



Gestão da qualidade e controle microbiológico na fermentação etanólica: estudo de caso em uma usina sucroenergética

SANTOS, Elenilson Rivando^{1*}; OLIVEIRA, Talia Farias²; SILVA, Diewelly Maria¹;
SILVA, Edriane Teixeira³

¹ Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Unidade de Ensino Penedo – UFAL;

² Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões – UFAL;

³ Instituto Federal de Alagoas, Campus Maceió – IFAL;

* Autor de correspondência. E-mail: elenilsonrivando@gmail.com

RESUMO

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para a produção de etanol e a eficiência do processo fermentativo está diretamente ligada com a qualidade desta. O objetivo deste trabalho é analisar a rotina de laboratório sobre o controle de contaminação biológica que pode prejudicar a qualidade da fermentação em uma usina sucroenergética. O acompanhamento das análises microbiológicas, no mosto fermentado e no fermento tratado, foi feito diariamente e seguindo a rotina do laboratório responsável por averiguar a gestão da produção e do controle de qualidade. O estudo demonstrou que as amostras analisadas possuem características que atendem aos padrões de qualidade para a produtividade do etanol, e comprovam também que a realização dessas análises garante a manutenção do volume de fermento utilizado durante a safra, possibilitando um processo mais rentável, eficiente e que não afete a qualidade do produto desejado.

Palavras-chave: Etanol; Fermentação; Levedura; Qualidade.

Quality management and microbiological control in ethanol fermentation: case study in a sugar and ethanol-power plant

ABSTRACT

Sugarcane is the main raw material for ethanol production and the efficiency of the fermentation process is directly linked to its quality. The objective of this paper is to analyze the laboratory routine on the control of biological contamination that can impair the quality of fermentation in a sugarcane plant. The follow-up of microbiological analyzes, in fermented must and treated yeast, was made daily and following the routine of the laboratory responsible for verifying production management and quality control. The study showed that the analyzed samples have characteristics that meet the quality standards of ethanol productivity, and also prove that the performance of these analyzes ensures the maintenance of the yeast volume used during the harvest, enabling a more cost effective, efficient process that does not affect the quality of the desired product.

Keywords: Ethanol; Fermentation; Yeast; Quality.

1 Introdução

O Brasil enquadra-se como um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo e esta serve então como matéria-prima para a produção de etanol, açúcar e bioeletricidade, sendo estes produtos para uso nacional ou para exportação. A produção de etanol tem forte significância para com o meio ambiente, pois sua produção é realizada a partir de uma matéria-prima renovável além de que o biocombustível reduz parcialmente a emissão de gases na atmosfera (JANK; NAPPO, 2008). Por se tratar de um setor do agronegócio nacional os biocombustíveis acabam por ser uma solução alternativa para os combustíveis fósseis, assim como movimentam o PIB nacional (JÚNIOR *et al.*, 2012).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é a principal matéria-prima para a obtenção do etanol, que pode se dar por via sintética ou fermentativa e devido a eficiência fotossintética do vegetal, se destaca na utilização para produção de etanol. Durante esse processo fermentativo ocorrem doze reações bioquímicas enzimáticas, e para que elas aconteçam eficientemente é preciso promover um ambiente favorável para a atuação da levedura no meio reacional, por isso é importante que o mosto possua nutrientes adequados e esteja livre de infecções bacterianas. Uma vez que essa contaminação desvia o ciclo metabólico da levedura, interferindo desfavoravelmente nas etapas do processo, o rendimento final do etanol é menor do que o esperado, contribuindo também para a formação de subprodutos indesejados como o glicerol (ANTONINI, 2011).

Para verificar se os parâmetros e as condições reacionais estão favoráveis à atuação das leveduras no meio e o etanol final tenha maior qualidade, as usinas realizam análises microbiológicas com o intuito de determinar as características das cepas utilizadas, bem como verificar a existência de contaminação bacteriana que possa interferir no processo fermentativo. E assim evitar tanto a queda da viabilidade celular como o aumento do processo de floculação das leveduras (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1995).

