

QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA COMO PARÂMETRO DE MONITORAMENTO DO PROCESSO

RICARDO VENTURA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Microbiologia Aplicada.

Rio Claro
Agosto / 2007

QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA COMO PARÂMETRO DE MONITORAMENTO DO PROCESSO

RICARDO VENTURA

Orientador: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Co-orientador: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Microbiologia Aplicada.

Rio Claro

Agosto / 2007

547.29 Ventura, Ricardo
V468q Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica
como parâmetro de monitoramento do processo / Ricardo
Ventura . - Rio Claro: [s.n.], 2007
92 f. : il., figs., tabs., gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis
Co-orientador: Jonas Contiero

1. Fermentação. 2. Produção de etanol. 3. Bactérias
láticas. 4. Lactato. 5. Lactímetro. I. título

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

À minha filha Isabella, maior razão do meu viver,

Dedico

Seria algo insensato estimar poder ser realizado o que até aqui não se conseguiu fazer, salvo se se fizer uso de procedimentos ainda não tentados.

Para que se penetre nos estratos mais profundos da natureza, é necessário que tanto as noções quanto os axiomas sejam abstraídos das coisas por um método mais adequado e seguro, e que o trabalho do intelecto se torne melhor e mais correto.

É preciso que se faça uma restauração da empresa a partir do âmago de suas fundações, se não se quiser girar perpetuamente em círculos, com progresso quase desprezível.

Não é tarefa fácil transmitir e explicar o que pretendemos, porque as coisas novas são sempre compreendidas por analogia com as antigas.

Francis Bacon

Novum Organum

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Instituto de Biociências da Unesp Rio Claro pela oportunidade da realização deste curso e desenvolver este trabalho.

Especialmente à minha orientadora, a estimada professora Dejanira, que mesmo do alto de sua reconhecida experiência não se limitou ao auxílio intelectual, agradeço pela acolhida, orientação, atenção, apoio e amizade.

Ao professor Dr. Jonas Contiero, meu co-orientador pela amizade, pelos muitos conhecimentos transmitidos e auxílio em várias etapas do trabalho.

Ao professor Dr. Pedro Oliva, da UNESP de Assis, pelas informações e conhecimentos transmitidos e pelo material bibliográfico.

Aos professores Corso e Edério pelas valiosas sugestões na qualificação.

Aos demais professores do IB e outras unidades da UNESP, onde cursei as disciplinas do programa, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao empreendedor professor Dr. Otávio Valsechi, o “Vico”, do Centro de Ciências Agrárias – CCA da UFSCar pela “força” e sugestões.

Ao professor Dr. Jorge Corrêa Lopes, do CCA da UFSCar, pelo material bibliográfico.

À Química Real e Elanco, na pessoa do colega Glauco Mello, pelo lactímetro, apoio financeiro, reconhecimento e valorização deste trabalho.

As colegas da Química Real: MSc. Marisol Camolez, pelas dicas, pelo material bibliográfico e dados de campo; MSc. Lina Vitti e Mariana Dallaqua, pelos dados de campo com lactímetro e companheirismo.

A TBW, na pessoa do seu diretor Ronaldo Mattar, pela concessão do lactímetro YSI e respectivos reagentes.

A John Cuomo da Phibro, pela oportunidade de conduzir os testes de campo com seus produtos.

Às destilarias e usinas de açúcar e álcool que permitiram a realização deste trabalho, ainda que por razões burocráticas não puderam ter seus nomes divulgados, e em especial aos respectivos colaboradores que nos acompanharam pacientemente nos testes.

Aos colegas do IB: Dra. Dilza e a Simone pelo inestimável apoio nos plaqueamentos; à Angela e a Arianne pelas culturas de bactérias lácticas; à Dra. Derlene pelas dicas fotográficas e correção do abstract; ao professor Peão e ao jovem Dr. Guilherme pelas orientações e auxílio com a estatística e ao Ronaldo pela formatação do texto.

E finalmente à minha esposa Cristiane, pela paciência e apoio logístico nesta empreitada.

ÍNDICE

	Página
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Produção de álcool via fermentativa.....	4
2.1.1 Produção de etanol no Brasil.....	9
2.1.2 Produção de etanol nos EUA.....	11
2.2 Contaminação bacteriana na fermentação etanólica.....	13
2.2.1. Bactérias láticas.....	15
2.3 Ácido láctico e sua interferência na fermentação etanólica.....	20
2.4 Controle do crescimento bacteriano e da produção de ácido láctico na fermentação etanólica.....	25
2.5 Importância do monitoramento da fermentação etanólica.....	30
2.5.1 Métodos utilizados nas destilarias brasileiras.....	31
2.5.2 Métodos utilizados nos EUA.....	33
2.5.3 Tecnologias alternativas.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Material	37
3.1.1. Equipamentos e reagentes.....	37
3.1.2. Microrganismos.....	38
3.1.3. Meio de ativação das leveduras e mostos de fermentação.....	39
3.1.4. Antibacterianos.....	39
3.2. Experimentos de laboratório.....	39
3.2.1. Ativação do inóculo de leveduras.....	39
3.2.2. Ativação das bactérias.....	40
3.2.3. Fermentação com diferentes BAL.....	40
3.2.4. Determinação do percentual dos isômeros D (–) e L (+) do ácido láctico formado nas fermentações.....	41
3.2.5. Teste de fermentação com pool de BAL em diferentes concentrações.....	41
3.2.6. Contagem de bactérias viáveis.....	42
3.2.7. Determinação do teor alcoólico do vinho.....	42
3.2.8. Determinação da floculação do vinho.....	42
3.2.9. Determinação da população da levedura.....	43
3.3. Ensaio de campo.....	43
3.3.1. Sítios de experimentação.....	43
3.3.2. Materiais e pontos de coleta nas indústrias.....	43
3.3.3. Preparo das Amostras.....	46
3.3.4. Quantificação do ácido láctico.....	46
3.3.5. Contagem microscópica de bactérias.....	47
3.3.6. Cálculo da massa de ácido láctico produzido na fermentação.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Resultados obtidos em laboratório.....	49
4.1.1. Fermentação etanólica com <i>S. cerevisiae</i> e diferentes bactérias láticas.....	49
4.1.2. Fermentação etanólica com <i>S. cerevisiae</i> e “pool” de bactérias láticas em diferentes concentrações.....	52
4.1.3. Determinação dos isômeros do ácido láctico.....	54
4.2. Resultados obtidos na indústria.....	56
4.2.1. Quantificação de ácido láctico em caldo de cana colhida (PCTS).....	56

4.2.2. Quantificação do ácido láctico durante a extração e concentração do caldo....	57
4.2.3. Fermentação batelada alimentada e contínua flocculante em destilaria anexa	60
4.2.4. Fermentação contínua em destilaria anexa.....	62
4.2.5. Quantificação de ácido láctico em fermentação sistema semicontínuo.....	64
4.2.6. Avaliação da eficácia de antibacterianos em fermentação etanólica.....	66
4.2.6.1. Fermentação batelada alimentada com tratamento contínuo de levedo.	66
4.2.6.2. Fermentação batelada alimentada com tratamento do levedo em batelada.....	68
4.2.6.3. Fermentação contínua multiestágios.....	70
4.2.7. Centrifugação do vinho e recuperação da levedura.....	72
4.2.8. Nova perspectiva de purificação de levedura na fermentação etanética	73
5. CONCLUSÕES.....	75
6. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES.....	76
7. LITERATURA CITADA.....	77
8. APÊNDICE	90

RESUMO

O ácido láctico foi quantificado no processo produtivo de várias destilarias do estado de São Paulo, com ênfase na fermentação, onde esse produto representa perdas de rendimento e afeta o metabolismo da levedura. As análises foram realizadas por meio de aparelhos dotados de tecnologia de enzima imobilizada, específicos para o isômero L(+) lactato e os resultados correlacionados com outros parâmetros do processo, obtidos pelas análises usuais. Na cana colhida, o teor de ácido láctico variou entre 10,0 a 297,0 mg/L, de acordo com estágio de deterioração da matéria-prima. Nas destilarias anexas à fábrica de açúcar, o ácido láctico foi detectado desde o caldo extraído nas moendas, onde se observou valor mínimo de 10 mg/L, até o mel final, no qual verificou-se teor superior a 8.800 mg/L. Nas fermentações contínuas registraram-se as maiores produções de ácido láctico, superando 3700 mg/L – equivalente a mais de 6% (m/v) do álcool produzido, enquanto que em batelada alimentada conseguiu-se manter teores ao redor de 300 mg/L por 16 ciclos fermentativos. Bactérias isoladas de diferentes destilarias, e inoculadas individualmente em fermentações em laboratório, produziram quantidades distintas de ácido láctico, de acordo com a espécie. Essa metodologia também foi empregada na avaliação da eficácia dos antibacterianos, usados freqüentemente nas destilarias brasileiras. Em fermentações tratadas com produtos específicos, a diminuição da atividade bacteriana determinou a queda na produção de ácido láctico em mais de 70% em um ciclo fermentativo.

Palavras chave: produção de etanol; bactérias lácticas; lactato; lactímetro.

ABSTRACT

The lactic acid was quantified in the ethanol production process of several distilleries of São Paulo State, especially in fermentation, where such product represents low yield and affects the metabolism of the yeast. The analysis were performed by equipments based on immobilized enzyme technology, specific for the isomer L(+) lactate and the results were correlated with others process parameters, got by the current methods. In the harvested cane, the lactic acid content varied from 10,0 to 297,0 mg/L, according to the deterioration of the raw material. In distilleries inside sugar factories, the lactic acid was quantified since the juice from crushers, where the registered values range from minimum of 10 mg/L until the molasses, in which values up to 8.800 mg/L were found. In the continuos fermentation it was registred the highest amount of lactic acid, up to 3.700 mg/L, corresponding to more than 6% of ethanol produced, while in fed batch it kept around 300 mg/L for 16 fermentaion cicles. Isolated from different distilleries, inoculated in laboratory fermentations, produced distinghished amount of lactic acid, according to the species. The method proposed also was used in the evaluation of efficacy of bactericidal, commonly used in the Brazilian distilleries. In fermentation treated with specific products, the reduction of bacterial activity leads the drop of lactic acid production up to 70% in one fermentation cicle.

Key words: ethanol production; lactic bacteria; lactate; lactimeter.

1. INTRODUÇÃO

As questões ambientais e econômicas em torno da utilização do petróleo têm intensificado a busca por fontes energéticas renováveis e menos poluentes. Nesse contexto, o etanol vem se consolidando como substituto economicamente viável aos combustíveis fósseis. No Brasil, a crescente frota de veículos equipados com motor flexível está resgatando o uso do álcool hidratado – combustível alternativo adotado há trinta anos com a implementação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Nos EUA, a legislação ambiental tem levado ao aumento do consumo de gasolina aditivada com álcool anidro, menos poluente. E vários países signatários do Protocolo de Quioto têm considerado essa fonte de energia renovável para diminuir a emissão dos gases causadores do efeito estufa. Em resposta a essa crescente demanda, a produção mundial de etanol vem se expandindo progressivamente, impulsionada por expressivos investimentos em novas unidades produtoras.

Para obtenção do etanol em grande escala, a síntese biológica tem se mostrado a mais viável, sendo adotada por praticamente toda indústria do álcool combustível, sobretudo onde há disponibilidade de biomassa. Nesse processo, chamado de fermentação etanólica, ou alcoólica, leveduras dotadas de enzimas apropriadas convertem os açúcares de um substrato em álcool etílico (etanol), o qual é recuperado através do processo de destilação.

Dentre os fatores que interferem na fermentação etanólica destaca-se a contaminação bacteriana. Nas destilarias que esmagam cana-de-açúcar, as

bactérias geralmente invadem o processo por meio dos colmos da planta contaminada ainda no campo. Mesmo nas indústrias que processam o milho em grãos, menos sujeito à deterioração, a etapa de sacarificação do amido e o longo tempo de fermentação também favorecem a proliferação desses microrganismos indesejáveis. Uma vez presentes no mosto, essas bactérias valem-se das condições propícias do meio fermentativo e multiplicam-se rapidamente, competindo pelos açúcares que deveriam ser transformados em etanol pelas leveduras.

Os lactobacilos são os contaminantes mais freqüentes na fermentação etanólica, sendo o ácido láctico o principal produto do seu metabolismo. Além das perdas devidas ao desvio de açúcar, o ácido láctico excretado no meio tem efeito inibitório sobre a levedura, comprometendo principalmente a reprodução e a síntese do etanol. Dessa maneira, o uso de agentes antibacterianos se faz necessário para manter a produção e o rendimento fermentativo em níveis elevados.

O monitoramento microbiológico da fermentação é imprescindível na detecção de variáveis interferentes do processo. Particularmente, a quantificação do ácido láctico reveste-se de importância na medida em que é um subproduto de diversos efeitos negativos e está relacionado com baixos rendimentos. Como a agroindústria do álcool processa grandes volumes de matéria-prima para obter um produto final de baixo valor agregado, o controle dessa variável é um fator chave para o sucesso dessa atividade.

Os países tidos como referência na produção de etanol – Brasil e EUA adotam diferentes procedimentos tanto na condução como no monitoramento do processo fermentativo, seja devido às particularidades das respectivas matérias-primas que utilizam, ou mesmo por questões econômicas e disponibilidade tecnológica. Nas destilarias brasileiras, o controle geralmente é feito por meio de análises químicas (pH e acidez) e microbiológicas (microscopia e plaqueamento). Essas técnicas nem sempre detectam as variações do processo e a qualidade das matérias-primas com precisão ou em tempo hábil, o que pode significar perdas de rendimento.

As destilarias de álcool norte-americanas, por sua vez, adotam outro conceito no monitoramento, baseado na quantificação dos produtos formados durante a fermentação – desde o próprio etanol e compostos do metabolismo

secundário das leveduras, como o glicerol, até os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias. Nessa metodologia é geralmente empregada a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) ou a espectroscopia de infravermelho (NIR). Essas técnicas analíticas permitem a rápida adoção de medidas corretivas, evitando perdas, bem como proporcionam maior precisão na avaliação do gerenciamento do processo.

Nesse contexto, busca-se, através desta pesquisa, a otimização do controle da produção de etanol nas destilarias brasileiras, tomando-se como paradigma o princípio adotado nas destilarias norte-americanas. Especificamente, o objetivo desse trabalho foi avaliar uma nova metodologia para o monitoramento da fermentação etanólica, baseada na quantificação do ácido láctico, por meio de análises enzimáticas. Esse método também foi empregado na verificação da qualidade microbiológica das matérias-primas e na avaliação da eficácia dos tratamentos antibacterianos utilizados no controle das contaminações durante a fermentação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção de álcool via fermentativa

Aproximadamente, 80% de todo etanol produzido mundialmente é obtido a partir de fermentação; o restante vem da síntese química do etileno derivado do petróleo. A produção do etanol é uma das mais imediatas e importantes aplicações da biomassa através de novos desenvolvimentos da biotecnologia, principalmente nas áreas de enzimas, microrganismos geneticamente modificados e fermentação (LIN; TANAKA, 2006).

A fermentação de açúcares por microrganismos, gerando álcool, é um dos fenômenos mais conhecidos e estudados da ciência. Civilizações antigas produziam bebidas que, atualmente sabemos, são resultantes de fermentação microbiana (PELCZAR et al., 1996). Essa constatação foi feita pela primeira vez por Antonie van Leewenhoek (1623-1723), ao observar amostras de cerveja em fermentação em seu microscópio rudimentar. Theodor Schwann demonstrou que leveduras eram responsáveis pela fermentação do álcool em vinhos e cervejas, contrariando a teoria da decomposição química da matéria. Em 1815, Gay-Lussac formulou a estequiometria da fermentação (Fig. 1) e, em 1863, Pasteur demonstrou a natureza anaeróbia da fermentação alcoólica. A partir de 1900, pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química de açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (KETCHUM, 1988; LIMA et al., 2001).

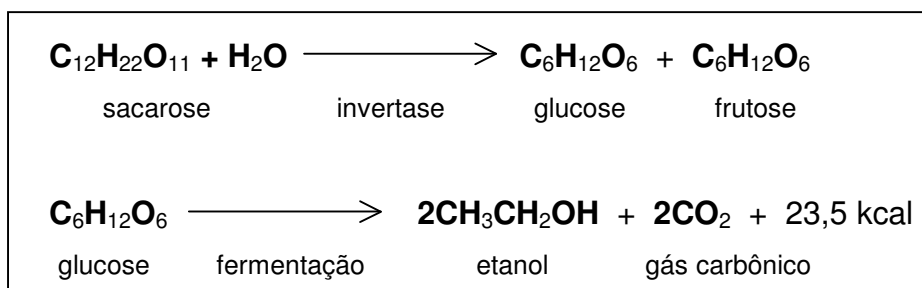


Figura 1. Reação estequiométrica da fermentação etanólica.

Fermentação é o termo geral que denota a degradação anaeróbia da glucose, ou outros carboidratos, em vários produtos (característicos para os diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP (Fig. 2). A quebra da glucose em duas moléculas de piruvato é, provavelmente, o mais antigo mecanismo biológico para obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis, uma vez que os microrganismos viviam em uma atmosfera destituída de oxigênio. No curso da evolução, essa rota bioquímica foi conservada.

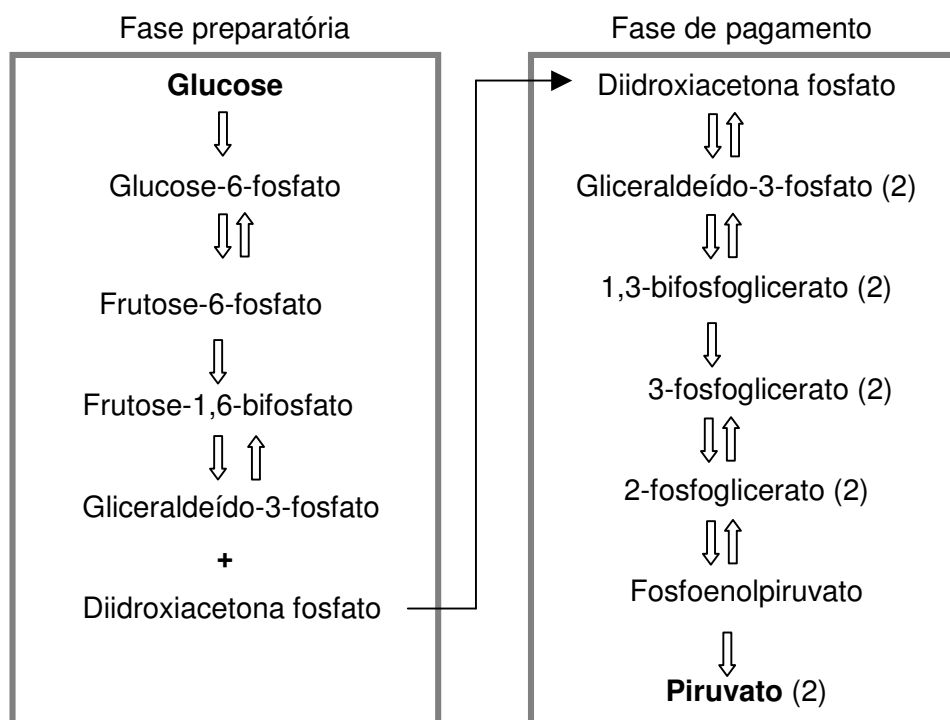


Figura 2. Esquema resumido da glicólise.

Um dos três destinos do piruvato produzido na glicólise depende do tipo de microrganismo e das rotas metabólicas. No caso da levedura, o piruvato é convertido em etanol e CO_2 em um processo de dois passos. Na primeira reação, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, através da ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH (Fig. 3). Portanto, a levedura transforma glucose em etanol e CO_2 e não em lactato (LEHNINGER et al., 2000).

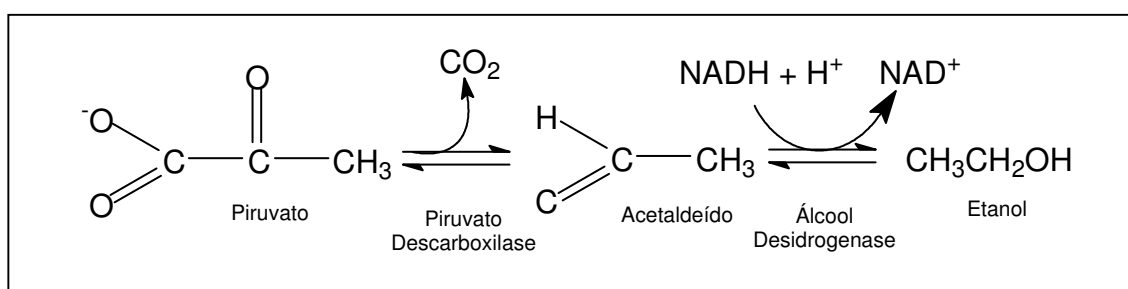


Figura 3. Destino do piruvato na fermentação alcoólica na levedura.

O etanol pode ser produzido a partir de qualquer matéria biológica que contenha quantidades suficientes de açúcares ou materiais que possam ser convertidos a açúcar, tal como amido ou celulose. A beterraba (*Beta vulgaris*) e a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) são as melhores produtoras de sacarose. O milho (*Zea mays*), o trigo (*Triticum spp.*) e a mandioca (*Manihot esculenta*) contém altos teores de carboidratos, porém o amido desses vegetais deve ser convertido em hexoses, através de enzimas apropriadas (VINH, 2003). Melaços representam uma matéria prima prontamente assimilável pela levedura, pois o açúcar predominante nesse material é a sacarose, a qual pode ser desdobrada em seus monossacarídeos constituintes – glucose e frutose, pela enzima invertase da levedura (POWER, 2003).

Microrganismos, alterados geneticamente ou não, são utilizados para produzir substâncias novas e mais valiosas, através da degradação de um substrato. O álcool etílico, por exemplo, pode ser produzido por leveduras ou bactérias que utilizam carboidratos como matéria-prima, sendo que na produção industrial de etanol são empregadas usualmente linhagens selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PELCZAR et al., 1997).

De acordo com Madigan et al. (2004), a fermentação etanólica é um processo microbiano no qual o produto é sintetizado durante a fase primária de crescimento da levedura. Ou seja, o etanol é originado no metabolismo energético, simultaneamente ao crescimento do microrganismo e produção de energia, ao contrário da fermentação de antibióticos, onde a formação do produto está dissociada do crescimento (Fig. 4).

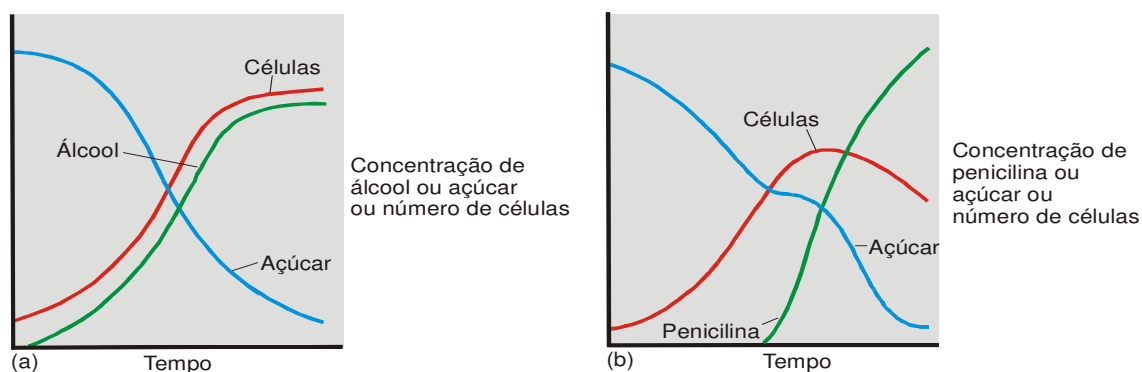


Figura 4. Produção de etanol (metabólito primário) por *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura (a); e produção de penicilina (metabólito secundário) por *Penicillium chrysogenum*, um fungo (b).

Na obtenção do álcool por via fermentativa, distinguem-se três fases: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação. O preparo do substrato é o tratamento da matéria-prima para dela se extraírem os açúcares fermentescíveis das distintas matérias-primas. A fermentação é o processo comum a todos os substratos, os quais, depois de fermentados, denominam-se vinhos – uma mistura de substâncias líquidas, sólidas e gasosas de constituição variável. Na destilação desses vinhos, recupera-se o etanol dos demais componentes (LIMA et al., 2001).

