

Identificação de Contaminantes Bacterianos em uma Destilaria de Etanol do Pontal do Triângulo Mineiro

Identification of Bacterial Contaminants of an Etanol Industry of the Pontal Triangulo Mineiro

Jéssica Velasco Andrade¹; Eleusa Maria Ferreira Rocha²

RESUMO

A indústria da fermentação etanólica tem empenhado intensamente no controle das contaminações microbianas, como por exemplo, a contaminação bacteriana, a principal responsável em afetar a viabilidade da levedura, provocando diversos transtornos no processo, comprometendo a eficiência fermentativa e o rendimento industrial. Por isto, neste trabalho foi realizado a identificação de contaminantes bacterianos a partir de amostras coletadas de cubas industriais com a concentração de $1,7 \times 10^8$. Uma colônia bacteriana contaminante foi caracterizada, a qual apresentou tamanho de 3 mm de diâmetro em meio sólido, aspecto leitoso, forma circular, elevação convexa, borda lisa, estrutura lisa, com ausência de pigmentação, de aspecto bastonete longo quando observado ao microscópio óptico e Gram-positivo pela técnica do Gram, sugerindo que esta colônia analisada pode pertencer ao gênero *Lactobacillus*. Além disto, o Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) em presença do antibiótico Kamoran foi acima de 3 $\mu\text{g/mL}$ para a colônia analisada, esta concentração foi capaz de inibir a contaminação bacteriana e garantiu a viabilidade da levedura. Portanto, um diagnóstico rápido e eficiente dos contaminantes do processo fermentativo e seu controle podem assegurar um bom rendimento industrial, significando em produtividade, milhões de litros de etanol.

Palavras-chave: Etanol. Levedura. *Saccharomyces cerevisiae*. Contaminantes bacterianos.

ABSTRACT

The ethanol fermentation industry has engaged an intense effort to control microbial contamination such as bacterial contamination, primarily responsible for affecting the viability of yeast, causing various disturbances in the process, which affects the performance and efficiency of industrial fermentation, in other words, loss of productivity million gallons of ethanol. Therefore, in this study the identification of bacterial contaminants was performed from samples collected from industrial vats at the concentration of 1.7×10^8 . A contaminant bacterial colony was characterized which showed a size of 3 mm diameter on solid medium, milky circular shape, convex elevation, smooth edge, flat structure without pigmentation, as long rod appearance when viewed under an optical microscope and Gram positive for the Gram technique, suggesting that this colony analyzed may belong to the genus *Lactobacillus*. In addition, the Test Minimum Inhibitory Concentration (MIC or MIC) in the presence of the antibiotic Kamoran was above 3 $\mu\text{g/mL}$ for the colony analyzed, this concentration

was able to inhibit bacterial contamination and ensured the viability of yeast. Therefore, a rapid and efficient diagnosis of the contaminants in the fermentation process and its control can ensure industrial output, meaning productivity, millions of liters of ethanol.

Keywords: Ethanol. Yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. Bacterial Contaminants.

INTRODUÇÃO

O etanol tem se destacado no cenário mundial por ser um combustível renovável e menos poluente que os derivados de petróleo, e de custo relativamente baixo (CERQUEIRA LEITE *et al.*, 2009). Além disto, a crise do petróleo de 1974 fez com que estimulasse no Brasil a criação do Programa Nacional do Álcool-Proálcool em 1975, o qual aumentou intensamente a produtividade do etanol brasileiro (LIMA *et al.*, 2001; VENTURA, 2007; RODA JÚNIOR *et al.*, 2013). A produção do etanol é realizada através do processo fermentativo anaeróbico pela ação biológica das leveduras, as quais necessitam de condições favoráveis do meio, e utilizam os açúcares, especialmente a glicose, como fonte de carbono, para obter energia e realizar suas atividades metabólicas (RODA JÚNIOR *et al.*, 2013).

A principal levedura fermentadora utilizada pela indústria do etanol pertence a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O *S. cerevisiae* é um fungo não filamentosos, eucarioto unicelular, de forma esférica, de tamanho microscópico de 1 a 5 µm de diâmetro e de 5 a 30 µm de comprimento, de parede celular rígida, anaeróbico facultativo, de reprodução vegetativa por brotamento, de ciclo de vida curto, possui uma alta capacidade adaptativa a condições industriais e possui atividade fermentativa (PELCZAR *et al.*, 1997; ALTERTHUM, 2001).

