

OS BENEFÍCIOS DA PESQUISA APLICADA NO APERFEIÇOAMENTO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

*Eduardo P. Borges^{*1}, Silene C. de Lima Paulillo¹, Claudemir D. Bernardino¹, Marcel S. Lorenzi¹, Fernando H. C. Giometti¹, Mário Lúcio Lopes¹, Henrique B. Amorim Neto¹, Henrique V. Amorim¹*

¹ Fermentec – Tecnologias em Açúcar e Alcool LTDA: Avenida Antônia Pazzinato Sturion, 1155, Jd. Petropolis, 13420-640 Piracicaba SP, Brasil.

* Autor correspondente: eduardo@fermentec.com.br.

RESUMO

O programa brasileiro de etanol (PRÓ-ÁLCOOL), iniciado em 1975, teve como propósito reduzir a importação de petróleo frente à escalada de seu preço no mercado internacional. Neste contexto, em 1977 a Fermentec foi fundada com o objetivo de otimizar o processo fermentativo e melhorar a eficiência industrial. A aplicação de análise estatística revelou-se um fator determinante para o sucesso na melhoria do rendimento de etanol. Igualmente, a adaptação de metodologias analíticas para o laboratório foi de grande importância para a medição da eficiência e mitigação de perdas. Paralelamente, implementou-se a seleção de leveduras para fermentação industrial, utilizando inicialmente a cariotipagem de cromossomos e, posteriormente, a análise de DNA mitocondrial. Esta última técnica tornou possível a metodologia denominada Seleção Guiada pelo Processo, que permite identificar cepas de levedura específicas e mais adaptadas a cada destilaria. Atualmente, as leveduras selecionadas e “personalizadas” por este processo representam 90% do mercado no Brasil.

Palavras-chave: *fermentação, leveduras, rendimento fermentativo, monitoramento de processo.*

ABSTRACT

The Brazilian Ethanol Program (PRÓ-ÁLCOOL), launched in 1975, was established with the purpose of reducing petroleum imports in response to the sharp increase in oil prices on the international market. In this context, Fermentec was founded in 1977 with the objective of optimizing the fermentation process and improving industrial efficiency. The application of statistical analysis proved to be a decisive factor in the successful enhancement of ethanol yield. Likewise, the adaptation of analytical methodologies to industrial laboratories was of great importance for accurately measuring process efficiency and mitigating losses. In parallel, yeast selection for industrial fermentation was implemented initially using chromosome karyotyping and later mitochondrial DNA analysis. The latter technique enabled the development of the so-called Process-Driven Selection methodology, which allows the identification of specific yeast strains better adapted to each distillery. Currently, yeasts selected and “customized” through this process account for approximately 90% of the Brazilian market.

Keywords: *fermentation, yeasts, fermentative yield, process monitoring.*

INTRODUCTION

Frente às crises do petróleo na década de 1970, o Brasil iniciou um programa para reduzir a importação e a dependência do petróleo em sua matriz energética. O programa, denominado PRÓ-ÁLCOOL e iniciado em 1975, incentivou o aumento do volume de etanol produzido por meio de benefícios financeiros aos produtores e redução de impostos aos consumidores (ZANIN et al., 2000; AMORIM & LOPES, 2005).

Até o advento deste programa, o etanol era produzido majoritariamente pela fermentação de melaço diluído com reciclo de levedura, utilizando tecnologia francesa introduzida no Brasil no início do século XX (AMORIM et al., 2011). O processo-padrão da época era caracterizado por baixas eficiências: até 1977, o rendimento da fermentação situava-se entre 70% e 75%, com tempos de ciclo longos, de 16 a 20 horas. A concentração alcoólica final nos fermentadores não excedia 7% (v/v), o que resultava na geração de um volume massivo de vinhaça, de no mínimo 16 litros por litro de etanol (AMORIM & LEÃO, 2005) — um reconhecido gargalo logístico e ambiental para as destilarias.

Nesse período, o dimensionamento dos fermentadores (dornas), que inicialmente não ultrapassava 100.000 litros, foi progressivamente aumentado para 200.000, 400.000, 500.000 e até 1 milhão de litros. Atualmente, é comum encontrar tanques industriais com capacidade de 3,5 milhões de litros (AMORIM & LEÃO, 2005).

