

FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

FACTORS AFFECTING ALCOHOLIC FERMENTATION

Danilo Aparecido Pereira^I
Rita de Cássia Vieira Macri^{II}
Alex Zerbinatti Gimenez^{III}

RESUMO

Entre diversas fontes de energias renováveis produzida no país, o etanol fabricado a partir da cana-de-açúcar ocupa uma posição de destaque. Sendo assim, o etanol é um fator econômico importantíssimo, conduzindo a interesses internos e externos. Esse processo só teve seu melhoramento por conta dos avanços tecnológicos, tanto na área agrícola, como na industrial. Com o processo fermentativo não poderia ser diferente, a partir do melhoramento do sistema em batelada alimentada e contínuos com utilização de centrífugas, com recirculação e tratamento de fermento, aliado a seleção de leveduras de alta capacidade fermentativa e melhorias nos processos de destilação. Assim, esse trabalho teve como objetivo o estudo do aumento da contaminação bacteriana, em função das variações de temperatura, pH e tempo fermentativo na fermentação e no metabolismo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, durante todo o processo de fermentação alcoólica. Por meio dos resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e dados do supervisorio foi possível concluir que nas temperaturas acima de 32°C a contaminação é favorecida, e a contaminação aumenta com a diminuição do pH, sendo necessário o controle que, geralmente, é feito com usos de antibióticos. Já quando o tempo de fermentação aumenta a contaminação também é favorecida.

Palavras-chave: Contaminação Bacteriana. Temperatura. Tempo de Fermentação. pH

ABSTRACT

Among several renewable energy sources produced in the country, ethanol manufactured from sugarcane occupies a prominent position. Therefore, ethanol is a very important economic factor, leading to internal and external interests. This process only had its improvement because of technological advances, both in the agricultural and industrial sectors. With the fermentation process could not be different, from the improvement of the batch fed and continuous system with the use of centrifuge, with recirculation and yeast treatment, combined with the selection of yeasts of high fermentative capacity and improvements in distillation processes. Thus, this study aimed to study the increase of bacterial contamination, due to variations in temperature, pH and fermentation time in fermentation and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, during the entire alcoholic fermentation process. Through the results of physicochemical, microbiological and supervisory data analyses, it was possible to conclude that at temperatures above 32°C

^ITecnólogo em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB) – São Paulo-Brasil.E-mail:danilopereira170588@gmail.com

^{II}Profa. Me. da Faculdade de tecnologia Nilo De Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB) – São Paulo-Brasil. E-mail: pro.ritacvm@gmail.com

^{III}Tecnólogo em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB) – São Paulo-Brasil.E-mail:zerbinatti:2016@gmail.com

contamination is favored, and contamination increases with the decrease in pH, and it is necessary to control what is usually done with the use of antibiotics. When fermentation time increases contamination is also favored.

Keywords: Contamination Bacterial. Temperature. Fermentation Time. pH

Data de submissão do artigo: 09/10//2020.

Data de aprovação do artigo: 17/12/2020.

DOI: 10.52138/citec.v12i1.113

1 INTRODUÇÃO

Em 1970, o Brasil passou a ser o principal produtor de etanol no mundo todo, tendo como matéria-prima a cana-de-açúcar. Contudo, o etanol que é produzido a partir da cana, possui sua natureza bio-renovável, torna-se um recurso utilizado como um dos subsídios para os combustíveis (CRUZ *et al.*, 2014).

Com o petróleo em alta nos anos 70, esse contexto estimulou a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), possuindo algumas metas: reduzir a dependência de energia por fontes não-renováveis, reduzir a emissão de gases que poluem a atmosfera e, também, atender a demanda do mercado interno e externo; além da política de combustíveis automotivos. O programa teve grande impacto, pois o país já apresentava altos índices da matéria-prima. O Governo Federal também contribuiu para o crescimento do plantio de cana-de-açúcar no sentido financeiro para aumentar as instalações de usinas (FERNANDES; PINTO; NAVES, 2010).

Após muitas etapas e desafios, o etanol acaba se tornando parte da produção energética do Brasil. Com isso foi necessário persistir em uma nova trajetória, que segundo Shikida e Prosa (2012 *apud* ARAVÉCHIA, 2013, p.16) “sob influência de usinas e destilarias, setor de máquinas e equipamentos, indústria automobilística, Estado, organizações corporativas e consumidores voltados, direta ou indiretamente, para a manutenção dessa rota escolhida”.

Para Andrietta (1999) a produção de etanol no Brasil, teve um aumento acima da propagação do setor agrícola aplicada a cultura da cana. Devido aos avanços tecnológicos, tanto na área industrial, como na área agrícola. O processo de fermentação alcoólica, por sua vez, também não poderia deixar de evoluir, uma vez que, tudo estava se aprimorando. Assim, houve a evolução do sistema em batelada com separação de fermento de vinho nos anos 1930, aos processos batelada alimentada e contínuos, com utilização centrífugas, com recirculação e tratamento de fermento. Com certeza isso foi um marco nos avanços desse setor, que em conjunto à seleção de leveduras de alta capacidade de fermentação, melhorias nos processos de produção, avanços nos processos de destilação, qualidade nacional na produção de equipamentos e insumos, fez com que a indústria brasileira de etanol de cana-de-açúcar como matéria prima, a mais competitiva e moderna no mundo inteiro.

