



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

ISMAR TEODORO VAZ

**CONTROLE DE ESPOROS BACTERIANOS NO PROCESSO DE
CULTURA DE LEVEDURA INDUSTRIAL**

**Assis/SP
2016**

ISMAR TEODORO VAZ

**CONTROLE DE ESPOROS BACTERIANOS NO PROCESSO DE
CULTURA DE LEVEDURA INDUSTRIAL**

Projeto de pesquisa apresentado ao Curso de Bacharelado em Química Industrial e Licenciatura em Química do IMESA - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito para obtenção do Certificado de Conclusão.

Orientando: Ismar Teodoro Vaz.

Orientador: Prof. Me. Alexandre V. Guedes Mazalli.

**Assis/SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

VAZ, Ismar Teodoro.

Controle de Esporos Bacterianos no processo de cultura de levedura Industrial /
Ismar Teodoro Vaz. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA – Assis, 2016.
pg.54

1. Esporos . 2. Clean In Place.3.Levedura

CDD: 660
Biblioteca da FEMA

CONTROLE DE ESPOROS BACTERIANOS NO PROCESSO DE CULTURA DE LEVEDURA INDUSTRIAL

ISMAR TEODORO VAZ

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, como requisito do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador:

Me. Alexandre Vinicius Guedes Mazalli.

Examinadora:

Me. Elaine Amorim Soares.

Assis/SP
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família. A minha esposa Liane e aos meus filhos Abner e Arthur.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua bondade, por me permitir concluir um curso de graduação, por me dar força e vontade de continuar sem desistir, por ser meu sustento nas horas difíceis.

Agradeço a minha família, minha esposa Liane meus filhos Abner e Arthur, que por eles fiz e faço qualquer sacrifício.

Agradeço especialmente a minha esposa pelo companheirismo, por ser meu apoio e minha base cuidando de tudo na minha ausência, por entender minha falta em casa, durante o trabalho e os quatro anos de faculdade, por me dar força durante todos esses anos juntos e sempre do meu lado.

Aos meus filhos Abner e Arthur que fazem com que eu nunca pare de lutar e me faz querer ser sempre melhor, por entenderem minha ausência nas noites durante o curso.

Agradeço a empresa que trabalho por me conceder apoio durante os anos do curso, bolsa de estudo me incentivando a crescer profissionalmente.

Agradeço a todos meus amigos do curso pelas suas amizades, pelo sorriso, pelo apoio e palavras de incentivo, em especial agradeço a Fabiane (Bia), Ane Caroline (Carol) e a Mayara, pela ajuda nos trabalhos, provas, explicações e a amizade que me deram durante todos esses anos, pelas risadas, pelos desabafos, pela alegria, pela troca de conhecimento e por tudo que passamos juntos.

A todos os professores do curso de Química, que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico me ajudando, ensinando e apoiando, em especial ao meu orientador o professor e amigo Alexandre Mazalli (Ale), pelo apoio, ensinamento, sinceridade e principalmente a amizade, também ao professor Ebano pelas dicas de caráter e crescimento pessoal, por eles me despertou a vontade de ser um professor.

Agradeço ao meu amigo Rodrigo Amaro pelas caronas ao longo de dois anos.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte do meu sucesso alcançado.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”

Martin Luther King

RESUMO

Os processos industriais de alimentos, quando não controlados corretamente, podem conter diversos tipos de micro-organismos, inclusive na água, ocasionando algum tipo de doença ou adversidade nas pessoas que consomem esses produtos. O processo de formação de esporos ou endósporos, conhecido como esporulação, ocorre quando as bactérias são expostas a condições desfavoráveis no meio em que elas estão, criando assim uma resistência/proteção em volta da bactéria. São do gênero *Bacillus* e *Clostridium* os principais formadores de esporos. Na fase vegetativa são bactérias patógenas à saúde humana, mas na fase esporulada não são consideradas patógenas, porém a quantidade de bactérias esporuladas no meio aumenta o número de bactérias totais nas análises, fazendo com que o produto ultrapasse o limite de especificação técnica, trazendo prejuízos à indústria. O presente trabalho teve por objetivo, identificar os fatores que propiciam a esporulação das bactérias e a quantificação de esporos bacterianos no processo industrial de reprodução de levedura. Realizamos coleta com swab na superfície dos equipamentos antes e após a realização do processo de higienização CIP, constituindo-se de análises microbiológicas de *Bacillus Cereus*, *Clostridio Sulfito Redutor* e Esporos, identificando a presença de micro-organismos indesejados no procedimento. Através dos resultados obtidos observamos que a presença de células vegetativas e células esporuladas após o processo CIP foram nulas, comprovando a eficiência do processo de higienização. Porém a contagem de células esporuladas no creme de levedura, no creme pré-fermentação e no creme após produção de biomassa se deu presente, podendo estar associados à contaminação de insumos adicionados no processo. Os padrões industriais para células vegetativas são ≤ 10 ufc/mL e para células esporuladas $\leq 250/10\text{mL}$, no entanto, os valores encontrados não são significativos, sendo considerados conformes aos padrões industriais de acordo com a ANVISA.

Palavras-chave: Esporos; Clean in place, levedura

ABSTRACT

Industrial food processes, when not properly controlled, may contain various types of microorganisms, including water, causing some kind of disease or adversity in the people who consume those products. The process of spore or endospore formation, known as sporulation, occurs when bacteria are exposed to unfavorable conditions in the environment they are, thus creating resistance / protection around the bacteria. Bacillus and Clostridium are the main spore formers. In the vegetative stage are bacteria pathogenic to human health, but in the spore phase are not considered pathogenic, but the amount of bacteria sporulated in the medium increases the number of total bacteria in the analyzes, causing the product to exceed the limit of technical specification, causing damages Industry. The objective of the present work was to identify the factors that favor the sporulation of bacteria and the quantification of bacterial spores in the industrial process of breeding of yeast. We performed swab collection on the surface of the equipment before and after the CIP sanitization process. Microbiological analyzes of Bacillus Cereus, Clostridium Reducing Sulfite and Spores, identifying the presence of undesired microorganisms in the procedure. Through the obtained results we observed that the presence of vegetative cells and cells sporulated after the CIP process were null, proving the efficiency of the hygienization process. However, the count of sporulated cells in the yeast cream, the pre-fermentation cream and the cream after the production of biomass was present, and may be associated to the contamination of inputs added in the process. The industrial standards for vegetative cells are ≤ 10 cfu /mL and for sporulated cells ≤ 250 /10mL, however, the values found are not significant and are considered to conform to industrial standards ANVISA.

Keywords: Spores; Clean in place, yeast

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Tanque de aço inox utilizado para reprodução de levedura.....	18
Figura 2:	Esquema do sistema CIP – Clean in Place.....	20
Figura 3:	Imagens de micro-organismos estudados na microbiologia.....	21
Figura 4:	Morfologia bacteriana.....	22
Figura 5:	Etapas da formação de esporos.....	23
Figura 6:	Levedura <i>Saccharomyces</i> em fase de brotamento	29
Figura 7:	Fluxograma do processo de reprodução de levedura.....	31
Figura 8:	Demonstração do experimento sobre fermentação.....	34
Figura 9:	Demonstração de coleta por swab ou esponja.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Tipos de fermentação e alimentos produzidos.....	27
Tabela 2:	Análise das superfícies dos tanques de produção.....	42
Tabela 3:	Análise do creme de levedura em processo.....	44

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS.....	17
2.1	TIPOS DE SUPERFÍCIES.....	17
3.	HIGIENIZAÇÃO.....	19
3.1	LIMPEZA.....	19
3.2	SISTEMA CIP (CLEAN IN PLACE).....	20
4.	MICRO-ORGANISMOS.....	21
4.1	BACTÉRIAS.....	21
4.2	PATOGENICIDADE.....	22
5.	ESPOROS BACTERIANOS.....	23
5.1	ESPOROS TERMÓFILOS E MESÓFILOS AERÓBIOS.....	24
5.2	ESPOROS MESÓFILOS ANERÓBIOS.....	25
5.3	ESPOROS “FLAT-SOUR”.....	25
5.4	ESPOROS TERMÓFILOS ANAEROBIOS NÃO PRODUTORES DE H ₂ S.....	25
5.5	ESPOROS TERMOFILOS ANAEROBIOS PRODUTORES DE H ₂ S	26
6.	FERMENTAÇÃO.....	27
6.1	TIPOS DE FERMENTAÇÃO.....	27
7.	LEVEDURA.....	28
7.1	REPRODUÇÃO DA LEVEDURA.....	28
8.	PROCESSO DE CULTURA DE LEVEDURA.....	30
8.1	INFLUENCIA DO CALOR.....	31
9.	FABRICAÇÃO DE PÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO NO ENSINO MÉDIO	32
9.1	MATERIAIS.....	33
9.2	METODOLOGIA.....	34

10.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
10.1	MATERIAIS.....	35
10.1.1	Equipamentos.....	35
10.2	MEIOS DE CULTIVO.....	35
10.3	EQUIPAMENTOS ANALISADOS.....	36
10.4	REAGENTES.....	36
10.5	CREME DE LEVEDURA.....	36
10.6	MÉTODOS.....	37
10.6.1	Amostragem.....	37
10.7	ANÁLISE DO CREME DE LEVEDURA.....	38
10.7.1	pH.....	38
10.7.2	Temperatura.....	38
10.7.3	Armazenamento.....	39
10.7.4	Contagem de <i>Bacillus Cereus</i>.....	39
10.7.5	Contagem de Clostrídio Sulfito Redutor.....	39
10.7.6	Contagem de Esporos Mesofilos Aeróbios.....	40
10.7.7	Contagem de Esporos Mesofilos Anaeróbios.....	40
10.7.8	Contagem de Esporos Termófilos Aeróbios.....	41
10.7.9	Contagem de Esporos Termofilos Anaeróbios.....	41
11.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
11.1	ANÁLISES DAS SUPERFÍCIES DOS TANQUES.....	42
11.2	ANÁLISES DO CREME DE LEVEDURA.....	43
12.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
13.	REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Podemos ter diversos tipos de micro-organismos em alimentos industrializados, inclusive na água, que causam algum tipo de doença ou adversidade nas pessoas que os consomem. Através de fezes de animais, por pessoas assintomáticas ou má condição de higiene nas superfícies dos equipamentos ou no interior destes, os alimentos podem ser contaminados por bactérias patógenas para o homem podendo assim trazer um perigo a saúde pública, devido ao crescimento excessivo dos patógenos (CREDÍDIO, 2012).

