

# Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda.

**Maria da Graça S. Andrietta, Cláudia Steckelberg e Sílvia Roberto Andrietta**

Divisão de Biotecnologia e Processos  
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)  
Universidade de Campinas  
CP 6171, CEP 13081-970 – Campinas – SP  
[stupiello@cpqba.unicamp.br](mailto:stupiello@cpqba.unicamp.br)

## Resumo

A história da planta cana-de-açúcar e da produção do açúcar se confunde com próprio descobrimento do Brasil. Existem relatos da produção de açúcar que datam de 1532, quando os portugueses trouxeram as primeiras mudas dessa planta para o Brasil.

O Brasil, que sempre se destacou como produtor de açúcar, ocupa também um lugar de evidência como o primeiro país a produzir e fazer uso de um biocombustível na sua frota de automóveis. Esse advento é consequência da implantação de um programa que já completou 30 anos, o Proálcool (Programa Nacional do Álcool). A crise do petróleo nos anos 70 motivou o governo a desenvolver uma forma alternativa de substituir a gasolina. Nasceu então o bioetanol, um combustível obtido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, melaço ou ambos. Incentivos foram oferecidos aos investidores do setor. Novas unidades que produziam exclusivamente etanol foram implantadas. Nos anos 80, 85% dos carros eram movidos exclusivamente a álcool. A produção de etanol daquela década chegou a superar a produção de açúcar pelas usinas. As unidades instaladas atingiram, naquele período, capacidade para produzir 18 bilhões de litros de bioetanol por safra, volume este equivalente a 100 milhões de barris de gasolina. O processo de fermentação que até então se restringia à fabricação da aguardente ou do etanol como subproduto da fabricação do açúcar passa a ocupar um lugar de destaque no cenário empresarial. Em função disso, processos envolvendo conceitos de engenharia surgiram e o entendimento dos fenômenos biológicos que envolvem a fermentação foi em grande parte entendido. O programa como estratégia de abastecimento energético fracassou nos anos 80, mas o conhecimento acumulado e as unidades instaladas persistiram.

**Palavras chaves:** Bioetanol, combustível renovável, fermentação alcoólica, levedura, Proálcool.

## **Introdução**

O fornecimento da energia sustentável é fundamental não apenas para o desenvolvimento econômico das nações, mas também para assegurar o bem estar do cidadão (1).

As reservas de petróleo, segundo previsões, serão suficientes para atender a demanda de consumo desse combustível fóssil por não mais que 40 anos. Entretanto, existe uma preocupação imediata quanto ao cumprimento do Protocolo de Kyoto. Por esse acordo, as nações desenvolvidas devem diminuir em 5% as emissões de dióxido de carbono proveniente da queima do petróleo.

Ironicamente, no ano em que o Brasil se torna auto-suficiente em petróleo, o mundo escuta o pronunciamento aonde o presidente George W. Bush admitiu que o programa brasileiro de utilização do etanol como combustível é um exemplo a ser seguido.

O Brasil quando criou o Proálcool (Programa Nacional do Álcool) nos anos 70 não tinha a dimensão do impacto desse programa no século XXI. O governo brasileiro após a primeira crise do petróleo em 1973 decidiu criar esse programa com o objetivo de produzir um combustível alternativo que substituísse a gasolina para uso carburante. O Brasil já contava com uma matéria prima adequada para esse fim, a cana-de-açúcar. O aumento de área de plantio e incentivos para instalações de destilarias autônomas foram fortemente estimulados, na forma de financiamento, pelo programas de governo. O Brasil passou a contar com inúmeras novas destilarias produtoras do bioetanol. A frota de veículos leves passa a ser quase que exclusivamente movida a etanol.

As instituições de pesquisas, que já tradicionalmente dedicavam suas pesquisas ao setor sucroalcooleiro, reforçaram suas atividades no sentido de um maior entendimento no que se refere aos fenômenos que ocorrem na fermentação alcoólica. As pesquisas focadas tanto na área agrícola como industriais fomentaram informações esclarecedoras para o universo da cana-de-açúcar.

Esse artigo se propõe a reunir parte do conhecimento acumulado nesses 30 anos pelo Proálcool, no que diz respeito à biotecnologia da produção do etanol.

## **Matéria prima**

O caldo da cana, que apresenta rendimento perto de 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar, é até o presente momento a única matéria prima utilizada em escala industrial para a produção do etanol no Brasil. A grandiosidade do território brasileiro permite que o Brasil seja o maior produtor dessa cultura, utilizando apenas 2,4% da área

agricultável do solo brasileiro. Existem ainda pelo menos 100 milhões de terras cultiváveis no Brasil, sem que haja o comprometimento com a devastação do meio ambiente.

