



Universidade Estadual de Campinas

Unicamp

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO TÉRMICO OTIMIZADO PARA MOSTO
DE CALDO DE CANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

**Jonas Nolasco Jr.
(Engenheiro Químico)**

Orientadora: Prof^a. Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre
em Ciência de Alimentos

Campinas – SP – 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

N712d Nolasco Junior, Jonas
Desenvolvimento de processo térmico otimizado para mosto de caldo de cana na fermentação alcoólica / Jonas Nolasco Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus Stearothermophilus*. 2. Esterelização. 3. Mosto. 4. Fermentação alcoólica. 5. Cinética de inativação térmica. 6. Sacarose. 7. Hidrolise. 8. Monossacarídeos. 9. Degradação térmica. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Bacillus Stearothermophilus*, Sterelization, Must, Alcoholic fermentation, Thermal inactivation Kinetics, Sucrose, Hydrolysis, Monossacarides, Thermal degradation

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

Carlos Eduardo Vaz Rossell

Silvio Roberto Andrietta

Fumio Yokoya (Suplente)

Data de defesa: 23/02/2005

Dissertação de Mestrado defendida por Jonas Nolasco Junior e aprovada
em de fevereiro de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof^a. Dr^a. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Orientadora – FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell
(membro – Centro de Tecnologia Canavieira)

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
(membro - CPQBA/UNICAMP)

Prof. Dr. Fumio Yokoya
(suplente – FEA/UNICAMP)

*O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher.*

Cora Coralina

Agradecimentos

À minha esposa Angela e meu filho Matheus, pelo apoio e compreensão nas horas de ausência, que não foram poucas.

Ao meu Pai exemplo de equilíbrio e à minha Mãe, quanta saudade.

À minha orientadora Prof^a Dra Pilar Rodriguez de Massaguer, pela orientação, meu carinho, respeito e amizade.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos pela infra-estrutura oferecida.

A Dr Isaias Carvalho Macedo, então gerente geral do Centro de Tecnologia Copersucar, pela autorização para esta pesquisa.

Ao Centro de Tecnologia Copersucar, pelo apoio financeiro que permitiu a execução deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Tecnologia Copersucar, Márcia Carvalho, Clever, Almir, Gabriel, Fabiano, pela ajuda cada qual na sua especialidade.

À minha sobrinha Adriana Furlan Martin, pela ajuda inestimável.

Aos amigos do Laboratório de Termobacteriologia, Rosinha, Cris, Salatir e especialmente a Wilmer e Wilson, grandes companheiros.

Fica registrado meu reconhecimento a todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO GERAL	xiii
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
Bactérias contaminantes de mostos e Fermentação	6
Prejuízos causados pelos contaminantes	9
Tratamentos propostos e resultados	12
Riscos associados ao uso intensivo de antibióticos	14
Resistência térmica dos contaminantes	16
Reações de degradação de açúcares	20
Nomenclatura	24
Referências	25
CAPÍTULO 3 – ARTIGO: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA HIDRÓLISE DA SACAROSE EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	37
CAPÍTULO 4 – ARTIGO: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS	62

CINÉTICOS DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE GLICOSE E FRUTOSE EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	
CAPÍTULO 5 – ARTIGO: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS DE <i>B. STEAROTHERMOPHILUS</i> EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	99
CAPÍTULO 6 – ARTIGO: OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TÉRMICO PARA INATIVAÇÃO DE CONTAMINANTES DE MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.	136
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES GERAIS	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 3:

FIG. 1. DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA SACAROSE. PONTOS EXPERIMENTAIS DOS TRATAMENTOS A TEMPERATURA CONSTANTE E AS CURVAS AJUSTADAS A MODELO LOGÍSTICO SIMPLES (EQ. 1) EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5° BRIX). CONSTANTES CINÉTICAS NA TABELA 2	58
FIG. 2. (A) GRÁFICO DE ARRHENIUS PARA OBTENÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX), (B) CURVA FANTASMA PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z PARA HIDRÓLISE DA SACAROSE	60

EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRX)

Capítulo 4:

- FIG 1.** GRÁFICOS DAS FRAÇÕES DE GLICOSE REMANESCENTES 87
ADOTANDO COMO PONTO INICIAL O TEMPO EM QUE A GLICOSE
ATINGIU A CONCENTRAÇÃO MÁXIMA E AJUSTANDO MODELO
LOGÍSTICO MONOPOPULACIONAL E ATRASO TÉRMICO IGUAL A
ZERO (EQ. 1), EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRX)
- FIG 2.** GRÁFICOS DAS FRAÇÕES DE FRUTOSE REMANESCENTES 89
ADOTANDO COMO PONTO INICIAL O TEMPO EM QUE A FRUTOSE
ATINGIU A CONCENTRAÇÃO MÁXIMA E AJUSTANDO MODELO
LOGÍSTICO MONOPOPULACIONAL E ATRASO TÉRMICO IGUAL A
ZERO (EQ. 1A), EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRX)
- FIG 3.** FRAÇÕES DOS ART REMANESCENTES EM FUNÇÃO DO 91
TEMPO AJUSTADOS POR MODÉLO LOGÍSTICO BIPOPULACIONAL
(EQ. 2), EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRX)
- FIG 4.** GRÁFICOS DE ARRHENIUS PARA OBTENÇÃO DA ENERGIA 93
DE ATIVAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DOS ART, EM MOSTO
(pH=6.14, 21.5°BRX). (A) BASEADO NA ESPÉCIE 1, k_1 , (B)
BASEADO NA ESPÉCIE 2, k_2
- FIG 5.** DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS z EM MOSTO 95
(pH=6.14, 21.5°BRX), SEGUNDO BIGELOW & ESTY (1920) PARA
AS ESPÉCIES 1 E 2 DO MOSTO. (A) CURVA FANTASMA PARA

OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z_1 , (B) CURVA FANTASMA PARA
OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z_2

FIG 6. REGRESSÃO LINEAR ENTRE AS CONSTANTES k_1 E k_2 DO AJUSTE DOS DADOS DOS ART REMANESCENTES EM MOSTO (pH=6.14, BRIX=21.5°BRIX) E (A): OS VALORES DE $k_{FRUTOSE}$ E (B): $k_{GLICOSE}$, RESPECTIVAMENTE 97

Capítulo 5:

FIG. 1. ATIVAÇÃO TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) A 98C 128

FIG. 2. PONTOS EXPERIMENTAIS E CURVAS DE SOBREVIVENTES DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 AJUSTADAS AOS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS EM MOSTO (pH = 6.14, BRIX = 21.5°BRIX) 130

FIG. 3. (A): GRÁFICO DE ARRHENIUS PARA DESTRUÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) E (B) CURVA FANTASMA PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z PARA DESTRUÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX), UTILIZANDO APENAS OS VALORES DA FRAÇÃO RESISTENTE 132

FIG. 4. COMPARAÇÃO DO GRÁFICO DE ARREHNIUS: DADOS DE ABRAHAM *et al.* (1990) E DESTA PESQUISA. 134

Capítulo 6:

FIG. 1. FLUXOGRAMA SIMPLES DA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL MOSTRANDO A POSSÍVEL LOCALIZAÇÃO DO PROCESSO TÉRMICO DO MOSTO 169

FIG. 2. LOCALIZAÇÃO DOS PT-100 NO INTERIOR DE DECANTADOR INDUSTRIAL CONVENCIONAL COM BANDEJAS COM CAPACIDADE PARA 700 m³/h COM EIXO CARTESIANO COM ESCALA EM MM INDICANDO O CENTRO GEOMÉTRICO DO EQUIPAMENTO E AS POSIÇÕES DOS PT-100 171

FIG. 3. LOCALIZAÇÃO DOS PT-100 NO INTERIOR DE DECANTADOR INDUSTRIAL SEM BANDEJAS COM CAPACIDADE PARA 500 m³/h, COM EIXO CARTESIANO COM ESCALA EM MM INDICANDO O CENTRO GEOMÉTRICO DO EQUIPAMENTO E AS POSIÇÕES DOS PT-100 (TUBO DA POSIÇÃO 4 COM FUNDO ABERTO LOCALIZADO NA MESMA POSIÇÃO DO TUBO POSIÇÃO 6, RESTANTE DOS TUBOS COM FUNDO FECHADO) 173

FIG. 4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE TRATAMENTO TÉRMICO PARA MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRX) 175

ÍNDICE DE TABELAS:

Capítulo 3:

TABELA 1. PARÂMETROS CINÉTICOS ESTIMADOS PARA OS MODELOS LOGÍSTICOS AJUSTADOS À HIDRÓLISE TÉRMICA DA SACAROSE EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRX) E VALORES D 56

TABELA 2. PARÂMETROS DO MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRX) PARA USO NA EQ. (3) DE VUKOV (1965) 57

Capítulo 4:

TABELA 1. PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE GLICOSE E FRUTOSE ESTIMADOS PARA OS MODELOS LOGÍSTICOS AJUSTADOS (EQ.1) A PARTIR DE SUAS CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS ATÉ O FINAL DOS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS, EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRX) 84

TABELA 2. PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA ESTIMADOS PARA OS MODELOS LOGÍSTICOS AJUSTADOS (EQ. 2) AOS ART REMANESCENTES DURANTE OS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS, EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRX) 85

TABELA 3. VALORES $D_1(h)$ E $D_2(h)$ CALCULADOS A PARTIR DE k_1 E k_2 DO AJUSTE CINÉTICO DOS ART REMANESCENTES 86

Capítulo 5:

TABELA 1. PARÂMETROS CINÉTICOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA 127

DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX)

Capítulo 6:

TABELA 1. PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A HIDRÓLISE TÉRMICA DA SACAROSE DURANTE OS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS EM MOSTO (pH = 6.14; 21.5°BRIX) (NOLASCO JUNIOR e DE MASSAGUER 2005a)	164
TABELA 2. PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE ART DURANTE OS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS, EM MOSTO (pH = 6.14; 21.5°BRIX) (NOLASCO JUNIOR e DE MASSAGUER 2005b)	165
TABELA 3. PARÂMETROS CINÉTICOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE <i>B. STEAROTHERMOPHILUS</i> ATCC1518 EM MOSTO (pH= 6.14, 21.5°BRIX) (NOLASCO JR e DE MASSAGUER 2005c)	166
TABELA 4. CARGA MICROBIANA DO CALDO À SAÍDA DO DECANTADOR	167
TABELA 5. MÉDIAS DAS TEMPERATURAS POR PONTO NO INTERIOR DOS DECANTADORES	168

Resumo geral

Nesta pesquisa é proposto um processo de tratamento térmico do mosto, com máxima preservação do conteúdo em açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose), a fim de promover a inativação térmica de seus contaminantes bacterianos e por extensão os da fermentação alcoólica.

Com esse objetivo foram examinadas as cinéticas de degradação térmica da sacarose, glicose, frutose e açúcares redutores totais (ART) (110 – 140°C) e também dos esporos de *B. stearothermophilus* (98 – 130°C), esporulado termo-resistente contaminante típico de mosto.

Todos os fatores termodegradáveis estudados apresentaram cinéticas de destruição térmicas não-lineares de forma que o índice de redução decimal (D), obtido por regressão linear, não foi representativo da velocidade de inativação térmica, e assim as cinéticas foram analisadas mediante modelos não lineares que permitiram obter as constantes de velocidade de inativação (k). Seguidamente utilizando um gráfico tipo Arrhenius a energia de ativação E_a foi determinada e o valor de z foi obtido.

As curvas de sacarose remanescentes obtidas durante estudo da sua hidrólise térmica, foram ajustadas por modelos logísticos que se mostraram apropriados para descrever ombros planos e caudas finais nas curvas cinéticas. A energia de ativação e valor z obtidos foram 112,32 kJ/mol e 26,99°C, respectivamente. Essa reação se mostrou praticamente equimolecular quanto às hexoses produzidas.

As curvas de concentração de ART vs tempo remanescentes foram ajustadas por modelos logísticos bipopulacionais, apropriados em casos em que o processo global é descrito por duas frações de compostos, as hexoses glicose e frutose, que se degradam em velocidades diferentes e apresentam ombros e caudas. Os valores de energia de ativação obtidos para a frutose e glicose foram bem próximas: 140,37 kJ/mol e 140,23 kJ/mol, respectivamente. Os valores z obtidos foram 21,59°C e 21,61°C. Quanto às velocidades de degradação a frutose apresentou velocidade 9 vezes maior do que a da glicose.

A suspensão de esporos se mostrou heterogênea em resistência. A temperatura influenciou a forma das curvas de sobreviventes, para os esporos de *B. stearothermophilus* ATCC1518. Nas temperaturas mais baixas, as curvas de inativação térmica apresentaram ombro plano, passando por comportamento de modelos de frações lineares consecutivas, e finalmente na temperatura mais elevada apresentou modelo linear com eliminação da fração termo-sensível. Os valores de energia de ativação e z obtidos foram 249,52 kJ/mol e 11,48°C, respectivamente.

O processo térmico para inativação dos contaminantes do mosto foi definido após o decantador, onde foram quantificados grandes grupos microbianos em amostras coletadas de Usinas situadas em regiões de clima e umidade distintas. A concentração máxima de esporos termofílicos produtores de acidez plana foi de 9×10^1 esporos/ml de mosto em Usina localizada em região quente e úmida enquanto um valor de 4 esporos/ml de mosto foi encontrado em Usina localizada em região de clima seco e com predominância de solo com baixa capacidade de retenção de água.

Foi determinada a letalidade do processo de decantação para os contaminantes do caldo de cana e mosto através da determinação da história térmica mínima detectada no ponto mais frio de dois decantadores industriais. Baseado no tempo de residência médio e na temperatura mais fria detectada foi possível estimar que a decantação produz, em média, $4,0 \times 10^6$ reduções decimais da população de *Lactobacillus fermentum* e apenas 0,14 reduções decimais nos esporos de *B. stearothermophilus*.

Baseado no conhecimento da cinética dos principais fatores termodegradáveis foi definida uma região de tratamento térmico que se estende dos 114 a 140°C e de 3000 a 4 segundos. Graficamente essa região é um triângulo delimitado, abaixo pela reta correspondente a 5 reduções decimais dos esporos de *B. stearothermophilus* e acima pela reta correspondente à preservação de 98,7% dos ART do mosto. O nível de preservação de 98,7% dos ART foi escolhido pela precisão das análises usadas na determinação dos mesmos (1,3%). Qualquer processo térmico dentro dessa região será capaz de satisfazer o requisito de 5 reduções decimais dos esporos de *B. stearothermophilus* e preservação de 98,7% dos ART do mosto.

A prática desse processo térmico implica na adoção de uma estratégia preventiva no controle da contaminação da fermentação em oposição às estratégias corretivas baseadas no uso de antibióticos que se pratica nas Usinas de Açúcar e Alcool Brasileiras.

Abstract

In this research is proposed a thermal treatment process for sugar cane must with maximum retention of fermentable sugar (sucrose, glucose and fructose), to promote a thermal inactivation of its bacterial contaminants and therefore, those of alcoholic fermentation.

With this objective were examined the thermo degradation kinetics of sucrose, glucose, fructose, total reducing sugars (TRS) (110 – 140°C) and also *B. stearothermophilus* spores (98 – 130°C), a typical thermo resistant sporulated contaminant of musts.

All thermo degradable factors showed non-linear thermal destruction kinetics due to this the D value, obtained for linear regression, could not be used, thus the kinetics were reported by Arrhenius model, obtaining the reaction rates (k), Activation Energy (Ea) and the z value through out Ea values.

Sucrose remaining curves obtained as a function of time during its thermal hydrolysis, were fitted by logistic models which are suitable to describe flat shoulders and ending tails in the kinetic curves. Activation Energy and z value were 112,32 kJ/mol and 26,99°C, respectively. This reaction showed to be equimolecular in regard to the produced hexoses.

TRS remaining curves vs time were adjusted by logistic bipopulational models, suitable when the overall process presents two fractions, the hexoses glucose and fructose, with different degradation rates with shoulders and tails. Ea and z values for fructose and glucose were quite close: 140,37 kJ/mol, z of

21,59°C and 140,23 kJ/mol, z of 21,61°C, respectively. As far as degradation rates are concerned, fructose showed to degrade 9 times faster than glucose.

Spores suspension showed heterogeneity in thermal resistance. Temperature affected the shape of survival curves for *B. stearothermophilus* ATCC1518 spores. At lower temperatures, it showed flat shoulder, passing through consecutive linear fraction models behaviors, and finally at higher temperatures followed linear model with elimination of the thermo-sensible fraction. E_a and z values were 249,52 kJ/mol and 11,48°C respectively.

A thermal process for sugar cane must contaminant inactivation was defined after the decanter, where microbiological quantification of various microbial groups was carried out on samples from sugar cane mills located in region with different climate and humidity conditions. The maximum thermophilic flat-sour spores count was of 9×10^1 spores/ml of must and was originated from a sugar cane mill located at the warmest and most humid region, while a count of 4 spores/ml of must was found in a plant with dry climate and with soil of low capability for water retention.

Decanters lethality of must contaminant was determined based on the minimum detected thermal history in two industrial equipments. Applying the average residence time with this thermal history, it was estimated that the decantation results, on average, $4,02 \times 10^6$ log reductions of *Lactobacillus fermentum* and only 0,13 log reductions in the counting of *B. stearothermophilus* spores.

Based on the kinetic knowledge of the thermo degradable major factors it was established a thermal process region from 114 to 140C and 3000 to 4 seconds. Graphically, this region is a triangle delimited by the line for 5 log

reductions of *B. stearothermophilus* (lower limit), and the line for 98,7% retention of the must TRS. This preservation level was adopted considering the accuracy of the sugar analysis methodology (1,3%). Any thermal process within this region will be able to satisfy the requirement of 5 log reductions for *B. stearothermophilus* and 98,7% retention of must TRS.

The implementation of this thermal process implies in the adoption of a preventive strategy in the contamination control of the fermenting process, opposite to the corrective strategies currently applied based on antibiotics, which is common practice in Brazilian Sugar Canes mills.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O álcool produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto, formado de caldo de cana e melaço que é proveniente do processo de fabricação de açúcar.

O agronegócio sucroalcooleiro movimenta cerca de R\$ 36 bilhões por ano, o que corresponde a aproximadamente 3,5% do PIB nacional. Este setor faz do Brasil o maior produtor mundial de cana e açúcar e o principal país do mundo a implantar, em larga escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo. Hoje o álcool é reconhecido mundialmente pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas e os países do primeiro mundo estão interessados na tecnologia brasileira. As recentes vitórias do Brasil na Organização Mundial de Comércio (OMC) e a crescente adesão dos países ao protocolo de Kyoto (1997) acenam para um aumento gradativo do uso de combustíveis renováveis, entre os quais o álcool Brasileiro, com impactos significativos para a balança comercial Brasileira.

Aproximadamente 50% das 340 milhões de toneladas de cana de açúcar processadas no ano de 2003, foram direcionadas para a produção de 14 bilhões de litros de álcool.

O caldo de cana e por extensão o mosto permitem o desenvolvimento de uma série de microorganismos, pois tem concentração de açúcares, pH, temperatura, macro e micro-nutrientes favoráveis para a sustentação de uma microbióta diversa que é enviada ao processo de fermentação alcoólica. Essa microbióta tem sido identificada por diversos autores como sendo bactérias predominantemente gram-positivas, dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*.

Em termos de eficiência na indústria sucro-alcooleira, o setor de produção de álcool nas usinas, dependendo da proporção de álcool produzido, é

responsável por 30-60% das perdas totais determinadas, sendo a maior parte delas associadas com a presença desses contaminantes no processo de fermentação. Alguns desses contaminantes consomem açúcar, outros álcool, causam a morte e ou floculação do fermento, aumento do tempo de fermentação, exigindo grandes gastos em insumos para a condução do processo.

As estratégias de combate à infecção adotadas, se concentram basicamente no uso de antibióticos. São produtos que foram desenvolvidos para uso em veterinária, onde são usados como aditivos alimentares antibacterianos na criação intensiva de animais, e são efetivos contra bactérias gram-positivas, daí a sua aplicabilidade no controle da infecção na fermentação.

É crescente a preocupação com relação ao uso em larga escala desses antibacterianos. Os riscos associados ao desenvolvimento de resistência a antibióticos são crescentes e não podem ser desprezados, pois as potenciais conseqüências tanto para a saúde animal como humana são sérias. Na Europa, principalmente nos países nórdicos, o uso desses produtos tem sido severamente restrito. Existem fortes correlações entre o uso em larga escala desses produtos e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos mais potentes disponíveis, caso dos antibióticos vancomicina e sinercid nos Estados Unidos, associados ao uso do produto virginamicina, na criação de frangos e porcos. Este produto também é usado no controle de infecções na fermentação.

A decisão de se projetar um processo térmico para inativação dos contaminantes do mosto pressupõe o estudo da resistência térmica tanto do microrganismo alvo do processo quanto da sacarose, ambos nas condições de Brix e pH encontrados nas Usinas.

Objetivos

Este projeto teve como objetivo a adoção de uma estratégia preventiva no controle dos contaminantes do processo de fermentação alcoólica, baseada na definição de um processo térmico de inativação das bactérias contaminantes de mosto de caldo de cana, em oposição às estratégias corretivas, em vigor nas usinas brasileiras, baseadas no uso intensivo de antibióticos. Este processo térmico foi dimensionado com máxima preservação do conteúdo dos açúcares sacarose, glicose e frutose do mosto e adotando como alvo do processo o *B. stearothermophilus*.

Para atingir este objetivo principal os seguintes objetivos parciais foram executados:

- a) Foi estudada a cinética de degradação térmica da sacarose em mosto de caldo de cana e estabelecidos seus parâmetros cinéticos.
- b) Foram determinados os parâmetros cinéticos de degradação térmica da glicose, frutose e ART em mosto de caldo de cana.
- c) Foram determinados os parâmetros cinéticos de degradação térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* em mosto de caldo de cana.
- d) Com os parâmetros cinéticos dos itens a, b, c foi projetado um processo térmico otimizado para o mosto de caldo de cana que garante 5 reduções decimais nos esporos de *B. stearothermophilus* e preservação de 98,7% dos ART do mosto.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias contaminantes de mostos e Fermentação

Na avaliação da flora contaminante nas principais etapas do processo de produção do açúcar e do álcool, constatou-se que os microorganismos de importância no setor de extração do caldo são essencialmente aqueles oriundos do solo e vegetais. Dentre esses, os fungos, as leveduras, as bactérias lácticas e esporogêneas desempenham papel de importância em um ou mais pontos da usina. No processo utilizado no Brasil, extração mecânica, as bactérias esporogêneas têm uma importância relativa, mas as bactérias lácticas são extremamente importantes tanto na extração como no setor de fermentação, como principais promotores da fermentação indesejável (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1983b). As bactérias do ácido acético, acetobacter, têm alguma importância no setor de moendas e das peneiras removedoras de bagacilho, partes mais expostas ao ar (MAEDA, 1999).

Na avaliação de pontos críticos para controle microbiológico na fabricação de açúcar e álcool, feito em Usinas Cooperadas ao sistema Copersucar, constatou-se que os equipamentos de extração de caldo (moendas, caixas, peneiras, tubulações) continham focos de crescimento de bactérias lácticas e que o pH na água de lavagem de cana, controlado na faixa de 10-11 mantinha a contagem total de microorganismos no caldo misto, sempre inferior a 10^7 UFC/ml. Na fermentação recomendou-se não apenas o controle da concentração de bactérias lácticas, mas também as quantidades relativas dessas com as leveduras vivas, além de um intenso controle no pé de cuba, através do uso de pHs

próximos ou inferiores a 2,0 (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1983a).

Em avaliação da evolução e perspectivas para aumento da produtividade e da eficiência na fermentação alcoólica em Usinas cooperadas ao sistema Copersucar, foram citados, entre outros, a necessidade de melhor controle microbiológico, melhor controle de perdas e projeto sanitário de tanques e tubulações (FINGUERUT; LUCREDI; ROSSEL,1983). Nessa direção, outros autores constataram contagens elevadas após os aquecedores do caldo que operavam a 105C, e sugeriram modificações para aumentar a turbulência e a instalação de um tubo de espera para conseguir uma esterilização prática, além de melhorias nos procedimentos de limpeza na secção de resfriamento final do caldo (LUCREDI *et al.*,1984). Visando fermentações mais eficientes, foram apontados alguns itens a serem obedecidos no tratamento do caldo destinado para a fermentação e destilação: eliminação de impurezas grosseiras (areia, terra, bagacilho etc), preservação de nutrientes como vitaminas, aminoácidos etc e redução da contaminação microbiológica (OLIVEIRA *et al.*,1987). Comparando quatro tipos de tratamento em funcionamento nas Usinas Cooperadas ao sistema Copersucar, os mesmos autores avaliaram que o tratamento primário de peneiramento do caldo seguido de aquecimento e decantação é o que apresentava os melhores resultados para a produtividade da fermentação. Constataram o aumento de contagem bacteriana de 10^1 bactérias/g na saída do decantador para 10^6 bactérias/g ao fim do processo de resfriamento do caldo, imediatamente antes de ser enviado à fermentação, mas não conseguiram avaliar

de forma definitiva a influência de uma contagem bacteriana elevada do caldo, para o rendimento da fermentação.

Distúrbios significativos causados por *Leuconostoc mesenteroides* não são esperados nas dornas de fermentação, em virtude do efeito inibidor do etanol sobre essas bactérias em concentrações bem mais baixas das efetivamente encontradas nas fermentações em Usinas (KAJI,1989). *Leuconostoc mesenteroides* é um gênero de bactéria há muito tempo conhecida como produtora de gomas e substâncias gomosas em caldo de cana, beterraba e outros fluidos à base de sacarose (EVANS; HIBBERT, 1946).

Um total de 334 isolados bacterianos de mostos e de dornas de fermentação alcoólica foram identificados a nível de espécie (GALLO, 1990). De acordo com o autor, os contaminantes bacterianos mais importantes no processo de fermentação alcoólica eram as bactérias Gram-positivas (98,52%), Gram-negativas (1,48%), bastonetes Gram-positivos (86,28%), cocos Gram-positivos (12,24%), bastonetes Gram-negativos (1,48%), esporulados (26,05%) e não esporulados (73,95%). Os gêneros bacterianos mais frequentes nas amostragens foram *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%). Em relação às espécies predominantes isoladas destacaram-se em ordem decrescente *B. coagulans*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *B. stearothermophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis* e *L. buchneri*. O autor atribuiu ao tratamento térmico do caldo (aproximadamente 100°C) o fato de não ter encontrado a bactéria *L. mesenteroides*, tão mencionada na literatura sobre contaminantes da fermentação alcoólica.

Uma excelente revisão sobre contaminantes na fermentação alcoólica pode ser encontrada em Gallo e Canhos (1991).

Prejuízos causados pelos contaminantes

Em investigação da degradação de sacarose por bactérias hipertermofílicas durante o processo de extração do caldo por difusão em Usinas de Açúcar da África do Sul, o ácido láctico representou, em média, 92% do total de ácidos orgânicos produzidos. A partir de dados de fermentação de sacarose em caldo de cana de difusores, sugeriu-se que duas partes de sacarose eram consumidas para a produção de uma parte de ácido láctico (MACMASTER; RAVNÖ, 1975). As perdas de sacarose associadas aos contaminantes da linha de caldo varia de 1 a 2,5 kg de sacarose/tonelada de cana, dependendo das condições de higiene e operacionais (YOKOYA 1989 *apud* GALLO; CANHOS, 1991).

Dentre os problemas associados com a presença de contaminantes na fermentação, a floculação da levedura foi apontada como um dos mais sérios na fermentação industrial de álcool. A redução na produção de álcool se dá através de consumo de açúcar pelos contaminantes, consumo de álcool por algumas bactérias, morte de fermento por toxinas lançadas ao meio pelos contaminantes, morte do fermento por substâncias utilizadas no combate à contaminação, perda do fermento retido no fundo das dornas ou nas centrífugas causada pela floculação, aumento do tempo de fermentação devido a queda do teor de fermento nas dornas, podendo uma contaminação violenta acabar com a fermentação (TROMBINI *et al.*, 1988). O problema torna-se mais acentuado com o uso da reciclagem de células para aumentar a produtividade, reduzir o tempo e o custo da fermentação, porque essa pratica tende a acumular a causa do problema a cada ciclo do processo (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991).

Aproximadamente 85% da floculação verificada em Usinas Cooperadas Copersucar durante a safra 93/94 foram causadas por bactérias. Em teste da influência da proporção entre bactérias e leveduras nas floculações, observou-se que o nível seguro, à prova de floculação, era 10^3 UFC/ml para as bactérias nas dornas de fermentação (NOLASCO; FINGUERUT, 1993). Neste trabalho, amostras originais de vinho provenientes de fermentações floculadas tinham seus contaminantes e leveduras quantificados, separados e crescidos para serem misturados fixando a população de leveduras igual à concentração da amostra original e reduzindo a concentração dos contaminantes bacterianos desde a concentração encontrada na amostra original até a concentração em que não ocorria a floculação. O efeito da proporção entre células de bactérias e leveduras também foi avaliado por outros autores sendo que esses autores, expressaram as quantidades dos microorganismos em massa seca (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991; BROMBERG; YOKOYA, 1995; ALCARDE; YOKOYA, 2003).

Nem todas as linhagens de *Lactobacillus* são capazes de causar o problema floculação (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). Os contaminantes *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri*, podem provocar a floculação de leveduras enquanto que *B. subtilis* e *B. coagulans* não (ALCARDE; YOKOYA, 2003).

Estudo de culturas mistas Levedura-*Lactobacillus* indicaram que um dos mecanismos de estimulação dos *Lactobacillus* era a hidrólise do açúcar do melaço pelas leveduras (NGANG *et al.*, 1992). Oliva-Neto e Yokoya (1997) avaliaram que aminoácidos (leucina, isoleucina, valina) eram essenciais para o crescimento das bactérias lácticas durante a fermentação e não sais, vitaminas ou açúcares como

se pensava. Gobbetti, Corsetti e Rossi (1994) avaliaram que culturas mistas dos *Lactobacillus* com levedura em meio isento de valina ou leucina, não inibiu o crescimento dos *Lactobacillus* devido à excreção desses aminoácidos pelas leveduras.