Os processos fermentativos, incluindo-se a fermentação etanólica, são classificados em três grupos por Borzani (1975) e Doin (1975), de acordo com a forma de condução: Descontínuos; contínuos e semicontínuos. Nos processos descontínuos ou “bateladas”, cada tanque fermentador recebe o inóculo previamente preparado, contendo uma suspensão concentrada de células ativas. O substrato é transferido para o reator de fermentação (dorna) e ao término do processo o produto final [ou meio fermentado] é retirado do reator. Já na operação contínua, a matéria-prima e o inóculo são adicionados simultaneamente a uma vazão constante e o meio fermentado, ou produto, é

retirado na mesma vazão de alimentação. O sistema semicontínuo conjuga as características dos dois processos anteriores. Na prática, um reator primário recebe o substrato e o inóculo continuamente e o meio em fermentação é transferido a mesma vazão para um ou vários reatores para finalizar a fermentação.

Em microbiologia industrial, uma produção economicamente viável somente é possível se for realizada em grande escala. O etanol, por exemplo, é um composto comercializado em grandes quantidades a preços relativamente baixos; portanto o processo microbiano deve ser refinado e realizado com elevada eficiência para se conseguir uma produção economicamente rentável (MADIGAN et al., 2004).

Embora a produção de álcool via fermentativa seja essencialmente um processo simples, conduzi-lo com alta eficiência em larga escala é uma notável combinação de microbiologia e engenharia (LYONS, 2003a). De acordo com Silcox e Lee (1948), citados por Shreve e Brink (1977), os pré-requisitos básicos de um bom processo fermentativo são: Um microrganismo de crescimento rápido; que mantenha a uniformidade biológica e sintetize o produto final desejado com eficiência; matérias-primas de baixo custo; fermentações rápidas de alto rendimento e produto de fácil recuperação e purificação. Por outro lado, alguns fatores críticos das fermentações industriais são: Temperatura; pH; aeração-agitação; inóculo [e contaminação].

Diversos métodos não convencionais de fermentação etanólica têm sido propostos. Lin e Tanaka (2006) descrevem várias técnicas para imobilização de células microbianas, cujas vantagens teóricas são a manutenção de altas concentrações de substrato, elevados teores de álcool no meio, menor contaminação e diminuição de custos em equipamentos.

Maiorella et al. (1984a) propõem um sistema de fermentação extrativa a vácuo, no qual a retirada de etanol do meio, à medida que fosse produzido, proporciona maior teor alcoólico e menor produção de células e, conseqüentemente, maior rendimento.

Fermentações com alto teor alcoólico, através do sistema *Very High Gravity* (VHG) também foram experimentadas em mostos de melaço e caldo de cana por Jones et al. (1994). Rendimentos entre 90 – 93% foram conseguidos com mostos de concentração entre 10,4 – 47,6% (m/v).

Nas últimas décadas, diversos microrganismos têm sido manipulados por engenharia genética, especificamente para produzirem etanol a partir de fontes não convencionais. Badger (2002) relata os recentes desenvolvimentos de tecnologia economicamente viável, que começam a emergir, para se produzir etanol a partir da celulose.

2.1.1 Produção de etanol no Brasil

Há décadas o álcool tem sido cogitado como combustível automotivo por vários países e o Brasil foi o pioneiro em ter êxito com um programa de grande escala para produção de etanol. O álcool carburante obteve sucesso por ter superado problemas tecnológicos, tanto na produção agrícola e industrial, como nos motores ciclo Otto, tornando-se um combustível substituto viável à gasolina (RIBEIRO, 1997).

A crise do petróleo de 1974 fez com que se iniciasse no país uma fase de grande importância na produção de etanol. Dos 700 milhões de litros por ano, a indústria passou a produzir 15 bilhões de litros, tanto para abastecer a frota de mais de 4 milhões de automóveis movidos a álcool hidratado, como ser misturado à gasolina, na versão desidratada. Com a utilização em larga escala do etanol como combustível ocorreu a ampliação das lavouras canavieiras, a modernização das destilarias anexas às usinas de açúcar e instalaram-se novas unidades autônomas (LIMA et al., 2001).

Entre 1975 e 2000, período no qual o Brasil produziu cerca de 227 milhões de litros de álcool, substituindo combustível fóssil, 173 milhões de toneladas de carbono deixaram de ser liberadas na atmosfera (MELFI, 2005).

A Figura 5 mostra a evolução da produção brasileira de etanol combustível nos últimos 12 anos.

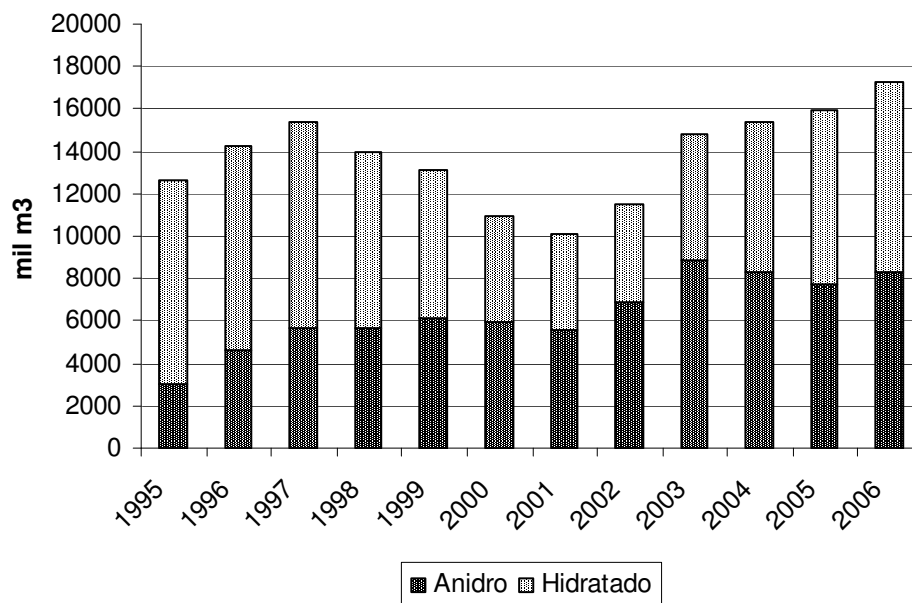


Figura 5. Evolução da produção de etanol no Brasil (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA – UNICA, 2007).

Os processos fermentativos mais usados no Brasil são baseados no chamado Melle-Boinot, cuja principal característica é recuperação das leveduras ao final de cada fermentação, mediante a centrifugação do vinho. As leveduras recuperadas são submetidas a um tratamento, no qual se faz diluição com água; adição de ácido sulfúrico até pH 2,5; agitação por 1 a 3 horas e retorno aos reatores de fermentação. O preparo do mosto envolve a mistura de caldo de cana com xarope ou melaço, ou ainda caldo concentrado, nas destilarias autônomas (GOLDENBERG; MACEDO, 1994).

No Brasil, 70% das destilarias que produzem álcool usam o processo de fermentação em bateladas. A alta densidade celular (8 – 17% v/v) e temperaturas de 33 – 35°C contribuem para inibir o crescimento da população de leveduras e proporcionam altas concentrações de etanol (8 – 11% v/v) e alto rendimento alcoólico. O curto tempo de fermentação (6 – 10 h) compensa o período limitado de aproximadamente 200 dias de safra (WHEALS et al., 1999).

Alguns processos alternativos têm sido propostos na produção de etanol no Brasil, como reatores tipo torre para fermentação contínua, utilizando leveduras de linhagens floculantes (VIEGAS et al., 2002).

2.1.2 Produção de etanol nos EUA

O desabastecimento de petróleo do Oriente Médio e as preocupações ambientais com o chumbo na gasolina, ocorridos a partir dos anos 1970, renovaram o interesse dos EUA no álcool combustível. O *Clean Air Act* (Ato do Ar Limpo) obrigou a adição de 2% de aditivos oxigenados na gasolina e impulsionou o consumo de álcool, maior a cada ano (LYONS, 2003b).

A produção norte-americana de etanol cresceu quase dez vezes entre 1980 e 1998, a partir da entrada de grandes companhias agrícolas suportadas por subsídios patrocinados pelo governo federal (DIPARDO, 2004).

Segundo o Departamento de Agricultura dos EUA, mais de 25 milhões de toneladas de milho são destinadas à produção de etanol. Desde o ano 2000, a produção americana de etanol vem crescendo expressivamente por meio de novas unidades e, em 2005, o volume produzido superou 15 bilhões de litros, como mostra a Figura 6 (LYONS, 2003b).

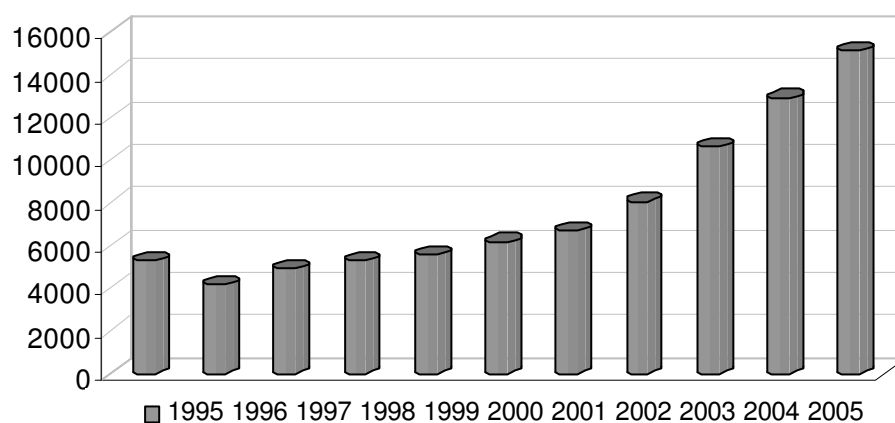


Figura 6. Produção de etanol nos EUA nos últimos 10 anos.
Fonte: RENEWABLE FUEL ASSOCIATION – RFA (2006).

Industrialmente, há dois processos para produção de etanol a partir do milho: a moagem úmida e a moagem seca. Neste último, a semente de milho é moída sem a separação dos vários componentes, sendo o mais utilizado. O

milho macerado é cozido em água, a alta temperatura para diminuição do nível de bactérias na fermentação. É promovida então, a sacarificação, na qual o amido é desdobrado em açúcares fermentescíveis. O mosto obtido é resfriado e transferido para os fermentadores, onde leveduras são adicionadas e a conversão de açúcares em etanol e CO₂ se inicia. O tempo de fermentação fica entre 40 a 50 horas e, nesse período, o meio é mantido resfriado e agitado para facilitar a atividade da levedura. O meio fermentado é então transferido para as colunas de destilação, onde o etanol é separado do restilo remanescente (RFA, 2006).

A sacarificação do amido ocorre em duas fases: A dextrinização, na qual o amido é parcialmente degradado a dextrinas solúveis; e a verdadeira sacarificação, na qual as dextrinas são hidrolisadas às açúcares fermentescíveis. Essas fases podem ser conduzidas por hidrólise ácida ou enzimática, com rendimento entre 95 – 97%. Tradicionalmente duas enzimas catalisam a conversão de amido a glucose. No primeiro estágio, a α -amilase cliva aleatoriamente as ligações α -1-4 dos polímeros de glucose em oligossacarídeos menores. Na etapa de sacarificação, glucoamilase hidrolisa os oligossacarídeos em subunidades de glucose livres (POWER, 2003).

As destilarias geralmente não reciclam levedura; culturas frescas de células são adicionadas continuamente, podendo ser adquiridas de um fornecedor ou produzidas na própria destilaria, a partir de uma unidade propagadora. Processos contínuos utilizam simultaneamente a sacarificação e fermentação (SSF), com adição de antibióticos contra contaminação bacteriana (WHEALS et al., 1999).

A Tabela 1 compara alguns parâmetros da fermentação etanólica entre os maiores produtores mundiais (WHEALS et al., 1999).

Tabela 1. Parâmetros da produção de etanol via fermentativa

País	Matéria-prima	Tempo fermentação	Rendimento (L/ha)	Rendimento Fermentativo ² (%)	Custo produção ³ (US\$/L)
Brasil	Cana	8	9000	92,0	0,20
EUA	Milho	40	4400	89,0	0,25

² Baseado na máxima produção teórica de 511 g etanol (kg glucose)⁻¹

³ Burnquist (2007)

2.2 Contaminação bacteriana na fermentação etanólica

Ao final do século XIX, Pasteur, investigando vinhos fermentados por leveduras, observou que quando a bebida adquiria um gosto azedo e odor predominante de ácidos láctico e butírico, bactérias também estavam presentes. Ele concluiu que o açúcar servia de alimento para os microrganismos e cada substância formada era devida a um tipo específico que se desenvolvia naquelas condições (KETCHUM, 1988).

A contaminação bacteriana é a maior causa da diminuição no rendimento de etanol durante a fermentação de matérias primas à base de amido ou açúcar por leveduras *S. cerevisiae*. O açúcar consumido pelas bactérias é desviado da produção de álcool e é convertido em produtos secundários, os quais são inibitórios para o crescimento e metabolismo da levedura (NARENDRANATH, 2003).

Segundo Lima et al. (2001), desde que a fermentação industrial não é conduzida em condições de completa assepsia, a contaminação bacteriana, principalmente de *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e compromete o rendimento do processo fermentativo.

Microrganismos contaminantes podem entrar nos reatores de fermentação de várias maneiras, dependendo do método e padrão de cada indústria. Como a limpeza e desinfecção das plantas de álcool combustível não são rigorosas quanto em uma cervejaria, os contaminantes podem se desenvolver nos tanques, linhas de transferência e trocadores de calor (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

Segundo Duncan e Colmer (1964), a produção de álcool a partir de cana enfrenta sérios problemas em relação a contaminantes, pois a matéria prima leva consigo para dentro da indústria uma grande quantidade de microrganismos que fazem parte de sua microbiota.

Pode-se afirmar que a contaminação bacteriana ocorre onde existem nutrientes e temperatura adequados. A formação de espuma é também uma porta que possibilita a contaminação (AQUARONE; SATO, 2001).

Nas destilarias que processam amido de milho, a etapa de sacarificação do mosto ocorre normalmente a 60 – 65°C (temperatura ótima de ação das

enzimas), as quais nem sempre impedem a proliferação de lactobacilos (KELSALL; LYONS, 2003a). Segundo Ingledew (2003a), é um desafio eliminar a contaminação bacteriana em fermentações de milho, pois as espécies de *Lactobacillus* tolerantes ao calor desenvolvem-se após o cozimento do amido, gerando focos de infecção. Contaminantes e seus produtos finais podem também afetar fermentações subseqüentes por meio da recirculação de água.

Thomas et al. (2001), simulando uma fermentação de mosto de milho em batelada contaminada com diferentes bactérias lácticas, observaram queda no rendimento em álcool, desvio dos carboidratos para produção de glicerol e ácido láctico, perda de viabilidade e queda na taxa de multiplicação da levedura.

Em destilaria de álcool de cana, a contaminação por bactérias que atinge a fermentação pode ocorrer através do mosto, bem como pela água de diluição do levedo (CAMOLEZ; MUTTON, 2005).

McKenzie e Kenny (1965) e Simpson (1968), citados por Bryan-Jones (1975) descrevem o pH (3,6 – 4,2) e as altas temperaturas (32°C), como condições favoráveis para a boa adaptabilidade de bactérias lácticas nas fermentações de uísque. Makanjuola et al. (1992) reportaram diminuição da utilização de carbono, queda no rendimento e floculação da levedura em fermentação de malte simulada, contaminada por bactérias isoladas de destilaria de uísque.

Fahrasmane e Ganou-Parfait (1998) citam que a fermentação de rum exhibe uma microflora diversificada em função do tipo de matéria-prima utilizada e algumas substâncias produzidas por bactérias causam distúrbio na fermentação e prejudicam as qualidades do produto final.

A contaminação de cerveja por bactérias como *Lactobacillus* é um problema que afeta a qualidade da bebida através da formação de acidez e aumento da turbidez (SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

Segundo Narendranath et al. (1997), mesmo contaminações bacterianas ao nível 10^5 UFC/mL nos reatores de fermentação [considerado ótimo na maioria das destilarias brasileiras], a contaminação interfere no crescimento da levedura e na saída de álcool. Kelsall e Lyons (2003b) relacionaram a população de bactérias contaminantes com perdas de rendimento da fermentação alcoólica (Tab. 2).

Tabela 2. Relação estimada entre número de bactérias na fermentação etanólica e respectivas perdas equivalente em etanol

Bactérias viáveis (UFC/mL)	Perda de álcool ¹ (% v/v)	Perda equivalente de álcool ² (litros)
10 ⁵	0,1 – 0,2	303.000
10 ⁶	0,2 – 0,4	848.000
10 ⁷	0,6 – 1,0	2.120.000
10 ⁸	0,9 – 1,2	2.544.000
10 ⁹	1,0 – 1,5	3.180.000

¹ Depende da linhagem da bactéria láctica.

² Perda máxima calculada com base em uma produção de 151.000 m³/ano.

Oliva-Neto e Yokoya (1994) mostraram os efeitos da contaminação bacteriana sobre a levedura em fermentação alcoólica. Enquanto que a acidez produzida aumentou em 2,7 vezes ao longo de 15 ciclos fermentativos, a viabilidade da levedura *S. cerevisiae* diminuiu mais de 64%, assim como o rendimento de etanol decresceu de 75% para 49%.

Em outro experimento, Oliva-Neto e Yokoya (1997) constataram que e a autólise das células de leveduras, devida ao aumento da acidez, liberou aminoácidos essenciais ao crescimento da bactéria a partir do segundo ciclo, favorecendo o aumento da contaminação.

Estudos realizados em fermentação de cerveja por White e Kidney (1981) mostraram que o antagonismo entre *S. cerevisiae* e *Lactobacillus brevis* não depende apenas do número de microrganismos, uma vez que diferentes linhagens de levedura são susceptíveis a diferentes concentrações da bactéria no mesmo meio.

2.2.1 Bactérias lácticas

O conceito de bactérias do ácido láctico (BAL) foi desenvolvido a partir dos primeiros anos do século XX. O nome do grupo foi criado para bactérias que causam a fermentação e coagulação do leite e esse é o conceito essencial do grupo tal como existe hoje, quando ele é relacionado como sinônimo de

grande parte da família *Lactobacillaceae*. O grupo é constituído de bactérias Gram-positivas; não esporulantes; fermentadoras de carboidrato, produtoras de ácido; anaeróbias; ácido-tolerantes; catalase-negativas; tipicamente sem motilidade e não redutoras de nitrato (INGRAM, 1975).

Kandler e Weiss (1986) ressaltam que as bactérias do ácido láctico são microaerófilas ou aerotolerantes. As células podem ser bastonetes ou cocos, têm exigências nutricionais complexas e produzem o ácido láctico como maior produto final do metabolismo de carboidrato.

Em especial, o gênero *Lactobacillus* compreende células na forma de bastonetes medindo $0,5 - 1,2 \times 1,0 - 10 \mu\text{m}$, geralmente longos, mas ocasionalmente são quase cocóides, podendo ocorrer em cadeias curtas. A temperatura ótima de crescimento está entre $30 - 40^\circ\text{C}$ (HOLT et al., 1994).

Exceto pelo seu metabolismo, as BAL são um grupo particularmente diverso de organismos com poucas características comuns (RADLER, 1975).

A Tabela 3 mostra a classificação das bactérias lácticas, proposta por Stanier et al. (1986).

Tabela 3. Subdivisão taxonômica das bactérias lácticas

Gênero	Morfologia e agrupamento celular	Tipo de fermentação	Isômero do ácido láctico	Percentual C + G ¹
<i>Streptococcus</i>	Esferas em cadeia	Homolática	L	33-44
<i>Leuconostoc</i>	Esferas em cadeia	Heterolática	D	38-44
<i>Pediococcus</i>	Esferas em tetraedro	Homolática	DL	34-44
<i>Lactobacillus</i>	Bastonetes	Variável	Variável	35-51

¹C + G: bases citosina + guanina

Segundo Lehninger et al. (2000), as bactérias lácticas são virtualmente as únicas desprovidas de catalase que conseguem crescer em condições aeróbias. Apesar de serem incapazes de sintetizar ATP por meios respiratórios, as BAL não têm seu crescimento afetado pela presença ou ausência de ar. As BAL podem ser divididas em dois subgrupos bioquímicos, distinguíveis pelos produtos formados a partir da glucose. As homofermentativas convertem glucose quase quantitativamente a ácido láctico, através da rota Embden-

Meyerhof e as heterofermentativas em uma mistura equimolar de ácido láctico, etanol e CO₂ pela rota oxidativa pentose fosfato (Fig. 7).

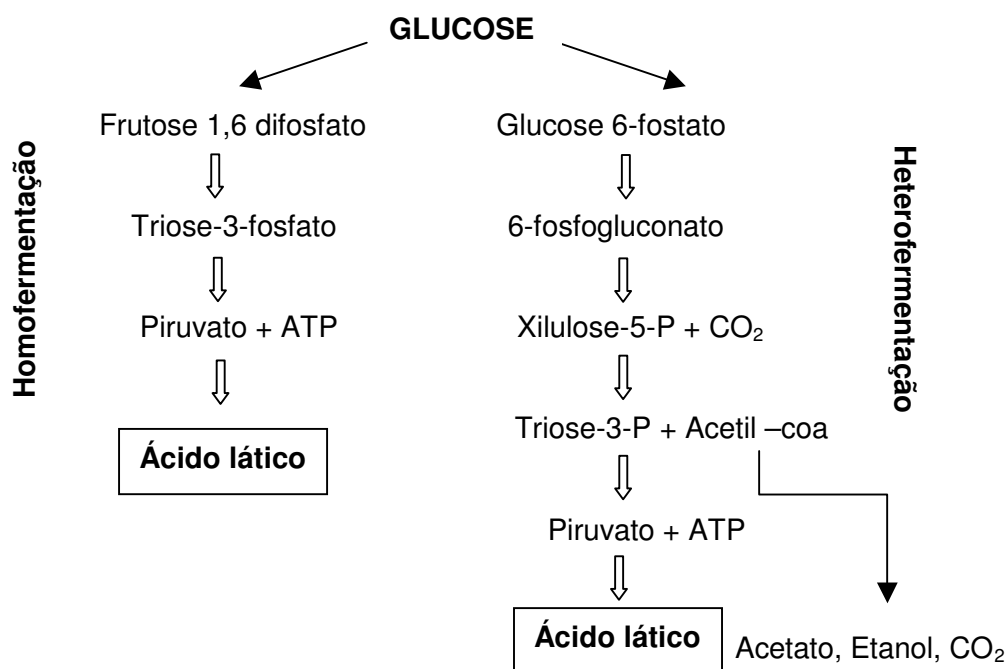


Figura 7. Representação resumida da fermentação de glucose em bactérias homoláticas e heteroláticas.

De acordo com Narendranath (2003), a diferença entre os produtos de fermentação das bactérias lácticas homofermentativas e as heterofermentativas é determinada pela presença ou ausência da enzima aldolase.

A diversidade das BAL se estende aos substratos fermentescíveis. Além da glucose, outras hexoses como frutose e manose; dissacarídeos como galactose, maltose e sacarose; e polissacarídeos, como amido e dextrina, servem às espécies homofermentativas, providas de enzimas que transformam esses carboidratos em intermediários para a rota glicolítica (WOOD, 1961).

As bactérias lácticas são encontradas no leite, plantas, silagem, vinho, cerveja e no intestino de humanos e animais. São importantes na produção de vários tipos de queijos e alimentos, como pães e bebidas lácteas, contudo, podem ser prejudiciais, por exemplo, por causar cáries nos dentes, através da liberação de ácido e pela produção de glucana ou na produção de vinho e outras bebidas (KETCHUM, 1988; RADLER, 1975).

Entre os contaminantes encontrados na produção de álcool, as bactérias do ácido láctico (BAL) são as mais nocivas, devido à sua habilidade de sobreviver sob condições da fermentação etanólica (temperatura ótima entre 30 e 40°C e pH ótimo de 5,5 – 6,0). Nestas condições, as BAL possuem um eficiente metabolismo de carboidratos e o tempo de duplicação da população é bem mais rápido que da levedura (NARENDRANATH, 2003).

