

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

INFLUÊNCIA DA ATUAÇÃO DE AGENTES CONTAMINANTES BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

ALESSANDRA MAIARA XAVIER MACIANO

**Orientadora: Rita de Cássia Vieira Macri
Coorientadora: Maria Angélica Elias Garcia**

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia
de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de
Tecnólogo em Biocombustíveis.**

**Jaboticabal – SP
2º Semestre/2011**

Maciano, Alessandra Maiara Xavier

M152i Influência da atuação de agentes contaminantes bacterianos na fermentação etanólica / Alessandra Maiara Xavier Maciano.— Jaboticabal : Fatec, 2011.

57f.

Orientador: Rita de Cássia Vieira Macri

Co-orientador: Maria Angélica Elias Garcia

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2011.

1. Contaminação bacteriana. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Floculação. 6. Antimicrobianos. I. Macri, R. C. V. II. Influência da atuação de agentes contaminantes bacterianos na fermentação etanólica.

CDU 663.52

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFLUÊNCIA DA ATUAÇÃO DE AGENTES CONTAMINANTES
BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

AUTOR: ALESSANDRA MAIARA XAVIER MACIANO

ORIENTADOR(A): PROF(a). RITA DE CÁSSIA VIEIRA MACRI

COORIENTADOR(A): MARIA ANGÉLICA ELIAS GARCIA

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

PROF(a). RITA DE CÁSSIA VIEIRA MACRI

PROF. DR. MARCELO GIROTO REBELATO

PROF(a). DR(a). NADIA FIGUEIREDO DE PAULA

Data da apresentação: 08 de dezembro de 2011.

Presidente da Comissão Examinadora

**"Eu não posso mudar a direção do vento, mas eu
posso ajustar as minhas velas para sempre
alcançar o meu destino."**

Jimmy Dean

Aos meus amados pais, Célio e Marlei

Pelo amor e dedicação desde os primeiros anos de minha vida, pelo apoio, carinho, exemplo e privação de suas vidas para realizarem os meus sonhos.

Ao meu irmão Alexander

Pelo incentivo, paciência e amor a mim dedicados, proporcionando-me a chance de chamar-lhe de Amigo e dizer-lhe quanto o amo.

Aos meus avós, João (*in memorian*) e Severina, Adail (*in memorian*) e Maria (*in memorian*)

Pelos valores e exemplos transmitidos, cuidando de mim e torcendo por minha vitória.

Ao Vinícius, meu amor

Pelo tantos anos de carinho, compreensão, companheirismo e amizade dedicados e por me fazer tão feliz. Permitindo-me crescer como ser humano ao seu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado, dando forças e me levantando sempre quando pensei em desistir.

A toda minha família, por entender minhas constantes ausências e falta de tempo, e por permanecer ao meu lado me apoiando.

À minha Orientadora Professora Rita Macri, por todo ensinamento, incentivo, e tempo cedidos para que eu pudesse fazer o melhor. Sem seu carinho e atenção jamais teria chegado até aqui.

À minha Coorientadora Maria Angélica Garcia, por todas as informações e conhecimentos cedidos, além de uma amizade que guardarei para sempre.

À minha amiga Fernanda, que desde o primeiro dia de aula esteve ao meu lado, incentivando nos momentos difíceis, me fazendo rir quando estava sem ânimo, me auxiliando em tudo que fosse possível mesmo quando não mais estudávamos juntas... nossa amizade será eterna!

À minha amiga Sara, que me recebeu de braços abertos, me apoiando, me acalmando, me aconselhando, mostrando-me ser alguém em quem poderei contar... você é muito especial para mim!

Às minhas amigas Angela, Joseli, Rô, Vanessa, Daiane e Taciana, que se fizeram presentes em minha vida durante esses anos... levarei vocês para sempre em meu coração!

À Usina Santa Adélia S/A S/A, por todo aprendizado e experiência adquiridos nos meses de estágio, além da disponibilização de informações para a concretização de meu trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório Industrial, em especial Monique (minha companheira de estágio), que além de colegas de trabalho, tornaram-se amigos que estarão eternamente presentes em minhas orações.

À Janessa Penaforte e Fúlvio Nunes por todo auxílio cedido na elaboração de meu trabalho.

Aos colegas de sala, com quem convivi, aprendendo a admirar e respeitar a todos ao longo desses três anos.

À Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, que me proporcionou conhecimento profissional através do trabalho de seus docentes, estando sempre à minha disposição quando necessitei.

A todos que acreditaram em minha capacidade dando seu voto de confiança e ajudaram direta ou indiretamente para meu sucesso. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS TÉCNICOS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Qualidade da matéria- prima.....	18
2.2. Mosto	19
2.2.1. Características físico-químicas	19
2.2.2. Características microbiológicas	20
2.3. Fermentação etanólica	20
2.4. Fatores que afetam o processo fermentativo	23
2.4.1. Agentes fermentativos	23
2.4.2. pH	24
2.4.3. Temperatura.....	25
2.4.4. Concentração de açúcares.....	25
2.4.5. Concentração do inóculo	26
2.4.6. Oxigênio	27
2.4.7. Etanol.....	28
2.4.8. Viabilidade celular.....	28
2.4.9. Floculação.....	29
2.4.10. Concentração de nutrientes.....	30
2.5. Contaminação no processo fermentativo.....	31
2.5.1. Contaminantes bacterianos no processo fermentativo.....	33
2.6. Compostos secundários	34

2.6.1.	Glicerol	35
2.6.2.	Ácido acético e ácido láctico	35
2.6.3.	Álcoois homólogos superiores.....	36
2.6.4.	Aldeídos.....	36
2.6.5.	Ésteres.....	37
2.7.	Métodos de controle bacteriano no processo industrial.....	37
3.	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1.	Material.....	40
3.2.	Métodos	40
3.2.1.	Determinação da viabilidade do fermento.....	41
3.2.2.	Determinação do índice de brotamento	41
3.2.3.	Determinação do índice de floculação.....	42
3.2.4.	Determinação do índice de infecção.....	43
3.2.5.	Plaqueamento e diluição em série	43
3.3.	Coleta de dados	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS TÉCNICOS

Pol – Porcentagem em massa de sacarose aparente em uma solução açucarada

CO₂ – Dióxido de Carbono

T_{maxi} - Temperatura máxima inicial de crescimento

T_{maxf} - Temperatura máxima final de crescimento

T_{opt} - Temperatura ótima de crescimento

O₂ – Oxigênio Atmosférico

UFC – Unidade Formadora de Colônia

pH – Potencial Hidrogeniônico

ATP – Trifosfato de Adenosina

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

C.I.M. - Concentração Inibitória Mínima

ppm – Partes por milhão

SA-1 – Santa Adélia 1

CEL/OBJ – Células Totais/Objetos

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

Mosto – Solução açucarada apta para a fermentação

Dorna Fermentativa – Tanque cilíndrico onde ocorre a fermentação

Cuba – Tanque utilizado para efetuar tratamento do fermento

Pé-de-cuba – Leite de leveduras obtido após a centrifugação do vinho

Centrífugas – máquinas que separam mecanicamente as misturas por diferença de densidade

Vinho – mosto depois de concluída a fermentação etanólica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da Produção de Etanol.....	17
Figura 2 – Equação da Fermentação Etanólica.....	20
Figura 3 – Pré- fermentação	21
Figura 4 – Fermentação.....	21
Figura 5 – Fermentação Descontínua.....	22
Figura 6 – Fermentação Contínua (Usina Santa Adélia S/A).....	22
Figura 7 – Linhagens de Leveduras: A) Levedura Seleccionada SA-1; B) Levedura Nativa dominante do processo fermentativo na safra 2011/2012 Usina Santa Adélia S/A.....	24
Figura 8 – Visualização microscópica da viabilidade de células de levedura da Usina Santa Adélia S/A, com a utilização da Câmara de Neubauer.....	41
Figura 9 – Reprodução assexuada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , onde os brotos são novos indivíduos formados.....	42
Figura 10 – Visualização microscópica de flocos de células de levedura da Usina Santa Adélia S/A, através de microscopia.....	42
Figura 11 – Infecção bacteriana, onde bastonetes se aderem às leveduras formando flocos.....	43
Figura 12 – Diluição da amostra de mosto da Usina Santa Adélia S/A	44

Figura 13 – Plaqueamento em meio apropriado (PCA) para desenvolvimento de bactérias.....	44
Figura 14 – Plaqueamento em PCA de bactérias totais na Usina Santa Adélia S/A – A) Caixa de Caldos; B) Caldo Filtrado; C) Mel.....	44
Figura 15 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Abril/2011.....	46
Figura 16 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Maio/2011.....	46
Figura 17 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Junho/2011.....	47
Figura 18 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Julho/2011.....	47
Figura 19 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Agosto/2011.....	48
Figura 20 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Setembro/2011.....	48
Figura 21 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Outubro/2011.....	48

RESUMO

INFLUÊNCIA DA ATUAÇÃO DE AGENTES CONTAMINANTES BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

São vários os fatores que afetam o processo fermentativo de uma usina sucroalcooleira, dentre eles ganha destaque a contaminação bacteriana. Para que seja garantido um processo com boa eficiência fermentativa, bom rendimento e um produto de qualidade desejável é necessário o controle de contaminantes presentes na fermentação. Etapas prévias à fermentação são cruciais para todo o processo, pois as mesmas podem permitir o desenvolvimento da microbiota contaminante, devido a condições favoráveis encontradas no preparo do mosto. Essas condições são: qualidade da matéria-prima, temperatura, pH, concentração de açúcares e de inóculo, entre outros fatores que podem interferir no desempenho fermentativo. A presença de bactérias pode causar diversos problemas, como o consumo de açúcar e nutrientes, queda de viabilidade das leveduras, formação de grumos, espumas, além de ácidos orgânicos que inibem o processo fermentativo. Isso deve-se à liberação de metabólitos que atuam sobre a atividade celular das leveduras, afetando a concentração e a qualidade do etanol produzido. No intuito de avaliar a ação de contaminantes bacterianos na fermentação etanólica, são utilizados métodos de controle de parâmetros como, viabilidade celular, índice de infecção e rendimento no processo fermentativo, onde através dos mesmos é possível constatar que a contaminação bacteriana interfere e causa quedas do rendimento e da eficiência do processo industrial. Como, no entanto, as bactérias são distintas das leveduras, utiliza-se de agentes antimicrobianos seletivos, para que possa então, haver um controle sobre a ação desses contaminantes, evitando que ocorram prejuízos no processo fermentativo para a obtenção de etanol.

Palavras-chave: contaminação bacteriana, *Saccharomyces cerevisiae*, floculação, antimicrobianos.

ABSTRACT

INFLUENCE OF THE PERFORMANCE OF AGENTS BACTERIAL CONTAMINANTS IN ETHANOLIC FERMENTATION

There are many factors that affect the fermentation of a sugarcane mill, among which stands out bacterial contamination. To be guaranteed a fermentation process with high efficiency, good performance and a product of desirable quality control is needed for contaminants in the fermentation. Prior to fermentation steps are crucial to the whole process, as these may allow the development of microbial contaminants, because to favorable conditions found in the preparation of the wort. These conditions are: quality of raw material, temperature, pH, sugar concentration and inoculum, and other factors that can interfere with fermentation performance. The presence of bacteria can cause several problems, such as consumption of sugar and nutrients, loss of viability of yeast, formation of lumps, foams, and organic acids that inhibit fermentation. This is due to the release of metabolites that influence the activity of the yeast cell, affecting the quality and concentration of ethanol produced. In order to assess the action of bacterial contaminants in ethanol fermentation, methods are used to control parameters such as cell viability, infection rate and yield in the fermentation process, where through the same it is clear that bacterial contamination interferes and causes of falls performance and efficiency of industrial processes. Since, however, bacteria are different from yeast, is used for selective antimicrobial agents, so you can then have a control over the action of these contaminants, preventing damage from occurring in the fermentation process for production of ethanol.