A produção de ácidos orgânicos pelas bactérias contaminantes da fermentação eram responsáveis, em média, pela redução de aproximadamente 1,5% no rendimento fermentativo, embora esse valor pudesse chegar até aproximadamente 5% dependendo de como fosse conduzido o processo de fermentação (FORMAGGIO; FINGUERUT, 1998). Oliva-Neto e Yokoya (1997) relataram forte inibição das leveduras em seus estudos de cultura mista levedura-*Lactobacillus* após 8 a 12 ciclos, provocada pelo aumento da acidez que chegou a 15g/l. Stroppa e outros (1998) encontraram que a relação consumo de açúcar/crescimento celular para os *Bacillus* foi 1,61 a 4,97 g/ciclo logarítmico enquanto que para *Lactobacillus*, 1,01 a 1,56 g/ciclo logarítmico. Oliveira-Freguglia e Horii (1998) relataram uma redução, em 12 horas, de 96% na viabilidade das leveduras em cultura mista com *L. fermentum*. Stroppa e outros (2000) estudando os efeitos dos antibióticos monensina e penicilina sobre linhagens de *Bacillus* e *Lactobacillus* isolados de fermentações industriais brasileiras, avaliaram que todos os microrganismos testados foram inibidos até mesmo na mais baixa dosagem de antibióticos. Segundo os mesmos autores as perdas de açúcares em fermentações contaminadas variaram com as linhagens de bactérias e só puderam ser detectadas na ausência de antibióticos e ainda sugeriram que o uso combinado dos dois antibióticos pode ser vantajoso devido a diferenças detectadas nas formas de ação dos mesmos. O setor de fermentação é

responsável por 30 a 60% das perdas totais determinadas na indústria de açúcar e álcool (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1996).

Negro, Yokoya e Eberlin (2003) encontraram uma associação de microrganismos (leveduras e bacilos) em amostragens realizadas em “canjicas” (material polimérico insolúvel em água) isoladas em Usinas de Açúcar e Álcool. Este fato, aliado ao isolamento de grande número de *Lactobacillus* produtores de homopolissacarídeos a partir de caldo de cana fresco, sugeriu que tais microrganismos estivessem envolvidos no processo, conferindo as características granuladas e de insolubilidade apresentadas pela “canjica”, embora nenhuma cultura de *Lactobacillus* quando crescida em meio de sacarose, produzisse gomas com aspecto característico da “canjica”.

Tratamentos propostos e resultados

Vários autores têm avaliado o desempenho de desinfetantes químicos, antibióticos na fermentação e biocidas nas moendas, como forma de controlar e minimizar as perdas decorrentes da contaminação microbiológica. Brazzach (1970), propôs o uso de desinfetantes químicos para controle da contaminação nas fermentações alcoólicas em substituição aos antibióticos, com redução de 50% na acidez dos vinhos fermentados. Alcarde, Gallo e Oliveira (1996) avaliando a atividade dos produtos comerciais antimicrobianos Virginiamicina®, Penicilina V Potássica®, Kamoram HJ®, Tetraciclina®, Bactol Q® e Adesol A-207®, utilizados em indústrias sucroalcooleiras, avaliaram que Bactol Q® pode ser utilizado para controlar o aumento de contaminação em caldo de cana após aquecimento e

decantação, recomendando um tempo de contato entre bactérias e o produto de 3 horas. Stroppa e outros (1998) constataram a efetividade dos antibióticos Biopen 450®, que tem penicilina como princípio ativo, e Kamoran WP®, cujo princípio ativo é a monensina, sobre linhagens de bactérias isoladas de fermentação industrial, sendo que *L. plantarum* foi a bactéria mais resistente enquanto *L. fermentum* foi a mais sensível. Oliva-Neto e Yokoya (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano de vários produtos incluindo formulações comerciais utilizadas em usinas, através do teste da Concentração Mínima Inibitória (CMI), em *S. cerevisiae*, *L. fermentum* e *L. mesenteróides*. Penicilina V ácida® e clindamicina® foram os mais efetivos contra o crescimento bacteriano em 24h. Entre os produtos químicos sulfito, nitrito e sulfato de cobre, foram os mais efetivos. Metilditiocarbamato foi eficiente apenas para *L. fermentum* (CMI= 2,5 µg/ml) e *S. cerevisiae* (CMI= 5,0 µg/ml). Tiocianato, bromofenato e n-alquildimetilbenzil cloreto de amônio afetaram o crescimento de *S. cerevisiae* em concentrações inibitórias similares à *L. mesenteroides* e *L. fermentum*. Formaldeído foi mais efetivo contra as bactérias que contra as leveduras em dois pHs avaliados (4,5 e 6,0).

Nolasco e Finguerut (1996), através de um modelo preditivo para o acúmulo de infecção na fermentação, concluíram que a recentrifugação total do leite de levedura operada de forma constante e uniforme, rejeitava mecanicamente mais de 75% das bactérias da fermentação e avaliaram que essa tecnologia em conjunto com uma redução drástica do nível de contaminantes no mosto, podem conferir longos períodos de operação, antes de se atingir nível crítico de bactérias, 10^3 UFC/ml, nas dornas de fermentação. Em outras pesquisas, foram

avaliadas a qualidade microbiológica de mostos e a qualidade do tratamento do caldo que era enviado à destilaria (NOLASCO; FINGUERUT, 1998; CRISTOFOLETTI; NOLASCO; FINGUERUT, 1998). Estes autores constataram que o tratamento praticado no caldo para a destilaria era inferior ao tratamento praticado no caldo para fabricação de açúcar e como consequência, grandes quantidades de sólidos eram enviados ao volume de controle da fermentação, onde eram reciclados (60%), através das centrifugas. Esses sólidos, segundo os autores, dificultavam as estratégias de combate à infecção, levando-os a propor a padronização físico-química e microbiológica do mosto através da decantação conjunta de caldos (caldo misto, caldo do filtro) e mel.

Riscos associados ao uso intensivo de antibióticos

O uso dos chamados promotores de crescimento na criação intensiva de animais, tem sido apontado como uma das fontes não humanas principais, que sustenta o aparecimento de bactérias nocivas ao Homem, resistentes a antibióticos. O mecanismo de transferência de resistência que essa prática exerce sobre as bactérias nocivas ao Homem, é bastante controverso embora haja clara evidencia que o aumento no consumo de antibióticos na veterinária, tem sido acompanhado por um similar aumento no número de linhagens de patógenos humanos resistentes a antibióticos. Estudos com *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococos* e *Campylobacter* têm sustentado a reivindicação de que novos genes resistentes podem ser selecionados na flora bacteriana de animais, como consequência direta do uso de antibióticos (THAL; ZERVOS, 1999).

Van Den Bogaard e outros. (2002) relataram a ocorrência de resistência de *Enterococos* a antibióticos comumente usados na terapia em frangos ou como promotores de crescimento. Relataram ainda a prevalência da resistência a um vasto painel de antibióticos testados, em isolados fecais de toda a população exposta aos antibióticos, desde os frangos até os trabalhadores, na fazenda e no frigorífico.

O uso de antibióticos na agricultura inclui o tratamento e prevenção de doenças em animais e plantas e como aditivos alimentares como promotores de crescimento na criação intensiva de animais. Esse uso tem sido criticado e reavaliado com a crescente preocupação com o fato de que o uso intensivo e extensivo de antibióticos leva ao estabelecimento de genes resistentes a antibióticos no ambiente com vários relatos de resistência detectados com algumas linhagens de *Campylobacter* resistentes a ciprofloxacina®, tetraciclina® e eritromicina®, principais antibióticos para tratamento de infecções por *Campylobacter* em humanos (ASM, 2002; LEDERGERBER *et al.*, 2003). Existem relatos na Europa sobre bactérias resistentes a vancomicina®, uma das drogas de último recurso para tratamento de certas infecções, possivelmente associado ao uso na agricultura do avoparcina®, uma droga quimicamente similar à vancomicina®. Nos EUA foi relatado fenômeno similar com o synercid®, a droga usada para tratar infecções resistentes a vancomicina®, possivelmente associado ao uso da virginiamicina®, quimicamente relacionada ao synercid®, como promotor de crescimento em aves e porcos (MELLON, 1998).

Preocupações com bactérias resistentes a antibióticos levaram a União Européia a banir o uso de quatro antibióticos como promotores de crescimento em

frangos em 1999. A Administração de Drogas e Alimentos Americana (FDA) banuiu o uso de uma classe particular de antibióticos chamada fluoroquinolonas na criação de frangos. (LEDERGERBER *et al.*, 2003).

Lima, Grisi e Bonato (1999) realizaram um rastreamento num agrossistema de cana de açúcar para obtenção de bactérias capazes de sintetizarem polihidroxialcanoatos (PHA), e que usem a sacarose como principal fonte de carbono além de serem resistentes a antibióticos. De acordo com os autores, oitenta e duas linhagens de bactérias, pertencentes a dezesseis gêneros e trinta e cinco espécies foram isoladas, dentre as quais setenta e três (89%) apresentaram múltipla resistência a antibióticos em dosagens de 10 – 100 U/ml de penicilina e 100 – 300 µg/ml de virginiamicina®, antibióticos usados na fermentação das Usinas. Para os autores esse fenômeno de resistência encontrado nessas linhagens, estaria ligado à pressão seletiva exercida pela fertirrigação da vinhaça no sistema de manejo e cultivo de cana de açúcar.

Resistência térmica dos contaminantes

A resistência térmica dos esporos está relacionada a fatores intrínsecos, como espécies ou variedade de linhagens dentro das espécies, e fatores extrínsecos, como desidratação do protoplasto, mineralização pela incorporação de íons minerais como cálcio, manganês, magnésio, potássio e adaptação térmica (PFLUG, 1990; BENDER; MARQUIS, 1985; BEAMAN; GERHARDT, 1986). Periago e outros (1998) avaliaram que o aumento da concentração de NaCl no meio de recuperação aumenta a resistência térmica de esporos de *B.*

stearothermophilus tratados termicamente. Vários trabalhos publicados avaliam os parâmetros cinéticos de destruição térmica de esporos de *B. stearothermophilus* a partir de dados obtidos em condições diversas como sistemas contínuos, batelada, em meios tamponados, água, leite (WESCOTT; FAIRCHILD; FOEGEDING, 1995; BUSTA, 1967; PERKIN *et al.*, 1977; BURTON *et al.*, 1977; DAVIES *et al.*, 1977; ABRAHAM *et al.*, 1990; PFLUG, 1990).

O valor D, para *B. stearothermophilus* em caldo de cana à temperatura de 120,130 e 140°C, foi relatado como sendo 11,3 minutos, 9,5 minutos e 8,1 minutos, respectivamente (GOUTHIER; MASSAGUER, 1987), usando cinética de primeira ordem.

Franchi e outros (2003a) determinaram o valor D_{60C} , para as bactérias contaminantes do gênero *Lactobacillus*, em Usinas de açúcar e álcool, em meio de caldo de cana clarificado a 14°Brix e pH = 6,5. Entre as espécies testadas, a *L. confusus*, se mostrou a mais sensível não sendo possível a determinação do valor D_{60C} para esse contaminante, enquanto o *Leuconostoc*, o mais resistente. Os valores de D_{60C} obtidos foram: 0,75 minutos para *L. fermentum*, 0,29 minutos para *L. plantarum* e 1,57 minutos para *Leuconostoc mesenteroides*. Ainda de acordo com Franchi e outros (2003b), pode-se observar uma ação sinérgica do tratamento térmico associado à ação de uma combinação de bioprotetores como Novasin (10ppm, contendo 1000000 UI/g de nisina), 30 ppm de Novagard (lisozima) e Tween 20(0.1%), que produziu uma redução de 16,7% no valor D_{60C} para o *Lactobacillus fermentum*, escolhido como alvo pela comparação entre os valores D obtidos, devido ao fato de o *Leuconostoc mesenteroides*, embora sendo o mais resistente, não ser um contaminante importante das dornas de

fermentação alcoólica, pela sua baixa tolerância ao álcool (KAJI, 1989). O parâmetro z encontrado para *Lactobacillus fermentum* foi 7,7°C.

Casadei e outros (2001) avaliando o efeito do pH e do etanol sobre a resistência térmica para *L. delbueckii* e esporos de *B. cereus*, constataram que a resistência térmica desses microorganismos é negativamente afetada com o abaixamento do pH e aumento no teor alcoólico. Para *B. cereus* a queda no pH de 7 para 3 na ausência de etanol causou uma redução média de sete vezes no valor D enquanto que em concentração de etanol de 10% a redução média foi de 12 vezes. O valor D encontrado para a inativação de *L. delbueckii* a 60°C na ausência de etanol em pH = 7 e a 54°C em pH = 3 foram 2,4 e 0,9 minutos, respectivamente.

Em leite a 121°C, os valores de D e z relatados para esporos mesofílicos foram 11 segundos e 10,4°C respectivamente, enquanto que para os esporos termofílicos 25 segundos e 10,3°C, respectivamente (KESSLER, 1981).

Nos últimos anos, vários modelos têm sido propostos para descrever curvas de sobreviventes semilogarítmicas não lineares complexas, multifásicas com retardos e atrasos, ombros e caudas, obtidas muito mais frequentemente do que as curvas semilogarítmicas lineares de 1ª ordem durante a inativação térmica de microorganismos, sem que se tenha chegado à conclusão sobre o melhor modelo (ABRAHAM *et al.*, 1990; PRUITT; KAMAU, 1993; PELEG, 1997; RODRIGUEZ *et al.*, 1992; GEERAERD; HERREMANS; VAN IMPE, 2000; VAN BOEKEL, 2002). Para Pflug (1990), curvas de sobreviventes semilogarítmicas curvilíneas são obtidas em ensaios para determinação de resistência térmica de microorganismos envolvendo flora microbiana heterogênea ou com variações de resistência dentro

de cada espécie, indicando a presença de um grande número de organismos com muito baixa resistência e um pequeno número de organismos altamente resistentes. Além disso a cada batelada de esporos produzidos, mutações genéticas da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} produzem espécies mutantes mais ou menos resistentes do que o restante da suspensão.

A recomendação do segundo “IFT’s Research Summit 2003” para o avanço no entendimento da cinética de inativação microbiana é que a comunidade técnico-científica deve reconhecer modelos alternativos e parâmetros para descrição e comunicação de sobreviventes de populações microbianas quando expostas a vários agentes letais, em virtude de haver evidência significativa de que as curvas de sobreviventes podem ser descritas por expressões cinéticas semi logarítmicas não lineares (HELDMAN; NEWSOME, 2003). Para esses autores, o conceito clássico de D e z (BIGELOW; ESTY, 1920 *appud* PFLUG, 1990) não são apropriados para tratar tais cinéticas complexas não lineares. Pruitt e Kamau (1993) revisaram a história das teorias de crescimento e mostraram como os modelos clássicos de crescimento podem ser derivados como casos especiais de uma equação da taxa de crescimento genérica. Além disso, considerando que matematicamente a diferença entre crescimento e morte é questão de sinal, converte curvas de crescimento em curvas de morte mudando o sinal da equação de crescimento.

Abraham e outros (1990) e Pruitt e Kamau (1993) propuseram modelos de regressão não lineares para representar curvas de sobreviventes complexas, multifásicas com retardos e atrasos, ombros e caldas respectivamente, e

mostraram que os métodos tradicionais de estimativa de valores D, não são sempre apropriados para o tratamento de dados cinéticos.

Abraham e outros (1990) avaliaram as curvas de sobreviventes de suspensão aquosa de *B. stearothermophilus* para seis temperaturas variando entre 105 a 130°C assumindo que a suspensão de esporos continha uma população de esporos ativa e termo sensível e uma população dormente que tinha que ser ativada antes de ser destruída. As curvas de sobreviventes obtidas revelaram aumento na contagem dos esporos nos instantes iniciais do tratamento. Esses autores consideraram que os dois mecanismos de inativação e ativação à temperatura constante seguiam cinéticas de primeira ordem com constantes K_a e K_d e demonstraram através dos seus dados que a dormência era independente da temperatura de aquecimento e que o fenômeno limitante era a ativação dos esporos. Suas constantes cinéticas de inativação térmica a 105, 110, 115, 121, 126 e 130°C foram para o fenômeno limitante K_a 0,008, 0,022, 0,12, 0,8, 3,5 e 11 minutos⁻¹, respectivamente. Avaliando esses dados verifica-se que essas constantes seguem Arrhenius com E_a igual a 377,20 kJ/mol e valor z igual a 7,74°C obtido a partir do valor da energia de ativação de acordo com a fórmula de Ramaswamy, Van de Voort e Ghazala (1989).

Reações de degradação de açúcares

A existência de pelo menos duas funções orgânicas (C=O e C-OH), na maioria dos carboidratos, dá a esses compostos sempre várias opções de transformações químicas, aumentadas ainda pelas diferenças de reatividade dos

diferentes grupos hidroxilas na mesma molécula. Entre essas degradações encontram-se a degradação alcalina, degradação em meio ácido, reações de Maillard com a degradação de Strecker e a caramelização (Bobbio; Bobbio, 1992).

Segundo Kelly e Brown (1978), a molécula de sacarose é termicamente estável a menos que seja hidrolisada produzindo as hexoses termolábeis glicose e frutose, sendo a frutose mais termolábil que a glicose. As taxas de reação de catálise hidrolítica são uma função complexa da concentração, temperatura, pH e sais. Em ordem decrescente, as taxas de hidrólise são: catálise por bases > sais > ácido. Como primeira aproximação, a sacarose é mais estável a pH=8. Meios ácidos (pH < 4,5), favorecem a formação de 5-hidroxi-metil-furfural (HMF), ao passo que a degradação alcalina dando origem a produtos estáveis, principalmente o ácido láctico, é favorecida em pHs superiores a 9. De acordo com Van Der Poel, Schiwek e Schwartz (1998) e De Bruijn, Kieboom e Van Bekkum (1986), o passo chave para as complexas reações de degradação alcalina envolve a formação de um ânion enediol e seu respectivo enediol. Segundo os autores, como regra, assume-se que 1,9 moles de ácidos totais resultam de 1 mol de monossacarídeos, dentre esses ácidos de um a mais de seis átomos de carbono, sendo o ácido láctico o principal produto formado (30-50% em base molar), nas condições de manufatura de açúcar de beterraba.

De acordo com Bobbio e Bobbio (1992), a reação de Maillard, muito importante nas condições de concentração de açúcares e temperatura elevadas, vem sendo estudada há quase 100 anos sem que se tenha chegado ao conhecimento completo do seu mecanismo. Van Der Poel, Schiwek e Schwartz (1998) e Bobbio e Bobbio (1992) apresentaram uma revisão completa do

mecanismo aceito para essas reações. Muitas variáveis afetam a velocidade da reação de Maillard, entre elas estrutura e concentração dos compostos, pH, temperatura, atividade de água e a presença de catalizadores ou inibidores, bem como luz e tempo (HARDY; PARMETIER; FANNI, 1999).

Segundo Van Der Poel, Schiwiek e Schwartz (1998) em condições de baixas concentrações, pH neutro ou levemente ácido, a reação de Maillard pode ser negligenciada (extração do caldo); em condições de baixas concentrações e pH alcalino (purificação do caldo), a reação de Maillard é de menor importância comparada à degradação alcalina nas condições encontradas na indústria de açúcar de beterraba. Entretanto as reações de hidrólise alcalina, não são relevantes para a indústria de açúcar de cana, por suas condições de calagem muito mais brandas, $\text{pH} < 9$. Em altas concentrações, condições alcalinas e temperatura elevada (evaporação e cristalização), entretanto, a reação de Maillard é de maior importância.

Karpun, Pismennyi e Semenova (1989) avaliaram que as perdas de açúcares durante a esterilização de soluções de melaço dependem do pH inicial, da proporção de açúcares invertidos em relação ao açúcar total e das propriedades de tamponantes das soluções de melaço. A esterilização das soluções de melaço foram conduzidas da seguinte maneira: 70°C por 30 minutos e 125°C por 10 minutos seguido de resfriamento a 30°C durante 180 minutos. Para melaços com pH inicial menores que 6,5 e que produziram queda de pH após a esterilização, as perdas de açúcares foram inferiores a 2%. Valores de perda de açúcares tão baixos quanto 0,2 e 0,4% foram obtidos com soluções de melaço com pHs iniciais de 5,55 e 5,75 respectivamente.

Numa revisão sobre o efeito do calor sobre a funcionalidade de nutrientes (proteínas, carboidratos, lipídeos e micronutrientes) em alimentos, Hardy, Parmetier e Fanni (1999) concluíram que o uso do calor é ainda o processo industrial mais efetivo porque os efeitos positivos sobre as propriedades organolépticas e sensoriais prevalecem, sendo apenas uma questão de otimização. É este tipo de enfoque que foi aplicado na presente pesquisa.

Nomenclatura

D: índice de redução decimal a temperatura constante (unidades de tempo)

D_{60C} : índice de redução decimal a 60C (unidades de tempo)

E_a : Energia de ativação, (kJ/mol)

K_a : constante de ativação térmica da população de esporos dormentes (unidades de tempo⁻¹).

K_d : constante de inativação térmica da população de esporos ativa e termo sensível (unidades de tempo⁻¹).

z : Coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (unidades de temperatura).

Referências

ABRAHAM, G.; DEBRAY, E.; CANDAU, Y.; PIAR, G. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.10, p. 3073-3080, 1990.

ALCARDE, V. E.; GALLO, C. R.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. **Semina. Revista Cultural E Científica Da Universidade Estadual De Londrina**, v. 17, n. 2, p. 223-227, 1996.

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

ASM - AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 2002. **Report examines use of antibiotics in agriculture.** Disponível em <<http://www.sciencedaily.com/releases/2002/10/021028072947.htm>.> Acesso em 27 Set. 2004

BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 6, p.1242-1246, 1986.

BENDER, G. R.; MARQUIS, R. E. Spore heat resistance and specific mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p.1414-1421, 1985.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. 1992. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed., São Paulo: Varela, 1992. 222 p.

BRAZZACH, M. L. **Emprego de desinfetantes químicos em fermentação alcoólica de mosto de melão de cana**. 1970. 39 p. Tese de doutorado - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1970.

BROMBERG, R.; YOKOYA, F. Chemical modification of cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT105 and their effect on flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 508-511, 1995.

BURTON, H.; PERKIN, A. G.; DAVIES, F. L.; UNDERWOOD, H. M. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. **Journal of Food Technology**, v. 12, p. 149-161, 1977.

BUSTA, F. F. Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultrahigh temperatures. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 640-645, 1967.

CASADEI, M. A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J. E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **Internation Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 125-134, 2001. Disponível em: <www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro> Acesso em 16 mar. 2004

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. COORDENADORIA INDUSTRIAL. Controle microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, 22, 2-17. 1983a.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. DIVISÃO INDUSTRIAL. Manual de controle microbiológico da usina de açúcar e álcool. **Cadernos Copersucar - Série Industrial**, Piracicaba, 5, 1-10. 1983b.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. Perdas na fermentação: é possível reduzir! **Industrial Informa**, Piracicaba, n. 50, p. 1-2, 1996.

CHRISTOFOLETTI, A. J.; NOLASCO, J. J.; FINGUERUT, J. **Tratamento de caldo e incrustação no processo de esterilização de mosto**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1998, p. 1-22, RT-827-97/98.

DAVIES, F. L.; UNDERWOOD, H. M.; PERKIN, A. G.; BURTON, H. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. **Journal of Food Technology**, v. 12, p. 115-129, 1977.

DE BRUIJN, J. M.; KIEBOOM, A. P. G.; VAN BEKKUM, H. Alkaline degradation of monosaccharides* Influence of reaction parameters upon the final product composition. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 105, p. 176-183, 1986.

EVANS, T. H.; HIBBERT, H. Bacterial polysaccharides. **Advances in carbohydrate chemistry**, New York, v. 2, p. 203-233, 1946.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H. A.; ROSSELL, C. E. V. Fermentação alcoólica em usinas cooperadas: evolução e perspectivas. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 23, p. 8-11, 1983.

FORMAGGIO, G. J.; FINGUERUT, J. **Produção específica de ácidos orgânicos**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1998, p. 1-12, RT963-99/00.

FRANCHI, M. A.; SERRA, G. E.; CRISTIANINI, M. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. **J. Food Sci.** v. 68, n. 7, p. 2310-2315, 2003b.

FRANCHI, M. A.; SERRA, G. E.; SVILOSEN, J.; CRISTIANINI, M. Thermal death kinetics of bacterial contaminants during cane sugar and alcohol production. **International Sugar Journal**, v. 105, n. 1259, p. 527-530, 2003a.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1990. 388 p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1990.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão. **Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n.4/5, p. 35-40, 1991.

GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 185-209, 2000.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J. The sourdough microflora. interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 275-279, 1994.

GOUTHIER, H. A.; MASSAGUER, P. R. Determinação da resistência térmica de microrganismos indicadores da esterilização em caldo de cana. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, XIV, 1987, Viçosa-MG. **Resumo.** Viçosa: Imprensa Universitária, 1987, D12, p. 46-47.

HARDY, J.; PARMETIER, M.; FANNI, J. Functionality of nutrients and thermal treatments of food. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 579-585, 1999.

HELDMAN, D. R.; NEWSOME, R. L. Kinetic models for microbial survival during processing. **Food Technology**, v. 57, n. 8, p. 40-46, 2003.

KAJI, D. A. **Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica**. 1989. 126 p. Dissertação de Mestrado - Univ Estadual de Campinas-UNICAMP-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1989.

KARPUN, E. V.; PISLMENNYI, V. V.; SEMENOVA, I. A. Influence of thermal sterilization on sugar losses in molasses solutions. **Biotekhnologiya**, v. 2, p. 168-172, 1989.

KELLY, F. H. C.; BROWN, D. W. Thermal decomposition and colour formation in aqueous sucrose solutions. **Sugar Technology Reviews**, Holanda, v. 6, n. 1, p. 1-48, 1978.

KESSLER, H. G. **Food engineering and dairy technology**. Germany. Verlag A. Kessler, 1981. 654 p.

LEDERGERBER, U.; REGULA, G.; STEPHAN, R.; DANUSER, J.; BISSIG, B.; STÄRK, K.D.C. Risk factors for antibiotic resistance in *campylobacter spp.*

isolated from raw poultry meat in Switzerland. **BMC Public Health**, v. 3, n. 39, 2003. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/39/abstract>>. Acesso em 15 set. 2004.

LIMA, T. C. S.; GRISI, B. M.; BONATO, M. C. M. Bacterial isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalcanoates and resistance to antibiotics. **Rev Microbiol**, v. 30, p. 214-224, 1999.

LUCREDI, A. H.; FINGUERUT, J.; LEIMER, K. H.; ROSSELL, C. E. V.; YOKOYA, F. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana de açúcar para a fermentação. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 27, p. 25-28, 1984.

MACMASTER, L.; RAVNÖ, A. B. Sucrose loss in diffusion with reference to thermophilic bacteria and lactic acid. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, p. 49-52, 1975.

MAEDA, A. H. **Estudo de bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool**. 1999. 67 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1999.

MELLON, M. Prescription for trouble: Use of antibiotics to fatten livestock. **Nucleus**, v. 20, n. 4. 1998. Disponível em:

<<http://www.ucsusa.org/publications/nucleus.cfm?publicationID=192>> Acesso em:
27 fev. 2002.

NEGRO, M. R. G. O. C.; YOKOYA, F.; EBERLIN, M. N. The chemical composition of “canjica” a polymeric material found in brazilian sugar cane industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 625-630, 2003.

NGANG, E. J. J.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of *lactobacilli* during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 8, p. 741-746, 1992.

NOLASCO, J. J.; FINGUERUT, J. **Balço de bactérias na fermentação contínua**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1996, p. 1-22, RT-764-95/96.

NOLASCO, J. J.; FINGUERUT, J. **Esterilização de mosto-processo cip/sip**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1998, p. 1-22, RT-835-97/98.

NOLASCO, J. J.; FINGUERUT, J. **Projeto floculação-fase I-caracterização e proposta de um índice de floculação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1993, p. 1-12, RT-674/93.

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

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

OLIVEIRA, D. T.; PIZAIA, W.; ACKERMANN, H. P. H.; ROSSELL, C. E. V. Alternativas de Processo no Tratamento do Caldo para Destilaria. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 36, p. 25-31, 1987.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*, **Sci agric**, v. 55, n. 3, p. 1-12, 1998.

PELEG, M. Modeling Microbial Populations with the Original and Modified Versions of the Continuous and Discrete Logistic Equations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 5, p. 471-490, 1997.

PERIAGO, P. M.; FERNÁNDEZ, P. S.; OCIO, M. J.; MARTINEZ, A. A predictive model to describe sensitization of heat-treated *Bacillus stearothermophilus* spore to NaCl. **Z. Lebensm Unters Forsch A**, v. 206, p. 58-62, 1998.

PERKIN, A. G.; BURTON, H.; UNDERWOOD, H. M.; DAVIES, F. L. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. **J. of Food Technololy**, v. 12, p. 131-148, 1977.

PFLUG, I. J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**. 7ªedição. Minneapolis, MN. Environmental Sterilization Laboratory, 1990. 444 p.

PRUITT, K. M.; KAMAU, D. N. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 221-231, 1993.

RAMASWAMY, H. S.; VAN DE VOORT, F. R.; GHAZALA, S. An analysis of tdt and arrhenius methods for handling process and kinetic data. **Journal Of Food Science**, v. 54, n. 5, p. 1322-1326, 1989.

RODRIGUEZ, A. C.; SMERAGE, G. H.; TEIXEIRA, A. A.; LINDSAY, J. A.; BUSTA, F. F. Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes. **Journal of Food Process Engineering**, v. 15, p. 1-30, 1992.

STROPPA, C. T.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E. Use of penicillin and monesin to control bacterial contamination of brazilian alcohol fermentations. **Int. Sugar Journal**, v. 102, n. 1214, p. 78-82, 2000.

STROPPA, C. T.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. **STAB- Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 16, p. 35-38, 1998.

THAL, L. A.; ZERVOS, J. M. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 171-176, 1999.

TROMBINI, M. A. M.; ROVANHOL, A. A.; VITTI, L. S. S.; BEDA, D. F.; PORTO, R. C. B.; SÁ, J. S. Causas da contaminação e suas conseqüências em usinas de açúcar e álcool. **STAB.**, v. 16, n. 6, 18p., 1988.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. On the use of Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 139-159, 2002.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J.; STOBBERINGH, E. E. Antibiotic resistance of *faecal enterococci* in poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 497-505, 2002.
Disponível em: < <http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>>

VAN DER POEL, P. W.; SCHIWEK, H.; SCHWARTZ, I. 1998. **Sugar technology: beet and cane sugar manufacture**. Berlin: Verlag Dr. Albert Bartens KG, 1998.

