



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

PALMIRO NÉSPOLI JÚNIOR

**CONTROLE MICROBIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO ÁLCOOLICA**

ASSIS-SP

2013



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

PALMIRO NÉSPOLI JÚNIOR

CONTROLE MICROBIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO ÁLCOOLICA

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Química Industrial
Do Instituto Municipal de Ensino
Superior de Assis, como exigência
Para obtenção do título de Químico
Industrial.

Orientando: Palmiro Néspoli Junior
Orientadora. Prof. Gilcelene Bruzon

Assis-SP
2013

PALMIRO NÉSPOLI JÚNIOR

CONTROLE MICROBIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO ÁLCOOLICA

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Química Industrial
Do Instituto Municipal de Ensino
Superior de Assis, como exigência
Para obtenção do título de Químico
Industrial.

Orientadora: Ms. Gilcelene Bruzon
Área de Concentração: Química

Assis
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

JUNIOR, Palmiro Néspoli

CONTROLE MICROBIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO ÁLCOOLICA Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA – Assis, 2013. 48p.

Orientadora: Ms. Gilcelene Bruzon

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Fermentação. 2. Controle microbiológico

CDD: 660

Biblioteca da FEMA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, amigos e professores que me ajudaram nos momentos mais difíceis, demonstrando apoio, carinho e afeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Palmiro e Lusia, que me ajudaram e incentivaram a seguir em frente.

Aos meus Amigos Rafael Luiz, Otair, Alexandre e outros mais.

Aos professores e colegas de curso, pelos conhecimentos transmitidos esses anos.

A minha orientadora Gilcelene Bruzon, pela dedicação ao término desta conquista.

À banca examinadora.

Aos demais amigos e professores, pessoas boas que encontrei em minha vida.

A todos que, com boa intenção contribuíram para a realização deste trabalho.

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein
(1879-1955)

RESUMO

Muitas empresas estão desenvolvendo pesquisas na área de utilização de microrganismos para serem consumidos na alimentação humana e animal. Um dos microrganismos mais utilizados e pesquisados é a *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse novo ramo um dos principais obstáculos que estão sendo encontrados são as contaminações microbiológicas de outros microrganismos provenientes tanto da matéria prima, quanto de falta de monitoramento e controles específico de limpeza e desinfecção dentro das plantas industriais. Este trabalho visou um estudo sobre a importância no controle microbiológico na entrada de matéria prima, água e ar no tanque de fermentação onde o processo fermentativo nesse caso tem por objetivo a produção de biomassa, que para esse meio a contaminação microbiológica de qualquer outro microorganismo e de extrema agressividade ao meio e impactando assim na qualidade do produto. O objetivo deste trabalho foi fazer a quantificação de bactérias lácticas, leveduras selvagens e bacterias aeróbias, contidas no mosto, água e ar que são utilizados como fonte de oxigênio para meio fermentativo. As amostras foram coletadas no mosto esterilizado, entrada de ar e tanque de agua potavel. Os resultados obtidos foram de presença de bactérias lácticas apenas no mosto que foi amostrado na saída do esterilizador, estando os demais pontos ausentes de contaminantes.

Palavra chave: cana de açúcar; controle microbiológico.

ABSTRACT

Many companies are developing research in the use of microorganisms to be consumed in food and feed . One of mais utilizados microorganisms and researched a *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse new branch is one of the main obstacles being encountered are the microbiological contamination of other microorganisms from both the raw material, as the lack of monitoring controls and specific cleaning and disinfection within industrial plants . This work aimed to study the importance of microbiological control the entry of raw materials, water and air in the fermentation tank where the fermentation process in this case is aimed at the production of biomass , this means that for microbiological contamination of any other microorganism and extreme aggressiveness of the environment and thereby impacting the quality of the product. The aim of this study was to quantify the lactic acid bacteria , wild yeasts and aerobic batteries , contained in wine, water and air are used as a source of oxygen for fermentation media . The samples were collected in sterile wort inlet and clean water tank. The results were the presence of lactic acid bacteria only in the mash which was sampled at the outlet of the sterilizer , the other being absent points contaminants.

Keyword: sugarcane; microbiological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Célula de Levedura.....	20
Figura 2-	Fluxograma para produção de Biomassa em larga escala.....	23
Figura 3-	Vantagens de desvantagens sistema de limpeza química.....	24
Figura 4-	Modelo de spray-ball giratório.....	27
Figura 5-	Modelo de spray-ball fixo.....	27
Figura 6-	Contagem microbiana após a esterilização.....	36
Figura 7-	Entrada de ar.....	36
Figura 8-	Entrada de água potável.....	37
Figura 9-	Saída de mosto esterilizador.....	38
Figura 10-	Entrada de Ar.....	38
Figura 11-	Tanque de água potável.....	38
Figura 12-	Saída de mosto esterilizador.....	39
Figura 13-	Entrada de ar tanque de fermentação.....	39
Figura 14-	Tanque de água potável.....	40

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	AÇÚCAR E ALCOOL.....	16
2.1	CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
2.2	AÇÚCAR.....	17
2.3	ÁLCOOL.....	18
3.	LEVEDURA.....	19
4.	FERMENTAÇÃO.....	20
4.1	HISTÓRICO.....	21
4.2	BIOMASSA DE LEVEDURA.....	22
5.	CONTROLE DO PROCESSO.....	24
5.1	LIMPEZA QUIMICA (CIP - CLEANING IN PLACE).....	24
5.1.1	Fatores Químicos.....	25
5.1.2	Fatores Operacionais.....	25
5.1.3	Fatores de higiene.....	25
5.1.4	Fatores Mecânicos.....	25
5.2	CONTROLE DURANTE A FILTRAGEM E ESTERILIZAÇÃO DO MOSTO.....	27
6.	FERMENTAÇÃO DE PÃES NO ENSINO.....	29
6.1	MATERIAS E MÉTODOS.....	30