Keywords: bacterial contamination, *Saccharomyces cerevisiae*, flocculation, antimicrobials.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país beneficiado por suas condições climáticas e de relevo, o que possibilita o plantio de diversas culturas, principalmente a cana-de-açúcar que domina uma vasta área deste território. Com o processamento desta cultura, pode-se obter o açúcar, o etanol e subprodutos (CAMOLEZ, 2004).

A indústria sucroalcooleira no Brasil é de grande importância para a economia, pois o etanol, além de suas propriedades antimicrobianas, é utilizado como combustível alternativo para automóveis, sendo menos poluente que a gasolina e, além disso, é derivado de uma fonte de energia renovável. Com os altos custos do petróleo e a pouca disponibilidade de combustíveis alternativos para transportes, o etanol está ganhando abertura para se tornar uma importante matriz energética mundial (DORTA, 2006).

A transformação da cana-de-açúcar em etanol é realizada por leveduras originárias do gênero *Saccharomyces* sendo uma das principais a *Saccharomyces cerevisiae*, por meio do processo de fermentação etanólica. Nesse processo há o reciclo de células, o que causa a intensificação da presença de agentes contaminantes, resultando em fatores que inibem o processo como, formação de glicerol, queda na viabilidade de leveduras, produção de ácidos orgânicos, gomas de dextrana, entre outros, fazendo com que ocorram quedas no rendimento do processo e na produção de etanol.

A decomposição da sacarose por microrganismos inicia-se quando a cana-de-açúcar ainda está no campo. Segundo Oliva-Neto (1995 apud DORTA, 2006, p. 7), durante a passagem da cana até a etapa de fermentação alcoólica, a microbiota contaminante passa por uma seleção em função do pH, temperatura, condições atmosféricas e produtos inibidores (presentes no substrato) a que são submetidas.

Durante o processo industrial de produção de álcool podem estar presentes microrganismos oriundos da cana-de-açúcar no campo que sobrevivem aos tratamentos do

caldo e condições como pH, temperatura e produtos inibitórios no meio fermentativo e se estabelecem nas dornas de fermentação (ANGELIS, 2010). As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado relativamente sadio apresenta níveis de bactéria próximos a 10^5 células/mL (ANDRIETTA *et al.*, 2006).

Os microrganismos transportados com a cana-de-açúcar são provenientes do solo, ar ou água. A cana possui uma cera que funciona como proteção natural, a qual é destruída após o processo de corte. Com essa destruição a cana fica suscetível, ocorrendo uma rápida multiplicação de microrganismos (ANDRIETTA, 2002).

Os principais contaminantes do meio fermentativo são bacilos Gram-positivos compostos pelos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*. Os *Lactobacillus* têm ampla distribuição, são espécies principalmente acidófilas e tolerantes ao etanol, sacarolíticas e exigentes nutricionalmente (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1997 apud DORTA, 2006; p.8).

As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e, embora não haja uma confirmação definitiva sobre a causa da floculação da levedura, considera-se, na indústria, que esta contaminação é a principal responsável pelos problemas encontrados na fermentação alcoólica (LIMA *et al.*, 2001).

No entanto, por haver distinção entre leveduras e bactérias, podem ser utilizados produtos seletivos, a fim de controlar a ação bacteriana no processo fermentativo, minimizando os diversos prejuízos causados pela ação desses agentes contaminantes.

A iniciativa de realizar este trabalho teve como base o histórico das fermentações da safra 2011/2012 da Usina Santa Adélia S/A, onde no processo de moagem da cana-de-açúcar, é utilizada como método preventivo de contaminação, a aplicação de vapor e quartenário de amônio, para que sejam evitadas perdas de sacarose que será utilizada na produção de açúcar e na fermentação. Caso haja ocorrência de contaminação, são utilizados antibióticos específicos e dióxido de cloro, a fim de controlar a infecção bacteriana (Comunicação Informal).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação de agentes bacterianos contaminantes sobre o metabolismo das leveduras, os quais interferem no processo fermentativo e diminuindo o rendimento da produção de etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Figura 1 demonstra o fluxograma da produção de etanol, envolvendo desde a produção da matéria-prima à obtenção do produto final.

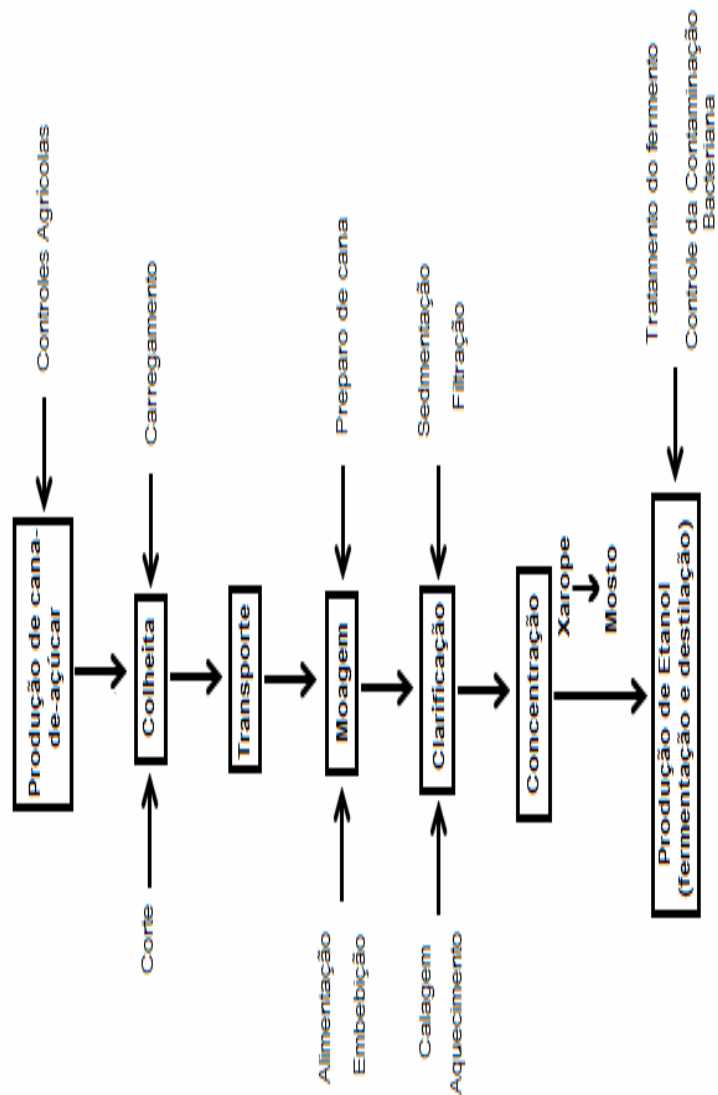


FIGURA 1 – Fluxograma da Produção de Etanol

2.1. Qualidade da matéria- prima

A qualidade da matéria-prima trata-se de um conjunto de características que sejam compatíveis com as necessidades exigidas na indústria. É um fator imprescindível, pois é dele que depende a eficiência e o rendimento do processo industrial e consequentemente, a qualidade do produto final.

Vários fatores, no entanto, podem influenciar na qualidade da cana-de-açúcar utilizada no processamento industrial. Características físico-químicas e microbiológicas, por exemplo, podem afetar significativamente a produção de etanol e açúcar, onde a contaminação microbiana é um indicativo importante quanto à qualidade da matéria-prima. Esta se origina com condições inadequadas de manejo, condições climáticas e com o aumento do tempo pós-queima e/ou impurezas minerais e vegetais.

Segundo Stupiello (1997, apud CAMOLEZ, 2004, p. 3), a utilização de cana-de-açúcar com características desejáveis, se processada rapidamente, resulta em um rendimento alto, porém quando possui condições inferiores causa perdas de tempo no processamento. Quanto pior a qualidade da matéria-prima, maior é o tempo de retenção nos decantadores para que se obtenha um caldo isento de impurezas e maior o consumo de produtos químicos, resultando em menor rendimento industrial e afetando diretamente na composição dos produtos finais obtidos.

Para que haja um desempenho industrial satisfatório, deve-se realizar um controle rigoroso sobre características da matéria-prima como, ponto de maturação, operações de colheita e transporte, perdas de sacarose, características microbiológicas e conseguinte, pH, acidez, teores de açúcares redutores, dextrana, Pol e pureza (CAMOLEZ, 2004).

Segundo observações de Mutton (2003), sob a ação de agentes agressores (insetos e patógenos), as plantas realizam reações bioquímicas, transformando as reservas de açúcares, anteriormente acumulados objetivando o armazenamento de sacarose nos colmos, para produção de biomoléculas (lignina, polissacarídeos e compostos fenólicos), a fim de proteger-se do ataque. O controle inadequado desses agressores pode causar uma maior incidência de microrganismos, que além de consumirem açúcares, diminuem o rendimento e produzem metabólitos que podem prejudicar o processamento e formar produtos secundários. Deve-se salientar ainda que, longos períodos de armazenamento pós- queima, causam maiores índices de deterioração avançada da matéria-prima (RAVANELI, 2010).

Neste contexto, as leveduras fermentadoras são inibidas e o processo fermentativo é prejudicado, refletindo nas perdas no rendimento alcoólico e na alteração do destilado obtido.

2.2. Mosto

Para que se obtenha o álcool etílico por meio de fermentação de misturas açucaradas, é necessário que se realize o preparo do mosto. Segundo Camolez (2004), o preparo do mosto compreende todas as operações tecnológicas que visam transformar e corrigir a matéria-prima em uma solução açucarada com concentração definida e suplementação de nutrientes, a fim de facilitar a fermentação para que seja atendida a produção pretendida e a capacidade fermentativa da levedura.

2.2.1. Características físico-químicas

A garantia de uma fermentação bem realizada depende, dentre outros fatores, do monitoramento de características essenciais para a qualidade do mosto. Essas características são a concentração de açúcares, a acidez, os complementos minerais e a clarificação do caldo utilizado (CAMOLEZ, 2004).

O mosto, portanto, deve passar pelos processos de aquecimento e decantação, onde no aquecimento, a viscosidade é reduzida e a velocidade das reações químicas é acelerada, agrupando todas as impurezas presentes na forma de pequenos flocos. Na decantação há a precipitação destes flocos, que são eliminados na forma de lodo (CAMOLEZ, 2004).

Os tratamentos nos caldos visam reduzir a quantidade de impurezas grosseiras, a carga microbiana, a formação de espumas e o aumento do teor de açúcares totais, resultando na maior eficiência do processo, economia de vapor e água, proteção dos equipamentos e continuidade do processo fermentativo em paradas eventuais de moagem (STUPIELLO & HORII, 1982 apud CAMOLEZ, 2004, p. 5). Um processo de decantação bem realizado elimina terra, bagacilho, entre outras impurezas, reduzindo a presença de contaminantes e os gastos com dispersantes, antiespumantes e ácido sulfúrico são bem menores (AMORIM *et al.*, 1996 apud RAVANELI, 2010, p. 22).

Fatores como pH, temperatura e o uso excessivo de produtos na clarificação do açúcar, podem interferir drasticamente na qualidade do mosto, afetando diretamente o rendimento

fermentativo. Motivo causado pela presença de contaminantes, que utilizam da sacarose para produzir ácido lático, impedindo a ação das leveduras (RAVANELI, 2010).

2.2.2. Características microbiológicas

A obtenção de um mosto de qualidade depende de controles agrícolas, no que se refere às horas pós-queima (no caso de colheita manual) ou tempo entre o corte mecanizado e a moagem. Quanto maior o período entre a queima/corte da cana e seu processamento, maior a possibilidade de deterioração da mesma, que acarretará um caldo com maior índice de microrganismos contaminantes (CAMOLEZ, 2004).

É necessário que seja realizada manutenção nos equipamentos, garantindo a assepsia adequada e operações térmicas ideais para que seja minimizado o desenvolvimento microbiológico nos caldos que serão utilizados para preparo do mosto (CAMOLEZ, 2004).

2.3. Fermentação etanólica

Segundo Bertoletti (2008), fermentação etanólica é uma reação química de oxidação-redução anaeróbia, onde o equilíbrio energético é conservado. Mediante este fenômeno os açúcares são transformados em etanol e gás carbônico, por ação das leveduras pela via glicolítica.

A Figura 2 mostra como ocorre a transformação de açúcares em etanol e gás carbônico, através da Equação que refere-se à Fermentação Etanólica.

