

CONTROLE ANALÍTICO PARA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM INDÚSTRIA CANAVIEIRA

ALVES, Douglas Ramos¹; CAPUCI, Ana Paula Silva².

^{1,2}. Universidade de Uberaba, Departamento de Engenharia Química, Campus Aeroporto, Avenida Nenê Sabino, 1801, Bairro Universitário, CEP: 38055-500 Uberaba MG, Brasil.

Email: douglasramos.eng@outlook.com; paulinha.aps@gmail.com².

RESUMO

A fermentação alcóolica é o processo reacional de transformação da sacarose em álcool por meio da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*. Para que a fermentação alcóolica ocorra, em boas condições e com alto rendimento é necessário um controle rígido em diversos parâmetros de qualidade físico-químicos e microbiológicos como: qualidade do substrato (mosto), temperatura de fermentação, pH, oxigenação, teor alcoólico, contaminação microbiana, CO₂, concentração de leveduras, etc. Pensando nisso, o intuito deste trabalho, foi determinar os principais parâmetros analíticos físico-químicos e microbiológicos, para controle e otimização deste processo demonstrando o impacto de cada parâmetro, com amostras coletadas na CMAA - Companhia Mineira de Açúcar e Álcool S/A – Unidade Vale do Tijuco, que utiliza como matéria prima a cana de açúcar. A fermentação alcóolica para produção de etanol vem sendo estudada há bastante tempo, portanto, o trabalho abrangeu uma larga escala de datas, compreendendo artigos de 1983 até o ano de 2013, demonstrando que a fermentação alcóolica deve seguir parâmetros rígidos de qualidade por meio de métodos analíticos, visando ganho em eficiência de produção, pois os fungos leveduriformes são seres unicelulares, que podem sofrer estresse, quando o seu meio não está adequado, causando quedas na viabilidade.

Palavras-chave: Microbiológicos. Oxigenação. Unicelulares.

1 Introdução

A fermentação é uma prática bastante antiga, conhecida antes mesmo do ano 6000 a.C., com aplicação de diversos produtos, existindo registros capazes de comprovar a utilização de muitos alimentos derivados desse processo por povos antigos, tais como os egípcios, assírios e babilônicos. (VILLEN, 2009).

O primeiro a realizar um estudo sobre fermentação alcóolica foi Lavoisier, em 1789. Já em 1857 Pasteur, demonstrou de forma mais clara a natureza deste processo, analisando que grande parte das fermentações eram ocasionadas por leveduras.

As fermentações podem ser realizadas por processos descontínuos, contínuos alimentados, contínuos e também por variações destes processos (WARD, 1991; BORZANI, 2001). Sendo que o processo descontínuo é utilizado em 85% das destilarias do Brasil, cujo sistema descontínuo é conhecido também como *Melle-Boinot*, (AMORIM; LEÃO, 2005). Segundo TACIRO, 1992, para aplicação de fermentação em um processo industrial é necessário que o processo seja sempre uniforme e contínuo para qualquer volume de fermentação.

A produção de etanol no Brasil é, na maioria dos casos oriunda da cana de açúcar, cujo cultivo é favorecido pelo clima, resultando em menor custo. (ANDRIETA et. al., 2006)

Com a implantação do Proálcool, Programa Nacional do Álcool, em 1975, o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a desenvolver um

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

programa de combustível alternativo em larga escala em substituição à gasolina. Desde então, o processo de fermentação alcoólica tem sido constantemente aprimorado. (ANDRIETA et. al; 2006)

Pensando na importância da fermentação alcoólica para a produção de etanol, combustível renovável, os autores do presente artigo propõem a realizar ensaios analíticos, físico-químicos como: pH, °BRIX, ART, teor alcoólico, concentração de levedo, e microbiológicos como: viabilidade, bastonetes e brotamento, para controle da fermentação alcoólica em indústria alcooleira.