Durante o processo fermentativo do etanol pode ocorrer algumas contaminações, uma delas é a contaminação bacteriana, que interfere negativamente no produto e qualidade do etanol. Estes contaminantes bacterianos inibem as leveduras e favorecem a floculação ocasionando perdas na eficiência da fermentação alcoólica. Os principais contaminantes já identificados no processo fermentativo pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, sendo responsáveis por uma queda bastante significativa na produção do etanol, traduzida na perda de milhões de reais. (CECCATO-ANTONINI, 2010; DE CARVALHO, 2011).

Os estudos de Rosales (1989), também relataram várias espécies de bactérias contaminantes isoladas a partir das diversas amostras do processo

fermentativo do etanol, as quais pertenceram as espécies *Lactobacillus sp* (45,04 %), *Leuconostoc mesenteroides* (14,41 %), *Bacillus sp* (9,46 %), *Acetobacter sp* (7,21 %), *Enterobacter sp* (6,75 %), *Sporolactobacillus sp* (3,6%), *Staphylococcus sp* (1,35 %) e *Escherichia coli* (1,35 %), confirmando a predominância dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* durante o processo fermentativo do etanol, como já acima mencionados (ROSALES, 1989).

Enquanto as leveduras são microrganismos eucariotos unicelulares, as bactérias são procariotos unicelulares e menores que as leveduras, podendo variar entre cerca de 0,2 μm , onde suas células podem apresentar na forma de bastonetes ou cocos e também competem com as leveduras pela glicose como substrato para realizar o seu crescimento celular (PELCZAR *et al.*, 1997). Algumas possuem capacidade sacarolítica e são fermentadoras, tolerantes ao etanol, ao pH baixo, e também possuem uma alta capacidade adaptativa a condições industriais (CECCATO-ANTONINI, 2010).

O controle da contaminação bacteriana durante o processo fermentativo se faz necessário para assegurar resultados positivos na produção do etanol (LEITE, 2011). Visando, então, controlar a contaminação bacteriana durante o processo fermentativo, diversos agentes antimicrobianos tem sido utilizados, e atualmente, um antibiótico sintético denominado Kamoran tem sido intensamente usado com sucesso no controle e eliminação da contaminação bacteriana. Este foi descoberto e desenvolvido pela Eli Lilly and Company, e possui uma atividade eficaz contra as bactérias Gram-positivas presentes no processo fermentativo do etanol (CECCATO-ANTONINI, 2010; LEITE, 2011; QUÍMICA REAL, 2012).

Este antibiótico é conhecido quimicamente por Monesina de sódio, comercializado pela indústria química para controlar a contaminação das bactérias Gram-positivas. O princípio ativo do Kamoran está associado com a desorganização do transporte de cátions na membrana das bactérias, interferindo no pH intracelular e afetando no desenvolvimento bacteriano (DA SILVA, 2010; QUÍMICA REAL, 2012). Devido ao mecanismo de ação do

Kamoran, ele tem contribuído significativamente na redução e eliminação completa das contaminações bacterianas, e garantindo a viabilidade da levedura e uma eficiente produtividade do etanol.

Portanto, os principais objetivos deste estudo foram o isolamento, a identificação e a caracterização dos contaminantes bacterianos do processo fermentativo do bioetanol, e também foi realizada uma avaliação de uma colônia contaminante em presença do antibiótico Kamoran, um potente inibidor de crescimento bacteriano. Conhecendo os principais contaminantes do processo fermentativo do etanol pode-se assegurar uma fermentação saudável, eficiente e livre de contaminantes, com uma alta produção do etanol e um significativo rendimento econômico.

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de Cultura para Leveduras e Bactérias

O meio de cultura utilizado para o crescimento de leveduras foi o Agar Nutriente contendo: peptona-0,8%, extrato de levedura-0,4%, glicose-2%, pH 5,5. Enquanto, o meio de cultura utilizado para o isolamento de bactérias foi o GLT contendo: glicose-0,1%, triptona-0,5%, extrato de levedura-0,25%, pH 6,8. Os meios de cultura, o isolamento, cultivo e as caracterizações morfológicas e microscópicas para os microrganismos analisados foram realizadas no laboratório de Microbiologia e Micologia da FEIT-UEMG em Ituiutaba-MG. E a coleta do fermento de levedo foi realizada em uma usina de cana-de-açúcar no Pontal do Triângulo Mineiro. Amostras do fermento de levedo industrial foram homogeneizadas e em seguida filtradas em algodão para eliminar as impurezas.