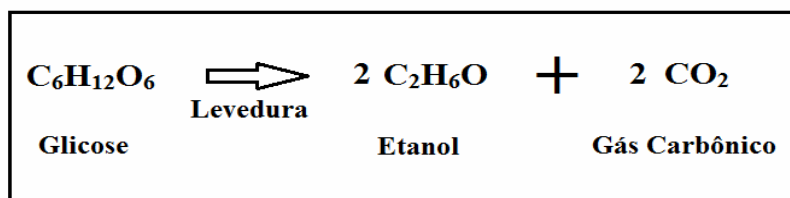


FIGURA 2 - Equação da Fermentação Etanólica

A fermentação etanólica que ocorre nas dornas de fermentação se divide em três etapas: pré-fermentação, fermentação e pós-fermentação.

A pré-fermentação tem seu início, quando é adicionado ao mosto previamente preparado, o fermento, havendo assim ativa multiplicação de células e elevação lenta e

gradual da temperatura do meio, pouca formação de espumas, pouco desprendimento de CO_2 e uma pequena produção de etanol (Figura 3). Cerca de cinco a seis horas após, inicia-se o processo de fermentação principal, onde há intenso desprendimento de CO_2 , formação de espuma, rápida elevação da temperatura, queda da densidade do mosto devido ao elevado consumo de açúcares e da formação equivalente do etanol (Figura 4) (ANTONINI, 2004).

A pós-fermentação se dá pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do CO_2 , elevação da acidez, formação de subprodutos, floculação e o desaparecimento de espumas. Tem duração de seis a oito horas para que se possa evitar a infecção do vinho e do pé-de-cuba, que será utilizado em nova fermentação. O mosto totalmente fermentado, portanto, é denominado vinho (ANTONINI, 2004).



FIGURA 3 - Pré- fermentação
FONTE: MADALENO, 2011



FIGURA 4 - Fermentação
FONTE: MADALENO, 2011

Os processos fermentativos utilizados para a produção de etanol podem ser contínuo, descontínuo (batelada), podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Segundo Copersucar (2001), as destilarias no Brasil utilizam o processo fermentativo com recuperação do fermento, onde após centrifugação o vinho é separado do leite de levedura que será submetido a um processo de lavagem com água e adição de ácido sulfúrico em agitação, até atingir um pH próximo de 2,5, na tentativa de se evitar contaminação bacteriana, para que assim possa retornar ao processo.

A condução do processo descontínuo (Figura 5) permite evitar o efeito inibitório do açúcar, durante a fase inicial, o que resulta em maior concentração de etanol. Permite ainda que seja realizada alimentação com adições intermitentes, à velocidade constante e de forma

exponencial, onde o mosto é adicionado lentamente por quatro horas e após seis a nove horas conclui-se o processo fermentativo (DORTA, 2006).

Este processo é o mais seguro, quando há problemas de manutenção e condições de assepsia, pois ao final de cada batelada a dorna será esterilizada, recebendo um novo inóculo. Uma desvantagem são os baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma vez só no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular para formação de produtos que não interessam, além do tempo maior gasto com as bateladas (COPERSUCAR, 2001).

No processo contínuo (Figura 6), o meio nutriente juntamente com o inóculo é injetado de forma contínua, resultando na saída da mesma quantidade de meio fermentado. Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, redução dos custos laboratoriais, uma vez alcançado o estado desejado e reduzido o tempo de limpeza e sanitização das dornas. (CYSEWSKI e WILKIE, 1978 apud DORTA, 2006, p.4).

Sua maior desvantagem é a suscetibilidade à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição, além de exigir total conhecimento para otimizar as condições de processo para atingir o rendimento desejado, principalmente no que se trata de adição de produtos químicos, alterações da taxa de fluxo e a mistura dos nutrientes, ou alterações nos parâmetros estimados, a fim de otimizar condições de processo, para que seja atingido o rendimento desejado (BAYROCK e INGLEDEW, 2005 apud DORTA, 2006, p.4).

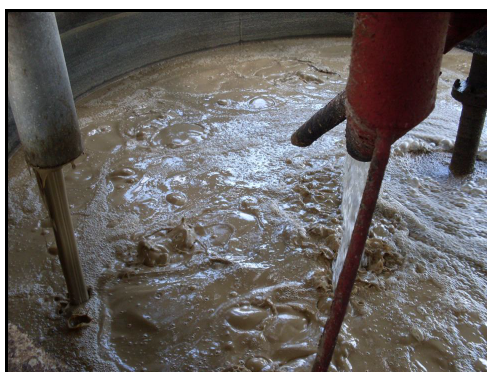


FIGURA 5 - Fermentação Descontínua

FONTE: MADALENO, 2011



FIGURA 6 - Fermentação Contínua

(Usina Santa Adélia S/A)

FONTE: PENAFORTE, 2011

2.4. Fatores que afetam o processo fermentativo

2.4.1. Agentes fermentativos

O conhecimento já existente, relativo à fisiologia, bioquímica e genética das leveduras, fez com que as mesmas fossem utilizadas como modelo básico de células biológicas para estudo de processos metabólicos complexos. No Brasil, as leveduras têm grande importância nas indústrias de panificação, de bebidas e de produção de etanol (BAPTISTA, 2001).

São fungos unicelulares, e suas células podem ser esféricas, ovóides ou cilíndricas. Sua reprodução pode ser sexuada (formação de esporos) ou assexuada que ocorre por brotamento ou fissão celular (COPERSUCAR, 2001).

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, principalmente as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são largamente utilizadas em escala industrial para a produção de etanol. Isso acontece, porque os representantes desse gênero são os microrganismos que possuem características mais favoráveis para a transformação de açúcares em etanol (COPERSUCAR, 2001).

O desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa, dependendo de várias circunstâncias, entre as quais o substrato ou matéria prima utilizada, o teor alcoólico desejado no produto final, a duração da fermentação, as propriedades do produto, entre outros fatores (LIMA *et al.*, 2001). Portanto, a escolha do agente fermentativo adequado é o fator que resultará em alta eficiência na produção de etanol, baixa produção de glicerol e alta tolerância a diversos fatores estressantes.

Segundo Lima *et al.* (2001), pode ser observado que durante o ciclo fermentativo, as linhagens que dão início ao processo são substituídas por leveduras comuns à região da destilaria, denominadas de leveduras contaminantes, invasoras ou nativas. É importante ressaltar que as leveduras nativas podem dominar o processo ao longo da safra melhorando a eficiência na produção de álcool ou acarretando problemas na fermentação, como baixo rendimento, formação excessiva de espumas e floculação do fermento.

Na figura 6 é possível visualizar uma linhagem de leveduras selecionadas e uma linhagem de leveduras nativas. A forma colonial lisa é da linhagem selecionada SA-1 (Usina Santa Adélia S/A) e a forma colonial rugosa é da linhagem nativa que dominou o processo fermentativo na safra 2011/2012.

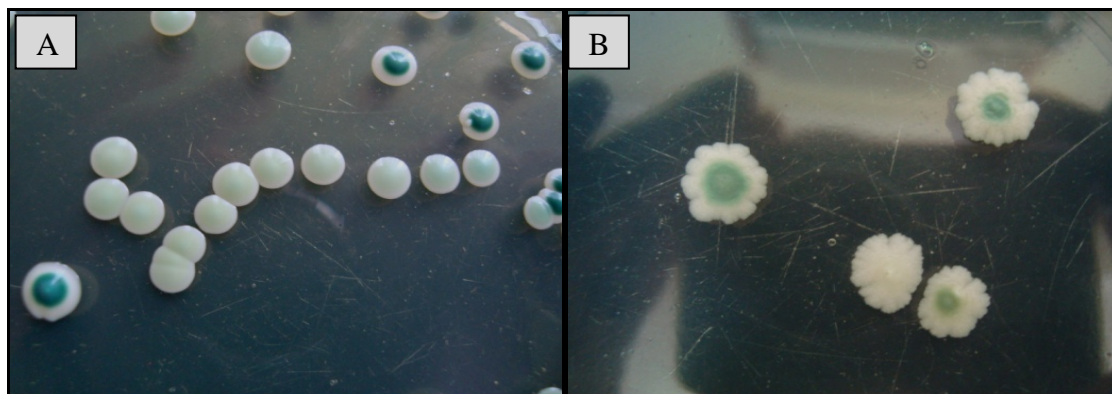


FIGURA 7 – Linhagens de Leveduras: A) Levedura Seleccionada SA-1; B) Levedura Nativa dominante do processo fermentativo na safra 2011/2012 Usina Santa Adélia S/A. FONTE: PENAFORTE, 2011.

2.4.2. pH

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (BASSO *et al.*, 1996 apud CAMOLEZ, 2004, p. 7).

A levedura possui ampla tolerância às condições de pH. Sendo assim, apresenta um desenvolvimento normal em na faixa de pH entre 4,5 a 5,5, mas permitindo também a operação de sistemas com valores de pH da ordem de 3,5 a 4,5, onde há sensibilidade da maioria de microrganismos, reduzindo os riscos de ocorrer contaminação (RAVANELI, 2010).

Para que o processo fermentativo e a multiplicação ocorram de forma correta, é importante que haja a correção de pH. Essa correção na prática é feita com aplicação de ácido sulfúrico, resultando em maiores rendimentos de álcool, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, ao mesmo tempo em que reduz a contaminação bacteriana. Os caldos de cana fermentam sem correção da acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6. Por serem acidófilas, as leveduras possuem considerável tolerância e mantêm a viabilidade na faixa ácida do pH (ANGELIS, 1992 apud CAMOLEZ, 2004, p. 8).

2.4.3. Temperatura

A Temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade dos microrganismos, influenciando no metabolismo, crescimento, capacidade fermentativa, e a viabilidade em leveduras. (ALCARDE, 1996 apud BAPTISTA, 2001, p.7).

A temperatura ideal para o metabolismo das leveduras mesófilas durante a fermentação encontra-se na entre 28 °C 34 °C (RAVANELI, 2010). Temperaturas inferiores a 30-33 °C prolongam o tempo do processo fermentativo, pois o metabolismo das leveduras fica mais lento por haver maior gasto de energia. Enquanto temperaturas elevadas inibem o crescimento celular, ocorrendo queda na viabilidade celular e favorecendo o desenvolvimento de bactérias, ao mesmo tempo em que as leveduras ficam mais sensíveis à toxidez do álcool, levando à formação de metabólitos secundários como o glicerol.

No entanto, a temperatura ideal para que se obtenha o máximo de sanidade da levedura (30-33°C), dificilmente é mantida na prática, durante os ciclos fermentativos. Segundo YOKOYA (1995 apud CAMOLEZ, 2004, p. 8), a temperatura de até 36°C é tolerável pela maioria das leveduras de fermentação alcoólica, pois temperaturas de 38-40°C são altamente prejudiciais à manutenção da atividade do processo fermentativo. Existem três temperaturas chaves de um processo de crescimento de leveduras: T_{maxi} (temperatura máxima inicial de crescimento), T_{maxf} (temperatura máxima final de crescimento) e T_{opt} (temperatura ótima de crescimento). O aumento da concentração alcoólica ao longo da fermentação provoca uma diminuição das três temperaturas. Quando T_{maxf} se iguala a temperatura do processo, o crescimento celular torna-se nulo (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010).

2.4.4. Concentração de açúcares

A concentração de açúcares no meio é fator determinante para a ocorrência da respiração e/ou fermentação no meio. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares que compõem a cana-de-açúcar, que são basicamente a glicose, a frutose, e a sacarose (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010). Essas linhagens de levedura normalmente utilizadas nos processos industriais apresentam uma osmotolerância

limitada, por essa razão, fermentações alcoólicas são realizadas em concentrações de açúcar \leq 20% (m/v) (SOUZA, 2009).

O aumento da concentração de açúcares, conseqüentemente eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos etanol. O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva à redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

Os substratos (mostos) devem ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e a finalidade de sua atividade, que é produzir uma determinada substância. Além de uma composição capaz de suprir as exigências dos microrganismos para seu melhor desempenho, deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (ZAR, 2010). Sendo assim, no preparo do mosto, a concentração de açúcar total deve ser compatível com a natureza e composição da matéria-prima, com o tipo de levedura empregada e com o processo de condução da fermentação (STUPIELLO E HORII, 1981 apud RAVANELI, 2010, p.8).