WESCOTT, G. G.; FAIRCHILD, T. M.; FOEGEDING, P. M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 446-450, 1995.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. **Rev Microbiol**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 12-16, 1991.

Capítulo 3

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA HIDRÓLISE DA SACAROSE EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Artigo que será submetido à revista Journal of Food Process Engineering, segundo normas de submissão da revista.

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA HIDRÓLISE DA SACAROSE EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

J. Nolasco Junior¹ e P.R. De Massaguer²

^{1,2} Universidade de Campinas-UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) /Departamento de Ciência de Alimentos, Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas-São Paulo/Brasil C.P. 6121 – CEP 13083-862.

¹A quem correspondência deve ser enviada. R 13 de maio, 1727, 13419-270, Piracicaba-SP-BRASIL, fone +55-021-19-34225966, Jonas.nolasco@terra.com.br.

Running Title: Hidrólise Térmica da Sacarose Em Mosto

Resumo

Avaliou-se a cinética de hidrólise da sacarose em mosto de fermentação alcoólica à base de caldo de cana e melaço contendo 21.5% de sólidos solúveis e pH = 6.14 nas temperaturas 110, 120, 130 e 140C, pelo método do tubo TDT, determinando a sacarose remanescente por HPLC. A curva da sacarose remanescente apresentou forte não linearidade com ombro inicial ou atraso térmico e cauda final que foram bem ajustadas através de modelo logístico. As constantes cinéticas, k , variaram de 0.21 h^{-1} a 2.64 h^{-1} , enquanto os atrasos térmicos variaram de 13.27 h a 1.14 h na faixa de temperatura estudada. A energia de ativação através da equação de Arrhenius e valor z obtidos foram 112.32 kJ/mol e 26.99°C, respectivamente.

Introdução

O álcool produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto que é formado de caldo de cana e melaço proveniente do processo de fabricação de açúcar. O mosto, por suas características físico-químicas, sustenta uma microbiota diversa que é enviada ao processo de fermentação onde compete pelo substrato com a levedura do processo, e é frequentemente associada com o elevado nível de perdas encontrado no setor de produção de álcool, 1.5 a 5% de queda no rendimento fermentativo (Evans e Hibbert 1946; Centro de Tecnologia Copersucar 1983a; Centro de Tecnologia Copersucar 1983b; Kaji 1989; Klaushofer *et al.* 1998; Gallo e Canhos 1991; Centro de Tecnologia Copersucar 1996; Formaggio e Finguerut 1998; Trombini *et al.* 1988; Yokoya e Oliva-Neto 1991; Nolasco e Finguerut 1993; Bromberg e Yokoya 1995; Alcarde e Yokoya 2003; Oliva-Neto e Yokoya 1997; Stroppa *et al.* 1998; Oliveira-Freguglia e Horii 1998; Negro *et al.* 2003).

As estratégias de controle desses contaminantes tem se concentrado no uso de produtos antibióticos (Stroppa *et al.* 2000), sendo que o uso industrial desses produtos tem sido correlacionado com o aparecimento do fenômeno de resistência a antibióticos por bactérias nocivas ao Homem (Thal e Zervos 1999; Van Den Bogaard *et al.* 2002, Lima *et al.* 1999).

A decisão de se projetar um processo térmico para inativação desses contaminantes do mosto pressupõe o estudo da resistência térmica tanto do microrganismo alvo do processo quanto da sacarose, ambos nas condições de Brix e pH encontrados nas Usinas. Quanto à resistência térmica, a sacarose

invariavelmente hidrolisa primeiro para as hexoses termolábeis glicose e frutose, sendo a frutose mais termolábil que a glicose, em qualquer reação de degradação térmica. Esta é uma reação estudada há muito tempo, embora a maioria dos estudos cinéticos estejam relacionados principalmente à hidrólise em soluções diluídas e fortemente acidificadas, condições estas em que a energia de ativação variou de 108.4 a 111.3 kJ/mol (Kelly e Brown 1978; Edye e Clarke 1996). Wiene e Shallenberger (1988) avaliando soluções de sacarose em pHs 1.0, 1.5 e 2.0 concluíram que a hidrólise ácida independe do tipo de ácido mas sim do pH da solução e propuseram uma equação em função do pH e temperatura que estima o tempo em horas para inversão de 99,99% da sacarose. Vukov (1965) analisando extensa coletânea de dados de hidrólise de sacarose publicados, avaliou que a energia de ativação variou de 25.1 a 26.8 kcal/mol. Baseado nessa extensa coletânea de dados, propôs uma equação para o cálculo da constante da cinética de primeira ordem da hidrólise da sacarose em meio ácido, básico e em função da presença de sais. Em meio ácido a equação abrange dados de concentração de sacarose na faixa de 0 a 0.9 g/ml, temperaturas de 20 a 130C e valores de pH de 1.0 a 6.5. Clarke *et al.* (1977), estudando a hidrólise da sacarose utilizando HPLC, ressaltaram na revisão bibliográfica sobre o assunto que os estudos anteriores de cinética da hidrólise da sacarose, fartamente disponíveis na literatura há mais de cem anos, usaram na sua maioria, soluções diluídas de sacarose com aproximadamente 3°Brix obtendo-se cinéticas de primeira ordem, comportamento freqüentemente esperado de nutrientes em geral quando submetidos a tratamento térmico (Leonard *et al.* 1986; Stumbo 1973 *apud* Lenz e Lund 1980). Ainda sobre tais estudos anteriores, Clarke *et al.* (1977) citaram problemas relativos à

metodologia adotada como o uso de métodos inespecíficos tais como polarização ou titulação das substâncias redutoras de cobre e variação de pH. Vukov e Pátkai (1981), sugeriram um valor de z igual a $26K = 26C$ para a hidrólise da sacarose em pH 10 -11.

Esta pesquisa teve como objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise da sacarose nas hexoses termolábeis glicose e frutose, por ser este o primeiro passo nas reações de decomposição térmica da sacarose. Esses dados são necessários em projeto de otimização do processo de tratamento térmico para inativação das bactérias contaminantes de mostos de fermentação alcoólica.

Materiais e Métodos

Ensaio de cinética

A determinação da cinética da hidrólise da sacarose, primeiro passo da destruição térmica dos açúcares do mosto (sacarose, glicose e frutose), foi feita pelo método do tubo TDT fechado, segundo Stumbo (1973). As temperaturas para os ensaios cinéticos foram 110, 120, 130 e 140C. Os tubos TDT (6 mm DI x 8 mm DE x 100mm de comprimento), em duplicata para cada um de pelo menos 8 tempos de tratamento, foram preenchidos com 2 ml do mosto, selados com maçarico e colocados em banho de óleo termostático Polystat® PolyScience modelo G12105-20, IL. USA, precisão $\pm 0.1C$, ajustado à temperatura do ensaio. À cronometragem de tempo para a amostragem foi adicionado um atraso térmico (lag) de 3 minutos para o tubo atingir a temperatura do ensaio.

Determinação do atraso térmico (lag) do tubo TDT

O atraso térmico (lag) para cada temperatura foi determinado com um tubo TDT contendo 2 ml de mosto e com um termopar tipo T flexível, TT-36 fio Ômega duplex, localizado no centro geométrico do tubo e medido em minutos para atingir a temperatura de tratamento.

Preparo do mosto

O mosto a 21.5°Brix composto por 15% (v/v) de caldo dos filtros a 13.2°Brix, 22% (v/v) de mel final a 60°Brix e o restante 63% (v/v) de caldo de cana do segundo terno de extração da moenda a 10°Brix, foi clarificado para remoção de impurezas à semelhança do processo de clarificação industrial, e mantido resfriado a 0C em câmara fria até a realização dos ensaios cinéticos. O processo de clarificação consistiu de adição de ácido fosfórico 0.25 ml/litro de mosto, calagem com leite de cal a 10°Be até pH = 6.4 seguido de aquecimento até fervura a pressão atmosférica, dosagem de polímero aniônico (4 ml/litro de mosto) e decantação à temperatura levemente abaixo da temperatura de ebulição, em kit de decantação composto de quatro provetas graduadas de 1 litro, dotado de lâmpadas incandescentes com regulador de intensidade luminosa para controle de temperatura interna do kit. Após o processo de clarificação o mosto resultante apresentou 21.5°Brix e pH = 6.14. Os tratamentos térmicos foram realizados no laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

Metodologia de análise da sacarose

A cinética da hidrólise da sacarose foi estudada pela análise da sacarose remanescente, determinada por HPLC (Icunsa-Method GS7-23 1994), em cromatógrafo com membrana de filtração de amostra de acetato/nitrato de celulose de 0.45 μ de porosidade, pré coluna Shodex KS-801 (6 mm DI x 50 mm de comprimento), coluna Shodex KS-801 (8 mm DI x 300 mm de comprimento), detector de índice de refração e solução de NaOH 0,0005 N a 0.4 mL/min como fase móvel, realizada no Centro de Tecnologia Copersucar em Piracicaba-SP.

Na temperatura de 140C foram realizados ensaios de cinética complementares em nos tempos 2, 2.25 e 2.5 h em que a sacarose remanescente foi analisada por HPLC em cromatógrafo com coluna CarboPac Pa-1, detector de amperometria pulsada e solução de hidróxido de sódio 150 mM a 1.0 mL/min como eluente, realizada na Universidade Estadual de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

Ajuste do modelo cinético

Os dados de sacarose remanescentes foram tratados através de modelo logístico em virtude desse modelo se ajustar bem a cinéticas que apresentam atraso térmico inicial (lag) e cauda (tail) final (Pruitt e Kamau 1993). Esses autores propuseram o uso do modelo logístico (Eq.1), para a destruição de bactérias cujas curvas de sobreviventes apresentam atraso térmico e onde os modelos exponenciais simples fornecem ajuste pobre. O mesmo modelo foi usado para estudar a cinética de hidrólise térmica da sacarose.

$$S = \frac{(1 + e^{-k\tau})}{(1 + e^{k(t-\tau)})} \quad (1)$$

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por regressão não linear através do Software Statistica® 6.0.

Relação entre constantes de velocidade, Energia de Ativação e os parâmetros D e z

O valor de energia de ativação foi obtido da equação de Arrhenius que relaciona as constantes cinéticas de inativação térmica com o inverso da temperatura absoluta. A transformação para z foi implementada mediante a fórmula de Ramaswamy *et al.* (1989) utilizando $T_{\text{mínimo}} = 383.15 \text{ K}$ e $T_{\text{máxima}} = 413.15 \text{ K}$.

Pruitt e Kamau (1993), sugeriram que uma melhor estimativa para os valores de D para curvas ajustadas pelo modelo logístico, são obtidas usando os parâmetros estimados para calcular o tempo em que $S = 0.1$, o que por definição é o valor D. Substituindo $t = D$ e resolvendo para D a Eq.(1) resulta na Eq. (2).

$$D = \tau + \frac{[\ln(9 + 10 \times e^{-k\tau})]}{k} \quad (2)$$

Os valores z também foram calculados segundo (Bigelow e Esty 1920 *apud* Pflug, 1990) em que z é o inverso negativo da inclinação da curva fantasma $\log D$ versus temperatura.

Resultados e Discussão

Os parâmetros cinéticos k e τ (Fig. 1, Tab. 1) do modelo logístico, Eq.(1), foram obtidos pela regressão não-linear de dados de sacarose remanescente em função do tempo. A extensão da reação de hidrólise foi acompanhada pela determinação da sacarose remanescente ao invés de se estudar os produtos formados, porque a diminuição da concentração da sacarose não pode ser seguida integralmente pela respectiva formação das hexoses glicose e frutose, devido a ocorrência concomitante tanto da hidrólise da sacarose quanto da decomposição térmica das hexoses termolábeis. O parâmetro τ que expressa o tempo de atraso térmico, diminui com o aumento da temperatura, passando de 13.27 horas a 110C para 1.14 horas a 140C.

Figura 1

Tabela 1

A energia de ativação da hidrólise, determinada avaliando a influência da temperatura nas constantes de velocidade de reação, segundo o modelo de Arrhenius, foi de 112.2 kJ/mol (26.83 kcal/mol), Fig. 2A, o que fornece um valor

de z de 26.99C na faixa de temperatura de 110 a 140C, calculado segundo Ramaswamy *et al.* (1989). Os valores de D calculados segundo a Eq. (2) estão na Tabela 1 e foram usados para calcular o valor z, determinado pelo inverso negativo da declividade da curva de log (D) versus temperatura, Fig. 2B. O valor z calculado dessa forma foi de 27.56C e difere em 2.11% dos valores calculados a partir da energia de ativação como sugere Ramaswamy *et al.* (1989).

Figura 2

As energias de ativação e o parâmetro de resistência térmica z obtidos nesse trabalho estão em conformidade com os dados fornecidos por Vukov (1965) e por Vukov e Pátkai (1981), respectivamente. Entretanto as magnitudes das constantes de velocidade de hidrólise térmica da sacarose obtidas neste trabalho de pesquisa foram muito maiores quando comparadas com as constantes de velocidade calculadas através da Eq. (3) abaixo, proposta por Vukov (1965). Os valores das constantes de primeira ordem da hidrólise térmica da sacarose, calculadas substituindo os valores apropriados do mosto (Tab. 2) na Eq.(3) de Vukov (1965) a 110C, 120C e 130C, foram $0.0048h^{-1}$, $0.0112 h^{-1}$, $0.0253h^{-1}$, respectivamente. Esta equação, além de expressar o efeito da temperatura na velocidade de reação, também leva em conta o efeito do pH e das características de densidade e concentração de sacarose da solução.

$$\log(k_a) = 16.91 + \log(d - c) - \frac{5670}{T} - pH \quad (3)$$

Tabela 2

De acordo com Clarke *et al.* (1977) a hidrólise da sacarose é uma reação de segunda ordem, dependente do pH e do solvente e diretamente dependente da temperatura. Esses autores avaliaram a hidrólise da sacarose a 60°Brix por HPLC, mesma metodologia de análise da sacarose aqui adotada, e obtiveram curvas de sacarose remanescentes sigmoidais embora não calcularam as constantes cinéticas. Ainda segundo os mesmos autores em soluções de sacarose a 3°Brix, a concentração de água pode ser considerada constante e seguir cinética linear de inversão, o que não é o caso das condições encontradas nas refinarias (60°Brix ou 40% água). O pH tem sido considerado fator não influenciar em soluções muito diluídas o que não é o caso de soluções mais concentradas. A não linearidade das curvas da sacarose remanescentes (Fig. 1) encontradas neste trabalho a 21.5°Brix e pH=6.14 estão de acordo com os resultados obtidos por Clarke *et al.* (1977) em soluções mais concentradas.

Conclusão

A hidrólise da sacarose em mosto de 21.5°Brix e pH=6.14 induzida pelo calor mostrou-se nitidamente não linear apresentando atrasos térmicos e cauda final que foram muito bem ajustados por um modelo logístico. Quanto às condições do mosto o pH é essencialmente o usado nas Usinas, entretanto o Brix pode variar em função das estratégias de produção adotadas. Optou-se por 21.5°Brix, porque altas concentrações de açúcares no mosto resultam em vinhos

fermentados de teores alcoólicos elevados, e fermentações mais eficientes. Entretanto é interessante avaliar essa cinética variando a concentração do mosto desde 10-25°Brix por ser uma faixa de concentração que atende à mais ampla faixa de estratégia de produção nas Usinas. Os parâmetros aqui obtidos serão importantes na otimização do processo de esterilização do mosto a ser desenhado, o que exige o estudo da resistência térmica das hexoses termolábeis glicose e frutose e do microrganismo alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Tecnologia Copersucar pelo apoio financeiro deste projeto.

Nomenclatura

C: concentração da sacarose (g/ml)

d : densidade da solução em g/ml

D: índice de redução decimal a temperatura constante (unidades de tempo)

DE: diâmetro externo dos tubos TDT (mm)

DI: diâmetro interno dos tubos TDT (mm)

Ea : Energia de ativação, (kJ/mol)

HPLC: “High Pressure Liquid Chromatography”

k_a : constante de hidrólise da sacarose da equação de Vukov (1965) (min^{-1})

k : a constante de degradação hidrolítica específica máxima, (h^{-1})

°Be: densidade específica de soluções. Na indústria sucroalcooleira é usada para expressar concentração de soluções de leite de Cao (2g de substância seca/100 ml de solução)

°Brix: concentração de sólidos solúveis (%m/m)

R: constante geral dos gases = 8.314×10^{-3} kJ/molK

S: (x / x_0) : Fração de sacarose remanescente no tempo t

T: temperatura absoluta (K)

TDT: tempo de destruição térmica

x : a concentração de sacarose (%m/m) no tempo t

x_0 : concentração de sacarose (%m/m) quando t=0

z : coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (unidades de temperatura)

τ : uma medida do atraso térmico na reação de hidrólise, (h)

Referências

ALCARDE, V.E. e YOKOYA, F. 2003. Efeito da População de Bactérias na Flocculação de Leveduras Isoladas de Processos Industriais de Fermentação Alcoólica. STAB. 21(4), 40-42.

BROMBERG, R. e YOKOYA, F. 1995. Chemical modification of cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 105 and their effect on flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11, 508-511.

- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 1996. Perdas na fermentação: é possível reduzir! Piracicaba: INDUSTRIAL INFORMA 50, 1-2.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. COORDENADORIA INDUSTRIAL. 1983a. Controle Microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. Boletim Técnico Copersucar 22, 2-17.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. DIVISÃO INDUSTRIAL. 1983b. Manual de Controle Microbiológico da Usina de Açúcar e Álcool. Cadernos Copersucar - Série Industrial 5, 1-10.
- CLARKE, M.A., BRANNAN, M.A. AND CARPENTER, F.G. 1977. A Study of Sugar Inversion Losses By High Pressure liquid Chromatography (HPLC). In Cane Sugar Refining Technical Session, New Orleans, 1976. Proceedings. New Orleans: U.S. Department of Agriculture 46-56.
- EDYE, L.A. and CLARKE, M.A. 1996. Sucrose Loss and Color Formation in Evaporators. In: International Society of Sugar Cane Technologists Congress, 22, Cartagena, Sept 11-15, 1995. Proceedings. Cali: Tecnicaña 1, 238-245.
- EVANS, T.H. and HIBBERT, H. 1946. Bacterial polysaccharides. In: Advances in carbohydrate chemistry 2, 203-233. Academic Press, Inc. New York.
- FORMAGGIO, G.J. e FINGUERUT, J. 1998. Produção específica de ácidos orgânicos. Piracicaba: Relatório Técnico Copersucar RT963-99/00, 1-12.
- GALLO, C.R. e CANHOS, V.P. 1991. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão. Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos Piracicaba 9(4-5), 35-40.

- ICUNSA-METHOD GS7-23. 1994. The determination of Sucrose, Glucose and Fructose in Cane Molasses by HPLC-tentative.
- KAJI, D.A. 1989. Influência da Temperatura e Infecção Láctica na Fermentação Alcoólica. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.
- KELLY, F.H.C and BROWN, D.W. 1978. Thermal Decomposition and colour formation in aqueous sucrose solutions. *Sugar Technology Reviews* 6(1), 1-48.
- KLAUSHOFER, H., CLARKE, M.A, REIN, P.W and MAUCH, W. 1998. Microbiology. In *Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture*, (Van der Poel, P.W, Schiweck H. and Schwartz T., authors) pp 993 – 1008, Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin.
- LENZ, M.K. and LUND, D.B. 1980. Experimental Procedures For Determining Destruction Kinetics of Food Components. *Food Technology* 34(2), 51-55.
- LEONARD, S.J., MERSON, R.L., MARSH, G.L. and HEIL, J.R. 1986. Estimating Thermal Degradation in Processing of Foods. *J. Agric. Food Chem.* 34, 392-396.
- LIMA, T.C.S, GRISI, B.M. and BONATO, M.C.M. 1999. Bacterial Isolated From a Sugarcane AgroEcosystem: Their Potential Production Of Polyhydroxyalcanoates And Resistance To Antibiotics. *Rev Microbiol.* 30, 214-224.
- NEGRO, M.R.G.O.C., YOKOYA, F. and EBERLIN, M.N. 2003. The Chemical Composition Of “Canjica” A Polymeric Material Found In Brazilian Sugar

- Cane Industry. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19(6), 625-630.
- NOLASCO, J.J. e FINGUERUT, J. 1993. Projeto Floculação- Fase I- Caracterização e Proposta de um Índice de Floculação. Piracicaba: Relatório Técnico Copersucar RT-674/93. 1-12.
- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 1997. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. Revista de Microbiologia 28, 25-31.
- OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M. e HORII, J.1998. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. Sci agric. 55(3), 1-12.
- PFLUG, I.J. 1990. Microbiology and Engineering of Sterilization Processes. Environmental Sterilization Laboratory, 7ªedição, Minneapolis, MN.
- PRUITT, K.M. and KAMAU, D.N. 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. Journal of Industrial Microbiology 12, 221-231.
- RAMASWAMY, H.S., VAN DE VOORT, F.R. and GHAZALA, S. 1989. An Analysis of TDT and Arrhenius Methods for Handling Process and Kinetic Data. Journal of Food Science 54(5), 1322-1326.
- STROPPIA, C.T., ANDRIETTA, M.G.S., ANDRIETTA, S.R., STECKELBERG, C., and SERRA, G.E. 2000. Use Of Penicillin And Monesin To Control Bacterial Contamination Of Brazilian Alcohol Fermentations. Int. Sugar Journal 102(1214), 78-82.

- STROPPA, C.T., STECKELBERG, C., SERRA, G.E., ANDRIETTA, M.G.S. e ANDRIETTA, S.R. 1998. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. STAB- Açúcar, Álcool e Subprodutos 16, 35-38.
- STUMBO, C.R. 1973. Thermobacteriology in Food Processing. 2nd edição. Academic Press New York.
- THAL, L.A. and ZERVOS, J.M. 1999. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43, 171-176.
- TROMBINI, M.A.M., ROVANHOL, A.A., VITTI, L.S.S., BEDA, D.F., PORTO, R.C.B. e SÁ, J.S. 1988. Causas da Contaminação e suas conseqüências em Usinas de Açúcar e Álcool. STAB.16(6), 18p.
- VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J. and STOBBERINGH, E.E. 2002. Antibiotic resistance of faecal *enterococci* in poultry slaughterers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49, 497-505. Disponível em <http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>.
- VUKOV, K. 1965. Kinetic Aspects of Sucrose Hydrolysis. Int. Sugar Journal 67, 172-175.
- VUKOV, K. and PÁTKAI, G. 1981. Rechnerische Methode zur Ermittlung von äquivalenten Wärmeeingwirkungszeiten für den Zuckerabbau in Säften. Zuckerind.106(4), 314-318.
- WIENEN, W.J. and SHALLENGERGER, R.S. 1988. Influence of Acid and Temperature on the Rate of Inversion of Sucrose. Food Chemistry 29, 51-55.

YOKOYA, F. e OLIVA-NETO, P. 1991. Características da Flocculação de Leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. Rev Microbiol. 22(1), 12-16.

TABELA 1.

PARÂMETROS CINÉTICOS ESTIMADOS PARA OS MODELOS LOGÍSTICOS AJUSTADOS À HIDRÓLISE TÉRMICA DA SACAROSE EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) E VALORES D

T(°C)	τ (h)	k (h ⁻¹)	r ²	Teste F	F de significação	^a D (h)
110	13.27	0.21	99.93	20574.24	< 0.01	24.05
120	5.37	0.45	99.48	1341.75	< 0.01	10.44
130	2.40	1.16	99.90	5994.00	< 0.01	4.35
140	1.14	2.64	99.81	6238.00	< 0.01	1.99

^aCalculados segundo a equação (2).

TABELA 2.

PARÂMETROS DO MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) PARA USO NA EQ. (3) DE
VUKOV (1965).

T (°C)	T (K)	D (g/ml)	C (g/ml)	pH
110	383.15	1.0196	0.1741	6.14
120	393.15	1.0121	0.1748	6.14
130	403.15	1.0033	0.1737	6.14

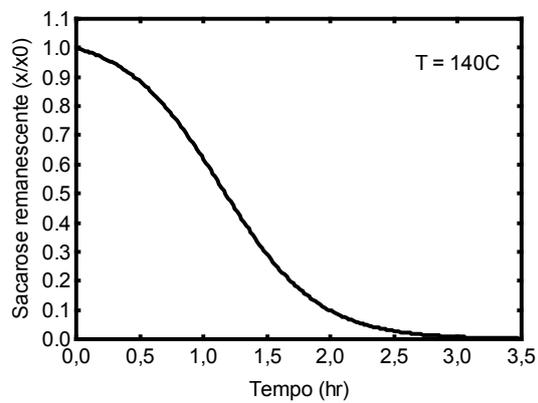
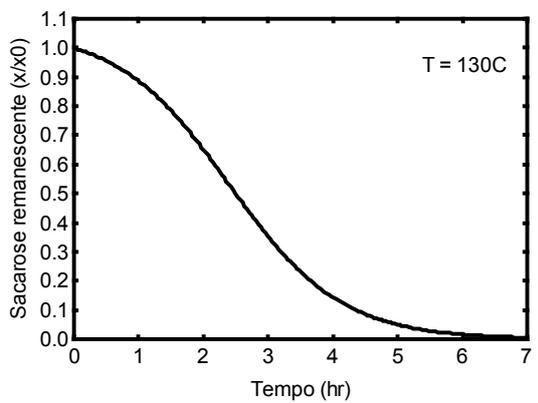
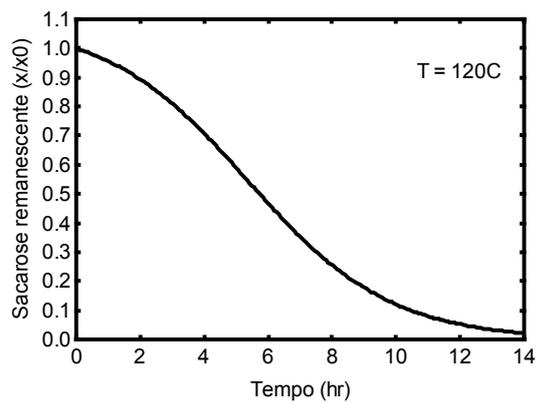
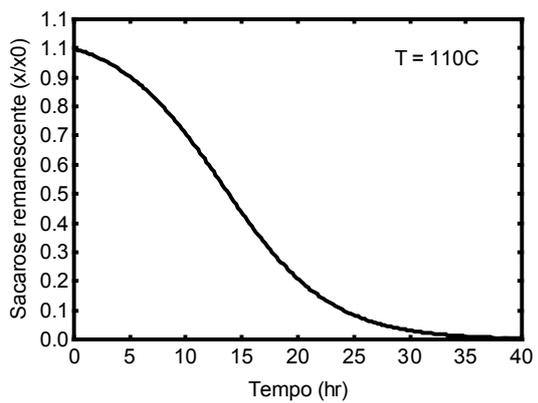


FIG. 1. DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA SACAROSE. PONTOS EXPERIMENTAIS DOS TRATAMENTOS A TEMPERATURA CONSTANTE E AS CURVAS AJUSTADAS A MODELO LOGÍSTICO SIMPLES (EQ. 1) EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5° BRIX). CONSTANTES CINÉTICAS NA TABELA 2.

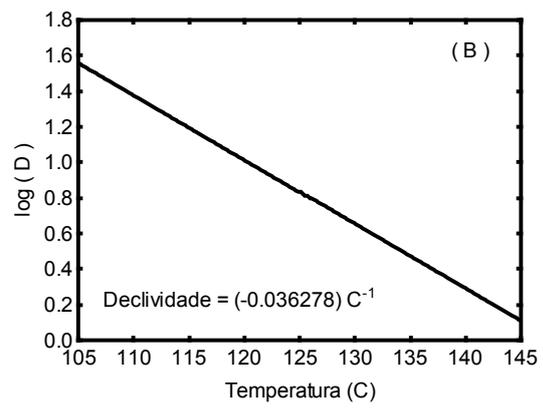
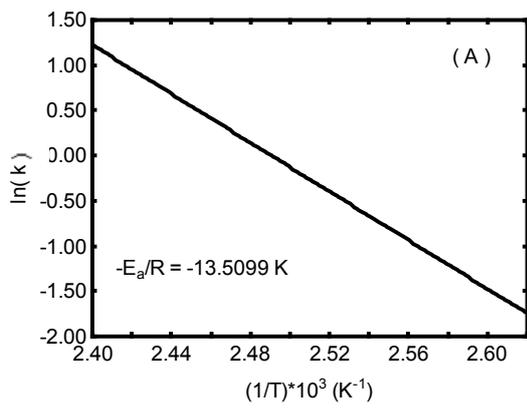


FIG. 2. (A) GRÁFICO DE ARRHENIUS PARA OBTENÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) ($R^2 = 0.997$, $F = 753.36$, F DE SIGNIFICAÇÃO = 0.0013), (B) CURVA FANTASMA PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z PARA HIDRÓLISE DA SACAROSE EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) ($R^2 = 0.9996$, $F = 4469$, F DE SIGNIFICAÇÃO = 0.000224).