São chamados de deteriorantes os micro-organismos que causam através da deterioração microbiana, alterações químicas prejudiciais nos alimentos, alterando assim a cor, odor, sabor e aspecto, eles utilizam os alimentos como fonte de energia para sobreviver. Bactérias, bolores e fungos são os principais agentes deteriorantes dos alimentos (GERMANO & GERMANO, 2008).

Quando expostas à condições desfavoráveis no meio em que elas estão, determinados tipos de bactérias são capazes de criar uma resistência chamada de esporos ou endósporos, conhecido como esporulação. Criados em volta da bactéria, esses esporos são formados devidos a habilidade que as bactérias têm de criar uma proteção em volta da célula que a protege do meio desfavorável. Estas, não se reproduzem na forma esporulada, quando o meio em que estão, torna-se favorável, as bactérias saem desta fase e retornam a forma vegetativa, dando origem a novas bactérias (CARDOSO et al., 2004).

São dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* os principais formadores de esporos. Na fase vegetativa são bactérias patógenas à saúde humana, na fase esporulada não são consideradas patógenas, mas a quantidade de bactérias esporulada aumenta o número de contagem de bactérias totais, fazendo com que o produto ultrapasse o limite estabelecido na especificação técnica, trazendo prejuízos à indústria (GALLO et al., 1988).

Desta forma, fica evidente que a higiene e os padrões de limpeza das indústrias devem ser seguidos para evitar possíveis contaminações ao produto, assim as condições e fatores que influenciam na esporulação das bactérias devem ser conhecidas e controladas.

O presente trabalho tem por objetivo, identificar os fatores que propiciam a esporulação das bactérias e a quantificação de esporos bacterianos no processo industrial de reprodução de levedura.

2. ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS

Devido à Revolução Industrial, que iniciou na Inglaterra em meados do século XVIII, surgiram as Indústrias de alimentos, expandindo-se para o mundo a partir do século XIX. Houve uma ampliação no mercado agroalimentar, devido à agricultura passar por um processo de transformação (HERNÁNDEZ, 2005).

A migração do homem rural para a cidade gerou uma diminuição no consumo de alimentos rurais e houve mudança na alimentação, gerando uma maior oferta de alimentos industrializados (BOTELHO, 2006).

2.1 TIPOS DE SUPERFÍCIES

Nas indústrias, os alimentos processados entrarão em contato com equipamentos que, devem ter superfícies, não tóxicas, resistentes a corrosão e mecanicamente estáveis. Além de não influenciar nas características do produto, como cores, odores nem contaminantes (DUTRA; ALLES; MARIOT, 2008).

Nas indústrias de alimentos o aço inox é o mais utilizado (figura 1), por ser de fácil limpeza e resistência a altas temperaturas (BERNARDES et al., 2012)



Figura 1: Tanque de aço inox utilizado para reprodução de levedura (In: Acervo pessoal, imagem empresa Zilor – Quatá/SP).

3. HIGIENIZAÇÃO

Para manter a qualidade microbiológica dos alimentos manipulados, a higienização nas indústrias alimentares auxilia na obtenção de produtos que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, apresentam também uma boa qualidade higiênica-sanitária e garantem menor risco para a saúde do consumidor. Para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, a higiene pessoal é, de extrema importância dado que todas as pessoas, mesmo as saudáveis, são portadoras naturais de uma grande variedade de micro-organismos, os quais podem ser transferidos para os alimentos (BENTO et al., 2008).

Nas indústrias de alimentos o processo de higienização se insere junto a Boas Práticas de Fabricação (BPF) e à Análise de Pontos Críticos de Controle (APCC), tendo objetivo principal a obtenção de produtos seguros para a população humana (ANDRADE 2008).

Se os alimentos não forem tratados da maneira adequada, os micro-organismos permanecem e se multiplicam, aumentando o risco de contaminação do produto. Assim, os equipamentos devem ser devidamente higienizados para não contaminar os alimentos (RIBAS, 2008).

3.1 LIMPEZA

As etapas de limpeza e sanitização das superfícies de equipamentos e utensílios é chamada higienização. O sistema CIP - Clean In Place (limpeza no lugar) é realizado em equipamentos fechados onde não há necessidade de desmontá-los, este procedimento é constituído por limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo principal remover resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos na superfície dos equipamentos, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais. Já a sanitização engloba a eliminação de micro-organismos (ANDRADE 2008).

As moléculas constituintes dos alimentos (proteínas, carboidratos, gordura e sais minerais), são essenciais para o desenvolvimento dos micro-organismos. Assim os resíduos que permanecem nas superfícies dos equipamentos onde se processam os

alimentos, fornecem um meio para proliferação destes (ATHAYDE, 1998 e MARRIOT, 1999).

3.2 SISTEMA CIP (CLEAN IN PLACE)

O uso do sistema CIP (Clean in Place), que é um sistema automático onde os equipamentos e tubulações são higienizados sem a desmontagem, é frequente nas indústrias de alimentos. O sistema CIP normalmente é constituído das seguintes etapas: pré-enxágue com água a uma temperatura de 38°C a 46°C para remoção de resíduos grosseiros, seguido pela circulação de solução alcalina (NaOH) a uma temperatura de 80°C, enxágue com água para remoção do alcalino, circulação de solução ácida (HNO₃ ou H₃PO₄) a uma temperatura de 70°C, e um novo enxágue (ANDRADE 2008). A figura 2 mostra o esquema CIP.

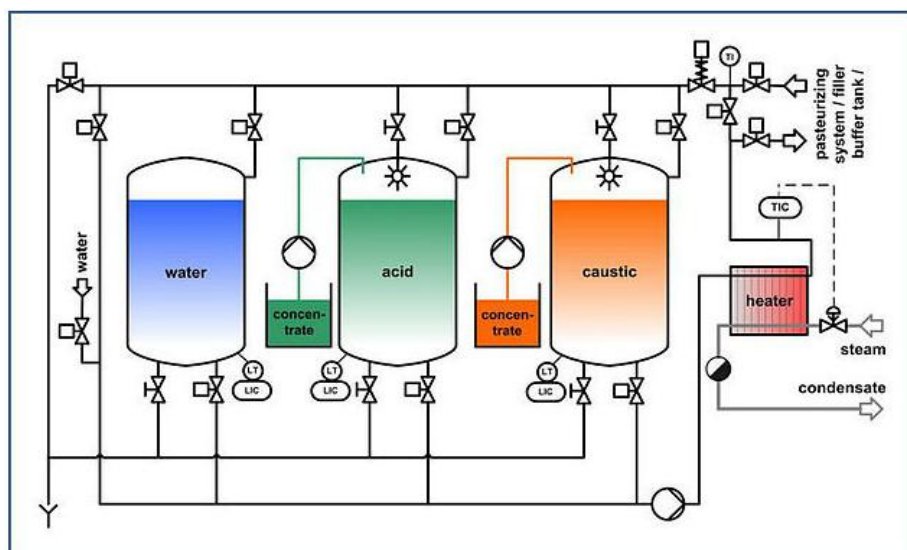


Figura 2: Esquema do sistema CIP - Clean in Place (In: <http://www.mangtech.com.br/#!/clean-in-place/gmlcv>).

4. MICRO-ORGANISMOS

Diversos tipos de micro-organismos sejam eles bactérias, bolores, vírus ou protozoários podem causar doenças de origem alimentar. As doenças transmitidas por alimentos estão bastante associadas às bactérias. Estes alimentos podem ser contaminados por bactérias patogênicas ao homem através de deficientes condições de higiene em seu processamento (FERREIRA et al., 2011).

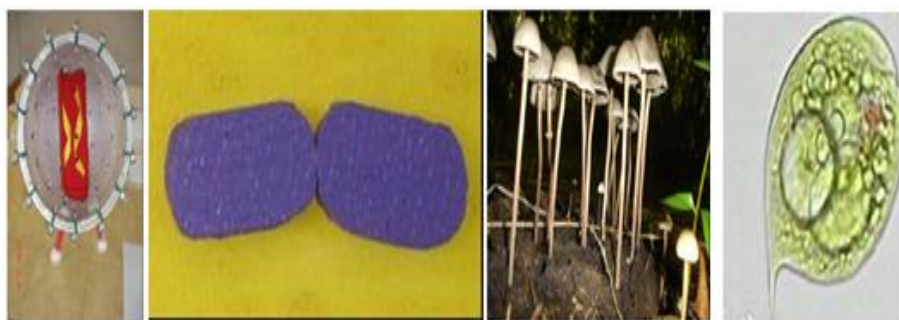


Figura 3: Imagens de micro-organismos estudados em microbiologia, 1-Vírus, 2-bactérias, 3-fungos e 4-algas (In: NASCIMENTO, 2010).

4.1 BACTÉRIAS

Bactérias são organismos unicelulares procariontes, encontradas em formas isoladas ou coloniais. Possuem estrutura celular simples e podem variar de tamanhos. As formas e tamanho das bactérias podem variar de 0,1 a até 1,0 μm , sendo o tamanho médio em torno de 1,0 μm . As bactérias que não possuem esporos são chamadas vegetativas, porém, grande parte das bactérias possui esporos (RIBEIRO & SOAREZ; 2000; MADIGAN; MARTINKO; PARKER; 2004).