Estudiosos do setor acreditam que a queda do custo da matéria prima é a forma mais significativa de baixar o custo de produção do açúcar e do álcool. O Brasil tem feito um programa extenso visando à diminuição do custo da cana-de-açúcar. Prova disso é que os ganhos alcançados em produtividade da cana-de-açúcar (açúcar por hectare) foram de 1,5% ao ano nos últimos 54 anos, aumento esse associado a dois principais fatores: o melhoramento das variedades e o manejo dos canaviais (2).

Embora os Estados Unidos da América em 2006 tenham sido apontados como os maiores produtores de etanol no mundo, produzindo 4265 milhões de galões de etanol contra 4227 produzidos no mesmo período no Brasil, a utilização da cana-de-açúcar como substrato faz com que o custo de produção por litro de etanol brasileiro seja consideravelmente inferior ao obtido pelos americanos. Esse fenômeno é facilmente explicável. Enquanto as 97 plantas instaladas naquele país processam principalmente o milho, matéria prima que necessita de um processo de hidrólise para obtenção dos açúcares fermentecíveis, a cana-de-açúcar possui os açúcares já na forma disponível para a levedura fermentá-lo. O custo de produção do etanol brasileiro é de US\$ 0,17/L contra US\$ 0,32/L para esse combustível produzido pelos Estados Unidos da América (3).

Nos dias de hoje, a fermentação exclusivamente do caldo de cana não é uma prática observada nas unidades industriais. Quando da implantação do Proálcool muitas unidades fermentavam apenas o caldo. Atualmente nenhuma dessas unidades fermenta exclusivamente o caldo de cana natural; essas denominadas destilarias autônomas, migraram para usinas produtoras de açúcar. Agora, o que elas fermentam não se restringe ao caldo da cana-de-açúcar, mas sim o que obtêm como subproduto da cristalização da sacarose do caldo, isto é o melaço. Trata-se do produto ideal para a fermentação, uma vez que, além de conter em média 90% de Brix sendo 60% de açúcares redutores, possui outros elementos necessários para que a fermentação ocorra sem a adição de nutrientes. Vários são fatores que influenciam na composição do melaço ou mel final, destacando-se entre eles a natureza da matéria prima, a qualidade da cana processada, os métodos da fabricação do açúcar, o tempo de armazenamento e as regiões de plantio. Com tantas variáveis agindo individual ou conjuntamente, não há possibilidade de aplicação de números médios para a composição desse substrato (4).

Embora o substrato melaço seja em tese ideal para a produção de etanol, existem alguns problemas de fermentação associados ao melaço utilizado. Muitas vezes as unidades enviam para a fermentação melaço com alto grau de esgotamento, isto é, o caldo na fábrica de açúcar foi exaustivamente processado de forma a se retirar toda a sacarose passível de ser extraída. Esse tipo de melaço apresenta-se de qualidade inferior, quando comparado aos demais, para a prática da fermentação. No sentido de aumentar o período de safra nas usinas a área agrícola tem lançado mão da utilização de maturadores na lavoura da cana-de-açúcar. Embora não existam dados suficientes para afirmações em relação à influência desse produto na fermentação, existe um forte indicativo de que essa prática interfere negativamente no desempenho do processo.

Tosetto (5) analisou a composição de mel final de 10 unidades produtoras de etanol instaladas em 4 regiões brasileiras. Conduziu fermentações em escala de laboratório com meio de cultivo preparado com esse material. Os dados apresentados mostram variações significativas. A acidez sulfúrica (g/L) variou entre 4,98 e 11,76; o Brix entre 72,0 e 88,2; o ART (g/L) 439,5 e 725,2 e a pureza entre 46,6 e 65,16. O diferente desempenho fermentativo de uma linhagem comercial de *S. cerevisiae* frente aos diferentes méis também foi constatado nessa pesquisa. O trabalho conclui que não é apenas o nível de esgotamento do mel que determina a qualidade da fermentação, uma vez que méis com maiores purezas nem sempre obtiveram os melhores resultados quanto ao desempenho fermentativo. O trabalho sugere que a infestação de broca na cultura da cana-de-açúcar promove como resposta de defesa da planta, a produção de compostos fenólicos. Esses, que são prejudiciais à levedura, são carregados para o processo e passam a ser um composto presente no mel e que será enviado para o processo de fermentação.