Capítulo 4

**DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA
DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE GLICOSE E FRUTOSE EM MOSTO
DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**Artigo que será submetido à revista Journal of Food Process
Engineering, segundo normas de submissão da revista.**

**DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA DEGRADAÇÃO
TÉRMICA DE GLICOSE E FRUTOSE EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

J. Nolasco Junior ¹ e P.R. De Massaguer²

**^{1,2} Universidade de Campinas-UNICAMP, Faculdade de Engenharia de
Alimentos (FEA) /Departamento de Ciência de Alimentos, Rua Monteiro
Lobato, 80, Campinas-São Paulo/Brasil C.P. 6121 – CEP 13083-862.**

**¹A quem correspondência deve ser enviada. R 13 de maio, 1727, 13419-270,
Piracicaba-SP-BRASIL, fone +55-021-19-34225966,
Jonas.nolasco@terra.com.br**

Running Title: Degradação térmica de glicose e frutose em mosto

Resumo

Avaliou-se a cinética de destruição térmica dos açúcares presentes em mosto à base de caldo de cana e melaço (21.5°BRIX e pH = 6.14) para fermentação alcoólica em temperaturas entre 110-140C, pelo método do tubo TDT usando HPLC como metodologia de análise dos açúcares remanescentes. O estudo analisou a cinética tanto dos açúcares redutores totais remanescentes, ART, como a cinética dos açúcares glicose e frutose remanescentes individualmente a partir do instante em que toda sacarose foi hidrolisada e os monossacarídeos apresentaram concentração máxima. Todas as curvas de cinéticas de degradação térmica apresentaram forte não linearidade com ombro inicial ou atraso térmico e cauda final, que foram bem ajustadas através de modelos logísticos bipopulacionais para os ART e monopopulacional para a glicose e frutose tratados individualmente. As energias de ativação obtidas para a frutose e glicose foram bastante coincidentes, 140.37 e 140.23 kJ/mol, respectivamente, e os valores z foram 21.59 e 21.61C, respectivamente.

Introdução

O álcool produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto formado de caldo de cana e melaço que é proveniente do processo de fabricação de açúcar. O mosto, por suas características físico-químicas, sustenta uma microbiota diversa que é enviada ao processo de fermentação onde compete pelo substrato com as leveduras do processo, e é frequentemente associada com o elevado nível de perdas encontrado no setor de produção de álcool, 1.5 a 5% de queda no rendimento fermentativo (Evans e Hibbert 1946; Centro de Tecnologia Copersucar 1983b; Centro de Tecnologia Copersucar 1983a; Kaji 1989; Klaushofer *et al.* 1998; Gallo e Canhos 1991; Centro de Tecnologia Copersucar 1996; Formaggio e Finguerut 1998; Trombini *et al.* 1988; Yokoya e Oliva-Neto 1991; Nolasco e Finguerut 1993; Bromberg e Yokoya 1995; Alcarde e Yokoya 2003; Oliva-Neto e Yokoya 1997; Stroppa *et al.* 1998; Oliveira-Freguglia e Horii 1998; Negro *et al.* 2003).

As estratégias de controle desses contaminantes tem se concentrado no uso de antibióticos (Stroppa *et al.* 2000; Oliva-Neto e Yokoya 2001), sendo que o uso industrial desses produtos tem sido correlacionado com o aparecimento do fenômeno de resistência a antibióticos por bactérias nocivas ao Homem (Thal e Zervos 1999; Van Den Bogaard *et al.* 2002; Lima *et al.* 1999). A decisão de se projetar um processo térmico para inativação dos contaminantes do mosto pressupõe o estudo da resistência térmica tanto dos microrganismos quanto da sacarose e dos produtos da sua hidrólise, as hexoses glicose e frutose, todos nas condições de Brix e pH encontrados nas Usinas.

A existência de pelo menos duas funções orgânicas (C=O e C-OH), na maioria dos carboidratos, dá a esses compostos várias opções de transformações químicas aumentadas ainda pelas diferenças de reatividade dos diferentes grupos hidroxilas na mesma molécula. Entre essas degradações encontram-se a degradação alcalina, degradação em meio ácido com HMF como principal produto de degradação, reações de Maillard com a degradação de Strecker e a caramelização (Bobbio e Bobbio 1992). Segundo Vander Poel *et al.* (1998) em condições de baixas concentrações, pH neutro ou levemente ácido, a reação de Maillard e degradação alcalina podem ser negligenciadas. Estas são as condições encontradas tanto na extração como também no processo de clarificação do caldo de cana para fabricação de açúcar e álcool no Brasil. Dessa forma, a degradação em meio ácido do caldo de cana para fabricação de álcool é mais relevante para o caso Brasileiro.

Quanto à degradação em meio ácido, Kelly e Brown (1978) em sua revisão indicou que a molécula de sacarose é termicamente estável a menos que seja hidrolisada produzindo as hexoses lábeis glicose e frutose, sendo a frutose mais termolábil que a glicose. Os mesmos autores relataram diversos trabalhos envolvendo soluções tamponadas de glicose em ampla faixa de concentração (1 a 40%), pH (1-7) e temperatura (40 - 190C), condições em que a energia de ativação da glicose variou de 123.5 a 138.2 kJ/mol. Para a frutose Kelly e Brown (1978) reportaram energia de ativação entre 92.9 a 96.3 kJ/mol e relatos de que a produção de HMF via degradação de frutose foi aproximadamente doze vezes maior daquela obtida com degradação de glucose. Kharin e Saprionov (1969) *apud* Kelly e Brown (1978) partindo de soluções de sacarose 0.2 a 2.0 M, tamponizada

em pH 5.6 a 100C, encontraram que a decomposição das hexoses apresentou comportamento de reações consecutivas e que para a solução 0.2 M sacarose, a concentração de frutose alcançou a concentração máxima após 127 h com uma constante de decomposição de $7.5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e a glicose alcançou a concentração máxima após 237 h com uma constante de decomposição de $1.77 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Esta pesquisa teve como objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos da degradação térmica das hexoses termolábeis glicose e frutose do mosto de caldo de cana. Esses dados serão utilizados em projeto de otimização do processo de tratamento térmico para inativação das bactérias contaminantes de mostos de fermentação alcoólica.

Materiais e Métodos

Ensaio de cinética

A determinação da cinética de degradação térmica das hexoses (glicose e frutose) em mosto foi feita pelo método do tubo TDT fechado segundo Stumbo (1973). As temperaturas para os ensaios cinéticos foram 110, 120, 130 e 140C. Os tubos TDT (6 mm DI x 8 mm DE x 100mm de comprimento), em duplicata para cada um de pelo menos 11 tempos de tratamento, foram preenchidos com 2 ml do mosto, selados com maçarico e colocados em banho termostático de óleo Polystat® PolyScience modelo G12105-20, IL. USA, precisão $\pm 0.1\text{C}$, ajustado à temperatura do ensaio. À cronometragem de tempo para a amostragem foi adicionado um atraso térmico (lag) de 3 minutos para o tubo atingir a temperatura do ensaio.

Determinação do atraso térmico (lag) do tubo TDT

O atraso térmico (lag) para cada temperatura foi determinado com um tubo TDT contendo 2 ml de mosto e com um termopar tipo T flexível TT-36 fio Ômega duplex, localizado no centro geométrico do tubo e medido em minutos para atingir a temperatura de tratamento, antes do início da hidrólise da sacarose.

Preparo do mosto

O mosto a 21.5°Brix composto por 15% (v/v) de caldo dos filtros a 13.2°Brix, 22% (v/v) de mel final a 60°Brix e o restante 63% (v/v) de caldo de cana do segundo terno de extração da moenda a 10°Brix, foi clarificado para remoção de impurezas à semelhança do processo de clarificação industrial, e mantido resfriado a 0C em câmara fria até a realização dos ensaios cinéticos. O processo de clarificação consistiu de adição de ácido fosfórico 0.25 ml/litro de mosto, calagem com leite de cal a 10°Be até pH = 6.4 seguido de aquecimento até fervura a pressão atmosférica, dosagem de polímero aniônico (4 ml/ litro de mosto) e decantação à temperatura levemente abaixo da temperatura de ebulição, em kit de decantação composto de quatro provetas graduadas de 1 litro, dotado de lâmpadas incandescentes com regulador de intensidade luminosa para controle de temperatura interna do kit. Após o processo de clarificação o mosto resultante apresentou 21.5°Brix e pH = 6.14. Os tratamentos térmicos foram realizados no laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

Metodologia de análise dos monossacarídeos glicose e frutose

A degradação térmica dos açúcares do mosto foi estudada de duas maneiras: pela análise das hexoses glicose e frutose remanescentes e pela determinação dos ART remanescentes.

A cinética da degradação térmica dos açúcares do mosto baseado nas hexoses, foi realizada pela análise dos produtos glicose e frutose remanescentes a partir do instante de concentração máxima dessas espécies químicas, que ocorreu quando a concentração de sacarose se aproximou de zero, ou seja, quando toda a sacarose foi hidrolisada nas hexoses glicose e frutose. Isso ocorreu após os seguintes tempos de tratamentos térmicos: 36 horas à 110C, 12 horas à 120C, 6 horas à 130C e 2.5 horas a 140C. Dessa forma foram estudadas as cinéticas de degradação térmica de forma individual das hexoses glicose e frutose.

A cinética da degradação térmica dos açúcares do mosto baseado no ART, por sua vez, foi estudada desde o início do aquecimento, quando o processo predominante era a hidrólise da sacarose, até o final dos tratamentos isotérmicos.

Os açúcares do mosto (sacarose, glicose e frutose) foram determinados pelo método HPLC (Icunsa-Method GS7-23 1994), em cromatógrafo com membrana de filtração de amostra de acetato/nitrato de celulose de 0.45 μ de porosidade, pré coluna Shodex KS-801 (6 mm DI x 50 mm de comprimento), coluna Shodex KS-801 (8 mm DI x 300 mm de comprimento), detector de índice de refração e solução de NaOH 0,0005 N a 0.4 mL/min como fase móvel, realizada no Centro de Tecnologia Copersucar em Piracicaba-SP.

Na temperatura de 120C, tempos de tratamento de 48, 96, 144, 168, 192, 240 h, e na temperatura de 140C, tempos de tratamento 2, 2.25 e 2.5 h, foram realizados ensaios de cinética complementares em que a glicose e frutose remanescentes foram analisadas por HPLC em cromatógrafo com coluna CarboPac Pa-1, detector de amperometria pulsada e solução de hidróxido de sódio 150 mM a 1.0 mL/min como eluente, realizada na Universidade Estadual de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

Ajuste do modelo cinético

Os dados das concentrações das hexoses glicose e frutose, tomando-se como ponto inicial o instante em que atingiram concentração máxima, foram tratados através de modelo logístico simples (monopopulacional) e atraso térmico nulo, $\tau = 0$, Eq. (1A).

$$S = \frac{2}{(1 + e^{kt})} \quad (1A)$$

A Eq.(1A) foi obtida substituindo $\tau = 0$ na Eq. (1B) que representa o modelo logístico simples com atraso não nulo.

$$S = \frac{(1 + e^{-k\tau})}{(1 + e^{k(t-\tau)})} \quad (1B)$$

Os dados dos ART remanescentes, calculados pela Eq. (3), foram tratados através de um modelo logístico para duas espécies, Eq. (2).

$$S = \left\{ \frac{\alpha [(1 + e^{-k_1 \tau_1})]}{(1 + e^{k_1(t-\tau_1)})} \right\} + \left\{ \frac{(1 - \alpha) [(1 + e^{-k_2 \tau_2})]}{(1 + e^{k_2(t-\tau_2)})} \right\} \quad (2)$$

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por regressão não linear através do Software Statistica® 6.0.

As concentrações de ART para cada tempo de tratamento foram calculadas conforme a Eq. (3) abaixo.

$$X(t)_{ART} = \left(\frac{X(t)_{sacarose}}{0.95} \right) + X(t)_{glicose} + X(t)_{frutose} \quad (3)$$

Os modelos logísticos foram escolhidos por se ajustarem bem a cinéticas que apresentam atraso térmico inicial (lag) e cauda (tail) final. Pruitt e Kamau (1993) propuseram o uso de modelos logísticos simples para população única e o estenderam para sistemas envolvendo destruição de duas populações de bactérias cujas curvas de sobreviventes apresentam atraso térmico, e onde os modelos exponenciais simples fornecem ajuste pobre. Os mesmos modelos foram aqui usados para estudar as cinéticas de degradação térmica dos ART, da glicose e frutose.

Relação entre constantes de velocidade, Energia de Ativação e os parâmetros D e z

O valor da energia de ativação foi obtido da equação de Arrhenius que relaciona as constantes cinéticas de inativação térmica com o inverso da temperatura absoluta. A transformação para z foi implementada mediante a fórmula de Ramaswamy *et al.* (1989) utilizando $T_{\text{mínimo}} = 383.15 \text{ K}$ e $T_{\text{máxima}} = 413.15 \text{ K}$.

Pruitt e Kamau (1993), sugeriram que uma melhor estimativa para os valores de D, para curvas ajustadas pelo modelo logístico, é obtida usando os parâmetros estimados para calcular o tempo em que $S = 0.1$, que por definição é o valor D. Substituindo $t = D$ e resolvendo para D a Eq. (1B) resulta para cada espécie:

$$D_1 = \tau_1 + \frac{\left[\ln(9 + 10 \times e^{-k_1 \tau_1}) \right]}{k_1} \quad (4a)$$

$$D_2 = \tau_2 + \frac{\left[\ln(9 + 10 \times e^{-k_2 \tau_2}) \right]}{k_2} \quad (4b)$$

Os valores z também foram calculados considerando (Bigelow e Esty 1920 *apud* Pflug 1990) em que z é o inverso negativo da inclinação da curva log D versus temperatura.

Resultados e Discussão

Os parâmetros cinéticos, k_{glicose} e k_{frutose} , do modelo logístico simples (monopopulacional) e atraso térmico (τ) nulo ajustados aos dados experimentais de glicose e frutose remanescentes em função do tempo, Fig. 1 e Fig. 2, a partir do instante em que estas espécies atingiram concentração máxima, estão mostradas na Tabela 1.

Figura 1

Figura 2

Tabela 1

Os parâmetros cinéticos α , k_1 , k_2 , τ_1 e τ_2 , mostrados na Tabela 2 referentes ao modelo logístico ajustado aos dados experimentais dos ART remanescentes em função do tempo, Figura 3, foram obtidos por regressão não linear dos dados de ART remanescentes em função do tempo. Os valores de α indicaram que a reação de hidrólise térmica da sacarose foi praticamente equimolecular para todas as temperaturas estudadas. Todos os gráficos da Figura 3 para temperaturas de 110, 120, 130 e 140C mostraram que existiam duas frações que se degradavam a velocidades diferentes.

Figura 3

Tabela 2

As energias de ativação de degradação térmica, E_{a1} e E_{a2} , determinadas avaliando a influência da temperatura nas constantes cinéticas k_1 e k_2 segundo Arrhenius, Fig. 4A e Fig. 4B, foram de 140.37 e 140.23 kJ/mol, respectivamente. Esses valores de energia de ativação forneceram valores de $z_1 = 21.59\text{C}$ e $z_2 = 21.61\text{C}$, calculados na faixa de temperatura de 110 a 140C, aplicando a equação de Ramaswamy *et al.*(1989).

Figura 4

Os valores k_1 e k_2 , do modelo logístico bipopulacional obtidos da regressão dos dados dos ART remanescentes em função do tempo pela Eq. (2), foram convertidos para valores D_1 e D_2 mostrados na Tabela 3 através da Eqs. (4a) e (4b), os quais foram usados para obtenção dos parâmetros z_1 e z_2 segundo Bigelow e Esty (1920) *apud* Pflug (1990). Determinados pelo inverso negativo da declividade da curva fantasma TDT (Tabela 3, Fig. 5A, Fig. 5B), os valores de z_1 e z_2 foram 22.56C e 21.95C e diferiram em 4.3% e 1.6%, respectivamente, dos valores z calculados a partir da energia de ativação pela equação de Ramaswamy *et al.* (1989). Os parâmetros de resistência térmica z_1 e z_2 são de mesma magnitude enquanto que os parâmetros de redução decimal, D_1 e D_2 relativos aos componentes 1 e 2 do modelo logístico bipopulacional ajustado aos ART remanescentes durante os tratamentos térmicos, são bastante diferentes

mostrando nitidamente que o componente 1 é degradado em média nove vezes mais rápido que o componente 2.

Tabela 3

Figura 5

A regressão linear entre os valores de k obtidos para a degradação da glicose mostrados na Fig.1 e Tabela 1 e valores de k_2 obtidos da modelagem da degradação dos ART mostrados na Fig. 3 e Tabela 2, e entre os valores de k obtidos para a degradação da frutose mostrados na Fig. 2 e Tabela 1 e valores k_1 obtidos da modelagem de degradação dos ART mostrados na Fig. 3 e Tabela 2, podem ser vistas na Fig. 6 e pode-se afirmar que k_1 e k_2 do modelo cinético do ART são referentes às constantes de velocidade de degradação térmica da frutose e glicose respectivamente. O valor de α reflete a proporção entre glicose e frutose formados durante a hidrólise da sacarose do mosto, na fase inicial da degradação térmica em que os processos de hidrólise da sacarose acontecem simultaneamente à degradação das hexoses. Ambas as constantes k_1 e k_2 do ajuste de dados dos ART remanescentes incorporam os valores das constantes cinéticas de hidrólise da sacarose que ocorre no início dos tratamentos térmicos e cujas magnitudes são em média doze vezes maiores do que as constantes

cinéticas de degradação térmicas da frutose e setenta vezes maiores do que as constantes cinéticas de degradação térmicas da glicose.

Figura 6

Conclusão

Avaliou-se a cinética de destruição térmica dos açúcares presentes em mosto à base de caldo de cana e melaço (21.5°Brix e pH = 6.14) para fermentação alcoólica, em temperaturas entre 110-140C pelo método do tubo TDT, usando HPLC como metodologia de análise dos açúcares remanescentes. O estudo analisou a cinética tanto de degradação de açúcares redutores totais, ART, como dos açúcares glicose e frutose individualmente a partir do instante em que estas atingiram suas concentrações máximas. Durante o acompanhamento da degradação térmica dos açúcares contidos no mosto, baseado nas espécies remanescentes, observaram-se duas fases distintas: a primeira em que a sacarose é hidrolisada nas hexoses glicose e frutose e estas, são concomitantemente degradadas termicamente cada qual à sua velocidade, e uma segunda fase quando toda a sacarose foi totalmente hidrolisada e as hexoses atingiram suas concentrações máximas e decaem com o tempo de tratamento. Nesta segunda fase, foi possível estudar as cinéticas de degradação térmica da glicose e frutose individualmente, obtendo-se as respectivas constantes cinéticas de destruição térmica.

O processo tratado desde o início como um todo, englobando as duas fases, foi monitorado pelos açúcares redutores totais (ART) remanescentes em função do tempo. Estas curvas apresentaram forte não linearidade com rápido decaimento e cauda final que foram bem ajustadas através de modelo logístico bipopulacional com duas constantes k_1 e k_2 , as quais pela análise conduzida especificamente sobre as espécies individuais a partir de suas concentrações máximas, revelaram-se referentes à degradação de frutose e glicose respectivamente. As energias de ativação para a frutose e glicose foram 140.37 e 140.23 kJ/mol, respectivamente, enquanto os valores z também para a frutose e glicose foram 21.59 e 21.61°C, respectivamente. Os dados de energia de ativação para a glicose e frutose aqui determinados foram similares. Kelly e Brown (1978) reportaram valores distintos de energia de ativação para as duas hexoses: 123.5–138.2 kJ/mol para a glicose e 92.9 – 96.3 kJ/mol para a frutose. Os valores das constantes de velocidade aqui obtidos revelam que a frutose se degrada aproximadamente nove vezes mais rápido que a glicose, valor parecido com o informado por Kelly e Brown (1978) que reportaram que a frutose se decompõe cerca de dez vezes mais rápido que a glicose.

Quanto às condições do mosto usadas nesta pesquisa, o pH é essencialmente o encontrado nas condições reais do processo, entretanto o Brix pode variar em função das estratégias de produção das Usinas. Optou-se por 21.5°Brix porque altas concentrações de açúcares no mosto resultam em vinhos fermentados de teores alcoólicos mais elevados e fermentações mais eficientes.

Entretanto é interessante avaliar essa cinética variando a concentração do mosto desde 10 – 25°Brix.

Esses dados são importantes tanto para avaliar a destruição térmica de açúcares durante a etapa de clarificação do caldo de cana em Usinas de Açúcar e Álcool nas condições em que esse processo é tipicamente conduzido, quanto na otimização do futuro projeto do processo de tratamento térmico do mosto, onde os parâmetros cinéticos serão utilizados para minimização de perdas desse nutriente.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Tecnologia Copersucar pelo apoio financeiro deste projeto.

Nomenclatura

(1- α): fração da população que se degrada com velocidade de degradação térmica

$k = k_2$.

1,2: índices para especificar espécies 1 e 2.

ART: açúcares redutores totais

D: índice de redução decimal a temperatura constante (unidades de tempo)

DE: diâmetro externo dos tubos TDT

DI: diâmetro interno dos tubos TDT

Ea : Energia de ativação, (kJ/mol)

k ; é a constante de velocidade degradação térmica (h^{-1})

k_{frutose} : constante de velocidade de degradação térmica máxima da frutose (h^{-1})

k_{glicose} : constante de velocidade de degradação térmica máxima da glicose (h^{-1})

$^{\circ}\text{Be}$: densidade específica de soluções. Na indústria sucroalcooleira é usada para expressar concentração de soluções de leite de Cao (2g de substância seca/100 ml de solução)

$^{\circ}\text{Brix}$: concentração de sólidos solúveis (%m/m)

R: constante geral dos gases = $8.314 \times 10^{-3} \text{ kJ/molK}$

$S(X / X_0)$: Fração de sacarose, glicose, frutose ou ART remanescente no tempo t,

t: tempo de tratamento térmico do mosto em cada temperatura (h)

TDT: Tempo de Morte Térmica

X: concentração (%m/m) de sacarose, glicose, frutose ou ART no tempo t

X_0 : concentração (%m/m) de sacarose, glicose, frutose ou ART quando $t = 0$

z: coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (unidades de temperatura).

α : fração da população que se degrada com velocidade de degradação térmica $k = k_1$

τ : medida do atraso nas reações de degradação térmica do modelo logístico (h)

Referências

ALCARDE, V. E. e YOKOYA, F. 2003. Efeito da População de Bactérias na Floculação de Leveduras Isoladas de Processos Industriais de Fermentação Alcoólica. STAB. 21(4), 40-42.

- BOBBIO, P.A. e BOBBIO, F.O. 1992. Química do processamento de alimentos, 3rd Ed., Varela, São Paulo.
- BROMBERG, R. and YOKOYA, F. 1995. Chemical modification of cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 105 and their effect on flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11, 508-511.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 1996. Perdas na fermentação: é possível reduzir! Piracicaba: INDUSTRIAL INFORMA 50, 1-2.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. COORDENADORIA INDUSTRIAL. 1983a. Controle Microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. Boletim Técnico Copersucar 22, 2-17.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. DIVISÃO INDUSTRIAL. 1983b. Manual de Controle Microbiológico da Usina de Açúcar e Álcool. Cadernos Copersucar - Série Industrial 5, 1-10.
- EVANS, T.H. and HIBBERT, H. 1946. Bacterial polysaccharides. In Advances in carbohydrate chemistry. Academic Press, Inc., New York. 2, 203-233..
- FORMAGGIO, G.J. e FINGUERUT, J. 1998. Produção específica de ácidos orgânicos. Piracicaba: Relatório Técnico Copersucar RT963-99/00, 1-12.
- GALLO, C.R. e CANHOS, V.P. 1991. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão. Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos Piracicaba 9(4-5), 35-40.
- ICUNSA-METHOD GS7-23. 1994. The determination of Sucrose, Glucose and Fructose in Cane Molasses by HPLC-tentative.

- KAJI, D.A. 1989. Influência da Temperatura e Infecção Láctica na Fermentação Alcoólica. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.
- KELLY, F.H.C and BROWN, D.W. 1978. Thermal Decomposition and colour formation in aqueous sucrose solutions. *Sugar Technology Reviews* 6(1), 1-48.
- KLAUSHOFER, H., CLARKE, M.A, REIN, P.W and MAUCH, W. 1998. Microbiology. In *Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture*, (Van der Poel, P.W, Schiweck H. and Schwartz T., authors) pp 993 – 1008, Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin.
- LIMA, T.C. S, GRISI, B.M. and BONATO, M.C.M. 1999. Bacterial Isolated From a Sugarcane AgroEcosystem: Their Potential Production Of Polyhydroxyalcanoates And Resistance To Antibiotics. *Rev Microbiol.* 30, 214-224.
- NEGRO, M.R.G.O.C., YOKOYA, F. and EBERLIN, M.N. 2003. The Chemical Composition Of “Canjica” A Polymeric Material Found In Brazilian Sugar Cane Industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(6), 625-630.
- NOLASCO, J.J. e FINGUERUT, J. 1993. Projeto Floculação-Fase I-Characterização e Proposta de um Índice de Floculação. Piracicaba: Relatório Técnico Copersucar RT-674/93, 1-12.

- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 1997. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation, *Revista de Microbiologia* (28), 25-31.
- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 2001. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria From The Alcohol Industry To Several Antimicrobial Compounds. *Bras. Journal of Microbiology* 32, 10-14.
- OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M. e HORII, J.1998. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum* *Sci agric.* 55(3), 1-12.
- PFLUG, I.J. 1990. *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes.* Environmental Sterilization Laboratory, 7ª edição, Minneapolis, MN.
- PRUITT, K.M. and KAMAU, D.N. 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 221-231.
- RAMASWAMY, H.S., VAN DE VOORT, F.R. and GHAZALA, S. 1989. An Analysis of TDT and Arrhenius Methods for Handling Process and Kinetic Data. *Journal of Food Science* 54(5), 1322-1326.
- STROPPA, C.T., ANDRIETTA, M.G.S., ANDRIETTA, S.R., STECKELBERG, C. and SERRA, G.E. 2000. Use Of Penicillin And Monesin To Control Bacterial Contamination Of Brazilian Alcohol Fermentations. *Int. Sugar Journal* 102(1214), 78-82.
- STROPPA, C.T., STECKELBERG, C., SERRA, G.E., ANDRIETTA, M.G.S. e ANDRIETTA, S.R. 1998. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes

- da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos 16, 35-38.
- THAL, L.A. and ZERVOS, J.M. 1999. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43, 171-176.
- TROMBINI, M.A.M., ROVANHOL, A.A., VITTI, L.S. S., BEDA, D. F., PORTO, R.C.B. e SÁ, J.S. 1998. Causas da Contaminação e suas conseqüências em Usinas de Açúcar e Álcool. STAB. 16(6), 18p.
- VAN DEN BOGAARD, A.E., WILLEMS, R., LONDON, N., TOP, J. and STOBBERINGH, E.E. 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 497-505. Disponível em <http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>.
- VAN DER POEL, P.W., SCHIWEK, H., and SCHWARTZ, I. 1998. Sugar Technology: Beet and cane sugar manufacture. Verlag Dr Albert Bartens. Berlim.
- YOKOYA, F. e OLIVA-NETO, P. 1991. Características da Flocculação de Leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. *Rev Microbiol.* 22(1), 12-16. São Paulo.

TABELA 1.

PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE GLICOSE E FRUTOSE ESTIMADOS PARA OS MODELOS LOGÍSTICOS AJUSTADOS (Eq. 1) A PARTIR DE SUAS CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS ATÉ O FINAL DOS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS, EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX)

T(C)	$K_{\text{glicose}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	a_r^2	bF	c_p	$k_{\text{frutose}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	a_r^2	bF	c_p
110	0.002540	0.98	364	< 0.01	0.012465	0.95	150	< 0.01
120	0.005527	0.96	116	< 0.01	0.046901	0.98	237	< 0.01
130	0.021492	0.96	159	< 0.01	0.109236	0.97	167	< 0.01
140	0.054924	0.94	118	< 0.01	0.243502	0.96	183	< 0.01

a_r^2 = coeficiente de correlação

bF = teste estatístico

c_p = nível de significância.

TABELA-2.

PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA ESTIMADOS PARA OS MODELOS LOGÍSTICOS AJUSTADOS (Eq. 2) AOS ART REMANESCENTES DURANTE OS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS, EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX)

T(C)	α	k_1 (h ⁻¹)	τ_1 (h)	k_2 (h ⁻¹)	τ_2 (h)	^a r ²	^b F	^c p
110	0.52	1.58E-2	0.10	1.96E-3	0.11	0.994	3219	< 0.01
120	0.55	5.53E-2	12.61	4.39E-3	0.07	0.999	6809	< 0.01
130	0.49	2.27E-1	7.74	1.75E-2	0.12	0.999	7289	< 0.01
140	0.58	3.41E-1	1.20	4.33E-2	7.80	0.998	8173	< 0.01

^ar²= coeficiente de correlação

^bF= teste estatístico

^cp = nível de significância

TABELA 3.

VALORES $D_1(h)$ E $D_2(h)$ CALCULADOS A PARTIR DE k_1 E k_2 DO AJUSTE
CINÉTICO DOS ART REMANESCENTES

T(C)	^a $D_1(h)$	^b $D_2(h)$
110	186.2352	1502.473
120	60.31221	670.7055
130	18.20951	168.6089
140	9.250705	72.07694

^a Determinado pela equação (4a).

^b Determinado pela equação (4b).