2 Materiais e Métodos

Foram determinadas análises físico-químicas e microbiológicas em triplicatas, no laboratório industrial da (CMAA) – Unidade Vale do Tijuco, da Safra 2017/2018, cuja produção diária é de 800 m³ de etanol hidratado. Foram seguidos procedimentos físico-químicos da FERMENTEC, 2011 e microbiológicos da FERMENTEC, 2013. Os principais materiais e reagentes utilizados para ensaios estão descritos a seguir:

- Densímetro Digital;
- Destilador Automático;
- Refratômetro Digital;
- Centrífuga;
- Espectrofotômetro;
- Microscópico;
- Micro-ondas;
- Banho de Ebulição;
- pHmetro;
- Tubo de Ensaio;
- Tubo de Concentração 15 mL;
- Dispensete Automático;
- Pipetas Volumétricas 5, 10, 20, e 50 mL;
- Balões Volumétricos 100 e 200 mL;
- Béquer 100 mL;
- Padrão pHmetro 4,00 e 7,00;
- Padrão 0, 15, 25, 50 °BRIX;
- Padrão Açúcar Invertido 1%
- Celite;

- Oxalato;
- Somogy & Nelson;
- Ácido Clorídrico 0,75 N;
- Hidróxido de Sódio 0,75 N.
- Solução Estoque e Trabalho Eritrosina;
- Papaína;
- Sulfato Azul de Nilo 2%;
- Azul de Metileno 0,2%.

2.1 Determinações em MOSTO

Solução açucarada, neste caso retirado da cana de açúcar.

2.1.1 Determinação °BRIX

Calibrou-se o refratômetro Anton Paar, modelo Abbemat 200, com os padrões de 0, 15, 25, 50 °BRIX, posteriormente adicionou-se a amostra, e realizou-se a leitura.

2.1.2 Determinação pH

Calibrou-se o pHmetro, Digimed, modelo DM-22, com as soluções tampão de 4,00 e 7,00, posteriormente adicionou-se as amostras e realizou-se a leitura.

2.2 Determinações em CUBA

Cubas são tanques de tratamento do “leite de leveduras” em alta concentração, para uso subsequente em outra batelada.

2.2.1 Determinação pH

Seguir conforme procedimento 2.1.2

2.2.2 Determinação Álcool °GL

Adicionou-se 25 mL da amostra, medidos em pipeta volumétrica, colocou-se dentro do bulbo do micro destilador, Tecnal, modelo TE-02, fechando todas as válvulas e delimitando uma temperatura de destilação entre 80 e 90°C, após isso foi adicionado em um balão de 100 mL na saída do micro destilador, completou-se com água destilada. Posteriormente levou-se a amostra ao densímetro, Anton Paar. Modelo DMA 4500 M, e determinou o teor de álcool °GL (v/v); conforme a **equação (1)**:

$$\text{°GL TOTAL} = \text{°GL OBTIDO} \times 4 \quad (1)$$

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

2.2.3 Determinação Concentração Levedo

Adicionou-se 15 mL de amostras em tubos graduados, e levou-se a centrífuga, Fanem, modelo 206 BL 1, com rotação de 3200 rpm, por 10 min. Conforme a **equação (2)**:

$$[\text{CONC.}] \% = \frac{\text{VOLUME CREME}}{\text{VOLUME TOTAL}} \times 100 \quad (2)$$

2.3 Determinações em DORNA

Dornas são tanques nos qual o mosto é submetido ao processo fermentativo, sendo transformados em vinho (substância a ser destilada).

2.3.1 Determinação pH

Seguir conforme procedimento 2.1.2

2.3.2 Determinação Álcool °GL

Seguir conforme procedimento 2.2.2

2.3.3 Determinação Concentração Levedo

Seguir conforme procedimento 2.2.3

2.3.4 Determinação ART

Adicionou-se 0,2 g de oxalato e 1,0 g de celite em 100 mL da amostra retirada da centrífuga a 3200 rpm, adicionou-se 10 mL em balão volumétrico de 200 mL, com 20 mL de ácido clorídrico 0,75 N, e levou-se para micro-ondas, por aproximadamente 1 minuto, ou até a amostra entrar em ebulição, retirou-se a amostra, resfriando-a em água corrente com posterior neutralização com com fenolftaleína 1%, e completou-se o balão com água destilada. Determinou-se o padrão de açúcar invertido para cálculo da **equação (3)**, adicionando 10 mL da amostra padrão em um balão de 100 mL, e retirando uma amostra de 10 mL adicionada em um balão de 200 mL. Numerou-se 9 tubos:

- 1,2,3: Amostra com água destilada;
- 4,5,6: Padrão Açúcar Invertido;
- 7,8,9: Amostra.