### **Microbiologia da fermentação alcoólica**

O processo de produção de etanol difere drasticamente de outras fermentações industriais. Existem duas peculiaridades no que se refere a esse tipo de fermentação. A primeira refere-se ao substrato; o mosto a ser fermentado não sofre nenhum tratamento no sentido de eliminar a microbiota do caldo de cana-de-açúcar. A outra particularidade diz respeito ao número de ciclos da fermentação. No início da safra se realiza uma propagação da levedura a qual se pretende manter no processo. Essa levedura passa a ser reutilizada pelo tempo de duração da safra. A reutilização é feita utilizando-se

máquinas centrífugas, que separam as células de leveduras do caldo fermentado retornando-as para o processo depois de um tratamento ácido. A manutenção do número de células em processo assim como a vitalidade das mesmas é feita de forma natural. As leveduras se reproduzem dentro das dornas em fermentação substituindo as que morrem dentro do processo. A levedura morta sofre uma lise celular, sendo esse material substrato protéico das leveduras ativas.

Hoje se tem conhecimento que a levedura propagada no início da safra é rapidamente substituída por uma levedura nativa, isto é, que habita o ambiente da cana-de-açúcar e é introduzida no processo. Essa substituição não é perceptível. Apenas depois do advento da biologia molecular é que essa substituição foi registrada.

### **As leveduras**

*Saccharomyces* é o gênero de levedura largamente utilizada na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o álcool, seja para uso carburante ou para obtenção de bebidas alcoólicas. Os fatores que consagram esse microrganismo como o mais indicado para esse fim resulta do fato desse fungo reunir os atributos desejados para a condução de um processo de produção de álcool. Capacidade de: rapidamente transformar açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido são os principais atributos desejáveis para uma cepa de uso industrial. Todos esses atributos se encontram reunidos por representantes do gênero *Saccharomyces*.

Esse gênero *Saccharomyces* é sem sombra de dúvida um dos grupos de microrganismos mais estudados pela comunidade científica. Esse interesse é função da ampla aplicação desses microrganismos na indústria de biotecnologia. Essa levedura tem sido relatada como agente de transformação desde 1800. Entre os principais atributos elencados a esse microrganismo estão: produção de bebidas, CO<sub>2</sub> para a indústria de panificação, enzimas entre outros. Em função do amplo conhecimento dessas leveduras, inúmeras espécies, no passado, foram descritas dentro do gênero *Saccharomyces*. Os cientistas, por falta de técnicas sofisticadas de identificação de microrganismos, descreviam leveduras já classificadas anteriormente como espécies novas e designavam nomes relacionados com nomes regionais (6). Com o advento da biologia molecular postulou-se que isolados que apresentam de 80 a 100% de homologia na seqüência de bases, são considerados da mesma espécie. Baseado neste conceito, o gênero *Saccharomyces* passa a contar com apenas 10 espécies (6).

A cana-de-açúcar sadia carrega níveis de  $10^3$  a  $10^4$  de fungo por grama de planta (7). Trabalhos mostram a presença de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (8) nessa matéria prima. As leveduras habitantes naturais do caldo são potencialmente as candidatas a dominarem a biomassa das dornas de produção de bioetanol. Considerando a forma de obtenção do inóculo utilizado na fermentação da cachaça, pode-se elucidar como as leveduras nativas são capazes de povoarem as dornas de fermentação do álcool. Naquela fermentação não existe a introdução de um inóculo no início das atividades de produção da bebida. Ele é produzido de forma artesanal. É feita uma mistura de milho, suco de limão arroz e amido. Essa mistura sofre uma fermentação espontânea com duração entre 12 e 24 horas. Caldo de cana é adicionado ao fermentado até que seja observada a produção de  $\text{CO}_2$ . Essa produção indica que as linhagens de leveduras nativas estão presentes nesse caldo e que serão as responsáveis pela produção da bebida durante a safra (9). A linhagem de levedura predominante nos inóculos de unidades produtoras de cachaça é a de *S. cerevisiae* (10). Alguns autores relatam o isolamento de outras linhagens, diferente de *S. cerevisiae*, de leveduras de dornas de fermentação. Leveduras como *Rhodotorula glutinis*, *Candida maltosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cândida valida*, *Cândida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. exiguus*, *S. unisporus*, *S. paradoxus* têm sido relatadas como isolados de destilarias de produção de cachaça (10,11). A incidência de leveduras não *Saccharomyces* nos processos de produção de cachaça é comum, uma vez que nem sempre os teores alcoólicos nesse tipo de fermentação é tão alto que selecionem apenas linhagens de *Saccharomyces*. No caso da fermentação para obtenção do etanol carburante, a permanência de linhagens não *Saccharomyces* em condições normais de processo é praticamente impossível, uma vez que os teores alcoólicos nas dornas desse tipo de fermentação não permitem a sobrevivência de linhagens não *Saccharomyces*. Trabalho realizado (12) em uma destilaria brasileira, produtora de álcool carburante, constatou a presença de uma flora de levedura diversificada nas amostras de caldo e mosto da cana-de-açúcar. Isolados pertencentes os gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis* e *Rhodotorula* foram encontradas nessas amostras. Quando esse mesmo levantamento foi feito em amostra do fermento tratado o gênero *Saccharomyces* representou 88% dos isolados. Os 12% restantes são pertencentes ao gênero *Candida*. A presença desse microrganismo não é esperada nessa fase do processo; entretanto, como essa levedura é uma habitante da matéria prima, é explicável a sua presença em baixas concentrações na amostra.