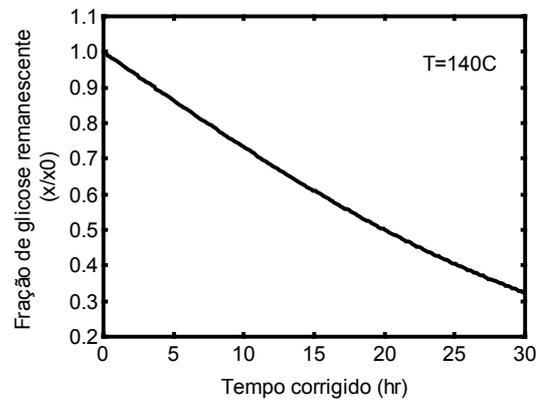
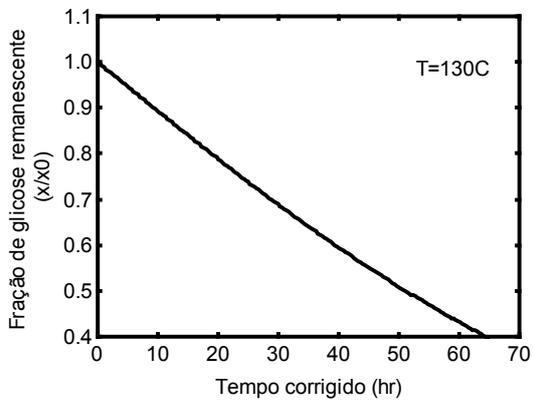
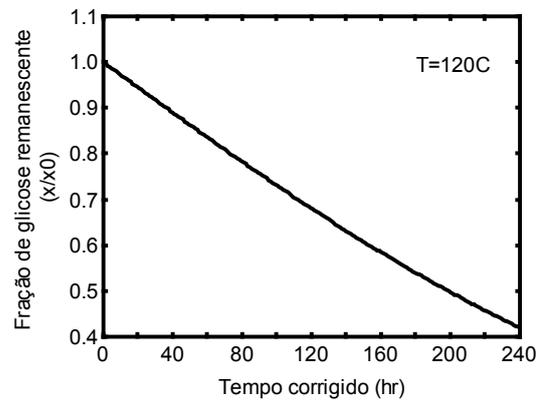
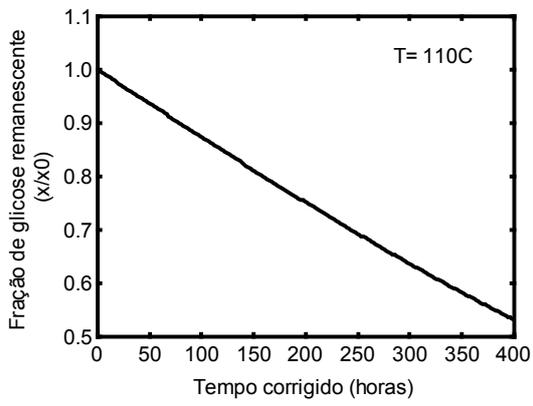


FIG 1. GRÁFICOS DAS FRAÇÕES DE GLICOSE REMANESCENTES
ADOTANDO COMO PONTO INICIAL O TEMPO EM QUE A GLICOSE ATINGIU A
CONCENTRAÇÃO MÁXIMA E AJUSTANDO MODELO LOGÍSTICO
MONOPOPULACIONAL E ATRASO TÉRMICO IGUAL A ZERO (Eq. 1), EM
MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX)

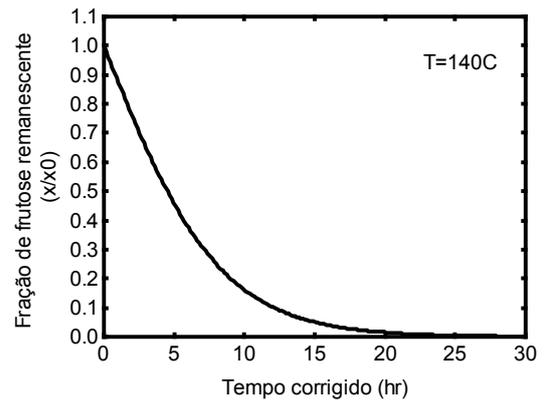
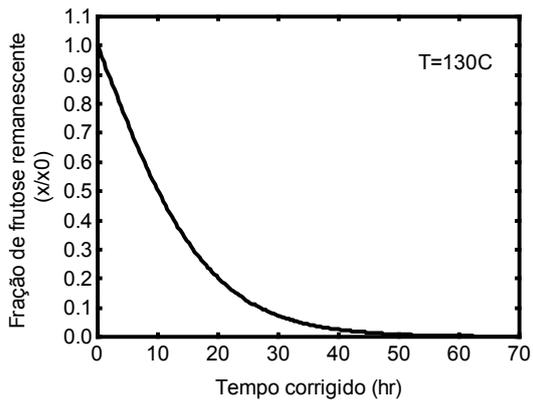
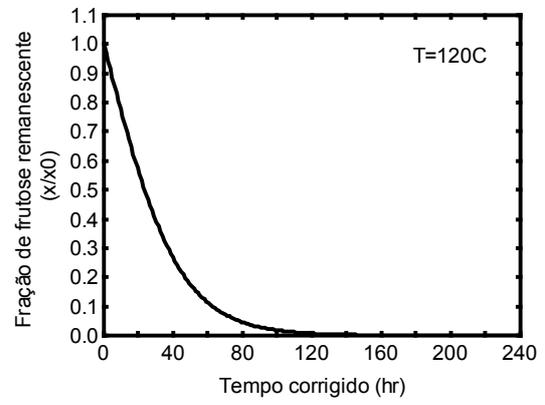
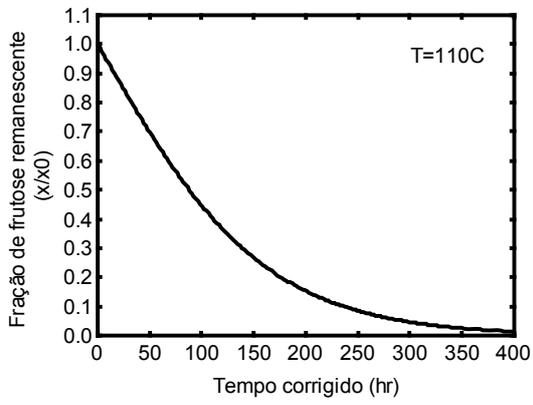


FIG 2. GRÁFICOS DAS FRAÇÕES DE FRUTOSE REMANESCENTES
ADOTANDO COMO PONTO INICIAL O TEMPO EM QUE A FRUTOSE ATINGIU
A CONCENTRAÇÃO MÁXIMA E AJUSTANDO MODELO LOGÍSTICO
MONOPOPULACIONAL E ATRASO TÉRMICO IGUAL A ZERO (Eq. 1A), EM
MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX)

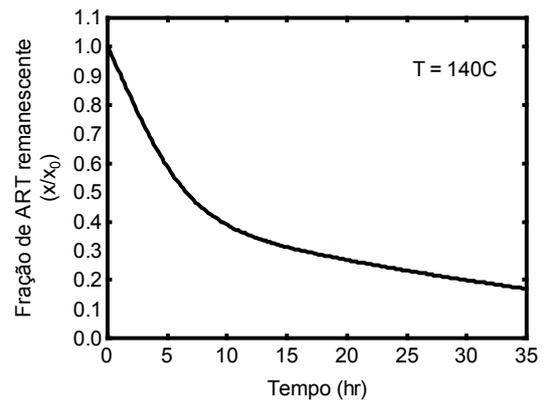
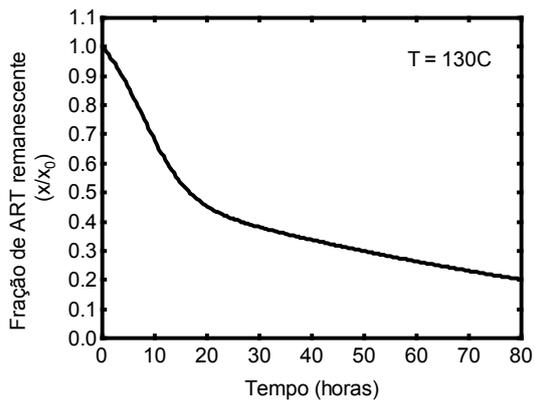
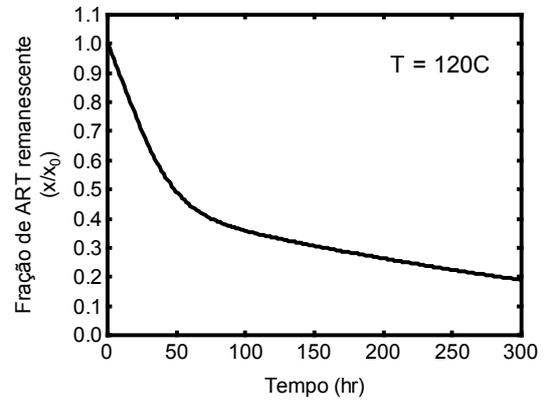
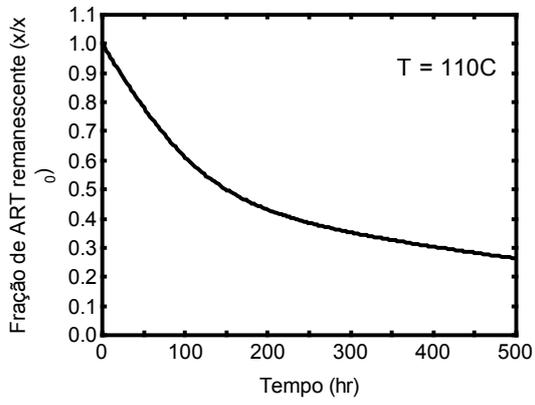


FIG 3. FRAÇÕES DOS ART REMANESCENTES EM FUNÇÃO DO TEMPO AJUSTADOS POR MODÉLO LOGÍSTICO BIPOPULACIONAL (Eq. 2), EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX)

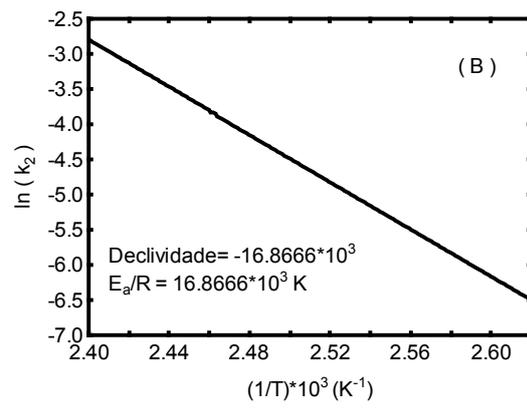
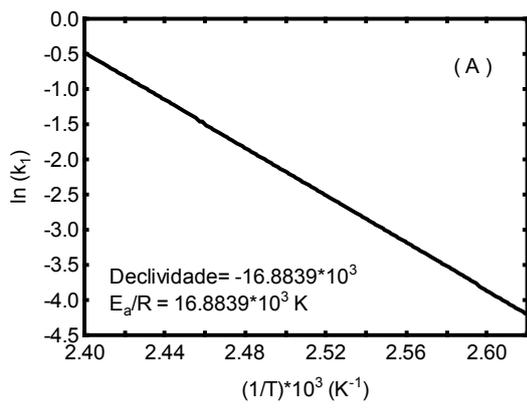


FIG 4. GRÁFICOS DE ARRHENIUS PARA OBTENÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DOS ART, EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX). (A) BASEADO NA ESPÉCIE 1, K_1 ($R^2= 0.966$, $F= 56.1$, $P= 0.017$), (B) BASEADO NA ESPÉCIE 2, K_2 ($R^2= 0.988$, $F= 171.64$, $P= 0.0058$)

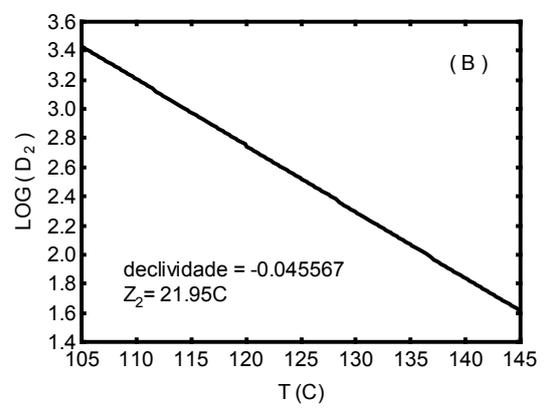
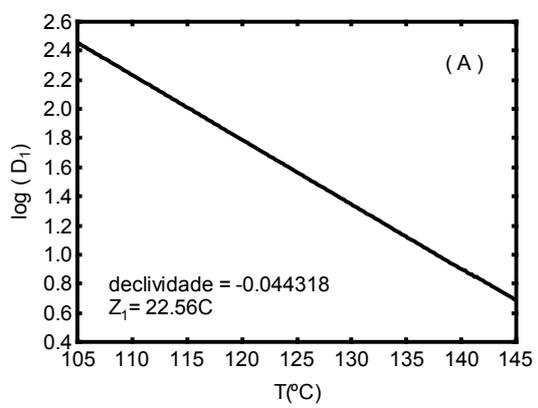


FIG 5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS z EM MOSTO ($\text{pH}=6.14$, 21.5°BRIX), SEGUNDO BIGELOW & ESTY (1920) PARA AS ESPÉCIES 1 E 2 DO MOSTO. (A) CURVA FANTASMA PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z_1 ($R^2 = 0.987$, $F = 152.89$, $P = 0.0065$), (B) CURVA FANTASMA PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z_2 ($R^2 = 0.989$, $F = 178.91$, $P = 0.0055$)

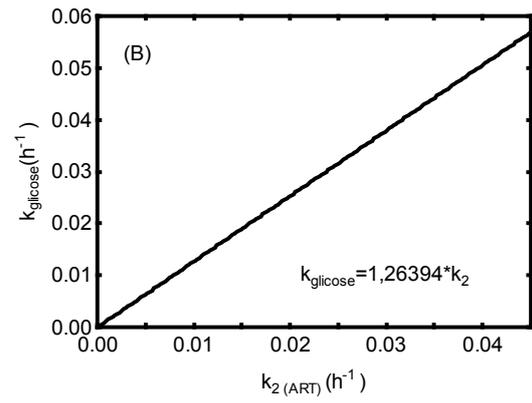
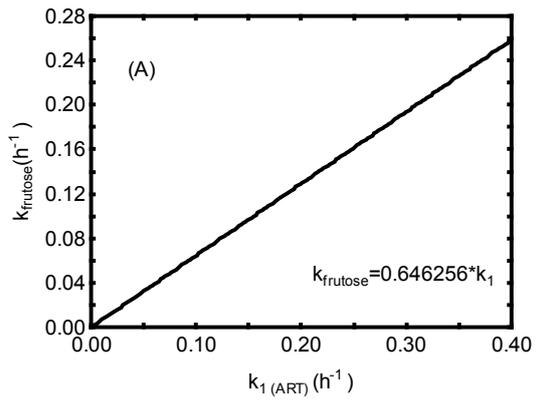


FIG 6. REGRESSÃO LINEAR ENTRE AS CONSTANTES k_1 E k_2 DO AJUSTE DOS DADOS DOS ART REMANESCENTES EM MOSTO (pH=6.14, BRIX=21.5°BRIX) E (A): OS VALORES DE $k_{FRUTOSE}$ ($R^2=0.97$, $F=42$, $P=0.022$) E (B): $k_{GLICOSE}$ ($R^2=0.99$, $F=12780$, $P=7.8E-5$), RESPECTIVAMENTE

Capítulo 5

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS DE *B.* *stearothermophilus* EM MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

**Artigo que será submetido à revista Journal of Food Process
Engineering, segundo normas de submissão da revista.**

**DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO
TÉRMICA DE ESPOROS DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* EM MOSTO DE
CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

J. Nolasco Junior¹ e P.R. De Massaguer²

**^{1,2} Universidade de Campinas-UNICAMP, Faculdade de Engenharia de
Alimentos (FEA) /Departamento de Ciência de Alimentos, Rua Monteiro
Lobato, 80, Campinas-São Paulo/Brasil C.P. 6121 – CEP 13083-862.**

**¹A quem correspondência deve ser enviada. R 13 de maio, 1727, 13419-270,
Piracicaba-SP-BRASIL, fone +55-021-19-34225966,
Jonas.nolasco@terra.com.br**

Running title: Cinética de inativação de *B. stearothermophilus* em mosto

Resumo

Avaliou-se a cinética de destruição térmica de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 em mosto de caldo de cana em sete temperaturas constantes variando entre 98 e 130C, pelo método do tubo TDT e contagem de sobreviventes. As curvas dos sobreviventes apresentaram forte não linearidade com ombro inicial ou atraso térmico variando sua forma com a temperatura, sendo ajustadas ao modelo logístico nas temperaturas de 98–110C, modelo de populações com resistência térmica heterogênea nas temperaturas de 120–125C e modelo linear a 130C. A energia de ativação e valor z obtidos foram 249.52 kJ/mol e 11.48C, respectivamente. Os valores k variaram de 0.019 min⁻¹ a 13.63 min⁻¹. Em comparação com comportamento não linear deste microrganismo disponível na literatura observou-se coincidência em temperaturas acima de 120C e divergência em temperaturas inferiores no início dos tratamentos térmicos. Enquanto este trabalho reporta ombro nítido, a literatura reportou forma curvilínea inicial devido a aumento inicial da população dos esporos.

Introdução

O álcool produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto formado de caldo de cana e melaço que é proveniente do processo de fabricação de açúcar. O mosto, por suas características físico-químicas, sustenta uma microbiota diversa formada predominantemente por bactérias Gram positivas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* (Evans e Hibbert 1946; Centro de Tecnologia Copersucar 1983b; Centro de Tecnologia Copersucar 1983a; Kaji 1989; Klaushofer *et al.* 1998; Gallo 1990; Gallo e Canhos 1991). A nível de espécie Gallo (1990) reportou para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente: *L. fermentum* (15,04%), *L. helveticus* (14,08%), *L. plantarum* (5,69%), *L. animalis* (4,55%), *L. buchneri* (3,76%), *L. acidophilus* (3,07%), *L. vitulinus* (2,96%), *L. viridescens* (2,35%), *L. amylophilus* (1,88%), *L. agilis* (1,25%), *L. reuteri* (1,22%), *L. delbruechii* subsp. *Lactis* (1,04%), *L. murinus* (1,02%), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,71%), *L. coryniformis* subsp. *torquens* (0,71%) e *L. saki* (0,42%), *B. coagulans* (15,09%), *B. stearothermophilus* (6,91%), *B. megaterium* (2,43%), *B. brevis* (1,23%), *B. lentus* (0,70%) e *B. pasteurii* (0,22%). Essa microbiota é enviada ao processo de fermentação onde, além de competir pelo substrato com a levedura do processo, provoca a floculação do fermento e é freqüentemente associada com o elevado nível de perdas no processo de produção de álcool (Centro de Tecnologia Copersucar 1996; Formaggio e Finguerut 1998; Trombini *et al.* 1988; Yokoya e Oliva-Neto 1991; Nolasco e Finguerut 1993; Bromberg e Yokoya 1995; Alcarde e Yokoya 2003; Oliva-Neto e Yokoya 1997; Stroppa *et al.* 1998; Oliveira-Freguglia e Horii 1998; Negro *et al.* 2003). Nem todas as bactérias são capazes de

provocar floculação. *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* têm sido reconhecidas como tendo capacidade de provocar a floculação de leveduras enquanto que *B. subtilis* e *B. coagulans*, não (Yokoya e Oliva-Neto 1991; Alcarde e Yokoya 2003).

As estratégias de controle desses contaminantes no processo de fermentação alcoólica se concentram basicamente no uso de antibióticos. São produtos que foram desenvolvidos para uso em veterinária, onde são usados como aditivos alimentares antibacterianos na criação intensiva de animais, e são efetivos contra bactérias gram-positivas, daí a sua aplicabilidade no controle da infecção na fermentação (Oliva-Neto e Yokoya 2001; Stroppa *et al.* 2000). Alguns são quimicamente, relacionados com os antibióticos reservados para tratamento de infecções em humanos. É crescente a preocupação com relação ao uso em larga escala desses anti-bacterianos. Os riscos associados ao desenvolvimento de resistência a antibióticos são crescentes e não podem ser desprezados, pois as potenciais conseqüências tanto para a saúde animal como humana são sérias. Na Europa e principalmente nos países nórdicos, o uso desses produtos tem sido severamente restrito. Existem fortes correlações entre o uso em larga escala desses produtos e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos mais potentes disponíveis, caso dos antibióticos vancomicina® e sinercid® nos Estados Unidos, associados ao uso dos produtos avoparcina® e virginiamicina® na criação de frangos e porcos. Este produto também é usado no controle de infecções na fermentação (Thal e Zervos 1999; Van Den Bogaard *et al.* 2002; Lima *et al.* 1999).

A decisão de se projetar um processo térmico para inativação desses contaminantes do mosto pressupõe o estudo tanto da destruição térmica dos

açúcares sacarose, glicose e frutose que compõe o mosto e que devem ser preservados para sua utilização como substrato na fermentação, quanto dos microrganismos contaminantes que competem com a levedura, nas mesmas condições de Brix e pH encontrados nas Usinas.

Os contaminantes do gênero *Bacillus* por produzirem esporos estão entre os que apresentam maior resistência térmica e dentre esses, o *B. stearothermophilus* é de longe o microrganismo termófilo mais resistente e adaptado ao pH do mosto. A resistência térmica dos esporos está relacionada a fatores intrínsecos, como espécies ou variedade de linhagens dentro das espécies, e fatores extrínsecos, como desidratação do protoplasto, mineralização pela incorporação de íons minerais como Cálcio, Manganês, Magnésio, Potássio e adaptação térmica (Pflug 1990; Bender e Marquis 1985; Beaman e Gerhardt 1986). Periago *et al.* (1998) avaliaram que o aumento da concentração de NaCl no meio de recuperação aumenta a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* tratados termicamente. Várias pesquisas publicadas avaliam os parâmetros cinéticos de destruição térmica de esporos de *B. stearothermophilus* a partir de dados obtidos em condições diversas como sistemas contínuos, batelada, em meios tamponados, água, leite (Wescott *et al.* 1995; Busta 1967; Perkin *et al.* 1977; Burton *et al.* 1977, Davies *et al.* 1977; Abraham *et al.* 1990; Pflug 1990). Os valores do índice de redução decimal, D, em caldo de cana para *B. stearothermophilus* à temperatura de 120, 130 e 140°C, aplicando modelo cinético de inativação linear, foram relatados como sendo 11.3 minutos, 9.5 minutos e 8.1 minutos, respectivamente (Gouthier e Massaguer

1987). Em leite a 121°C, os valores de D e z relatados para os esporos termofílicos foram 25 segundos e 10.3C, respectivamente (Kessler 1981).

Quanto à resistência de *Lactobacillus sp* em meio de caldo de cana podem ser citados os valores de índice de redução decimal, D_{60C} , obtidos para *L. fermentum*, *L. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* em caldo de cana clarificado a 14°Brix e pH = 6.5, como sendo 0.75, 0.29 e 1.57 minutos respectivamente e um valor z para *L. fermentum* de 7.7C (Franchi *et al.* 2003a,b). Casadei *et al.* (2001), avaliando o efeito do pH e do etanol sobre a resistência térmica para *L. delbueckii* e esporos de *B. cereus*, constataram que a resistência térmica desses microorganismos é negativamente afetada com o abaixamento do pH e aumento no teor alcoólico.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos por diversos autores propondo modelos para descrever curvas de sobreviventes tais como, curvas semi-logarítmicas não lineares complexas, multifásicas com retardos e atrasos, ombros e caudas. Estas últimas são obtidas muito mais frequentemente do que as curvas semi-logarítmicas lineares de 1ª de ordem durante a inativação térmica de microorganismos. Nestes estudos não foi possível chegar à conclusão sobre o melhor modelo a ser usado (Abraham *et al.* 1990; Pruitt e Kamau 1993; Peleg 1997; Rodriguez *et al.* 1992; Geeraerd *et al.* 2000; Van Boekel 2002). Curvas de sobreviventes semilogarítmicas curvilíneas são obtidas em ensaios para determinação de resistência térmica de microorganismos envolvendo flora microbiana heterogênea ou com variações de resistência dentro de cada espécie, indicando a presença de um grande número de organismos com muito baixa resistência e um pequeno número de organismos altamente resistentes. Além

disso a cada batelada de esporos produzidos, mutações genéticas da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} produzindo espécies mutantes mais ou menos resistentes do que o restante da suspensão (Pflug 1990). A recomendação do segundo “IFT’s Research Summit 2003” para o avanço no entendimento da cinética de inativação microbiana é que a comunidade técnico-científica deve reconhecer modelos alternativos e parâmetros para descrição e comunicação de sobreviventes de populações microbianas quando expostas a vários agentes letais, em virtude de haver evidência significativa de que as curvas de sobreviventes podem ser descritas por expressões cinéticas semi logarítmicas não lineares (Heldman e Newsome 2003). Para esses autores, o conceito clássico de D e z de Bigelow não são apropriados para tratar tais cinéticas complexas não lineares. Pruitt e Kamau (1993) revisaram a história das teorias de crescimento e mostra como os modelos clássicos de crescimento podem ser derivados como casos especiais de uma equação da taxa de crescimento genérica. Além disso, considerando que matematicamente a diferença entre crescimento e morte é questão de sinal, converte curvas de crescimento em curvas de morte mudando o sinal da equação de crescimento.

Este trabalho tem como objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos da destruição térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 em mosto de caldo de cana. Esses dados serão utilizados em projeto de otimização do processo de tratamento térmico para inativação das bactérias contaminantes de mostos de fermentação alcoólica.

Materiais e Métodos

Definição do microrganismo alvo

Como alvo do processo térmico, foram utilizados esporos de *B. stearothermophilus*, devido à sua alta resistência térmica. A suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 foi preparada, limpa e coletada segundo descrito por Pflug (1990) em meio nutriente ágar DIFCO® proveniente de um mesmo lote, atingindo concentração de 10^{10} esporos/ml e denominada de suspensão-mãe. Esta suspensão foi estocada a 4C por até 4 meses, tempo de duração dos ensaios. Suspensões com concentração de 10^8 esporos/ml foram preparadas a partir da suspensão mãe para que a concentração inicial de esporos nos ensaios cinéticos nos tubos TDT fosse da ordem de 10^7 esporos/ml.

Preparo do mosto

O mosto a 21.5°Brix composto por 15% (v/v) de caldo de cana proveniente dos filtros a vácuo das Usinas a 13.2°Brix, 22% (v/v) de mel final a 60°Brix e o restante 63% (v/v) de caldo de cana do segundo terno de extração da moenda a 10°Brix, foi clarificado para remoção de impurezas à semelhança do processo de clarificação industrial, esterilizado a 121C, 40 minutos e mantido resfriado a 0C em câmara fria até a realização dos ensaios cinéticos. O processo de clarificação consistiu de adição de ácido fosfórico 0.25 mL/litro de mosto, calagem com leite de cal a 10°Be até pH = 6.4 seguido de aquecimento até fervura a pressão atmosférica, dosagem de polímero aniônico (4 ml/litro de mosto) e decantação à

temperatura levemente abaixo da temperatura de ebulição, em kit de decantação composto de quatro provetas graduadas de 1 litro, dotado de lâmpadas incandescentes com regulador de intensidade luminosa para controle de temperatura interna do kit. Após o processo de clarificação o mosto resultante apresentou 21.5°Brix e pH = 6.14. Os tratamentos térmicos foram realizados no laboratório de Termobacteriologia da FEA/UNICAMP. Para efeito de simplicidade toda referência a mosto neste trabalho será relativa a mosto com a composição acima descrita.

Ensaio de cinética

A determinação da cinética de destruição térmica da suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 foi feita pelo método do tubo TDT fechado, segundo Stumbo (1973) nas temperaturas de 98, 110, 120, 122,5 e 130C. Tubos TDT estéreis (6 mm DI x 8 mm DE x 100mm comprimento), em duplicata para cada um de pelo menos 6 tempos de tratamento, foram preenchidos com 0.2 ml da suspensão de esporos e 1.8 ml do mosto preparado conforme descrito acima, selados com maçarico e colocados em banho termostático óleo Polystat® PolyScience modelo G12105-20, IL. USA, precisão $\pm 0.1C$, ajustado à temperatura do ensaio. À cronometragem de tempo para a amostragem foi adicionado um atraso térmico (lag) de 3 minutos para o tubo atingir a temperatura do ensaio.

Determinação do atraso térmico (lag) do tubo TDT

O atraso térmico (lag) para cada temperatura foi determinado com um tubo TDT contendo 2 ml de mosto e com um termopar tipo T flexível TT-36 fio Ômega duplex, localizado no centro geométrico do tubo e medido em minutos para atingir a temperatura de tratamento.

Determinação da curva de ativação para obtenção da concentração inicial

(N₀)

A determinação da ativação ótima da suspensão dos esporos para a determinação da concentração inicial N₀, foi realizada em mosto a 98C nos tempos 10, 15, 20,30, 40, 50 e 60 minutos, seguido de resfriamento rápido, diluição e contagem de sobreviventes em meio Triptona Soja Ágar (TSA, Oxoid®).

Contagem de esporos sobreviventes

Após cada tempo de aquecimento aplicado, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo sendo higienizados externamente com ácido peracético 0.3% p/v. Em seguida, os tubos foram abertos assepticamente em câmara de fluxo laminar e através de diluições decimais sucessivas e em duplicata, fez-se plaqueamento em profundidade em meio TSA (Oxoid®). As placas foram incubadas a 55C em estufa e as colônias formadas contadas após 48 horas e o resultado expresso em UFC/ml.

Ajuste do modelo cinético

Em ensaios preliminares foi observado que a forma da curva de sobreviventes mudou conforme as temperaturas de aquecimento. Dois modelos cinéticos foram utilizados cada qual em uma faixa de temperatura: um que descreve curvas de sobreviventes que apresentam ombro inicial, Eq. (1), ou sua transformada logarítmica, a curva do logaritmo natural de sobreviventes em função do tempo, Eq. (2), e outro que leva em conta a variabilidade de resistência dentro da população, Eq. (3), (Pruitt e Kamau 1993).

$$S = \frac{(1 + e^{-k\tau})}{(1 + e^{k(t-\tau)})} \quad (1)$$

$$\ln(S) = \ln \left[\frac{1 + e^{-k\tau}}{1 + e^{k(t-\tau)}} \right] \quad (2)$$

$$\ln(S) = \ln[\alpha e^{-k_1 t} + (1 - \alpha)e^{-k_2 t}] \quad (3)$$

Os parâmetros cinéticos foram obtidos por regressão não linear através do Software Statistica® versão 6.0, entretanto em virtude de se obter mais de uma solução para o modelo quando a Eq. (3) foi aplicada optou-se por, preliminarmente, determinar os parâmetros k_1 e k_2 através de linearização dos dados de sobreviventes das porções termo sensível e termo resistentes separadamente, e inserir estes parâmetros no modelo e calcular α . Dessa forma, o Software Statistica® forneceu o valor de α e informações estatísticas do ajuste obtido. Pruitt e Kamau (1993) sugeriram que melhores estimativas para os valores de D para curvas ajustadas pelo modelo logístico, Eq (1) e Eq. (2), são obtidas

usando os parâmetros estimados para calcular o tempo em que $S = 0.1$ o que por definição é o verdadeiro valor D . Substituindo $t = D$ na Eq. (1) e resolvendo para D resulta a Eq. (4), válida para estimativa dos valores D nas temperaturas 98 e 110C. Assim para $S = 0.1$:

$$D = \tau + \frac{[\ln(9 + 10e^{-k\tau})]}{k} \quad (4)$$

Para as temperaturas 120, 122,5 e 125C, os valores D foram obtidos pela Equação (5) por se tratar de duas frações com cinéticas lineares consecutivas.

$$D_i = \frac{2.303}{k_i} \quad (5)$$

Sendo $i =$ fração 1 ou 2.