6.1.1	Materiais.....	30
6.1.2	Métodos.....	30
7.	MATERIAS E MÉTODOS.....	31
7.1	MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	31
7.2	MÉTODOS.....	32
7.2.1	Pontos de amostragem.....	33
7.2.1.1	Saída de mosto esterilizador.....	33
7.2.1.2	Entrada de ar.....	33
7.2.1.3	Tanque de água potável.....	33
7.2.2	Análises.....	34
7.2.3	Diluições das amostras.....	34
7.2.4	Inoculação e incubação.....	34
7.2.5	Cálculos.....	35
8.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
8.1	BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	36
8.2	LEVEDURAS SELVAGENS NÃO <i>Saccharomyces</i>	37
8.3	BACTÉRIAS AERÓBIOS.....	39
9.	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos várias unidades industriais vem realizando estudos com objetivo de direcionar investimentos na área de desenvolvimento de novos ramos industriais, proporcionando novas fontes de lucratividade através de matéria prima proveniente de cana de açúcar (BIORIGIN, 2004).

Muitas empresas estão desenvolvendo pesquisas na área de utilização de microrganismos para serem consumidos na alimentação humana e animal, um dos microrganismos mais utilizados e pesquisados é a *Saccharomyces cerevisiae* (FERMENTEC, 1994).

Existem diversas abordagens focadas na produção de álcool e bebidas. Assim a *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo desenvolvida e melhorada na indústria de produção de etanol e cervejaria (FERMENTEC, 1994).

Nesse novo ramo um dos principais obstáculos que estão sendo encontrados são as contaminações microbiológica de outros microrganismos provenientes tanto da matéria prima, quanto de falta de monitoramento e controles específico de limpeza e desinfecção dentro das plantas industriais (FERMENTEC, 1994).

Basicamente para obtenção de um bom produto final (nesse caso fermento concentrado), o principal fator que deve ser monitorado é limpeza e desinfecção de equipamentos e linhas de produção (FERMENTEC, 1994).

O objetivo desse trabalho é verificar a presença de microrganismos contaminantes nas amostras de fermento final e levantar os possíveis pontos de contaminação durante o processo.

2. AÇÚCAR E ALCÓOL

2.1 CANAS DE AÇÚCAR

A cana de açúcar é originária da região sudeste da Ásia, onde é cultivada desde épocas remotas, o surgimento de várias doenças e tecnologias mais avançadas exigiram a criação de novas variedades, as quais foram atingidos através de cruzamentos com variedades ascendentes. Os trabalhos de melhoramento persistem até os dias atuais e conferem a todas as variedades em cultivo de novas espécies (NASCIMENTO, 2009).

A cana de açúcar chegou ao Brasil através dos portugueses no início do século XVI, chegando à região nordeste do país, onde na época se tornou a responsável por ser a região maior na produção de açúcar na época que veio a se estender até o século XVII (FERRO et al., 2007). Hoje a maior parte dos canaviais existentes nos países estão concentrados na região sudeste, mais precisamente no interior do estado de São Paulo, e o açúcar não é o principal produto da cana de açúcar, hoje o principal produto é o álcool. Além do álcool, vários novos produtos estão sendo desenvolvidos com matéria prima proveniente da cana de açúcar.

Um dos fatores mais atrativos a trazer os canaviais para o interior do estado de São Paulo é devido ao clima tropical, pois é um clima quente, subdividido em uma estação seca e uma estação úmida (FILHO, 2009).

A cana de açúcar é cultivada numa extensa área territorial, onde apresenta melhores rendimentos nas regiões quentes. O clima ideal é aquele que apresenta estações distintas, uma quente e a outra úmida, onde proporciona melhor germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo, seguido de outra fria e seca, que promove a maturação e conseqüentemente acúmulo de sacarose nos colmos (NASCIMENTO, 2009).

Uma característica importantíssima da cana de açúcar também é na sua utilização direta como fonte de nutriente direto na alimentação animal, como mais utilizado nas estações do inverno, pois as pastagens são muito frágeis e os animais necessitam de fonte nova de alimento devido a escassez das chuvas (FERRO, et al., 2007).

Um fator importantíssimo para que a região migre a cana de açúcar na região sudeste é devido ao êxodo rural, pois muitas famílias principalmente na região sudeste estão mudando para as cidades, isto faz com que a região migre para áreas de plantio de cana de açúcar na maioria do caso devido as indústrias buscarem mão de obra nas cidades, onde estas são mais especializadas. As áreas rurais acabam se tornando grandes fazendas de cana de açúcar e atualmente com as reduções de queimadas, as grandes indústrias estão adquirindo máquinas e equipamentos sofisticados que dependem de menor quantidade de mão de obra (NASCIMENTO, 2009).

Essa migração de pessoas da área rural para área urbana é chamada de urbanização, que isto incentiva o crescimento de grandes e médias cidades, criando oportunidade de empregos (NASCIMENTO, 2009).

2.2 AÇÚCAR

O açúcar surgiu na Índia, era de difícil acesso, era utilizado mel com maior frequência para adoçar. Os primeiros cristais de açúcar na Índia eram chamados de pães de açúcar, pois era a forma mais fácil de armazenar e transportar. Posteriormente no final do século XIX já estavam sendo produzidos em formatos de cubos (AÇÚCAR GUARANI, 2013).

O açúcar é um termo genérico para carboidratos cristalizados, os principais são sacarose, lactose e frutose. Sua principal característica é o seu sabor adocicado.

A cana de açúcar foi uma cultura de acesso limitado e açúcar uma mercadoria rara durante muito tempo, comerciantes de açúcar se tornavam ricos, Veneza foi o principal centro comercial de açúcar na Europa (AÇÚCAR GUARANI, 2013). Hoje o

açúcar se apresenta em diversos tipos, açúcar refinado, açúcar cristal, xarope invertido e açúcar orgânico entre outros.