O caráter microaerófilo das BAL é preponderante para que elas sobrevivam na terra aderida às raízes, folhas e colmos da cana. Muitas dessas bactérias se adaptam muito bem ao meio ambiente que existe nos estágios da produção de açúcar. Apesar da acurada exigência nutricional das BAL's, o caldo em processo parece conter quantidades adequadas de aminoácidos, vitaminas e minerais para seu crescimento, e causam significantes perdas de sacarose por inversão durante o curto período antes da etapa de clarificação. Muitas espécies excretam gomas extracelulares, as quais ajudam a proteger as células dos efeitos letais do calor e agentes químicos (TILBURY, 1975).

Segundo Silva e Canhos (1990), a cana de açúcar em estágio de deterioração avançado compromete o processo, pois introduz elevada quantidade de microrganismos na indústria, as quais produzem metabólitos prejudiciais a partir do açúcar disponível.

Os melaços industriais de beterraba, também usados para fermentação alcoólica também são substratos para o crescimento de algumas bactérias, especialmente as bactérias do ácido láctico (ESSIA-NGANG et al., 1989).

Rosales (1989) isolou diversas bactérias contaminantes a partir de amostras de mosto, vinho de fermentação alcoólica, fermento centrifugado e fermento tratado com ácido sulfúrico, provenientes de usina de açúcar e álcool. A identificação revelou *Lactobacillus sp* (45,04%); *Leuconostoc mesenteroides* (14,41%); *Bacillus sp* (9,46%); *Acetobacter sp* (7,21%); *Enterobacter sp* (6,75%); *Sporolactobacillus sp* (3,60%); *Acinetobacter sp* (3,60%); *Xantobacter sp* (3,60%); *Micrococcus varians* (1,80%); *Staphylococcus sp* (1,35%); *Escherichia coli* (1,35%) e *Citrobacter sp* (0,50%), comprovando a predominância de bactérias lácticas no processo de fermentação alcoólica.

Gallo (1992) identificou a microbiota bacteriana de amostras de mosto e vinho fermentado de uma usina brasileira. O resultado mostrou a predominância de bactérias Gram positivas (98,52%); na forma de bastonetes

(87,76%); não esporuladas (73,95%). Os gêneros predominantes foram *Lactobacillus* (59,75%); seguido de *Bacillus* (26,85%). As espécies predominantes foram *Bacillus coagulans* (15,09%); *Lactobacillus fermentum* (15,04%); *Lactobacillus helveticus* (14,08%); *Bacillus stearothermophilus* (6,91%) e *Lactobacillus plantarum* (5,69%).

Em torre de resfriamento no processo de produção de álcool, a microbiota do caldo de cana apresentou-se predominantemente bacteriana (88%), sendo 87% Gram (+). As cepas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram os contaminantes mais frequentes (38%), seguindo-se os gêneros *Staphylococcus* (23%) e *Leuconostoc* (12%) (SILVA e CANHOS, 1990).

Nas fermentações de mosto de milho em destilarias norte-americanas Skinner e Leathers (2004), da mesma forma, constataram que os contaminantes mais comuns são as bactérias do ácido lático, chegando a 77% do total dos isolados.

As bactérias lácticas também provocam o indesejado fenômeno da floculação da levedura, induzida principalmente por *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructuosus* e *L. buchneri*. Esse fenômeno ocorre por interação entre componentes protéicos da parede celular dessas bactérias, potencializado pela presença de íons cálcio no meio (Fig. 8). O grau da floculação na fermentação etanólica varia com a relação entre bactérias e levedura oscila entre 0,20 a 3,0 (ALCARDE e YOKOYA, 2003).

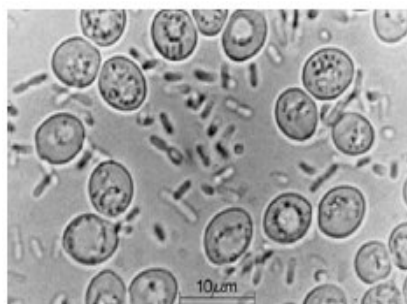
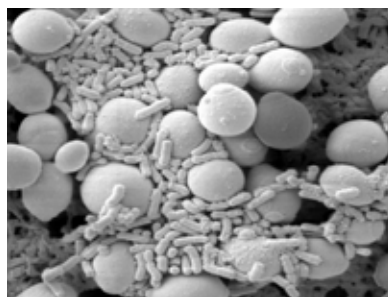
**a****b**

Figura 8. Leveduras e lactobacilos dispersos (a) e floculados (b) em fermentação etanólica (Russell, 2003; Godoy, 2002).

Muitas bactérias heterofermentativas, como os gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* também contêm a enzima manitol desidrogenase e, portanto, produzem manitol como um produto da fermentação da frutose. Outras BAL homofermentativas, como *Streptococcus* e *Lactobacillus*, sob condições de escassez de substrato, podem produzir outros metabólitos além do ácido láctico, como etanol e acetato. Porém, em condições de excesso de nutrientes, a concentração de intermediários do catabolismo do açúcar é alta, e o piruvato é convertido quantitativamente em lactato (STANIER et al., 1986).

2.3 Ácido láctico e sua interferência na fermentação etanólica

Como já visto, o ácido láctico é o principal produto do metabolismo das hexoses pelas bactérias lácticas, através da rota metabólica do piruvato obtido na glicólise. A redução do piruvato a lactato (forma dissociada do ácido láctico) ocorre sob condições anaeróbias, sendo catalisada pela enzima lactato desidrogenase (Fig.9). Embora existam dois passos de oxidação-redução quando a glucose é convertida a lactato, não há variação do estado de oxidação do carbono, e a relação entre C:H é a mesma. Muitos microrganismos não podem metabolizar o ácido láctico formado, sendo então excretado no meio ambiente (KETCHUM, 1988; LEHNINGER et al., 2000).

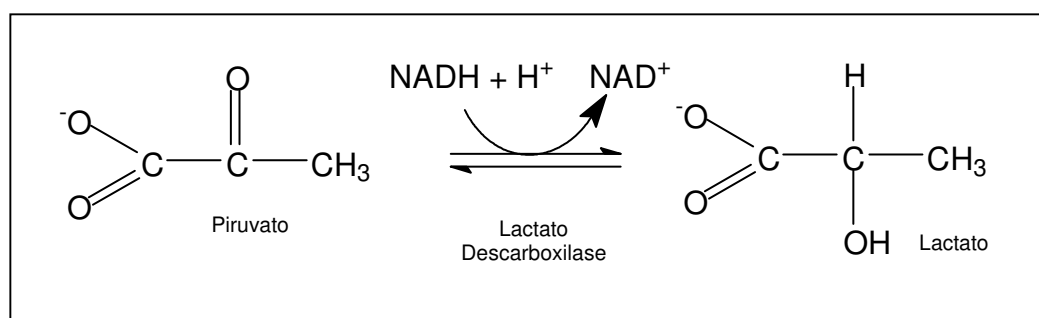


Figura 9. Diminuição do piruvato, catalisada pela enzima lactato desidrogenase, formando o isômero L(+) lactato.

A razão ecológica para a produção do ácido láctico por certas bactérias reside na hipótese da antibiose entre as espécies. Relações antagônicas entre microrganismos, que visam sua sobrevivência na natureza, inclui a produção de substâncias por uma espécie, que é tóxica à outra (SEELEY et al., 1984).

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) de fórmula $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ é um líquido viscoso, higroscópico, inodoro, de sabor azedo, ponto de fusão 18°C e ponto de ebulição 122°C . Pode ser sintetizado quimicamente ou pela via biológica, pelas bactérias lácticas, ou nos tecidos musculares em atividade, quando o oxigênio é limitado (DAINTITH, 1996).

Quando o ácido láctico é produzido naturalmente por bactérias, através da fermentação da lactose e outros açúcares no leite, ocorre a dissociação em lactato e H^+ fazendo baixar o pH, o que provoca desnaturação da caseína do leite e, conseqüentemente, sua precipitação (KETCHUM, 1988).

O ácido láctico é um produto industrial valioso porque seus derivados têm várias aplicações. Por exemplo, o lactato de cálcio e o lactato de ferro são utilizados como complementos alimentares (PELCZAR et al, 1997). Isolado a primeira vez por Scheele, do leite azedo, o ácido láctico foi o primeiro ácido orgânico produzido industrialmente por fermentação, em 1880 nos EUA (PENNA, 2001). Largamente utilizado nas indústrias alimentícias, químicas, farmacêuticas, de processos, entre outras, o ácido láctico é uma especialidade química utilizada na produção de plásticos biodegradáveis a partir de fontes renováveis (ZHOU et al, 2003).

A produção dos polímeros de ácido láctico necessita de isômeros puros do monômero do ácido láctico, sendo que as formas D(-) e L(+) somente são conseguidas separadamente através da fermentação de substratos apropriados por BAL específicas. A quantidade de ácido láctico produzido varia conforme a espécie de bactéria utilizada (Tab. 4) (WEE et al, 2006).

Por outro lado, experimentos com *L. plantarum* e *L. bulgaricus*, realizados por Mirdamadi et al. (2002), mostram que uma mesma espécie de bactéria exibe diferenças significativas nos índices de produção e rendimento de ácido láctico em função da concentração de glucose do meio fermentativo.

Tabela 4. Bactérias produtoras de ácido láctico e respectivos dados de rendimento fermentativo

Bactéria	Ácido láctico (g/L)	Rendimento (g/g)	Produtividade (g/L.h)
<i>Enterococcus faecalis</i>	144,0	0,96	5,1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	90,0	0,97	3,8
<i>Lactococcus lactis</i>	90,0	0,76	1,6
<i>Lactobacillus casei</i>	82,0	0,91	5,6
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	76,2	0,70	0,8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	67,0	0,84	2,5
<i>Lactobacillus helveticus</i>	65,5	0,66	2,7
<i>Lactobacillus plantarum</i>	41,0	0,97	1,0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	38,7	0,90	3,5
<i>Lactobacillus pentosus</i>	21,8	0,77	0,8

Pesquisas em várias usinas de açúcar mostraram que enquanto o ácido láctico estava ausente na cana colhida fresca, ele foi encontrado na cana que chega à moenda, horas depois. Desse modo, conclui-se que o produto formou-se por fermentação bacteriana da sacarose durante o período de espera para o processamento da matéria-prima (MCMASTER; RAVNÖ, 1977).

A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e essa é a principal responsável pelos problemas da fermentação alcoólica na indústria (LIMA et al., 2001). Segundo Stuppiello (1984), algumas das substâncias que provocam efeitos negativos na fermentação têm sua origem no próprio processo fermentativo.

Entre os metabólitos microbianos da fermentação alcoólica, o ácido láctico é o maior componente. Esse inibidor afeta a taxa de crescimento específico da levedura e a taxa específica da produção de álcool de diferentes modos (ESSIA-NGANG et al., 1989).

Porém, de acordo com Kelsall e Lyons (2003b), a levedura produz alguns ácidos orgânicos, mas em concentrações relativamente baixas, comparadas aos lactobacilos.

Maiorella et al. (1984b), observaram que a concentração inibitória de ácido láctico para a *S. cerevisiae* varia 10 – 40 g/L, sendo que 80% de diminuição na massa de células de levedura ocorreu com 38 g/L.

O efeito inibitório de ácidos orgânicos fracos, como o ácido láctico, sobre o crescimento da levedura depende do pH do meio, da constante de dissociação do ácido e da sua concentração molar. Em solução, um ácido orgânico está em equilíbrio entre o estado dissociado e protonado, conforme a equação formulada por Henderson-Hasselbach: $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$; onde A^- e HA são as espécies dissociadas e não dissociadas, respectivamente. Essa equação indica que em pH acima de seu valor de pK_a , mais de 50% do ácido está dissociado e que a concentração do ácido não dissociado cresce logaritmicamente com o declínio do pH. Desde que ácidos orgânicos são mais tóxicos para microrganismos a pH baixos, assume-se que a atividade antimicrobiana desses ácidos é o resultado de um aumento na proporção de moléculas não dissociadas (SALMOND et al., 1984).

Células de *S. cerevisiae* em meio de glucose, que perderam o simporte próton-lactato, foram usadas no estudo da cinética de absorção de ácido láctico não dissociado em diversos valores de pH por Cassio et al. (1987). O experimento mostrou que os valores da constante de difusão aumentaram exponencialmente com o pH, linearmente com o aumento da concentração de próton extracelular. Desse modo, a difusão passiva de ácido láctico não dissociado através da membrana plasmática da levedura é sujeita a influência oposta do pH; aumenta devido ao aumento relativo do ácido não dissociado com pH decrescente, e diminui devido à diminuição da permeabilidade com o declínio do pH. A taxa de acúmulo de lactato no interior da célula depende da diferença de pH de um lado e outro da membrana (Fig. 10).

Ácidos fracos não dissociados difundem-se passivamente para dentro da célula microbiana até que o equilíbrio seja estabelecido através da membrana. Assim que a molécula entra no citoplasma, elas dissociam-se no devido pH intracelular. Os prótons liberados são então bombeados para fora da célula na troca por outros cátions ou são neutralizados pelo poder tampão do citoplasma (BOOTH; KROLL, 1989).

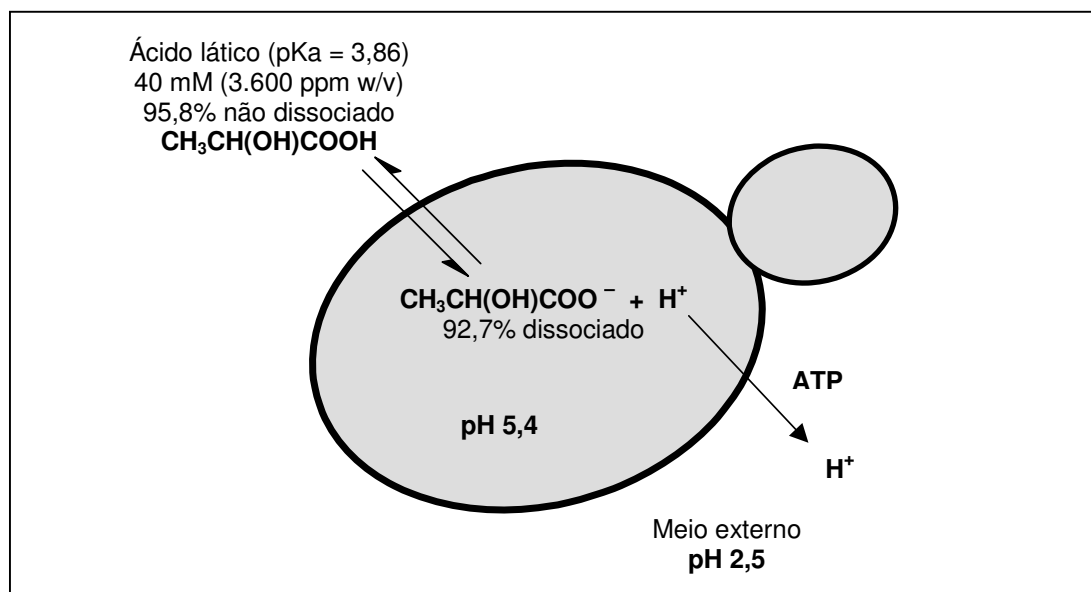


Figura 10. Ilustração do transporte de ácido láctico do meio externo para o interior da célula de levedura, dissociando-se em ânion lactato (Narendranath et al., 1997).

Com o aumento da concentração dos ácidos no meio a 30 °C, a taxa de crescimento específico das duas linhagens decaiu exponencialmente ($r^2 > 0,9$) e o comprimento da fase lag aumentou de mesmo modo. A concentração inibitória mínima (CIM) do ácido láctico para o crescimento da levedura foi de 2,5% (m/v) ou 278 mM para ambas linhagens. Contudo, concentrações de 0,2 – 0,8% (m/v) começam a estressar a levedura com diminuição da taxa de crescimento e declínio nas taxas de consumo da glucose e da produção de álcool (Fig. 11). O efeito desses ácidos orgânicos é sinérgico; quando outros agentes de estresse estão presentes na fermentação etanólica (como alto teor alcoólico, alta temperatura e baixo pH), afetam ainda mais a levedura (NARENDRANATH et al., 2001).

Essia-Ngang et al. (1989) correlacionaram a influência da pressão osmótica do meio e a inibição de leveduras pelo ácido láctico. Para os mostos com menor pressão osmótica, e com ácido láctico na faixa de 0 – 10 g/L, a taxa específica de produção de etanol foi maior nos ensaios com ácido láctico. Sob maior pressão osmótica, a inibição ocorreu a partir de 2,5 g/L de ácido láctico.

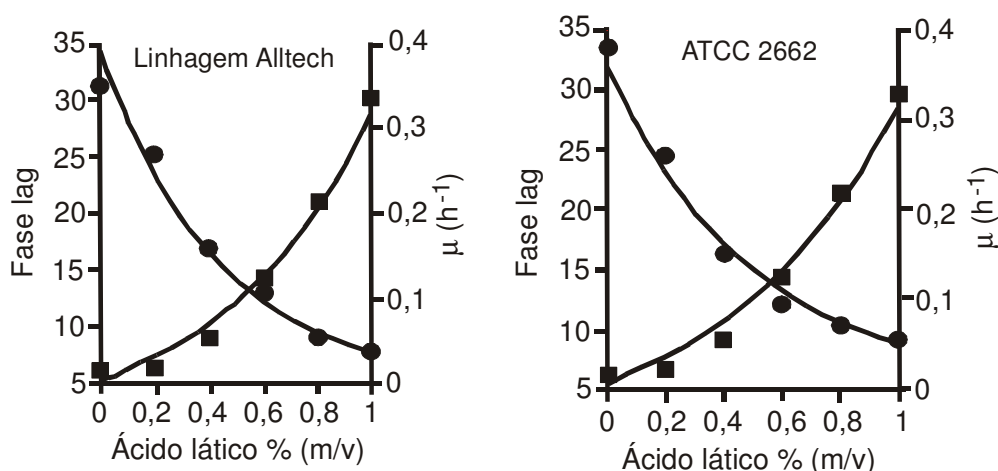


Figura 11. Efeito do ácido láctico na taxa específica de crescimento (●) e fase lag (■) sobre duas linhagens de *S. cerevisiae* em meio mínimo a 30°C.

Tilbury (1975) relata que produção de ácido láctico, associada ao crescimento de bactérias como *L. mesenteroides*, pode resultar também em corrosão nos equipamentos de extração de caldo. Peckman (1944) e Schopmeyer (1954) citados por Penna (2001) também relatam problemas de corrosividade do ácido láctico sobre equipamentos metálicos nos processos fermentativos utilizados na sua fabricação. Fenômeno que pode estar associado à corrosão de equipamentos relatados em algumas destilarias de álcool, onde a contaminação bacteriana e, conseqüentemente a produção de ácido láctico é alta.

2.4 Controle do crescimento bacteriano e da produção de ácido láctico na fermentação etanólica

De acordo com Narendranath et al. (2001) o mecanismo de ação dos subprodutos estressantes da fermentação etanólica é bastante conhecido. Portanto, é necessário diminuir o número de microrganismos presentes no mosto de tal modo que o nível dos metabólitos seja muito baixo para afetar as taxas de produção e rendimento de etanol.

Segundo Kelsall e Lyons (2003b), a maneira fundamental para controlar a infecção é adequar o ambiente da fermentação etanólica. Os tanques fermentadores devem ser esvaziados e limpos regularmente; os trocadores de

calor não devem ser compartilhados; evitar 'pontos mortos' nas tubulações de mosto e vinho; maximizar o crescimento da levedura; promover fermentações rápidas com temperatura controlada e utilizar agentes antibacterianos.

Porém, Lyons (2003a) afirma que uma destilaria dificilmente vai ter uma fermentação estéril e, como a levedura é relativamente um microrganismo de crescimento lento, comparada com a maioria dos microrganismos infecciosos, é crucial que se tenham vários agentes bactericidas, produtos de limpeza e programas efetivos prontos a proteger o ambiente fermentativo.

De acordo com Narendranath (2003), os métodos mais utilizados da indústria do etanol para o controle de bactérias contaminantes incluem limpeza e sanitização severas, lavagem ácida das leveduras, ajuste do pH do mosto e o uso de antibióticos durante a fermentação. Mas, mesmo com os procedimentos de limpeza, as bactérias encontram seu caminho dentro do processo nas destilarias, devendo ser removidas o mais rápido possível.

Aquarone e Sato (2001) ressaltam a importância da desinfecção nas indústrias de fermentação, pois evita diversos inconvenientes. Os autores consideram que, do ponto de vista econômico, o emprego de desinfetantes e biocidas de forma preventiva traz benefícios e o uso constante previne a ameaça de quedas no rendimento em álcool.

Lima et al. (2001) também atestam que, pelo fato de não se esterilizar os mostos nas destilarias de álcool, recorre-se ao uso de antibióticos nas fermentações industriais para produção de etanol. Segundo o autor, a ação sanitizante desses produtos decorre de suas propriedades bacteriostáticas, tornando as fermentações mais puras e regulares.

Portanto, um aspecto a ser explorado nas indústrias sucroalcooleiras, visando à diminuição de perdas industriais e elevação nos rendimentos, é a eliminação ou diminuição dos contaminantes microbiológicos, especialmente as bactérias formadoras do ácido láctico (Valsechi, 2005).

A adição de ácido sulfúrico no processo de fermentação alcoólica pelo método Melle-Boinot é a prática mais utilizada para o controle de bactérias contaminantes nas destilarias brasileiras. Gallo e Canhos (1991a) observaram diminuição média de 44,38% na microbiota bacteriana presente em fermento tratado na cuba com ácido sulfúrico em pH 2,0 por duas horas.

Chang et al. (1997) estudaram os efeitos do sulfito em presença de peróxido de hidrogênio no controle de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica contínua com reciclo de leveduras e concluíram que o trióxido de enxofre, formado pela reação das duas substâncias, é responsável pelo controle das bactérias, sem afetar a levedura.

Da mesma forma, o emprego de melaços oriundos de caldos sulfitados pode resultar em benefício, devido ao controle que o SO_2 exerce sobre as bactérias lácticas (WHITING, 1976).

Contudo, Dorta et al. (2006) compararam o efeito combinado entre ácido láctico, sulfito, pH e teor de etanol em fermentação alcoólica para produção de etanol e chegaram à conclusão de que esses elementos combinados inibem de modo sinérgico a levedura, e que especialmente o uso de ácido sulfúrico em excesso tem efeito negativo no rendimento e na produtividade.

Alves (1994) constatou que a produção de ácido láctico em fermentação alcoólica, devida à contaminação bacteriana, manteve-se baixa e estabilizada nos meios tratados com antibióticos.

Oliva-Neto e Yokoya (1994), ao avaliarem os efeitos da contaminação bacteriana em fermentação alcoólica por leveduras, concluíram da mesma forma, que algum tipo de controle bacteriano é necessário para o sucesso dessa operação nas destilarias de álcool combustível.

Diversas substâncias têm sido estudadas e utilizadas em indústrias para a desinfecção eficiente dos mostos em fermentação: ácidos, álcalis, compostos fenólicos, formaldeído, peróxidos e, mais recentemente antibióticos. Esses últimos apresentam diversas vantagens, pois atuam imediatamente, sem afetar o microrganismo útil (AQUARONE e SATO, 2001).

Andrietta et al. (1995) avaliaram a Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) de cinco antimicrobianos aplicados em meio de cultivo inoculados com diversos *Bacillus* e *Lactobacillus*. A virginiamicina controlou cinco das oito bactérias com a dosagem de 0,25 ppm; enquanto que Fermacol inibiu duas nessa dosagem e quatro com 2 ppm. Penicilina controlou cinco bactérias com 0,5 ppm e uma com 2 ppm. Quaternário de amônia inibiu todas as 8 bactérias com 10 ppm e cloranfenicol inibiu quatro com 4 ppm e uma com 8 ppm.

Hynes et al. (1997) também investigaram virginiamicina no controle de sete linhagens de lactobacilos em fermentação alcoólica de trigo por levedura.

De acordo com os resultados, 0,5 mg de virginiamicina foram efetivas contra a maioria das bactérias utilizadas no ensaio e preveniu potenciais perdas de rendimento de mais de 11% do etanol. Contudo, foi constatada uma possível diminuição na efetividade do antibiótico em longo tempo de incubação.