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo o estudo do aumento da contaminação bacteriana, em função das variações de temperatura, pH e tempo fermentativo na fermentação e no metabolismo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, durante todo o processo de fermentação alcoólica.

2 UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

De acordo com Aravéchia (2013) a fermentação alcoólica ocorre em consequência de que as células de levedura necessitam de energia para sua sobrevivência, pois essas consomem a matéria orgânica para conseguir a energia, assim fermentando na presença ou ausência de oxigênio.

“As leveduras mais utilizadas no processo fermentativo são do gênero das *Sacharomyces*, tendo como a mais utilizada a *Saccharomyces cerevisiae*” (PORTAL SÃO FRANCISCO, 2011 *apud* ARAVÉCHIA, 2013, p.17)

2.1 Morfologia e estrutura celular da levedura

Em relação a morfologia e estrutura celular da levedura, Andrietta (2012 *apud* ARAVÉCHIA, 2013, p.18) afirma que:

As leveduras são células esféricas, elípticas ou cilíndricas, com dimensões variadas, as *Saccharomyces Cerevisiae* apresentam forma esférica ou elíptica com largura entre 2 e 8 μm e comprimento entre 3 a 15 μm . Estes organismos são eucarióticos tem protoplasma da célula envolvido por uma membrana celular a esta por uma parede, a qual está nele contido o núcleo, vacúolo e outras organelas. Sua parede celular é composta por uma densa camada externa na faixa de 0,05 μm a 0,02 μm na sua estrutura interna está subdividida em três camadas: composta de polímeros de glicose e manose, com pequenas quantidades de proteínas, quitina e lipídios, todos estão distribuídos de acordo com as condições do meio de cultivo em qual está a levedura, apresentando comportamento variável de acordo com o meio.

2.2 Nutrição da levedura

Segundo Camili (2006) os nutrientes são importantíssimos para desenvolver a fermentação, afetam inclusive a velocidade e multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes do mosto é extremamente importante, pois em quantidades insuficientes ou exageradas, pode ter resultados negativos sobre o processo fermentativo como um todo. A falta de nutrientes, segundo Aravéchia (2013) é uma função específica no metabolismo celular e a falta desses nutrientes compromete o metabolismo e consequentemente a eficiência da fermentação.

2.3 Tipos de leveduras

De acordo com Aravéchia (2013) a levedura escolhida é obtida de leveduras selvagens que foram selecionadas por apresentarem características de bom rendimento: tolerância ao etanol, produtividade e rendimento fermentativo. São adaptadas a condições específicas, como diferentes das normais, como excesso de temperatura e grandes concentrações de açúcar. Essas características são benéficas por dificultar a contaminação, inclusive aumenta a velocidade de fermentação e atinge uma maior produtividade.

Stroppa (2002 *apud* ARAVÉCHIA, 2013, p. 22) afirma que “as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas de processos fermentativos e utilizadas como inóculo no início de safra para produção de etanol no Brasil”.

Ainda de acordo com Aravéchia (2013) o ponto principal da fermentação alcoólica a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem a função de transformar o açúcar em etanol.

Em relação as principais características exigidas para selecionar uma boa levedura, Amorim (2011 *apud* ARAVÉCHIA, 2013, p. 23) explica que são elas: “ permanência e dominância, com auto rendimento alcoólica, baixa floculação, baixa espuma, baixo açúcar residual e ser tolerante ao meio de estresse fermentativo”.

2.4 Processos fermentativos para a produção de etanol

Antonini (2004) explica que a fermentação acontece em três etapas distintas: a pré-fermentação tem início quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto. Após cinco ou seis horas, inicia-se a fermentação principal, elevação da temperatura, queda da densidade do mosto por conta da transformação do açúcar e da formação do álcool. A acidez aumenta e abaixa o pH. Esse processo só tem término quando as espumas reduzem, sendo um indício que a fermentação terminou. Esse processo tem duração de nove a dez horas.

A pós-fermentação é considerada pela diminuição lenta e gradativa da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e a não formação de espuma. Essa etapa tem durabilidade de seis a oito horas e deve demorar o mínimo possível para evitar a infecção do vinho e do pé-de-cuba.