2.3 ÁLCOOL

O álcool é produzido a partir de matérias primas que possuem altos índices de frutose, a produção de álcool é feita a partir de processo de fermentação alcoólica, em seguida passa por processo de separação através de centrifuga e por processos de destilação, onde temos vários tipos de acordo com a necessidade de cada tipo de produto que será produzido (PORTAL DA CANA, 2013).

Para cada litro de álcool produzido, são gerados aproximadamente 12 litros de resíduos, sendo que a quantidade de resíduos depende diretamente do rendimento do processo de fermentação e principalmente do rendimento dos processos envolvidos (PORTAL DA CANA, 2013). O álcool é uma classe de compostos orgânicos que possui na sua estrutura um ou mais grupos de hidroxilas (OH^-), ligados a carbonos saturados, geralmente é utilizado como combustível, esterilizante, solvente e é o componente principal de bebidas alcoólicas (UOL EDUCAÇÃO, 2013). Hoje o álcool se apresenta em alguns tipos, etanol, metanol e álcool anidro.

Além do álcool, temos outros produtos derivados da cana de açúcar, como a cachaça, o bagaço, o óleo fusel e a levedura.

3.LEVEDURA

As leveduras são os microrganismos eucariotos mais importantes utilizados em processos fermentativos caseiros e industriais. Sua estrutura é constituída por parede celular, membrana celular e núcleo. A parede celular das leveduras é constituída por duas camadas principais: uma interna chamada de glucana e uma externa denominada manana, sobreposta à camada de glucana (VALENTÍN, et al.; 1997), em muitos esta entra apenas como agente biológico de transformação, uma vez que ao termino do processo produtivo é descartada. Trata-se de uma prática antiga nas produções principalmente de etanol, onde as quantidades geradas são muito grandes. Vislumbra-se uma necessidade real de se buscar novas aplicações desses micro-organismos após sua aplicação em processos primários. Entre inúmeras utilizações de levedura como fonte de matéria prima, hoje as empresas investem em fermentações aeróbicas, pois a produção de biomassa é maior.

As leveduras mais utilizadas nos ramos de fermentação alcoólica são a *Saccharomyces cerevisiae*, *Salix fragilis*, *Candida subtilis* e *Candida tropicalis*. A espécie mais utilizada para fins de fermentação em escalas industriais, panificação, é a *Saccharomyces cerevisiae*. Existem muitos estudos a respeito do emprego desta levedura no processo de fabricação de etanol e o seu aproveitamento em rações para animais e utilização também como fonte importante de proteína para consumo humano. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser usada na alimentação humana sob diversas formas (PEIXOTO, 1996), podendo ser utilizada em sua forma íntegra ou derivados de levedura (DZIEZAK, 1987).

Outra utilização da levedura é a produção do etanol que despertou bastante interesse no mundo inteiro, devido às enormes vantagens, destacando-se a sua sustentabilidade e por contribuir acentuadamente na amenização do aquecimento global (BUTOLO, 2002 apud OLIVEIRA, 2006).

A figura 1 ilustra uma célula de levedura.

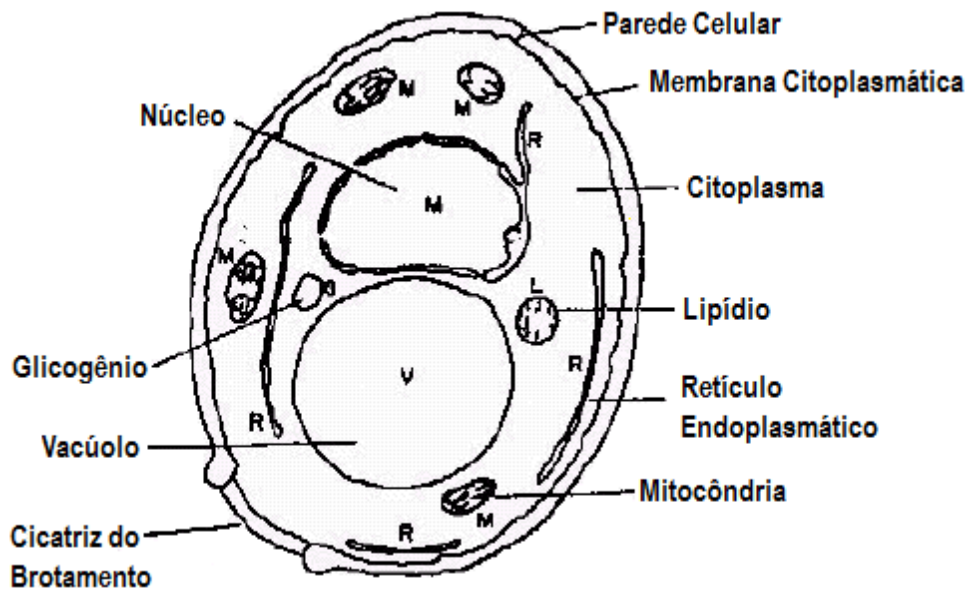


Figura 1- Célula de levedura

As leveduras são micro-organismos que possuem algumas características próprias de crescimento e desenvolvimento, por exemplo pH de crescimento ideal entre 3,5 a 5,0, nessa faixa ela tem um meio propício para seu rápido crescimento e melhor qualidade em sua carga de proteína, a temperatura de 28 a 33°C, nessa faixa de temperatura também tem bom resultado de crescimento.

A qualidade do meio de cultivo, replicará na melhoria do desenvolvimento das células, sendo que pH, temperatura, minerais e teor de açúcar são condições fundamentais deste processo.

4. FERMENTAÇÃO

4.1 HISTÓRICO

Os produtos de fermentação foram usados desde a antiguidade. Habitantes das cavernas descobriram que a carne envelhecida tem um sabor mais agradável que a carne fresca. Vinho, cerveja e pão são tão velhos quanto a agricultura. Queijo, que envolve a fermentação de leite ou creme, é outra comida muito antiga.