Colocaram-se os tubos em banho de ebulição e aquecendo-os até que a temperatura dos tubos se igualassem (2 a 3 minutos), adicionou-se com auxílio do dispensete 1 mL do reativo de Somogy em cada tubo, sem tirá-los da ebulição e deixou-se durante 15 minutos. Esfriou-se em água corrente. Colocou-se em cada tubo 1 mL do reativo de Nelson. Agitou-se imediatamente. Colocou-se em cada tubo 7 mL de água destilada e agitou-se bem. Deixou-se 5 minutos em repouso com posterior realização da leitura em espectrofotômetro, HACH, modelo DR 5000, a 535 nm.

$$\text{ART \%} = 0,1 \times \frac{\text{L. AMOSTRA} - \text{L. BRANCO}}{\text{L. PADRÃO} - \text{L. BRANCO}} \quad (3)$$

2.3.5 Determinação Microscopia

Transferiu-se 5 mL de uma amostra de vinho bruto para tubo de ensaio, adicionando papaína, homogeneizou-se, e aguardando 5 minutos, dilui-se a amostra em água destilada, adicionou-se, adicionou-se 1 mL da amostra diluída para 1 mL de solução corante, preparou-se a câmara de Neubauer, cobrindo a superfície espelhada com uma lamínula, transferindo o volume de amostra ate preencher a câmara de Neubauer, observou-se o microscópico, Nikon, modelo Eclips E 200, pela objetiva de imersão 100x, quantificou-se células vivas, mortas e brotos presentes nos retículos centrais dos 25 quadrículos. Para diluição da amostra: procurou-se ajustar a lâmina para a faixa de menor erro da metodologia (300 a 500 células totais), adicionou-se 1 mL de vinho bruto diluído em 19 mL de água destilada, posteriormente adicionou-se 1 mL de corante. Conforme a **equação (4)**:

- 1º Diluição: diluiu-se a amostra de vinho em água;
- 2º Diluição: homogeneizou-se partes iguais da amostra diluída e corante.

$$\text{DILUIÇÃO} = (1^\circ \text{ DILUIÇÃO}) \times (2^\circ \text{ DILUIÇÃO}) \quad (4)$$

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017
2.3.5.1 Determinação Viabilidade

Seguir conforme procedimento 2.3.5 e a equação (5):

$$\% \text{VIAB.} = \frac{\text{CÉLULAS VIÁVEIS}}{(\text{VIÁVEIS} + \text{NÃO VIÁVEIS})} \times 100 \quad (5)$$

2.3.5.2 Determinação Brotamento

Seguir conforme procedimento 2.3.5 e a equação (6):

$$\% \text{BROT} = \frac{\text{BROTAMENTO VIÁVEIS}}{\text{CÉLULAS VIÁVEIS}} \times 100 \quad (6)$$

2.3.6 Determinação Bastonetes

Foi utilizado papaína para a contagem em vinho, aguardando 5 minutos para que a amostra 3:5 (bastonetes/campo) fosse diluída. Foram misturadas partes iguais da amostra diluída e da solução corante, agitando e transferindo 0,003 mL para uma lamínula 22x22 mm. Após, observou-se o microscópio, contando as células não coradas (viáveis), sendo importante ressaltar que não foram contadas os bastonetes de coloração azul. Utilizou-se 50 campos para contagem de vinho. O cálculo para determinação de bastonetes foi realizado conforme equação (7):

$$\frac{\text{BAST}}{\text{mL}} = \frac{\text{BAST}}{\text{CAMPOS}} \times \frac{1}{\text{VOL AMOSTRA}} \times \text{DIL} \times \text{FM} \quad (7)$$

2.4 Determinações em VOLANTE

Volante são reservatório de vinho devedurado, enviado para coluna de destilação.

2.4.1 Determinação Álcool ° GL

Seguir conforme procedimento 2.2.2

2.4.2 Determinação Concentração Levedo

Seguir conforme procedimento 2.2.3

2.5 Determinações em CENTRÍFUGAS

São equipamentos que utilizam força centrípeta para separar o fermento do vinho enviado para coluna de destilação.

2.5.1 Determinação Concentração Levedo

Seguir determinação de creme conforme procedimento 2.2.3

3 Resultados

Tabela 1 – Resultados analíticos, para controle de fermentação alcoólica em indústria alcooleira, coletados da CMAA - Unidade Vale do Tijuco, Safra 2017/2018.