Esse aumento na escala de produção demandou, conseqüentemente, a busca por inovações tecnológicas. Neste cenário, a Fermentec focou seus esforços iniciais no processo de fermentação, a partir de 1977. Como resultado da pesquisa aplicada e do trabalho de campo, foi possível alcançar

melhorias expressivas: obteve-se um aumento no rendimento da fermentação para a faixa de 91 a 91,5%, a redução do tempo de ciclo para 10 horas e, crucialmente, a elevação da concentração alcoólica final nos tanques para 12% (v/v) com reciclo de levedura (AMORIM & LEÃO, 2005; LOPES et al., 2016). Um estudo com o objetivo de quantificar os ganhos econômicos decorrentes do aumento da eficiência de destilarias industriais de etanol conduzido pela Universidade de São Paulo (ALVES & BARROS, 2011), concluiu que, no período analisado entre 1977 e 2007, observou-se um ganho médio de 8,3% na produção das 33 destilarias analisadas. No total, a melhoria de rendimento resultou em um acréscimo acumulado de 3,5 bilhões de dólares no valor da produção das unidades avaliadas.

Tais avanços foram possibilitados por um conjunto de ações integradas, que incluíram o monitoramento rigoroso dos indicadores de processo e de qualidade, aliado ao desenvolvimento e à adaptação de metodologias analíticas adequadas para o acompanhamento desses parâmetros. Adicionalmente, foram implementadas medidas voltadas à redução de perdas ao longo do processo produtivo e ao controle da contaminação bacteriana, bem como à seleção de cepas de leveduras mais bem adaptadas às condições do ambiente industrial. Estas ações serão detalhadas a seguir.

1. Métricas: Da Análise Estatística à Regressão Múltipla

Ao longo dos últimos 48 anos, a Fermentec consolidou um robusto e extenso banco de dados, abrangendo parâmetros de qualidade da cana-de-açúcar e variáveis de todo o processo industrial.

Para extrair valor deste vasto conjunto de

dados, adotou-se uma abordagem sinérgica, aplicando estatísticas clássicas e técnicas de regressão. Ferramentas como a regressão linear simples e múltipla, embora sejam técnicas estatísticas tradicionais, funcionam como algoritmos basilares do aprendizado supervisionado. Elas permitiram modelar a relação entre variáveis e, assim, prever o comportamento do processo com base em dados históricos. Hoje em dia com o avanço do poder computacional outras técnicas de aprendizado de máquina também estão sendo utilizadas para o reconhecimento de padrões como Análise por Componentes Principais (PCA) e algoritmos baseados em Árvores de Decisão como Floresta Aleatória (Random Forest) e Impulsioneamento de Gradiente Extremo (Extreme Gradient Boosting).

Essa integração entre a estatística inferencial permitiu transcender a análise puramente descritiva (o que aconteceu) e avançar para a análise preditiva (o que acontecerá). Isso possibilitou a identificação dos principais parâmetros e das “variáveis críticas” que possuem correlação direta com os indicadores de desempenho industrial (rendimentos, perdas e qualidade final do produto). A Figura 1 exemplifica essa modelagem, onde se observa como o rendimento fermentativo é adversamente afetado (reduzido) pelo aumento da acidez do vinho, um fenômeno decorrente da contaminação bacteriana.

Os conhecimentos gerados por essas análises foram e continuam sendo cruciais, pois fornecem subsídios técnicos e objetivos aos gestores industriais. Tais análises não apenas evidenciam a necessidade de melhorias, mas também orientam uma tomada de decisão baseada em dados, permitindo alocar investimentos de forma estratégica para incrementar a eficiência e a qualidade. Ademais, o conhecimento aprofundado dos parâmetros que impactam o processo permite um controle mais proativo da fermentação,

auxiliando diretamente na mitigação de perdas operacionais e na otimização do consumo de insumos, como antibióticos, ácido sulfúrico e antiespumantes (AMORIM et al., 2004).

Nesse contexto, os avanços recentes em engenharia de dados, plataformas digitais e tecnologias associadas à indústria 4.0 ampliaram de forma significativa a capacidade de transformar dados brutos — provenientes tanto da automação quanto do laboratório — em informações operacionais úteis e disponíveis em tempo real. Esses recursos tecnológicos potencializam as análises anteriormente descritas, permitindo gerar alertas automáticos, identificar rapidamente as variáveis que mais influenciam o desempenho e definir o arranjo operacional mais adequado. Como consequência, ampliam-se a eficiência global do processo, a aderência aos limites operacionais (gestão de rotina e padronização) e a agilidade na tomada de decisão, além de fortalecer a cultura de melhoria contínua por meio de painéis gráficos, cartas de controle e fluxos estruturados para tratativa de desvios