2.4.5. Concentração do inóculo

As fermentações industriais geralmente iniciam-se através da inoculação de uma massa de células proveniente de cepa de levedura selecionada, denominada inóculo.

Concentrações elevadas de inóculo na dorna permitem fermentações mais rápidas, que são seguidas por aumento da temperatura, o que resulta em uma maior produtividade e um maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, o elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas (LIMA *et al.*, 2001).

Conseqüentemente resulta em uma maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento. Portanto, é importante existir um teor ótimo de levedura na dorna, dependendo das condições especiais do processo industrial (LIMA *et al.*, 2001).

Assim a recirculação das células da levedura permite assim, a manutenção da alta concentração celular e maior eficiência decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para formação de células (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.8).

2.4.6. Oxigênio

Os microrganismos se comportam de diferentes maneiras na presença de oxigênio livre, ou seja, alguns desses exigem a presença de oxigênio para sua sobrevivência, que são os aeróbios, outros não toleram a presença de oxigênio, que são os anaeróbios e há aqueles que podem se desenvolver tanto na presença como na ausência do oxigênio livre, que são os facultativos (BORZANI *et al.*, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.8).

A levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* possui características facultativas para a utilização do oxigênio, possibilitando rotas metabólicas tanto na ausência como na presença de oxigênio. No entanto, altas concentrações de açúcares inibem a atividade enzimática respiratória e a formação de mitocôndrias, produzindo etanol mesmo na presença de oxigênio. Esse processo é denominado “Efeito Crabtree” (LIMA *et al.*, 1986 apud NAVES *et al.*, 2010, p.8).

Há a possibilidade também de a fermentação etanólica ser inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, o que é denominado de “Efeito Pasteur”. Efeito este, que está intimamente associado ao estado fisiológico da célula, manifestando-se principalmente nas leveduras que estão na fase estacionária onde não há crescimento das células, ocorrendo diminuição do consumo de glicose. Nas células em crescimento, ou seja, na fase exponencial, não há diferença significativa na velocidade de consumo de glicose entre uma célula aeróbia e outra anaeróbia (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.8).

Embora pareça contraditório, sabe-se hoje que a completa falta de oxigênio não é benéfica ao processo de produção de álcool. Níveis mais altos de rendimentos alcoólicos e menos glicerol formado foram obtidos em culturas nas quais havia certa quantidade de oxigênio disponível (SOUZA, 2009).

2.4.7. Etanol

Fisiologicamente, o etanol inibe o crescimento e a viabilidade das leveduras e a habilidade fermentativa, pois atua negativamente sobre vários sistemas de transporte celular, a sinalização celular da glicose e sobre enzimas de extrema importância para a via glicolítica (ALEXANDRE e CHARPENTIER, 1998 e BISSON 1999 apud SOUZA, 2009, p.31).

O efeito inibitório do etanol produzido pela *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação é complexo e resulta no principal fator que desencadeia uma fermentação incompleta e conseqüentemente a diminuição no rendimento do processo. Portanto, o melhor conhecimento do efeito de etanol sobre a levedura, pode ser interessante para melhorar a fermentação (NAVES *et al.*, 2010).

Os fatores que influenciam na sensibilidade do etanol (temperatura, aeração, composição do meio) agem direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática. Entretanto, o etanol parece não ter um efeito único, provocando modificações nas propriedades da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e agindo sobre algumas enzimas (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.8).

Algumas análises evidenciaram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de álcool inferiores a 26 g/L, mas é inibido totalmente quando a concentração de álcool atinge 68,5 g/L no meio da fermentação. Da mesma forma ao isolar leveduras de destilarias mostraram inibição de suas atividades fermentativa em batelada simples a 30 °C quando a concentração de álcool no meio foi superior a 8%. Acima de 8% de álcool a fermentação ocorre de forma gradativamente reduzida (SOUZA, 2009).

2.4.8. Viabilidade celular

Um dos aspectos mais importantes no controle fermentativo é a viabilidade celular e quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo. Como o ambiente das dornas de fermentação não é propriamente ideal para manutenção da viabilidade celular um controle minucioso deve ser feito nas unidades produtoras (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.9).

Os aumentos de temperatura na fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular. Isto ocorre devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol

no meio e nas células (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.9). A adição ao meio de ácidos graxos insaturados ou esteróis melhora a tolerância das leveduras ao etanol, aumentando assim a viabilidade celular (SOUZA, 2009).

Segundo Dorta (2006), nas últimas décadas, as usinas de açúcar e álcool vêm aumentando a dosagem de melaço no mosto fermentativo, em relação ao caldo de cana, o que faz com que ocorram maiores problemas para a produção etanólica, devido à adição de sulfito no processo de sulfitação. Tal substância é utilizada na clarificação do açúcar e acumulada, torna-se excessiva no melaço. A presença deste reagente, em quantidades elevadas no melaço de cana, tem sido apontada como outro fator de diminuição do rendimento alcoólico, da viabilidade e do crescimento celular de leveduras.

2.4.9. Flocculação

Na flocculação, fenômeno que ocorre na fermentação alcoólica por leveduras, as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em etanol e CO₂, pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio (MUTTON *et al.*, 2004).

Este fenômeno pode causar perda de células na centrifuga e o consequente gasto de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico. A flocculação dificulta o contato entre o antimicrobiano usado no processo e a bactéria causando o aumento desses contaminantes, que provocam um aumento de acidez, afetando a qualidade do etanol produzido (LUDWING *et al.*, 2001 apud NAVES, 2010, p.9). Além disso, têm sido observados aumento no tempo de fermentação e redução de aproximadamente 15% no processo fermentativo.

A flocculação ocorre devido a vários fatores dos quais destacam-se o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias, ou pelo contato entre bactérias indutoras da flocculação e leveduras, devido à contaminação por leveduras flocculentas, ou ainda pelo excesso de sais presentes nos caldos. No setor de fermentação e destilação as bactérias lácticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis, especialmente, o gênero *Lactobacillus* que é resistente ao etanol (LUDWING *et al.*, 2001 apud NAVES, 2010, p.9).

A acidez do vinho, causada por bactérias produtoras de ácidos orgânicos, é comprovadamente aumentada pelo alto teor de flocculação, causando uma significativa queda

do rendimento alcoólico e viabilidade das leveduras. Para o controle da infecção bacteriana, e de suas consequências no processo de obtenção de etanol visando uma fermentação sadia, rápida e eficiente, é fundamental a busca por soluções práticas e viáveis para atenuar ou eliminar a floculação do fermento nas destilarias, reduzindo assim, os custos de produção de etanol (LUDWING *et al.*, 2001 apud NAVES, 2010, p.9).

Quando se trata de altas concentrações de sais no caldo, foi observado que a força iônica do meio e concentrações de cálcio favorecem a floculação de cepas floculentas de *Saccharomyces cerevisiae*. Micro quantidades de cálcio são suficientes para promover a floculação.

A separação realizada para a recuperação das células presente no vinho é feita através de centrífugas, que são equipamentos otimizados ao trabalho com concentrações homogêneas de sólidos. Portanto, exigem condições totalmente diferentes daquelas apresentadas na floculação, onde a sedimentação das células nos fermentadores forma fases de concentrações diferentes, ocasionando baixas eficiências de separação.

Segundo Amorim *et al.* (1982), há ocorrência de perdas intensas de levedura, tornando os ciclos de fermentação mais longos, provocando redução acentuada no rendimento (SOUZA, 2000). Acarretando ainda, entupimento de tubulações com consequente demora no bombeamento do caldo fermentado (LUDWIG *et al.*, 1995 apud SOUZA, 2000; p.25). Além de problemas operacionais na indústria, a floculação de leveduras na fermentação, afeta a cinética do processo, através da diminuição da área de contato entre levedura e o substrato (GUERRA *et al.*, 1998 apud SOUZA, 2000, p.25).

2.4.10. Concentração de nutrientes

Do ponto de vista nutricional, o nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, manganês, zinco, cálcio entre outros, são elementos considerados fundamentais às leveduras, levando-se em conta a estrutura celular dos microrganismos fermentadores, o desdobramento de açúcares e outros processos metabólicos vitais (AMORIM, 1985 apud RAVANELI, 2010, p.21).

De acordo com Amorim *et al.* (1996), a exigência nutricional depende da concentração desses elementos no meio, estando diretamente ligados à linhagem da levedura utilizada no

processo. O enxofre, potássio, manganês e cobalto apresentam uma função importante no processo por estarem relacionados às atividades enzimáticas (RAVANELI, 2010).

2.5. Contaminação no processo fermentativo

A presença de microrganismos contaminantes inicia-se no campo, uma vez que fazem parte do ambiente de produção da cana-de-açúcar. Entretanto, de acordo com Stupiello & Horii (1981) a infecção pode aumentar durante o período entre o corte-carregamento-transporte e o processo de extração, sob condições favoráveis de desenvolvimento (BADIN, 2010).

Quanto mais rápido a cana for levada à usina para ser convertida em açúcar ou etanol, mais eficiente será o processo de obtenção de tais produtos. Segundo Oliva-Neto (1995), durante a passagem da cana até a etapa de fermentação etanólica nas dornas das destilarias, a microbiota contaminante passa por uma grande seleção em função do pH, temperatura, condições atmosféricas e produtos inibidores (presentes no substrato) a que são submetidas (DORTA, 2006).

No decorrer do processo fermentativo, a microflora restringe-se a poucos gêneros, uma vez que o pH torna-se mais baixo e existe o aumento do teor alcoólico, ficando difícil a adaptação para a maior parte dos microrganismos. Entretanto, o processo de batelada alimentada ou contínuo com o reciclo de célula, utilizado nas usinas sucroalcooleiras, favorece a proliferação de alguns gêneros contaminantes nas dornas fermentativas, que realizam fermentações paralelas à fermentação etanólica (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1994 apud DORTA, 2006, p.7).

Os microrganismos contaminantes afetam diretamente o processo fermentativo, destacando entre eles fungos, bactérias e leveduras, os quais não são direcionados para o processo da fermentação (MUTTON, 1998). As leveduras contaminantes são aquelas presentes no processo fermentativo que não foram selecionadas para a condução da produção de etanol, prejudicando o processo causando problemas e aumentando o tempo de fermentação (CABRINI & GALLO, 1999).

As bactérias presentes na cana-de-açúcar podem prejudicar intensivamente a qualidade do caldo e do mosto. Isso acontece porque os mesmos são considerados ótimos substratos

para o desenvolvimento microbiano devido a altos teores de nutrientes, alta atividade de água, pH e temperatura favoráveis (BADIN, 2010).

O número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como por insipiente assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto como referido material, necessitando muitas vezes do emprego de anti-sépticos para o controle da carga bacteriana (MUTTON, 2003).

As bactérias presentes a fermentação etanólica causam vários problemas, como o consumo de açúcar e nutrientes, queda de viabilidade das leveduras, formação de grumos, espumas, além de ácidos orgânicos que inibem o processo fermentativo. Estes compostos atuam sobre as células das leveduras, afetando a concentração e a qualidade de etanol produzido (CAMOLEZ, 2004).

As bactérias participam ativamente na deterioração da cana colhida, reduzindo o tempo de estocagem e introduzem no processo produtos indesejáveis do metabolismo que tanto dificultam as diversas etapas do processo até a fermentação, como causam alterações ambientais desfavoráveis às leveduras durante a fermentação. Um rigoroso controle microbiológico do processamento, com a sistemática eliminação de contaminantes, precisa ser melhor investigado e conhecido (ZAR, 2010).

Microrganismos contaminantes são também reciclados com a levedura e isto pode causar muitos problemas, gerando competição entre bactérias e leveduras pelo mesmo substrato (OLIVA-NETO & YOKOYA, 2001 apud CAMOLEZ, 2004, p. 9). Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a produção de ácido acético e ácido láctico que causam a perda de açúcares e intoxicação das células de levedura. A redução da viabilidade e do brotamento de leveduras pode estar relacionada à produção desses metabólitos tóxicos às leveduras ou ao esgotamento de alguns nutrientes essenciais ao desenvolvimento das mesmas. (CAMOLEZ, 2004).