Contagem de Levedura Viável ao Microscópio

Para avaliação da viabilidade celular da levedura fermentadora foi realizada a técnica de coloração com azul de metileno (5%). Partindo da amostra do fermento de levedo industrial concentrada foi realizada uma diluição em tubos de ensaio com solução de salina esterelizada (0,8%). Após a diluição, transferiu 1 mL da amostra de levedo para um tubo de ensaio e adicionou 1 mL da solução de azul de metileno. Após 5 minutos, transferiu-se 100 µL da amostra corada para uma Câmara de Neubauer e levou ao microscópio óptico e com objetiva de 40X realizou-se a contagem das células viáveis.

Diluição Seriada e Plaqueamento em Meios de Cultura (CECCATO-ANTONINI, 2010)

O método de contagem de colônias em placas de Petri foi baseado no princípio de que cada colônia crescida foi considerada originária de uma única célula viável. O número de células viáveis presentes em uma suspensão foi genericamente chamado de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), ou Colony Forming Units (CFU). A quantificação de UFC envolve o preparo de suspenso de células e diluições em série (10^{-2} a 10^{-7}), e uma alíquota de cada diluição (100 µL ou 0,1 mL) foi inoculada com alça de Drigalsky em placa de Petri com meio de cultura adequado. Após a incubação adequada por 48 horas, foi realizada a contagem de colônias formadas.

Colônias Bacterianas Isoladas

As colônias bacterianas foram isoladas em meio GLT e incubadas em placa de Petri a 37 °C por 48 horas.

Contagem de Bactérias Contaminantes do Processo Fermentativo

Cada amostra do levedo foi diluída em água destilada estéril e transferida 1 mL da amostra para tubo de ensaio esterilizado, e adicionou-se 1

mL de corante de azul de nilo (5%) e azul de metileno (5%). A seguir, homogeneizaram-se os tubos de ensaio e 5 μ L da amostra corada foram transferidos para uma lâmina de vidro e foi realizada a contagem de bastonetes não corados presentes em objetiva de imersão (100X).

Caracterização das Culturas Bacterianas

As colônias bacterianas contaminantes isoladas foram crescidas em meio de cultura GLT sólido a 37°C por 48 horas. Após o crescimento, elas foram caracterizadas quanto a forma, estrutura, diâmetro e textura em uma lupa óptica microscópica.

Coloração de Gram e Morfologia Microscópica

Para o procedimento de coloração do Gram foi realizado um pequeno esfregão de uma cultura de bactéria, e em seguida usou o cristal de violeta, e aguardou por 1 minuto. Lavou-se cuidadosamente o excesso de corante com água destilada. Cobriu-se o esfregado com a solução de lugol e aguardou por mais 1 minuto. Removeu o corante, lavando a lâmina com água destilada. Descoloriu a lâmina corada com etanol absoluto durante 1 segundo. Lavou-se a lâmina cuidadosamente com água destilada, e em seguida, secou a lâmina cuidadosamente com papel absorvente, e examinou ao microscópio óptico utilizando a objetiva para imersão (100X). Verificou-se a coloração e forma das bactérias ao microscópio óptico.

Estoque das Colônias Isoladas

As bactérias isoladas foram inoculadas em meio GLT sólido e líquido, após o crescimento das mesmas foi adicionado glicerol e em seguida elas foram congeladas e estocadas.

Soluções de Inibidores Microbianos

As soluções de Kamoran e Actidiona foram preparadas em etanol na concentração de 100 μ g/mL ou 100 ppm e estocadas a 4°C.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)

Uma alíquota de 100 µL de cada colônia bacteriana em análise foi inoculada em tubos de ensaio contendo meio GLT líquido suplementado com antibiótico Kamoran nas concentrações de 3 ppm, 6 ppm, 12 ppm e o controle, e estes foram incubados a 37°C e por 48 horas. Três experimentos independentes com três repetições de cada experimento foram realizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento e caracterização dos principais contaminantes microbianos do processo fermentativo são de grande importância para identificação dos agentes contaminantes, pois estes podem afetar diretamente a viabilidade da levedura e causar perdas significativas na produtividade do etanol.

Neste estudo iniciou-se da análise da viabilidade do levedo industrial. Este fermento apresentou uma boa viabilidade tanto pela contagem de células/leveduras viáveis microscópicas de 2.0×10^7 células/mL quanto pela contagem por unidade formadora de colônias de 1.2×10^7 UFC/mL, ambos os resultados apresentaram 10^7 células ou colônias viáveis, e assim indicando um fermento de boa viabilidade. Apesar do fermento analisado ter apresentado uma boa qualidade foi, também, observado alguns pontos de contaminações de aspecto leitoso, os quais estão mostrados na Figura 1.