Relação entre constantes de velocidade, Energia de Ativação e os parâmetros D e z :

O valor de energia de ativação foi obtido da equação de Arrhenius que relaciona as constantes cinéticas de inativação térmica com o inverso da temperatura absoluta. A transformação para z foi implementada mediante a fórmula de Ramaswamy *et al.* (1989) utilizando $T_{\text{mínimo}} = 371.15$ K e $T_{\text{máxima}} = 403.15$ K.

Resultados

Dois picos de ativação a 98C foram observados: a 15 e a 50 minutos indicando claramente a presença de população de esporos heterogênea como pode ser visto na Fig. 1. Até 120 minutos não se observaram diferenças significativas nas contagens obtidas após os choques térmicos. Foi selecionado o choque de 15 minutos pois seu efeito foi igual ao de 50 minutos porém com menos dano térmico sobre o produto.

Para todos os ensaios de cinética aqui reportados, a concentração inicial de esporos, N_0 , foi determinada a 98C, com choque de 15 minutos mais 3 minutos de tempo de atraso térmico.

Figura 1.

As curvas de sobreviventes dos esporos de *B. stearothermophilus* em mosto, (Tabela 1, Fig. 2), apresentaram dois tipos de comportamento: a presença de ombro marcante na temperatura de 98C e ombro menor a 110C, em que o modelo logístico monopopulacional, Eq. (2), foi especialmente apropriado; já para as temperaturas 120, 122,5 e 125C o modelo exponencial com dois termos para população de resistência heterogênea, Eq. (3), foi empregado. A curva de sobreviventes a 130C apresentou um pequeno ombro de menos de 2 segundos possibilitando tanto o ajuste do modelo logístico, Eq. (2), quanto o modelo semi logarítmico linear. Em virtude do tamanho do ombro ser muito pequeno, podendo estar associado a erros experimentais, optou-se, nessa temperatura, pela cinética linear de destruição térmica avaliando que esse comportamento estaria associado

ao desaparecimento instantâneo da fração termo sensível. Esses resultados indicaram que a temperatura influenciou na forma da curva de sobreviventes. Nas temperaturas mais baixas, 98C e 110C onde a fração dormente é alta, a fração mais resistente ditou a forma da curva de sobreviventes com a manifestação de ombro, enquanto que nas temperaturas intermediárias (120, 122,5 e 125C) as duas frações com suas cinéticas próprias se manifestaram consecutivamente, e a 130C o tradicional modelo linear de inativação térmica foi apropriado devido ao desaparecimento instantâneo de uma das frações.

A energia de ativação, segundo Arrhenius (Fig. 3A), e o valor z determinado segundo Ramaswamy *et al.* (1989), para destruição térmica de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 em mosto foram 249.52 kJ/mol e 11.48C, respectivamente. As constantes de velocidade, k , foram convenientemente convertidas para parâmetros de resistência térmica, D , de acordo com as Eqs. (4) e (5) com a finalidade de obtenção do valor z que é o inverso negativo da declividade do gráfico de $\log D$ versus temperatura, Fig. 3B. O valor z assim obtido foi de 9.19C e difere cerca de 20% do valor z calculado a partir da energia de ativação acima.

Tabela 1

Figura 2

Figura-3

Discussão

Os dados reportados nesta pesquisa mostraram claramente a não linearidade das curvas de sobreviventes para *B. stearothermophilus* ATCC 1518 em mosto. A heterogeneidade em resistência térmica dos esporos na suspensão utilizada neste trabalho pode ser vista pela curva de ativação térmica obtida. A manifestação de uma fração com alta resistência térmica pode ser verificada na Fig. 1, uma vez que mesmo após 120 minutos de tratamento térmico, a contagem dos esporos recuperados não diferiram significativamente das contagens máximas obtidas. Observou-se que apenas após 240 minutos de tratamento térmico a 98C se iniciou a morte térmica logarítmica (Fig. 2). A curva de ativação mostrou que de fato não houve aumento da população de esporos no início do tratamento térmico, mas sim nítido atraso térmico ou ombro, que foi bem ajustado através da aplicação do logaritmo natural ao modelo logístico, Eq. (2), para as temperaturas 98C e 110C. À medida que a temperatura subia (120, 122.5 e 125C) observou-se o desaparecimento do ombro e manifestação de duas populações de esporos com cinéticas de destruição térmicas semi-logarítmicas lineares e diferentes, sendo a primeira termo sensível e a segunda termo resistente, ajustadas pela Eq. (3). Nessa população de resistência heterogênia observou-se a predominância da fração termo sensível, $\alpha > 0,99$ (tabela. 1), e após seu desaparecimento ainda foi possível contar uma população mais resistente da ordem de 10^3 , 10^5 e 10^4 esporos/ml a 120, 122.5 e 125C, respectivamente. Nestas temperaturas, o prolongamento do tratamento térmico produziu aproximadamente três reduções decimais também através de cinética de morte térmica linear. Esse

comportamento foi descrito por Pflug (1990) para flora microbiana heterogênea e microrganismos com resistências variadas dentro da mesma espécie. A 130C dois ajustes de modelos cinéticos foram possíveis: um logístico, Eq. (2), que calculou um ombro de menos de 3 segundos, e o clássico linear. Neste trabalho optamos pelo modelo linear por consideramos que um ombro de 3 segundos pode estar associado a erros experimentais e que o modelo linear pode ser explicado pelo desaparecimento completo e instantâneo da fração termo sensível em temperatura mais elevada.

Embora os valores k tenham sido convenientemente convertidos para valores D , este parâmetro carece de significado quando a curva de sobreviventes não obedece cinética de primeira ordem. Por esse motivo os valores de destruição térmica para reportar estes dados, não são comparáveis à grande maioria de dados disponíveis na literatura pelo fato de estes últimos terem sido obtidos através de cinéticas lineares de primeira ordem.

Quanto aos valores z e energia de ativação, Pflug (1990) citou valores de z para *B. stearothermophilus* em diferentes meios entre 7.6 e 10.3C. Busta (1967) reportou valores de z de 6.7 e 8.9C e detectou influência do meio de esporulação na forma da curva de sobreviventes. Davies *et al.* (1977) reportaram 7.3 e 11.8C como valores de z para *B. stearothermophilus* em água e leite, respectivamente. O valor de z reportado por esses autores para o leite se aproxima do valor de z determinado nesta pesquisa. Alderton e Snell (1970) reportaram curvas de sobreviventes semi-logarítmicas não lineares e energias de ativação entre 173 e 193 kJ/mol em baixa atividade de água, $a_w = 0.28$. Os dados de Wescott *et al.* (1995) em tampão de fosfato (pH = 6.8) para energia de ativação em batelada, em

processo contínuo pelo método tradicional e pelo método do ponto equivalente, foram respectivamente 377, 366 e 405 kJ/mol, enquanto os valores de z foram 8.1, 7.5 e 7.3C, respectivamente. Para garantir ativação e evitar ombros nas curvas de sobreviventes, estes autores submeteram a suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 12980, utilizada durante o estudo, a choques térmicos a 105C por 15 minutos, 1 hora antes de cada experimento. Dessa forma obtiveram cinéticas lineares de destruição térmica.

Abraham *et al.* (1990) avaliaram as curvas de sobreviventes de suspensão aquosa deste microrganismo para seis temperaturas variando entre 105 a 130C, ajustando um modelo idêntico à Equação (3), assumindo que a suspensão de esporos continha uma população de esporos ativa e termo sensível e uma população dormente que tinha que ser ativada antes de ser destruída. As curvas de sobreviventes obtidas por esses autores revelaram aumento na contagem dos esporos nos instantes iniciais do tratamento. Esses autores consideraram que os dois mecanismos destruição e ativação à temperatura constante seguiam cinéticas de primeira ordem com constantes K_d e K_a e demonstraram, através dos seus dados, que a dormência era independente da temperatura e que o fenômeno limitante era a ativação dos esporos. Suas constantes cinéticas de inativação térmica a 105, 110, 115, 121, 126 e 130C foram para o fenômeno limitante K_a 0.008, 0.022, 0.12, 0.8, 3.5 e 11 min^{-1} , respectivamente. Avaliando esses dados, verifica-se que as constantes seguem Arrhenius com energia de ativação de 377.20 kJ/mol e valor z de 7.74C, obtido a partir do valor da energia de ativação de acordo com a fórmula de Ramaswamy *et al.* (1989). Como pode ser observado pela Fig. 4, os valores das constantes aqui calculadas e as reportadas por

Abraham *et al.* (1990) são bastante coincidentes nas temperaturas acima de 120C. As diferenças se acentuaram nas temperaturas mais baixas nas quais, neste trabalho, foram detectados ombros planos enquanto que os autores reportaram aumento da contagem de esporos no início dos tratamentos térmicos realizados por eles. As diferenças entre os parâmetros obtidos certamente estão relacionadas às formas das curvas de sobreviventes, em substratos diversos.

Figura 4

Embora as constantes cinéticas aqui calculadas sigam Arrhenius (Fig. 3A) com bom ajuste estatístico ($R^2=0.948$, $F=73$ e $p=0.001025$), observou-se um claro desvio da linearidade nas temperaturas mais altas. Pflug (1990) citou a possibilidade de desvios da linearidade das constantes cinéticas em relação a Arrhenius. Efeito similar foi observado por Davies *et al.* (1977) para esporos de *B. stearothermophilus* em água a partir de 132.5C e em leite a partir de 142.5C. As constantes obtidas por Abraham *et al.* (1990) não apresentaram desvios da linearidade em gráfico de Arrhenius como pode ser visto na Fig. 4.

Os dados desta pesquisa confirmaram a não linearidade das curvas de sobreviventes de *B. stearothermophilus* ATCC1518 muito provavelmente relacionada à heterogeneidade na resistência térmica da população de esporos ou também poderia ser devido à degradação dos componentes do meio de aquecimento que certamente afeta a recuperação dos esporos injuriados. A não linearidade das curvas de sobreviventes é amplamente reconhecida e muitos modelos não lineares têm sido propostos e testados para descrevê-la. Não foi

possível, com nossos dados, ajustar apenas um tipo de curva de sobreviventes. A Eq. (3) é apropriada para descrever processos com incremento inicial da contagem de microrganismos nos instantes iniciais (Abraham *et al.* 1990) e não para descrever ombros planos como os encontrados aqui nas temperaturas inferiores que foram bem ajustados pelo modelo logístico, Eq. (2). Entretanto os dois modelos concordaram que essa fase inicial de ativação é a fase limitante do processo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao e Centro de Tecnologia Copersucar pelo apoio financeiro deste projeto.

Nomenclatura

$(1-\alpha)$: fração 2 de sobreviventes, termo-resistente

D: índice de redução decimal (minutos)

D_1 : índice de redução decimal da fração 1 da população de esporos (minutos)

D_2 : índice de redução decimal da fração 2 da população de esporos (minutos)

DE: diâmetro externo dos tubos TDT

D_i diâmetro interno dos tubos TDT

E_a : Energia de ativação, (kJ/mol)

k_1 e k_2 as constantes de destruição térmica das frações 1 e 2 da população de esporos, respectivamente (min^{-1}) na eq.(3)

k_a : constante de ativação térmica da população de esporos dormente (minutos^{-1})

k_d : constante de destruição térmica da população de esporos ativa e termo sensível (minutos^{-1})

k : constante de destruição térmica (min^{-1})

N: esporos/ml no tempo = t

N_0 : esporos/ml no tempo inicial = t_0

$^{\circ}\text{Be}$: densidade específica de soluções. Na indústria sucroalcooleira é usada para expressar concentração de soluções de leite de Cao (2g de substância seca/100 ml de solução)

$^{\circ}\text{Brix}$: concentração de sólidos solúveis (%m/m)

R: constante geral dos gases = $8,314 \times 10^{-3}$ kJ/mol K

S (N/N_0): Fração de esporos sobrevivente no tempo t

TDT: Tempo de Morte Térmica

z : coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial ($^{\circ}\text{C}$).

α : fração 1 de sobreviventes, mais termo-sensível

τ : medida do atraso letal (min).

Referências

- ABRAHAM, G., DEBRAY, E., CANDAU, Y. and PIAR, G. 1990. Mathematical Model of Thermal Destruction of *Bacillus stearothermophilus* Spores. Applied and Environmental Microbiology 56(10), 3073-3080.
- ALCARDE, V.E. e YOKOYA, F. 2003. Efeito da População de Bactérias na Floculação de Leveduras Isoladas de Processos Industriais de Fermentação Alcoólica. STAB. 21(4), 40-42.
- ALDERTON, G. and SNELL, N. 1970. Chemical States of Bacterial Spores: Heat Resistance and Its Kinetics at Intermediate Water Activity. Applied Microbiology 19(4), 565-572.
- BEAMAN, T.C. and GERHARDT, P. 1986. Heat Resistance of Bacterial Spores Correlated with Protoplast Dehydration, Mineralization and Thermal Adaptation. Applied and Environmental Microbiology 52(6), 1242-1246.
- BENDER, G.R. and MARQUIS, R.E. 1985. Spore Heat Resistance and Specific Mineralization. Applied and Environmental Microbiology 50(6), 1414-1421.
- BROMBERG, R. and YOKOYA, F. 1995. Chemical modification of cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 105 and their effect on flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11, 508-511.

- BURTON, H., PERKIN, A.G., DAVIES, F.L. e UNDERWOOD, H.M. 1977.
Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. J. Fd. Technol. 12, 149-161.
- BUSTA, F.F. 1967. Thermal Inactivation Characteristics of Bacterial Spores at Ultrahigh Temperatures. Applied Microbiology 15(3), 640-645.
- CASADEI, M.A., INGRAM, R., HITCHINGS, E., ARCHER, J. and GAZE, J.E. 2001.
Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. Internation Journal of Food Microbiology 63, 125-134. Disponível em www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 1996. Perdas na fermentação: é possível reduzir! Piracicaba: INDUSTRIAL INFORMA 50, 1-2.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. COORDENADORIA INDUSTRIAL. 1983a. Controle Microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. Boletim Técnico Copersucar 22, 2-17.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. DIVISÃO INDUSTRIAL. 1983b. Manual de Controle Microbiológico da Usina de Açúcar e Álcool. Cadernos Copersucar - Série Industrial 5, 1-10.
- DAVIES, F.L, UNDERWOOD, H. M., PERKIN, A.G. and BURTON, H. 1977.
Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. J. Fd. Technol. 12, 115-129.
- EVANS, T.H. and HIBBERT, H. 1946. Bacterial polysaccharides. In: Advances in carbohydrate chemistry 2, 203-233. Academic Press, Inc. New York.

- FORMAGGIO, G.J. e FINGUERUT, J. 1998. Produção específica de ácidos orgânicos. Piracicaba: Relatório Técnico Copersucar RT963-99/00, 1-12.
- FRANCHI, M.A., SERRA, G.E. and CRISTIANINI, M. 2003b. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. *J. Food Sci.* 68(7), 2310-2315.
- FRANCHI, M.A., SERRA, G.E., SVILOSEN, J. and CRISTIANINI, M. 2003a. Thermal death kinetics of bacterial contaminants during cane sugar and alcohol production. *International Sugar Journal* 105(1259), 527-530.
- GALLO, C.R. 1990. Determinação da Microbiota Bacteriana de Mosto e de Dornas de Fermentação Alcoólica. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.
- GALLO, C.R. e CANHOS, V.P. 1991. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão. *Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos Piracicaba* 9(4-5), 35-40.
- GEERAERD, A.H., HERREMANS, C.H. and VAN IMPE, J. F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59, 185-209.
- GOUTHIER, H. A.; MASSAGUER, P. R. 1987. Determinação da resistência térmica de microrganismos indicadores da esterilização em caldo de cana. In Congresso Brasileiro de Microbiologia, XIV, 1987, Viçosa-MG. Resumo. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987, D12, p. 46-47.
- HELDMAN, D.R. e NEWSOME, R.L. 2003. Kinetic Models for Microbial Survival During Processing. *Food Technology* 57(8), 40-46.

- KAJI, D.A. 1989. Influência da Temperatura e Infecção Láctica na Fermentação Alcoólica. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.
- KESSLER, H.G. 1981. Food Engineering and Dairy Technology, Verlag A. Kessler, Germany.
- KLAUSHOFER, H., CLARKE, M.A, REIN, P.W and MAUCH, W. 1998. Microbiology. In Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture, (Van der Poel, P.W, Schiweck H. and Schwartz T., authors) pp 993 – 1008, Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin.
- LIMA, T.C.S, GRISI, B.M. and BONATO, M.C.M. 1999. Bacterial Isolated From a Sugarcane AgroEcosystem: Their Potential Production Of Polyhydroxyalcanoates And Resistance To Antibiotics. Rev Microbiol. 30, 214-224.
- NEGRO, M.R.G.O.C., YOKOYA, F. and EBERLIN, M.N. 2003. The Chemical Composition Of “Canjica” A Polymeric Material Found In Brazilian Sugar Cane Industry. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19(6), 625-630.
- NOLASCO, J.J. e FINGUERUT, J. 1993. “Projeto Flocação- Fase I- Caracterização e Proposta de um Índice de Flocação.Piracicaba: Relatório Técnico Copersucar, RT-674/93, 1-12.
- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 1997. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. Revista de Microbiologia 28, 25-31.

- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 2001. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria From The Alcohol Industry To Several Antimicrobial Compounds. Bras. Journal of Microbiology 32, 10-14.
- OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M. e HORII, J. 1998. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. Sci agric. 55 (3), 1-12.
- PELEG, M. 1997. Modeling Microbial Populations with the Original and Modified Versions of the Continuous and Discrete Logistic Equations. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 37(5), 471-490.
- PERIAGO, P.M., FERNÁNDEZ, P.S., OCIO, M.J. and MARTINEZ, A. 1998. A predictive model to describe sensitization of heat-treated *Bacillus stearothermophilus* spore to NaCl. Z. Lebensm Unters Forsch A, 206, 58-62, Springer-Verlag.
- PERKIN, A.G., BURTON, H., UNDERWOOD, H.M. and DAVIES, F.L. 1977. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. J. Food Technol. 12, 131-148.
- PFLUG, I.J. 1990. Microbiology and Engineering of Sterilization Processes. Environmental Sterilization Laboratory, 7ª edição, Minneapolis, MN.
- PRUITT, K.M. and KAMAU, D.N. 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. Journal of Industrial Microbiology 12, 221-231.
- RAMASWAMY, H.S., VAN DE VOORT, F.R. and GHAZALA, S. 1989. An Analysis of TDT and Arrhenius Methods for Handling Process and Kinetic Data. Journal of Food Science 54(5), 1322-1326.

- RODRIGUEZ, A.C., SMERAGE, G.H., TEIXEIRA, A.A., LINDSAY, J.A. and BUSTA, F. F. 1992. Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes. *Journal of Food Process Engineering* 15, 1-30.
- STROPPA, C.T., ANDRIETTA, M.G.S., ANDRIETTA, S.R., STECKELBERG, C. and SERRA, G.E. 2000. Use Of Penicillin And Monesin To Control Bacterial Contamination Of Brazilian Alcohol Fermentations. *Int. Sugar Journal* 102(1214), 78-82.
- STROPPA, C.T., STECKELBERG, C., SERRA, G.E., ANDRIETTA, M.G.S. e ANDRIETTA, S.R. 1998. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. *STAB- Açúcar, Álcool e Subprodutos* 16, 35-38.
- STUMBO, C.R. 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*, 2a edição, Academic Press, New York.
- THAL, L.A. and ZERVOS, J.M. 1999. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43, 171-176.
- TROMBINI, M.A.M., ROVANHOL, A.A., VITTI, L.S.S., BEDA, D.F., PORTO, R.C.B. e SÁ, J.S. 1988. Causas da Contaminação e suas conseqüências em Usinas de Açúcar e Álcool. *STAB*. 16(6), 18p.
- VAN BOEKEL, M. A.J. S. 2002. On the use of Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74, 139-159.
- VAN DEN BOGAARD, A.E., WILLEMS, R., LONDON, N., TOP, J. and STOBBERINGH, E.E. 2002. Antibiotic resistance of faecal *enterococci* in

poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 497-505.

Disponível em <http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>.

WESCOTT, G.G., FAIRCHILD, T.M. and FOEGEDING, P.M. 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* Spore Inactivation in Batch and Continuous Flow Systems. *Journal of Food Science* 60 (3), 446-450.

YOKOYA, F. e OLIVA-NETO, P. 1991. Características da Flocculação de Leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. *Rev Microbiol.* 22(1), 12-16, São Paulo

TABELA 1.

PARÂMETROS CINÉTICOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE *B.**STEAROTHERMOPHILUS* ATCC1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRX)

T (C)	Modelo cinético	τ (min)	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	α Fração termo-sensível)	^c (R ²)/[F]{p}
98	Eq [2]	295,39	0,0194	-----	-----	(0,990)/[704] {<0,01}
110	Eq [2]	45,82	0,1114	-----	-----	(0,981)/[306] {0,01}
120	Eq [3]	-----	1,71 ^a	0,51 ^b	0,996	(0,999)/[5548] {0,01}
122,5	Eq [3]	-----	5,50a	1,51b	0,965	(0,998)/[2748] {<0,01}
125	Eq (3)	-----	16,25 ^a	4,29 ^b	0,9992	(0,988)/[426] {<0,01}
130	Linear	-----	13,63	-----	-----	(0,987)/[308] {<0,01}

^arelativo à fração termo-sensível.^brelativo à fração termo-resistente.

^c R²= coeficiente de correlação
 F= teste estatístico
 p = nível de significância.

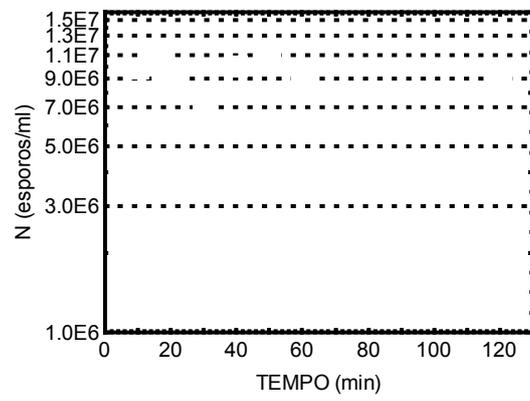


FIG. 1. ATIVAÇÃO TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 EM MOSTO (pH=6.14, 21.5°BRIX) A 98C.

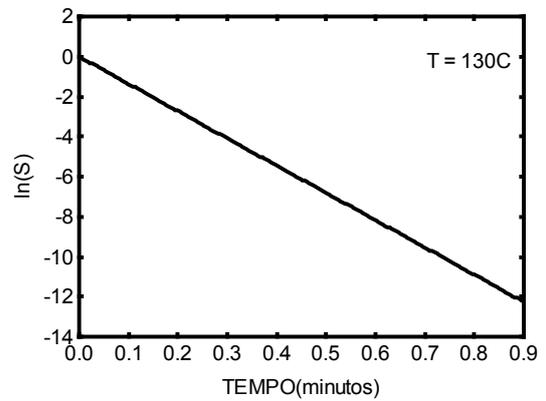
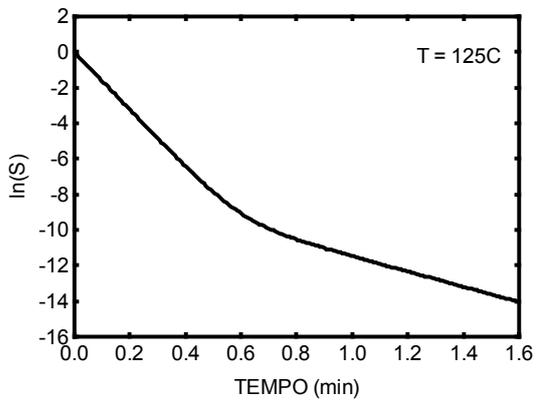
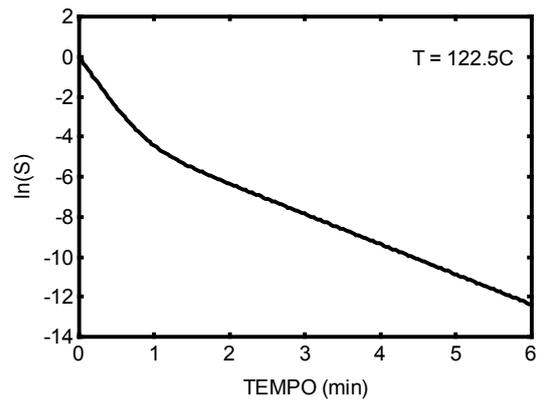
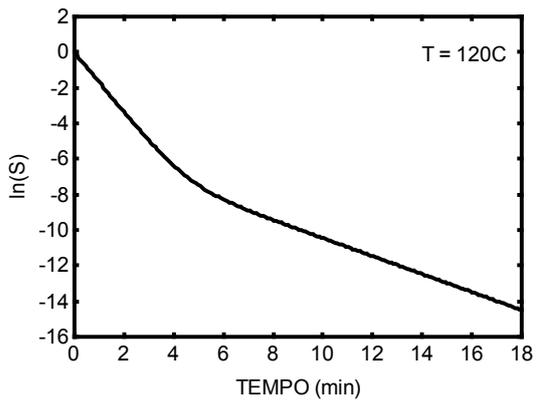
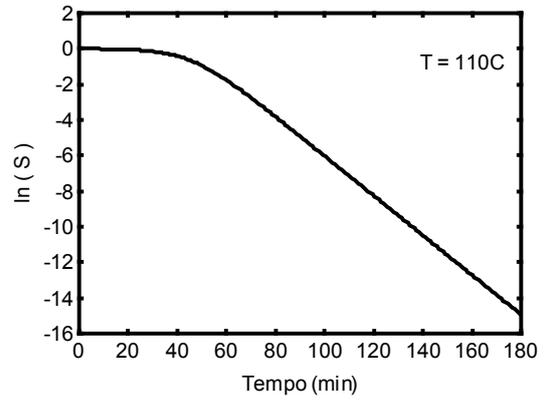
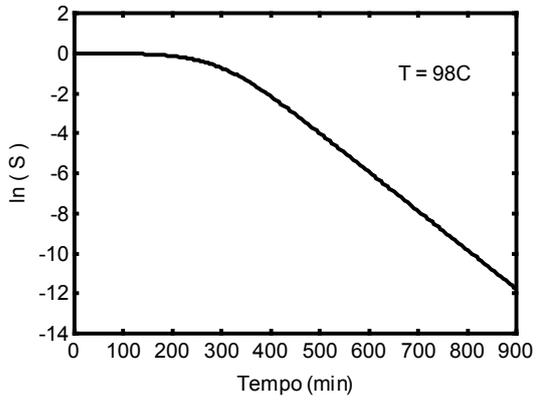


FIG. 2. PONTOS EXPERIMENTAIS E CURVAS DE SOBREVIVENTES DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 AJUSTADAS AOS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS EM MOSTO (pH = 6.14, BRIX=21.5°BRIX) (CONSTANTES CINÉTICAS NA TABELA 1).

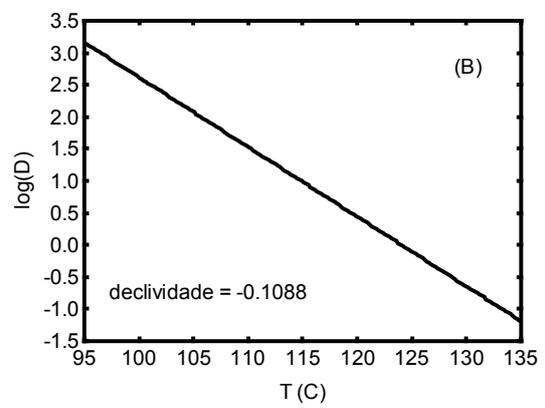
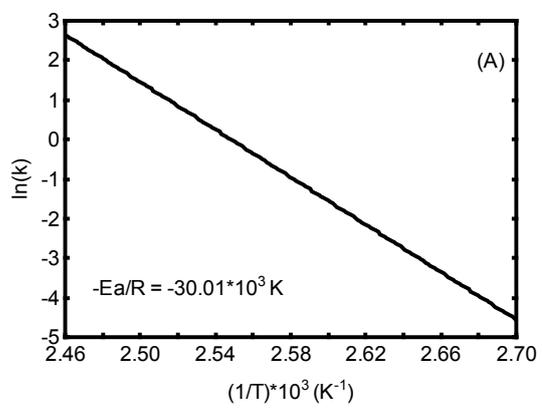


FIG. 3. (A): GRÁFICO DE ARRHENIUS PARA DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) ($R^2 = 0.948$; $F = 73$; $P = 0.001025$) E (B) CURVA FANTASMA PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO z PARA DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 1518 EM MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX) ($R^2 = 0.973$, $F=143$, $P=0.000278$), UTILIZANDO APENAS OS VALORES DA FRAÇÃO RESISTENTE

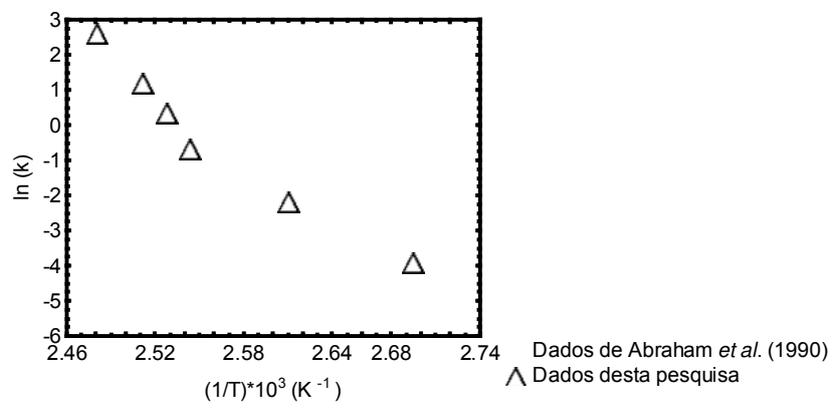


FIG. 4. COMPARAÇÃO DO GRÁFICO DE ARREHNIUS: DADOS DE ABRAHAM *et al.* (1990) E DESTA PESQUISA.

Capítulo 6

OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TÉRMICO PARA INATIVAÇÃO DE CONTAMINANTES DE MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Artigo que será submetido à revista Journal of Food Process Engineering, de acordo com as normas de submissão da revista.