Objetivando controlar a infecção KELSALL & LYONS (2003) recomendam a adequação do ambiente em que se realizará a fermentação alcoólica. Dentre os cuidados destacam a limpeza constante das dornas de fermentação, não formação de “pontos mortos” nas tubulações de mosto e vinho, maximização de condições que favoreçam o crescimento da levedura, fermentações rápidas com temperatura controlada, além da utilização de agentes antibacterianos (BADIN, 2010).

2.5.1. Contaminantes bacterianos no processo fermentativo

A fermentação industrial, pela dimensão do processo não é conduzida em condições ideais de assepsia. Com isso a contaminação bacteriana, está sempre presente e dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo.

As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e, embora não haja uma confirmação definitiva sobre a causa da floculação da levedura, considera-se, na indústria, que esta contaminação é a principal responsável pelos problemas encontrados na fermentação alcoólica (LIMA *et al.*, 2001).

Entre os contaminantes que mais aparecem nos processos fermentativos, ocorrendo inclusive na etapa da fermentação etanólica, predominam os bacilos gram-positivos dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*. A sacarose consumida por esses microrganismos deixará de ser transformada em etanol ou cristais de sacarose, provocando assim perdas do açúcar recuperável, o qual será transformado em ácidos orgânicos e dextrana, por exemplo (ANTONINI, 2004).

Determinar o número e tipo de bactéria presente no processo é um parâmetro importante para o controle da infecção. Um processo fermentativo é considerado relativamente sadio, quando apresenta uma contagem bacteriana entre 10^5 UFC/mL e 10^7 UFC/mL.

O rendimento fermentativo pode diminuir cerca de 15%, devido à presença de bactérias contaminantes. (SERRA *et al.*, 1979 apud DORTA, 2006, p.8). Quando a contagem bacteriana atinge níveis de 10^8 a 10^9 UFC/mL, a queda no rendimento fermentativo pode atingir a faixa de 14 a 90% do rendimento teórico (ALTERTHUM *et al.*, 1984 apud DORTA, 2006, p.8). Em contaminações com níveis de 10^7 a 10^8 UFC/mL, o rendimento fermentativo sofreu quedas de 10 a 40% (CRUZ *et al.*, 1985 apud DORTA, 2006, p.8).

Assim com o controle adequado de matéria-prima, da água de lavagem e do processo de extração, pode-se obter um caldo misto com pH ao redor de 5,5 e com números de contaminantes inferiores a 10^7 UFC/mL (ANGELIS, 2010).

Segundo AMORIM & OLIVEIRA (1982), bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Bacillus* quebram a sacarose, formando polímeros de alto peso molecular, que são constituídos por

resíduos de glicose ou frutose. Estes polímeros entopem trocadores de calor e canalizações, além de aumentarem a viscosidade do vinho, entupindo as centrífugas (RAVANELI, 2010).

As bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter* oxidam o etanol em ácido acético, aumentando a acidez volátil e fixa nos vinhos, enquanto as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Pediococcus* produzem grande quantidade de ácido láctico a partir da glicose, e as bactérias do gênero *Clostridium* são responsáveis pela formação dos ácidos butírico, fórmico e acético (YOKOYA, 1995 apud RAVANELI, 2010, p.22).

Um dos grupos de contaminante mais encontrado na fermentação alcoólica é o de bactérias lácticas devido a sua alta taxa de crescimento, tolerância a altas temperaturas, alto teor alcoólico e pH menor que 4,5. Os *Lactobacillus* têm ampla distribuição, são espécies principalmente acidófilas e tolerantes ao etanol, vulgarmente denominadas de bactérias lácticas, são sacarolíticas e exigentes nutricionalmente, principalmente quanto a aminoácidos (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1997 apud DORTA, 2006, p. 7).

Segundo HYNES *et al.* (1997), a contaminação por bactérias lácticas é o maior problema do processo fermentativo, pois o crescimento das mesmas, causa a redução do rendimento fermentativo devido ao consumo de glicose que seria utilizada na síntese etanólica, além da competição de nutrientes do meio e do efeito tóxico do ácido láctico (DORTA, 2006).

Os microrganismos contaminantes são também reciclados com o fermento e isto pode causar muitos problemas, gerando competição entre bactérias e leveduras pelo mesmo substrato (OLIVA-NETO & YOKOYA, 2001 apud BADIN, 2010, p.9). Neste sentido o reaproveitamento do inóculo estimula a multiplicação bacteriana graças ao enriquecimento do meio causado pelas substâncias intracelulares e aminoácidos produzidos pelas células de leveduras (OLIVA-NETO, 1995 e CHERUBIN, 2003 apud BADIN, 2010, p.9).

2.6. Compostos secundários

Segundo Lima *et al.* (2001), o processo fermentativo pode ser inibido pela formação de compostos secundários, tais como aldeídos, álcoois superiores, ácidos, ésteres e o glicerol, que são produzidos por alguns microrganismos, podendo estar presentes no mosto.

2.6.1. Glicerol

O glicerol é produzido na mesma via de síntese que a do etanol, na forma de desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor, NADH, motivo que faz com sua produção seja inversamente proporcional a do etanol, o que causa queda na eficiência fermentativa. Esse desvio pode ocorrer devido ao tipo de levedura e seu desenvolvimento, da presença de contaminantes, da pressão osmótica, do meio e da produção de ácidos orgânicos (BASSO *et al.*, 1996 apud CAMOLEZ, 2004, p.14).

A produção de glicerol não é constante, e além do tipo da levedura, outros fatores como, pH, oxigênio, temperatura, têm grande influência sobre a formação desse composto (CAMOLEZ, 2004). Segundo Ravanelli (2010), Amorim (1977) relatou ainda que condições de pH básico, favoreceram a produção de glicerol, proporcionando o crescimento de contaminantes em detrimento das leveduras que são acidófilas.

2.6.2. Ácido acético e ácido láctico

Os principais ácidos encontrados na fermentação alcoólica são o acético e láctico e ambos são inibidores do crescimento das leveduras. O ácido acético é um produto formado em pequenas quantidades na fermentação, enquanto o ácido láctico é o principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas. A presença de ácidos orgânicos, como o acético e láctico, resultam em um aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno. (NARENDRANATH *et al.* 2001 apud RAVANELLI, 2010, p.6)

O ácido acético é um co-produto normal da fermentação etanólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. Até 30% do mosto pode ser convertido em ácido acético pela mesma na presença de oxigênio, mesmo que não haja a presença de contaminação por bactérias acéticas. No entanto, sua aparição se dá através da ação principal do metabolismo microbiano, sendo que a levedura tem a capacidade de se sintetizá-lo através do processo oxidativo (CAMOLEZ, 2004).

O ácido acético é capaz de inibir por interferência química, o transporte de fosfato em nível de membrana. Ácidos acético, láctico e fórmico são similares, na capacidade de

solubilizar lipídeos e podem em alta concentração, alterar a morfologia celular (MAIORELLA et al. 1983 apud DORTA, 2006, p.11).

2.6.3. Álcoois homólogos superiores

A presença de álcoois superiores (1-propanol, isobutanol, amílico e isoamílico) no processo fermentativo é indesejável nas destilarias, pois a mesma dificulta a obtenção de etanol (GUTIERREZ, 1993 apud CAMOLEZ, 2004, p.15). A formação de álcoois superiores nas leveduras ocorre através da descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica (WEEB & INGRAHAM, 1993 apud CAMOLEZ, 2004, p.15).

Segundo Camolez (2004), Gutierrez (1993) pôde observar que o aumento da temperatura e da concentração de sacarose, além de valores de pH entre 3,0 e 4,5, causam maior produção de álcoois superiores. Vários autores citam que esses álcoois são produzidos a partir de aminoácidos presentes no meio e que a quantidade formada é influenciada pela composição deste, pela temperatura, pelo grau de aeração e pela linhagem de levedura que fazem parte do processo fermentativo.

De acordo com Yokoya (1995) quantidades mais elevadas de álcoois superiores são formadas quando se utiliza fermento com baixa atividade metabólica, que por sua vez acabam por influenciar a microbiota durante o processo fermentativo (BADIN, 2010).

2.6.4. Aldeídos

Os aldeídos podem ser formados pela redução de ácidos graxos, sendo de ocorrência restrita à fermentação etanólica. O principal aldeído associado à fermentação etanólica é o acetaldeído. (MAIA, 1994 apud CAMOLEZ, 2004, p.16).

O aparecimento de acetaldeído pode ocorrer a partir da oxidação do etanol, através da influência do oxigênio do ar ou pela ação direta de algumas enzimas oxidantes provenientes das próprias leveduras (VALESCHI, 1960 apud CAMOLEZ, 2004, p.16). A formação de congêneres como acetaldeído ocorre principalmente nas primeiras horas da fermentação, diminuindo posteriormente, principalmente, sob condições de anaerobiose (MAIA, 1994 apud BADIN, 2010, p.15).

Vários aldeídos podem ser formados a partir de aminoácidos presentes no caldo de cana. A degradação parcial dos aminoácidos leva à formação de álcoois superiores que, em presença de oxigênio podem ser transformados em aldeídos (CLETO, 2000 apud CAMOLEZ, 2004, p.16). O furfural é um aldeído formado como resultado da (TÉO, 2003 apud BADIN, 2010 p.15).

2.6.5. Ésteres

Após a fermentação, de acordo com Cardoso (2001) os ácidos carboxílicos podem reagir com álcoois produzindo ésteres (BADIN, 2010).

Os ésteres são compostos derivados da substituição dos hidrogênios ionizáveis de um ácido por ramificações orgânicas, sendo que o principal éster formado durante o processo fermentativo é o acetato de etila (MATEO *et al.*, 2001 apud CAMOLEZ, 2004, p. 16). Este é formado devido à reação intracelular entre partes de etanol e o ácido acético, que pode formar além de acetato de etila, outros ésteres (MAIA, 1994 apud CAMOLEZ, 2004, p.17).

Rojas *et al.* (2001), pôde observar que a produção de acetato de etila possui maiores concentrações em fermentações realizadas por linhagem de leveduras não pertencentes à *Saccharomyces*. Por isso, o controle da qualidade do substrato e do inóculo utilizados são de extrema importância para a eficiência do processo, evitando perdas e outros transtornos provocados pela presença de metabólitos originários de fermentações secundárias (CAMOLEZ, 2004).

2.7. Métodos de controle bacteriano no processo industrial

A utilização de agentes antimicrobianos reduz os danos causados pelos contaminantes, além de medidas como limpeza das moendas, tubulações, instalações da fermentação e vários outros procedimentos, tais como descarte de fundo de dorna, returbinação do fermento e tratamento ácido. Porém, o eficiente controle só é conseguido com o uso de antimicrobianos adequados e na dosagem correta, pois a aplicação racional desses produtos deve visar apenas a população de bactérias e não a de leveduras (ANTONINI, 2004).

Como as bactérias são distintas das leveduras, existem alguns antimicrobianos seletivos que são usados para o controle bacteriano, os quais podem minimizar os prejuízos

causados por estes contaminantes sobre a fermentação (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.10).

Segundo Amorim (1996) a quantificação do pH é um fator de grande importância no controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. A princípio o tratamento ácido pode apresentar-se também como estressante para a levedura, sendo prejudicial, se os efeitos desta operação provocar conseqüências sobre a fisiologia das células, alterando seu funcionamento. Entretanto sua ação importante é retardar a multiplicação das bactérias minimizando a contaminação, que afetam o processo, reduzindo a eficiência fermentativa (AMORIM, 1996 e MUTTON, 1998, apud BADIN, 2010, p.7).

O processo de fermentação por batelada com reciclo de fermento, se utiliza de ácido sulfúrico para correção do pH e controle de contaminantes, sendo o principal método de controle de floculação do fermento (SOUZA, 2000).