Gerenciar um laboratório é uma tarefa complexa, pois todas as etapas de gestão precisam ser tratadas com total eficiência e segurança para que não ocorram falhas durante o processo de acompanhamento e gerenciamento de sua rotina. Mas para que isso ocorra, é necessário que as usinas saibam a importância de se ter uma gestão de controle da qualidade, que analisa todas as áreas da empresa, não apenas um setor ou departamento específico, de forma a identificar todos os possíveis indicadores da sua eficiência organizacional. A gestão da qualidade tem o objetivo de assegurar que o projeto será concluído com a qualidade desejada, ou seja, satisfazer as necessidades do cliente e os requisitos do produto (POUBEL, 2007), envolvendo todo um

processo de planejamento, controle e garantia da qualidade (ESCRIG-TENA, 2004). Uma empresa que se adequa à gestão da qualidade durante o processo produtivo acrescenta uma vantagem competitiva, que permite um melhor escoamento de seus produtos, nesse mercado cada vez mais competitivo e uma melhor resposta dos seus clientes.

Qualquer processo está sujeito a inconformidades durante a sua condução, estas podem vir oriundas de causas aleatórias ou advindas do processo, a depender da quantidade de variáveis empregadas. Nas usinas que produzem etanol, o monitoramento do comportamento fermentativo faz uso de metodologias analíticas de microbiologia, para analisar o comportamento das variáveis do processo de fermentação, mantendo então um controle mais específico referente ao processo e ao produto.

Dessa forma, a pesquisa tem como objetivo analisar o funcionamento e a organização de um laboratório microbiológico de uma usina sucroenergética, sobre o controle do processo fermentativo etanólico, visando atingir uma maior eficiência do processo e consequentemente um produto de melhor qualidade para o mercado.

2 Procedimentos metodológicos

Esta pesquisa é classificada como descritiva uma vez que são descritas as características de uma metodologia utilizada por uma indústria para manter o controle da gestão da produção e qualidade ao mesmo passo que trata-se de um estudo de caso onde são observados os fatos e fenômenos e são coletados e descritos os dados de um procedimento realizado na prática (FONSECA, 2002; GIL, 2007). A pesquisa foi realizada a partir de visitas *in loco* periódicas em uma usina sucroenergética no setor de qualidade, no laboratório de microbiologia localizada na cidade de Igreja Nova/AL, sendo realizado o acompanhamento das atividades do laboratório durante o período da safra.

A análise de contagem das células é realizada no leite tratado, que é uma solução concentrada de leveduras (Figura 1), bem como no mosto fermentado, solução açucarada que passa pelo processo de fermentação, para determinar se a fermentação alcança padrões de eficiência desejados não ocorrendo infecção bacteriológica e também se o processo de separação das leveduras e do mosto por centrifugação está sendo realizado corretamente.

Figura 1 – Solução concentrada de leveduras após tratamento com nutrientes, ácido sulfúrico e antibactericida.

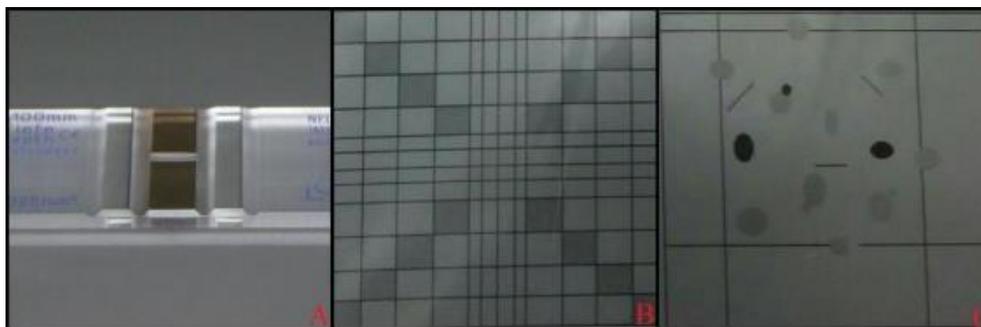


Fonte: Autores (2019).