## **Leveduras utilizadas nas partidas de fermentação**

A maioria das unidades até meados dos anos 90 tradicionalmente iniciava a safra com toneladas de levedura oriunda da indústria de panificação. Essa estratégia permite uma partida rápida e mais segura minimizando possíveis problemas de acidentes fermentativos. A partir dos anos 90, constatou-se que as leveduras utilizadas como inóculo são completamente substituídas por leveduras nativas ainda no início da safra. Constatou-se ainda que a única levedura que tem a capacidade de permanecer no processo é aquela isolada da mesma unidade em safras anteriores. (13)

A partir dessa constatação, as usinas começaram a propagar a sua própria levedura para o início da safra. As unidades se equiparam de modo a serem aptas a realizarem a propagação de sua própria levedura nativa para o início da fermentação. Parte dessas unidades realiza uma análise de cariotipagem para constatar a permanência dessa linhagem nas dornas de fermentação durante a safra. Os resultados confirmam o esperado, isto é, quando as leveduras utilizadas como inóculo são as isoladas da própria unidade, essas dominam o processo até o final do período da safra.

Esse trabalho já tinha sido intuitivamente realizado pelo prof. Jayme Rocha de Almeida (1905 – 1964) então professor do Instituto Zimotécnico da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – ESALQ – USP. Nos meados dos anos 50 em uma de suas visitas a uma indústria, o prof. Jayme de Almeida obteve uma levedura eficiente, que serviu de base para inúmeros trabalhos de pesquisa: “Naquela ocasião, ele colocou a mão numa dorna em que fermentava uma levedura importada, de boa qualidade e, em seguida, limpou-a no lenço. Mais tarde, no laboratório, retirou cuidadosamente e o isolou”. Do isolamento foram obtidas duas linhagens de leveduras, denominadas IZ 1830 e IZ-1940 (14).

A partir desse isolamento a levedura IZ 1940 era distribuída para as usinas para início das safras. A dificuldade na obtenção de grandes volumes desse fermento desestimulou as usinas a fazer uso desse fermento passando a utilizar fermento de panificação para a partida da planta. O que o prof. Jaime não imaginou é que, na verdade, essa levedura não se tratava mais da levedura importada mais sim uma levedura nativa, a qual foi introduzida de forma silenciosa no processo em substituição à importada.

Atualmente existe o fornecimento por unidades produtoras de biomassa, de grandes volumes de leveduras previamente isoladas de unidades brasileiras durante o período da safra. Essas leveduras foram isoladas do próprio processo, sendo assim consideradas

nativas. Essas são utilizadas como inóculo tanto para as unidades das quais foram isoladas como para outras unidades. Algumas linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de processos de fermentação alcoólica são largamente utilizadas como inóculo para início das safras brasileiras. Essas foram nomeadas com as iniciais das unidades de origem, dessa forma tem-se disponíveis BG 1 (Usina Barra Grande), CR1 (Usina Cresciumal), SA -1 (Usina Santa Adélia), CAT -1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra) CL (Usina Clealco), entre outras. Embora a utilização de leveduras selecionadas seja uma alternativa viável para o início da safra, fazer uso de leveduras provenientes do próprio processo é a expectativa para o futuro das usinas brasileiras. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de produção de álcool está relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo (15).