O valor medicinal de produtos fermentados é conhecido há muito tempo, os chineses, por exemplo, usavam coalho de feijão-soja mofado para curar infecções de pele há 3.000 anos. Os índios da América Central tratavam feridas infetadas com fungos.

A verdadeira causa de fermentação, porém, não era compreendida até o século XIX. O cientista francês Louis Pasteur, enquanto estudava problemas dos cervejeiros e vinicultores da França, descobriu que um tipo de levedura produz vinho bom, mas um segundo tipo torna-o azedo. Esta descoberta conduziu à teoria da origem de doenças de Pasteur. Estudos realizados por Pasteur permitiram verificar que a fermentação alcoólica estava sempre associada ao crescimento de leveduras, mas que se estas fossem expostas a quantidades importantes de oxigênio produziram em vez de álcool e dióxido de carbono, água e dióxido de carbono. Destas observações, Pasteur concluiu que a fermentação é o mecanismo utilizado pelos seres vivos para produzir energia na ausência de oxigênio (FERREIRA, 2008). Já em 1897, o químico alemão Buchner demonstrou que a fermentação era apenas uma sequência de reações químicas, podendo ocorrer fora de células vivas. Foi este estudo que revelou as enzimas e permitiu a compreensão do metabolismo celular em toda a sua globalidade. Em 1930 os bioquímicos alemães Embden e Meyerhof descobriram a totalidade das etapas deste processo, pelo que essa sequência também é conhecida por cadeia de Embden-Meyerhof (FERREIRA, 2008).

A química das fermentações é uma ciência nova que ainda está em suas fases mais iniciais trata-se da base para processos industriais que convertem matérias-primas como grãos, açúcares, e subprodutos industriais em muitos produtos sintéticos diferentes(PARAZZI, 1995).

As proteínas são nutrientes essenciais na dieta humana e devem estar presente na alimentação. O valor nutricional da proteína depende de sua composição (SGARBIERI et al., 1999).

4.2 BIOMASSA DE LEVEDURA

A necessidade de aumentar a quantidade de biomassa de levedura mundialmente se deu em função de aumentar a utilização de produto como fonte de matéria prima no ramo alimentício, apesar de que já era utilizado desde os ancestrais principalmente para área de panificação.

Principalmente no final do século XXI, o mundo começou a absorver a necessidade de uma vida mais saudável, utilizando produtos com natureza orgânica. A figura 2 é uma forma resumido fluxograma para produção de biomassa em larga escala.

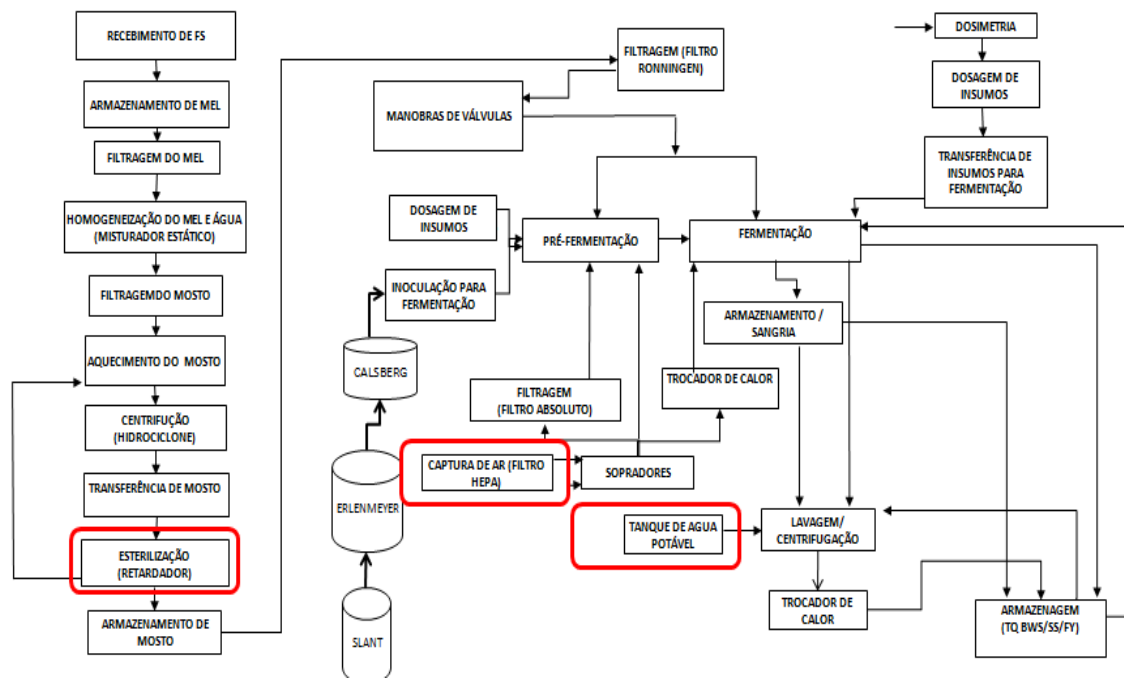


Figura 2: Fluxograma para produção de Biomassa em larga escala.

5. CONTROLE DO PROCESSO

5.1 LIMPEZA QUÍMICA(CIP - CLEANING IN PLACE)

Limpeza química é um termo utilizado nas empresas que visam otimizar processos de forma a garantir processo confiável, livre de contaminação física, química e microbiológica. Nesse processo alguns fatores devem ser seguidos rigorosamente, como por exemplo, tempo, temperatura, tecnologia (este critério é utilizado na fabricação do equipamento onde é pensado em toda a área que será utilizada e como será feita a limpeza em todos os locais), concentração das soluções químicas (BORELLI, 2008).