Antes da realização da análise é feita a amostragem, que consiste em coletar a amostra diretamente das dornas de fermentação e do tanque de tratamento das leveduras. Na coleta são retirados cerca de 500 mL de cada solução sendo acondicionadas em recipientes de polietileno. Após isso, são retirados 1 mL de cada amostra e colocados em balões volumétricos de 500 mL para o leite tratado e 250 mL para o mosto fermentado, os balões têm seus volumes preenchidos até a marca de aferição com água destilada, seguida de uma breve agitação para misturar as amostras. Essa relação de diluição é feita devido ao fato de que a concentração celular nos dois meios são diferentes entre si, uma apresenta uma maior concentração, nesse caso o leite tratado e por isso precisa ser mais diluído.

Feito isso, uma alíquota de 1 mL de uma das soluções é misturada com 1 mL de solução azul de metileno, após isso 1 gota dessa mistura é colocada numa câmara de Neubauer com uma lamínula na qual são contabilizadas as células de leveduras e bactérias vivas e mortas que estão dentro de todos os 16 quadrinhos arrumados sistematicamente na câmara (Figura 2) a visualização é realizada em microscópio com lente de 40x de aumento.

Figura 2 – Câmara de Neubauer (A), quadro sistemático para contagem (B), exemplo de visualização de células durante a análise (C).



Fonte: Autores (2019).

O processo é realizado para ambas as amostras e os dados obtidos para o parâmetro de contagem de células vivas ou mortas bem como seus valores de referência são discutidos no próximo tópico.

3 Resultados e discussões

A cana-de-açúcar é uma variedade de gramínea que pertence ao gênero *Saccharum* e é propícia de climas subtropicais e tropicais. Com o seu caldo é possível produzir etanol uma vez que a sua composição é de em média 87 % caldo e 13 % fibra. Quando madura, o caldo da cana-de-açúcar tem em média 82 % de água e 18 % sólidos solúveis, destes estão presentes a glicose, frutose e sacarose, que podem ser metabolizados pela levedura com a finalidade de produzir etanol e gás carbônico (SILVA; SILVA, 2012).

3.1 Fermentação etanólica

Nas indústrias o tipo de fermentação propício para a produção de etanol é por via anaeróbica, sem que tenha oxigênio no meio reacional, pois as leveduras irão produzir cada vez mais etanol. Para alcançar o rendimento máximo da fermentação e que o substrato possa ser convertido em etanol com maior eficiência são necessários que os microrganismos estejam em um meio adequado sem que aconteça infecção bacteriológica ou por leveduras selvagens que são capazes de converter os açúcares em polímeros ou ácidos (TAVARES, 1992).

Para que a fermentação seja controlada é importante que o processo seja realizado em batelada, mas ainda assim o controle não é efetivo e por isso é necessário realizar práticas laboratoriais que acompanham as características das leveduras no decorrer da fermentação e ainda quando as células vivas saem do processo e passam por um tratamento para que sejam reutilizadas. Em um laboratório industrial de uma usina, a função das análises microbiológicas

é basicamente quantificar o percentual de células de leveduras ainda presentes no processo fermentativo assim como manter o controle microbiológico quanto a presença de bactérias como os bastonetes que são bactérias contaminantes de maior proporção na fermentação e que causem efeito negativo na fermentação etanólica. Além disso conta-se também durante a análise a quantidade de brotamentos, que nada mais é do que o fator de reprodução unicelular do microrganismo e ainda a razão de células mortas e aquelas que permanecem vivas.

3.2 Contagem das células

A contagem das células acontece assim que as amostras são preparadas para a análise e por um técnico em química ou açúcar e álcool que possua certificação técnica adequada para atuar nesta função. É importante salientar que essa análise embora tenha importância para a gestão da qualidade e de produção de etanol, pode ainda estar suscetível a erros quando o operador não possui experiência na contagem de células vivas e mortas ou ainda de bactérias que podem possuir um formato estrutural parecido com o das leveduras.