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TÉRMICO PARA INATIVAÇÃO DE
CONTAMINANTES DE MOSTO DE CALDO DE CANA PARA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA.**

J. Nolasco Junior¹ e P.R. De Massaguer²

**^{1,2} Universidade de Campinas-UNICAMP, Faculdade de Engenharia de
Alimentos (FEA) /Departamento de Ciência de Alimentos, Rua Monteiro
Lobato, 80, Campinas-São Paulo/Brasil C.P. 6121 – CEP 13083-862.**

**¹ A quem correspondência deve ser enviada. R 13 de maio, 1727, 13419-270,
Piracicaba-SP-BRASIL, fone +55-021-19-34225966,
Jonas.nolasco@terra.com.br**

Running Title: OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO TÉRMICO PARA MOSTOS.

RESUMO:

Definiu-se a localização do processo de tratamento térmico do mosto após a etapa de decantação e determinou-se a carga microbiológica de grandes grupos microbianos deteriorantes neste ponto. A concentração máxima encontrada para os esporos termofílicos produtores de acidez plana foi 9.0×10^1 esporos/ml. A letalidade média da decantação para *L. fermentum* e *B. stearothermophilus* foi 4.0×10^6 e 0.14 reduções decimais, respectivamente. A partir de dados cinéticos de destruição térmica dos açúcares e dos esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, eleito microrganismo alvo, foi possível desenhar um processo térmico otimizado para inativação das bactérias contaminantes do mosto de caldo de cana para fermentação alcoólica. Este processo é compreendido por binômios tempo x temperatura que vão desde 114C/(3000 segundos) até 140C/(3-335segundos).

Introdução

O álcool produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto formado de caldo de cana e melão que é proveniente do processo de fabricação de açúcar. O mosto, por suas características físico-químicas, sustenta uma microbiota diversa formada predominantemente por bactérias gram positivas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* (Evans e Hibbert 1946; Centro de Tecnologia Copersucar 1983b; Centro de Tecnologia Copersucar 1983a; Kaji 1989; Klaushofer *et al.* 1998, Gallo 1990; Gallo e Canhos 1991). A nível de espécie Gallo (1990) reportou para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente: *L. fermentum* (15,04%), *L. helveticus* (14,08%), *L. plantarum* (5,69%), *L. animalis* (4,55%), *L. buchneri* (3,76%), *L. acidophilus* (3,07%), *L. vitulinus* (2,96%), *L. viridescens* (2,35%), *L. amylophilus* (1,88%), *L. agilis* (1,25%), *L. reuteri* (1,22%), *L. delbrueckii subsp. Lactis* (1,04%), *L. murinus* (1,02%), *L. delbrueckii subsp bulgaricus* (0,71%), *L. coryniformis subsp torquens* (0,71%) e *L. saki* (0,42%), *B. coagulans* (15,09%), *B. stearothermophilus* (6,91%), *B. megaterium* (2,43%), *B. brevis* (1,23%), *B. lentus* (0,70%) e *B. pasteurii* (0,22%). Essa microbiota é enviada ao processo de fermentação onde, além de competir pelo substrato com a levedura do processo, provoca a floculação do fermento e é freqüentemente associada com o elevado nível de perdas no processo de produção de álcool: 30% das perdas totais determinadas ou 1.5 -5.0% de queda de rendimento fermentativo (Centro de Tecnologia Copersucar 1996; Formaggio e Finguerut 1998; Trombini *et al.* 1988; Yokoya e Oliva-Neto 1991; Nolasco e Finguerut 1993; Bromberg e Yokoya 1995; Alcarde e Yokoya 2003; Oliva-Neto e Yokoya 1997; Stroppa *et al.* 1998;

Oliveira-Freguglia e Horii 1998; Negro *et al.* 2003). Nem todas as bactérias são capazes de provocar floculação: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* têm sido reconhecidas como tendo capacidade de provocar a floculação de leveduras enquanto que *B. subtilis* e *B. coagulans* não (Yokoya e Oliva-Neto 1991; Alcarde e Yokoya 2003).

Nolasco e Finguerut (1998) avaliaram diferentes fluxogramas de processo de preparo e transporte de mosto até a fermentação e os equipamentos existentes alocados nesse processo com seus respectivos níveis de contaminantes. Além disso caracterizaram do ponto de vista microbiológico todas as correntes formadoras do mosto além do próprio mosto em 39 Usinas de Açúcar e Álcool. Apesar de encontrarem diferenças significativas nos tipos de equipamentos usados e temperaturas ao longo da linha de mosto, verificaram invariavelmente que os mostos à chegada na fermentação apresentavam contagens de bactérias lácticas da ordem 10^6 UFC/mL além de esporos mesofílicos e termofílicos da ordem de 10^1 UFC/mL.

Christofoletti *et al.* (1998) avaliando a carga microbiológica de todas as correntes formadoras do mosto e a quantidade de sólidos que eram tipicamente enviados à fermentação, onde ficavam aprisionados, propuseram misturar todas as correntes formadoras do mosto (caldo da moenda, caldo dos filtros, mel e água) antes do decantador e de forma diferente do que se pratica, propuseram transformar o decantador de caldo em decantador de mosto, conduzindo essa decantação de forma muito mais rigorosa com o objetivo de obter um padrão físico-químico e microbiológico muito mais rigoroso ao mosto. Os mesmos autores chamaram atenção para a necessidade de procedimentos de higienização que

garantissem a manutenção dessa qualidade do mosto até a sua chegada ao processo de fermentação.

As estratégias de controle dos contaminantes do processo de fermentação alcoólica se concentram basicamente no uso de antibióticos. São produtos que foram desenvolvidos para uso em veterinária, onde são usados como aditivos alimentares antibacterianos na criação intensiva de animais, e são efetivos contra bactérias gram positivas, daí a sua aplicabilidade no controle da infecção na fermentação (Oliva-Neto e Yokoya 2001; Stroppa *et al.* 2000). Quimicamente, são relacionados com os antibióticos reservados para tratamento de infecções em humanos. É crescente a preocupação com relação ao uso em larga escala desses antibacterianos. Os riscos associados ao desenvolvimento de resistência a antibióticos são crescentes e não podem ser desprezados, pois as potenciais conseqüências tanto para a saúde animal como humana são sérias. Na Europa, e principalmente nos países nórdicos, o uso desses produtos tem sido severamente restrito. Existem fortes correlações entre o uso em larga escala desses produtos e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos mais potentes disponíveis, caso dos antibióticos vancomicina® e sinercid® nos Estados Unidos, associados ao uso dos produtos avoparcina® e virginiamicina® na criação de frangos e porcos (Thal e Zervos 1999; Van Den Bogaard *et al.* 2002; Lima *et al.* 1999). A virginiamicina® é um produto também usado no controle de infecções na fermentação.

A decisão de se projetar um processo térmico para inativação desses contaminantes do mosto pressupõe o estudo tanto da destruição térmica dos açúcares sacarose, glicose e frutose que compõe o mosto e que devem ser preservados para sua utilização, como substrato na fermentação, quanto dos

microrganismos contaminantes que competem com a levedura. Estes estudos devem ser realizados nas mesmas condições de Brix e pH encontrados nas Usinas. Os contaminantes do gênero *Bacillus* por produzirem esporos estão entre os que apresentam maior resistência térmica e dentre esses, o *B. stearothermophilus* é de longe o microrganismo mais resistente e adaptado ao pH do mosto.

Baseado nos parâmetros cinéticos obtidos em mosto de fermentação alcóolica para a hidrólise da sacarose, degradação térmica dos açúcares redutores totais, ART, e destruição térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* ATCC1518 (Nolasco Junior e De Massaguer 2005a,b,c), foi possível definir as curvas limites para determinação da região de processo térmico a exemplo de Kessler(1981) para leite UHT.

Materiais e Métodos

Localização do processo térmico:

O processo de esterilização foi localizado após a decantação conforme figura-1 abaixo, onde as linhas tracejadas representam as modificações no processo existente. Pela proposta, todas as correntes formadoras do mosto passam a ser misturadas num tanque de caldo para destilaria. O mosto assim preparado segue para a etapa de clarificação usualmente praticada nas Usinas que consiste de calagem, aquecimento, resfriamento evaporativo (“flash”) e adição de polímero aniônico antes de ser enviado ao decantador de mosto. O mosto clarificado é então enviado ao processo de tratamento térmico antes de ser enviado à fermentação.

Figura 1

Determinação da história térmica mínima nos decantadores para cálculo da letalidade:

Como no decantador, o mosto fica em temperatura próxima à ebulição à pressão atmosférica por 0.8–3.0 horas, procedeu-se a determinação da distribuição interna de temperatura em decantadores industriais com capacidade de 500 e 700 m³, para avaliar a letalidade do processo nestes equipamentos aos contaminantes do mosto. A medição das temperaturas nas diversas posições internas, Figura 2 e Figura 3, dos equipamentos foi feita através da alocação de sensores de temperatura por resistência (PT-100, 3 fios, classe 1/10 DIN, com bainha rígida em inox, 6x20 mm com rabicho de 12 m em teflon para imersão) e aquisição dos dados em Indicador multiponto Presys® DMY-2015-1-0-0-1-2-0, alimentação 90-240 VAC, conectado em PC para armazenagem dos dados que foram coletados a cada minuto. Cada decantador foi monitorado em média 15 dias durante 24 horas. Esse trabalho foi realizado em Usina de Açúcar e Álcool, localizada no Estado de São Paulo. Cada ponto interno aos decantadores foi caracterizado por sua respectiva temperatura média com intervalo de confiança igual a 95%.

A letalidade foi calculada para o ponto mais frio identificado, utilizando a menor temperatura dentro do intervalo de confiança, considerando um tempo médio de residência no decantador convencional e decantador rápido igual a 2.5 horas e 1.15 horas, respectivamente. O efeito letal integral ou valor de

esterilização do processo (F_p), expresso em $\frac{\min T_R}{\min T}$ produzido por cada tipo de decantador foi calculado para *L. fermentum* e esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, multiplicando-se o respectivo tempo de residência médio pela letalidade calculada para o ponto frio pela equação $L = 10^{\frac{(T-T_R)}{z}}$ utilizando 120C como temperatura de referência, obtendo-se assim a letalidade média de cada processo de decantação. Considerando que segundo Franchi *et al.* (2003) a destruição térmica de *L. fermentum* é linear, o valor $z = 7.7C$ encontrado pelos autores pode ser utilizado para obter uma estimativa da letalidade média do processo de decantação sobre o *L. fermentum*. Para os esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, o valor $z = 11.48C$ reportado por Nolasco Junior e De Massaguer (2005c) para a fração mais resistente dos esporos foi utilizado para essa finalidade. O número de reduções decimais na população de cada microrganismo, γ , foi calculado pela equação $F_p = \gamma D_{120C}$.

A avaliação do efeito térmico do processo de decantação sobre a hidrólise da sacarose e sobre a degradação de ART foi baseada nos dados a 110C de Nolasco Junior e De Massaguer (2005a,b), substituindo-se os parâmetros cinéticos, Tabela 3 e Tabela 4, ajustados aos respectivos modelos e calculando-se a fração de açúcares remanescentes, $S = \left(\frac{x}{x_0} \right)$, correspondente aos tempos médios de residência encontrados nos decantadores. Estes cálculos foram feitos através da rotina Solver® do software Statistica® 6.0. A temperatura de 110C foi a

mais baixa usada por esses autores em suas pesquisas sobre degradação térmica de açúcares em mosto de caldo de cana.

Determinação da carga microbiológica à saída dos decantadores:

Determinação da carga microbiológica no mosto clarificado na saída do decantador (N0). Conhecer a flora neste ponto foi importante pois seria o ponto de entrada do mosto para o processo térmico a ser implementado. Essa determinação foi feita através de uma amostra de 1 litro proveniente de cada uma de 4 Usinas, e contagens por diluição e plaqueamento no laboratório de Termobacteriologia da faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Os seguintes grupos microbianos foram quantificados: Contagem de esporos mesofílicos aeróbios em Agar Triptona Glicose Extrato de carne (TGE, DIFICO®) segundo Stevenson e Segner (2001).

Contagens de esporos mesofílicos anaeróbios em meio PE-2 (extrato de levedura, 3g; peptona, 20; solução de bromocresol púrpura em etanol a 2%, 2ml; 1000 ml água destilada) segundo Scott *et al.* (2001).

Contagem de esporos termofílicos totais e produtores de acidez plana em Dextrose Triptona Ágar (DTA, Oxoid®) segundo metodologia geral para açúcar líquido de Olson e Sorrells (2001) com expressão do resultado em UFC/ml de mosto. Para isso não foi considerada a concentração de açúcares no mosto. Foram diluídos 10 ml de mosto em 90 ml de água destilada estéril, procedeu-se o choque térmico e resfriamento rápido de acordo com a metodologia, seguido de complementação do volume com água destilada estéril, distribuído o volume total

da suspensão de 10 ml em 5 placas (2 ml por placa). O resultado foi expresso pela soma das colônias contadas por ml de mosto.

Contagem de bactérias lácticas em Agar de Man, Rogosa and Sharpe (MRSA, ACUMEDIA®) segundo Hall et al. (2001) acrescido de actidione (100ppm).

Contagem de *Leuconostoc Mesenteroides* em TBY (extrato de levedura, 5g; triptona, 10g; sacarose, 100g; glicose, 10; agar, 12g; água, 1000 ml). Foi adicionado 100 ppm de actidione e 0.5 ml de solução de azida sódica 1% para cada 100 ml de meio, segundo metodologia descrita em Centro de Tecnologia Copersucar (2000) para contagem de bactérias produtoras de goma, inibindo leveduras.

Contagem de bactérias mesófilas aeróbias totais em Agar Padrão para Contagem (PCA, Oxoid®) segundo Morton (2001).

Contagens de bactérias sulfito redutoras em Agar sulfito (Oxoid®) segundo Donnelly e Hannah (2001).

Contagem de bolores e leveduras em Batata Dextrose Ágar (PDA, Oxoid®) acidificado com solução ácido tartárico para pH = 3.5, segundo Mislivec *et al.* (1992).

Desenho do processo térmico:

Como alvo do processo de tratamento térmico, foram utilizados esporos de *B. stearothermophilus* ATCC1518, devido a sua alta resistência, levando em conta que o nível da população final deste organismo deverá ser reduzido para 10^{-4} esporos / mL de mosto, considerando uma população inicial de 1×10^1 esporos /

mL de mosto conforme (Nolasco e Finguerut, 1998). Este tipo de processo deverá ser bem mais que suficiente para atingir o *L. fermentum*, reconhecido agente floculante (Yokoya e Oliva Neto 1991), que por tratar-se de não esporulado tem resistência térmica inferior. A máxima perda de açúcares admitida no tratamento térmico foi definida de forma a causar o mínimo impacto no rendimento da fermentação e contrabalancear as perdas de rendimento associadas à infecção-floculação, estimadas em até 5% (Formaggio e Finguerut, 1998). Baseado nesse fato foi admitida uma perda máxima de açúcares de 1.3%, mesma magnitude da precisão das análises cromatográficas utilizadas nos estudos cinéticos de degradação térmica dos açúcares do mosto. Assim variações de até 1.3% na concentração dos açúcares durante os tratamentos térmicos, ficaram dentro da margem de erro analítico e não foram consideradas como perdas. Com base nos dados cinéticos coletados para os esporos de *B. stearothermophilus* ATCC1518 (Nolasco Junior e De Massaguer 2005c) e para os açúcares (Nolasco Junior e De Massaguer 2005a,b), num diagrama tempo-temperatura, foram traçadas as curvas TDT limites para causar 5 reduções decimais em esporos de *B. stearothermophilus* (limite inferior da região de tratamento térmico) cruzando com as curvas limites para perda de açúcares de 1.3%, ou seja uma preservação de 98.7% (limite superior da região de tratamento térmico). O cálculo para determinação do tempo referente a esses impactos foi feito com a rotina Solver® do software Excel®, utilizando as curvas de sobreviventes e os respectivos parâmetros cinéticos calculados que podem ser encontrados nas Tabelas 1, Tabela 2 e Tabela 3. Para o microrganismo alvo foi fixado uma fração de

sobrevivência, S, igual a $-11.51 \cdot \ln(10^{-5})$ e para os açúcares foi fixado uma fração de açúcares remanescentes, S, igual a 0,987. A partir desses dados, a rotina Solver® calculou o tempo para se obter os valores de sobreviventes, S, fixados para cada fator termodegradável, definindo cada uma das curvas limites envolvidas. Na porção inferior do cruzamento das retas definiu-se a região ótima do processo. Um enfoque similar foi desenvolvido para definir a região UHT de processamento de leite por Kessler (1981). Considerações econômicas sobre o custo energético do processo térmico são de menor importância em unidades auto-suficientes em energia.

Tabela 1.

$$S = \frac{(1 + e^{-k\tau})}{(1 + e^{k(t-\tau)})} \quad (1)$$

Tabela 2.

$$S = \left\{ \frac{\alpha [(1 + e^{-k_1\tau_1})]}{(1 + e^{k_1(t-\tau_1)})} \right\} + \left\{ \frac{(1 - \alpha) [(1 + e^{-k_2\tau_2})]}{(1 + e^{k_2(t-\tau_2)})} \right\} \quad (2)$$

Tabela 3.

$$\ln(S) = \ln \left[\frac{1 + e^{-k\tau}}{1 + e^{k(t-\tau)}} \right] \quad (3)$$

$$\ln(S) = \ln\left[\alpha e^{-k_1 t} + (1 - \alpha) e^{-k_2 t}\right] \quad (4)$$

Resultados e Discussão

A carga microbiana do caldo à saída do decantador e que deverá ser inativada pelo processo térmico, pode ser vista na Tabela 4 abaixo. As Usinas 1 e 3 estão localizadas em regiões bastante úmidas e solo com alta capacidade de retenção hídrica e clima muito quente, enquanto que as Usinas 2 e 4 estão situadas em regiões bastante secas. O solo da região de localização da Usina 2 é um solo predominantemente arenoso com baixa capacidade de retenção hídrica enquanto que o solo da região de localização da Usina 4 é um solo predominantemente com alta capacidade de retenção hídrica. O grupo de bactérias lácticas inclusive os *Leuconostoc sp*, bem como os bolores e leveduras não foram detectados na menor diluição de plaqueamento realizado, 10^{-1} , confirmando o efeito térmico do processo de decantação na flora menos resistente. As bactérias do gênero *Sporolactobacillus* e *Bacillus* são membros de significância do grupo dos formadores de esporos mesofílicos aeróbios e apresentam baixa resistência térmica. Os esporos mesofílicos aneróbios sacarolíticos são tão sensíveis ao calor que sua presença em alimentos minimamente processados são tratados como contaminação pós processamento ao invés de subprocessamento. As bactérias sulfito redutoras detectadas são classificadas como termófilas estritas e apresentam elevada resistência térmica, com valores D_{120C} de 2.0 a 3.0 minutos e pH mínimo para crescimento de 6.2 (Donnelly E Hannah 2001). Essa deterioração poderia ocorrer em mostos de

fermentação porém não ocorreria em vinhos fermentados cujos pHs variam de 3.5 a 4.5 tipicamente. As bactérias *B. Stearothermophilus* e *B. Coagulans* são membros do grupo dos esporos termofílicos produtores de acidez plana. Ambas produzem ácidos a partir da glicose sendo *B. Coagulans* considerado termófilo facultativo enquanto *B. Stearothermophilus* é termófilo. Os esporos de *B. Stearothermophilus* apresentam excepcional resistência térmica. O valor médio encontrado nessas contagens realizadas para determinação da carga microbiana à saída do decantador, 3.5×10^1 UFC/mL, está de acordo com o valor reportado por Nolasco e Finguerut (1998) avaliado em 37 Usinas cooperadas ao sistema Copersucar e trata-se do grupo de esporulados de maior presença no mosto. O desenho de um processo térmico para inativação das bactérias contaminantes de mosto de fermentação alcoólica tendo esporos de *B. Stearothermophilus* como alvo será mais que suficiente para inativação de todos os demais contaminantes, inclusive o *B. Coagulans* que cresce melhor nas condições de pH (3.5 a 4.5) e temperatura (32-35C) da fermentação alcoólica.

Tabela 4.

Realizou-se o monitoramento das temperaturas internas dos decantadores industriais durante operação normal da Usina. As Figuras 2 e Figura 3 mostram a localização dos PT-100 dispostos no interior dos decantadores industriais e a Tabela 5 resume os pontos e suas respectivas temperaturas.

Figura 2

Figura 3

Tabela 5

Os pontos 04 e 06 estão localizados no mesmo local do decantador rápido sem bandeja. A diferença entre eles é que no ponto 04 o PT-100 foi colocado imerso no caldo do decantador enquanto que no ponto 06, como nos demais, os sensores estavam dentro de bainhas contendo óleo. Observa-se que não houve necessidade de correções das temperaturas pelo fato de os sensores todos terem sido colocados em bainhas contendo óleo.

O ponto 07 do decantador convencional com bandeja e os pontos 07 e 08 do decantador rápido sem bandejas foram os pontos mais frios detectados nesses equipamentos (ver Tabela 5). No primeiro, a letalidade foi avaliada à temperatura de 93.61C, obtida subtraindo do valor médio de temperatura neste ponto (96.55C), o valor do intervalo de confiança correspondente (2.94C). Para o último, o ponto 07 é o mais frio e a letalidade foi avaliada à temperatura de 95.20C, obtida subtraindo do valor médio de temperatura neste ponto (97.12C), o valor do intervalo de confiança correspondente (1.92C). No decantador convencional o ponto frio fica localizado no fundo próximo ao costado do equipamento, e no decantador rápido no centro.

As temperaturas mais frias detectadas situam-se fora da faixa em que se obtiveram os dados cinéticos tanto para o *L. fermentum* (50-65C) de Franchi *et al.* (2003) quanto para os esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 (98-130C) de Nolasco Junior e De Massaguer (2005c) e também para hidrólise da sacarose e

degradação térmica dos açúcares (110-140C) de Nolasco Junior e De Massaguer (2005a,b). Porém fazendo um exercício de cálculo foi possível estimar o efeito térmico da etapa de clarificação sobre o *L. fermentum* e os esporos de *B. stearothermophilus*. O decantador convencional com seu tempo de residência médio de 2.5 horas e temperatura de 93.61C no ponto mais frio, produz um valor de esterilização $F_p = \frac{0.056 \text{ min a}120C}{\text{min a}93.61C}$ e $\frac{0.789 \text{ min a}120C}{\text{min a}93.61C}$, para *L. fermentum* e esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, respectivamente. O decantador rápido sem bandejas com seu tempo de residência médio de 1.15 horas e temperatura de 95.20C no ponto mais frio, produz um valor de esterilização $F_p = \frac{0.0415 \text{ min a}120C}{\text{min a}95.20C}$ e $\frac{0.498 \text{ min a}120C}{\text{min a}95.20C}$, para *L. fermentum* e esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, respectivamente. O parâmetro de resistência D_{120C} para *L. fermentum* estimado utilizando os dados de Franchi *et al.* (2003) foi de $1.21 \cdot 10^{-8}$ minutos. Para os esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, um valor D_{120C} para a fração resistente foi calculado em 4.52 minutos com a ressalva de que esse parâmetro perde significado em cinéticas de destruição térmicas não lineares. Com esses dados a letalidade calculada do decantador convencional foi $4.6 \cdot 10^6$ reduções decimais sobre *L. fermentum* e 0.17 reduções decimais nos esporos termofílicos, enquanto que no decantador rápido a letalidade calculada foi $3.43 \cdot 10^6$ reduções decimais sobre *L. fermentum* e 0.11 reduções decimais nos esporos termofílicos.

A fração de sacarose não hidrolisada a 110C foi de 0.961 e 0.985 para os decantadores convencional e rápido, respectivamente. A fração dos ART

remanescentes nessa temperatura foi de 0.989 e 0.995 para os decantadores convencional e rápido, respectivamente. Portanto às temperaturas médias de operação da decantação qualquer que seja o tipo de decantador, Tabela 5, as frações de açúcares remanescentes deverão ser superiores aos valores aqui estimados a 110C.

O desenho otimizado do processo de tratamento térmico para inativação dos contaminantes do mosto foi possível graças ao conhecimento das várias espécies presentes na matriz original do mosto bem como de seus papéis relativos nessa matriz e aos estudos cinéticos conduzidos por Nolasco Junior e De Massaguer (2005a,b,c), sobre a hidrólise térmica da sacarose, a degradação térmica dos açúcares, expressos em ART e sobre a resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* ATCC1518, todos em mosto nas condições de pH e Brix de 6.14 e 21.5%, respectivamente.

Na Figura 3 foram construídas as curvas para preservação de 98.7% de sacarose, 98.7% de ART e 5 reduções decimais dos esporos de *B. stearothermophilus* ATCC1518, na faixa de temperatura estudada. Nesta figura, a linha tracejada referente ao esporo de *B. stearothermophilus* representa uma extrapolação para a temperatura de 140C, já que em temperaturas acima de 130C os tempos de amostragem ficam muito pequenos, e prejudicam a precisão das análises. Por outro lado a temperaturas abaixo de 110C, os ensaios de açúcares demandaram tempos excessivamente longos para se conduzir os ensaios com segurança, daí a linha tracejada indicando uma extrapolação para 98C.

A região de processo ótimo desenhada está limitada por uma temperatura de 114C (3000 segundos) até uma temperatura de 140C (4 e 335 segundos).

Binômios dentro dessa região asseguram as 5 reduções decimais do microrganismo alvo e retenção de 98.7% da sacarose do mosto, oferecendo à indústria uma maneira eficiente e segura de eliminar a contaminação do mosto. É fundamental que junto com a aplicação do processo térmico ótimo, o tratamento do produto pós processo seja suficientemente cuidadoso para evitar a recontaminação.

Figura 3.

Conclusão

Os resultados da determinação da carga contaminante à saída do decantador revelou uma diferença significativa em esporos termofílicos produtores de acidez plana e bactérias mesofílicas aeróbias totais na Usina 2. Esta Usina está localizada numa região bastante seca e com solo predominantemente arenoso com baixa capacidade de retenção de água. Talvez estes fatores climáticos estejam relacionados com uma menor carga de contaminantes à entrada do decantador. Por outro lado nas Usinas localizadas em regiões de clima quente e úmido a carga de termófilos foi muito mais elevada.

O processo de decantação assegura a total eliminação dos lactobacilos contaminantes da fermentação alcoólica, de forma que se eles aparecem posteriormente na fermentação é por recontaminação.

O processo térmico desenhado abrangeu uma faixa relativamente ampla de tempo e temperatura de modo que pode acomodar as muitas diferenças e particularidades encontradas nas Usinas, sem prejudicar o objetivo do processo.

Sugestões:

Uma vez desenhado o processo térmico é urgente e imperativo a implantação de um processo de higienização e limpeza das linhas e equipamentos das Usinas, adequado às características das sugidades de mostos de forma a garantir a entrega do mosto à fermentação com a mesma qualidade microbiológica conferida a ele pelo processo térmico projetado.

Apesar de a região ótima de tratamento térmico ser bastante ampla deveria-se trabalhar em binômios de tempo x temperatura menos rigorosos por dois motivos: economia de energia e retenções nutricionais maiores que podem ser benéficas para o processo de fermentação. Este trabalho restringiu-se apenas a otimizar a destruição do microrganismo alvo e a retenção dos açúcares, a implementação prática do processo deverá confirmar este estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao e Centro de Tecnologia Copersucar pelo apoio financeiro deste projeto.

Nomenclatura

$(1-\alpha)$: fração da população que se degrada com velocidade de degradação térmica

$k = k_2$.

ART: açúcares redutores totais

D: índice de redução decimal a temperatura constante da substância (unidades de tempo)

D_{120} : índice de redução decimal a temperatura constante de 120C (unidades de tempo)

F_p : valor de esterilização à temperatura de referência equivalente à temperatura de processo (minutos à temperatura T_R /minuto à temperatura T de processo).

k : é a constante de velocidade degradação térmica (unidade de tempo⁻¹)

k_1 e k_2 : constantes de velocidade degradação térmicas máximas das substâncias 1 e 2 previstas no modelo logístico bipopulacional, eq.(2), respectivamente (h^{-1})

L: letalidade do processo

N: esporos/ml no tempo = t

N_0 : esporos/ml no tempo= t_0

°Brix: concentração de sólidos solúveis (%m/m)

$S=(x / x_0)$: Fração de sacarose, glicose, frutose ou ART remanescente no tempo t, eqs. (1) e (2) ou $S=(N/N_0)$: Fração de esporos sobrevivente no tempo t, eqs. (4) e (5)

T: temperatura do processo (C)

t: tempo de tratamento térmico do mosto ou da suspensão de esporos em cada temperatura (unidades de tempo)

T_R : temperatura de referência (C)

UHT: ultra alta temperatura

X :concentração (%m/m) de sacarose, glicose, frutose ou ART no tempo t

X_0 :concentração (%m/m) de sacarose, glicose, frutose ou ART quando $t=0$

z: coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (unidades de temperatura).