Existem inúmeros trabalhos originários no Brasil, os quais se dedicam ao conhecimento das características das leveduras nativas. Embora a cariotipagem, a qual é uma análise de origem molecular, contribua significativamente para o conhecimento das diferentes linhagens de leveduras nativas distribuídas pelo ambiente de dornas brasileiras, as informações provenientes dessa análise, mesmo que de extrema importância, se restringem ao conhecimento do número e peso molecular dos cromossomos que constituem o genoma da levedura. O conhecimento das características quanto ao potencial fermentativo da levedura é a informação mais importante para a condução do processo de fermentação. Andrietta (16) propõe um método de caracterização de leveduras utilizando as características cinéticas de cepas de leveduras. Com esses testes se torna possível conhecer o potencial quanto à capacidade de fermentação de linhagens de processo. Steckelberg (17) reuniu algumas das técnicas disponíveis para avaliação de leveduras e estudou leveduras isoladas de 19 destilarias brasileiras. Todas as leveduras apesar de serem pertencentes ao gênero *Saccharomyces* e, portanto, com características adequadas para serem utilizadas para os processos de produção de etanol, reuniram atributos distintos quanto à composição celular (teores de trealose, proteínas, aminoácidos e ácidos graxos).

Em algumas unidades é possível encontrar um processo que opera em condições de floculação. Até bem pouco tempo acreditava-se que a floculação ocorria exclusivamente quando da presença de algum tipo de bactéria nas dornas. Hoje se conhece algumas linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* que apresentam propriedade de floculação. Essas linhagens apresentam em sua composição genômica, genes que expressam proteínas conhecidas como floculinas que permitem que essas

leveduras cresçam de forma floculada(18)O maior inconveniente da presença dessas leveduras nas dornas não se refere à capacidade de conversão do açúcar em álcool, mas sim, na dificuldade da operacionalidade do processo. Existe uma problemática de operação das centrífugas quando o mosto não se apresenta de forma homogênea, característica essa encontrada em fermentação quando floculada.

As linhagens de levedura floculante apresentam o mesmo desempenho fermentativo quando comparadas às linhagens de *Saccharomyces* que não apresentam essa propriedade. Essa propriedade de floculação de algumas leveduras tem sido utilizada de forma a sugerir novos conceitos de design de processos fermentativos (19,20,21,22). Nesse caso a levedura é separada do vinho fermentado por outro meio que não a centrifugação. Essa estratégia de operação, isto é, a ausência da centrífuga permite uma instalação de um processo com custo reduzido.

### **As bactérias contaminantes**

As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado sadio trabalha com níveis de bactérias nunca menores que  $10^5$  células/ml.

A procedência dessas é a mesma das leveduras nativas, isto é, a matéria prima. As fontes de contaminação incluem: a cana-de-açúcar, as práticas agrícolas, industrialização, extração, equipamentos (23). Entretanto a presença dessas no processo, diferindo das leveduras nativas, nunca é benéfica para a fermentação.

As bactérias que habitam a matéria prima não estão restritas a determinados grupos de microrganismos, considerando-se que o caldo de cana é um meio de cultivo extremamente rico no que se refere à disponibilidade de nutrientes, sem que haja nenhum fator de limitação para o crescimento de maioria de microrganismos mesófilos. Já foram descritas como bactérias presentes em amostras provenientes de usina de açúcar *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Microrcoccus*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *A. cloacae*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, entre outras (24,25,26). Entretanto as bactérias do ácido lático, por serem os microrganismos mais relacionados com o substrato caldo de cana-de-açúcar, estão sempre presentes em trabalhos que se propõem a isolar microrganismos habitantes de processo de produção de açúcar e álcool. Entre as bactérias do ácido lático, o gênero *Leuconostoc* tem um papel importante como contaminante, principalmente na produção do açúcar. Essa bactéria utiliza o açúcar do caldo para a produção de goma.

A presença da goma no processo além de contribuir para a queda do rendimento provoca problemas na etapa da cristalização da sacarose. A presença de *Leuconostoc mesenteroides* promove o aumento da viscosidade o que, além de dificultar a recuperação da sacarose, aumenta a presença desse açúcar no melaço (27). Outros microrganismos como *Klesbsiella* e *Acetobacter* formam goma sendo também citados como habitantes das linhas de caldo (28).

Apesar da diversidade da microbiota existente no caldo, nem toda essa flora consegue sobreviver às barreiras químicas e físicas que a matéria prima sofre dentro da fábrica. Sendo assim, as condições de cada etapa do processo de produção de álcool, selecionarão o desenvolvimento de certos microrganismos (29).