Figura 1- Amostra de cultura de fermento de levedo industrial cultivada (1.2×10^7 UFC/mL) em meio sólido com glicose. As setas indicam os pontos de contaminações microbianas.

Então, os pontos de contaminações microbianas de aspecto leitoso, foram investigados. Estes pontos foram inoculados em meio GLT sólido e líquido em presença de um inibidor (actidiona, 100 ppm) de levedura da espécie *S. cerevisiae* e estes, então, foram incubados a 37 °C por 48 horas, para o isolamento e a caracterização dos mesmos. Os resultados indicaram que estes microrganismos contaminantes analisados eram mesmo do tipo bacteriano, como apresentado pela Figura 2. Na figura 2, também, foi detectado outros tipos de contaminantes, os quais não foram caracterizados neste estudo.



Figura 2- Contaminantes bacterianos isolados em meio GLT sólido. As setas indicam alguns contaminantes bacterianos.

Em seguida foi realizada a contagem dos contaminantes bacterianos através da microscopia óptica, os quais foram estimados em torno de $1,7 \times 10^8$ células/mL; sugerindo que este fermento industrial analisado apresentou um grau significativo de colônias bacterianas contaminantes.

Kelsall e Lyons (2003); Barbosa (2012), discutiram a relação estimada entre o número de bactérias contaminantes presentes na fermentação e respectivas perdas equivalentes em etanol, como, em bactérias viáveis (UFC/mL), em torno de 10^7 com perda de 2.120.000 L de etanol, e em bactérias viáveis (UFC/mL), 10^8 com perda de 2.544.000 L de etanol. Mostrando o quanto é sério e grave o prejuízo econômico que os contaminantes bacterianos podem causar em um processo fermentativo do etanol.

Após o isolamento e contagem dos contaminantes bacterianos do processo fermentativo, uma colônia foi escolhida para sua caracterização morfológica. Esta colônia foi cultivada em meio GLT e então caracterizada através da lupa microscópica, a fim de determinar a sua forma, estrutura e diâmetro. O resultado da análise acima mencionado foi de tamanho de 3 mm de diâmetro da colônia em meio sólido, aspecto leitoso, de forma circular, com elevação convexa, a borda lisa, de estrutura lisa, de brilho translúcida e com ausência de pigmentação, como mostrado pela seta da esquerda na figura 2.

Quanto ao resultado da forma e coloração do Gram foi observado bastonete longo e coloração roxa, apresentando ser bastonete Gram-positivo. Este resultado pode sugerir que este contaminante pode pertencer ao gênero *Lactobacillus*. De acordo com os estudos de Gallo (1990), os gêneros mais freqüentes nos processos industriais de fermentação do etanol foram as Gram-positivas *Lactobacillus* (59,7%) e *Bacillus* (26,6%) (GALLO, 1990).

Para definir com segurança a espécie que poderia pertencer a colônia bacteriana em análise, necessitaria a realização de testes bioquímicos, os quais ainda não foram concluídos. Por outro lado, vários trabalhos científicos já relataram que as bactérias contaminantes predominantes do processo fermentativo são de bastonetes Gram-positivos geralmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* (ROSALES, 1989; CECCATO-ANTONINI, 1998; VENTURA, 2007), os quais confirmam o resultado bastonete Gram-positivo da colônia isolada a partir de um fermento de levedo de uma usina de cana-de-açúcar no Pontal do Triângulo Mineiro.

Narendranath e Power (2004); Ventura (2007), relataram, também, que entre os contaminantes mais comuns encontrados na produção de etanol foram as bactérias do tipo bastonetes, as quais possuem um eficiente metabolismo, tempo de duplicação mais rápida que da levedura, e bastante eficiente em sobrevivência sob condições ácidas, em temperatura acima de 37°C, em presença de etanol e foram capazes de realizar a fermentação láctica. Além disto, estas bactérias podem provocar um enorme prejuízo na fermentação alcoólica, inibindo o crescimento de leveduras pela produção de ácido láctico,

um fenômeno chamado de floculação, que causa uma queda significativa na produção de etanol e também na viabilidade da levedura.

Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)

Na Figura 3 foi demonstrado o experimento do MIC em presença do antibiótico Kamoran e na tabela 1 apresentado o valor do CIM ou MIC de concentração acima de 3 µg/mL para a colônia bacteriana analisada.



Figura 3- Cultura bacteriana crescida em meio GLT líquido. I-Controle sem inibidor. II- Cultura em presença de Kamoran 3.0 µg/mL (3.0 ppm). III- Cultura em presença de Kamoran 6.0 µg/mL (6.0 ppm). IV- Cultura em presença de Kamoran 12.0 µg/mL (12.0 ppm).