As vantagens do sistema de CIP ou limpeza química estão descritas na figura 3.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Não há desmontagem do circuito; - Detergentes mais concentrados; - Operação segura; - Controle de resultados; - Mínimo tempo de inatividade da Produção; - Único método para tanques grandes, tubulações, trocadores de calor e concentradores. 	<ul style="list-style-type: none"> - Áreas mortas sem ação mecânica; - Interrupção total, em caso de mal funcionamento; - Problemas difíceis de serem diagnosticados; - Não elimina a necessidade de mão de obra para pontos de difícil acesso; - Eficácia do detergente não é totalmente compensada pela ação mecânica.

Figura 3: Vantagens de desvantagens sistema de limpeza química.

O processo de CIP é muito eficiente, porém existem alguns fatores que influenciam em uma boa eficiência de limpeza, dentre elas destacamos os fatores químicos, operacionais, de higiene e mecânicos(BORELLI, 2008):

5.1.1 Fatores Químicos

- Detergente adequado para a aplicação;
- Desinfetante inadequado para a aplicação;
- Uso de concentrações abaixo das especificadas pelo fabricante.

5.1.2 Fatores Operacionais

- Erro no direcionamento de fluxo;
- Não cumprimento de tempos;
- Não cumprimento das temperaturas;
- Limpeza manual insatisfatória;
- Não verificação de concentrações;

5.1.3 Fatores de higiene

- Tipo e quantidade de sujidade;
- Composição da sujidade;
- Tipo e Concentração do detergente;
- Temperatura de higienização;
- Qualidade da água utilizada no enxágue e na preparação das soluções.

5.1.4 Fatores Mecânicos

- Acabamento das superfícies;
- Vazão da bomba de avanço inadequada;
- Pressão na bomba de avanço;
- Vazão da bomba de retorno inadequada;
- Velocidade de fluxo nas tubulações;
- Bomba de retorno muito distante do tanque a ser higienizado;

A vazão da bomba de avanço requerida para criar ação mecânica necessária para realizar a higienização de um tanque vertical é calculada através da relação matemática existente entre a circunferência do tanque e nível de sujidade do mesmo (BORELLI. A., 2008).

$$QR = DT \cdot FS$$

- FS (fermenter sugar)= 27 para baixas condições de sujidade (adega de pressão)
- FS (fermenter sugar)= 30 para médias condições de sujidade (adega de maturação)
- FS (fermenter sugar)= 32 para altas condições de sujidade (adega de fermentação)
- FS (fermenter sugar)= 35 para altas condições de sujidade limpas com ácido

QR: vazão requerida.

DT: diferencial de temperatura.

OBS: 1- QR= vazão requerida é dada em litros por minuto.

Um equipamento fundamental para uma boa eficiência de CIP é sistema aspensor, ou como é chamado nas indústrias spray-ball, no mercado temos vários modelos, nas figuras 4 e 5 estão apresentados modelos de boa eficiência(BORELLI, 2008).



Figura 4: modelo de spray-ball giratório.



Figura 5: modelo de spray-ballfixo

5.2 CONTROLE DURANTE A FILTRAGEM E ESTERILIZAÇÃO DO MOSTO

O processo de esterilização do mosto é a eliminação de micro-organismos presentes no mosto. Após processo de esterilização, onde no mesmo utiliza-se conceito de autoclave mas em um processo contínuo, é utilizado o conceito de pressão, tempo e temperatura.

Nos testes em que foi realizado, utilizou-se pressão de 1,5 Bar, temperatura de 121°C aproximadamente e tempo de retenção no retardado de 60 segundos mas no processo contínuo.

O processo de retenção, em processo contínuo, é simplesmente um tubo de 12" de 8 metros de altura, onde a vazão de esterilização é controlada através do cálculo de retenção no equipamento a temperatura e pressão especificada.

O ponto de controle é na vazão e temperatura, os outros pontos são de monitoramento.

6.FERMENTAÇÃO DE PÃES NO ENSINO

A fermentação da levedura *Saccharomices cerevisiae* em fermentação de pães é um método simples de ser explicado e entendido no ensino médio, pois é um assunto do dia a dia das pessoas, também muito simples de exemplificar com práticas. Com o intuito de uma atividade interdisciplinar é interessante levar os alunos até a cozinha da escola e preparar pães para as suas respectivas refeições, mostrando passo a passo o crescimento da massa através da fermentação da levedura (GUTKOSKI;SANTOS,2004).

A história da panificação vem desde o Egito antigo, há mais de 6000 anos a.C., feitos a partir de trigos selvagens secos em pedras aquecidas, misturados com água até formar pasta e consumidos. A partir daí foram aprimorando-se as técnicas de panificação. Em 2600 a.C. os padeiros descobrem que uma mistura de trigo e água que não foi cozida aumentava de volume durante a fermentação.

No Egito, o pão era o alimento básico da população. Era amassado com os pés, e normalmente, feito de cevada. Os pães preparados com trigo de qualidade superior eram destinados apenas aos ricos. O segredo para a produção de pães não está nos ingredientes, mas sim na bioquímica de transformação e na tecnologia da panificação.

Pode-se acrescentar outros ingredientes como farinha de outros cereais, gorduras, emulsificantes, leite e produtos lácteos, ovos, entre outros. Fornece, de modo geral, 19% das necessidades energéticas diárias, contendo também elementos nutritivos e energéticos, como ácidos graxos, aminoácidos, elementos minerais e vitaminas (A, B1, B2, C, D, E e K).

Deste modo esta prática pode ser aplicada em todas as séries do ensino, em especial aos alunos do ensino médio para que estes alunos possam sair do ensino médio com uma noção maior principalmente nas disciplinas de química e biologia, onde estes ensinamentos serão levados por todas as suas vidas.

6.1 MATERIAS E MÉTODOS

A metodologia a ser usada é de simples entendimento e fácil execução pelo professor e pelos próprios alunos. Esta metodologia é a mesma usada para a fabricação de pães caseiros.