As formas das bactérias podem ser classificadas em três grupos, cocos esféricos, bacilos e em espiral, sendo que podem ainda apresentar algumas variações como apresentado na figura 4 (CABEEN; JACOBS-WAGNER; 2005).

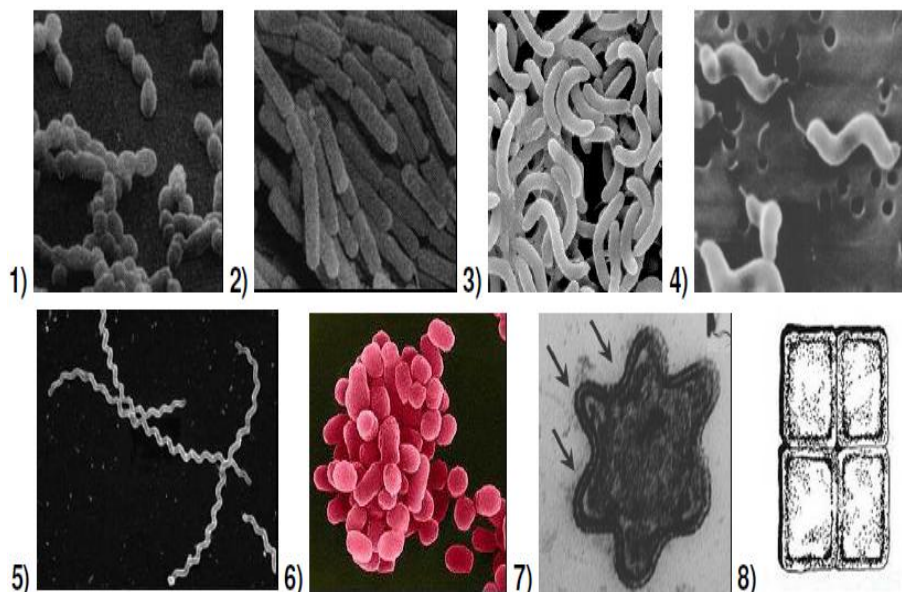


Figura 4: Morfologia bacteriana: 1-cocos, 2-bacilos, 3-vírgula, 4-espirilo, 5-espiroqueta, 6-cocobacilos, 7-estrela, 8-quadrada (In: TORTORA, FUNKE, CASE, 2003).

4.2 PATOGENICIDADE

É chamada patogênica quando uma bactéria tem capacidade de causar doença. Os patógenos podem infectar o corpo humano ou de outro hospedeiro quando há portas de entrada. Destacam-se as membranas mucosas, a pele e deposição direta sob a pele e as membranas (TORTORA; FUNKE; CASE; 2005).

Podemos diferenciar os micro-organismos patogênicos de outros da mesma espécie, pois estes apresentam sintomas anormais no corpo hospedeiro, assim definindo o estado da doença. Os fatores de virulência ajudam a bactéria a melhorar sua capacidade de infecção, podendo destacar os mais importantes fatores de virulência como as adesinas, as toxinas e as invasinas (TRABULSI et al., 2005; VIEIRA; 2009).

5. ESPOROS BACTERIANOS

As bactérias que resistentes aos processos térmicos e as ações de alguns componentes químicos são as termo resistentes. Espécies com estruturas chamadas esporos, são capazes de resistir a altas temperaturas (TOURNAS, 1994).

Os esporos se mantêm em estado de dormência, com baixa atividade metabólica. A germinação é definida como o processo pelo qual o esporo (ou ascósporo) é passado de um estágio de dormência para um estado de alta atividade metabólica. Entretanto, o crescimento do micro-organismo na forma de célula vegetativa após a germinação do esporo depende do meio (MIORELLI, 2009).

A esporulação está associada a síntese de Ácido Dipicolínico (DPA). Este ácido confere aos esporos resistência ao calor, à desidratação e ação de desinfetantes, estabilizando as macromoléculas (MIORELLI, 2009; HABERBECK, 2011; ZIMMERMANN, 2012). A figura 5 mostra as etapas de formação de esporos.

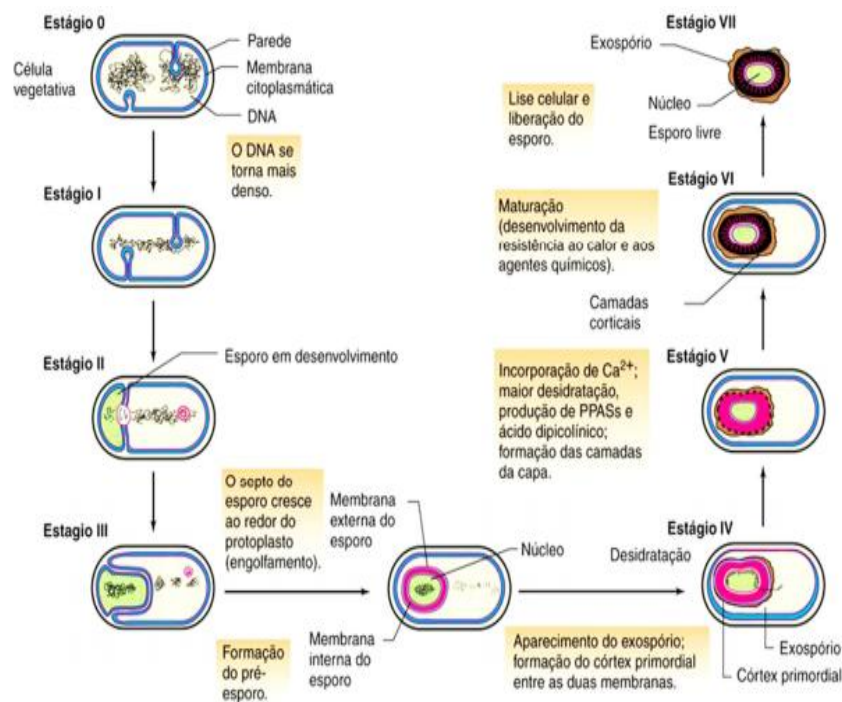


Figura 5: Etapas da formação de esporos (In: MADIGAN, MARTINKO, PARKER 2004).

A estrutura do esporo é formada pelo conteúdo nuclear, algumas proteínas e o cálcio que ao se ligar ao ácido dipicolínico produz o cerne (parte interna inatingida), que é revestido por uma membrana interna, dupla camada de peptídeoglicano (córtex) e uma capa externa de proteína semelhante à queratina. A reativação do esporo ocorre pela ruptura da capa externa (estágio V e VI da figura 5), através de ação mecânica, calor ou outro fator estimulador, em presença de água e nutrientes. O dipicolinato de cálcio é degradado e a célula vegetativa se reconstitui, voltando ao metabolismo normal com a entrada de água e nutrientes (MADIGAN, MARTINKO, PARKER; 2004).

Os esporos bacterianos podem resistir aos agentes químicos usados no procedimento de higienização. Esses esporos, muitas vezes, alteram o produto ou dão origem às doenças alimentares, ocasionando riscos à saúde do consumidor. Os micro-organismos esporulantes estão amplamente disseminados no ar, água, matéria prima, ingredientes, manipuladores e, conseqüentemente, nas superfícies de equipamentos e utensílios de linhas de processamento (CAETANO; MADALENO, 2011).

5.1 ESPOROS TERMÓFILOS E MESÓFILOS AERÓBIOS

Na indústria de processamento, em qualquer ponto onde existam condições apropriadas, servirá como ponto para população de esporos, sendo difíceis de serem destruídos nos alimentos (FERMENTEC, 2006).

Os esporos mesófilos se encontram em temperaturas abaixo de 30°C e os esporos termófilos acima de temperaturas de 40°C. As diferenças entre as membranas de esporos termófilos e de esporos mesófilos consistem, principalmente, na substituição de ácidos graxos insaturados por ácidos graxos saturados, de modo que a membrana adquira um equilíbrio entre densidade e fluidez, necessário para a manutenção de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas (GOMES, 2007).

Na natureza, os organismos termófilos desenvolvem-se em processos de compostagem durante a fase de altas temperaturas (acima de 40°C) (GOMES, 2007). Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos mesófilos e estimula a germinação dos esporos e/ou endósporos das bactérias termófilas, ou seja, esporos mesófilos se encontram em

temperaturas ambientes de 10 a 30°C e esporos termófilos em temperaturas de 40 a 70°C (ANTUNES&OLIVEIRA 1986).

A formação do esporo bacteriano, com o abandono do ciclo de crescimento e divisão celular, é manter a vida microbiana. O esporo é extremamente resistente as agressões de natureza física e química, que são danosas as células vegetativas microbianas, por armazenar em seu interior uma cópia íntegra do cromossomo bacteriano, e torna-se capaz de originar uma nova célula vegetativa quando as condições se tornam favoráveis novamente (REAL & HENRIQUES, 2001; MADIGAN, MARTINKO, PARKER; 2004).

5.2 ESPOROS MESÓFILOS ANAERÓBIOS

Os esporos mesófilos anaeróbios são derivados principalmente do solo, daí sua ampla ocorrência no leite, nos vegetais e em outros alimentos. A temperatura ótima para desenvolvimento dos mesófilos anaeróbios é em torno de 37°C, muitos se desenvolvem-se a 20°C ou menos (GONÇALVES, 1992).

5.3 ESPOROS “FLAT-SOUR”

Os esporos “flat sour” produzidos pelas bactérias *Bacillus coagulans* e *Bacillus stearothermophilus* caracterizam-se pela produção de ácidos a partir de açúcares, sem que haja formação de gases, isto resulta numa queda acentuada no pH do produto (GONÇALVES, 1992).

5.4 ESPOROS TERMÓFILOS ANAERÓBIOS NÃO PRODUTORES DE H₂S

Esporos termófilos anaeróbios são capazes de se desenvolver entre temperaturas de 33 a 70°C, apresentam metabolismo semelhante ao *Bacillus coagulans* com fermentação de açúcares e não produzem gases (GONÇALVES, 1992).