A utilização desta metodologia para o controle de qualidade referente a manutenção das leveduras do processo fermentativo faz uso do azul de metileno que serve como indicador químico devido ao fato de que o mesmo torna a solução incolor quando na presença de enzimas ativas, indicando então que a célula está viva, porém se as células permanecerem azuis diz-se que as células estão em estado inoperante, ou melhor, as enzimas da parede celular estão desnaturadas (NÁPOLES; BRANCO, 1997).

Durante a contagem das células são obedecidos alguns critérios para que esta seja realizada de forma correta, o primeiro é que tanto as leveduras quanto os brotos que estiverem coloridos de azul são considerados mortos, pois neste estado a membrana celular da levedura não consegue mais produzir proteínas que repelem o azul de metileno, neste caso a coloração é absorvida pela célula morta, já leveduras incolores, ou com uma coloração esverdeada são consideradas vivas. A contagem dos brotos só é feita se estes forem maior que 50 % do tamanho total da célula de levedura que está passando pelo processo de reprodução na fermentação aeróbica, ou seja na presença de oxigênio, e se este não estiver colorido de azul, pois assim indicaria que a célula já não conseguirá se desenvolver. Células soltas ou avulsas do tamanho do brotamento não são contadas, visto que isso pode ser indício de leveduras selvagens, oriundas da matéria-prima (CUNHA *et al.*, 2006).

Na usina onde esse estudo foi realizado não existe um padrão estabelecido para a quantidade de brotamentos, células vivas e mortas, porém quanto maior e menor, respectivamente, forem as variáveis, melhor para o processo fermentativo pois, as leveduras

empregadas na fermentação serão tratadas e utilizadas novamente na indústria, a depender da produção e da qualidade da matéria-prima utilizada. Nesse sentido a análise realizada para a microbiologia da fermentação serve para garantir as especificidades da levedura industrial que é utilizada durante a safra e apresenta relevância durante a execução da produção de etanol.

Com a contabilização das células não só de levedura como de bastonetes é possível quantificar as variáveis viabilidade (%), brotamento (%), levedura/mL e bastonete/mL que são obtidas através de cálculos em programas de gestão da própria empresa utilizando os valores já citados acima, porém tem como função determinar a concentração dos mesmos no meio fermentativo, por exemplo, a viabilidade celular deve estar entre 70 e 100 % pois assim é possível manter o meio fermentativo sempre com uma quantidade consideravelmente boa de células em bom estado para fermentar os açúcares restantes no mosto. As variáveis servem para demonstrar que a cepa de levedura utilizada durante aquela safra será capaz de produzir o etanol e assegurar o índice de produtividade da usina.

Durante o processo fermentativo pode haver a incidência de bactérias contaminantes como bastonetes, que afetam diretamente a produção de etanol pois estas não só se alimentam dos açúcares do mosto como também inviabilizam o ciclo de vida das leveduras e por causa disso a razão de infecção de uma dorna fermentativa deve estar entre 0 e 5, estando esse valor diretamente proporcional ao pH da fermentação e do mosto.

Uma das perdas na fermentação se dá na presença de bactérias, pois estas consomem o açúcar que inicialmente era destinado para a fabricação do etanol, e nesse sentido as bactérias acabam produzindo ácidos como produto após o seu ciclo metabólico (NARENDRANATH *et al.*, 1997). A perda de produtividade começa a ser significativa quando a contaminação de bastonetes ultrapassa $1,0 \times 10^7$ bastonetes/mL (AMORIM *et al.*, 1981).

Ao produzirem ácidos orgânicos as bactérias fazem com que o pH do meio fermentativo caia e como consequência os íons hidrônio começam a atacar a membrana das leveduras o que acarreta em um índice de mortalidade elevado por conta dessa intoxicação. A contaminação bacteriana é um dos problemas que impactam diretamente a produtividade e o rendimento final da fermentação pois, além de contribuir com uma maior porcentagem de células mortas ajuda na degradação da sacarose por conta da produção dos ácidos orgânicos (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

As leveduras são separadas do mosto após a fermentação por centrifugas industriais. O processo de fermentação na empresa onde o estudo foi realizado é executado em batelada, e o fermento industrial é separado em 12 partes com volumes iguais para 10 dornas de fermentação,

enquanto que duas partes restantes são tratados em cubas de tratamento, aguardando o momento para ser utilizado em uma dorna de fermentação.