6.1.1 Materiais

1kg de farinha de trigo

1 tablete de fermento

½ litro de água levemente morna

1 colher de sopa de banha

1 colher de sopa de açúcar refinado

1 colher de chá de sal

6.1.2 Métodos

Dissolve-se o fermento no açúcar refinado. Junta-se o líquido, que deve estar quase frio. Acrescenta-se 1 xícara de farinha.

Deixa-se crescer por 30 minutos num lugar tampado e sem vento (forno comum ou de micro-ondas).

Acrescenta-se os outros ingredientes. Deve-se sovar muito bem e com força. Deixar crescer novamente até dobrar o volume.

Divide-se a massa em duas partes e faz-se os formatos. Colocar na assadeira em que será assado sem untar e deixe crescer novamente. Esses pães não ficam muito dourados por cima, verifique por baixo, quando estiver dourado está bom.

Desta forma os alunos poderão perceber a importância da fermentação no dia a dia.

7. MATERIAS E MÉTODOS

7.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E REAGENTES

- Autoclave;
- Balança semi-analítica;
- Câmara de Fluxo Laminar/Câmara Biológica;
- Contador de Colônias tipo "Quebec";
- Difusor Plástico;
- Incubadora;
- Estufa de secagem e esterilização circulação mecânica;
- Banho de água com aquecimento controlável (banho-maria);
- Refrigerador;
- Termo-higrômetro;
- Bico de Bunsen;
- Espátula estéril;
- Placa de Petri estéril;
- Pipeta graduada estéril ou Micropipetador;
- Ponteira estéril;
- Homogeneizador peristáltico
- Vórtex;
- Papel alumínio, algodão.
- Meio de cultivo MRS;
- Actidiona
- Álcool etílico 70%;

- Diluente: Água Peptonada 0,1%.
- Meio de cultivo Ágar Lisina;
- Lactato de Potássio 50%;
- Diluentes: Água Peptonada 0,1% ou Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Tampão Fosfato pH 7,2;
- Antibiótico: Cloranfenicol;
- Água Estéril;
- LysineMedium– OXOID
- Lysine Medium - Himédia
- Agar PCA;
- Agar R2A;
- Água Peptonada 0,1%;
- Álcool etílico 70%;
- Ácido Láctico 10% ou Ácido Láctico P.A. (85-90%) $C_3H_6O_3$;

7.2 MÉTODOS

7.2.1 Amostragem

As amostras nos pontos mencionados abaixo foram coletadas nos pontos: saída de mosto esterilizado, entrada de ar e tanque de água potável. Os pontos de amostragem foram: saída de mosto no esterilizador, Entrada de ar soprador e Tanque de água potável.

7.2.1.1 Ponto de amostragem 01

Definiu-se este ponto por tratar-se da principal entrada no meio fermentativo (tanque fermentador), em função de açúcares (alto teor) e devido ao fato de que o mosto possui teor de sólidos que não possíveis retiradas no filtro antes da esterilização e também no hidro ciclone do esterilizador

7.2.1.2 Ponto de amostragem 02

O critério utilizado para a escolha deste ponto foi por tratar-se da principal entrada de oxigênio no tanque de fermentação e pela validação do processo de filtração de ar (filtro Absoluto)

7.2.1.3 Ponto de amostragem 03

A água de poço por sua vez contém microrganismos, portanto o método mais eficaz de eliminação de microrganismos é através de cloração. Este ponto foi selecionado por ser a principal entrada no tanque de fermentação e pela natureza da água que pode conter microrganismos.

7.2.2 Análises

Todos os ensaios foram realizados em Câmara de Fluxo Laminar e em Câmara Biológica devidamente esterilizada.

7.2.2.1 Diluições das amostras

Foi transferido assepticamente 1 mL da amostra líquida para 9 mL do diluente, isso correspondeu à diluição 10^{-1} e 10^{-2} , respectivamente. Prosseguiu-se de maneira similar, transferindo-se 1 ml da diluição para 9 ml do diluente e assim sucessivamente. Antes de retirar o volume a ser transferido, agitou-se vigorosamente (15s) o tubo com o auxílio de um vórtex. As diluições decimais foram feitas de acordo com o nível de contaminação esperada. Anotou-se o Fator de Diluição (FD) para cálculo dos resultados.

7.2.2.2 Pour Plate com Sobre camada

Foram selecionadas as diluições adequadas da amostra e inoculadas 1,0 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis, adicionando a cada placa inoculada de 15 mL de meio de cultura MRS estéril. Adicionou-se o meio MRS e homogeneizou-se suavemente com movimentos circulares em forma de oito e foi deixado solidificar a temperatura ambiente. Após a solidificação do meio de cultura adicionou-se uma sobrecamada do mesmo meio de cultura, foi aguardado novamente a solidificação e incubou-se as placas de forma "invertida" em estufa a 30° C por 48 h.

7.2.3 Cálculos

Após período de incubação, foram selecionadas as placas com número de colônias entre 25 a 250. Com o auxílio do contador de Quebec, as colônias das placas foram contadas. O número de UFC (Unidade Formadora de Colônia) por g ou mL da amostra é igual ao número de colônias contadas na placa da amostra sem diluição.

Cálculo: $\text{UFC/g} = \text{n}^\circ \text{ total de colônias} \times \text{FD}$

UFC = Unidade Formadora de Colônias

FD = Fator de Diluição

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 BACTÉRIAS LÁCTICAS

Os resultados do ensaio de bactérias lácticas estão mostrados nas figuras 6, 7 e 8.

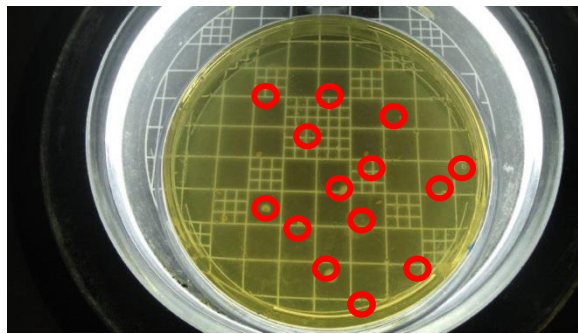


Figura 6: Contagem microbiana após a esterilização.