5.5 ESPOROS TERMÓFILOS ANAERÓBIOS PRODUTORES DE H₂S

Nos produtores de gás, a bactéria responsável é *D. nigrificans*, apresenta atividade sobre aminoácidos sulfurados, resultando na formação de H₂S (gás sulfídrico). Os esporos desta bactéria são menos termorresistentes quando comparados a outros esporos, sendo mais facilmente destruídos (GONÇALVES, 1992).

6. FERMENTAÇÃO

A “fermentação” pode apresentar vários significados dependendo do setor que a utiliza. De modo geral, fermentação significa qualquer processo de cultivo microbiológico que ocorre com ou sem presença de oxigênio. Bioquimicamente, é o processo metabólico onde o substrato orgânico atua como doador e como receptor final de elétrons, ocorrendo em condições anaeróbias, mas sem a utilização de uma cadeia respiratória, como acontece na respiração anaeróbia (TORTORA FUNKE & CASE, 2006).

6.1 TIPOS DE FERMENTAÇÃO

O iogurte é produzido pela famosa fermentação láctica, na qual as bactérias, denominadas de lactobacilos, produzem ácido láctico. O pão e cerveja são produzidos pela fermentação alcoólica, onde a fermentação é realizada por fungos (anaeróbicos facultativos), que produzem no final álcool. O vinagre é produzido pela fermentação acética, que consiste numa reação química, onde ocorre à oxidação parcial do álcool etílico, obtendo o ácido acético, as bactérias que realizam esse processo são as acetobactérias. Os tipos de fermentação são mostrados na tabela 1 (WARD, 1991).

Tipo de Fermentação	Produto Final	Exemplos
Alcoólica	Álcool etílico (etanol)	Leveduras: fabricação de vinho, pão e cerveja.
Láctica	Ácido Láctico	Bactérias: fabricação do iogurte.
Acética	Ácido acético	Bactérias: fabricação do vinagre (a partir do vinho)
Bútrica	Ácido butírico	Bactérias: Alteram a manteiga

Tabela 1: Tipos de fermentação e alimentos produzidos.

7. LEVEDURA

Pertencem ao reino dos fungos, são organismos eucarióticos, unicelulares, não filamentosos e de forma oval que assim como as bactérias, a identificação de leveduras pode ser feita por testes de crescimento (TORTORA, 2006).

São mesófilos, com temperatura ótima de crescimento em aproximadamente 25 a 35°C, e com pH ótimo por volta de 4 a 5. A manutenção dessas condições evita a contaminação do cultivo por outros micro-organismos (LIMA et al., 2001).

Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas em vários processos, como a produção de fermento de pão, extrato de levedura, cerveja, aditivos alimentícios (vitaminas, proteínas, enzimas), proteínas heterólogas e produtos de interesse farmacêutico através da manipulação de novas vias metabólicas e do aumento da produção com a engenharia genética, uma vez que o genoma de leveduras já foi inteiramente sequenciado (BADOTTI et al., 2008).

Nas bebidas alcoólicas produzidas pelo processo de fermentação, como é o caso da cerveja, do rum e uísque, a levedura converte o açúcar em álcool e também pode contribuir na formação de constituintes secundários responsáveis pelo sabor (WARD, 1991).

7.1 REPRODUÇÃO DA LEVEDURA

Existem duas formas de reprodução das leveduras, sexuada e assexuada. A forma mais comum de reprodução da levedura alcoólica é a assexuada, realizada por gemulação ou brotamento. Esse tipo de reprodução ocorre com o surgimento de uma protuberância na parede da célula-mãe que aumenta de tamanho com o decorrer do tempo, até atingir o tamanho semelhante à célula original. Em seguida, a parede de ambas as células (mãe e filha) se fecham, formando uma dupla camada, completando assim, o brotamento. Neste caso, surgirá uma cicatriz permanente na célula mãe e neste local não haverá mais brotamento (STECKELBERG, 2011).

Para que a variabilidade genética ocorra, a levedura utiliza a reprodução sexuada. A produção deste tipo de esporo se faz por meio de meiose (processo redutor e formador de gametas), ou seja, há a formação de indivíduos com metade da informação gênica (n – haploide) que, futuramente, irão se fundir novamente, formando um novo indivíduo com a carga gênica completa ($2n$ – diploide) (STECKELBERG, 2011).

A capacidade de sobreviver em condições anaeróbias dos micro-organismos tem seu preço. A geração de energia por via anaeróbia é 19 vezes menos eficiente na formação de moléculas de ATP quando comparada à via metabólica aeróbica, pois, nas fermentações para obtenção de etanol, a levedura gera apenas 2 ATP por molécula de glicose enquanto que, na presença de oxigênio, o saldo final de ATP é de 38 por molécula de glicose (BASSO, 2007).

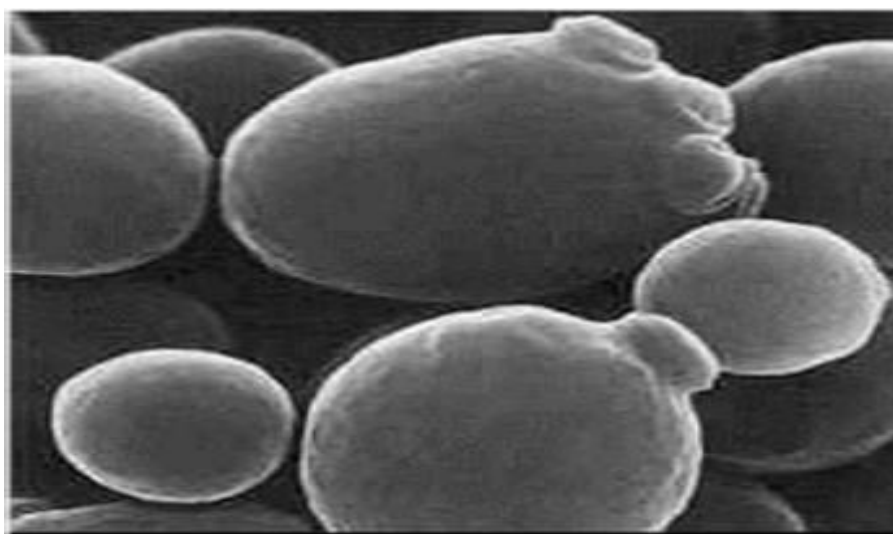


Figura 6: Levedura *Saccharomyces* em fase de Brotamento
(In: <http://florabrasilienses.blogspot.com.br/2009/05/o-reino-fungi.html>).

8. PROCESSO DE CULTURA DE LEVEDURA

O processo industrial analisado foi um processo de fermentação, que tem o objetivo de produção de biomassa, ou seja, multiplicação da levedura. Este processo é iniciado em um tanque de mel (melaço industrial de açúcar invertido) que juntamente com água é produzida uma solução chamada mosto, líquido açucarado que alimentará a levedura e resultará em sua multiplicação (INSTRUÇÃO DE TRABALHO 168, 2016).

Em seguida, este mosto é submetido a um processo de esterilização, variando a temperatura entre 120°C e 130°C para eliminar todo e qualquer tipo de micro-organismo na solução, evitando a contaminação da fermentação. O mosto esterilizado é armazenado em um tanque e será destinado à alimentação da levedura (INSTRUÇÃO DE TRABALHO 168, 2016).

Posteriormente em um tanque chamado pré-fermentador, dá-se início a inoculação da levedura, que após 18 ou 20 horas, uma concentração maior de células vivas desenvolvidas nesse período é enviada a um tanque maior onde é realizado o processo de fermentação (fermentador). Esta fermentação é realizada aerobiamente para facilitar e ajudar na sua multiplicação (INSTRUÇÃO DE TRABALHO 168, 2016).

Depois de cessada a multiplicação (em torno de 50 h), esta levedura é passada por um processo de centrifugação, onde é lavada até chegar a uma cor específica da produção e assim ser concentrada a uma população maior de levedura. A levedura concentrada é conhecida industrialmente como “creme de levedura” que após sua obtenção é armazenado em tanques refrigerados para manter suas características de cor e sabor e ainda inibir a contaminação microbiológica (INSTRUÇÃO DE TRABALHO 168, 2016).

A figura 7, mostra o fluxograma do processo, baseado na produção industrial da empresa Zilor – Energia e Alimentos.

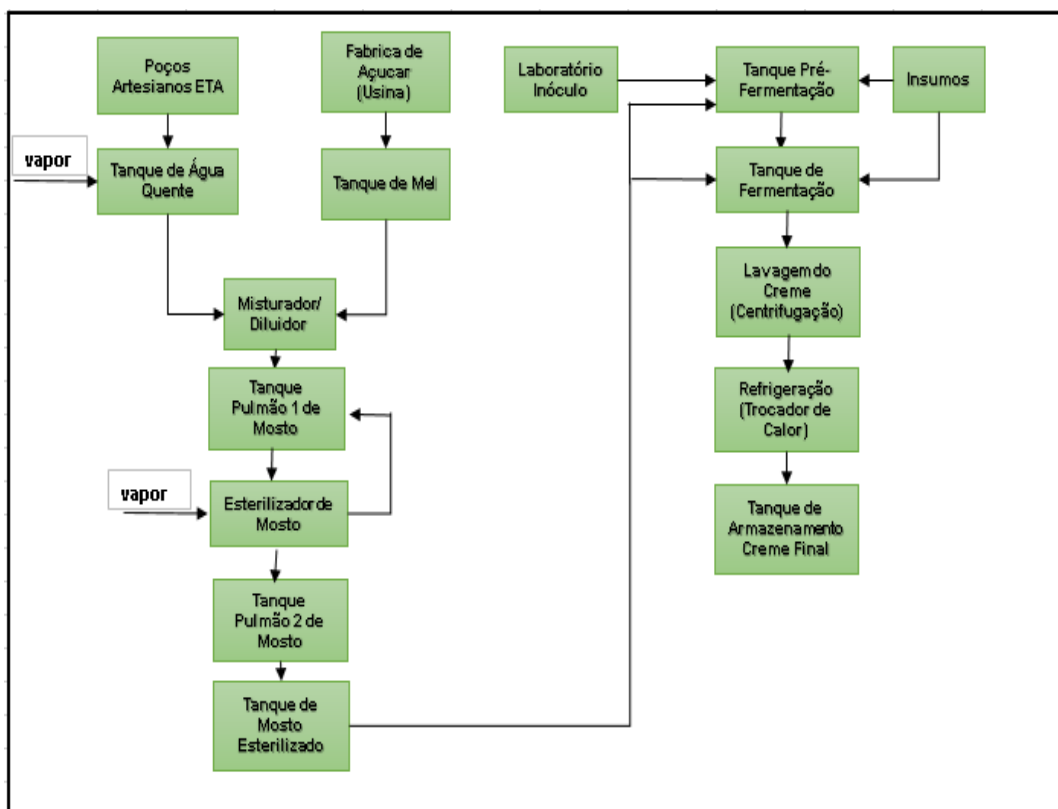


Figura 7: Fluxograma do processo de Reprodução de levedura.