Análises	Dorna	Cuba	Mosto	Creme
pH	4,92	2,66	5,48	
Temperatura °C	33	30	29	
Concentração %	14,66	46,6		66,66
Álcool %	10,12	4,80		
°BRIX				22,19
ART %	0,28			
Viabilidade %	91,84			
Brotamento %	5,49			
Bastonetes ml ⁻¹	5,4x10 ⁶			

Fonte: Acervo dos Autores, (2017).

4 Discussão

O estudo foi desenvolvido em processo descontínuo (batelada), que segundo AMORIM e LEÃO; 2005 é o processo utilizado em 85% das destilarias do Brasil, cujo sistema descontínuo é conhecido também como *Melle-Boinot*, como pode ser observado na **Figura 1**. Este processo é o responsável por grandes avanços em fermentações alcólicas.

Figura 1 – Fluxograma de fermentação alcoólica, descontínuo *Melle Boinot*.



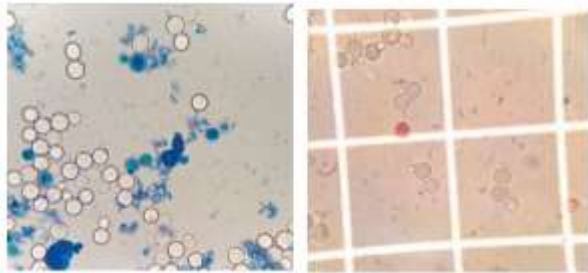
Fonte: (UFU, 2009)

O processo fermentativo inicia-se com a alimentação do “leite de leveduras” em alta concentração proveniente das cubas, conforme **figura 1**, que são tanques de tratamento das

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

leveduras, cujos parâmetros principais a serem controlados para uma fermentação com alto rendimento são: a concentração das leveduras e o pH. Segundo OLIVEIRA, 2010, a concentração de leveduras nas cubas é alta em torno de 45 a 50 %, pois a proporção de água adicionada nas cubas é de 1:1. O resultado encontrado descrito na **tabela 1** e, através dele é possível notar que os parâmetros exigidos foram alcançados. Nas cubas também são adicionados ácido sulfúrico até pH 2,5 com o objetivo de reduzir a sua carga microbiana diminuindo o uso de antibióticos que são produtos com preço elevado (OLIVEIRA, 2010). O pH da cuba determinado foi de 2,66. Portanto o pH estava próximo ao adequado, aumentando a viabilidade, e quantidade de bastonetes/mL estava controlada $5,4 \times 10^6$, excluindo a formação de flocos que são causados pelas bactérias, atrapalhando o processo fermentativo reduzindo a velocidade da fermentação, (CHERUBIN, 2003).

Figura 2 – Leveduras em câmara de Neubauer e lamina, para determinação de bastonetes, viabilidade e brotamento.



Fonte: Acervo dos Autores, (2017).

Alimenta-se também o mosto nas dornas como demonstrado na **figura 1**, sendo que as análises mais importantes são pH e °BRIX, o pH é de suma importância, pois caldos com pH muito baixo, indicam inversão de sacarose e elevados teores de contaminação bacteriana que são fatores prejudiciais para o processo fermentativo, o pH da amostra estava favorável. Já o °BRIX determina a quantidade de açúcares na solução de mosto. A alta concentração de mosto é estudada e desejada

nos processos de fermentação, pois reduzem a quantidade de energia gasta em destilação e volume de efluentes (BAI, 2007), no entanto elevados teores de açúcares aumentam a pressão osmótica que é prejudicial as células das leveduras, diminuindo a viabilidade (BAFRNCOVA et al., 1999). Portanto segundo BARBOSA, 2016, o teor açúcares deve ser de no máximo 16 °BRIX, cujo resultado da nossa amostra foi de 22,19 °BRIX, portanto a amostra estava fora dos parâmetro especificado em literatura, com isso realizou-se um cálculo, demonstrado na **equação (8)**, para diluição do mosto, onde em cada 1000 litros de mosto foi adicionado aproximadamente 387 litros de água.

$$VOL T = VOL C \times \frac{BRIX C - BRIX D}{BRIX D} \quad (8)$$

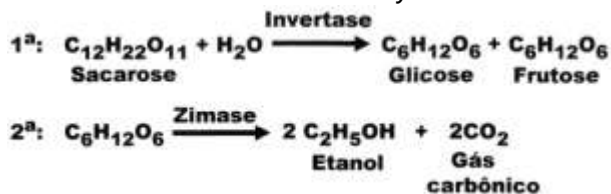
Na qual:

- VOL T é o volume total;
- VOL C é o volume do caldo;
- BRIX C é o °BRIX do mosto;
- BRIX D é o °BRIX desejado.