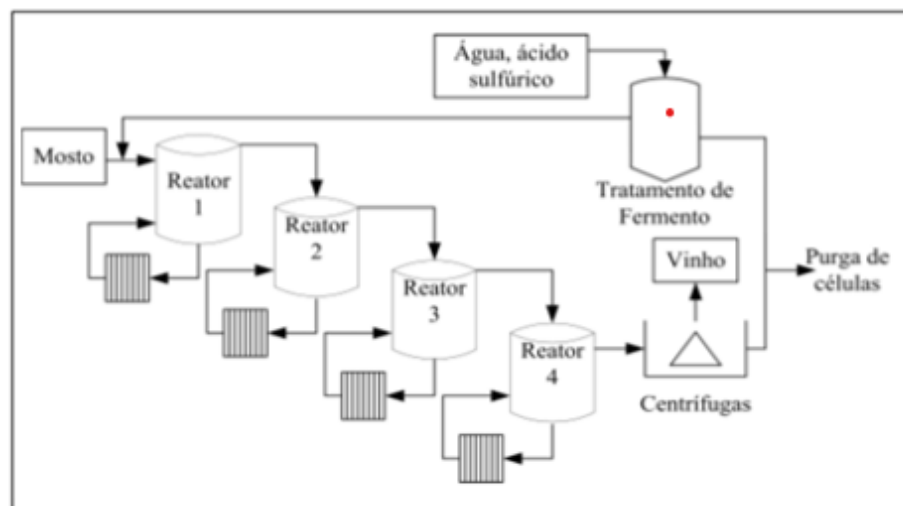
2.5 Fermentação contínua

Segundo Aravéchia (2013) os processos contínuos de fermentação funcionam sem interrupção até o término da safra, só param se caso houver problema no processo. Esses processos se caracterizam com a utilização de dornas com dimensões maiores e processo de forma ininterrupta passando assim de dorna para dorna, com vazão controlada.

Após a dorna estar morta – baixo açúcar residual na última dorna - esse fermento é destinado para centrifugação o qual é segmentado a parte leve denominado vinho para ser destilado e a outra parte com maior densidade, levedura para o tratamento.

Ainda de acordo com Aravéchia (2013), nesse processo contínuo o trabalho tem como ponto fundamental a produção máxima de etanol, representado pela figura 1. Por esse motivo requer maior peculiaridade. Esse fenômeno diferencia a fermentação contínua da fermentação de batelada, por conta do maior cuidado exigido.

Figura 1 - Esquema de processo fermentação contínua para produção de etanol



Fonte: Naves *et al* (2010, p. 4)

2.6 Principais características do modelo contínuo

O processo contínuo pode ser caracterizado como mais vantajoso que a batelada ou batelada alimentada, pois inclui uma otimização das condições produtivas, gerando uma produtividade maior, mais uniformidade do produto, diminuição dos custos laboratoriais e sanitização das dornas com mais facilidade de controle (NAVES *et al.*, 2010).

2.7 Fermentação alcoólica

A fermentação conduzida com uma maior velocidade, aumenta a transformação e dá mais eficiência a produção do etanol, causando um maior aperfeiçoamento no processo por um tempo menor de fermentação e, inclusive, a diminuição dos riscos de infecção por contaminantes (ARAVÉCHIA, 2013).

2.8 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Diversos fatores afetam a fermentação como, fenômenos físicos: temperatura, pressão osmótica; químicos: pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e os fenômenos microbiológicos: espécie, linhagem e concentração de levedura, contaminação bacteriana). Todos esses fatores têm impacto diretamente no rendimento da fermentação e, também, na eficiência da conversão do açúcar em etanol. (REIS; RIBEIRO, 2009).

Um bom monitoramento, segundo Aravéchia (2013) contribui muito para a eficiência de todo processo, como exemplo: análises de temperatura, brix de alimentação ou densidade, pH, contaminação bacteriana, velocidade e açúcares residuais.

2.9 Influências da temperatura na viabilidade celular

As temperaturas ideais para o processo de produção industrial de etanol encontram-se nas casas 26 a 35°C. À medida que a temperatura vai aumentando, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol (SOUZA; MONTEIRO, 2012).

Temperaturas diferentes afetam as atividades metabólicas e o crescimento das leveduras. A maioria dos elementos celulares, como proteínas e membrana plasmática se altera quando são expostas a grandes temperaturas. Inclusive a temperatura é um dos elementos que mais contribui para uma alteração das atividades do microrganismo. Sendo assim, tudo isso influencia o crescimento, capacidade fermentativa e viabilidade celular das leveduras (NAVES *et al.*, 2010).

Conforme Lima (2001 *apud* NAVES *et al.*, 2010, p.7) “à medida que a temperatura aumenta, eleva-se a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana.”.

A temperatura inclusive pode afetar a permeabilidade da membrana das leveduras. Se estiver muito baixa, diminui a velocidade de absorção dos nutrientes e de açúcar, causando um tempo de fermentação acima do esperado. Segundo Walker (1994 *apud* AMARAL, 2009, p.10) “apesar de existirem meios fisiológicos para regulação da temperatura interna da levedura, um aumento do estresse celular acontece, promovendo rápido declínio da viabilidade do microorganismo”.