8.1 INFLUÊNCIA DO CALOR

A liberação de calor é uma propriedade geral do crescimento de micro-organismos independentemente da natureza da fonte de carbono, ou se o processo é aeróbico ou anaeróbico (LUONG et al., 1983).

Nos processos de fermentação é necessário controle que, geralmente abrange medidas de quantidades físicas e químicas. Os indicadores da população de micro-organismos e outros parâmetros ligados ao crescimento de células são indispensáveis para o controle de processo de fermentação (VOLPE & SILVA FILHO, 1995).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura mesofílica (20 – 40°C) utilizada em muitos processos industriais, fabricação de bebidas alcólicas, biomassa (panificação e alimentos). A temperatura influencia física e quimicamente no processo de reprodução da levedura exercendo um efeito em todos os aspectos de crescimento, metabolismos, viabilidade e fermentação (TORIJA et al., 2003).

9. FABRICAÇÃO DE PÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

No ensino médio a disciplina de química tem dado relevância à abordagem de conceitos químicos isolados dos demais saberes das outras ciências da natureza, humanas e outros. As dificuldades de aprendizagem dos conteúdos e, conseqüente rejeição da química pelos alunos, é devido a isolamentos de conceitos, dificultando assim o processo de ensino-aprendizagem. Várias discussões sobre o aprendizado interdisciplinar é tema de congressos de educação, documentos oficiais etc. um ensino de química interdisciplinar promove uma aprendizagem ativa e significativa (SÁ & SILVA, 2008)

Percebe-se que muitas vezes no ensino da química, o aluno não consegue aprender, não associam o item estudado com seu cotidiano e se desinteressam pelo tema (NUNES E ADORNI, 2010).

Para relacionar conteúdo com realidade o professor nem sempre está preparado, o único recurso utilizado na sala de aula na maioria das vezes são os livros didáticos e o professor deve evitar utilizar apenas este recurso em sala (LOBATO, 2007).

É importante o ensino da química no cotidiano para que o aluno faça essa relação do cotidiano com a disciplina. Relacionar as demais ciências, seu caráter interdisciplinar, que deve existir e precisa fazer parte do ensino da Química. O quanto apresenta caráter experimental, sendo necessário para interpretação da mesma utilização e aplicação do método científico, que a química em suas diversas áreas de atuação apresenta caráter puro e aplicado. Precisa-se ter aulas teóricas e práticas, para que os alunos possam compreendê-la, e formar uma opinião acerca da Ciência Química na sociedade (NUNES e ADORNI, 2010).

Existe a necessidade de falar em educação química, para que estes alunos possam perceber a importância da química, numa sociedade avançada no sentido tecnológico (TREVISAN E MARTINS, 2006).

O preparo do pão envolve reações e modificações visuais no produto que podem ser utilizadas como ferramenta didática pelos professores na alfabetização científica dos alunos, revelando que a química está verdadeiramente inserida em seu cotidiano, inclusive nos alimentos (FOGAÇA, 2016).

Na produção de pães, os principais ingredientes são os grupos essenciais (farinha de trigo, fermento biológico, água e sal) e os não essenciais (açúcar, gordura, leite e outros) (CANELLA-RAWLS, 2005).

A função principal do fermento biológico é iniciar a fermentação dos açúcares na mistura, liberando gás carbônico (CO_2), responsável pela formação dos poros internos e pelo crescimento da massa (FOGAÇA, 2016).

Os conceitos de química que podem ser abordados com essa prática são:

- Reação da fermentação
- Liberação de gases
- Produção de álcool
- Diferença entre fermento químico e fermento biológico

9.1 MATERIAIS

- Farinha de trigo
- Açúcar
- Água
- Fermento Biológico
- Fermento Químico
- Béquer ou copo
- Colher
- Filme plástico (PVC)

9.2 METODOLOGIA

Preparar três massas de pães e colocá-las em recipientes separados e cobertos com filme plástico (PVC), de acordo com o esquema descrito:

1- 1 colher (de café) de açúcar + 1 colher (de café) de fermento químico + 13 colheres (de sopa) de farinha + 1/4 de copo de água;

2- 1 colher (de café) de açúcar + 13 colheres (de sopa) de farinha + 1/4 de copo de água;

3- 1 colher (de café) de açúcar + ¼ de tablete de fermento biológico dissolvido separadamente em ¼ de copo de água morna + 13 colheres (de sopa) de farinha.

Após 30 minutos, os alunos observarão que somente a massa do recipiente 3 cresceu, isso porque ela foi a única que continha fermento biológico.

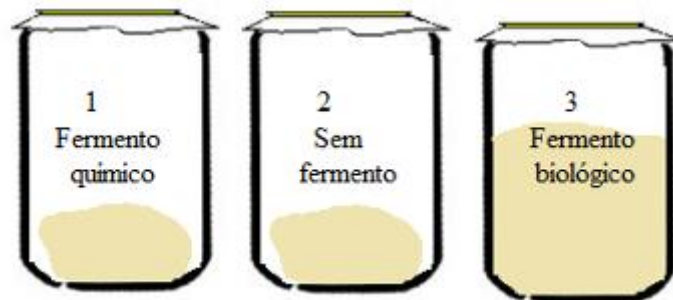


Figura 8: Demonstração do experimento sobre fermentação (In: FOGAÇA, 2016).

10. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais serão realizados nos laboratórios de análises químicas e microbiológicas da empresa Zilor – Energia e Alimentos, situada na cidade de Quatá/SP, tendo em vista a coleta de amostras e monitoramento do processo de reprodução de leveduras.

10.1 MATERIAIS

10.1.1 Equipamentos

- Termômetro
- PHmetro – (marca METTLER TOLEDO) (modelo MP220)
- Capela para plaqueamento de fluxo laminar – (marca VECO) (modelo FUH-12)
- Estufa – (marca MARCONI) (modelo MA032/3)
- Microscópio – (marca NIKON) (modelo ECLIPSE E200)
- Contador Quebec – (marca PHOENIX) (modelo CP-600)
- Alça Drigalski

10.2 MEIOS DE CULTIVO

- MYP - Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar;
- MYP Agar *Bacillus cereus* - 20 ml PL90X15;
- Cycloheximide 1% (Actidiona 1%),
- Ágar sangue de carneiro – Placa Pronta – códigos: 711 (Newprov) ou 540159 (Laborclin);
- Cycloheximide (Actidiona);

- ISA - Iron Sulfite Agar;
- TSC - Triptose Sulfito Agar Base;
- Meio de Cultivo Caldo de Fígado;
- Ágar Selo 2%;
- AN - Ágar Nutriente;
- BHI – Brain Heart Infusion Agar;

10.3 EQUIPAMENTOS ANALISADOS

Foram analisados a superfícies dos tanques através de swabs, nos tanques de pré-fermentação e fermentação localizados no setor de produção de Cultura Pura da empresa Zillor, localizada na cidade de Quatá/SP.

- Tanque de Pré-Fermentação
- Tanque de Fermentação

10.4 REAGENTES

- Tampão Fosfato pH 7,2
- Água Salina Peptonada;

10.5 CREME DE LEVEDURA

O creme de levedura analisado foi coletado após o processo de pré-fermentação (entrada do fermentador), no qual obteve um aumento na população e concentração de levedura para dar início ao processo de fermentação. Também foi analisado o creme após o processo de fermentação, coletado na saída do fermentador (produção de biomassa).

10.6 MÉTODOS

Foi realizada coleta com swab na superfície dos equipamentos antes e após a realização do processo de higienização CIP. Sendo realizadas análises microbiológicas de *Bacillus Cereus*, *Clostridium* Sulfito Redutor e Esporos, buscando quantificar a presença de microorganismos indesejados no procedimento e assim identificar a eficiência da limpeza e higienização dos equipamentos no processo produtivo.

As análises foram repetidas em coletas de três lotes sequenciais para obtenção de resultados mais precisos.

Para o creme de levedura foi realizada as análises físico-químicas (pH, temperatura e tempo de armazenamento do creme) e também as análises microbiológicas de *Bacillus Cereus*, *Clostridio* Sulfito Redutor e Esporos.

Todas as análises foram realizadas antes e após adição de nutrientes e insumos.