Oliva-Neto e Yokoya (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano de diversos agentes químicos e alguns antibióticos, através do teste de concentração inibitória mínima (CIM) para *S. cerevisiae*, *L. fermentum* e *L. mesenteroides*. Os produtos mais efetivos contra as bactérias e inócuos para a levedura foram os antibióticos clindamicina e penicilina V ácida.

A penicilina já foi bastante estudada e utilizada em fermentações industriais, mas devido sua pouca estabilidade em pH < 5, outros antibióticos de amplo espectro têm sido mais empregados (Tab. 5). Além do mais, o uso isolado e repetido de virginiamicina ou penicilina G pode induzir o desenvolvimento de microrganismos mutantes, resistentes a esses antibióticos, conforme experimento *in vitro* utilizando *Lactobacillus paracasei*. Associações de diferentes antibióticos seria a solução para diminuir o risco de resistência (NARENDRANATH, 2003).

Tabela 5. Alguns antibacterianos usados na fermentação etanólica e respectivos modos de ação, efeito e tipos de bactérias sensíveis

Antibacteriano	Mecanismo de ação	Efeito	Bactérias sensíveis
Bacitracina	Afeta a parede celular	Bactericida	Gram (+)
Cloranfenicol	Inibe síntese de proteínas	Bacteriostático	Gram (+) e (-)
Kamoran	Afeta a bomba iônica	Bactericida	Gram (+)
Lazolacida	Altera a pressão osmótica	Bactericida	Gram (+) e (-)
Monensina	Afeta a membrana celular	Bactericida	Gram (+)
Penicilina G	Inibe síntese da parede celular	Bactericida	Gram (+)
Penicilina V	Inibe síntese da parede celular	Bactericida	Gram (+)
Polimixina	Afeta a membrana celular	Bactericida	Gram (-)
Salinomicina	Afeta a membrana celular	Bactericida	Gram (+)
Streptomicina	Inibe síntese de proteínas	Bactericida	Gram (+) e (-)
Tetraciclina	Inibe síntese de proteínas	Bacteriostático	Gram (+)
Virginiamicina	Inibe síntese de proteínas	Bactericida	Gram (+) e (-)

Os efeitos da penicilina e Kamoran WP sobre bactérias isoladas da fermentação alcoólica, em indústrias brasileiras, foram investigados por Stroppa et al. (2000). Os resultados mostraram que o crescimento e o consumo de açúcar foram fortemente inibidos por ambos antibióticos, em todas as dosagens estudadas (1 – 6 ppm). A penicilina V-K foi mais efetiva em menor tempo de contato, contudo, a retomada do crescimento de duas colônias tratadas sugere que houve seleção de variedades resistentes a esse antibiótico. Kamoran WP causou grande diminuição da população ao final do ensaio, sem mostrar formação de células resistentes.

Islam et al. (1999) estudaram os efeitos do pH (3,8 a 4,8) e temperatura (25 e 35 °C) sobre antibióticos em fermentação etanólica em condição industrial simulada. A investigação mostrou que virginamicina não foi significativamente alterada durante a fermentação alcoólica conduzida por 72 horas, mantendo 87% da concentração original, enquanto que penicilina-G foi rapidamente degradada na faixa de pH do ensaio, especialmente a 35 °C.

Mello (2002), verificou a estabilidade dos antibióticos Kamoran e Corstan em levedura tratada com ácido sulfúrico (pH 1,9 – 2,5). A avaliação, realizada em escala industrial mostrou que mesmo no valor mínimo de pH, a dosagem de 3 ppm dos antibióticos diminuiu a população de bactérias viáveis em proporção similar ao valor máximo, mostrando que a atividade dos produtos não é alterada dentro dessa faixa de pH.

Narendranath et al. (2000) preconizam o uso de 2 mmol/L de peróxido de hidrogênio-uréia (UHP) no combate das bactérias lácticas em mosto de amido para fermentação alcoólica. Além do efeito bactericida contra os lactobacilos, a uréia liberada no meio serve como fonte de nitrogênio para a levedura. Contudo, o produto não deve entrar contato com materiais susceptíveis à corrosão, pH ácido e temperaturas > 30 °C.

Oliva-Neto et al. (2004) isolaram leveduras de fermentação alcoólica para extração de substâncias com atividade antibacteriana e produtos naturais com potencial atividade antimicrobiana no controle de bactérias na fermentação alcoólica. Bregagnoli (2006) realizou experimentos em escala de laboratório com extratos de própolis e pomelo comparativamente a ampicilina. Segundo os resultados obtidos, o extrato de própolis possui efeito similar ao antibiótico.

Tecnologias alternativas, baseadas em métodos físicos para o controle de microrganismos e conseqüente diminuição da produção do ácido láctico, também têm sido investigadas. Alcarde et al. (2003) avaliaram os efeitos da radiação gama e Valsechi (2005) a radiação de microondas sobre mostos de cana-de-açúcar, contaminados com bactérias lácticas.

2.5 Monitoramento da fermentação etanólica

O entendimento dos princípios básicos da microbiologia da fermentação alcoólica, por Pasteur, diminuiu significativamente o grau de empirismo na indústria e forneceu um meio eficiente de controlar a fermentação e limitar o desperdício na produção do álcool de beterraba (STOKES, 2005).

Mesmo com o vasto conhecimento empírico acumulado na fabricação de etanol, ainda se sabe pouco sobre as condições ótimas da condução da fermentação. Isso se deve em grande parte pelo controle deficiente, especialmente o microbiológico, cuja grande dificuldade está em detectar de modo rápido e precoce os desvios motivados por um nível incipiente de contaminação bacteriana (ROSSEL et al., 1983).

O gerenciamento técnico de uma unidade industrial [produtora de açúcar e álcool] deve ser conduzido com base em fatos, cuja avaliação definirá uma ação a ser implementada com o objetivo de melhorias em produtividade, eficiência e qualidade. Os fatos devem originar de medias realizadas no laboratório ou no processo e não de opiniões sem uma base confiável. Quanto mais rápida a coleta de dados, mais rápida a tomada de decisão e ação e menores perdas de processo (CARVALHO-FILHO et al., 1999).

Nas destilarias é necessário reconhecer as fontes potenciais de contaminação de modo que medidas apropriadas possam ser tomadas para minimizar as perdas. A enumeração de bactérias em muitas destilarias é freqüentemente limitada à detecção de bactérias do ácido láctico, pois as aeróbias e anaeróbias facultativas não são consideradas séria ameaça à eficiência de produção (NARENDRANATH, 2003).

A otimização da fermentação pode ser complexa por causa de muitos parâmetros que podem afetar o teor final de álcool e o rendimento geral. Com

as tradicionais análises, hoje disponíveis, pode-se estar consumindo tempo do pessoal do laboratório para manter a demanda de análises da fermentação. Eficiência ótima pode ser alcançada se todos os parâmetros são mantidos sob controle, mas isso nem sempre acontece (LIVERMORE et al., 2003).

2.5.1 Métodos utilizados nas destilarias brasileiras

No auge do Proálcool, as destilarias deram grande ênfase à parte microbiológica da fermentação alcoólica, instalando e operando laboratórios de microbiologia. Eram feitas contagens microscópicas de células de leveduras e de bactérias. Para as condições da época os controles eram satisfatórios, porém, investir em aquisições e atualizações de equipamentos, é retorno garantido (VASCONCELOS, 2002).

No Brasil o uso sistemático do microscópio no controle microbiológico das fermentações foi introduzido no final da década de 70, quando foi desenvolvida a metodologia de contagem de bastonetes [e leveduras] através de corantes diferenciais. Com essa técnica foi possível avaliar os níveis de contaminação na fermentação, possibilitando um controle mais eficaz. É uma metodologia muito difundida pela sua facilidade e rapidez, mas deve ser ressaltado que esta técnica não se aplica para amostras com menos de 10^4 bastonetes/mL. A relação entre a contagem de colônias em meios de cultivo vai depender de vários fatores, mas em geral, a contagem microscópica geralmente é maior (OLIVEIRA, 2004).

Segundo Amorim et al. (2000), embora outros tipos de bactéria (cocos) possam ser contados, a técnica de contagem direta ao microscópio óptico é adequada somente para a contagem de bacilos (bastonetes), sendo que a maior precisão e repetibilidade são conseguidas quando a população da amostra está entre 10^6 e 10^7 bastonetes/mL.

O uso do microscópio ótico na indústria de fermentação iniciou-se com Pasteur, por volta de 1850. Desde então, o microscópio passou a ser instrumento importante nas indústrias de bebidas fermentadas. Contudo, a microscopia tem acuidade e reprodutibilidade limitadas, sendo que populações de bactérias abaixo de 10^4 bactérias/mL são dificilmente detectadas e, devidos

aos erros analíticos, a contagem visual normalmente é superestimada em relação ao número de indivíduos viáveis (PELCZAR et al., 1997).

Avaliação entre as técnicas de microscopia e plaqueamento, empregadas na indústria sucroalcooleira, foi feita por Delalibera et al. (1984). Os resultados mostraram que a contagem ao microscópio foi geralmente superior à contagem de viáveis em placas de Petri, devido à dificuldade de diferenciação das bactérias viáveis das não viáveis ao microscópio, ao passo que nas placas só ocorre o crescimento das viáveis.

Diversas outras técnicas de cultivo de microrganismos em meios nutrientes foram adaptadas para o controle microbiológico na indústria do álcool (ROSSEL et al., 1987; AMORIM et al., 1999; CAPARRÓS, 2005).

Análises específicas são utilizadas no setor sucroalcooleiro para se determinar compostos metabólitos, como o produto de interesse, quanto outros produzidos pela levedura ou bactérias (Tab. 6).

Tabela 6. Análise de metabólitos microbianos na indústria sucroalcooleira

Metabólito	Microrganismo	Material analisado	Método	Referência
Etanol	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho Levedo tratado	Ebuliometria Denstimetria C.G.	Copersucar
Glicerol	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho	Enzimático Colorimetria	Sigma Copersucar
Dextrana	<i>Leuconostoc sp.</i>	Caldos Açúcar	Colorimetria Enzimático	ICUMSA Copersucar
Ácidos orgânicos*	BAL	Caldos Mosto Vinho	Titulometria	Copersucar

*Acidez total

Segundo Stupiello apud Moreno (2005), as principais perdas no setor sucroalcooleiro, são aquelas que não se medem – as chamadas indeterminadas, por exemplo, na fermentação. O pesquisador acredita que não existam equipamentos para identificação dessas perdas, contudo, atesta que se o gestor industrial pudesse quantificá-las, poderia tentar minimizá-las.

Vasconcelos (2004) ressalta que a eficiência da fermentação alcoólica no Brasil já se encontra em patamares difíceis de serem suplantados sem inovações tecnológicas.

Um dos reflexos dessa falta de informações precisas se reflete, de acordo com Borzani (2007), na incerteza que afeta o valor calculado no rendimento de uma fermentação alcoólica.

2.5.2 Métodos utilizados nos EUA

De acordo com Dinwoodie e Mehnert (1985), a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) é a ferramenta mais adequada para o monitoramento da fermentação etanólica em uso nas destilarias de álcool norte-americanas. Através desse método, podem-se quantificar as principais substâncias geradas durante o processo fermentativo do etanol, seja o produto principal ou subprodutos indesejáveis como os ácidos orgânicos, originários das fermentações paralelas. Dessa maneira, pode-se calcular mais precisamente o balanço de materiais e o rendimento fermentativo, bem como avaliar tratamentos preventivos e corretivos durante o processo.

Porém, Livermore et al. (2003) atestam que para a quantificação de açúcares, ácidos, glicerol e álcool, e mantê-los dentro dos parâmetros em cada estágio da fermentação, a tecnologia do infravermelho próximo (NIR) seria a mais indicada. Segundo os autores, o HPLC apresenta as seguintes desvantagens:

- Os técnicos devem ser altamente qualificados e os acessórios (colunas, reagentes, filtros) de alto custo;
- O tempo mínimo para determinar respostas corretas é 20 minutos (sem incluir repetição de análises, tempo para preparação das amostras, ajustes, lavagens e calibração);
- A preparação das amostras permite somente análises dos componentes solúveis na fração líquida. Isso irá compor o erro por que a porção sólida que é removida contém açúcares, ácidos e álcool, distorcendo os resultados.

Esses fatores podem interferir quando decisões imediatas são requeridas, por exemplo, na verificação se o açúcar está sendo totalmente convertido e usado pela levedura.

Um parâmetro importante na fermentação de milho que o espectrofotômetro NIR pode monitorar é a produção de ácido láctico produzido por *Lactobacillus*. Quanto maior a contaminação bacteriana, mais ácido láctico é produzido. Em fermentação contínua, os valores de ácido láctico podem ser usados para determinar quando produtos antibacterianos ou procedimentos de lavagem são requeridos. Outras aplicações potenciais para a metodologia NIR são: Análise dos subprodutos da fermentação destinados à nutrição animal; determinação de resíduos de amido, teor de fibras, cinzas, umidade e proteína; avaliação de novas enzimas e suplementos nutricionais das leveduras, com precisão bastante aceitável (LIVERMORE et al. 2003).

2.5.3 Tecnologias alternativas

Segundo Pelczar et al. (1996), entre as várias técnicas disponíveis, o crescimento de uma população de microrganismos pode ser determinado pela quantidade de produtos metabólicos, como os ácidos orgânicos, que podem ser expressos em miliequivalentes de ácido por mililitro de suspensão.

Alves (1994) constatou que a produção de ácido láctico segue a mesma tendência da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica e que esse produto constitui um parâmetro preciso para detectar a extensão da contaminação, uma vez que expressa a atividade metabólica desses microrganismos. Amorim et al. (1996) reiteram que a quantificação desse produto é um indicador bastante preciso do grau de contaminação da fermentação, pois é proporcional ao número de bactérias.

Eggleston e Harper (2006) propõem a determinação enzimática do teor de manitol como indicador da deterioração da cana-de-açúcar, uma vez que essa substância está associada ao metabolismo de bactérias do gênero *Leuconostoc*, responsáveis pela degradação dos açúcares do caldo.

Análises empregando tecnologia enzimática vêm sendo introduzidas na indústria sucroalcooleira para determinação de compostos indesejáveis. Por exemplo, a dextrana, produzida por *L. mesenteroides* e o glicerol, um metabólito secundário de *S. cerevisiae*, são detectados por essas técnicas (COPERSUCAR, 2001).

Métodos enzimáticos de análises têm sido reportados desde que se intensificaram as técnicas de isolamento, purificação e imobilização de diversas enzimas, há quase meio século (HASSELBERGER, 1978; COULET et al., 1990; BILITEWISKI, 1994). Essa tecnologia atingiu o estado da arte através do desenvolvimento de sistemas enzimáticos imobilizados em membranas semipermeáveis, conjugados com eletrodos e transdutores – os chamados biosensores (SULEIMAN; GUILBAULT, 1994; WAGNER, 1994).

O precursor dessa tecnologia foi Clark, quem em 1962 combinou oxidases em solução com um sensor eletroquímico de oxigênio para medição de glucose. Posteriormente, em 1966, Hicks e Updike projetaram o primeiro eletrodo de enzimas imobilizadas em membrana de gel de poliacrilamida. Desde então, os biosensores têm se mostrado um campo atrativo, devido sua relativa simplicidade e alta sensibilidade, sendo aplicados em vários campos, incluindo processos industriais (DONG; CHEN, 2002).

As indústrias necessitam de métodos hábeis e rápidos para assegurar a qualidade dos produtos e o controle do processo e que não sejam dispendiosos e laboriosos, como a cromatografia líquida (HPLC). Os biosensores enzimáticos constituem técnica alternativa promissora, uma vez que oferecem vantagens aos métodos convencionais (MELLO; KUBOTA, 2002).

As vantagens das enzimas em análises são sua sensibilidade e especificidade. Ou seja, elas são hábeis para detectar quantidades muito pequenas de materiais e reagem com uma molécula específica, sem afetar outras próximas. Além do mais, as técnicas enzimáticas são precisas, rápidas e não dependem de condições extremas. Os métodos mais modernos empregam instrumentos eletrônicos que simplificam os procedimentos e diminuem a possibilidade de erro humano (HASSELBERGER, 1978).

A determinação de ácido láctico através de métodos enzimáticos tem sido proposta por vários pesquisadores, para os mais variados fins, como análise de sangue, alimentos e bebidas. Emprega-se a enzima lactato oxidase combinada

com eletrodos amperométricos sensíveis a oxigênio ou peróxido de hidrogênio. A enzima é extraída de diferentes microrganismos e imobilizada através das várias técnicas disponíveis em diversos materiais (COULET et al., 1990). Sistemas alternativos, como o enzimático luminescente de análise em fluxo para D(-) e L(+) lactato em cerveja, têm sido propostos (GIROTTI et al., 2000).

Uma das aplicações mais difundidas da dosagem de ácido láctico está na fisiologia do esporte, onde a concentração de lactato sanguíneo é utilizada para monitorar o treinamento de atletas de várias modalidades e o aparelho tido como padrão em vários estudos é o YSI 1500 *Sport* (FRANCHINI et al. 2004).

Os analisadores industriais da YSI têm sido empregados para analisar produtos laticínios, meios de fermentação, bebidas alcoólicas e cereais (HUNTINGTON, 1978; ELLIS; GRAND, 1987; WILLIAMS, 1992 apud WAGNER, 1994). Podem ser detectados vários níveis de glucose, sacarose, lactose, L(+) lactato e etanol. Comparações entre os analisadores YSI com outros métodos enfatizam a alta especificidade de detecção, o curto tempo de análise, e a alta taxa de recuperação (BETTENFELD, 1983; BUDKE, 1984; ELLIS e GRAND, 1987 apud WAGNER, 1994).

Ventura (2005) realizou medições de ácido láctico em diversas fermentações para produção de etanol, através de equipamento YSI 1500 *Sport* para L(+) lactato. Os valores de ácido láctico variaram entre 220 ppm a 2700 ppm em mosto fermentado, em função do grau de contaminação bacteriana de cada fermentação.

Trabalho realizado por Lefebvre et al (2002), comparam as técnicas enzimáticas e cromatográficas na quantificação de sacarose, glucose, frutose, maltose, etanol e os ácidos láctico e acético em 'massa azeda' inoculada com leveduras e BAL, destinada à panificação. Foi detectado nível de significância mínima de 95% na média para os compostos analisados.

Sistema empregando multicomutação de fluxo em conjunto com reação enzimática e espectrofotometria para determinação de L(+) lactato em fermentação alcoólica, foi proposto por Kronka et al. (2005). Amostras com concentrações de 5,0 – 100,0 mg L⁻¹ de L(+) lactato foram analisadas usando uma solução contendo 150 UI de lactato oxidase e 200 UI de peroxidase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências de Rio Claro – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e em doze indústrias sucroalcooleiras do estado de São Paulo, durante as safras de 2004/2005; 2005/2006 e 2006/2007.

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e reagentes

- Analisador de L(+) lactato modelo *YSI 1500 Sport* (Yellow Springs Inc. – USA) e respectivos reagentes e acessórios.
- Analisador de L(+) lactato modelo *Accutrend Lactato* (Roche AG – Alemanha) e respectivos reagentes e acessórios.
- Reagentes enzimáticos para determinação de D(–) e L(+) lactato (Boehringer/R-Biopharm – Alemanha).
- Espectrofotômetro UV/Visível modelo *Ultrospec 3000* (Biotech).
- Cromatógrafo a gás CG modelo *YYY*.
- Estufa de cultura modelo *002 CB* (Fanem – SP).
- Medidor de pH modelo *DM 21* (Digimed – SP).

- Microscópio ótico com lente de imersão de aumento 1000 X modelo (Nikon).
- Contador de colônias modelo EC 589 (Phoenix – Brasil).
- Balança de precisão modelo AS 200 C (Marte – SP).
- Autoclave modelo 103 (Fabbe – São Paulo).
- Câmara de contagem microscópica tipo Neubauer (Knittel).
- Agitador mecânico para 16 frascos com controle de temperatura e rotação modelo MA 470 (Marconi – SP).
- Centrífuga de laboratório para 8 tubos de 15 mL modelo Excelsa Baby (Fanem – SP).
- Micropipeta 1000 μL (1/1 μL).
- Mel rico e mel final de usina de açúcar.
- Solução H_2SO_4 0,1 N.
- Extrato de levedura.
- Vidraria usual de laboratório.

3.1.2 Microrganismos

Para simular as condições de uma fermentação etanólica industrial, foram utilizados os seguintes microrganismos:

- *Saccharomyces cerevisiae*: levedura prensada para panificação marca Fleischmann, adquirida no comércio;
- Bactéria isolada de fermentação etanólica batelada (A);
- Bactéria isolada de mosto de melaço (B);
- Bactéria isolada de fermentação etanólica contínua (C);
- *Lactobacillus fermentum*: linhagem FT 292-B obtida na Fundação André Tosello, Campinas – SP (D);
- Pool de bactérias: partes iguais (v/v) de cada uma das quatro culturas de bactérias.

3.1.3 Meio de ativação das leveduras e mostos de fermentação

Utilizou-se mel de cana, coletado em indústria sucroalcooleira, de concentração 75 °Bx e 78% de pureza, diluído em água deionizada em partes adequadas para obter-se 6 litros de mosto com 10 ($\pm$ 1) °Brix. Ao mosto, foram adicionados: 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N (pH 4,5). O mosto foi transferido para dois frascos erlenmeyer e esterilizado em autoclave.

3.1.4 Antibacterianos

Foram utilizados em escala industrial três produtos comerciais de uso regular no mercado sucroalcooleiro, de princípios ativos distintos, a saber: monensina (MN); virginamicina (VM); salinomicina (SL), penicilina (PN). As dosagens seguiram as recomendações dos respectivos fabricantes, sendo: 3 ppm (choque) e 1,5 ppm (preventivo) para os produtos MN e VM; e 6 ppm / 3 ppm para os produtos SL e PN. As quantidades utilizadas nos tratamentos foram calculadas em relação ao volume de vinho bruto (mosto fermentado com levedura) e os produtos foram aplicados no leite de leveduras na cuba, após tratamento das células com água e de ácido sulfúrico (pH 2,0 – 2,5).

3.2 Experimentos de laboratório

3.2.1 Ativação do inóculo de leveduras

Uma suspensão de células, com viabilidade superior a 99,00% foi ativada suspendendo-se 60 g de levedura prensada em 600 mL do mosto preparado no item 3.1.3. A suspensão foi incubada por 12 horas a $31\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2 Ativação das bactérias

As linhagens de bactérias, previamente isoladas em meio sólido Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Acumedia Inc., EUA) e incubadas por 48 horas, foram avaliadas em microscópio quanto a pureza das respectivas colônias e uma alçada de cada foi transferida para tubos de cultura individuais com 20 mL de meio MRS líquido e incubadas por a 33°C por 24 horas.

3.2.3 Fermentação com diferentes BAL

Realizou fermentação etanólica, contaminada com diferentes linhagens de bactérias, em batelada, utilizando-se a técnica de incubação de frascos agitados, descrita por Calam (1986), com duas repetições. Os materiais preparados nos itens 3.1.3; 3.2.1 e 3.2.2 foram transferidos para frascos erlenmeyer de 250 mL, em triplicata, sendo adicionado 2 mL de água no controle para igualar o volume final das fermentações (Tab. 7). Os frascos foram tampados com algodão e colocados em agitador mecânico com temperatura controlada por 8 horas a 32°C.

Tabela 7. Protocolo experimental de fermentação etanólica em batelada, inoculada com levedura e diferentes linhagens de bactérias produtoras de ácido láctico

Frascos	Bactéria inoculada	Volume (mL)				
		Inóculo bactéria	Mosto	Inóculo levedura	Água	Total
01/02/03	—	0,0	90,0	10,0	2,0	102,0
04/05/06	A	2,0	90,0	10,0	0,0	102,0
07/08/09	B	2,0	90,0	10,0	0,0	102,0
10/11/12	C	2,0	90,0	10,0	0,0	102,0
13/14/15	D	2,0	90,0	10,0	0,0	102,0
16	Pool*	2,0	90,0	10,0	0,0	102,0

A: bactéria isolada de fermentação batelada; B: isolada de mosto de melaço; C: bactéria isolada de fermentação contínua; D: *Lactobacillus fermentum*; Pool: mistura em partes iguais das suspensões das bactérias A; B; C; D.