O fermento é analisado diariamente e por isso todos os resultados das análises de microbiologia ofertam influência na tomada de decisão sobre medidas que podem ser realizadas para aumentar a produtividade. Quando os valores de bastonetes/mL apresentam valores acima da quantidade recomendada ocorre um aumento na dosagem de ácidos para o tratamento do fermento facilitando a diminuição do pH do meio ou ainda é feita a dosagem de antibióticos para eliminar a infecção bacteriológica e diminuir a quantidade de bastonetes por mL de solução.

Ainda durante a fermentação, a depender da matéria-prima e das características do solo onde a cana-de-açúcar é produzida pode-se haver a incidência de leveduras selvagens que acompanham o caldo extraído. As leveduras selvagens causam problemas durante a fermentação uma vez que consomem o substrato açucarado e também excretam substâncias que muitas vezes podem ser nocivas para a *Saccharomyces cerevisiae*. Em um ambiente competitivo as leveduras naturais da matéria-prima saem na frente e causam todo esse desvio metabólico que conseqüentemente diminui a produtividade. Um dos indicativos visuais da presença não só de bastonetes, mas também de leveduras selvagens é a floculação que causa a formação de uma espuma esbranquiçada no mosto.

A floculação prematura das células devido à presença de leveduras selvagens causa a diminuição do tempo em que estas passam tendo contato com o mosto, reduzindo expressamente o rendimento da fermentação etanólica e impossibilita a manutenção do processo bem como causa perdas no volume total de fermento disponível para metabolizar os açúcares (AMORIM; LEÃO, 2005). O processo de floculação é caracterizado pela adesão entre as células de leveduras, o que acaba formando pequenos aglomerados que sedimentam no fundo do tanque fermentativo sendo que as leveduras anteriormente são encontradas em suspensão (SATO *et al.*, 2001). As principais causas do fenômeno de floculação são a diminuição dos nutrientes no meio, presença de corpos estranhos, pH, temperatura e oxigênio que causam estresse e alteram a composição da parede celular da levedura (VERSTREPEN *et al.*, 2003).

Com a floculação surge outro problema que é o aparecimento de espuma na dorna de fermentação, o que também afeta negativamente no rendimento do processo produtivo já que a dorna passa a ser ocupada pela espuma e isso faz com que não aconteça o brotamento de novas células. Quando a fermentação chega em sua fase exponencial ocorre a produção de espuma (SHIMOI *et al.*, 2002). A Figura 3 apresenta o fermento com espuma durante o tratamento.

Figura 3 – Formação de espuma devido a flocculação das leveduras.



Fonte: Autores (2019).

A usina onde o estudo foi realizado não produz somente etanol e por conta disso não possui mais perdas de açúcar e rendimento durante a fermentação uma vez que cerca de 90 % da vazão volumétrica do caldo extraído é destinado para a fabricação de açúcar e somente os méis ricos e pobres que são resíduos do processo são utilizados na fabricação de etanol uma vez que estes possuem concentrações de glicose e frutose e estes açúcares não cristalizam.

O controle de qualidade é, para a empresa, uma ferramenta de orientação cuja finalidade é assegurar que o processo possa ser acompanhado durante a fabricação e a partir disso avaliar possíveis problemas. A não inspeção de parâmetros de qualidade pode acarretar em perdas de produtividade e financeiras, contribuindo para o decaimento da confiabilidade comercial da empresa. Através da inserção de novas tecnologias para a malha industrial e também as análises microbiológicas é possível aumentar o rendimento fermentativo para valores em média 90 % que antes em meados da década de 1970 possuía um rendimento entre 75 % e 80 % (AMORIM; LEÃO, 2005; ALVES; BARROS, 2011).