10.6.1 Amostragem

Para amostragem do creme de levedura, foi utilizada a metodologia de SILVA et al., (2010), onde descreve que devemos limpar o local com detergente neutro diluído 1:4; e esfregar com escovinha, desinfetar o ponto de retirada da amostra (torneira, válvula) com álcool etílico 70%, abriu-se a válvula de coleta, purgou-se a linha, e manteve um fluxo mínimo de líquido em escoamento por aproximadamente 30 segundos, abriu rapidamente a embalagem/frasco estéril de amostragem não deixar que a tampa tocar qualquer superfície, não tocou-se no bocal do frasco. Amostrou-se rapidamente o volume ideal de amostra, fechou a embalagem/frasco após a amostragem e fechou-se imediatamente a válvula do ponto de coleta. Lavou-se novamente o ponto de coleta com detergente neutro diluído, e desinfetou-se com álcool 70%. Para amostragem das superfícies, preparou-se tubos e frascos contendo 25 ml do diluente adequado (água peptonada 0,1% ou água peptonada tamponada modificada). Abriu-se a embalagem contendo a esponja estéril e adicionou uma quantidade de diluente suficiente para molhar a esponja, sem excesso de fluído visível. Segurou-se a embalagem pelo lado de fora, massageou-se a esponja para umedecer uniformemente. Lavou-se bem as mãos, colocou-se luvas estéreis, retirou-se a

esponja da embalagem e aplicou a esponja. Após a aplicação, colocou-se a esponja de volta na embalagem e adicionou o restante do diluente, completando os 25 ml. A figura 9 mostra como aplicar o swab ou esponja.



Figura 9: Demonstração de coleta por swab ou esponja (In: Acervo Pessoal).

10.7 ANÁLISE DO CREME DE LEVEDURA

10.7.1 pH

Transferiu-se a amostra para um béquer de 100mL e, ajustou-se a sua temperatura para a mesma temperatura que foram ajustados os padrões, lavou-se o eletrodo 2 a 3 vezes com água deionizada e enxugou-se levemente com papel macio e absorvente. Mergulhou o eletrodo limpo na amostra e procedeu com a leitura diretamente no pHmetro. Anotou-se a leitura (L) e a temperatura (T). O pH estava de acordo com os valores estipulados em variáveis de processo que determinam uma valor de 4,0 a 6,0%.

10.7.2 Temperatura

Durante o processo de pré-fermentação e reprodução de levedura a temperatura nos tanques de processo deve-se manter de 30 a 34°C de acordo com valores estipulados em variáveis de processo. Esta temperatura é atingida através da troca de calor entre o creme de levedura e água potável através de trocadores de calor em placas. A temperatura foi medida através de transmissores de temperatura (PT-100), que se encontram instalados nos tanques, trabalham de acordo com o valor inserido no set point e enviam sinal ao supervisor de hora em hora.

10.7.3 Armazenamento do creme

O creme armazenado em processo atendeu as especificações definidas em variáveis de processo para conformidade da produção industrial, durante o processo de pré-fermentação. O tempo estipulado para atingir a concentração ideal de levedura é até no máximo 24h no processo de pré-fermentação, no processo de reprodução de biomassa o tempo é de no máximo 55h. Este tempo foi medido através da receita inserida no processo de reprodução que não excedeu o limite máximo nem mínimo, enviando o tempo para supervisor de hora em hora.

10.7.4 Contagem de *Bacillus cereus*

Em 4 placas contendo meio de cultura seletivo MYP previamente preparadas e secas, inoculou-se 0,3 mL (300µl) em 3 placas e 0,1 mL (100µl) em 1 placa, (corresponde a 1mL total da amostra). Espalhou-se o inóculo com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após a inoculação, incubou-se as placas de forma “invertida” 30°C±1°C por 18–24h e realizou as contagens das colônias características. Se caso as colônias ainda não estiverem visíveis, incubar por mais 24h. Contou-se as colônias presuntivas de *B. cereus* presente nas 4 placas, as colônias presuntivas são esféricas, rosas, leitosas indicando que não ocorreu a fermentação de manitol são geralmente rodeadas por um grande halo de precipitação, indicando a produção de lecitinase (ISO, 2016).

10.7.5 Contagem de *Clostridium* Sulfito Redutor

Inoculou-se em duplicata 1,0 mL da amostra em placas de Petri estéril adicionando em cada placa aproximadamente 15 mL de meio de cultura Iron Sulfite Agar (ISA) desaerado e resfriado em banho Maria a uma temperatura média de 44-47°C.

Homogeneizou-se suavemente com movimentos circulares em forma de oito e deixou até completa solidificação do meio. O tempo que decorre entre a inoculação da amostra na placa de Petri e o momento que é vertido o meio, não excedeu de 15 minutos. Cobriu-se com uma camada de aproximadamente 10 mL do mesmo meio para formar a sobrecamada necessária para esse método. Após a solidificação do meio, incubou-se as placas sem inverter em Jarra de Anaerobiose a uma temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas. Leu-se os resultados em ambos os tempos: 24 horas e 48 horas de incubação, o que irá definir será a coloração negra das colônias e seu crescimento típico. Contou-se todas as colônias negras com probabilidade de crescimento de uma zona opaca ao redor da colônia (ISO, 2003).

10.7.6 Esporos Mesófilos Aeróbios

Em tubo estéril, adicionou-se 10 mL da amostra e realizou-se o choque térmico em banho de água quente a 80°C por 30 minutos, garantindo que a água cubra o volume da amostra. Resfriou-se em banho de gelo até aproximadamente 45°C . Após o resfriamento distribuiu o conteúdo de cada tubo estéril em quatro placas de Petri estéreis em meio de cultura PCA, homogeneizou-se suavemente com movimentos circulares em forma de oito e deixou-se até a completa solidificação do meio. Após a solidificação do meio de cultivo inoculado, incubou-se as placas invertidas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação, com o auxílio do contador de Quebec contou-se os esporos desenvolvidos nas placas com 25 a 250 colônias, multiplicou-se por 1 os esporos desenvolvidos nas placas (STEVENSON & SEGNER, 2001).

10.7.7 Esporos Mesófilos Anaeróbios

Em tubo estéril, adicionou-se 10 mL da amostra e realizou-se o choque térmico em banho de água quente a 80°C por 30 minutos, garantindo que a água cubra o volume da amostra. Resfriou-se em banho de gelo até aproximadamente 45°C . Após o resfriamento distribuiu o conteúdo de cada tubo estéril em quatro placas de Petri estéreis em meio de cultura BHI, homogeneizou-se suavemente com movimentos circulares em forma de oito

e deixou-se até a completa solidificação do meio. Após a solidificação do meio de cultivo inoculado, incubou-se as placas petri em jarras de anaerobiose em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação, com o auxílio do contador de Quebec contou-se os esporos desenvolvidos nas placas com 25 a 250 colônias, multiplicou-se por 1 os esporos desenvolvidos nas placas (SCOTT; ANDERSON, WANG, 2001).

10.7.8 Esporos Termófilos Aeróbios

Em tubo estéril, adicionou-se 10 mL da amostra e realizou-se o choque térmico em banho de água quente a 80°C por 30 minutos, garantindo que a água cubra o volume da amostra. Resfriou-se em banho de gelo até aproximadamente 45°C . Após o resfriamento distribuiu o conteúdo de cada tubo estéril em quatro placas de Petri estéreis em meio de cultura PCA, homogeneizou-se suavemente com movimentos circulares em forma de oito e deixou-se até a completa solidificação do meio. Após a solidificação do meio de cultivo inoculado, incubou-se as placas invertidas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação, com o auxílio do contador de Quebec contou-se os esporos desenvolvidos nas placas com 25 a 250 colônias, multiplicou-se por 1 os esporos desenvolvidos nas placas (OLSON & SORRELLS, 2001).

10.7.9 Esporos Termófilos Anaeróbios

Em tubo estéril, adicionou-se 10 mL da amostra e realizou-se o choque térmico em banho de água quente a 80°C por 30 minutos, garantindo que a água cubra o volume da amostra. Resfriou-se em banho de gelo até aproximadamente 45°C . Após o resfriamento distribuiu o conteúdo de cada tubo estéril em quatro placas de Petri estéreis em meio de cultura BHI, homogeneizou-se suavemente com movimentos circulares em forma de oito e deixou-se até a completa solidificação do meio. Após a solidificação do meio de cultivo inoculado, incubou-se as placas petri em jarras de anaerobiose em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação, com o auxílio do contador de Quebec contou-se os esporos desenvolvidos nas placas com 25 a 250 colônias, multiplicou-se por 1 os esporos desenvolvidos nas placas (SCOTT; ANDERSON, WANG, 2001).

11. RESULTADOS E DISCUSSÕES

11.1 ANÁLISE DAS SUPERFÍCIES DOS TANQUES

Na tabela 2 observam-se os resultados obtidos das três análises realizadas nas superfícies dos tanques através de swab. Os resultados para as análises antes do CIP (Clean in Place) na superfície dos tanques apresentam presença de micro-organismos, mas dentro das especificações de conformidade. Consideram-se valores dentro da conformidade, ≤ 10 ufc/mL para células vegetativas e $\leq 250/10$ mL para esporos bacterianos. Os resultados obtidos após o CIP, mostra que o sistema é eficiente, evidenciando resultados zero (ausente) para todos os micro-organismos propostos nas análises.

1ª coleta	Célula Vegetativa (UFC/mL)		Esporos (un.) nº esporos/10mL			
Superfície interna dos tanques	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium S. Redutor</i>	Mesófilos aeróbios (30-35°C)	Mesófilos anaeróbios (30-35°C)	Termófilos aeróbios (40-45°C)	Termófilos anaeróbios (40-45°C)
Antes do CIP no tanque Pré-fermentação	3	1	150	200	50	100
Após CIP no tanque Pré-fermentação	0	0	0	0	0	0
Antes do CIP no tanque de fermentação	0	3	170	220	70	120
Após CIP no tanque de fermentação	0	0	0	0	0	0
2ª coleta	Célula Vegetativa (UFC/mL)		Esporos (un.) nº esporos/10mL			
Superfície interna dos tanques	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium S. Redutor</i>	Mesófilos aeróbios (30-35°C)	Mesófilos anaeróbios (30-35°C)	Termófilos aeróbios (40-45°C)	Termófilos anaeróbios (40-45°C)
Antes do CIP no tanque Pré-fermentação	0	5	100	200	50	90
Após CIP no tanque Pré-fermentação	0	0	0	0	0	0
Antes do CIP no tanque de fermentação	2	5	120	250	60	120
Após CIP no tanque de fermentação	0	0	0	0	0	0
3ª coleta	Célula Vegetativa (UFC/mL)		Esporos (un.) nº esporos/10mL			
Superfície interna dos tanques	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium S. Redutor</i>	Mesófilos aeróbios (30-35°C)	Mesófilos anaeróbios (30-35°C)	Termófilos aeróbios (40-45°C)	Termófilos anaeróbios (40-45°C)
Antes do CIP no tanque Pré-fermentação	2	2	110	190	70	110
Após CIP no tanque Pré-fermentação	0	0	0	0	0	0
Antes do CIP no tanque de fermentação	2	3	150	190	60	130
Após CIP no tanque de fermentação	0	0	0	0	0	0

Tabela 2: Resultados das análises das superfícies dos tanques de produção

A higienização interna pelo processo CIP funciona de modo satisfatório, o tanque não apresentou quantidades significativas de micro-organismos após os procedimentos de limpeza e sanitização, indicando a efetividade dos processos.