O tratamento com ácido sulfúrico é feito diminuindo o pH do fermento, diluído em água, a uma faixa de 2,0 a 3,0. Ao fermento mantido na cuba são adicionados ácido sulfúrico e água e mantido em constante agitação. O tempo de tratamento é variável (até 3 horas), quanto maior for este tempo menor a viabilidade celular. As células de levedura mais jovens e as mais velhas são menos resistentes ao tratamento (BOVI e MARQUES, 1983 apud DORTA, 2006, p.5).

Segundo Rodine (1985), o uso excessivo do ácido sulfúrico para o controle do contaminante é uma prática danosa às células de levedura num processo de fermentação alcoólica (DORTA, 2006). O tratamento ácido excessivo pode ter efeito abrasivo sobre a parede da levedura que é essencial para sua viabilidade e produção de etanol, assim segundo Paterson *et al.* (1988) a intensidade do tratamento deve variar de acordo com o índice de contaminação do meio (DORTA, 2006).

No entanto segundo Angelis (1992), as leveduras são células consideradas acidófilas, ou seja, são altamente tolerantes a variações de pH do meio, e podem trabalhar em faixas de pH que variam desde 2,4 a 8,6. Os valores ideais recomendados para o processo fermentativo estão na faixa de 3,5 a 4,5. (BADIN, 2010).

De acordo com Dorta (2006), Silva (1993) mostrou através de seus experimentos que o uso do ácido sulfúrico como agente de desinfecção do leite de leveduras constitui-se numa das práticas mais eficientes e econômicas para a fermentação alcoólica. Entretanto, seu uso não deve ser indiscriminado, mas baseado num rigoroso acompanhamento dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do processo fermentativo.

Às vezes é necessário optar entre dois fatores estressantes, como caso do tratamento ácido, que exerce um efeito estressante à levedura, mas acaba sendo benéfica por controlar a contaminação. E outro que acaba sendo muito mais prejudicial à levedura e ao processo que é a contaminação, podendo levar a redução da eficiência fermentativa, e assim prejudicando o rendimento de todo o processo (STECKELBERG, 2001 apud NAVES *et al.*, 2010, p.12).

A utilização de antibióticos como, penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e clorotetraciclina, kamoran e virginiamicina, apresenta-se como uma das possibilidades para controle, em virtude de suas propriedades bactericidas e/ou bacteriostáticas.

Porém o uso contínuo destes produtos pode favorecer o desenvolvimento de linhagens resistentes, tornando-as cada vez menos sensíveis à sua ação, gerando um alto custo do processo de produção, além de possibilitar a incorporação de resíduos no produto final obtido. A utilização de biocidas naturais, que possuem mais de um princípio ativo, apresenta-se como alternativa a ser empregada (BADIN, 2010).

Lyons (2003) afirma que uma destilaria dificilmente vai ter uma fermentação estéril e, como a levedura é um microrganismo de crescimento relativamente 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 (VENTURA, 2007).

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 (VENTURA, 2007).

No entanto, o uso da aplicação de Dióxido de Cloro pode substituir antibióticos na fermentação. É um biocida que na maioria das vezes reage por meio de um mecanismo de transformação de elétrons, atacando a membrana celular, penetrando, desestruturando e oxidando os componentes internos da célula microbiana. Como vantagens, esse antimicrobiano não causa resistência bacteriana por não deixar residuais na fermentação, tornando-se um produto interessante para os interessados na comercialização de levedura seca, além de possuir um custo menor que o dos antibióticos (Comunicação Informal).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O estudo de caso foi realizado a fim de verificar a ação de microrganismos contaminantes no processo fermentativo da Usina Santa Adélia S/A, onde os ensaios analíticos para se obter resultados sobre o rendimento fermentativo e o índice de infecção, foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia da unidade. A partir do lançamento desses resultados no Software de Armazenamento de Dados (PIMS-PI), foi possível acompanhar o desempenho fermentativo da unidade durante a safra 2011/2012.

O material a ser analisado foi retirado das dornas fermentativas, das cubas de tratamento, das caixas de armazenamento de caldos, dos méis e dos trocadores de calor.

3.2. Métodos

As metodologias utilizadas para o controle de rendimento fermentativo da Usina Santa Adélia S/A são baseadas nas Referências Normativas do CTC – Centro de Tecnologia Canavieira, (2011).

Os ensaios analíticos envolvidos no controle de rendimento fermentativo são: Determinação da viabilidade do fermento; Determinação do índice de infecção; Determinação do índice de floculação e Determinação do índice de brotamento, sendo estes realizados através de microscopia. É realizado também, o Plaqueamento e diluição em série a fim de a multiplicação de células e a formação de colônias.

3.2.1. Determinação da viabilidade do fermento

Determina a relação entre células mortas e células vivas. Essa relação pode sofrer variações entre 85 a 100%. Análise realizada através da técnica de coloração com azul de metileno, onde as células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto células inativas adquirem a cor azul. A visualização microscópica deste método se dá através da utilização da Câmara de Neubauer (Figura 8).

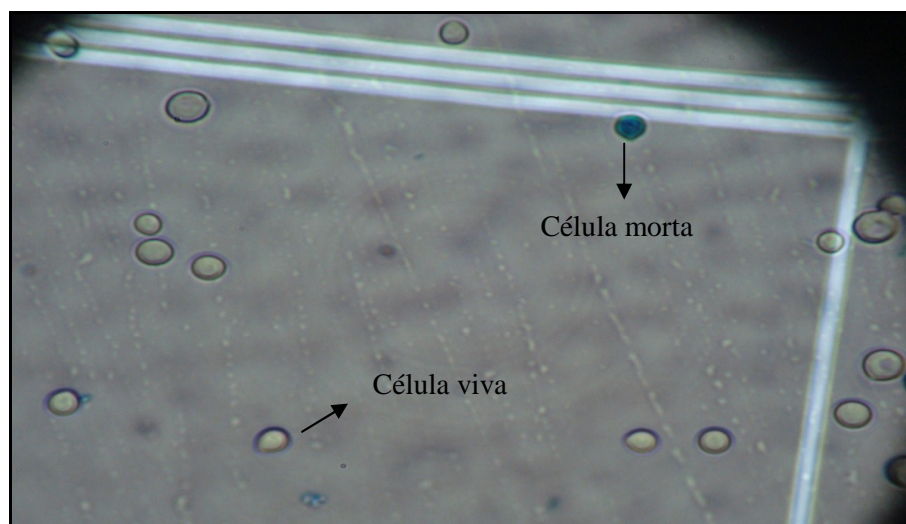


FIGURA 8 – Visualização microscópica da viabilidade de células de levedura da Usina Santa Adélia S/A, com a utilização da Câmara de Neubauer.

FONTE: PENAFORTE, 2011.

3.2.2. Determinação do índice de brotamento

Determina o desenvolvimento de novas células através do processo de brotamento (Figura 9). Neste caso, tolera-se um índice de até 6% de brotos, pois é indispensável a reprodução, porém o foco principal do processo é a produção de etanol.

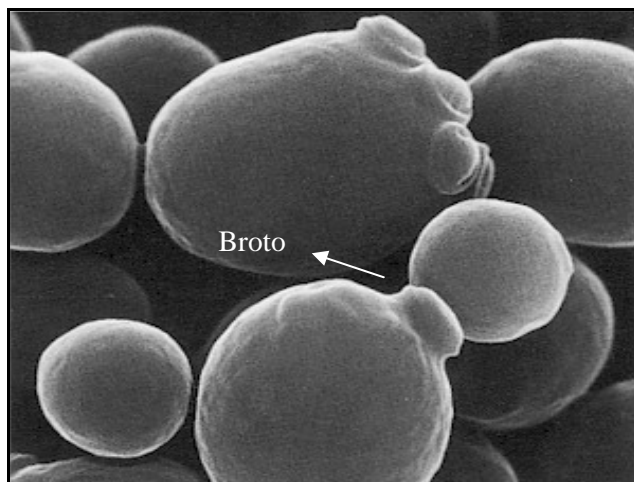


FIGURA 9 – Reprodução assexuada de *Saccharomyces cerevisiae*, onde os brotos são novos indivíduos formados.

FONTE: <http://jmelobiologia.zip.net/>

3.2.3. Determinação do índice de floculação

Determina a relação de número de células por floco formado (Figura 10). Índice de extrema importância, pois quanto maior é, mais facilmente haverá contaminação bacteriana. É dado pela divisão do número de células totais pelo número de objetos encontrados.

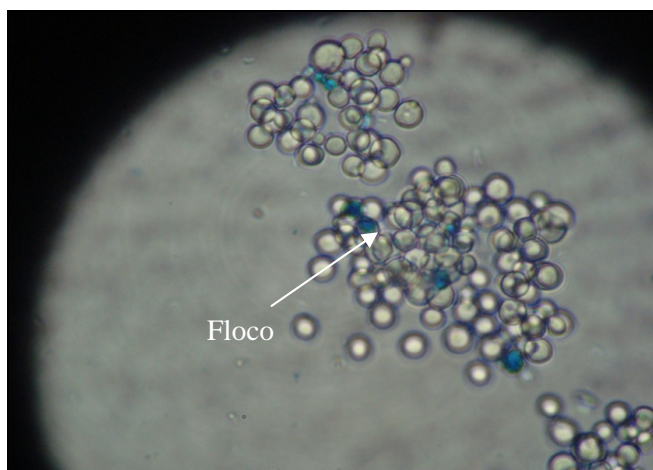


FIGURA 10 – Visualização microscópica de flocos de células de levedura da Usina Santa Adélia S/A, através de microscopia.

FONTE: PENAFORTE, 2011.

3.2.4. Determinação do índice de infecção

Determina a relação entre o número de bastonetes e o número de células de levedura (Figura 11), onde uma contagem maior que 10^8 UFC/mL, indica a necessidade do uso de antibióticos.

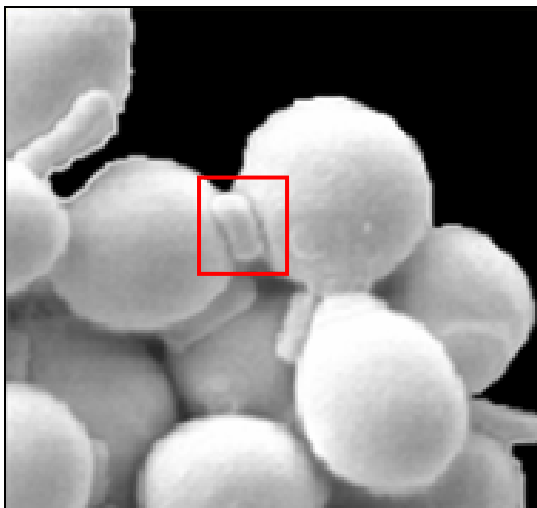


FIGURA 11 – Infecção bacteriana, onde bastonetes se aderem às leveduras formando flocos.

FONTE: GARCIA, 2006.

3.2.5. Plaqueamento e diluição em série

A semeadura em placas ou plaqueamento (Figura 13) revela o número de células de leveduras capazes de se multiplicarem e formarem colônias em meios de cultivo apropriados e sob condições de incubação adequadas. Cada colônia desenvolvida é supostamente originada a partir de uma unidade viável, a qual pode ser um organismo ou muitos. A diluição da amostra (Figura 12) é utilizada neste caso, para uma maior precisão na contagem de colônias (Figura 14).