4 Considerações finais

Para fazer com que um processo produtivo detenha alto rendimento e um produto com qualidade é imprescindível que este esteja intimamente ligado à qualidade da matéria-prima e demais insumos utilizados. Sendo assim, as leveduras empregadas na fermentação etanólica precisam estar em condições favoráveis para que estas possam desempenhar suas funções metabólicas e produzam o etanol com a maior eficiência possível.

As atividades laboratoriais oriundas da microbiologia são de extrema importância pois promove a determinação de indicadores de qualidade e produção que servem para determinar o rendimento produtivo de etanol.

A realização destas análises durante a produção do etanol serve para averiguar a qualidade da matéria-prima usada, a eficiência do processo fermentativo e a obtenção de um produto melhor e mais rentável no mercado. Mas para que isso ocorra é necessário que se faça um acompanhamento das etapas envolvidas desde a entrada da matéria-prima até a saída do produto desejado, de forma a identificar as possíveis falhas, corrigir as deficiências e aprimorar a produção, contudo sem uma gestão de controle de qualidade adequada, ficará difícil obter um produto de melhor excelência para ser ofertado nesse mercado cada vez mais competitivo.

Referências bibliográficas

ALVES, L. R. A.; BARROS, M. B.; **Ganhos Econômicos da Eficiência Industrial de Destilarias de Álcool que Receberam Consultoria: o Caso de Empresas Atendidas pela Fermentec Ltda.** Informe Gepec, Toledo, v. 15, n. 2, p. 36-58, jul./dez. 2011.

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

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil, 2. Rio de Janeiro, 1981. **Anais...** Piraciaba: Stab. P. 158-168. 1981.

ANTONINI, S. R. C. **Microbiologia da Fermentação Alcoólica.** Coleção UAB – UFSCAR, 2011.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. A. D. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** 2009. 177 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

CUNHA, A. F.; MASSWA, S. K.; GOMES, L.H.; REIS, S. F; PEREIRA, G. A. G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial etanol production, **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 280-287, 2006.

ESCRIG-TENA, A. TQM as a competitive factor: a theoretical and empirical analysis, **International Journal of Quality & Reliability Management**, v. 21, n° 6/7, pp. 612-637, 2004.

FONSECA, J. J. S. **Metodologia da pesquisa científica.** Fortaleza: UEC, 2002. Apostila.

GIL, A. C. **Métodos e Técnicas de Pesquisa Social.** 5 ed. São Paulo: Atlas, 2007.

JANK, M. S.; NAPPO, M. **Etanol de cana-de-açúcar: uma solução energética global sob ataque.** São Paulo: Senac, 2008.

JÚNIOR, B. C. A.; ABRANTES, A. L.; GOMES, P. A.; GONÇALVES, L. M. R. Eficiência produtiva e análise econômica e financeira de usinas de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo. **Revista Ambiente Contábil.** Natal, v.4 n.2, p. 74-92, 2012.

NÁPOLES, A. M. de; BRANCO, M. do C. **Técnicas Laboratoriais de Biologia.** Ed. Didáctica, 1997.

NARENDRANATH, N. V.; HYNWA, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast- catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4158-4163, Nov. 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evolution of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, n. 6, p.697-699, 1994.

POUBEL, C. **A gestão da qualidade e sua importância em projetos**. Revista Techoje, Belo Horizonte, fevereiro, 2007.

SATO, M.; WATARI, J. & SHINOTSUKA. Genetic instability in flocculation of bottom- fermenting yeast, **Journal of the Society of Brewing Chemists**, v59, n.3, p. 130-134, 2001.

SHIMOI, H.; SAKAMOTO, K.; OKUDA, M.; ATTHI, R.; IWASHITA, K.; ITO, K. The AWAI gene is required for the foam-formation phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 2018-2025, 2002.

SILVA, J. P. N. da.; SILVA, R. N. da. **Noções da cultura da cana-de-açúcar**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012, 105 p.: il.; 21.

TAVARES, F. C. A. **Processo de controle seletivo leveduras contaminantes – STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**. 5p. 34-39, 1992.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G; VERACHTERT, H. Yeast flocculation: what brewers should know, **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 61, p. 197-205, 2003.