Bremer, Fillery e Mcquillan (2006), após realizarem um estudo com tubos de aço inox expostos em leite por 18h contendo diversas espécies bacterianas, realizaram o CIP, utilizando um detergente alcalino (NaOH) e um detergente ácido (HNO₃), observando uma redução significativa no número de células, comprovando a efetividade do sistema com esses produtos.

Portanto, os dados apresentados acima nos sugerem que a contaminação por células vegetativas e posteriormente por esporos não está relacionada com o processo de higienização, muito menos com a superfície dos equipamentos, eliminando a possibilidade da ineficiência do sistema CIP com fatores que possivelmente propiciariam o desenvolvimento de esporos bacterianos.

11.2 ANÁLISE DO CREME DE LEVEDURA

Observa-se na tabela 3 os resultados das coletas do creme, que em todas as amostras, tanto na fase de pré-fermentação como na fase de produção de biomassa, que estavam dentro dos parâmetros de temperatura, pH e tempo de armazenamento necessários para a reprodução das leveduras.

1ª coleta	Físico-Químico			Célula Vegetativa (ufc/mL)		Esporos (un.) nº esporos/10mL			
Creme de levedura	Tempo (h)	Temp. (°C)	pH	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium S. Redutor</i>	Mesófilos aeróbios (30-35°C)	Mesófilos anaeróbios (30-35°C)	Termófilos aeróbios (40-45°C)	Termófilos anaeróbios (40-45°C)
Creme pré-fermentação	18 horas	30 °C	5,4	0	0	50	70	30	30
Creme após produção de biomassa	52 horas	32 °C	5,25	0	0	60	90	40	50
2ª coleta	Físico-Químico			Célula Vegetativa (ufc/mL)		Esporos (un.) nº esporos/10mL			
Creme de levedura	Tempo (h)	Temp. (°C)	pH	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium S. Redutor</i>	Mesófilos aeróbios (30-35°C)	Mesófilos anaeróbios (30-35°C)	Termófilos aeróbios (40-45°C)	Termófilos anaeróbios (40-45°C)
Creme pré-fermentação	22 horas	32 °C	5,12	0	0	70	75	50	35
Creme após produção de biomassa	55 horas	33,5 °C	5,57	0	0	90	90	60	50
3ª coleta	Físico-Químico			Célula Vegetativa (ufc/mL)		Esporos (un.) nº esporos/10mL			
Creme de levedura	Tempo (h)	Temp. (°C)	pH	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium S. Redutor</i>	Mesófilos aeróbios (30-35°C)	Mesófilos anaeróbios (30-35°C)	Termófilos aeróbios (40-45°C)	Termófilos anaeróbios (40-45°C)
Creme pré-fermentação	22 horas	30,5 °C	4,9	0	0	50	55	45	55
Creme após produção de biomassa	50 horas	32,5°C	5,1	0	0	65	100	60	60

Tabela 3: Resultados das análises do creme de levedura em processo

Nesta fase do processo não houve presença de micro-organismos na forma vegetativa, sendo considerado zero como “ausente”, evidenciando a limpeza eficiente nos equipamentos. As figuras abaixo (gráfico 1 e 2) apresentam a distribuição dos dados em UFC x Análises.

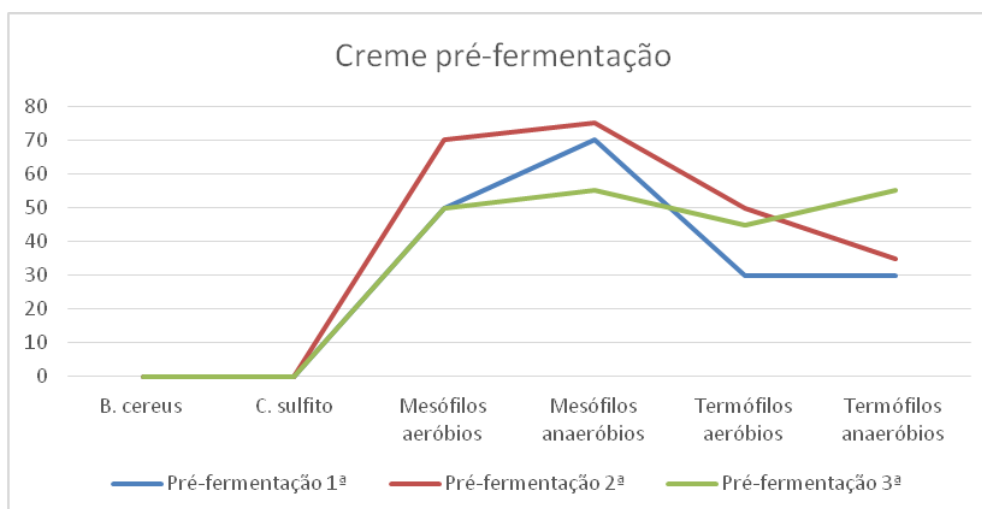


Gráfico 1: Resultados das análises antes do processo de fermentação.

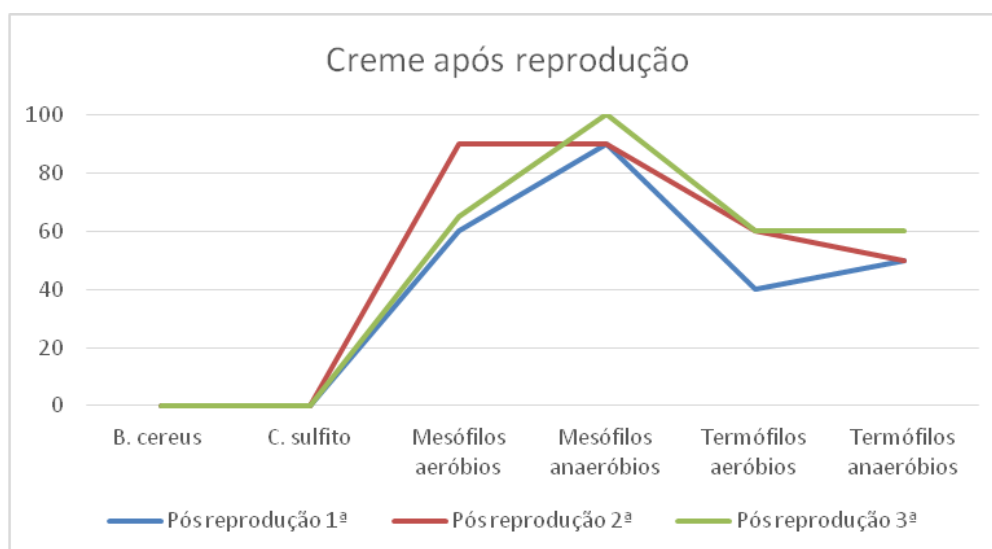


Gráfico 2: Resultados das análises após o processo de fermentação.

Nota-se há presença de esporos bacterianos no creme de levedura em ambas as fases, havendo um crescimento significativo da fase de pré-fermentação para fase de produção de biomassa, principalmente dos mesófilos devido a temperatura do processo, porém os resultados obtidos na fase de pré-fermentação e produção de biomassa estão dentro da conformidade do processo. Entende-se por conformidade do processo quando os valores para células vegetativas estiverem com valores ≤ 10 ufc/mL e os esporos com valores $\leq 250/10$ mL.

Os resultados indicativos da presença de esporos no creme de pré-fermentação nos sugerem que a contaminação deste pode estar relacionada com outros fatores do processo, como insumos contaminados que são adicionados nesta fase do processamento, higienização precária dos filtros de ar, ou das tubulações que enviam oxigênio, excluindo a possibilidade de má higienização do equipamento ou de instabilidade de temperatura e pH, pois os mesmos foram controlados durante estas etapas.

Portanto indica-se ao processamento uma análise prévia dos insumos antes de adicioná-los e das outras variáveis do processo para poder evidenciar por completo os verdadeiros fatores que propiciam a esporulação das bactérias na produção de biomassa.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos, observou-se que a presença de células vegetativas e células esporuladas após o processo CIP foram dadas como ausentes, comprovando a eficiência do processo de higienização e excluindo a possibilidade desta de ser um fator relevante na formação dos esporos. Porém a contagem de células esporuladas no creme de levedura na fase pré-fermentação e no creme após produção de biomassa se deu presente, podendo assim, estar associados à contaminação de insumos adicionados no processo ou outros fatores que não estão associados ao sistema de higienização do fermentador, no entanto, os valores encontrados não são significativos, sendo considerados conformes aos padrões industriais. Entende-se por conformidade do processo quando os valores para células vegetativas estiverem com valores ≤ 10 ufc/mL e os esporos com valores $\leq 250/10\text{mL}$, segundo RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001 da ANVISA.

13. REFERÊNCIAS

ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 2008. 412p.

ANTUNES, L.A.F. & OLIVEIRA, J.S. Qualidade microbiológica do leite cru. *Revista do Instituto Cândido Tostes*, v.41, p.20-24, 1986.