α .: fração da população que se degrada com velocidade de degradação térmica $k = k_1$

γ : número de reduções decimais na população de microrganismos ($\log (N/N_0)$)

τ : medida do atraso nas reações de degradação ou inativação térmica do modelo logístico, eq. (1) e (4), (unidades de tempo)

τ_1 e τ_2 : medidas do atraso nas reações de degradação térmica das substâncias 1 e 2 previstas no modelo logístico bipopulacional, eq.(2), (h)

Referências

- ALCARDE, V.E. e YOKOYA, F. 2003. Efeito da População de Bactérias na Flocculação de Leveduras Isoladas de Processos Industriais de Fermentação Alcoólica. STAB. 21(4), 40-42.
- BROMBERG, R. and YOKOYA, F. 1995. Chemical modification of cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 105 and their effect on flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11, 508-511.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 2000. Microbiologia da Fermentação. Revisão 1- Apostila Curso de Fermentação. Piracicaba 55 p.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 1996. Perdas na fermentação: é possível reduzir! Piracicaba: INDUSTRIAL INFORMA 50, 1-2.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. COORDENADORIA INDUSTRIAL. 1983a. Controle Microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. Boletim Técnico Copersucar 22, 2-17.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. DIVISÃO INDUSTRIAL. 1983b. Manual de Controle Microbiológico da Usina de Açúcar e Álcool. Cadernos Copersucar - Série Industrial 5, 1-10.
- CHRISTOFOLETTI, A.J., NOLASCO, J.J. e FINGUERUT, J. 1998. Tratamento de caldo e incrustação no processo de esterilização de mosto. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar RT-827-97/98, 1-22.
- DONNELLY, S.L. and HANNAH, T. 2001. Sulfide Spoilage Sporeformers. In Compendium of methods for the microbiological examination of foods,

- (DOWNES, F.P. and ITO, K. eds) pp. 253-255, American Public Health Association (APHA), Washington.
- EVANS, T.H. and HIBBERT, H. 1946. Bacterial polysaccharides. In *Advances in carbohydrate chemistry* 2, 203-233. Academic Press, Inc., New York.
- FORMAGGIO, G.J. e FINGUERUT, J. 1998. Produção específica de ácidos orgânicos. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar RT963-99/00, 1-12.
- FRANCHI, M.A., SERRA, G.E., SVILOSEN, J. and CRISTIANINI, M. 2003. Thermal death kinetics of bacterial contaminants during cane sugar and alcohol production. *International Sugar Journal* 105(1259), 527-530.
- GALLO, C.R. 1990. Determinação da Microbiota Bacteriana de Mosto e de Dornas de Fermentação Alcoólica. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.
- GALLO, C.R. e CANHOS, V.P. 1991. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão. *Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos Piracicaba* 9(4-5), 35-40.
- HALL, P.A., LEDENBACH, L. and FLOWERS, R.S. 2001. Acid-Producing Microorganisms. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (DOWNES, F. P. and ITO, K. eds) pp. 201-207, American Public Health Association (APHA), Washington.
- KAJI, D.A. 1989. Influência da Temperatura e Infecção Láctica na Fermentação Alcoólica. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.

- KESSLER, H.G. 1981. Food Engineering and Dairy Technology, Verlag A. Kessler, Germany.
- KLAUSHOFER, H., CLARKE, M.A, REIN, P.W and MAUCH, W. 1998. Microbiology. In Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture, (Van der Poel, P.W, Schiweck H. and Schwartz T., authors) pp 993 – 1008, Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin.
- LIMA, T.C.S, GRISI, B.M. and BONATO, M.C.M. 1999. Bacterial Isolated From a Sugarcane AgroEcosystem: Their Potential Production Of Polyhydroxyalcanoates And Resistance To Antibiotics. Rev Microbiol. 30, 214-224.
- MISLIVEC, P.B, BEUCHAT, L.R. and COUSIN, M.A. 1992. Yeasts and Molds. In Compendium of methods for the microbiological examination of foods (VANDERZANT, C. and SPLITTSTOESSER, D. F. eds) pp. 239-245, American Public Health Association (APHA), Washington.
- MORTON, R.D. 2001. Aerobic Plate Count. In Compendium of methods for the microbiological examination of foods (DOWNES, F. P. and ITO, K. eds) pp. 63-67, American Public Health Association (APHA), Washington.
- NEGRO, M.R.G.O.C., YOKOYA, F. and EBERLIN, M.N. 2003. The Chemical Composition Of “Canjica” A Polymeric Material Found In Brazilin Sugar Cane Industry. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19(6), 625 - 630.
- NOLASCO JUNIOR, J. e DE MASSAGUER, P.R. 2005a. Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Hidrólise da Sacarose em Mosto de Caldo de Cana para Fermentação Alcoólica. In Desenvolvimento de Processo

Térmico Otimizado para Mosto de Caldo de Cana na Fermentação Alcoólica, Capítulo 3, (Nolasco J.J. autor), Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.

NOLASCO JUNIOR, J. e DE MASSAGUER, P.R. 2005b. Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Degradação Térmica de Glicose e Frutose em Mosto de Caldo de Cana para Fermentação Alcoólica. In Desenvolvimento de Processo Térmico Otimizado para Mosto de Caldo de Cana na Fermentação Alcoólica, Capítulo 4, (Nolasco J.J. autor), Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.

NOLASCO JUNIOR, J. e DE MASSAGUER, P.R. 2005c. Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Destruição Térmica de Esporos de *B. stearothermophilus* em Mosto de Caldo de Cana para Fermentação Alcoólica. In Desenvolvimento de Processo Térmico Otimizado para Mosto de Caldo de Cana na Fermentação Alcoólica, Capítulo 5, (Nolasco J.J. autor), Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP-BRASIL.

NOLASCO, J.J. e FINGUERUT, J. 1993. Projeto Floculação - Fase I - Caracterização e Proposta de um Índice de Floculação. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar. RT-674/93, 1-12.

NOLASCO, J.J., FINGUERUT, J. 1998. Esterilização de Mosto-Processo CIP/SIP. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar. RT.835-97/98, 1-37.

- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 1997. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia* 28, 25-31.
- OLIVA-NETO, P. and YOKOYA, F. 2001. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria From The Alcohol Industry To Several Antimicrobial Compounds. *Bras. Journal of Microbiology* 32, 10-14.
- OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M. e HORII, J.1998. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*, *Sci agric.* 55 (3), 1-12.
- OLSON, K.E. and SORRELLS, K. 2001. Thermophilic Flat Sour Sporeformers. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* (DOWNES, F.P. and ITO, K. eds) pp. 245-248, American Public Health Association (APHA), Washington.
- SCOTT, V.N., ANDERSON, J.E. and WANG, G. 2001. Mesophilic Anaerobic Sporeformers. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (DOWNES, F. P. and ITO, K. eds) pp. 229-237, American Public Health Association (APHA), Washington.
- STEVENSON, K.E. and SEGNER, W.P. 2001. Mesophilic Aerobic Sporeformers. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (DOWNES, F.P. and ITO, K. eds), pp. 223-227, American Public Health Association (APHA), Washington.
- STROPPA, C.T., ANDRIETTA, M.G.S., ANDRIETTA, S.R., STECKELBERG, C. and SERRA, G.E. 2000. Use Of Penicillin And Monesin To Control

Bacterial Contamination Of Brazilian Alcohol Fermentations. Int. Sugar Journal 102(1214), 78-82.

STROPPA, C.T., STECKELBERG, C., SERRA, G.E., ANDRIETTA, M.G.S. e ANDRIETTA, S.R. 1998. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos 16, 35-38.

THAL, L.A. and ZERVOS, J.M. 1999. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43, 171-176.

TROMBINI, M.A.M., ROVANHOL, A.A., VITTI, L.S.S., BEDA, D.F., PORTO, R.C.B. e SÁ, J. S. 1988. Causas da Contaminação e suas conseqüências em Usinas de Açúcar e Álcool. STAB. 16(6), 18p.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J. and STOBBERINGH, E.E. 2002. Antibiotic resistance of faecal *enterococci* in poultry slaughterers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49, 497-505. Disponível em :<http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>.

YOKOYA, F. e OLIVA-NETO, P. 1991. Características da Flocculação de Leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. Rev Microbiol. 22(1), 12-16.

TABELA 1.

PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A HIDRÓLISE TÉRMICA DA SACAROSE
 DURANTE OS TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS EM MOSTO (pH=6.14;
 21.5°BRIX) (NOLASCO JUNIOR e DE MASSAGUER 2005a)

T(C)	τ (h)	^a k (h ⁻¹)
110	13.27	0.21
120	5.37	0.45
130	2.40	1.16
140	1.14	2.64

^aCalculados segundo a Eq. (1).

TABELA 2.
 PARÂMETROS CINÉTICOS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE ART DURANTE OS
 TRATAMENTOS ISOTÉRMICOS, EM MOSTO (pH = 6.14; 21.5°BRIX)
 (NOLASCO JUNIOR e DE MASSAGUER 2005b)

T(°C)	^a α	^a k_1 (h ⁻¹)	^a τ_1 (h)	^a k_2 (h ⁻¹)	^a τ_2 (h)
110	0.52	1.58E-2	0.10	1.96E-3	0.11
120	0.55	5.53E-2	12.61	4.39E-3	0.07
130	0.49	2.27E-1	7.74	1.75E-2	0.12
140	0.58	3.41E-1	1.20	4.33E-2	7.80

^aCalculados pela Eq. (2).

TABELA 3.

PARÂMETROS CINÉTICOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE *B. STEAROTHERMOPHILUS* ATCC1518 EM MOSTO (pH= 6.14, 21.5°BRIX)
(NOLASCO JUNIOR e DE MASSAGUER 2005c)

T (°C)	Modelo cinético	τ (min)	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	α Fração termo-sensível)
98	Eq. (3)	295.39	0.0194	-----	-----
110	Eq. (3)	45.82	0.1114	-----	-----
120	Eq. (4)	-----	1.71 ^a	0.51 ^b	0.996
122,5	Eq. (4)	-----	5.50 ^a	1.51 ^b	0.965
125	Eq. (4)	-----	16.25 ^a	4.29 ^b	0.9992
130	Linear	-----	13.63	-----	-----

^arelativo à fração termo-sensível.

^brelativo à fração termo-resistente.

TABELA 4.

CARGA MICROBIANA DO CALDO À SAÍDA DO DECANTADOR

ANÁLISE/USINA	USINA 1	USINA 2	USINA 3	USINA 4	MÉDIA
DATA AMOSTRA	20/09/2002	04/10/2002	27/09/2002	21/11/2002	-----
AMOSTRA	caldo	caldo	caldo	caldo	-----
pH	6.58	6.60	6.50	6.8	-----
%Brix	17.5	17.8	19.6	19.7	18.15
Esporos Mesofílicos Aeróbios [esporos/ml]	23	30	17	35	26.25
^a Esporos Mesofílicos Anaeróbios	6 ⁺ /6	0 ⁺ /6	6 ⁺ /6	4 ⁺ /6	4 ⁺ /6
Esporos Termofílicos Produtores de Acidez Plana [esporos/ml]	27	4	90	20	35.3
Esporos Termofílicos Totais [esporos/ml]	0	7	6	13	6.5
^a Bactérias Sufito Redutoras	1 ⁺ /6	1 ⁺ /6	0 ⁺ /6	1 ⁺ /6	1 ⁺ /6
Bactérias Mesófilas Totais [UFC/ml]	1.6E02	4.0E01	5.6E02	3.8E02	2.9E02
Bactérias Lácticas[UFC/ml]	<10	<10	<10	<10	<10
Bactérias Produtoras de Goma[UFC/ml]	<10	<10	<10	<10	<10
Bolores/Leveduras[UFC/ml]	<10	<10	<10	<10	<10

^a Semi-quantitativo: número de tubos positivos em 6 tubos incubados.

TABELA 5.
MÉDIAS DAS TEMPERATURAS POR PONTO NO INTERIOR DOS
DECANTADORES

	DECANTADOR CONVENCIONAL (COM BANDEJAS)	DECANTADOR RÁPIDO (SEM BANDEJAS)
TEMPO DE RESIDÊNCIA (h)	2-3	0.8-1.5
T(°C) PONTO 1 (precisão)/(N) ^a	97.12 (0.67)/(16260)	97.51 (0.73)/(22818)
T(°C) PONTO 2 (precisão)/(N) ^a	97.06 (0.69)/(16361)	97.39 (0.51)/(7559)
T(°C) PONTO 3 (precisão)/(N) ^a	97.48 (0.43)/(23344)	97.46 (0.84)/(22699)
T(°C) PONTO 4 (precisão)/(N) ^a	97.58 (0.39)/(25564)	97.33 (0.71)/(8684)
T(°C) PONTO 5 (precisão)/(N) ^a	97.60 (0.41)/(25775)	97.34 (0.78)/(22825)
T(°C) PONTO 6 (precisão)/(N) ^a	97.50 (0.41)/(24664)	(97.45) (0.80)/(22782)
T(°C) PONTO 7 (precisão)/(N) ^a	96.55 (2.94)/(9975)	(97.12) (1.92)/(15082)
T(°C) PONTO 8 (precisão)/(N) ^a	97.55 (0.43)/(10400)	(97.41) (1.78)/(15181)

^aprecisão = 1.96*desvio padrão(nível de confiança= 0.95)/N= número de pontos.

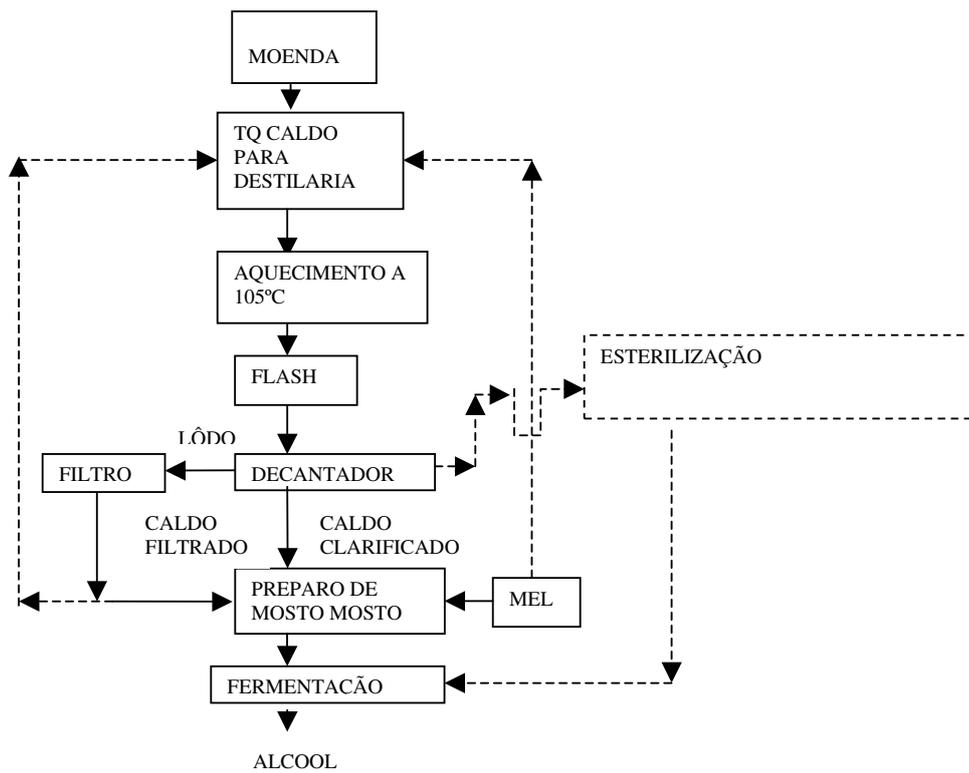


FIG. 1. FLUXOGRAMA SIMPLES DA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL MOSTRANDO A POSSÍVEL LOCALIZAÇÃO DO PROCESSO TÉRMICO DO MOSTO

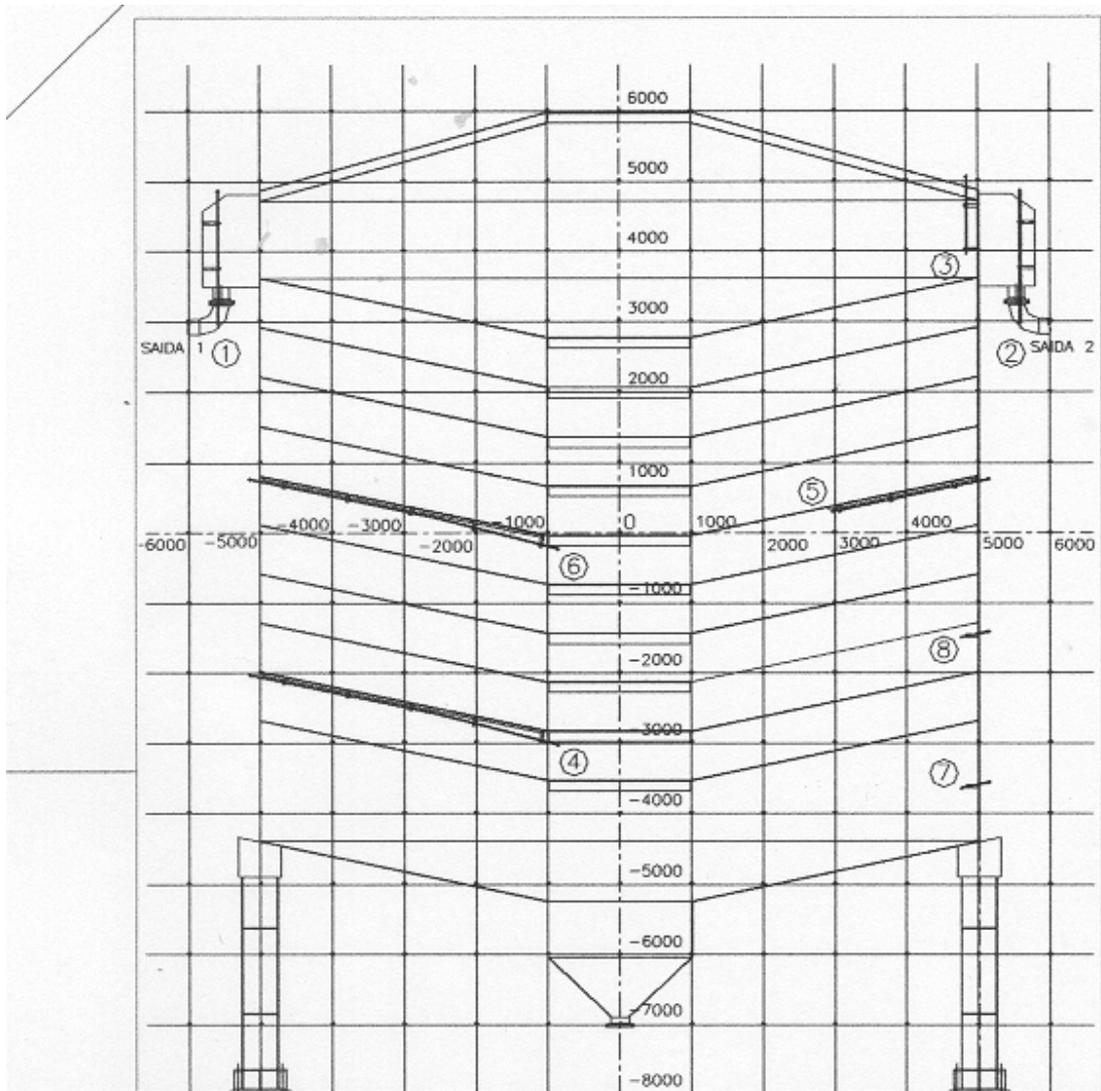


FIG. 2. LOCALIZAÇÃO DOS PT-100 NO INTERIOR DE DECANTADOR INDUSTRIAL CONVENCIONAL COM BANDEJAS COM CAPACIDADE PARA 700 m³/h COM EIXO CARTESIANO COM ESCALA EM MM INDICANDO O CENTRO GEOMÉTRICO DO EQUIPAMENTO E AS POSIÇÕES DOS PT-100

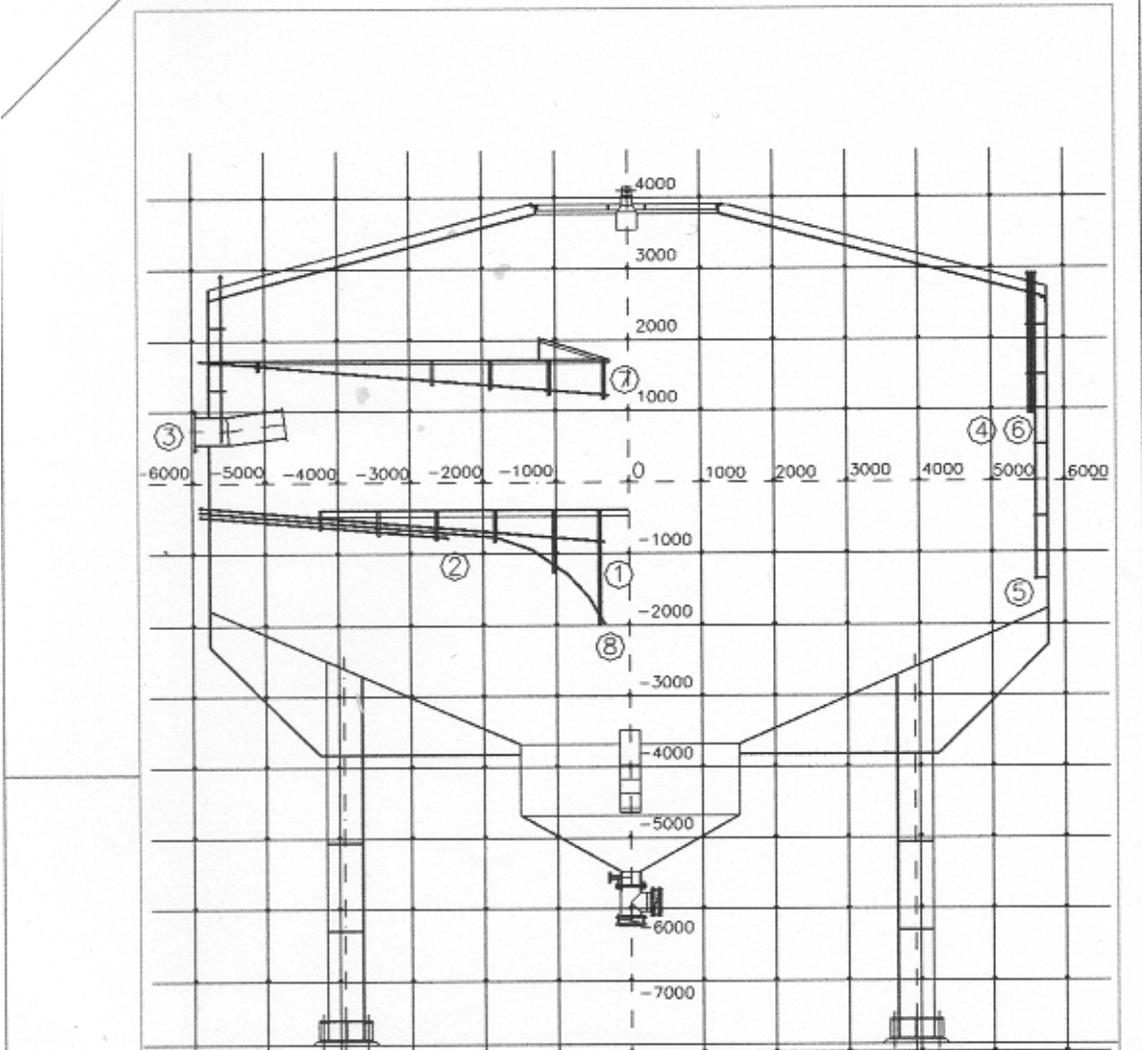


FIG. 3. LOCALIZAÇÃO DOS PT-100 NO INTERIOR DE DECANTADOR INDUSTRIAL SEM BANDEJAS COM CAPACIDADE PARA 500 m³/h, COM EIXO CARTESIANO COM ESCALA EM MM INDICANDO O CENTRO GEOMÉTRICO DO EQUIPAMENTO E AS POSIÇÕES DOS PT-100 (TUBO DA POSIÇÃO 4 COM FUNDO ABERTO LOCALIZADO NA MESMA POSIÇÃO DO TUBO POSIÇÃO 6, RESTANTE DOS TUBOS COM FUNDO FECHADO)

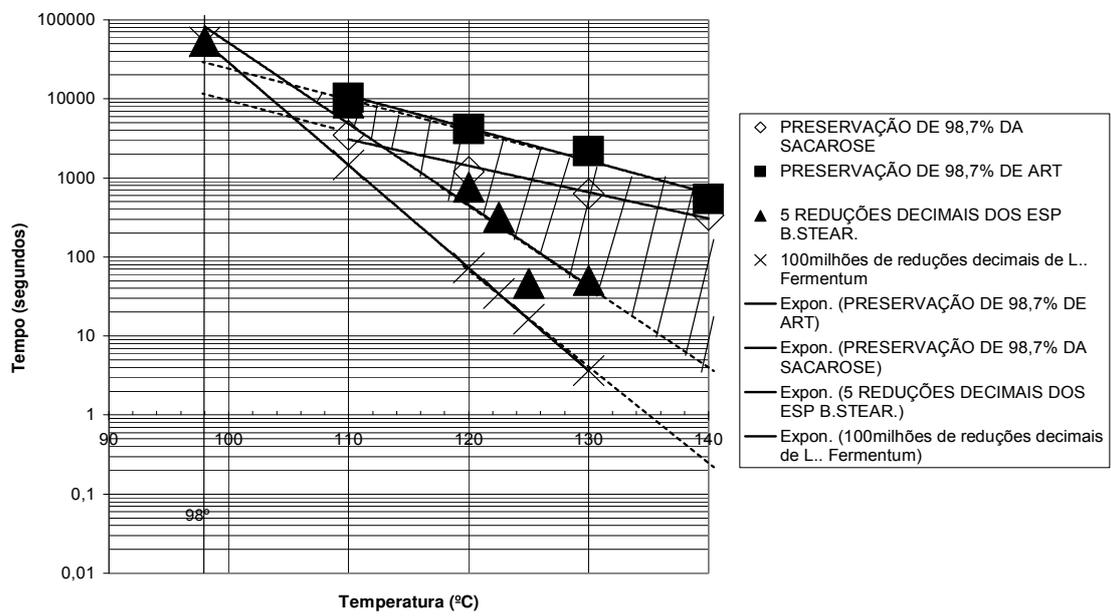


FIG. 4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE TRATAMENTO TÉRMICO PARA MOSTO (pH = 6.14, 21.5°BRIX)

Capítulo 7

CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES

Conclusões gerais

- A cinética da hidrólise da sacarose em mosto a base de caldo de cana de 21,5°Brix e pH = 6,14 avaliada em temperaturas entre 110-140°C mostrou-se nitidamente não linear apresentando atrasos térmicos e cauda final que foram muito bem ajustados por um modelo logístico. Nessas condições as constantes cinéticas, k , variaram de 0,21 h⁻¹ a 2,64 h⁻¹, enquanto os atrasos térmicos variaram de 13,27 h a 1,14 h na faixa de temperatura estudada. A energia de ativação através da equação de Arrhenius e valor z obtidos foram 112,32 kJ/mol e 26,99°C, respectivamente.
- A cinética da degradação térmica dos açúcares do mosto estudada pela fração de ART remanescente em função do tempo também nas condições de 21,5°Brix e pH = 6,14 e na mesma faixa de temperatura de 110-140°C, apresentou forte não linearidade com rápido decaimento e cauda final que foram bem ajustadas através de modelo logístico bipopulacional com duas constantes, k_1 e k_2 , as quais se revelaram referentes às constantes de degradação térmica da frutose e glicose respectivamente. Os dados aqui obtidos demonstraram que a frutose se degrada aproximadamente nove vezes mais rápido que a glicose.
- A suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 preparada para os ensaios de cinética de destruição térmica em mostos, revelou-se heterogênea em termos de resistência térmica.
- A cinética de destruição térmica de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 1518 em mosto nas condições de 21,5°Brix e pH = 6,14 em temperaturas variando entre 98°C e 130°C apresentou comportamentos diferentes na faixa de

temperatura estuda. As curvas de sobreviventes apresentaram forte não linearidade com ombro inicial ou atraso térmico nas temperaturas 98°C e 110°C e foram ajustadas ao modelo logístico. Acima de 110°C, observou-se o desaparecimento do ombro e manifestação de duas populações de esporos com cinéticas de destruição térmicas semi-logarítmicas lineares e diferentes, sendo a primeira termo sensível e a segunda termo resistente. Nessa população de resistência heterogênia observou-se a predominância da fração termo sensível. A 130°C, cinética linear pode ser ajustada graças ao desaparecimento completo e instantâneo da fração termo sensível nesta temperatura mais elevada. A energia de ativação e valor z obtidos foram 249,52 kJ/mol e 11,48°C, respectivamente. Os valores de k variaram de 0,019 min⁻¹ a 13,63 min⁻¹.

- Quanto à letalidade do processo de decantação, o decantador tipo convencional (com bandejas) ou rápido (sem bandejas) conferem em média 4x10⁶ reduções decimais em *Lactobacillus fermentum* e 0,14 reduções decimais em *B. stearothermophilus* ATCC 1518 em caldo.
- À temperatura de operação do processo de decantação do caldo, a degradação térmica de açúcares em qualquer tipo de decantador é desprezível. Nos decantadores convencionais preservação de ART é superior a 98,6%, considerando um tempo de residência máximo de 3 horas. Nos decantadores rápidos a preservação de ART é superior a 99,3%. A hidrólise de sacarose é significativa nos decantadores convencionais com tempos de residência de 3 horas. Entretanto essa hidrólise não significa perda se for considerado que a

decantação é realizada para a produção de álcool, pois as hexoses produzidas ficam preservadas e disponíveis para a fermentação pelas leveduras do processo.

- Embora *B. stearothermophilus* não seja esperado como um contaminante da fermentação, o desenho de um processo térmico baseado em 5 reduções decimais deste microrganismo, será suficiente para inativação térmica de todos os demais contaminantes microbiológicos de mostos de fermentação alcoólica, com preservação de 98,7% dos açúcares do mosto.
- O processo térmico desenhado abrange uma faixa relativamente ampla de binômios de tempo e temperatura que pode acomodar as muitas diferenças e particularidades encontradas nas Usinas, sem prejudicar o objetivo do processo. As temperaturas possíveis para o tratamento projetado vão desde 114°C até 140°C e os tempos vão desde 4 segundos até 3000 segundos.

Recomendações:

- Quanto às condições do mosto utilizado nesta pesquisa, o pH é essencialmente o usado nas Usinas, entretanto o Brix pode variar em função das estratégias de produção adotadas. Optou-se pelo mosto de 21,5°Brix porque altas concentrações de açúcares no mosto resultam em vinhos fermentados de teores alcoólicos elevados, e fermentações mais eficientes. É interessante estudar essas cinéticas utilizando mostos numa faixa mais ampla de concentração (10-25°Brix) para atender estratégias de produção mais abrangentes nas Usinas.
- A implantação de procedimento de higienização das linhas e equipamentos é necessária para garantir os resultados do tratamento térmico realizado.

- Quanto ao tratamento térmico, deve-se procurar trabalhar em binômios de tempo x temperatura menos rigorosos por dois motivos: economia de energia e maior retenção nutricional, porque o processo aqui desenhado restringiu-se apenas a otimizar a destruição dos contaminantes alvos e retenção dos açúcares.