Embora o caldo ou o melaço diluído sejam um excelente meio de cultivo para a grande maioria dos microrganismos se desenvolverem, quando esses substratos passam a fazer parte do processo de fermentação suas características são completamente modificadas. Os microrganismos habitantes do mesmo, que se beneficiavam de todas as propriedades não restritivas desse substrato, encontram na dorna de fermentação um ambiente hostil. Nesse novo ambiente, os microrganismos contaminantes além de competir com a levedura de processo têm que apresentar características que lhes permitam crescer em condições de altos teores alcoólicos e alta acidez. São alguns representantes dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* que reúnem as características que os colocam como os principais contaminantes do ambiente fermentativo. Gallo (29) trabalhou em um extenso levantamento da microbiota predominante de amostras de todo o ambiente fermentativo. Os resultados obtidos revelaram que 98,52% das bactérias isoladas eram pertencentes ao grupo das Gram<sup>+</sup>. O gênero *Lactobacillus* foi o mais freqüente (59,75%) entre eles: *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. animalis*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, *L. vitulinus*, *L. viridences*, *L. amylophilus*, *L. agilis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. murinus*, *L. coryniformis*, *L. sake*. Entre os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, que representaram 26,58% do total de isolados foram isolados: *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. lentus* e *B. pasteurii*. Outros trabalhos (30,31,32,33) de levantamento da microbiota de processos fermentativos confirmam os resultados obtidos por Gallo.

Existem controvérsias no que se refere ao prejuízo que essas bactérias causam ao processo. Tilbury (34) acredita que 62% das perdas do açúcar da indústria estão associados aos microrganismos contaminantes. A literatura mostra números discrepantes quando se trata de perda de rendimento pela presença de bactérias nas

dornas de fermentação. Valores que variam de 15 (35) a 55% (36) de perdas em rendimento em função da presença de bactérias contaminantes estão disponíveis em artigos científicos.

O consumo de açúcar por bactérias relevantes na fermentação foi estudado por Stroppa (37). Os resultados mostram que pequena quantidade de açúcar permite o aumento significativo da população de bactérias. *Lactobacillus plantarum* utilizou 3,30g de glicose, em meio de cultivo sem qualquer inibidor, para crescer 3,5 ciclos logarítmicos em um período de 24 horas. Sendo assim, se faz necessário realizar estudos complementares para afirmar o quanto de açúcar um contaminante consome quando cultivado em ambientes de dorna de fermentação.

Talvez o maior problema relativo aos altos níveis de contaminação nas dornas sejam os problemas operacionais que o produto do metabolismo de certas bactérias cause ao processo. A floculação do fermento é o mais sério deles. A falta de homogeneidade do vinho fermentado faz com que a centrifuga não opere de forma eficiente provocando sérios danos ao processo.

Hoje já se tem muito bem elucidado que a floculação do fermento é causada não pela quantidade de bactérias presentes na dorna, mas sim pela presença de determinadas espécies de lactobacilos. *Lactobacillus fermentum* foi a primeira bactéria a ser citada como causadora de problemas de floculação. Hoje se sabe que *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* estão associadas à presença desse fenômeno. Não só a presença dessas bactérias no processo desencadeia a floculação das leveduras. Existe a necessidade de uma relação bactéria levedura para que a floculação ocorra, sendo essa relação diferente para as diferentes espécies de *Lactobacillus*. (38)

### **Os processos de fermentação alcoólica nas destilarias brasileiras**

A evolução da fermentação alcoólica segue a tendência de qualquer outro processo industrial, isto é, a implantação de processos contínuos. Esse tipo de processo traz como vantagens a modernização da usina, aumento da produção, redução de tempos não produtivos (carga, descarga, limpeza), condução da fermentação em estado estacionário, redução de insumos, uniformidade do produto e maior controle do processo (39).

A modernização das plantas brasileiras, isto é, a migração das plantas de batelada para contínua ocorre de forma lenta nas indústrias brasileiras. Acredita-se que no Brasil 70% das destilarias instaladas ainda utilizem o processo do tipo batelada (40). A explicação do atraso reside no fato de que, no auge do Proálcool, as primeiras plantas contínuas

instaladas foram fruto de adaptações de baixo custo de plantas de batelada já existentes (41). Essas adaptações foram feitas de uma forma empírica, o que resultou muitas vezes em processos problemáticos. Isto desencorajou e desencoraja até hoje o setor, no que diz respeito à implantação de plantas que operem de forma contínua. O processo como qualquer outro processo moderno exige um projeto de engenharia para sua concepção. Andrietta estudou, utilizando modelagem matemática e simulação, um processo de fermentação que opera de forma contínua. O modelo preconizado por esse autor inclui a instalação de quatro reatores de mistura perfeita ligados em série, com a seguinte distribuição de volume em relação ao volume total de reator: 20,96% para o reator 1, 26,72% para o reator 2, 31,56% para o reator 3 e 20,76% para o reator 4 (42). Esse processo é apenas um entre outros que foram desenvolvidos no Brasil. Sendo assim, a implantação dos processos contínuos, não se trata de domínio de tecnologia, mas sim de quebra de paradigma.