2.10 Influências do pH

O pH é um fator extremamente significativo para as fermentações industriais devido à sua importância no controle da contaminação bacteriana e, também, seus efeitos de crescimento da levedura e taxa fermentativa (NAVES *et al.*, 2010).

Segundo Lima (2001, *apud* AMARAL, 2009, p. 10) “as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH”. O mesmo autor explica que “a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0”.

Quando os valores de pH se encontram baixo, ocorre a perda de nutrientes como o potássio e o nitrogênio, resultando no crescimento da sensibilidade do etanol (AMARAL, 2009).

O processo de fermentação dentro das indústrias acontece em uma faixa mais elevada de pH, o que beneficia a integridade fisiológica da levedura, durante as fermentações o pH pode variar por uma diversidade de fatores (SOUSA; MONTEIRO, 2012).

Já para Cardoso (2005, *apud* SOUSA; MONTEIRO, 2012 p. 3), “como o pH do caldo de cana é naturalmente em torno de 5,5 a acidificação realizada antes da inoculação favorece a fermentação alcoólica e, também, previne o crescimento das bactérias contaminantes”.

2.11 Influência da contaminação

Durante o processo industrial de etanol estão também presentes os micro-organismos oriundos do caldo da cana. Portanto, é natural a existência de níveis de bactérias. Os mais naturais são eles: *Lactobacillus* e *Bacillus*. Vários estudos realçam que a contaminação bacteriana é responsável por perdas no rendimento de fermentação (NAVES *et al.*, 2010).

2.12 Viabilidade celular

A viabilidade é, sem dúvida, um aspecto de muita importância no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior for o número, maior tende ser o desempenho em todo processo (NAVES *et al.*, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com dados coletados na área da fermentação. O lugar de experimentação é uma unidade sucroenergética da região, localizado no município de Nova Europa/SP.

Todo processo fermentativo é composto por dois conjuntos de dornas. Sendo o lado 1 com 4 dornas e o lado 2 com 5 dornas em sequência, com controle de passagem de temperatura, pressão e nível. O sistema de fermentação é alimentado com mosto na primeira dorna, sendo amostrado com coletores contínuos e realizada a distribuição dos volumes de maneira que seja possível obter a máxima produtividade e rendimento fermentativo. Após esse processo de fermentação, o vinho já fermentado é encaminhando para a área de centrifugação e será separado o vinho fermentando para a destilação e a segunda fração da centrifugação composta por levedura retornando ao tratamento da hidratação com ácido, adição de nutrientes e antibióticos se necessário.

Foram realizadas coletas diárias, duas vezes ao dia, análises físico-químicas e, também, microbiológicas, uma vez que, são os três fatores que interferem em todo o processo.

As análises de temperatura, tempo de fermentação, contaminação bacteriana e pH todas foram monitoradas continuamente durante o período da safra 17/18.

3.1 Análises físico-química no vinho fermentado

Os procedimentos e dados de análise foram realizados junto ao laboratório industrial de uma unidade sucroenergética da região.

3.2 Análise de potencial hidrogênio

O pH de uma solução, permite identificar a concentração de íons de hidrogênio na solução. O pH varia com a temperatura e com a presença de substância dissolvidas com a solução.

Os materiais e equipamentos necessários foram: pHmetro; agitador magnético; béquer, 250 ml; pipeta, 500mL, com água destilada; termômetro, escala 0 a 50°C; papel higiênico; soluções tampão pH 4 e 7.

Os processos seguiram as seguintes ordens:

- 1 resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
- 2 colocar o eletrodo na amostra até cobrir o bulbo, com o máximo de cuidado para manter o nível da amostra abaixo do nível do eletrólito;
- 3 medir o pH;
- 4 limpar o eletrodo com água destilada e manter sempre o bulbo do eletrodo em água destilada quando não estiver em uso; e
- 5 recomenda-se guardar a solução tampão de pH em geladeira.

3.3 Análise microbiológicas

Os procedimentos e dados de análise foram realizados junto ao laboratório de microbiologia de uma unidade sucroenergética da região.

3.4 Análise de contaminação bacteriana

Realizar contagem de bactérias ao microscópio óptico.

Materiais e equipamento necessários: microscópio óptico (campo claro); agitador automático para tubos de ensaio; contador para células; tubo de ensaio; pipetas graduadas de 1,0 ml e 10,0 ml; lamínula 22 x 22 mm; lâmina 26 x 76 mm; óleo para imersão; água destilada esterilizada; bastão vidro; suporte para tubos; suporte para pipetas; solução de trabalho; agitador magnético; papel alumínio esterilizado; balança analítica; espátula esterilizada; funil de vidro; algodão; balão volumétrico de 100 e 200 ml; papaína.