FIGURA 12 – Diluição da amostra de mosto da Usina Santa Adélia.
FONTE: Acervo próprio



FIGURA 13 – Plaqueamento em meio apropriado (PCA) para desenvolvimento de bactérias.
FONTE: Acervo próprio

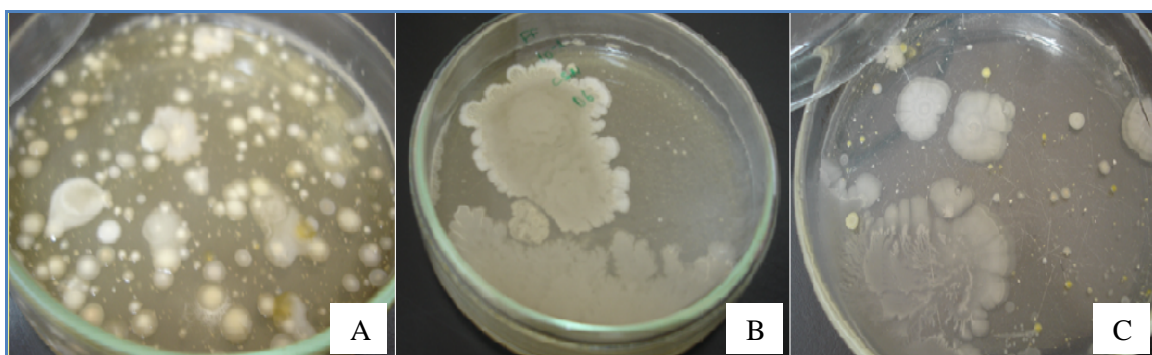


FIGURA 14 - Plaqueamento em PCA de bactérias totais na Usina Santa Adélia S/A – A) Caixa de Caldos; B) Caldo Filtrado; C) Mel.

FONTE: PENAFORTE, 2011.

3.3. Coleta de dados

Utilizou-se o Software de Armazenamento de Dados (PIMS-PI), onde baseado em fórmulas do CTC- Centro de Tecnologia Canavieira pôde-se obter a média mensal dos seguintes parâmetros: Viabilidade, Índice de Brotamento, Índice de Floculação, Índice de Infecção, Utilização de Insumos para o tratamento da fermentação (ácido sulfúrico, dióxido de cloro e antibiótico) e o Rendimento Fermentativo, da safra 2011/2012.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no processo fermentativo durante todos os meses de safra da Usina Santa Adélia S/A estão dispostos na Tabela 1.

TABELA 1 – Média mensal dos parâmetros: Viabilidade, Índice de Brotamento, Índice de Floculação, Índice de Infecção e Rendimento Fermentativo do processo fermentativo da safra 2011/2012 da Usina Santa Adélia S/A, obtida a partir do Software de Armazenamento de Dados (PIMS-PI).

PARÂMETROS	MESES DE SAFRA DA USINA SANTA ADÉLIA S/A						
	ABRIL	MAIO	JUNHO	JULHO	AGOSTO	SETEMBRO	OUTUBRO
VIABILIDADE (%)	100	90	92	96	90	88	78
BROTAMENTO (%)	10,71	10,07	10,17	9,84	9	9,46	7,44
INFECCÃO (%)	3,39	19,1	14,89	11,76	14,08	14,19	24,19
FLOCULAÇÃO (CEL/OBJ)	1,4	7,66	7,99	4,74	5,58	5,22	6,41
RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)	92,18	87,74	87,14	89,93	90,06	87,03	76

A média mensal dos parâmetros fermentativos indicou que a presença de agentes contaminantes bacterianos interferiu na viabilidade celular e no índice de brotamento, consequentemente, a fermentação da Usina Santa Adélia S/A possuiu quedas em seu rendimento quando a mesma demonstrou alto índice de infecção e/ou floculação. Isso comprova os resultados obtidos por Amorim *et al.* (1982) citado por Souza (2000), indicando que a ocorrência de floculação devido à presença de contaminantes causa perdas intensas de levedura tornando o ciclo fermentativo mais longo acarretando redução acentuada no rendimento.

A partir dos resultados obtidos na média mensal do processo fermentativo, puderam-se obter gráficos comparativos (Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21) entre os parâmetros em cada mês da safra.

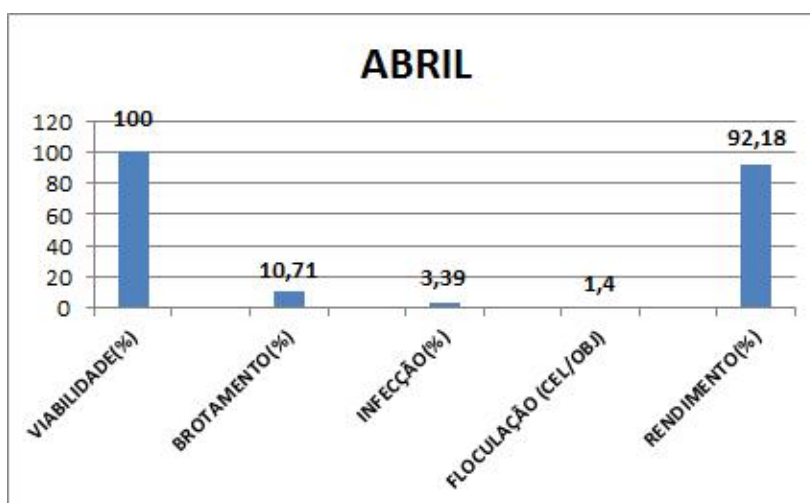


FIGURA 15 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Abril/2011

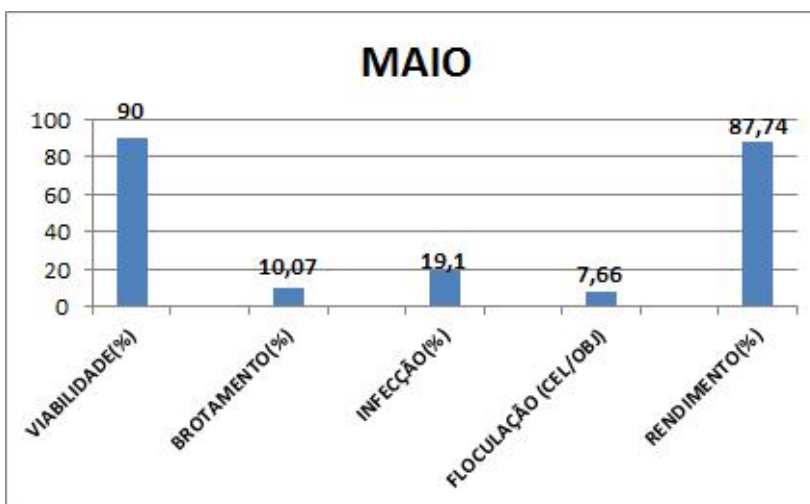


FIGURA 16 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Maio/2011

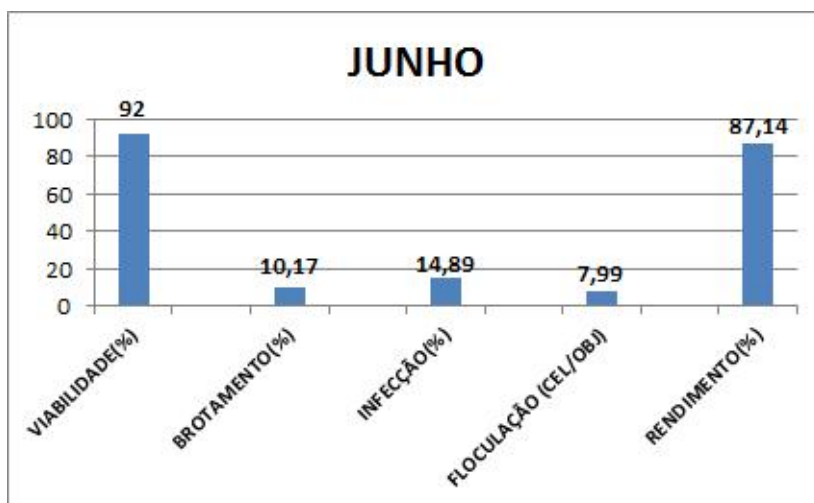


FIGURA 17 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos - Junho/2011

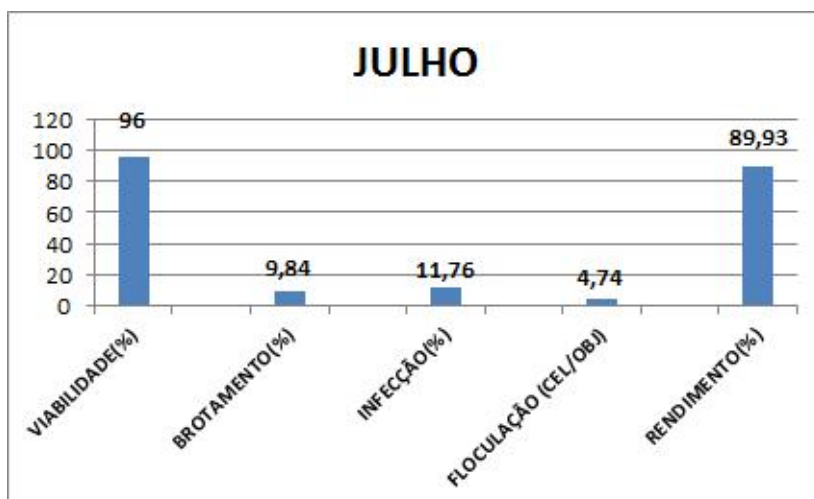


FIGURA 18 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Julho/ 2011

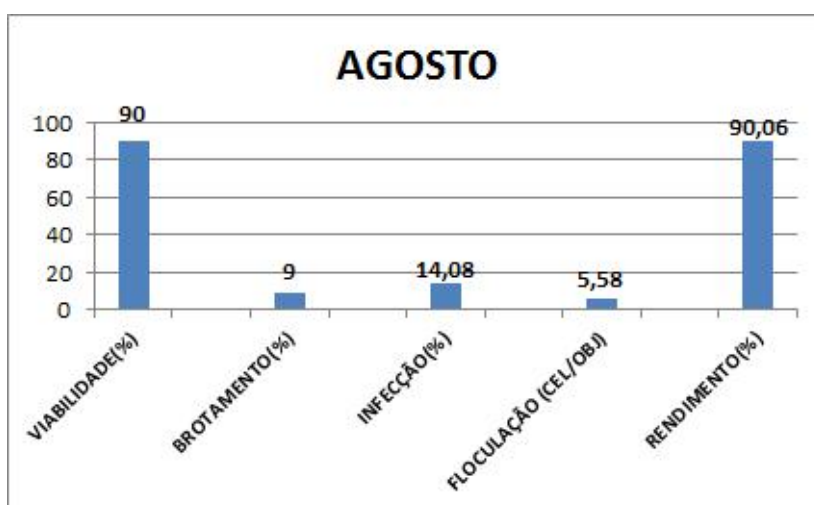


FIGURA 19 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Agosto/2011

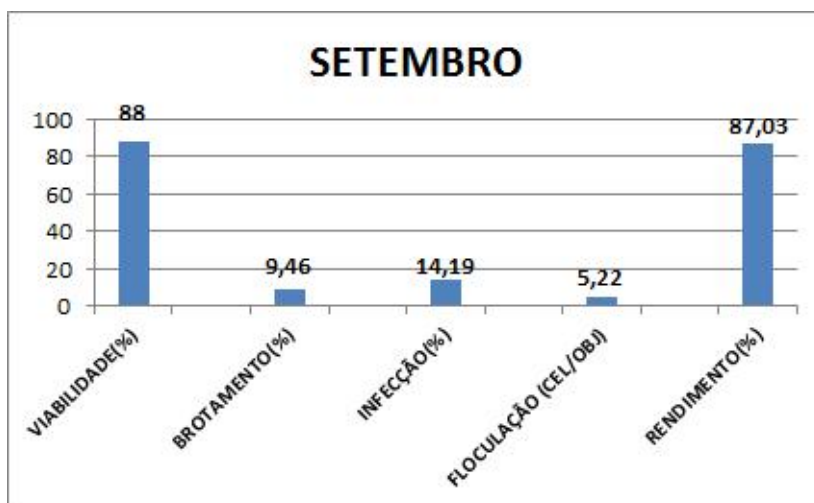


FIGURA 20 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Setembro/2011

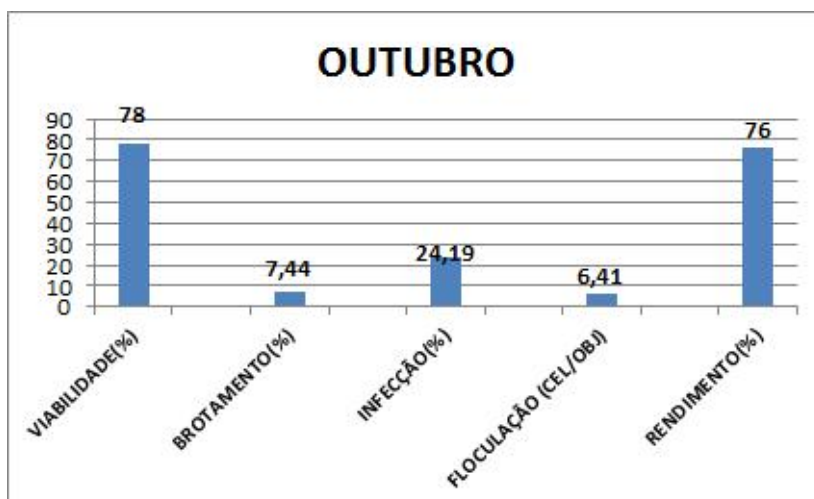


FIGURA 21 – Comparativo mensal dos parâmetros fermentativos – Outubro/2011

Pode ser observado que no primeiro mês de safra o índice de infecção foi o menor de todos os meses de safra, causando consequentemente a queda do índice de floculação, o aumento da viabilidade celular e do brotamento. Fato que ocorreu quando a linhagem de levedura era a selecionada SA-1 e os microrganismos contaminantes não haviam se adaptado ao meio.