No vinho obtido de cada uma destas fermentações foram analisados: Teor de ácido láctico, teor de álcool, contagem de bactérias e leveduras viáveis.

3.2.4 Determinação do percentual de isômeros D(–) e L(+) do ácido láctico formado nas fermentações

O experimento anterior foi repetido uma vez mais em laboratório, utilizando-se como substrato mel final e as bactérias FB, BM, LF com volume de 3,0 mL para cada inóculo, e o “pool” com volume de 10,0 mL. Os vinhos obtidos nestas fermentações e ainda amostra de vinho obtido de fermentação industrial tiveram a quantificação dos isômeros D(–) e L(+) do ácido láctico mediante método enzimático-colorimétrico da R-Biopharm.

Após o tratamento com os reagentes do kit, as amostras tiveram a absorbância analisada em espectrofotômetro a 340 nm.

3.2.5 Teste de fermentação com “pool” de BAL em diferentes concentrações

Nestas fermentações, também em batelada e corridas em triplicata e duas repetições, foram mantidas as mesmas concentrações de levedura, porém utilizadas concentrações variadas do pool de bactérias, conforme descrito na Tabela 8. Os frascos foram incubados durante 8 horas em agitador mecânico a 32°C e 120 rpm em condição não estéril.

Tabela 8. Protocolo experimental de fermentação batelada com levedura e “pool” de bactérias produtoras de ácido láctico em diferentes concentrações

Frascos	Volume (mL)				Total
	Mosto	Inóculo levedura	Inóculo bactérias	Água	
01/02/03	90,0	10,0	0,0	15,0	115,0
04/05/06	90,0	10,0	15,0	0,0	115,0
07/08/09	90,0	10,0	10,0	5,0	115,0
10/11/12	90,0	10,0	5,0	10,0	115,0
13/14/15	90,0	10,0	2,5	12,5	115,0
16	90,0	10,0	1,0	14,0	115,0

No vinho obtido destas fermentações foram analisados: teor de ácido láctico, teor de álcool, contagem de bactérias e leveduras viáveis e floculação.

3.2.6 Contagem de bactérias viáveis

Efetuu-se plaqueamento mediante a técnica de cultura submersa conforme descrito por Seeley et al. (1984). Foi utilizado meio MRS acrescido de Agar, para solidificação e solução de actidiona, para a inibição do crescimento de leveduras. Foram contadas as colônias crescidas após 24 e 48 horas.

3.2.7 Determinação do teor alcoólico do vinho

No experimento 3.2.3. foi utilizado o ebuliômetro Salleron, que determina o teor de álcool em soluções hidroalcoólicas através da diferença de temperatura de ebulição dos componentes, conforme método Copersucar (2001).

Os vinhos obtidos nos experimentos 3.2.5. foram analisados pelo método de cromatografia gasosa, empregando cromatógrafo a gás CG com ionizador de chama, dotado de coluna com 20% ce Carbowax 20M sobre Cromosorb WAW-DMCS segundo metodologia Copersucar (2001).

3.2.8 Determinação da floculação do vinho

Observada através da medição, em proveta graduada, da fração decantada do vinho floculado, conforme Amorim et al. (2000).

3.2.9 Determinação da população da levedura

Estabelecida mediante relação entre células não coradas (vivas) e coradas com eritrosina (mortas), segundo Amorim et al. (2000), observadas ao microscópio ótico em aumento de 1000 X (imersão), através de câmara de Neubauer, conforme descrito por Sussman (1974).

3.3 Ensaios de campo

3.3.1 Sítios de experimentação

As indústrias onde se realizaram os experimentos de campo foram escolhidas por possuírem sistemas de fermentação representativos dos mais difundidos no país, a saber:

- Destilaria autônoma com fermentação batelada alimentada;
- Destilaria anexa a usina de açúcar com fermentação batelada alimentada;
- Destilaria anexa a usina de açúcar com fermentação contínua empregando levedura floculante;
- Destilaria anexa a usina de açúcar com fermentação batelada alimentada e tratamento contínuo do levedo;
- Destilaria anexa a usina de açúcar com fermentação contínua multiestágios;
- Destilaria anexa a usina de açúcar com fermentação semicontínua.

3.3.2 Materiais e pontos de coleta nas indústrias

Os materiais para análise de ácido láctico foram coletados *in situ* com as unidades em operação rotineira para produção de etanol, segundo

procedimentos descritos por Copersucar (2001). A Figura 12 mostra os pontos de coleta dos materiais descritos abaixo:

- 1) **Caldo de cana-de-açúcar não processada**: extraído na prensa no laboratório de pagamento de cana pelo teor de sacarose (PCTS);
- 2) **Caldo primário**: extraído no primeiro terno de moagem de cana;
- 3) **Caldo misto**: coletado da calha receptora sob o conjunto de moendas;
- 4) **Caldo clarificado quente**: coletado no decantador;
- 5) **Caldo clarificado resfriado**: coletado na saída do trocador de calor a placas;
- 6) **Mel final**: coletado no tanque de armazenamento;
- 7) **Mosto**: coletadas 3 amostras em intervalos de 1 hora na tubulação de alimentação das dornas, durante o período de enchimento;
- 8) **Levedo tratado**: em fermentação batelada, coletado na cuba após diluição com duas partes de água e ácido sulfúrico (pH 2,0 – 2,5). Em sistemas com tratamento contínuo a coleta era feita na última cuba em três etapas, em intervalos de uma hora entre elas, (t_0 , t_1 , t_2);
- 9) **Vinho fermentado**: coletado nas dornas depois de estabilizada a fermentação, normalmente após três repetições do mesmo brix. Em fermentação contínua foram feitas três coletas na última dorna de fermentação em intervalos de 1 hora entre cada uma, (t_7 , t_8 , t_9). Em fermentação “Conbat”, este último procedimento foi feito na dorna primária;
- 10) **Vinhaça**: retirada da base da coluna de destilação (A).

A coleta das amostras e os ensaios foram realizados nas unidades operando em marcha normal de produção, dentro do período regular de safra da cana-de-açúcar no estado de São Paulo (abril a novembro).

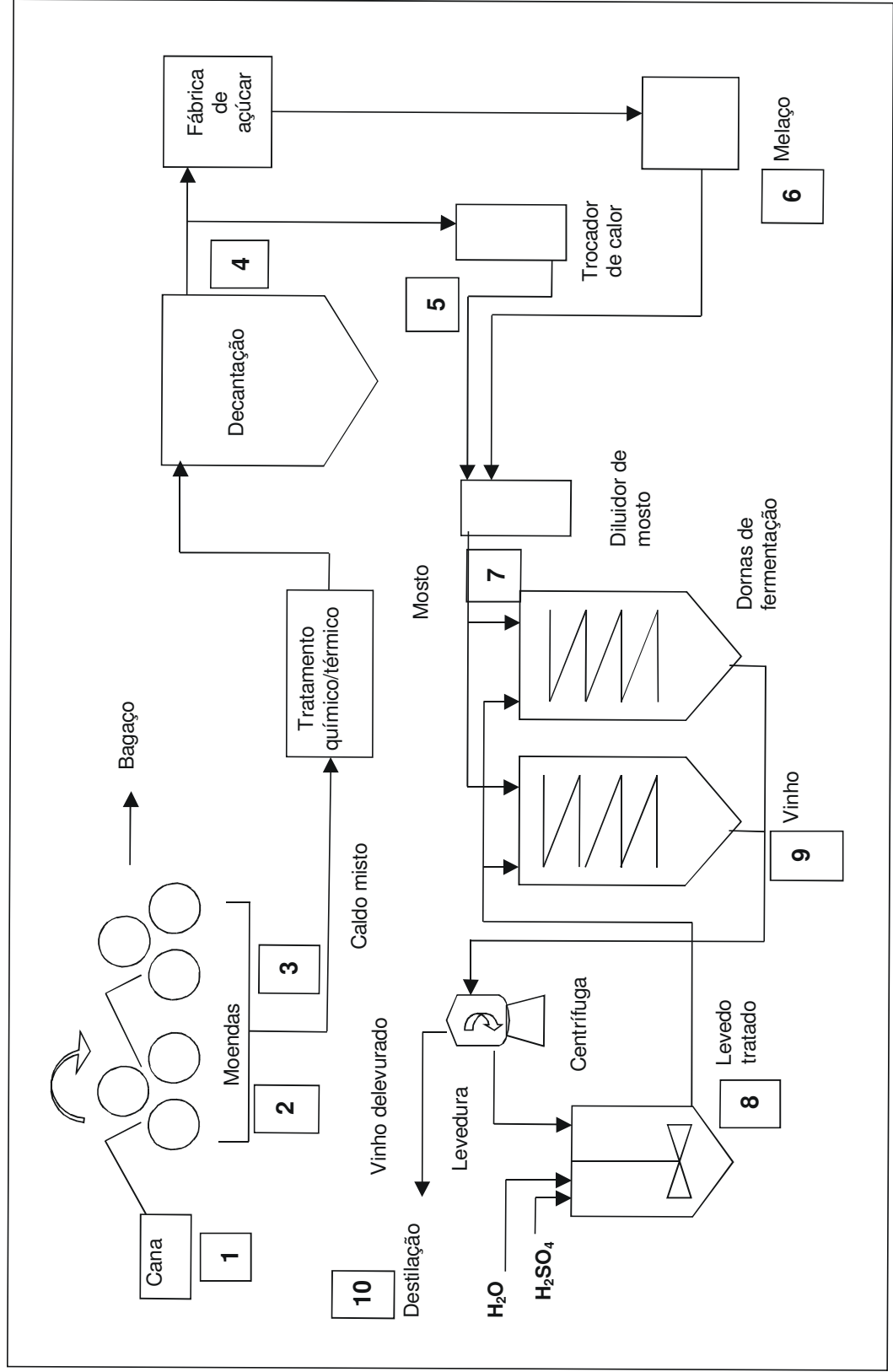


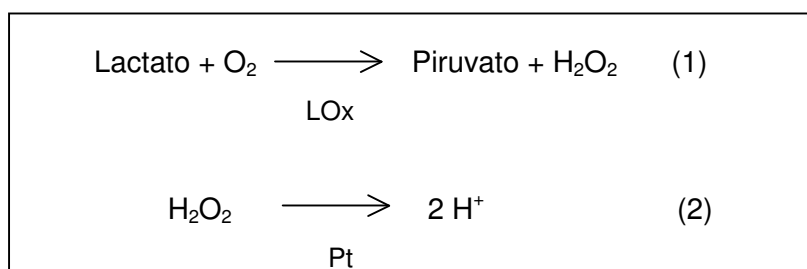
Figura 12. Fluxograma típico de unidade de fermentação industrial por processo Melle-Boinot com pontos de amostragem para quantificação do ácido láctico.

3.3.3 Preparo das amostras

O caldo clarificado quente e a vinhaça foram resfriados através de imersão em água corrente. As amostras dos caldos do PCTS, primário e misto foram filtradas em algodão, para eliminação dos resíduos. O levedo tratado e o vinho foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga de laboratório para separação da massa de leveduras. Para análise no lactímetro, as demais amostras foram processadas logo após a coleta.

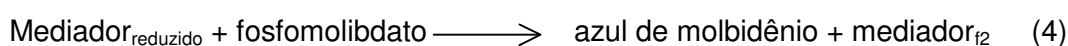
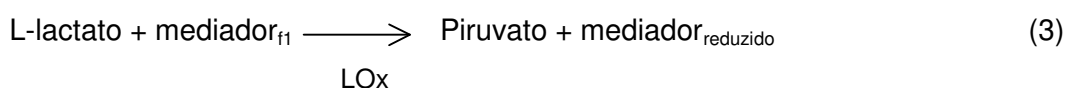
3.3.4 Quantificação do ácido láctico

O princípio de funcionamento do lactímetro YSI 1500 *Sport* baseia-se na tecnologia de sensor amperométrico, dotado de enzimas imobilizadas. A sonda contendo o eletrodo de platina é acoplada a uma membrana de tripla camada contendo como princípio ativo a enzima lactato oxidase (LOx) na membrana central. A superfície da sonda, coberta por essa membrana, faz contato com a câmara onde a amostra é injetada, previamente cheia de uma solução tampão. O ácido láctico é dissociado a lactato e é absorvido pela membrana, entrando em contato com a enzima LOx imobilizada. O lactato é oxidado a piruvato, formando peróxido de hidrogênio como segundo produto da reação 1. Este é por sua vez, oxidado no anodo de platina, produzindo elétrons (reação 2). Um equilíbrio é atingido quando a taxa de produção de H_2O_2 e a taxa de liberação do peróxido torna-se constante (YELLOW SPRING INC. – YSI, 2001).



O fluxo de elétrons é linearmente proporcional ao estado estável da concentração de H_2O_2 e, portanto, à concentração de ácido láctico. O eletrodo de platina é mantido a um potencial anódico, sendo capaz de oxidar H_2O_2 . (YSI, 2001).

Os aparelhos portáteis da Roche são dotados fotômetro de reflexão e fitas reagentes descartáveis impregnadas com enzima imobilizada lactato oxidase, extraída de *Aerococcus viridans*, linhagem recombinante. A amostra é colocada sobre uma malha na superfície da fita que retém as células de levedura e, a seguir, permeia até uma camada de fibra de vidro, contendo as enzimas imobilizadas e a zona de detecção. O lactato, em presença de um mediador, é degradado a piruvato em um minuto, através da LOx (reação 3).



O fotômetro de reflexão avalia o resultado dos produtos da reação por colorimetria em 657 nm (reação 4). O coeficiente de variação fica na média de 5% e exatidão de 0,957.

Efetuada os ajustes e calibrações, descritos nos respectivos manuais dos aparelhos, foram injetadas 25 μL das amostras preparadas como descrito no item 3.3.3, e, em cerca de 1 minuto os resultados estavam disponíveis no visor digital. Para cálculo do balanço de massa, os resultados exibidos pelos aparelhos (mmol/L) foram convertidos em mg/L e posteriormente em kg, conforme descrito no item 3.3.6.

3.3.5 Contagem microscópica de bactérias

O método utilizado foi descrito por Oliveira et al. (2000). Consiste na observação ao microscópio (objetiva de imersão 1000 X) da amostra de vinho

colorida com solução de sulfato azul do Nilo e azul de metileno tamponada com fosfato.

3.3.6 Cálculo da massa de ácido láctico produzido na fermentação

A quantidade de ácido láctico formado exclusivamente durante a etapa de fermentação alcoólica (excetuando-se o ácido que entrou no sistema através do mosto e àquele recirculado com o creme de leveduras), foi determinada com base no cálculo da acidez produzida em fermentação, conforme COPERSUCAR (2001) e Fernandes (2003), e nos cálculos de balanço de massa em estequiometria industrial, descritos por Gomide (1979), conforme equação 5:

$$QAL = QV \times VV - (QM \times VM - QL \times VL) \quad (5)$$

onde:

QAL = teor de ácido láctico produzido na fermentação etanólica (mg/L)

QV = teor ácido láctico no vinho (mg/L)

VV = volume de vinho fermentado (m³)

QM = teor de ácido láctico no mosto (mg/L)

VM = volume de mosto alimentado no reator (m³)

QL = ácido láctico no levedo (mg/L)

VL = volume de levedo inoculado no fermentador (pé-de-cuba) (m³)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados obtidos em laboratório

4.1.1 Fermentação etanólica com *S. cerevisiae* e diferentes bactérias lácticas

As fermentações foram analisadas após 8 horas, ao término do consumo dos açúcares do mosto, verificado pelo teor de sólidos 2°Bx (Tab. 9).

Tabela 9. Parâmetros do vinho de fermentação etanólica em batelada, inoculada com diferentes linhagens de bactérias produtoras de ácido láctico

Fermentações	Bactéria inoculada	UFC* (10 ⁶ bact/mL)	Ácido láctico (mg/L)	Teor alcoólico (%)	Viabilidade Levedura (%)
01;02;03	Controle	<1,0	18,0	5,00	92,19
04;05;06	A	2,6	171,0	5,00	86,92
07;08;09	B	0,1	198,0	5,10	88,87
10;11;12	C	6,0	216,0	5,00	88,23
13;14;15	D	24,5	135,0	5,05	88,78
16	Pool	—	207,0	5,00	86,18

*Unidade formadora de colônia/mL.

A: bactéria isolada de fermentação etanólica; B: isolada de mosto de melaço; C: bactéria isolada de vinho centrifugado de fermentação etanólica; D: *Lactobacillus fermentum*; Pool: mistura em partes iguais das suspensões das bactérias A; B; C; D.

Através desses experimentos pôde-se verificar a diversidade metabólica das bactérias encontradas em fermentação etanólica. A formação de ácido láctico variou conforme a linhagem de bactéria inoculada, de acordo com resultados de experimentos similares descritos por Wee et al. (2006). Observa-se também que o crescimento das diferentes linhagens não resultou em produção de ácido na mesma proporção. Isso se deve à probabilidade de haver espécies dotadas de metabolismo homofermentativo e outras heterofermentativo. As diferenças populacionais entre as espécies ao final das fermentações podem ser explicadas pelas interações antagônicas entre os microrganismos, ou pela variação na taxa de crescimento de cada espécie de bactéria nas condições do meio fermentativo, conforme demonstrado por Mirdamadi et al. (2002). Esta última hipótese também se aplica em relação à diferenças de crescimento das diferentes espécies no meio de cultura sólido, utilizado na contagem de viáveis (KIRSOP e DOLEZIL, 1975).

Nos frascos 7; 8 e 9 houve significativa produção de ácido láctico, mesmo com a menor população bacteriana, indicando que a espécie em questão possui baixa taxa de crescimento, porém alta produtividade fermentativa. *Lactobacillus fermentum* teve crescimento significativo, e pouca produção de ácido láctico. Isso pode ser devido ao metabolismo heterofermentativo dessa bactéria, que produz os dois isômeros do ácido láctico (DL) em proporções variáveis, conforme constatado por Costa (2006), e somente a forma L(+) foi medida pelo aparelho utilizado.

O ácido láctico formado no controle, deveu-se provavelmente à contaminação bacteriana natural dos mostos que não receberam o inóculo de bactéria, uma vez que as fermentações não correram em condições de esterilidade. Por outro lado, a formação de ácido láctico exclusivamente devido ao metabolismo da levedura *S. cerevisiae* é reportada como exceção. Wood (1961) registrou quantidades inferiores a 1% em relação à produção de álcool e Whiting (1976) observou produção desse metabólito em poucas linhagens de levedura quando em meios com ausência de tiamina.

Pôde-se observar também que os níveis de crescimento bacteriano e produção de ácido láctico no experimento (considerados satisfatórios na indústria), não interferiram significativamente na viabilidade e no metabolismo da levedura, expressa pela produção de álcool. Isso foi também constatado por

Thomas et al. (2001). Da mesma forma, fermentações de mosto de milho, onde a relação levedura/bactérias era a mais elevada, houve menor produção de ácido láctico, bem como se registraram maior viabilidade e população da levedura (NARENDRANATH; POWER, 2004).

Todas as quatro bactérias, isoladas em meio MRS sólido, revelaram-se Gram (+), como era esperado. As lâminas do teste de Gram foram observadas em microscópio ótico (Fig.13).

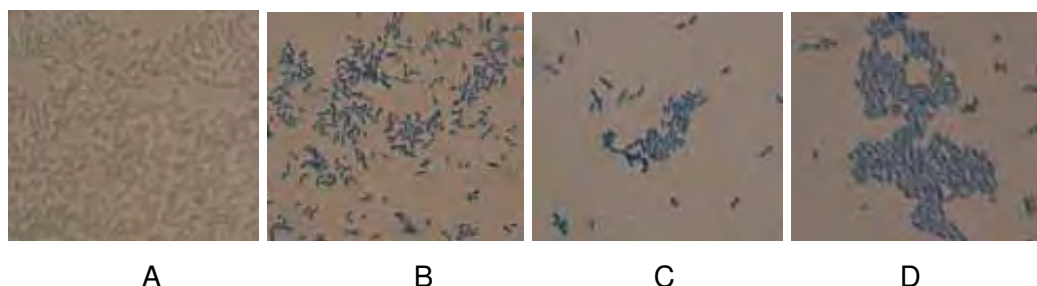


Figura 13. Fotografias das bactérias isoladas das fermentações, tingidas com coloração de Gram, observadas em microscópio ótico com aumento de 1000 X. A: bactéria isolada de fermentação batelada; B: bactérias isolada de mosto de usina; C: bactéria isolada de fermentação contínua; D: *Lactobacillus fermentum*.

Embora fossem de linhagens diferentes e apresentassem atividades metabólicas distintas, a morfologia das bactérias nesta resolução (utilizada nas contagens feitas nas indústrias) apresenta-se muito similar. Visto que a produção de ácido láctico variou consideravelmente para cada linhagem de bactéria, conclui-se que a microscopia é um método limitado para o monitoramento da fermentação etanólica, pois, sendo apenas quantitativo, não avalia a virulência dos microrganismos observados e as perdas provocadas por cada um deles. Essa discrepância fica mais acentuada se for considerado que há mais de 110 espécies diferentes somente do gênero *Lactobacillus*, conforme descrito por Rodas et al. (2005), e que vários isolados em fermentação etanólica por Rosales (1989) são cocos produtores de ácido láctico, mas não identificados pela técnica de microscopia.

4.1.2 Fermentação etanólica com *S. cerevisiae* e “pool” de bactérias láticas em diferentes concentrações

Os vinhos produzidos após 8 horas de fermentação, foram analisados e os resultados de vários parâmetros estão dispostos na tabela 10. A maior quantidade inicial de inóculo, bem como a interação entre as várias espécies de bactérias, reproduziram de maneira mais realista as condições encontradas nas fermentações industriais.

A correlação entre a quantidade de ácido láctico, viabilidade da levedura e teor alcoólico está em conformidade com resultados de vários outros trabalhos similares (NARENDRANATH et al., 1997; THOMAS et al., 2001; NOBRE et al., 2007).

Tabela 10. Parâmetros de vinho obtido de fermentação de mosto de melaço por leveduras, contaminado com pool de bactérias láticas, corrido em batelada durante 9 horas, a 32°C sob agitação

Fermentações	U.F.C. (x 10 ⁶ /mL)	Ácido láctico produzido (mg/L)	Teor alcoólico (%)	Levedura (x10 ⁸ /mL)	Viabilidade levedura (%)	Floculação média (%)
01, 02, 03	0,01*	20,7	4,92	3,02	84,36	4,00
04, 05, 06	12,80	1089,0	3,80	1,60	76,92	92,00
07, 08, 09	5,40	774,0	4,25	1,86	78,54	74,00
10, 11, 12	0,40	369,0	4,38	2,14	79,23	44,00
13, 14, 15	0,10	108,0	4,70	2,32	81,57	12,00
16	0,05	37,8	4,84	2,68	83,12	6,00

* Valor estimado

A Tabela 10 mostra que o teor de ácido láctico afeta diretamente o metabolismo da levedura, refletido na queda da viabilidade, teor de álcool, população e aumento da floculação, fatores indesejáveis no processo fermentativo.

Nas fermentações onde o teor de ácido láctico atingiu valores acima de 774 mg/L, ou seja, próximo à concentração inibitória mínima de 800 mg/L (m/v) do ácido láctico em relação à levedura, foram registrados os teores alcoólicos

mais baixos e menores crescimentos da levedura, conforme experimentos similares relatados por Russell (2003).

Os resultados do teor de ácido e viabilidade da Tabela 10 foram utilizados para verificar a correlação entre a formação de ácido lático e o número de bactérias no meio (Figura 14).

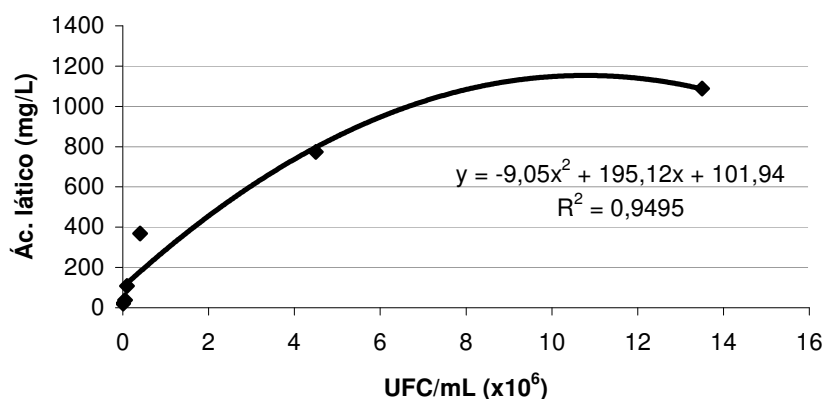


Figura 14. Correlação entre formação de ácido lático e população de bactérias em fermentação etanólica batelada.