Procedimento analítico:

1. Homogeneizar a amostra;
2. Transferir uma alíquota da amostra (3 – 5 ml) para um tubo de ensaio;
3. Adicionar papaína na amostra;
4. Homogeneizar em agitador para tubos;
5. Deixar em repouso durante 5 minutos;
6. Diluir a amostra com água destilada;
7. A diluição é realizada para que o número de células seja adequado para a faixa de maior precisão da metodologia;

8. Transferir 1 ml da amostra diluída para outro tubo de ensaio;
9. Transferir 1 ml da solução corante (solução de trabalho) para o tubo de ensaio que contém a amostra diluída;
10. Homogeneizar em agitador para tubos;
11. Transferir 3,0 µL (lamínula de 22 x 22 mm) da amostra corada para uma lâmina de vidro (26 x76 mm);
12. Colocar uma lamínula sobre a preparação, tomando o cuidado para não formar bolhas; e
13. Proceder a contagem de bastonetes não corados presentes em 50 campos. Uniformemente distribuídos em toda a área da lamínula, utilizando a objetiva para imersão (100x).

Observação: O volume de amostra transferida para a lâmina depende do tamanho da lamínula utilizada.

Tabela 1 – Diluição das Amostras

Volume (ml)	Lamínula (mm)
0,002	20 x 20
0,003	22 x 22
0,004	24 x 24

Fonte: Fermentec (2017)

Cálculo:

$$n^{\circ} \text{ bastonetes/ml} = \text{FM} \times \frac{1}{\text{Vol. Amostra}} \times \text{M} \times \text{D} \quad (1)$$