A adaptação no meio fermentativo é restrita a poucos gêneros devido ao pH muito baixo e o aumento do teor alcoólico. A proliferação é favorecida pelo processo de batelada alimentada ou contínuo com reciclo de células, processo este, utilizado pela Usina Santa Adélia S/A, o que comprova os resultados de Oliva-Neto e Yokoya (1994), citados por Dorta

(2006), indicaram que o uso desses métodos facilita a multiplicação de gêneros de microrganismos resistentes, que realizam fermentações paralelas à etanólica, causando perdas no processo fermentativo.

Para que haja controle microbiológico na fermentação, a Usina Santa Adélia S/A faz uso de ácido sulfúrico para tratamento do fermento, dióxido de cloro e antibióticos e os resultados do consumo mensal desses insumos durante a safra 2011/2012, podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2 – Média mensal de consumo de insumos utilizados para controle microbiano no processo fermentativo na safra 2011/2012 da Usina Santa Adélia S/A, obtida a partir do Software de Armazenamento de Dados (PIMS-PI).

INSUMOS	MESES DE SAFRA DA USINA SANTA ADÉLIA S/A						
UTILIZADOS (kg)	ABRIL	MAIO	JUNHO	JULHO	AGOSTO	SETEMBRO	OUTUBRO
H₂SO₄	0	157.950	78.308	95.970	109.434	135.267	53.084
DIÓXIDO DE CLORO	0	0	348,01	567,71	821,27	624,8	505,56
ANTIBIÓTICOS	10	140	50	0	30	45	106

A média mensal de consumo de insumos indicou que quanto menor a quantidade de ácido sulfúrico utilizada para o tratamento do fermento que passou pelo processo de reciclo nas cubas, a fim de evitar a proliferação de contaminantes bacterianos, maior foi o uso de produtos para tratamento de choque nas dornas fermentativas, ou seja, para controlar a infecção já existente no processo. Esses produtos são o dióxido de cloro e os antibióticos seletivos.

O tratamento de choque com dióxido de cloro foi uma opção adotada da pela Usina Santa Adélia S/A na safra 2011/2012, a fim de reduzir o uso de antibióticos que deixam residual no fermento, prejudicando a produção de levedura seca, pois o mesmo não causa nenhum dano ao processo. Porém em casos de infecções muito altas, o uso de antibióticos foi indispensável à fermentação da unidade, como foi possível observar nos meses de junho, agosto, setembro e principalmente outubro de 2011.

O problema do uso de antibióticos é o residual que permanece no fermento após tratamento de choque, o que é grave para a produção de levedura seca. A mesma por ser utilizada para alimentação animal deve ser isenta de antibióticos, que devem ser utilizados em casos extremos de infecção nas dornas de fermentação (Comunicação Informal).

Com isso, o uso de assepsia de equipamentos com Quartenário de amônio, dióxido de cloro e o uso de ácido sulfúrico para tratamento ácido é o mais recomendado, para se manter o controle da presença de bactérias contaminantes no processo (Comunicação Informal).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através do Software de Armazenamento de Dados (PIMS-PI) da Usina Santa Adélia S/A, comprovaram que a presença de agentes contaminantes bacterianos na fermentação etanólica, causou o aumento da floculação e a diminuição da viabilidade celular, do brotamento e do rendimento fermentativo, acarretando em perdas no processo, devido às fermentações paralelas à etanólica.

O fator que favoreceu a proliferação desses agentes contaminantes nas dornas fermentativas da unidade foi o uso do processo fermentativo contínuo com reciclo do fermento, o que intensificou a produção de compostos secundários, inibiu o metabolismo das células de levedura que competiram pelo substrato do meio, diminuindo a quantidade de etanol obtido.

O uso de insumos para controle da fermentação, no entanto, auxiliou para que o rendimento fermentativo fosse considerado satisfatório, minimizando o prejuízo que poderia ocorrer no processo de produção de etanol no decorrer da safra 2011/2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A. R. **Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas pelo processo de liofilização.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo – Piracicaba, 1992.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 20- 27, 1998.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R.; M.; VAIRO L. R.; GAMBASSI, D. M. **Efeitos de microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias.** STAB, v.3, n.1, p. 42-49, 1984.
- AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: princípios e problemas.** Piracicaba, 59p. Apostila, 1977.
- AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: princípios e problemas.** Piracicaba, 59p. Apostila, 1977.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool & Açúcar**, n.5, p. 12-18, 1982.
- AMORIM, H. V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 4, 1985. **Anais.** Piracicaba. p.44- 48
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento.** Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996, 93p.
- 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.
- ANDRIETTA, M. G. S., STECKELBERG, C. **O uso da microbiologia como ferramenta na indústria sucroalcooleira: Uma visão aplicada** (Apostila), 2002 p. 72

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERB, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, Campinas, v. 7, p. 1-16, Out. 2006.

ANGELIS, D. F. de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana- Produção e Qualidade**. Jaboticabal, FUNEP, 1992 p. 49-66.

ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>>. Acesso em 23 de junho de 2011.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP, Brasil, 2004.

BADIN, F. **Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 2010.

BAPTISTA, A. S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo – Piracicaba, 2001.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. ; AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H. V. (Coord.). **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC, 1996. P. 56-85.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, p. 83-88, 2005.

BERTOLETI, A. C. D. **Ação biocida do poliquilgerm® derivado do óleo de Ricinus communis L. (mamona) sobre bactérias contaminantes da Fermentação etanólica**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências – Unesp – Rio Claro, 2008.

BOVI, R.; MARQUES, M. O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **Álcool E Açúcar**, v.3, n.9, p.10-13, 1982.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.56, n.1, p.207-215, 1999.

CAMOLEZ, M. A. **Microrganismos contaminantes e seus reflexos na produção de etanol**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 2004.

CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardentes. In: CARDOSO, M. G. Produção de aguardente. Lavras: UFLA, 2001.p. 152-173.

CLETO, F. V. G. **Ação da lecitina no processo fermentativo, rendimento e composição das aguardentes em mostos de cana-de-açúcar, laranja e uva.** Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 2000.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo – Piracicaba, 2003.

COPERSUCAR. Centro de Tecnologia Copersucar. **Treinamento de Operadores de Fermentação – Divisão Industrial.** Piracicaba, 2001. 31 p. (Série Manuais).

CRUZ , M. R. L., VAIRO, M. L., GAMBASSI, D. M. Influência da pinicilina v-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. **Revista de Microbiologia**, v.16, p.138- 142, 1985.

CYSEWSKI, G.R. e WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnol. and Bioeng.** v. 20, p. 1421-1430, 1978.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26.** Dissertação (Mestrado). IB. UNESP – Rio Claro, 2006. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/58327634/6/Contaminacao-no-processo-da-fermentacao-alcoolica>>. Acesso em: 05 de junho de 2011.

GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Flocculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica: I Método de detecção preventiva e estudos para o controle. **STAB: Açúcar, Álcool Subprod.**, v.16, n.6, p.25-27, 1998.

GUTIERREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.50, n.3, p.464-472, 1993.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 18, p. 284-291, 1997.

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 1986.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de Etanol.** In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LUDWING, K. M., OLIVA-NETO, P. de, ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 63-68, Jan./Abr., 2001.

LUDWING, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Desenvolvimento de uma técnica para monitoramento industrial da floculação do fermento por bactérias flocculentas em destilarias produtoras de etanol. In: SEMANA NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 11, 1995. **Anais**. São Carlos. p.7-12.

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, 2003. p.8-9.

MAIA, A. B. R. A. Componentes secundários da aguardente. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.12, n.6, p. 29-33, 1994.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotech. Bioeng.**, v.25, p. 103- 121, 1983.

MATEO, J. J; JIMENEZ, M.; PASTOR, A.; HUERTA, T. Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. **Food Research International**, Ottawa, v.34, n.4, p. 307-314, 2001.

MUTTON, M. J. R. **Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) tratadas com maturadores químicos**. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 1998.

MUTTON, M.J.R. Reflexos da qualidade da matéria-prima no processo industrial. **II Simpósio Internacional da STAB – Perdas de açúcares: do campo ao produto final**. Águas de São Pedro, 2003. 1 CD ROOM.

MUTTON, M. J. R., SOUZA, M. A. C. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada através de técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p. 893-898, Jul./Ago, 2004.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. **Contaminação Microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11; 2010 Pág. 2.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid ad lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.71-177, 2001.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminantes da fermentação alcoólica por leveduras**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp – Campinas, 1995.

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 antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.1, p.10-14, 2001.

PATERSON, M.; BORBA, J. M. M.; MELO, F. A. D.; MORAES, J. I. Avaliação do desempenho da fermentação etanólica em diferentes situações do processo industrial. **Brás. Açuc.**, v.106, n.516, p.27-32, 1988.

RAVANELI, G. C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Maharva fimbriolata* em cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 2010.

RODINE, M. A. T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo – Piracicaba, 1985.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PIÑAGA F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, n.3, p.283-289, 2001.

SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T.; VINCENTE, A. L. **Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento"**. Brasil açucareiro, XCIII, n.6, p. 336-341, 1979.

SILVA, E. F. A. **Fermentação etanólica: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo e bactérias e leveduras contaminantes**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências – Unesp – Rio Claro, 1993.

SOUZA, M. A. C. **Aspectos industriais da floculação por *Lactobacillus fermentum* e seus efeitos na fermentação etanólica**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 2000.

SOUZA, C. S. STECKELBERG, C. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. Cerevisiae***. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação interunidades em biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT – São Paulo, 2009.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 2001.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v. 17, p.43-46, 1981.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Considerações sobre tratamentos de caldo de cana para fermentação alcoólica. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 40-45, 1982.

STUPIELLO, J. P. Qualidade da matéria-prima e seu impacto no processo de produção de açúcar e álcool. In: ATUALIZAÇÃO TECNOLÓGICA NA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA (STAB), 1997. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1997. p. 4-5.

TÉO, D. **Características físico-químicas de aguardentes envelhecidas em diferentes madeiras**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, 2003.

VALESCHI, O. **Aguardente de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1960. 116 p.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na Fermentação etanólica como parâmetro de Monitoramento do processo**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências – Unesp – Rio Claro, 2007.

YOKOYA, F. Pontos críticos microbiológicos no processo de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S. Y.; , S. Y.; YOKOYA, F.; PRADA, G. M. M.; UMINO, C. Y.; CASTRO, M. M. S. **Usinas de açúcar álcool: estudo das leveduras e dos fatores que afetam a fermentação**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. p.1-11.

YOKOYA, F. **Fabricação da aguardente da cana**. (Série Fermentações Industriais, 2). Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995.

ZAR, L. S. **Efeito da contaminação bacteriana na viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis). Faculdade de Tecnologia, Araçatuba, 2010.

WEEB, A. D. ; INGRAHAN, J. L. Fusel oil. **Advances in Applied Microbiol**, San Diego, v.5, p.317-325, 1963.