Tabela 1 - Valor da Concentração Inibitória Mínima (MIC ou CIM) do Kamoran para a colônia bacteriana analisada.

MIC	
Colônia Bacteriana	Kamoran
Bastonete Gram-positivo	> 3 µg/mL

O valor do MIC acima de 3 µg/mL para a colônia contaminante foi suficiente para a sua completa eliminação, além disto, este dado se mostrou de acordo com outros estudos, como por exemplo, de Meneghin *et al.*, 2008. Este

antibiótico realmente apresentou bastante eficaz, o qual demonstra que as usinas estão usando um antibiótico bastante potente que é capaz de inibir a presença dos contaminantes bacterianos Gram-positivos do gênero *Lactobacillus*.

Portanto, o conhecimento da concentração correta para uso de um antibiótico é de grande importância para evitar desperdício e uso abusivo do mesmo. Sabendo-se a concentração ideal de uso do inibidor de crescimento bacteriano, pode-se controlar e monitorar corretamente as contaminações indesejáveis, evitando, assim, o uso repetitivo dos inibidores de crescimento e a seleção de colônias bacterianas resistentes.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi identificado uma colônia bacteriana contaminante a partir do processo fermentativo industrial do etanol, sendo que as técnicas e análises laboratoriais usadas neste trabalho indicaram, que esta era um bastonete longo Gram-positivo e quando esta foi visualizada ao microscópio indicou que poderia pertencer ao gênero *Lactobacillus*. As análises e procedimentos do CIM ou MIC para esta colônia foi acima de 3 µg/mL, e se mostrou significativo. Todavia, um diagnóstico eficiente e rápido dos agentes contaminantes durante o processo fermentativo industrial do etanol, e o conhecimento do antibiótico ideal e a sua concentração usada, podem garantir assim, uma capacidade fermentativa da levedura livre de contaminantes, e um rendimento significativo da produção industrial do etanol brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o órgão financiador deste estudo, FAPEMIG e a instituição FEIT-UEMG. Agradecemos, também, a Professora Daniela Paula de Oliveira, a Bióloga Camila Cristina Saturnino, e a usina Vale do Paranaíba da região de Ituiutaba, que gentilmente nos forneceu as amostras do fermento de levedo.

REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F. **Elementos de microbiologia**. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONI, E. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgard Blucher, v.1, cap. 1, p 1-32. 2001.

BARBOSA, N. F. 2012. **Aspectos teóricos e práticos do processo de fermentação alcoólica**. Trabalho de Graduação. Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2012.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**. EdUFSCAR, 103 p, 2010.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Monitoramento microbiológico em destilarias uma necessidade**. STAB, Piracicaba, v. 16, n.5, p. 18-19, 1998.

CERQUEIRA LEITE, R. C.; LEAL, M. R. L. V.; CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. **Can Brasil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?** *Energy*, vol 34,p.655-661, 2009.

DA SILVA, G. K. C. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para a obtenção do etanol**. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

DE CARVALHO, G. G. ; MONTEIRO, R. A. B. **A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol**. FAZU em Revista, Uberaba, n.8, p.47-54, 2011.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 338 p, 1990.

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

LEITE, I. R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista**. Dissertação (Pós Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, Vol. 3, p.1-46, 2001.

MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; DE ALMEIDA, P. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. **Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, vol.39, p. 337-343, 2008.

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

PELCZAR, M. J.; CHANE, C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: McGraw-Hill, v.1, p.52-187, 1997.

Química Real. Disponível <http://www.quimicareal.com.br>. Acesso em novembro de 2012.

RODA JÚNIOR, G. B.; MINARI, G. D.; ANNUNZIO, F. R.; CARVALHO, M. R.; FRIGIERI, M. C.; MADALENO, L. L. **Controle de contaminantes no mosto de melão utilizando extrato de lúpulo e óleo essencial de orégano**. Ciência e Tecnologia Fatec-JB, Jaboticabal. v. 5, 2013.

ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: Isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1989.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

AUTORES

JÉSSICA VELASCO ANDRADE ⁽¹⁾ Estudante de graduação do curso de Engenharia Agrônoma da Fundação Educacional de Ituiutaba (FEIT) – Associada à Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG). jessikandrade2010@hotmail.com

ELEUSA MARIA FERREIRA ROCHA ⁽²⁾ Doutora em Genética de Microrganismos pela Universidade de São Paulo (USP). Professora de Bioquímica da Fundação Educacional de Ituiutaba (FEIT), Associada à Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG). eleusarocha@hotmail.com