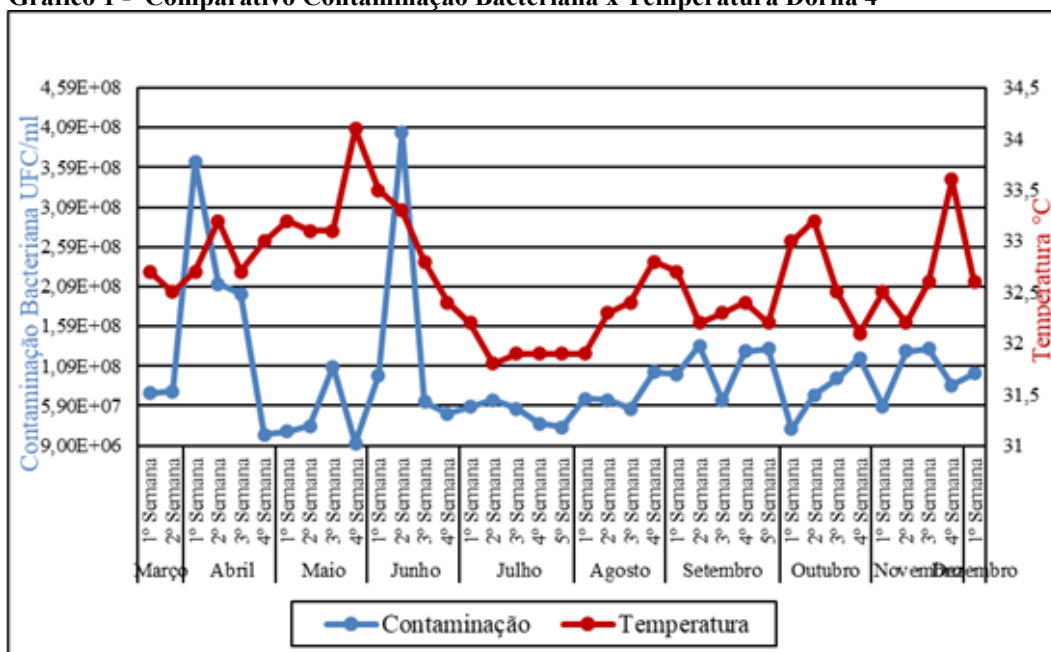
Onde: FM = fator microscópio

Referência: Fermentec

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

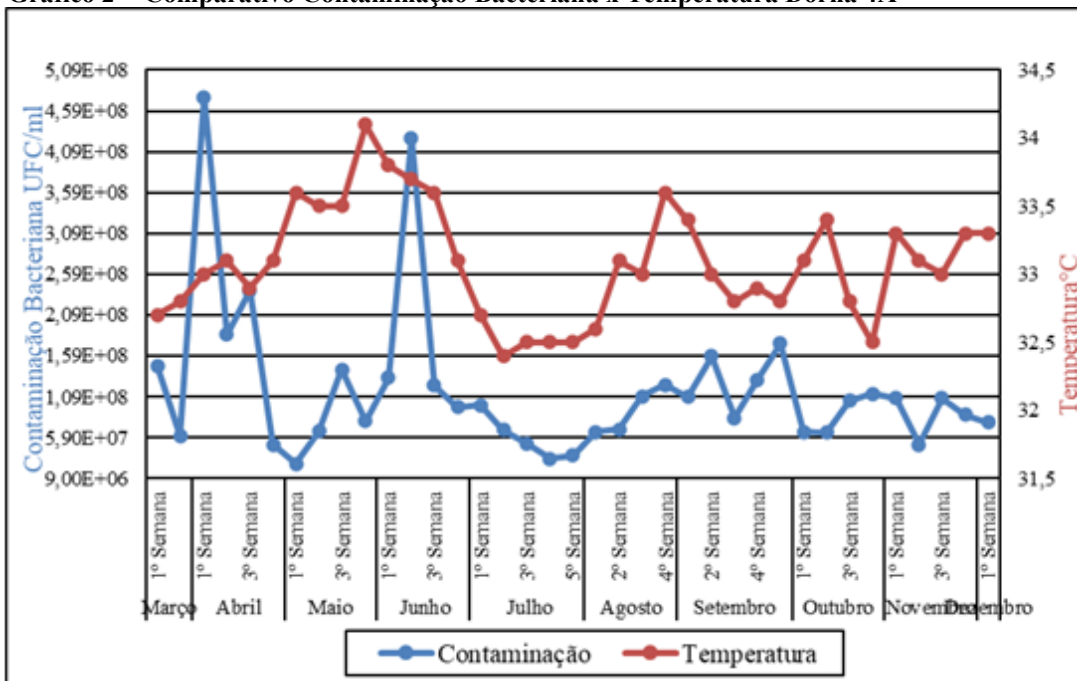
Análise do gráfico 1 e 2: é possível visualizar que em temperaturas acima de 32° C, houve um aumento na contaminação bacteriana.

Gráfico 1 - Comparativo Contaminação Bacteriana x Temperatura Dorna 4



Fonte: os dados foram coletados junto ao laboratório industrial e microbiologia de uma unidade sucroenergética da região, no período dos meses março a dezembro, agrupados em médias semanais na safra 17/18.

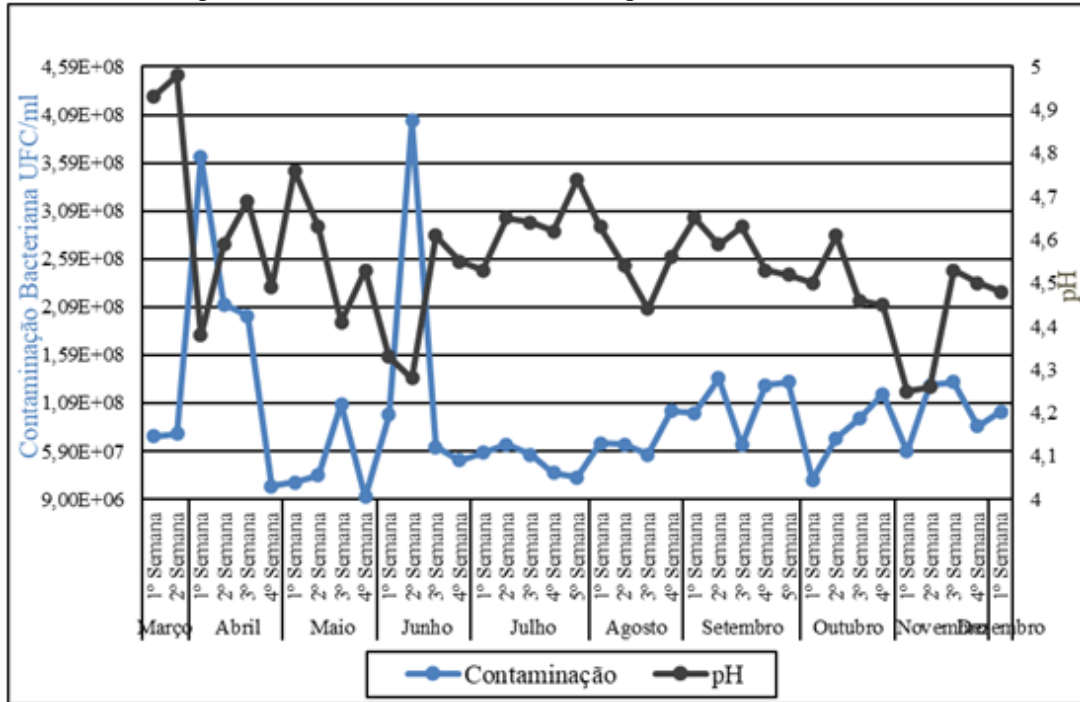
Gráfico 2 - Comparativo Contaminação Bacteriana x Temperatura Dorna 4A



Fonte: os dados foram coletados junto ao laboratório industrial e microbiologia de uma unidade sucroenergética da região, no período dos meses março a dezembro, agrupados em médias semanais na safra 17/18.