Após a alimentação de mosto e fermento nas dornas, inicia-se a fermentação, sendo a *Saccharomyces Cerevisiae* a levedura responsável pelo processo. Segundo (AMARAL, 2009), fermentam bem em temperatura de 26 a 35°C e tem melhor atividade com pH de 4 a 5. Tanto o pH quanto a temperatura estavam dentro dos parâmetros ótimos de operação conforme **tabela 1**. A *Saccharomyces Cerevisiae* realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de adquirir energia química necessária à sua sobrevivência, liberando o etanol e CO₂, que é formado pelas leveduras a partir de monossacarídeos, sendo necessário decompor a sacarose, (C₁₂H₂₂O₁₁), em D-glicose e D-frutose, sendo esta a reação principal. Na fermentação alcoólica estes microrganismos fornecem a enzima invertase que hidrolisa a sacarose, dada pela **reação 1**, (SOUZA, 2009).

11º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 16 de outubro a 30 de novembro de 2017

Reação 1 – Reação de produção de etanol, utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: (SANTOS, 2011).

Como o pH, concentração de leveduras e temperatura, estavam nos parâmetros especificados, a produção de etanol foi alta de 11,12 (v/v), cujo teor normalmente para fermentações bem controladas são de 10 a 12 (v/v), (PULIGLUNDA, 2011). Todos esses controles refletem diretamente na eficiência da fermentação, sendo que o rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g de etanol/g de açúcares redutores totais (ART) consumidos (DARÉ, 2008). A amostra estudada relevou um teor de açúcares redutores totais de 0,28 %. Na prática, este valor não é observado, pois as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) (LIMA et. al., 2001). Todo o controle operacional deve ser feito interruptamente e sem alterações bruscas, para que as leveduras não sofram estresses, causando queda na viabilidade e rendimento.

Após o término da fermentação, com duração de 11h e 15min, todo o conteúdo da dorna é transferido para as centrífugas. A concentração do creme de leveduras que sai das centrífugas foi de 66,66%, sendo que este creme foi depositado nas cubas, onde é diluído em água e passou pelo tratamento ácido, para posteriormente retornar para as dornas, onde será adicionada uma nova carga de mosto para um novo ciclo fermentativo. Cerca de 90% das leveduras são reaproveitadas de uma fermentação para outra e esse processo de reciclo permanece durante todo o período da safra, se repetindo de 2 a 3 vezes por dia (MISSAWA, 2009).

De acordo com MISSAWA, 2009 após a centrifugação, o vinho (fermentado de cana sem as leveduras) é enviado para a dorna volante, de onde segue para as colunas de destilação para separação do etanol e vinhaça.

5 Conclusão

Ao final deste trabalho foi possível concluir que o termo fermentação é utilizado para definir um processo químico baseado em reações químicas na presença de enzimas sendo que a fermentação alcoólica é realizada por fungos leveduriformes, cuja fermentação é ocasionada pela presença de açúcares, principalmente glicose. Vários estudos demonstraram que todo o controle operacional deve ser feito interruptamente e sem alterações bruscas, para que as leveduras não sofram estresses, causando queda na viabilidade e rendimento.

Os resultados analíticos demonstraram uma viabilidade e teor alcóolico da amostra de vinho alta, com baixa perda em ART (Açúcares Redutores Totais). Portanto nota-se a importância dos resultados analíticos para correção no processo industrial, sendo que para cada processo fermentativo existem controles para que elas ocorram como o esperado, e estudá-los antes de iniciar qualquer tipo de fermentação, aumenta a produção seja ela industrial ou em pequenas escalas.

6 Referências

AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p

PULIGUNDLA, P.; Very high gravity (ACA), ethanolic brewing and fermentation: A research update. **Jornal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133 – 1144, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG; C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguard. **Multiciência**, Construindo a História dos Produtos Naturais, São Carlos v. 7, p. 1-16, 2006.