A floculação da levedura aumentou diretamente com a produção de ácido lático, uma vez que este metabólito está associado ao crescimento dos microrganismos inoculados. Esse fato fica mais evidente sabendo-se que *Lactobacillus fermentum* é grande indutor de floculação, segundo Alcarde e Yokoya (2003), bem como, duas das três linhagens de bactérias inoculadas foram isoladas de meio fermentativo industrial altamente floculado.

Segundo Madigan et al. (2004) as diferentes espécies de bactéria têm requerimentos nutricionais e velocidade específica de crescimento máxima (μ_{Max}) distintos, bem como a taxa de crescimento das colônias (K) é afetada pela temperatura, pH e aeração. Considerando-se a diversidade da microbiota da fermentação etanólica, reproduzida nos experimentos, pode-se concluir que o crescimento das colônias ocorreu de forma heterogênea (Fig. 15).

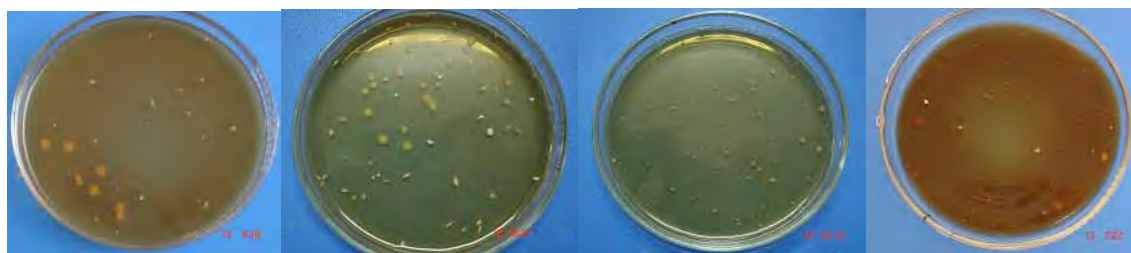


Figura 15. Fotografia das colônias crescidas em meio MRS pelas linhagens de bactérias lácticas utilizadas na fermentação em laboratório.

Collins et al. (1989), observam que na técnica de cultivo em placas, as bactérias raramente são separadas totalmente uma das outras, formando-se aglomerados em particular quando estão na fase de reprodução. Desse modo, uma única colônia pode originar-se de um indivíduo ou centenas aglomeradas, o que obviamente dificulta a reprodutibilidade dos resultados. Essa questão é significativa na fermentação etanólica, onde freqüentemente ocorre o fenômeno da floculação, associada à contaminação bacteriana.

Outra questão que deve ser relevada é o tempo de cultivo. O plaqueamento, embora de suma importância, fornece os resultados no mínimo em 24 h – tempo três vezes superior ao da média do ciclo fermentativo industrial. Portanto, a quantificação do ácido láctico pode ser uma alternativa apropriada quando se necessita de resultados rápidos na avaliação da fermentação etanólica.

4.1.3 Determinação dos isômeros do ácido láctico

Os vinhos obtidos nas fermentações corridas em laboratório e amostra industrial apresentaram perfil isomérico, demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11. Percentual dos isômeros D(–) e L(+) do ácido láctico formado em fermentações etanólicas, inoculadas com diferentes bactérias lácticas

Fermentações	Bactéria inoculada	Ácido láctico (mg/dL)		D(–) / L(+) (%)
		D(–)	L(+)	
01;02;03	Mosto	99	48	67,35 / 32,65
04;05;06	BB	144	239	27,68 / 72,32
07;08;09	VC	106	374	22,08 / 77,92
10;11;12	LF	110	89	55,05 / 44,95
13;14;15	Pool	535	834	39,08 / 60,92
Industrial	–	262	294	47,12 / 52,88

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o mel final utilizado no mosto está com teor de ácido láctico total mais elevado que no experimento anterior. Isso provavelmente se deve ao fato do mel final ser mais concentrado que o mel rico; e o ácido láctico segue a mesma tendência de concentração nesse substrato, conforme Tabela 12. No mosto também foi detectado um percentual maior do isômero D(–), o que pode levar à hipótese desse substrato ter sido contaminado durante a etapa de moagem da cana com bactérias do gênero *Leuconostoc*, a qual produz somente o isômero D(–) lactato (EGGLESTON, 2002).

Nas demais fermentações, sejam as conduzidas em laboratório, como naquela obtida industrialmente, prevaleceu o isômero L(+), com exceção o *L. fermentum*. Portanto, pode-se inferir que há grande probabilidade de ocorrer as duas formas isoméricas do ácido láctico em fermentação etanólica contaminada com bactérias lácticas. Essa tendência é reforçada quando se verifica a diversidade das bactérias que ocorrem nesse meio, bem como a presença constante do isômero L(+) em diversas medições com aparelhos específicos para essa forma (Anexo 1; Anexo 2).

4.2 Resultados obtidos na indústria

4.2.1 Ácido láctico em caldo de cana colhida (PCTS)

A procura de indicadores de deterioração da cana de açúcar é um desafio para os pesquisadores, especialmente devido às condições climáticas locais. Os estudos devem visar prioritariamente um indicador de fácil determinação, rápido, de baixo custo e que seja confiável (STUPIELLO, 2005).

De acordo com Eggleston (2002), produtos oriundos da deterioração da cana antes de seu processamento industrial devem ser utilizados para prever e controlar problemas de processo na fábrica.

Dessa forma, o ácido láctico foi quantificado em várias amostras de cana, recebidas para o processamento (Tab. 12).

Tabela 12. Teor de ácido láctico em caldo de cana colhida, com diferentes períodos entre queima / corte e o processamento.

Amostra	Espera (h)	Brix (%)	Ácido láctico (mg/L)	Ácido láctico (mg/Kg SD)
A1	15	20,6	10,0	48,5
A2	22	19,4	40,0	206,2
B1	36	18,5	22,0	118,9
B2	48	21,8	24,0	110,1
C1	38	15,9	112,0	704,4
C2	60	17,3	184,0	1063,6
D1	80	18,2	234,0	1285,7
D2	86	16,4	297,0	1810,1

SD: Sólidos dissolvidos

Segundo MacMaster e Ravnö (1977) o ácido láctico não é um constituinte natural da cana-de-açúcar, portanto, a ocorrência desse metabólito indica a presença de bactérias ativas na matéria-prima.

A quantidade de ácido láctico pode variar conforme o estágio de deterioração microbiológica cana, que está relacionado ao tempo entre a queima, o corte e o processamento, conforme também constatou Saska (2002).

Silva (1974), apud Gallo e Canhos (1991b) citam fatores como tipo de colheita, condições climáticas, pragas e doenças, tipos de transporte,

armazenamento e tempo entre corte até o processamento como fatores que contribuem para a contaminação presente no caldo.

De maneira geral, o teor de ácido láctico variou diretamente com o tempo de espera da cana até o processamento industrial. Exceção foi registrada na amostra B1 e B2, nas quais pode-se supor que houve maior produção do isômero D(–), não registrado, ou a que a matéria-prima estava em condições fitossanitárias ótimas, que pode ter inibido o ataque bacteriológico.

Muito provavelmente os números aqui registrados estão subestimados, pois as bactérias do gênero *Leuconostoc* – uma das espécies predominantes na deterioração da cana, produzem somente o isômero D(–) do ácido láctico, o qual não é detectado pelo aparelho utilizado nos ensaios.

De acordo com Wood (1961), várias bactérias heterofermentativas, por exemplo, o *Leuconostoc dextranicum*, produzem mais ácido láctico e etanol do que manitol e ácido acético. Dessa forma, a quantificação do ácido láctico total, assim como é feito com a dextrana, é um indicador a ser considerado nas análises de rotina das usinas de açúcar e destilarias de álcool.

4.2.2 Ácido láctico na extração e concentração do caldo

Pela importância da destruição de açúcares durante a extração do caldo descrita por Tilbury (1975), o teor de ácido láctico foi mensurado nos diversos materiais intermediários nas etapas sucessivas da concentração do caldo de cana para produção de açúcar, até o mel final (utilizado como substrato para produção do etanol) (Tabela 13).

Como o ácido láctico é formado pelas bactérias contaminantes da etapa de extração do caldo da cana, conclui-se que as condições microbiológicas da cana recebida, bem como a assepsia da moenda na destilaria autônoma, podem ser consideradas satisfatórias em relação as destilarias anexas as usinas de açúcar. A comparação entre os dados das duas destilarias autônomas mostra que a formação do ácido láctico e, portanto a contaminação bacteriana é menor quando se emprega o difusor na extração do caldo. Contudo, Polanco et al. (2006), avaliando as condições microbiológicas desses equipamentos em usinas norte-americanas, chegaram a conclusão oposta.

Isso indica que o grau de assepsia é um fator relacionado com a contaminação na etapa de extração do caldo, independente do equipamento utilizado.

Tabela 13. Teor de ácido láctico (mg/L) nos diferentes estágios sequenciais de processamento do caldo de cana para produção de etanol

Amostra	Destilarias autônomas		Destilarias anexas		
	Difusor	Moenda	A	B	C
Caldo PCTS	0	0	10	30	120
Caldo primário	0	0	10	80	320
Caldo misto	0	10	20	90	150
Caldo aquecido	—	80	50	200	880
Caldo clarificado	—	50	60	320	470
Caldo concentrado	58	80	—	—	—
Caldo resfriado	162	70	80	210	1280
Mel final 80° Bx	—	—	500	4500	8840
Mosto 22° Bx	369	70	100	1220	2680
Sol. sacarose 20%	—	—	0	0	0

PCTS: Pagamento de cana pelo teor de sacarose

A diminuição do teor de ácido láctico do caldo clarificado para o caldo resfriado, na destilaria anexa B, pode ser devida ao recebimento de caldo misto proveniente da moenda, com uma contaminação menor.

Na destilaria anexa C, a diminuição do teor de ácido láctico do caldo primário para o misto, foi devida a embebição, que dilui o caldo.

Segundo Eggleston (2002), na etapa de moagem prevalecem as bactérias do gênero *Leuconostoc* produtoras de D(-) ácido láctico e, da mesma forma, os valores totais de ácido láctico seriam ainda maiores, pelas razões já discutidas no item anterior.

Na destilaria C foi detectado teor mais elevado de ácido láctico na cana recebida, o que se refletiu nas concentrações desse produto no mel final. Isso foi devido tanto pelo aumento da concentração relativa do ácido láctico, em relação ao caldo, quanto pela contaminação adicional ao longo dos denominados “pontos mortos” do processo. A hipótese para o aumento de sua concentração relativa em relação ao caldo (da mesma forma que a sacarose) é devida a suas características físico-químicas (DAINTITH, 1996). Por outro lado,

Vasconcelos (2001), observou que as tubulações que levam caldo da moenda para a fábrica de açúcar e destilaria (dependendo da configuração e da distância) funcionam como verdadeiros fermentadores contínuos, onde as bactérias se reproduzem. Esses pontos são normalmente monitorados pela contagem de colônias em placas (resultados em 24 horas) e, conforme demonstrado, pode ser também feito pela rápida quantificação do ácido láctico.

Tanto a contaminação quanto à concentração do caldo ao longo do processo, como também constataram MacMaster e Ravnö (1977) em experimentos similares feitos em usinas sul-africanas, resultou em elevados teores de ácido láctico no mel final. Em destilarias anexas os mostos de melaços com baixa pureza, em especial oriundos de fabricação de açúcar tipo *Very High Polarization* (VHP), no qual se utiliza menos sulfito no branqueamento, estão mais propensos à contaminação. Segundo Chang et al. (1997), isso é atribuído à propriedade bacteriostática do SO_2 , que diminui a viabilidade de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica em concentrações entre 100 e 400 mg/L, sem afetar a viabilidade da levedura utilizada no processo. De maneira inversa, pode-se concluir que a presença do ácido láctico nos méis esgotados é um fator que contribui para inibir a levedura desde o início da fermentação, mesmo que a contaminação bacteriana não esteja elevada nas dornas.

Pelo fato de não se ter detectado ácido láctico em solução de açúcar, pode-se concluir que essa substância é praticamente eliminada na fração aquosa durante a centrifugação das massas – operação descrita por Hugot (1977), concentrando-se no mel final.

Uma das maneiras de se assegurar à qualidade dos melaços destinados à produção de etanol é o controle das bactérias contaminantes a ao longo do processo de produção de açúcar e a verificação desse controle poderia ser feita rapidamente pela quantificação do ácido láctico nestes pontos estratégicos.

4.2.3 Fermentação batelada alimentada e contínua floculante em destilaria anexa

Duas fermentações convencionais em batelada alimentada, e uma contínua com levedura floculante, em escala piloto, foram comparadas com relação à formação de ácido láctico. Durante 13 dias consecutivos efetuou-se a quantificação de ácido láctico e a contagem microscópica de bactérias nas três fermentações operando em paralelo na mesma unidade industrial, alimentadas com o mesmo substrato (Fig. 16). O mosto era composto de melaço oriundo da produção de açúcar da mesma unidade.

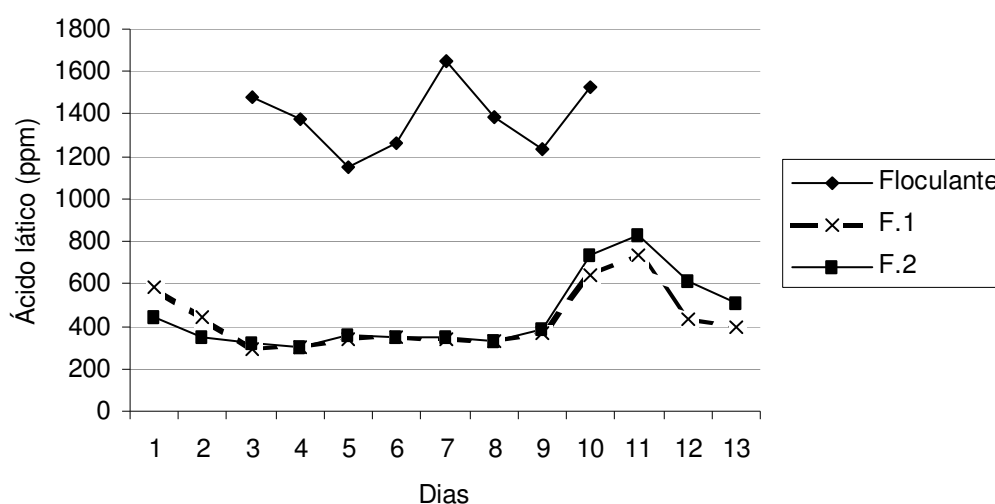


Figura 16. Teores de ácido láctico, medidos em três fermentações alimentadas simultaneamente com o mesmo substrato.

A evolução do teor de ácido láctico nas fermentações convencionais (F.1 e F.2) mostram homogeneidade entre esses processos, os quais mantiveram, em média, 5×10^6 bastonetes/mL e teores de ácido láctico em torno de 300 mg/L ao longo dos primeiros 8 dias. Nesse período foram realizados 16 ciclos fermentativos, em média, em cada reator de 400 m³, a uma vazão de alimentação de 120 m³/h.

No nono dia ocorreu incidência de chuvas, o que e matéria-prima com maior teor de terra e contaminação foi introduzida no processo a partir do dia seguinte, quando a contaminação atingiu 10^7 bastonetes/mL e o teor de ácido láctico próximo de 800 mg/L. Ao atingir esse nível de contaminação, foi

efetuada a aplicação de agente antibacteriano (3 ppm de Kamoran) e, após 24 horas notou-se a estabilização do teor de ácido láctico nos níveis do início do teste. As correlações entre as contagens de bactérias e a quantidade de ácido láctico formada nestas duas fermentações são mostradas nas Figuras 18 A/B.

Os teores de ácido láctico na fermentação floculante (em média cerca de 4 vezes maior que na convencional) levam a concluir que este sistema opera com maior contaminação em relação aos sistemas convencionais. Segundo Viegas et al. (2002), as fermentações com levedura floculante não necessitam de centrífugas, diminuindo o custo de instalação. Contudo, problemas operacionais e baixos rendimentos são atribuídos a essas fermentações por Amorim et al. (1996). Isso pode ser explicado pelo fato dos flocos de leveduras serem um nicho potencial para o alojamento das bactérias, que vão se acumulando no processo com mais intensidade, uma vez que o vinho não é centrifugado.

Outro inconveniente das fermentações floculadas é a dificuldade do monitoramento de contaminação, uma vez que a formação dos flocos impede a contagem de bactérias ao microscópio. Portanto, a quantificação do ácido láctico é uma ferramenta em potencial para o monitoramento das fermentações que empregam esse sistema.

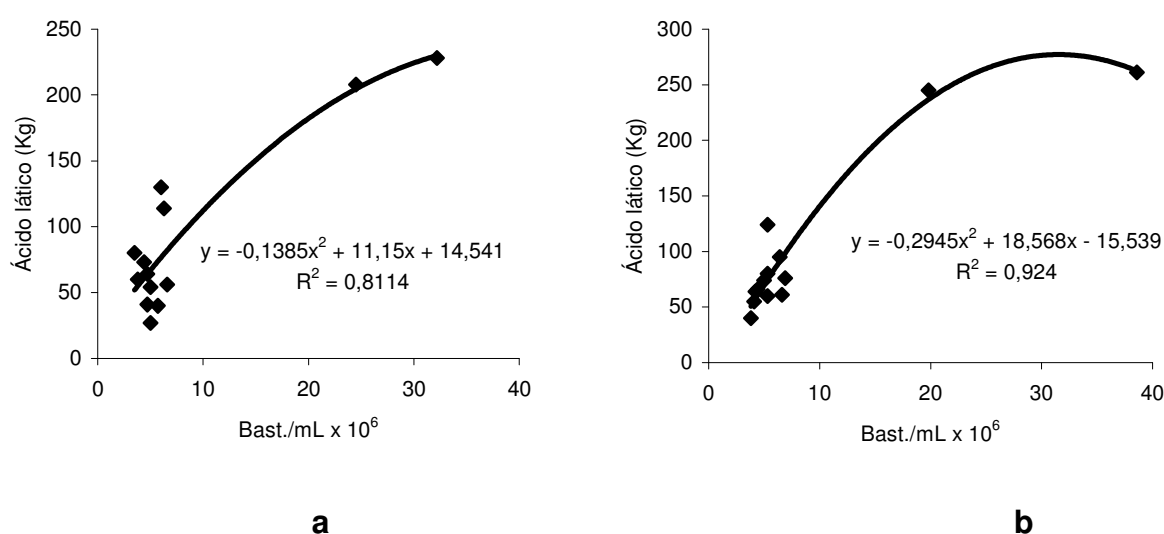


Figura 17 (a; b). Correlação entre contagem de bastonetes ao microscópio ótico e quantidade de ácido láctico formado em duas fermentações alcoólicas (F.1 e F.2) alimentadas simultaneamente com mesmo mosto.

Segundo Doria-Filho (1999), o coeficiente de correlação, observado entre a formação de ácido láctico e a contagem de bastonetes ao microscópio, pode ser considerado forte ($r > 0,75$) em ambas fermentações. Isso pode ser explicado pelo fato dessa técnica de contagem não identificar as bactérias em forma de cocos, conforme atestado por Cherubin (2003), o que pode ter sido compensado pela não detecção do isômero D(-) ácido láctico, possivelmente formado pelas bactérias presentes na fermentação, conforme constatado por Costa (2006).

De qualquer forma, uma correlação perfeita ($r=1$) é uma situação pouco provável de ocorrer na prática, visto que entre as bactérias contaminantes da fermentação etanólica pode existir aquelas de metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo. Portanto, fica evidente a limitação da microscopia como único parâmetro para se avaliar a contaminação na fermentação etanólica, enquanto que a quantificação do ácido láctico pode ser um dado a mais na avaliação das condições da fermentação.

A concentração de resultados na parte inferior da reta deve-se ao fato da contagem de bastonetes ao microscópio ser feita uma vez ao dia (quando o ácido láctico era também medido na mesma amostra). Assim, o espaço de 24 horas entre uma análise e outra era suficiente para um aumento de praticamente uma potência na população de bactérias. Porém, como o intuito era comparar o novo parâmetro com a análise na rotina da indústria, essa sistemática foi mantida.

4.2.4 Fermentação contínua em destilaria anexa

De acordo com Stafford (1986), as fermentações contínuas não têm uma grande aplicação na indústria devido a grande probabilidade de contaminação. Na indústria brasileira do etanol pode se constatar essa tendência, conforme descrito por Amorim e Leão (2005). Os dados referentes ao ácido láctico coletados em fermentação contínua multistágio permitiram verificar esta afirmação, uma vez que suas maiores concentrações foram detectadas neste sistema (Fig. 18).

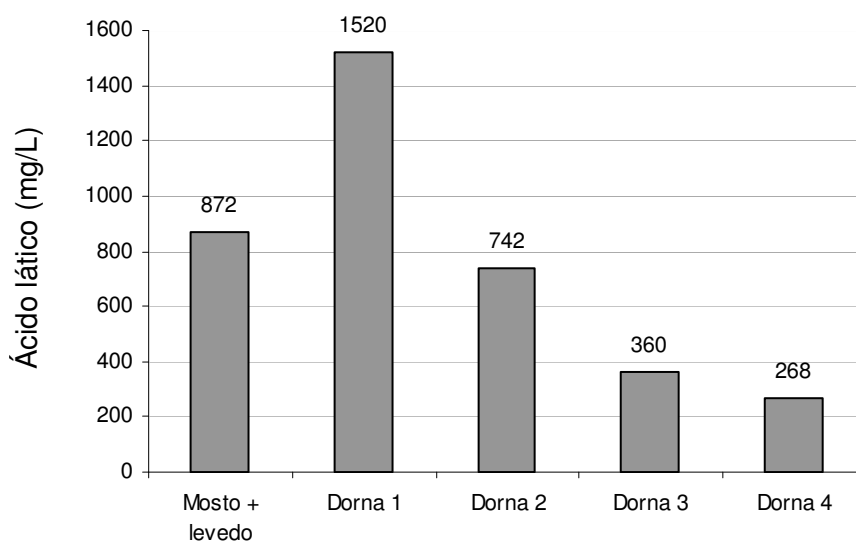


Figura 18. Teor de ácido láctico formado em cada uma das dornas de sistema contínuo multiestágio. Temperaturas máximas: D.1 = 36°C; D.4 = 31°C

Formou-se claramente uma típica curva de crescimento microbiano, o que não deve ser uma simples coincidência considerando-se a ecologia das dornas. Ou seja, as concentrações de substrato e as temperaturas do meio, decrescentes do primeiro para o último estágio, proporcionam diferentes condições de crescimento dos microrganismos e produção associada de ácido láctico. Pode-se inferir que dorna 1 a população inicial de bactérias cresce exponencialmente devido a maior disponibilidade de substrato e temperaturas mais elevadas, decrescendo nas dornas subseqüentes, onde o teor de açúcar e a temperatura diminuem gradualmente.

A partir dos valores de ácido láctico e os respectivos volumes dos materiais foi calculado o balanço de massa do sistema, bem como pôde-se estimar a perda de álcool equivalente em ácido láctico. (Tabela 14).

Tabela 14. Quantidades de ácido láctico formado durante ciclo de 8 horas, nas etapas da fermentação etanólica em processo contínuo.

Amostra	Ácido Láctico ¹ (mg/L)	Volume (m ³)	Ácido Láctico (Kg)	Bastonetes/mL ² (x10 ⁷)
Mosto	212	1907	404,3	0,7
Levedo	660	983	648,7	18,0
Vinho	2385	2890	6892,6	3,6
Fermentação	—	—	5839,6	—
Vinhaça	2160	—	—	—

¹Média de três amostragens em intervalos de 1 hora

²Contagem microscópica

Álcool 100% produzido no período (v/v): 187.850 L

Relação entre ácido láctico/etanol: 3,45% (m/v).