ATHAYDE, A. Higienização em indústria de laticínios colabora no controle total da qualidade. *Engenharia de alimentos*, São Paulo, v. 4, n. 184, p. 24 – 29, 1998.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES-JR, S. L.; CORDIOLI, M. L. A.; MILETTI, L. C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. **Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbial Cell Factories* 2008, 7:4.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 1., PROJETO PROGRAMA DE PESQUISA EM POLÍTICAS PÚBLICA, 2007. **Anais...** São Paulo: ESALQ/USP.

BENTO, R. A. ORANGE, L. G. ; BARBOSA, L. S. ; ARAÚJO, N. L. M. ; SILVA, S. M. M. ; OLIVEIRA, G. D. ; MACENA, T. M. C. ; CUNHA, M. C. S. A. L. ; ANDRADE, S. P. ; LIMA, C. R. ; DOURADO, K. F. ; Implantação dos programas governamentais de gestão de qualidade no processamento de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.22, n. 164, p. 46 – 50, set. 2008.

BERNARDES, P.C. ARAUJO, E.A. PIRES, A.C.S. JUNIOR, J.F.Q.F. LELIS, C.A. ANDRADE, N.J. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. V 43, n. 4, p. 1261 – 1268, Oct/Dec 2012.

BOTELHO, R. B. A. Culinária regional: **O Nordeste e a Cultura alimentar. 2006. 192 f.** Tese de doutorado- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2006 Disponível em: < <http://repositorio.bce.unb.br>>. Acesso em: 08 mar.2011.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; McQUILLAN, A.J Laboratory scale Clean-In-Palce (CIP) studies on he effectiveness of diferente caustic and acid wash steps on the removal os dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n.3, p. 254-262, Feb. 2006.

CABEEN, Matthew t.; JACOBS-WAGNER, Cristine; BacterialCellShape; **NatureReview/Microbiology**; Vol. 3; pgs 601 – 610; August; 2005.

CABRINI, K. T., GALLO, C. R. **Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo**, Brasil. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 46, n. 1, p. 207-216, out. 1998.

CAETANO, A.C.G; MADALENO. L.L. Controle de Contaminantes Bacterianos na Fermentação Alcoólica com a Aplicação de biocidas naturais. Ciencia e Tecnologia, 2011.

CANELLA-RAWLS. S. **Pão: arte e ciência**. São Paulo: SENAC. 2005. 320 P.

CARDOSO, T. COSTA, M. ALMEIDA, H.C. GUIMARÃES, M. Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. **ACTA Médica Portuguesa**, Lisboa, v.17, p.54–58, 2004.

CAUVAINS. S. **Tecnologia da panificação**. 2 ed. Barueri. SP: Manole. 2009. 418 p.

CREDÍDIO, E. Leite: **O elixir da vida**. Itu: OTTONI, 2012, 27 p.

DUTRA, C. C.; ALLES, M.J.L.; MARIOT, R.F. **Manual do design higiênico para máquinas, equipamentos e instalações da indústria de alimentos e bebidas**. Porto Alegre: SENAI. 2008.

FERMENTEC, **Roteiro para treinamento de controle microbiológico do açúcar**, Piracicaba, 2006. 40p.

FERREIRA, R.M. SPINI, J.C.M. CARRAZZA, L.G. SANT'ANA D.S. OLIVEIRA, M.T. ALVES, L.R. CARRAZZA, T.G. **Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijo Minas Frescal artesanal**. PUBVET, Londrina, V. 5, N. 5, Ed. 152, Art. 1021, 2011.

FOGAÇA, J. **A Química do Pão**. Disponível em: <http://educador.brasilecola.uol.com.br/estrategias-ensino/quimica-pao.html>. Acesso em: 20 Jul. 2016

GALLO, E. LUCHESI, G. FILHO, N.M. RIBEIRO, P.T. **Reforma sanitária: uma análise de viabilidade**. Cadernos de Saúde Pública, v. 4, nº. 4, 1988.

GANZLE, M. G.; VERMEULEN. N.; VOGEL. R. F. Carbohydrate. Peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**. London. V. 24. P. 128-138, 2007.

GERMANO, P. M. L; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de Bacillus subtilis em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

GONÇALVES, José Ricardo. Princípios de esterilização de alimentos. In: ITAL/Rede de Núcleos de Informação Tecnológica, Campinas, 1992.

HABERBECK, L. U. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de Bacillus coagulans por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2011.

HERNÁNDEZ, J. C. **Patrimônio e globalização: o caso das culturas alimentares**. In: CANESQUI, A. M.; GARCIA, R. W. D. Antropologia e nutrição: um diálogo possível. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005. 306p.

International Standard ISO 7932:2016 – Microbiology of Food and feeding stuffs – Horizontal methods for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30°C.

International Standard ISO15213:2003 – Microbiology of Food and feeding stuffs – Horizontal methods for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic condition.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 3 – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

LOBATO, A., C., **A abordagem do efeito estufa nos livros de química: uma análise crítica**. Monografia de especialização. Belo Horizonte, 2007, CECIERJ. Luong, J. H. T.; Yerushalmi, L. e Volesky, B.; **Enzyme Microb. Technol.** 1983, 5, 291.

LUONG, J. H. T.; YERUSHALMI, L. e VOLESKY, B.; **Enzyme Microb. Technol.** 1983, 5, 291.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKHER, J. **Microbiologia de Brock**, Prentice Hall, São Paulo, 2004, 608p.

MANGTECH. **Higienização – CIP**. Disponível em: <<http://www.mangtech.com.br/#!/clean-in-place/gmlcv>>. Acesso em: 15 Mar. 2016.

MARRIOT, N. G. **Principles of food sanitation**. 4 ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. P. 364.

MIORELLI, S. **Determinação dos parâmetros de resistência térmica de microorganismos contaminantes de alimentos ácidos**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2009.

NASCIMENTO, J.S. Biologia de microrganismos. In: GUERRA, R.A.T. (Org.). **Cadernos CB Virtual 4**. João Pessoa: UFPB, 2010, v.4, p.233-306.

NUNES, A. S. ; ADORNI, D.S . O ensino de química nas escolas da rede pública de ensino fundamental e médio do município de Itapetinga-BA: O olhar dos alunos.. In: **Encontro Dialógico Transdisciplinar** - Enditrans, 2010, Vitória da Conquista, BA. - Educação e conhecimento científico, 2010.

OLSON K. E.; SORRELLS K.M.; **Thermophilic Flat Sour Sporeformers**. In: Downes F.P.; Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed. American Public Health Association, Washington D.C., 2001. Chapter 25, p. 245-248;

25.51.

REAL, G.; HENRIQUES, A. O. Controle da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*, **Boletim de Biotecnologia**, v.68, p.2 – 12, 2001.

RIBAS, L. C. M. **Higienização de instalações e equipamentos de indústria de laticínios**. 2008. 74 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização Lato Sensu em Higiene e Inspeção em produtos de Origem Animal). Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2008.

RIBEIRO, Mariangela Cagnoni & SOAREZ, Maria Magali S.R. **Microbiologia Prática – Roteiro e Manual – Fungos e Bactérias**. Ano 2000. Editora Atheneu.

SÁ, Helena Cristina Aragão de & SILVA, Roberto Ribeiro da. Contextualização e interdisciplinaridade: **concepções de professores no ensino de gases**. Disponível em: <<http://www.quimica.ufpr.br/eduquim/eneq2008/resumos/R0621-1.pdf>>. Acesso em: 21 de maio de 2011.

SILVA, N., Junqueira, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S, Gomes, R. A. R. *Preparação de amostras para análise*. Em: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 4 ed, São Paulo, Livraria Varela, 2010, Capítulo 2, p. 35-37.

SILVA, O.S. A interdisciplinaridade na visão de professores de química do ensino médio: concepções e práticas. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Educação para a Ciência e a Matemática) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR, 2008.

SCOTT, V.N.; ANDERSON J.E.; WANG G.; **Mesophilic Anaerobic Sporeformers**. In: Downes F.P.; Ito K.; *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th Ed. American Public Health Association, Washington D.C., 2001. Chapter 23, p. 229-237; 23.541

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2011. 56 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

STEVENSON, K.E.; SEGNER W.P.; **Mesophilic Aerobic Sporeformers**. In: Downes F.P.; Ito K.; Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed. American Public Health Association, Washington D.C., 2001. Chapter 22, p. 223-227; 22.512.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio; MARTINEZ, Marina Baquerizo; CAMPOS, Leila Carvalho; GOMPERTZ, Olga Fischman; RÁCZ; Maria Lucia. **Microbiologia**, 4. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**. Boca Raton, v. 20, 4, p. 243-263, 1994.

TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET. M.; GUILLON, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, p. 47-53, 2003.

TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Artmed, 2006. 245p. Tradução de Roberta Marchiori Martins. Porto Alegre. Editora Artmed, 2005

TREVISAN, Tatiana Santini e MARTINS, Pura Lúcia Oliver. A prática pedagógica do professor de química: **possibilidades e limites**. UNIrevista. Vol. 1, nº 2 : abril, 2006

VIEIRA MAM, SALVADOR FA, SILVA RM, IRINO K, VAZ TM, ROCKSTROH AC, GUTH BE, GOMES TAT (2009) **Prevalência e características da ilha de patogenicidade O122 em típicos e atípicos enteropatogênicos *Escherichia coli* estirpes**. J Clin Microbiol 48: 1452-1455.

VOLPE, P. L. O. e SILVA FILHO, E. A.; **Thermochimica Acta** 1995, 257, 59.

www.mangtech.com.br/clean-in-place/gmlcv

WARD, O. **Biotecnología de la Fermentación**. Zaragoza: Acribia, 1991. 155 p.

ZIMMERMANN. M. **Resistência de esporos de *Byssochlamys fulva* e *Bacillus coagulans* em polpa de tomate sob condições isotérmicas, não isotérmicas de altas**

pressões hidrostáticas. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.;