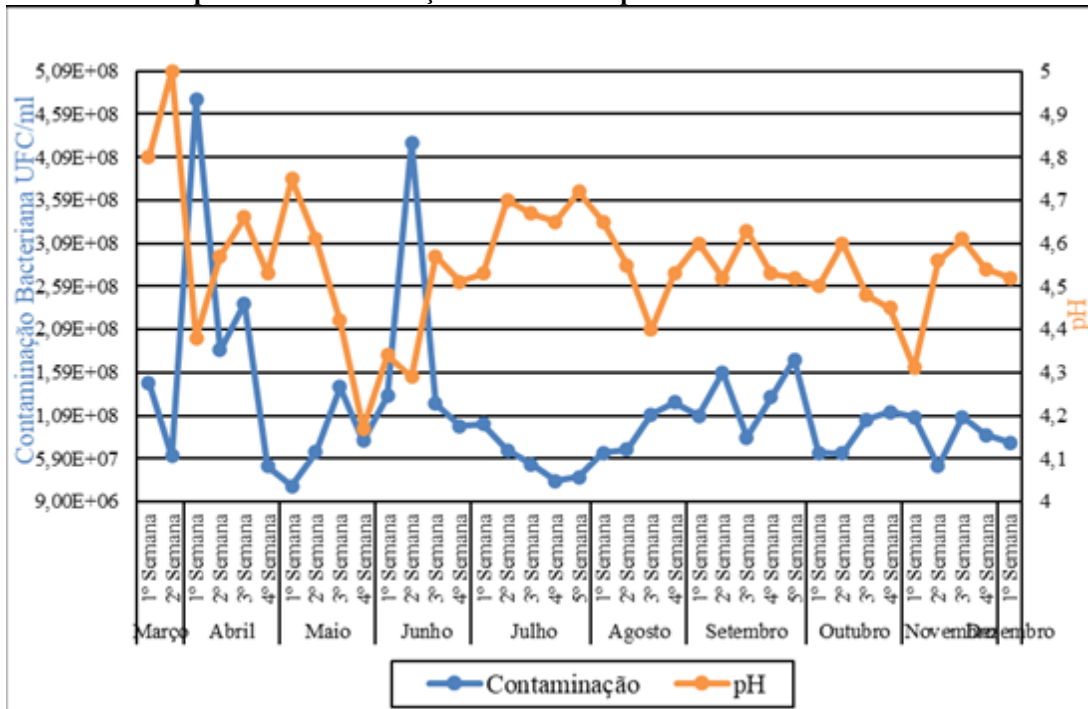
Na análise gráfico 3 e 4: é possível observar que com o aumento da contaminação, houve uma queda no pH, assim sendo necessário a aplicação de antibióticos.

Gráfico 3 - Comparativo Contaminação Bacteriana x pH Dorna 4



Fonte: os dados foram coletados junto ao laboratório industrial e microbiologia de uma unidade sucroenergética da região, no período dos meses março a dezembro, agrupados em médias semanais na safra 17/18.

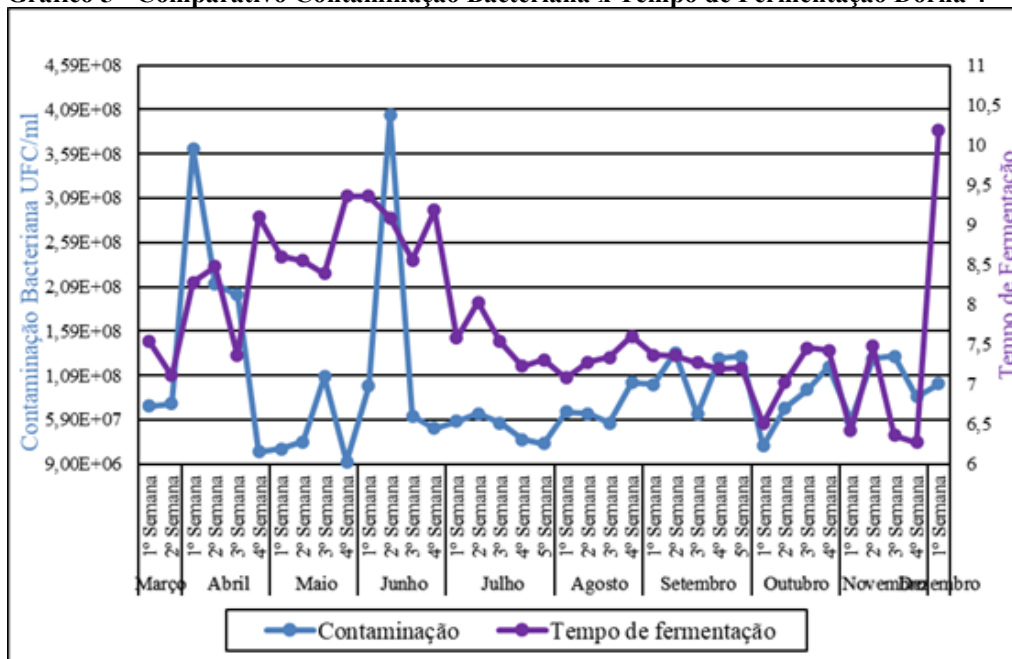
Gráfico 4 - Comparativo Contaminação Bacteriana x pH Dorna 4ª



Fonte: os dados foram coletados junto ao laboratório industrial e microbiologia de uma unidade sucroenergética da região, no período dos meses março a dezembro, agrupados em médias semanais na safra 17/18.