Considerando-se os valores da contagem de bactérias ao microscópio (normalmente superestimados) e alto teor de ácido láctico no vinho, pode-se depreender que as bactérias eram bastante ativas quanto à produção de ácido. Nas fermentações contínuas, o monitoramento rápido e confiável é imprescindível para o controle de perdas do processo e esta metodologia mostrou-se adequada neste quesito.

4.2.5 Quantificação de ácido láctico em fermentação sistema semicontínuo

Uma das variações do processo Melle-Boinot, que reúne tanto características da fermentação semicontínua é o chamado “Conbat”, no qual uma dorna primária, de grande volume, recebe continuamente mosto e leite de levedura. O vinho em fermentação desse primeiro estágio segue para as dornas secundárias independentes e de volume menor, onde termina a conversão dos açúcares em álcool. Para se verificar essa característica do sistema Conbat, com relação a formação de ácido láctico, foi realizado experimento em destilaria configurada com esse sistema, anexa à usina de açúcar e os resultados estão expressos na Figura 19.

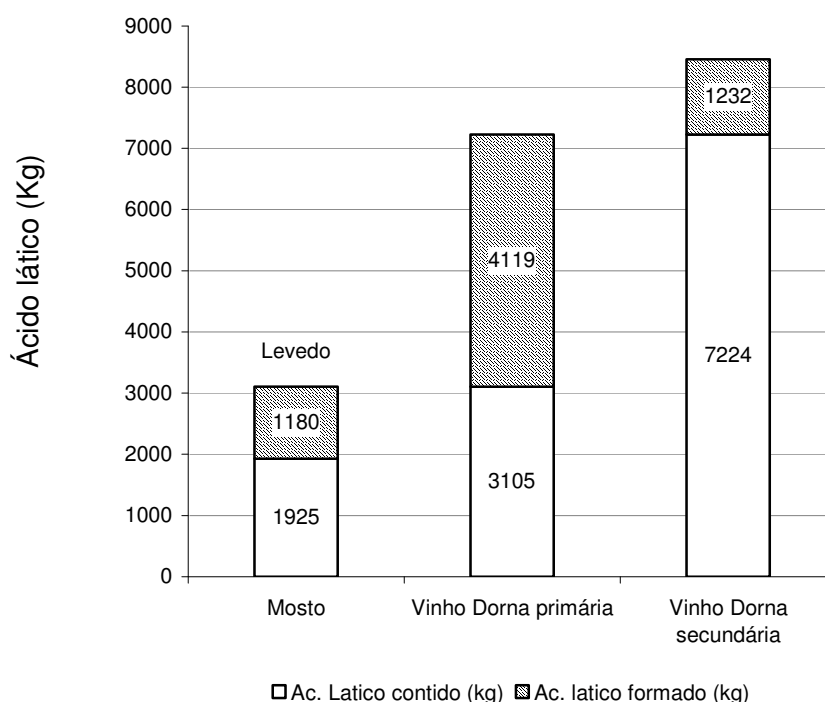


Figura 19. Formação de ácido láctico durante as etapas de fermentação etanólica de sistema Conbat.

Junto ao mosto processado no período, entrou 1925 kg de ácido láctico e, no levedo retornou 1180 kg. Verificou-se que a maior formação de ácido láctico ocorreu na dorna primária (48,71%), em comparação ao processo como um todo, induzindo à conclusão que a maior contaminação ocorre nesta dorna. Muito provavelmente isso também é influenciado pela temperatura média (33,8°C) do substrato em fermentação na dorna primária, o que, aliado ao grande volume, provoca grande liberação de calor¹, não dissipado totalmente pelos sistemas de resfriamento. Segundo Amorim et al. (1996), uma das maiores desvantagens desse sistema é que a dorna primária não é esvaziada para limpeza e o biofilme formado pela espuma aderida nas paredes internas contribui o aumento da contaminação bacteriana, o que pode ser verificado

¹ Segundo a equação geral da calorimetria ($Q=m.c.\Delta t$), a quantidade de calor gerado é diretamente proporcional à massa e a temperatura do corpo.

pela formação de ácido láctico. Esses fatores contribuem para rendimentos inferiores a 90%, relativamente baixos se comparados com a média das fermentações por batelada.

4.2.6 Avaliação da eficácia de antibacterianos em fermentação etanólica

Os agentes antimicrobianos atuam sobre os microrganismos através de diferentes modos, provocando a morte ou simplesmente a inibição das células. Para obter uma medida precisa da eficácia inibitória e letal, devem-se considerar fatores como a concentração do antimicrobiano, a concentração de bactérias, temperatura, pH e solubilidade relativa em água dos agentes testados. Ademais, os diversos produtos se dispersam a diferentes taxas e são inativados em graus variados pelo próprio meio (SEELEY et al., 1984).

A avaliação do desempenho dos desinfetantes em escala industrial é complexa, principalmente pelos fatores que podem afetá-la. Entretanto, torna-se evidente a importância desse trabalho, de modo a elucidar a eficácia dos produtos comerciais sobre os microrganismos freqüentes e prejudiciais no processo de fermentação para produção de etanol (ROSALES, 1989).

4.2.6.1 Fermentação batelada alimentada com tratamento contínuo do levedo

Este experimento teve como objetivo avaliar comparativamente a eficácia de dois antimicrobianos em escala industrial. Como parâmetro de desempenho, foi utilizado o teor de ácido láctico no vinho ao final de fermentação nas dornas tratadas com os respectivos produtos. A dorna inicial do ciclo fermentativo não foi tratada com qualquer dos produtos e, assim, utilizada como controle; as dornas ímpares da seqüência foram tratadas com o produto VM e as dornas pares com MN. Este ensaio desprezou o ácido do mosto e o recirculado no levedo, pois duas dornas eram alimentadas

simultaneamente com o mesmo mosto. Os resultados estão expressos na Tabela 15.

Tabela 15. Teor de ácido láctico em vinho obtido de fermentação etanólica por processo batelada alimentada, previamente tratada com dois antimicrobianos.

Dorna	Produto aplicado	Dosagem (mg/L) ²	Ácido láctico (mg/L)
1	Controle	0	1140
2	VM	3	270
3	MN	3	260
4	VM	3	310
5	MN	3	250
6	VM	3	290
7	MN	3	300
8	VM	3	330
9	MN	3	270

²Quantidade de produto (g) sobre volume (m³) de vinho levedado

As médias do teor de ácido láctico para os tratamentos foram 300 mg/L para o VM e 270 mg/L para o MN (Fig. 20), e a diminuição em relação ao controle, respectivamente de 73,68% e 76,31%. Considerando-se que o ácido láctico foi medido ao final da fermentação, não sendo subtraído o que foi introduzido no processo via mosto e levedo tratado, pode-se concluir que os produtos minimizaram significativamente as perdas provocadas pelas bactérias contaminantes da fermentação.

Pode-se inferir que houve uma significativa diminuição no número de bactérias viáveis, partindo-se do pressuposto que o ácido láctico é produto do metabolismo de bactérias ativas.

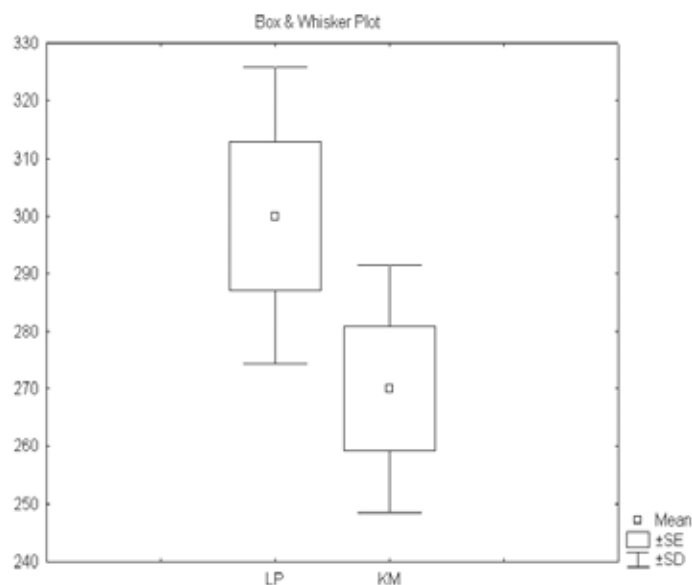


Figura 20. Gráfico Box & Whisker para as médias de formação de ácido láctico em tratamento com os antibacterianos virginiamicina (VM) e monensina (MN).

Os técnicos que conduzem as fermentações alcoólicas não têm um parâmetro preciso para avaliar qual melhor biocida a ser aplicado no momento de contaminação, bem como lidam com incertezas quanto à eficácia do tratamento efetuado. Dessa forma, a quantificação do ácido láctico formado em fermentações industriais pode ser utilizada como método indireto, complementar aos métodos tradicionais para avaliar o efeito biocida de antimicrobianos.

4.2.6.2 Fermentação batelada alimentada com tratamento do levedo em batelada

Neste ensaio, verificou-se a produção de ácido láctico em fermentação etanólica em bateladas tratadas com quatro produtos antimicrobianos de diferentes princípios ativos. Os produtos foram aplicados por dois ciclos consecutivos de fermentação, variando-se a quantidade. A concentração de ácido láctico inicial, que entrou através do mosto e o que recirculou associado ao levedo, foi considerada para efeito do cálculo do balanço de massa do ácido formado. Os resultados estão expressos na Tabela 16.

Tabela 16. Quantidade de ácido láctico em vinho de fermentação etanólica batelada alimentada, tratada com diferentes antibacterianos.

Dorna	Produto	Ciclo 1			Ciclo 2		
		Dosagem (mg/L) ¹	Ácido láctico (Kg)	Ácido láctico (%)	Dosagem (mg/L) ¹	Ácido láctico (Kg)	Ácido láctico (%)
1	Controle	0,0	1226,2	—	0,0	1067,8	—
2	MN	3,0	280,4	-77,13	1,5	86,1	-91,94
3	SL	6,0	238,8	-80,53	3,0	96,4	-90,97
4	VM	3,0	360,0	-70,64	1,5	167,5	-84,31
5	VM+ SL ³	3,0	181,0	-85,24	1,5	87,2	-91,83

MN: Monensina, SL: Salinomycin; VM: Virginiamycin

¹Quantidade de produto (mg) sobre volume de vinho levedado (L)

²Diminuição do ácido formado em relação ao controle

³Mistura de VM (40%) e SL (60%)

De acordo com os resultados, pode-se concluir que a mistura de LP + XP foi o mais efetivo contra as bactérias contaminantes entre os quatro produtos testados no primeiro ciclo fermentativo, considerando-se a menor quantidade de ácido láctico formado. Isso pode ser explicado pelo maior espectro alcançado por uma mistura de dois produtos de princípios ativos e modos de ação diferentes, em conformidade com estudos feitos por Narendranth (2003). No segundo ciclo, os produtos MN e a mistura VM + SL exibiram praticamente o mesmo desempenho na inibição das bactérias lácticas, o que pode ser verificado pela diminuição do ácido láctico formado em relação ao controle. Pode-se depreender também que ambos os produtos apresentaram maior efeito residual no meio fermentativo.

Ficou também evidente que o tratamento sistemático e regular traz benefícios em relação a dosagens esporádicas, visto que se consegue controlar mais efetivamente as contaminações quando a população inicial de bactérias é menor (Pelczar et al., 1997).

Tomando-se os valores médios de álcool recuperado após o tratamento em relação ao potencialmente perdido como ácido láctico, calculou-se o balanço financeiro do tratamento, como segue:

Volume da dorna: 250 m³

Volume médio de álcool recuperado em cada dorna tratada: 961 L

Valor do álcool recuperado*: US\$ 374,36

Custo do tratamento por dorna^{**}: US\$ 74,87

Saldo do tratamento por dorna: US\$ 299,49

Saldo estimado por dia de produção (12 dornas): US\$ 3593,85

* Baseado na cotação de venda do produtor em maio/2007 para álcool anidro: R\$ 0,76/L (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA DA ESALQ – CEPEA, 2007).

** Considerando-se o preço médio de US\$ 100/kg, convertidos em moeda local a taxa cambial de R\$ 1,95.

Além do retorno financeiro, há que se contabilizar os ganhos indiretos advindos da fermentação saudável, como menor floculação e conseqüentemente menor perda de biomassa na centrifugação do levedo, teor alcoólico mais elevado, viabilidade da levedura e fermentações mais rápidas, como fora atestado por Aquarone e Sato (2001).

4.2.6.3 Fermentação contínua multiestágio

As fermentações contínuas notoriamente são mais susceptíveis as contaminações e, portanto, proporcionam rendimentos inferiores aos sistemas operados em batelada (STAFFORD, 1986; INGLEDEW, 2003b). Essa característica é percebida em particular na fermentação etanólica, nas quais há maior demanda de antibacterianos para se manter os parâmetros do processo dentro das condições aceitáveis (Tab. 17).

A diminuição da conversão da glucose em etanol, um dos reflexos do estresse provocado pelo ácido lático no metabolismo na levedura, é notada especialmente na fermentação contínua contaminada por bactérias, pois o processo não pode ser paralisado, levando ao aumento de açúcar residual na última dorna do sistema. Em dados momentos, quando não existe uma demanda imediata pelo volume de produção de álcool, pode-se, por exemplo, recorrer ao expediente de diminuir o teor de açúcares no mosto, o que causa vários inconvenientes operacionais. Porém, quando as colunas de destilação trabalham a plena capacidade, o operador obriga-se a centrifugar dornas ainda em fermentação, perdendo-se açúcar.

Tabela 17. Quantidade de ácido láctico, bastonetes, açúcares residuais e etanol em de fermentação de 24 horas, antes e após tratamento com antimicrobianos.

Antes tratamento						
Amostra	Antibiótico (mg/L etanol)	Teor de ácido láctico (mg/L)	Ácido láctico (Kg)	Bast./mL ² (x10 ⁷)	AR (%)	Produção de Etanol (L)
Mosto	—	315,0	1878,7	0,72	—	—
Levedo	—	650,9	1900,9	16,80	—	—
Vinho	9,8 ³	3746,2	33280,8	2,41	0,48	—
Balanço liq.	—	—	32867,0	—	—	534.000
Após tratamento						
Mosto	—	295,0	1805,4	0,32	—	—
Levedo	10,0 ⁴	350,1	1000,7	6,40	—	—
Vinho	6,2 ⁴	746,9	6701,3	0,65	0,09	—
Balanço liq.	—	—	3898,4	—	—	560.000

¹ Média de três amostragens em intervalos de 1 hora

² Contagem microscópica

³ Produto base penicilina

⁴ Produto base monensina

AR: Açúcares residuais

O tratamento com antimicrobianos efetuado durante esse ensaio, embora em maior dosagem do que o necessário em fermentação contínua, proporcionou uma recuperação de 26 mil litros de álcool (100% v/v) durante ciclo de 24 horas. Tomando-se a mesma base de cálculo do ensaio anterior, teremos uma recuperação aproximada de US\$ 10.133 ante o investimento ao redor de US\$ 910.

Vários exemplos recentes de troca de sistema de fermentação contínua para batelada em algumas destilarias comprovam que a economia em capital, conseguida no momento do projeto e durante a operação das fermentações contínuas, perde-se ao longo de alguns anos devido aos menores rendimentos e ao maior custo do tratamento com antimicrobianos. Considerando-se que as instalações de uma destilaria industrial têm vida útil de algumas décadas, cálculos de depreciação mais consistentes deveriam ser feitos e considerados na escolha do sistema fermentativo para se evitar futuros gastos adicionais.

4.2.7 Centrifugação do vinho e recuperação da levedura

O processo Melle-Boinot, introduzido no Brasil na década de 1940, trouxe novo conceito para o processo de fermentação etanólica, proporcionando ganhos significativos de rendimento na medida em que a recuperação das células de levedura, feita em separadoras centrífugas, evita o consumo de açúcar para reposição da biomassa (AMORIM; LEÃO, 2005).

Contudo, junto das leveduras também recirculam proporções variadas do vinho, o qual leva consigo parte significativa das bactérias e as substâncias produzidas na fermentação. Várias destas substâncias, incluindo-se os ácidos orgânicos, os álcoois superiores e o próprio etanol, são inibidoras da levedura. Contudo, seus efeitos na fermentação têm passado despercebidos aos técnicos, tendo em vista que as práticas de condução foram introduzidas há muito tempo (STUPIELLO, 1984).

Normalmente, apenas o teor de álcool é verificado no levedo recuperado, para fins de cálculo de rendimento. Porém, a quantidade de ácido láctico no vinho recirculado junto do creme de leveduras, na operação de centrifugação, mostrou-se, na média, significativa, como pode ser constatado na Tabela 18.

Tabela 18. Recirculação de ácido láctico no creme de levedura centrifugado de vinho fermentado pelo processo Melle-Boinot.

Destilaria	Ácido láctico no vinho (mg/L)	Concentração levedura (%)	Vinho recirculado (m ³)	Ácido láctico ^a no levedo (mg/L)	Ácido láctico recirculado (%)
1	536	78,0	19,0	161	10,28
2	567	74,5	10,5	189	7,58
3	405	70,5	59,0	145	11,03
4 ^b	1278	55,0	670,5	945	21,60
5	306	53,2	26,6	252	16,81
6 ^b	747	48,3	741,3	351	14,93
7	840	45,2	55,6	328	17,56

^a Após adição com água e ácido sulfúrico até pH 1,9 – 2,5.

^b Fermentação contínua (volume de pé-de-cuba, calculado em 24 horas)

A quantidade de ácido láctico que é introduzida novamente no processo varia em função do teor de ácido láctico no vinho fermentado, bem como do

volume de vinho recirculado junto com o levedo, promovendo sua concentração no processo conforme citado por Maiorella et al. (1984b).

Considerando-se o pH médio de 4,5 do vinho fermentado, pode-se deduzir que neste meio a maior parte do ácido láctico encontra-se na sua forma dissociada, ao passo que nas cubas de tratamento (onde o pH geralmente não é maior que 2,5) esse ácido orgânico atingirá sua maior concentração não dissociada, fazendo com que seja absorvido pelas leveduras, comprometendo a fermentação seguinte.

4.2.8 Nova perspectiva de purificação de levedura na fermentação etanólica

A quantificação do ácido láctico no levedo recirculado mostra claramente que o processo Melle-Boinot, tal qual foi designado, soluciona apenas parte do problema, ao recuperar as leveduras da fermentação. A retirada das substâncias indesejáveis, formadas na fermentação, não é feita integralmente pelas separadoras centrífugas, mesmo que estes equipamentos operem nas melhores condições.

Marques e Serra (2004), investigando os álcoois recirculados junto com as leveduras, concluíram que a diminuição da recirculação desses metabólitos minimiza o efeito inibitório nas fermentações. Estudos feitos por Amorim e Basso (2003) mostraram diminuição no rendimento fermentativo quando se utilizou maior diluição do levedo no pé-de-cuba, devido à multiplicação da levedura em detrimento da produção de etanol.

Com base na literatura e nos dados do presente trabalho, recomenda-se maior retirada de vinho no creme obtido na centrífuga, de modo que a concentração de levedura que retorna ao processo seja superior a 95%, proporcionando o mínimo retorno de ácido láctico (entre outras substâncias indesejáveis). Isso pode ser conseguido mediante uma unidade de filtração rotativa a vácuo, equipamento de uso consolidado nos processos de produção de biomassa microbiana (RUSSELL, 2003; KILIKIAN, 2005). Esse filtro, instalado complementarmente ao processo Melle-Boinot tradicional, poderia minimizar o problema de recirculação de substâncias na fermentação etanólica

(Anexo 3). Como efeitos adicionais, o teor alcoólico do vinho se elevaria e o consumo de água industrial, usada na diluição e lavagem da levedura poderia ser menor. No exemplo a seguir, pode-se estimar a economia diária de água com a diluição do levedo em uma destilaria de médio porte, conseguida com a aplicação do sistema proposto.

- Produção diária de etanol hidratado: 500.000 L
- Volume de vinho para destilação¹: 5.000.000 L
- Volume aproximado de creme de levedura gerado²: 825.000 L
- Volume de água de diluição do pé-de-cuba (1:1): 825.000 L
- Gasto água para diluição do levedo concentrado (95%): 525.000 L
- Economia diária de água: 300.000 L/dia

¹ teor alcoólico médio de 10% (v/v):

² concentração média de 65%

Com este sistema pode-se também diminuir outra fonte de entrada de bactérias e potencial contaminante do sistema através da água de diluição do fermento (CAMOLEZ; MUTTON, 2005). Com efeito, menos ácido sulfúrico será necessário para a lavagem do leite de leveduras.

Aumentando-se o teor alcoólico no vinho, haverá ainda uma economia de vapor (e água tratada para esse fim) na etapa de destilação, bem como a diminuição do grande volume de vinhaça, um efluente de diversos impactos no solo (ROSSETTO, 2006).

A instalação do filtro rotativo a vácuo pode ser útil, sobretudo para as unidades que secam o excedente de levedura destinada à produção de proteína animal, na medida em que a massa de levedura vai exigir menos energia nos equipamentos de secagem.

5. CONCLUSÕES

- A formação de ácido láctico na fermentação etanólica, devido à contaminação bacteriana, induz a perdas significativas de álcool;
- O ácido láctico pode ser formado pela ação de bactérias sobre a cana, ainda no campo, e introduzido no processo de produção do etanol, podendo ser utilizado com um indicador da qualidade microbiológica da matéria-prima;
- A presença de ácido láctico no caldo, durante a extração e processamento, pode indicar focos de contaminação nos equipamentos e respectivas perdas de açúcar;
- O mel final destinado à fermentação etanólica geralmente contém altas concentrações de ácido láctico;
- Geralmente a maior formação de ácido láctico ocorre durante a etapa de fermentação etanólica, variando em função do número e das espécies de bactérias contaminantes;
- Parte do ácido láctico formado na fermentação etanólica retorna ao processo através do leite de leveduras recuperado;
- Antibacterianos específicos são eficazes contra as bactérias lácticas contaminantes, as quais, deixam de produzir ácido láctico;
- A quantificação do ácido láctico pode ser adotada como método rápido e de razoável confiabilidade no monitoramento da fermentação etanólica, bem como na avaliação dos tratamentos antibacterianos.

6. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES

- Outros estudos, comparando-se os diferentes equipamentos e reagentes enzimáticos para quantificação do ácido láctico, deverão ser realizados para determinar qual o mais adequado em termos de custo, precisão, repetitividade e reprodutibilidade.
- Equipamentos ou reagentes enzimáticos que detectem também o isômero D(–) do ácido láctico tornarão os resultados ainda mais representativos.
- Como o ácido láctico afeta o metabolismo da levedura de um modo geral, ensaios correlacionando esse metabólito e o teor de proteínas em levedura seca, poderão ser realizados nas fábricas de levedura para nutrição animal;
- Testes em escala piloto poderão demonstrar a viabilidade prática de sistemas de filtração a vácuo, para remoção das substâncias recirculadas nos processos de fermentação etanólica.

7. LITERATURA CITADA

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 677-681, 2003.

ALCARDE, V. E.; YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 21, n. 4, p. 40-42, 2003.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, M. D. G. **Processos de produção de álcool** – controle e monitoramento. Piracicaba: Fermentec/ ESALQ/USP, 1996.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; GALLO, A. R.; ALCARDE, V. E.; GARCIA, C. E.; GODOY, A. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica** – Plaqueamento. Piracicaba: FERMENTEC, 1999.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A.; GARCIA, C. E. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica** – microscopia. Piracicaba: FERMENTEC, 2000.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Volume de pé-de-cuba caso a caso. In: ENCONTROS FERMENTEC – REUNIÃO ANUAL, 27. **Resumos**: Fermentação alcoólica. Piracicaba: FERMENTEC, 2003. p. 22.

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: FERMENTEC, 2005.

ANDRIETTA, M. G. S.; OLIVEIRA, A. J.; STUPIELLO, J. P. Determinação de concentração inibitória mínima para cinco antimicrobianos sobre bactérias G (+) isoladas na indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 13, n. 6, p. 42-43. 1995.

AQUARONE, E.; SATO, S. Controle de contaminações microbianas em processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 25, p. 583-593.

BADGER, P. C. Ethanol from cellulose: a general review. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 17-21.

BILITEWISKI, U. Enzyme electrodes for food analysis. In: WAGNER, G; GUILBAUT, G. G. **Food biosensor analysis**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 31-61.