### **Considerações finais**

O conhecimento adquirido nesses 30 anos de implantação do Proálcool coloca o país como pioneiro na produção e utilização de um combustível limpo. O Brasil merece lugar de destaque no cenário mundial. Ele tem sido apontado como um exemplo a ser seguido, pelas inúmeras delegações internacionais que visitam o Brasil em busca de informações técnicas e científicas. O Brasil transformou o álcool em uma commodity de energia e do meio ambiente.

O desejo atual é que o governo brasileiro regule os preços praticados para esse produto, tranquilizando os produtores e consumidores desse biocombustível.

### **Referencias Bibliográfica**

- 1- World Health Organization – Ecosystems and human well-being – Summary for decision –makers – 2006
- 2- Hoffman, H.P., Fancelli, A.L., Matsuoka, S. Masuda, Y. Contribuição de variedades melhoradas de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, nos últimos cinqüentas anos. In: 7º Congresso Nacional da STAB. 227-231, Londrina, PR 1999.
- 3- Hennige, O., Zeddies, J. Uma comparação da produção do álcool nos EUA e na Alemanha. In: Jornal Cana, Ribeirão Preto matéria 12335, 2004

- 4- COPERSUCAR, Fermentação – Centro de Tecnologia Copersucar – Divisão Industrial, CTDI – 1987.
- 5- Tosseto, G. M., Influencia da matéria prima no comportamento cinético de leveduras na produção de etanol. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Brasil, 2002
- 6- Barnett – The taxonomy of genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists, **Yeast** 8 :1-23, 1992
- 7- Ducan, C.L., Colmer, A.R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Ap. Microb.** 12 (2): 173-177, 1964.
- 8- Bevan, D., Bond J. Micro-organism in field and mill – A preliminary survey. In: QUEENSLAND SOC. SUGAR CANE TECH. CONFERENCE, 38., Proceedings.p 137-143..
- 9- Vicente, V.A., Fietto, L.G., Castro, I.M., Santos, A.N.G., Coutrim, M.X., Brandão, R.L., Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirits. **Int. J. Food Microbiology** 108 : 51-59. 2006.
- 10- Schwan, R.F., Mendonça, A.T., Silva, J.J.J., Rodrigues, V., Wheals, A.E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek** 79: 89-96, 2001.
- 11- Pataro, C., Guerra, J.B., Petrillo-Peixoto, M.L., Mendonça-Hagler, L. C., Linardi, V.R. Rosa, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *S. cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **J. Applied Microbiology** 89: 24-31, 2000
- 12- Cabrini, K.T., Gallo, C.R. Identificação de cepas de leveduras no processo de fermentação das destilaria Mandú, SP. In: 7º Congresso Nacional da STAB. 227-231, Londrina, PR, 1999.
- 13- Basso, L. C., Oliveira, A. J., Orelli, V. F. D. M., Campos, A. A., Gallo, C. R., Amorim, A.H. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5, Águas de São Pedro, Anais 45-49, 1993
- 14- Amorim, H. V. Fermentação Alcoólica Ciência & Tecnologia – Fermentec – Piracicaba, 448p 2005
- 15- Stroppa, C. T. Dinâmica populacional de leveduras caracterizadas por eletrocariótipos e desempenho fermentativo em processos de fermentação alcoólica.

- Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2002.
- 16- Andrietta, S. R. Andrietta, M.G S.Rodrigues, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processos utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, 15(6): 32-35, 1997
- 17- Steckelberg, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Brasil, 2001.
- 18- Cunha, A.F., Missawa, S., Pereira, G.A.G. Industrial potential of yeast biotechnology in the production of bioethanol in Brazil: the example of condition flocculation. IN: Franco T., *Industrial perspectives for bioethanol*, 2005).
- 19- Bu'lock, J.D. Practical advantages of very flocculent yeast for alcohol production in single and multiples continuous system. **Int. Spec. Symp. Yeast. England 8**, A. 186, 1983
- 20- Paiva, T.C.B., Sato, S.,Visconti, A.E.S., Castro, L.A.B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. **Applied Bioch. Biotech.** (58): 535-541, 1996
- 21- Prince, I.G., Barford, J.P. Continuous tower fermentation for power ethanol production. **Biotech. Letters** (4): 263-268, 1982
- 22- Viegas, M.C. Andrietta, S.R. Andreitta, M.G.S. Use of tower reactor for continuous ethanol fermentation, **Brazilian J. Chem. Eng.** 19(2): 167-173, 2002 .
- 23- Stupiello, M. G. Avaliação de metodologia para estudo da ação de alguns antimicrobianos frente a bactérias Gram <sup>(+)</sup> isoladas da fermentação alcoólica. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Agroindustrial, 1993.
- 24- Pederson, C.S., Hucker, G.J. The significance of bacteria in sugar mills. IN: Meetg. Assoc. Techn. Aucaereros Cuba. 225-230, 1946
- 25- Ducan, C.L., Colmer, A.R. Coliforms associated with sugar cane plants and juices. **Applied Microbiology** 12: (2): 173-177, 1964
- 26- Tilbury, R. H. Biodeterioratoin of harvest sugar cane in Jamaica. PH.D. Thesis. University of Aston in Birmingham, 1970.

- 27- Purchase, B.S. Losses caused by micro-organisms In: .S.S.C.T., 24. Brisbane, Australia Proceedings 1: 379,2001.
- 28- Yokoya, F. Microbiologia de Processo. In: Eguchi, S.Y.; Yokoya, F.; Canhos, V.F. Pontos críticos Microbiológicos em usinas de açúcar e álcool. Fundação André Tosello, 1-22, 1989.
- 29- Gallo, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e dornas de fermentação alcoólica. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Brasil, 1989
- 30- Rodini, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Agroindustrial, 1985.
- 31- Rosales, S.Y.R. Contaminantes bacteriano da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Tese Doutorado. Universidade Júlio de Mesquita Filho/UNESP, Rio Claro, Brasil, 1989.
- 32- Seki, M.; Kaneuchi, C., Kumnnata, J., Mantirungij, M., Ohomono, T., Komagata, K. Identification of lactic acid bacteria isolated from fermented cane molasses at alcohol plants in Thailand. **Bulletin J. Federation for culture collection**, 5(2): 80-8,1989. Apud **Sugar Industry Abstracts** 52(4): 115,1990.
- 33- Oliva-Neto, P. Influencia da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo batelada alimentada. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1990.
- 34- Tilbury, R.H., Hollingsworth, B. S., Graham, S.D., Pottage, P. Mill sanitation – A fresh approach to biocide evaluation. In: **I.S.S.C.T.**, 16. São Paulo, Brasil Proceedings 3: 2749-2768, 1977.
- 35- Serra, G.E. Cereda, M.P., Feres, R.J., Bertozo, M.T. Vicente, A.T. Contaminação da fermentação alcoólica “floculação do fermento”. *Brasil Açucareiro* 93(6): 26-31, 1979
- 36- Amorin, H.V., Oliveira, A.J., Campos, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 2, Anais 158-168, 1981.

- 37- Stroppa, C.T., Andrietta, M.G.S., Andrietta, S.R., Steckelberg, C. Serra, G.E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **Int. Sugar J.** 102 (1214) 78-82, 2000.
- 38- Alcarde, V.A. Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2001
- 39- Guerreiro, M.A. Desenvolvimento de um sistema especialista para projeto de unidades de produção de álcool. Dissertação Mestrado Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP (2002.) Em relação ao investimento inicial de implantação
- 40- Wheals, A.E., Basso, L. C., Alves, D.M.G., Amorim, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, 17(12) 482-487, 1999.
- 41- Finguerut, J. César, A.R.P., Leiner, K.H., Vaz Rossel C.E. Fermentação contínua em múltiplos estágios. **STAB Açúcar, Álcool e subprodutos**, 10(3): 41-42, 1992.
- 42- Andrietta, S.R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Brasil, 2001.

**Endereço para Correspondência:**

Divisão de Biotecnologia e Processos  
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)  
Universidade de Campinas  
CP 6171, CEP 13081-970 – Campinas –SP  
[stupiello@cpqba.unicamp.br](mailto:stupiello@cpqba.unicamp.br)

**Data de Recebimento: 28/07/2006****Data de Aprovação: 09/08/2006**