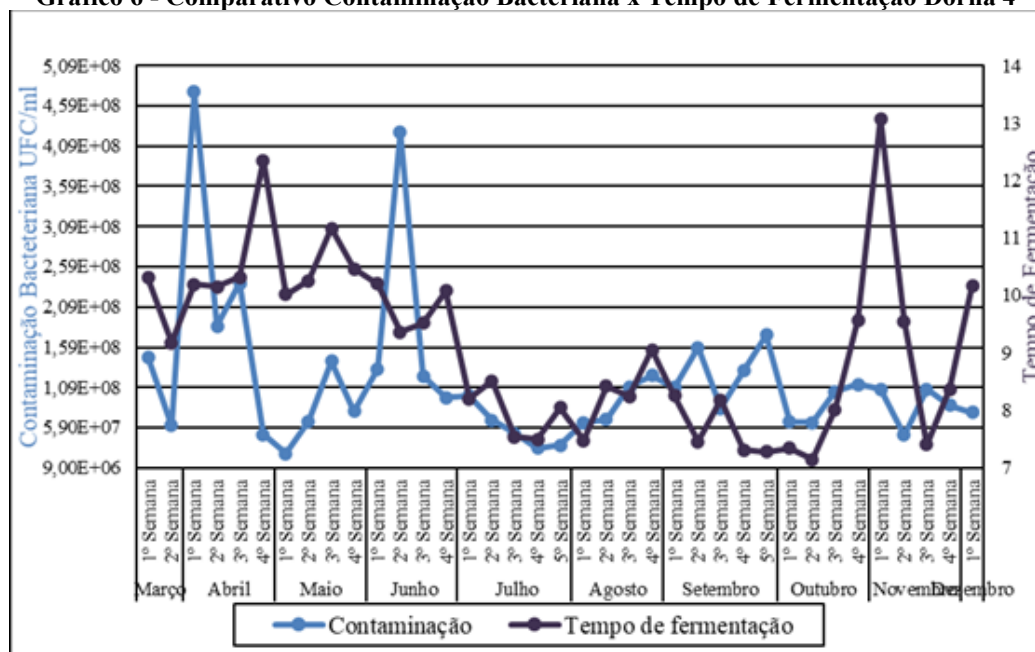
Análise gráfico 5 e 6: é possível observar que com o aumento do tempo de fermentação, houve também um aumento na contaminação. O tempo de fermentação ideal é recomendado entre seis e oito horas.

Gráfico 5 - Comparativo Contaminação Bacteriana x Tempo de Fermentação Dorna 4



Fonte: os dados foram coletados junto ao laboratório industrial e microbiologia de uma unidade sucroenergética da região, no período dos meses março a dezembro, agrupados em médias semanais na safra 17/18.

Gráfico 6 - Comparativo Contaminação Bacteriana x Tempo de Fermentação Dorna 4ª



Fonte: os dados foram coletados junto ao laboratório industrial e microbiologia de uma unidade sucroenergética da região, no período dos meses março a dezembro, agrupados em médias semanais na safra 17/18.

4 CONCLUSÕES

Através de análises físico-químicas, microbiológicas e dados do supervisor foi possível chegar aos seguintes resultados: nas temperaturas acima de 32°C a contaminação é favorecida. A contaminação aumenta com a diminuição do pH, sendo necessário o controle que, geralmente, é feito com usos de antibióticos. Já quando o tempo de fermentação aumenta a contaminação também é favorecida.

REFERÊNCIAS

AMARAL F.S **Influência Conjunta do pH, Temperatura e Concentração de Sulfito na Fermentação Alcoólica de Mosto de Sacarose.** Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

ARAVÉCHIA P.R. **Estudo da Influência da Pureza do Xarope e Mel Final Resultante de Produção de Açúcar na Contaminação do Processo Fermentativo e Seletividade do Meio.** IFSP – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo Campus Matão, 2013.

CRUZ, M.L.; RAMINHO, M.L.F.; CASTRO, A.L.M.; GUIDINI, C.Z.; RESENDE, M.M de; RIBEIRO, E.J.. Estudo da influência da Temperatura na Resistência ao Etanol da Levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014.

NAVES R.F; FERNANDES F.S; PINTO O.G; NAVES P.LF. **Contaminação Microbiana nas Etapas de Processamento e sua Influência no Rendimento Fermentativo em Usina Alcooleira.** Enciclopédia Biosfera, 2010.

REIS H.B; RIBEIRO E.J. Influência Conjunta do pH, Temperatura e Concentração de Sulfito em Fermentação Alcoólica de Mostos de Sacarose. **IX encontro e XIII seminário de iniciação científica**, 2009.

SOUSA J.L.U; MONTEIRO R.A.B. **Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de etanol**, 2012.