No ponto após a esterilização observou-se a ocorrência de formação de colônias de $1,4 \times 10^2$ UFC/mL em pequena quantidade o que indica contaminação, porém baixa.

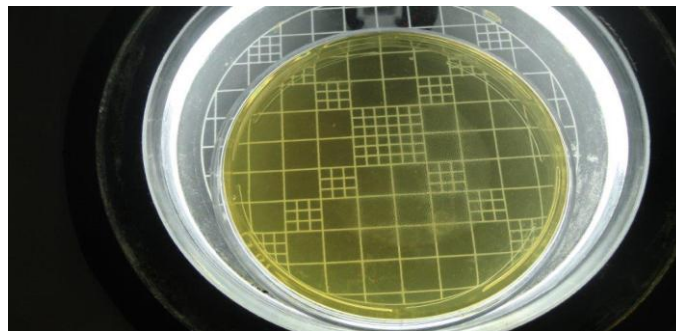


Figura 7: Entrada de ar.

No ponto de amostragem de entrada de ar, ocorreu confirmação da eficiência no processo de filtragem, pois após filtragem do ar pelo filtro absoluto, não teve presença de microorganismo.

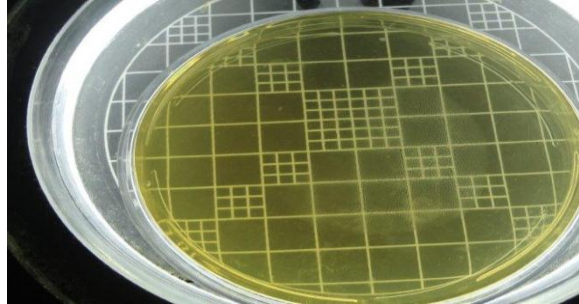


Figura 8: Entrada de água potável.

No ponto de amostragem de entrada de água potável (tanque de armazenamento), ocorreu confirmação da eficiência no processo de cloração da água, no caso do tratamento com hipoclorito de sódio 12% e a cloração da água de 2,00 a 2,50 ppm de cloro livre. Assim pode-se perceber que o tratamento da água está sendo eficiente.

Verificamos que a partir dos resultados obtidos, apenas um dos pontos apresentou contaminação. Como ocorreu a contagem no ponto após esterilização, mesmo sendo uma contaminação considerada baixa, indica que a esterilização não foi eficiente. Em valores de contagem o valor é baixo, mas quando esses microorganismos estiverem no meio fermentativo, o impacto é grande devido as variáveis de exposição ideais para crescimento.

8.2 LEVEDURAS SELVAGENS NÃO *Saccharomyces*

Em todos os pontos monitorados e analisados nos períodos de investigação não foi detectado presença de levedura não *Saccharomyces*, como ilustrado nas figuras 9, 10 e 11.

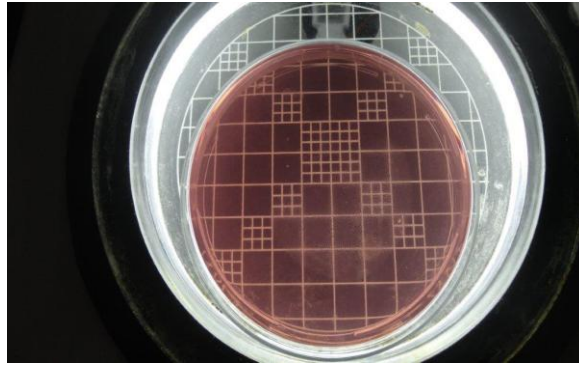


Figura 9: Saída de mosto esterilizador.

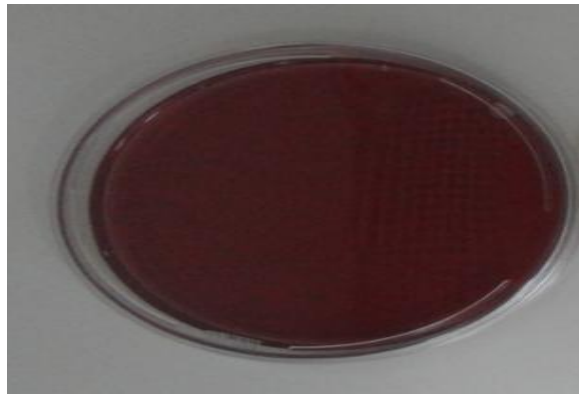


Figura 10: Entrada de Ar.



Figura 11: Tanque de água potável.

A ausência de bactérias não *Saccharomyces*

8.3 BACTÉRIAS AERÓBIAS

Em todos os pontos monitorados e analisados nos períodos de investigação não foi detectado presença de bacterias aeróbias, o que pode ser verificado nas figuras 12, 13 e 14.

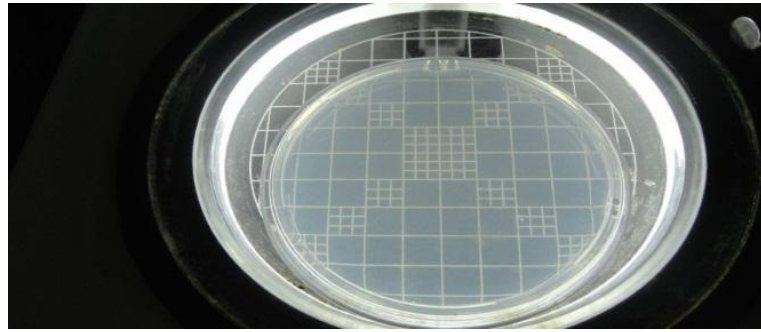


Figura 12: Saída de mosto esterilizador.