BOOTH, I. R.; KROLL, R. G. The preservation of foods in low pH. In: GOULD, G. W. (Ed.). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier, 1989. p. 119-160.

BORZANI, W. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. cap. 6, p. 105-111.

BORZANI, W. Considerações a respeito do cálculo de rendimentos de fermentações alcoólicas. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 25, n. 3, p. 40-42, 2007.

BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 76 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BURNQUIST, H. L. Por que o Brasil deve apoiar a internacionalização do etanol? In: **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, jan. – mar. 2007.

BRYAN-JONES, G. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p. 165-175.

CALAM, C. T. Shake-flask fermentations. In: DEMAINE, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. cap. 6, p. 59-65.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. R. J. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 23, n. 5, p. 42-47, 2005.

CAPARRÓS, L. A. T. Controle microbiológico: atualizações. In: ENCONTROS FERMENTEC – REUNIÃO ANUAL, 24. São Pedro. **Resumos...** p. 10-11. Piracicaba: FERMENTEC, 2005.

CARVALHO-FILHO, T. D.; CALDAS, C.; SILVA-JUNIOR, J. F. Aplicação do infravermelho próximo no setor sucroalcooleiro. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 17, n. 6, p. 25-26, 1999.

CASSIO, F.; LEÃO, C.; VAN-UDEN, N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 3, p. 509-513, 1987.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA DA ESALQ – CEPEA. **ÁLCOOL**. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/alcool>. Acesso em: 20 abr. 2007.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 1-6, jan. 1997.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M. **Microbiological methods**. 6th ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1989.

COPERSUCAR. **Manual de métodos analíticos** – controle químico da fermentação. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 2001.

COSTA, V. **Perfil de metabólitos excretados por Lactobacillus isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico**. Piracicaba: Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006. 66 p.

COULET, P. R.; GILBERT, B.; SÉCHAUD, F. Amperometric enzyme membrane electrodes. In: WISE, D. L. (Ed.). **Bioinstrumentation and biosensors**. New York: Marcel Dekker, 1990.

DAINTITH, J. **A dictionary of chemistry**. 3th ed. New York: Oxford University Press, 1996.

DELALIBERA, M. C. B.; VENTURA, R.; CHAGAS, V. C. Determinação comparativa de níveis de infecção utilizando-se metodologia de análise microscópica e cultura em placas de Petri. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, p. 37-38, nov./dez. 1984.

DINWOODIE, R. C.; MEHNERT, D. W. Continuous method for monitoring and controlling fermentation using an automated HPLC system. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 27, p.1060-1062, 1985.

DIPARDO, J. **Outlook for biomass ethanol production and demand**. Energy Information Administration. Washington, 2004. Disponível em: <http://www.ethanol-gec.org/information/briefing/6.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2006.

DOIN, P. A. Fermentação contínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. cap. 6, p. 112-134.

DONG, S.; CHEN, X. Some new aspects in biosensors. **Reviews in Molecular Biotechnology**, Oxford, v. 82, p. 303-323, 2002.

DORIA-FILHO, U. **Introdução à bioestatística**. São Paulo: Elsevier, 1999.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P; ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 177-182, 2006.

DUNCAN, C. L.; COLMER A. R. Coliforms associated with sugar cane plants and juices. **Applied Microbiology**, Washington, v. 12, n. 2, p. 173-177, 1964.

EGGLESTON, G. Deterioration of cane juice – sources and indicators. **Food Chemistry**, London, v. 78, p. 95-103, 2002.

EGGLESTON, G.; HARPER, W. D. Determination of sugarcane deterioration at the factory: development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to measure mannitol. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 366-372, 2006.

ESSIA-NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

FAHRASMANE, L.; GANOU-PARFAIT, B. Microbian flora of rum fermentation media. **Journal of Applied Microbiology**. V. 84, p.921-928. 1998.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 2. ed. Piracicaba: Sociedade dos Técnicos Açucareiros de Alcooleiros do Brasil, 2003.

FRANCHINI, E.; MATSUSHIGUE, K. A.; CALANTONIO, E.; KISS, M. A. P. D. Comparação dos analisadores de lactato *Accusport e Yellow Springs*. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 39-44, 2004.

GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v.10, n. 5, p. 30-34, 1992.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido do fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**. V. 9, n.6. Piracicaba. 1991a.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**. V. 9, n.4/5. Piracicaba. 1991b.

GIROTTI, S.; MURATORI, M.; FINI, F.; FERRI, E. N.; CARREA, G.; KORAN, M.; RAUCH, P. Luminescent enzymatic flow sensor for D/L – lactate assay in beer. **European Food Research Technology**. V. 210, p. 216-219, 2000.

GODOY, A. Contaminação bacteriana: efeitos na fermentação. In: **Encontros Fermentec** – Reunião Anual, 23. Piracicaba: Fermentec, 2002. 90 slides em MS Power Point.

GOLDENBERG, J., MACEDO, I. C. Brazilian Alcohol program: an overview. **Energy for Sustainable Development**, Bangalore, v. 1, n. 1, p. 19, 1994.

GOMIDE, R. **Estequiometria industrial**. 2. ed. São Paulo: Ed. do autor, 1979.

HASSELBERGER, F. X. **Uses of enzymes and immobilized enzymes**. Chicago: Nelson-Hall, 1978.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, J. T.; STALEY, J. T. WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUGOT, E. **Manual da engenharia açucareira**, V.2. São Paulo: Mestre Jou, 1977.

HYNES, S. H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Use of virginiamycine to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 284-291, 1997.

INGLEDEW, W. M. Water reuse in fuel alcohol plants: effect on fermentation. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003a. Chapter 24, p. 343-354.

INGLEDEW, W. M. Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: How does the technology affect yeast?. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003b. Chapter 11, p. 135-143.

INGRAM, M. The lactic acid bacteria – a board view. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p. 01-13.

ISLAM, M.; TOLEDO, R.; HAMDY, M. K. Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 17, p. 369-376, 1999.

JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, M. W. Ethanolic fermentation of blackstrap molasses and sugar cane juice using very high gravity technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1242-1246, 1994.

KANDLER, O.; WEISS, M. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, Section 14, p. 1208-1234.

KELSALL, D. R.; LYONS, T. P. Grain dry milling and cooking procedures. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: N. University Press, 2003a. Chapter 2, p. 09 – 21.

KELSALL, D. R.; LYONS, T. P. Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: N. University Press, 2003b. Chapter 10, p.121-133.

KETCHUM, P. A. **Microbiology**: concepts and applications. New York: John Wiley & Sons, 1988.

KILIKIAN, B. V. Filtração e centrifugação. In: PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005.

KIRSOP, B. H.; DOLEZIL, L. Detection of lactobacilli in Brewing. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p. 159-164.

KRONKA, E. A. M.; PAIM, A. P. S.; TUMANG, C. A.; LATANZE, R.; REIS, B. F. Multicommutated flow system for spectrophotometric L(+)lactate determination in alcoholic fermented sugar cane juice using enzymatic reaction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 46-49, 2005.

LEFEBVRE, D.; GABBRIELI V.; VAYSSIER, Y.; FONTAGNÉ-FAUCHER, C. Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 35, n. 5, p. 407-414, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-43.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, p. 627-642, 2006.

LIVERMORE, D.; WANG, Q.; JACKSON, R. S. Understanding near infrared spectroscopy and its applications in the distillery. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. p.145-170.

LYONS, T. P. Alcohol production: a traditional process changing rapidly. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003a. p.ix-xi.

LYONS, T. P. Ethanol around the world: rapid grow in policies, technology and production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003b. Chapter 1, p.2-7.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering** Vol. 26, no. 9, pp. 1003-1025. 1984a.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, n. 10, p. 1155-1166, 1984b.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAN, D. G. Some effects of lactic acid on laboratory scale yeast fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, n. 5, p. 351-357, 1992.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 532-535, 2004.

MCMMASTER, L.; RAVNÖ, A. B. The occurrence of lactic acid and associated microorganisms in cane sugar processing. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1977, São Paulo. **Anais...** São Paulo: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS - ISSCT, 1977. p. 2679-2693.

MELFI, A. J. Soil, sugar and carbon sinks. **TWAS Newsletters**, Kuwait, v. 17, n. 4, p. 35-39, 2005.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, London, v. 77, p. 237-256, 2002.

MELLO JR, G. M. Aplicação dos produtos Elanco Kamoran e Corstan durante o processo de tratamento do fermento com pH na faixa de 1,9 a 2,5. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 20, n. 4, p. 47-48, 2002.

MIRDAMADI, S.; SADEGHI, H.; SHARAFI, N.; FALLAHPOUR, M.; MOHSENI, F. A.; BAKHTIARI, R. M. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. **Iranian Biomedical Journal**, Tehran, v. 6, n. 2-3, p. 69-75, 2002.

MORENO, A. Principais perdas são as que não se medem. **Jornal Cana**, Ribeirão Preto, p. 48-49, mar. 2005.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INLGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INLGLEDEW, W. M. Urea Hydrogen Peroxide Reduces the Numbers of Lactobacilli, Nourishes Yeast, and Leaves No Residues in the Ethanol Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4187-4192, 2000.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INLGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 26, p. 171-177, 2001.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 20, p. 287-298.

NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. n.31, p. 581-584. 2004.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *S. cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 25-31, 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

OLIVA-NETO, P.; FERREIRA, M. A.; YOKOYA, F. Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. **Bioresource Technology**, Essex, v. 92, p.1-6, 2004.

OLIVEIRA, A. J. Aplicações da microscopia em microbiologia. In: ENCONTROS FERMENTEC – REUNIÃO ANUAL, 25. Fermentação Alcoólica – Otimizando o Rendimento Industrial: **Resumos**. Piracicaba: FERMENTEC, 2004. p. 5-6.

OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E; GODOY, A.; GARCIA, C. E. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica** – microscopia. Piracicaba: FERMENTEC, 2000. 74 p.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. v. 1. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. v. 2. 2. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.

PENNA, T. C. V. Produção de ácidos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 2, p. 45-59.

POLANCO, L. S.; REIN, P. W.; WHITE, B. E. A comparison of sugarcane juice quality from a mill and a diffuser. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 68, n. 10, p. 12-21, 2006.

POWER, R. F. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: N. University Press, 2003. Chapter 3, p.23-32.

RADLER, F. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p. 17-27.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast Technology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

RENEWABLE FUEL ASSOCIATION – RFA. **Production Process**. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/industry/>. Acesso em: 12 fev. 2006.

RIBEIRO, S. K. **O álcool e o aquecimento global**. Rio de Janeiro: CNI; COINFRA; COPERSUCAR, 1997.

RODAS, A. M.; FERRER, S.; PARDO, I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 197-207, 2005.

ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação alcoólica**: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. 1989. 200 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1989.

ROSSEL, C.E.V. et al. Otimização da fermentação descontínua. In: **I Seminário de Tecnologia Industrial**. Piracicaba: Centro de Tecnologia COPERSUCAR. 1983. p.231-235.

ROSSEL, C.E.V. et al. Controle microbiológico da fabricação de açúcar e álcool. In: **III Seminário de Tecnologia Industrial**. Piracicaba: Centro de Tecnologia COPERSUCAR. 1987. p.369-373.

ROSSETTO, R. Vinhaça e meio ambiente. In: Encontros Fermentec – Reunião Anual, 27. Cana-de-Açúcar: **Resumos**. Piracicaba: Fermentec. 2006. p. 3-4.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 9, p. 85-119.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 105-124, 2003.

SALMOND, C. V.; KROL, R. G.; BOOTH J. R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, p. 2845-2850, 1984.

SASKA, M. Ethanol and lactic acid levels as a measure of post harvest cane deterioration in different harvesting schemes. **International Sugar Journal**, v. 104, n. 1237, p. 10-13, 2002.

SEELEY JR, H. W.; VAN-DEMARK, P. J.; LEE, J. J. **Microbes in action**. 4th ed. New York: Freeman and Company, 1984. 450 p.

SHREVE, J.; BRINK JR, J. A.. Indústrias de fermentação. In: _____ **Indústrias de processos químicos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1977. Cap. 31, p. 469-486.

SILVA, N.; CANHOS, V. P. Caracterização da microbiota bacteriana contaminante do caldo de cana durante a etapa de resfriamento em torre no processo de produção de álcool. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n. 1, p. 60-72, jan./jun. 1990.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 31, p. 401-408, 2004.

STAFFORD, K. Continuous fermentation. In: DEMAINE, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. cap. 11, p. 137-149.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **The microbial world**. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1986.

STOKES, D. E. **O quadrante de Pasteur**: a ciência básica e a inovação tecnológica. Campinas: Editora Unicamp, 2005.

STROPPIA, C. T.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 102, n. 1214, p. 78-82, 2000.

STUPIELLO, J. P. Considerações sobre a recirculação de substâncias na fermentação e na destilação alcoólicas. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 2, p. 35-37, 1984.

STUPIELLO, J. P. Um crédito a simplicidade. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 23, n. 3, p. 14, 2005.

SULEIMAN, A.; GUILBAULT, G. G. Biosensors: current and future prospects. In: WAGNER, G.; GUILBAULT, G. G. (Ed.). **Food biosensor analysis**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 1–12.

SUSSMAN, A. S. **Microorganismos**: crescimento, nutrição e interação. São Paulo: Edart, 1974.

TILBURY, R. H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic acid bacteria in Beverages and Food**. London: Academic Press, 1975. p.177-191.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 819-828, 2001.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA – ÚNICA. **Estatísticas**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/> Acesso em: 05 fev. 2007.

VALSECHI, O. A. **Efeito da radiação de microondas sobre *Lactobacillus fermentum*; linhagens: CCT4145; CCT4146 e FT038B**. 2005. 123 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

VASCONCELOS, J. N. Distância entre as moendas e dornas de fermentação. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 19, n. 6, p. 9, 2001.

VASCONCELOS, J. N. A importância de um bom laboratório de microbiologia. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 20, n. 6, p. 44-45, 2002.

VASCONCELOS, J. N. Evolução e tendência das pesquisas em fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 22, n. 3, p. 18, 2004.

VENTURA, R. Lactic acid quantification in ethanol fermentation in Brazil. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES Y LEVADURAS, 5., 2005, Campos do Jordão. **Libro de Resúmenes...** Campos do Jordão: Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005. p. 28.

VIEGAS, M. C.; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA M. G. S. Use of tower reactors for continuous ethanol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 167-173, 2002.

VINH, N. T. T. Ethanol from cassava. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 6, p. 59-64.

WAGNER, G. The state of the art. In: WAGNER, G.; GUILBAULT, G. G. (Ed.) **Food biosensor analysis**. USA: Marcel Dekker, 1994. p. 219-252.

WEE, Y. J.; KIN, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications – review. **Food technology and biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 16-172, 2006.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 482-487, 1999.

WHITE, F. H.; KIDNEY, E. Yeast-bacterium interactions in the brewing industry. In: BUSHELL, M. E.; SLATER, J. H. **Mixed culture fermentations**. London: Academic Press, 1981. cap. 6, p. 121-148.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages – a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 82, p. 84-92, 1976.

WOOD, W. A. Fermentation of carbohydrates and related compounds. In: GUNSALOS, I. C.; STANIER, R. Y. (Ed.). **The bacteria**. Metabolism. New York: Academic Press, 1961. v. 2, cap. 2, p. 59-149.

YELLOW SPRINGS INC - YSI. **Lactate analyser 1500 Sport** – users manual. Yellow Springs: Yellow Springs Inc., 2001.

ZHOU, S.; CAUSEY, T. B.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 399-407, 2003.

8. APÊNDICE

Anexo 1. Teores de ácido láctico em fermentação etanólica de diferentes destilarias brasileiras, medidos durante as safras de 2004/2005, 2005/2006 e abril - maio/2007 com respectivas contagens de lactobacilos

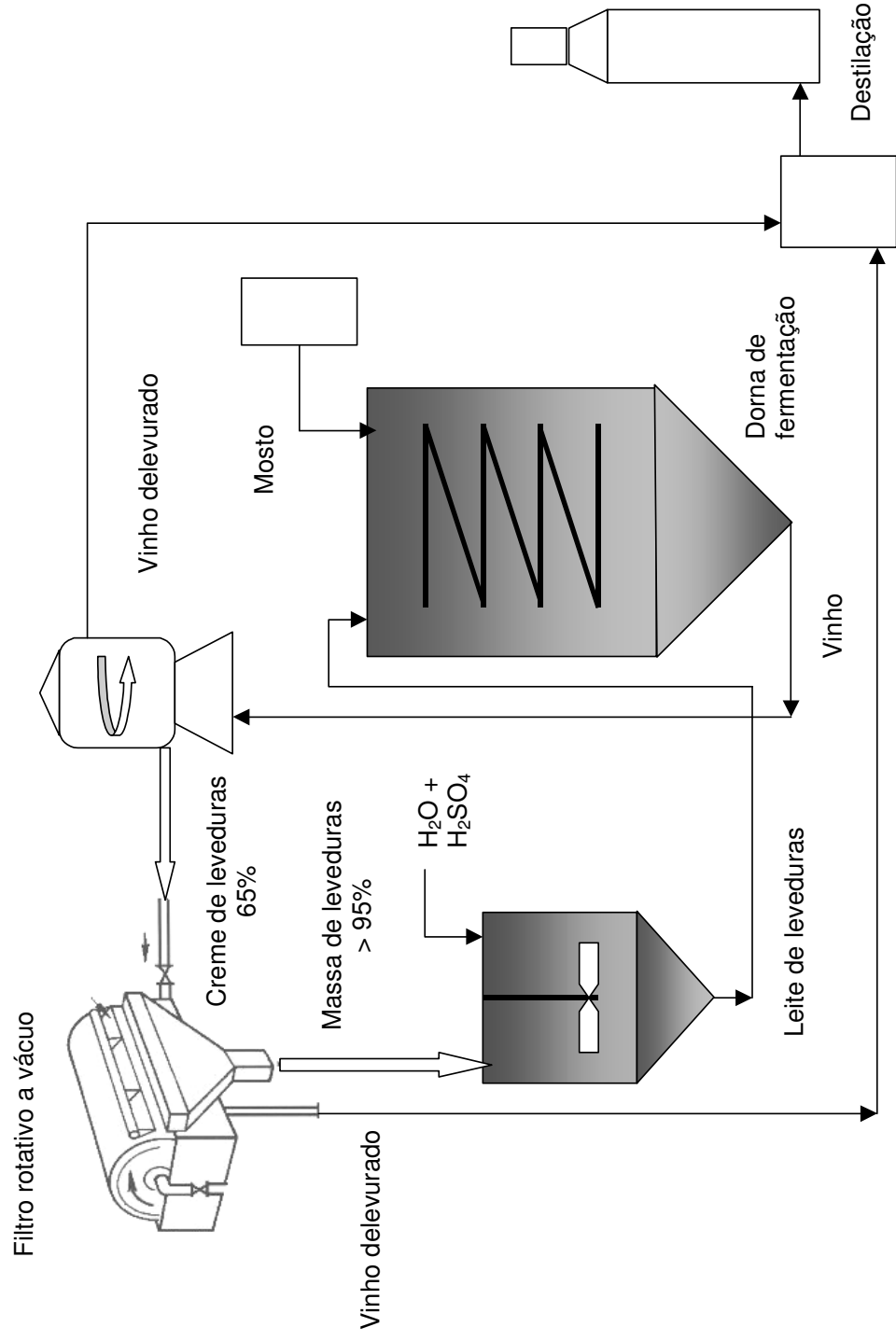
Destilaria	Tipo de indústria*	Sistema de fermentação	Ácido láctico (mg/L vinho)	Bastonetes ($\times 10^7$ cel./mL)
1	Anexa	Batelada alimentada	765,3	6,10
2	Anexa	Contínua multiestágio	2920,0	72,8
3	Anexa	Batelada alimentada	1290,0	3,80
4	Anexa	Contínua multiestágio	1080,2	8,70
5	Anexa	Contínua multiestágio	1305,0	5,20
5a			1121,4	10,23
5b			379,8	12,80
6	Anexa	Batelada alimentada	481,8	3,23
7	Anexa	Contínua multiestágio	1615,5	7,85
8	Anexa	Batelada alimentada	756,0	4,75
9	Anexa	Batelada alimentada	652,5	1,20
9a			585,0	0,91
9b			226	0,43
10	Anexa	Batelada alimentada	734,0	1,48
11			468,0	0,47
12	Anexa	Contínua multiestágio	858,6	2,23
12a			1305,0	5,20
13	Anexa	Batelada alimentada	1053,0	6,84
14	Anexa	Batelada alimentada	1818,0	14,7
15	Anexa	Batelada alimentada	735,3	—
15a	Anexa		1102,5	—
16	Anexa	Contínua multiestágio	1161,0	7,65
17	Autônoma	Batelada alimentada	243,0	—
18	Anexa	Contínua multiestágio	522,0	4,20
19	Anexa		1233,0	9,35
20	Anexa	Batelada alimentada	837,0	6,70
21	Anexa	Batelada alimentada	1125,0	5,95
21a	Anexa		468,0	0,65
21b	Anexa	Batelada alimentada	839,0	2,25
22	Autônoma	Contínua floculante	1557,0	—
23	Anexa	Contínua multiestágio	1080,0	—
24	Anexa	Contínua multiestágio	1534,0	19,5
24a			1728,0	43,0
25	Anexa	Batelada alimentada	1529,0	6,40
25a			1494,0	1,90
26	Anexa	Contínua multiestágio	1476,0	28,4
27	Autônoma	Batelada alimentada	336,0	0,06
28	Autônoma	Contínua multiestágio	1548,0	24,3
29	Anexa	Batelada alimentada	135,0	0,06
30	Anexa	Batelada alimentada	585,0	1,17
30a			160,8	0,09
31	Anexa	Contínua multiestágio	1194,0	8,40

* Em relação a fabrica de açúcar.

Anexo 2. Bactérias lácticas identificadas de fermentações etanólica, respectivos substratos fermentado, isômero do ácido láctico e o meio de onde foram isoladas*

Espécie	Metabolismo fermentativo	Isômero produzido	Substrato
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ^{a g}	Homolático	D(-)	Malte / caldo de cana
<i>L. fermentum</i> ^{d g}	Heterolático	ND	Beterraba
<i>L. fructivorans</i> ^g	ND	ND	Saquê
<i>L. homohiochi</i> ^b	ND	ND	Saquê
<i>L. sake</i> ^c	ND	D(-)/L(+)	Saquê
<i>L. helveticus</i> ^{b f}	ND	D(-)/L(+)	Milho / caldo de cana
<i>L. paracasei</i> ^a	Homolático	ND	Caldo de cana
<i>L. plantarum</i> ^{a d g}	Homolático	D(-)/L(+)	Caldo de cana / malte
<i>L. rhamnosus</i> ^a	Homolático	ND	Licor de milho
<i>L. acidophilus</i> ^b	ND	L(+)	Milho
<i>L. amylovorus</i> ^b	ND	D(-)/L(+)	Milho
<i>L. brevis</i> ^{b d g}	Heterolático	ND	Milho/malte
<i>L. buchneri</i> ^{i b}	Heterolático	ND	Milho
<i>L. hilgardii</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>L. casei</i> ^{b d}	ND	L(+)	Milho/malte
<i>L. gasserii</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>L. ramosus</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>L. reuteri</i> ^{i b}	Heterolático	ND	Milho
<i>L. collinoides</i> ^{c d}	Heterolático	ND	Milho/malte
<i>L. confusus</i> ^g	Heterolático	ND	Caldo de cana
<i>L. vacinostercus</i> ^g	ND	ND	Caldo de cana
<i>Lactococcus lactis</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>L. raffinolactis</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>Pediococcus acidilactici</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>P. pentosaceus</i> ^b	ND	ND	Milho
<i>P. damnosus</i> ^c	Homolático	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ^b	Homolático	ND	Milho/malte
<i>Streptococcus lactis</i> ^b	ND	ND	Milho

*Adaptado de: ^aHynes et al. (1997); ^bSkinner; Leathers (2004); ^cNarendranath (2003); ^dThomas et al. (2001); ^eBryan-Jones (1975); ^fGallo (1992), ^gRosales (1989).
ND: não disponível



Anexo 3: Esquema proposto de melhoramento do processo Melle-Boinot, mediante instalação de filtro rotativo a vácuo