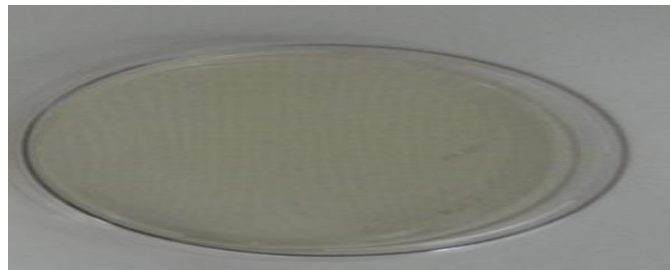


Figura 13: Entrada de ar tanque de fermentação.



Figura 14: Tanque de água potável.

9. CONCLUSÃO

Observando os resultados nas análises de bactérias lácticas, leveduras selvagens e bactérias aeróbios, constatou-se como principal entrada de contaminantes no fermentador, a amostra coletada na saída do esterilizador de mosto, aonde a mesma veio a apresentar alto índice de contagem de 140 colônias de bactérias lácticas na placa.

Nos demais pontos amostrados, entrada de ar e entrada de água não foram evidenciados entrada de contaminantes, também no mosto não foi encontrado presença de leveduras selvagens e também bactérias aeróbios.

REFERÊNCIAS

AOAC Official Method 990.12 **Aerobic Plate Count in Foods.**

AOAC Official Method 966.23 **Microbiological Methods.**

BIORIGIN, 2004. Disponível em <WWW.BIORIGIN.NET/ESTUDOSQUATÁ>. Acesso em 29 de set. de 2011.

BORELLI, Alexandre, 2008. Disponível em <Alexandre.borelli@johnsondiversey.com>. Acesso em 18 de out. de 2011.

COPERSUCAR. **Apostila de Microbiologia da Fermentação.** Copersucar, Piracicaba - S.P. ; 2000.

DZIEZAK, J. D. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, v.41, n.2, 1987, p.104-121.

ESPAÇO DO CONSUMIDOR. **Origem e história do açúcar.** Disponível em: <<http://acucarguarani.com.br/hp/consumidor/historia.php>>. Acesso em: 09 de jul de 2013.

FERMENTEC, 1994. Disponível em <WWW.FERMENTEC.COM.BR>. Acesso em 29 de set. de 2011.

FERREIRA, Julia, 2008. Disponível em: <<http://julia3mcesb.blogspot.com/2007/10/fermentao-na-histria.html>>. Acesso em 18 de out. de 2011.

FERRO, Maria Inês; BARROS, Neli Martins de.; DABBAS, Karina Maria; LAIA, Marcelo Luiz de.; KUPPER, Kátia Cristina; MORAES, Vicente Alberto de.; OLIVEIRA, Julio Cezar Franco de.; FERRO, Jesus Aparecido; ZINGARETTI, Sonia Maria. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*. **Summa Phytopathol**, Botucatu, n°2, v.33, abril/junho 2007.

FILHO, José Rubens Almeida Leme. **Desenvolvimento da Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob diferentes formas de colheita e de manejo de palhço**. 2009.111p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GUTKOSKI, Luiz C.; SANTOS, Elisa dos. **ESTUDO DE FORMULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE PÃO FRANCÊS CONGELADO NÃO FERMENTADO**. Revista Brasileira de Agrociência, v.10, n. 3, p. 347-352, jul-set, 2004.

MATURIN, L., PEELER, J.T. Chapter 3 – **Aerobic Plate Count**. In: US Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online, 8th Edição, Revisão A, 1998. Disponível no site: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm>>. Acesso em 24/05/2012.

MORTON, D.R. Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F.P., ITO K. (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th Ed. American Public Health Association (APHA), Washington, 2001. Capítulo 7 p.63-67.

NASCIMENTO, Rafael Silva Vieira do. **Gestão da Qualidade na Cultura da Cana-de-açúcar**. 2009. 89p. Trabalho de Conclusão de Curso (Administração)- Fundação Educacional do Município de Assis- FEMA/ Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis- IMESA, ASSIS, 2009

NOTÍCIAS. **A verdadeira história do ProÁlcool**. Disponível em:<<http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.html>>. Acesso em: 09 de jul de 2013.

OLIVEIRA, Celso Guarani Ruiz. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura *SACCHAROMYCES Cerevisiaerica* em selênio orgânico**. Curitiba, 2006. 77 p. Dissertação de Mestrado do curso de pós-graduação em tecnologia de alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

PARAZZI, C. **Fermentação alcoólica com leveduras flocculantes**. Rio Claro, 1995. 164p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Rio Claro. 1995.

PEIXOTO, N. **Processamento de Produtos de Biomassa de Levedura para Alimentação Humana: Potencial, Mercado Interno e Externo**. "WORKSHOP": Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Campinas, 1996. p.90.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos; ALVIM, IzabelaD.; VILELA, Elke Simone D.; BALDINI, Vera Lucia S.; BRAGAGNOLO, Neura. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomycessp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Braz. J. FoodTechnol.**, v. 1,2, n. 2; agosto, 1999, p.119-125.

QUÍMICA. **Compostos orgânicos: Fórmulas estruturais e principais classes**. Disponível em: <<http://educacao.uol.com.br/disciplinas/quimica/compostos-organicos-formulas-estruturais-e-principais-classes.htm>> . Acesso em: 09 de jul de 2013.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., Gomes, R.A.R. **Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos em placas.** Em: Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos, 3 ed., São Paulo, Livraria Varela, 2007, Capítulo 6, p. 87-97; p. 381-382 e Capítulo 14, p. 183-199.

VALENTÍN, E; HERRERO; RICO, H.; MIRAGALL, F.; SENTRANDEU, R.; Cell wall manoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Archives of Microbiology**. n. 148, Julho, 1997. p. 88-94.