2. Metodologias Analíticas e Amostragem

A adaptação das metodologias analíticas ao contexto do laboratório industrial foi um fator essencial para o controle da fermentação e a otimização do rendimento (AMORIM & LEÃO, 2005). A implementação de métodos robustos e confiáveis é a base para a geração de dados confiáveis. Contudo, mesmo as técnicas analíticas laboratoriais mais modernas, que minimizam a incerteza da medição, tornam-se ineficazes se a amostra analisada não for representativa. É imperativo que a amostra coletada possua características físico-químicas tão similares quanto possível às vigentes no processo. Se a etapa de amostragem for inadequada, a análise, por si só, perde seu valor e não gera informação confiável para a

tomada de decisão (SKOOG et al., 1993).

O primeiro objetivo desses dados é quantitativo, focado em calcular o rendimento fermentativo e, por extensão, a eficiência industrial global. Este cálculo representa, essencialmente, a razão de etanol produzido em função da concentração de açúcar (Açúcares Redutores Totais) disponível na matéria-prima (AMORIM & LEÃO, 2005; PEREIRA et al., 2018).

O segundo objetivo é de natureza operacional e gerencial: monitorar e gerir o desempenho do processo de fermentação. Esta abordagem permite aos técnicos e gestores compreenderem as flutuações e variações que ocorrem no desempenho do processo. O entendimento aprofundado dessas variações é o que viabiliza uma ação proativa, permitindo prevenir e mitigar comportamentos e desvios indesejáveis no processo.

2.1 Evolução da determinação de Açúcares nas Usinas de açúcar e Alcool

Atualmente, a determinação de açúcares pode ser realizada rotineiramente por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Índice de Refração ou por Cromatografia de Íons de Alta Eficiência com Detector de Amperometria Pulsado (KAVAS et al., 2008; EGGLESTON & BORGES, 2015). No entanto, embora nos dias de hoje um número significativo de usinas disponha de cromatógrafos em seus laboratórios, em 1975 este tipo de equipamento era considerado um “sonho técnico”, completamente fora da realidade industrial.

Nesse contexto, a quantificação de Açúcares Redutores Totais (ART) em diversas matrizes do processo, como caldos, xarope, melaços, mosto e vinho, era realizada predominantemente pela metodologia de

titulação de Eynon & Lane, baseada na reação de Fehling (ICUMSA, 2013). O procedimento fundamenta-se na redução dos íons cobre (II) e como a reação não é estequiométrica e envolvia aquecimento direto em Bico de Bunsen, a precisão analítica era muito baixa, pois qualquer variação nas condições reacionais, como a taxa de aquecimento da solução reacional, influenciava os resultados. Para solucionar este problema de precisão, um equipamento desenvolvido na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (HORII & GONÇALVES, 1991) otimizou o desempenho da determinação e reduziu a dificuldade ao realizar a reação em uma câmara aquecida por vapor de água. Em 1992, a Fermentec aprimorou o equipamento ao adicionar um eletrodo de oxi-redução (redox) para determinar o ponto final da titulação, o que resultou em melhor exatidão e repetibilidade (ZAGO et al., 1992). Contudo, esta metodologia não era adequada para a determinação de baixas concentrações de açúcares, geralmente encontradas no vinho ao final da fermentação, devido à sua baixa sensibilidade.

Diante disso, em 1978, a Fermentec adaptou a metodologia de Somogyi & Nelson, originalmente concebida para análise de glicose no sangue, que também era baseada na redução do íon cobre II (NELSON, 1944), para a análise de amostras com baixa concentração de ART, como vinho e águas residuais. Esta adaptação demonstrou boa exatidão para concentrações tão baixas quanto 7-10 mg/L.

Retomando as técnicas cromatográficas, entre 1975 e 1995, seu uso no setor sucroenergético era restrito a laboratórios de pesquisa. Contudo, a partir de 1995, algumas usinas começaram a implementar esses equipamentos. Em uma única corrida analítica, é possível quantificar sacarose, glicose, frutose, glicerol e manitol (EGGLESTON et al., 2007). O glicerol e o

manitol, assim como os ácidos láctico e acético, foram incluídos no balanço de massa para auxiliar no cálculo do rendimento fermentativo e fornecer indicativos de possíveis anomalias no processo. Atualmente, esses equipamentos tornaram-se mais acessíveis e, portanto, estão mais presentes nos laboratórios das usinas e destilarias. Isso se deve, especialmente, à necessidade de analisar amostras complexas como melaço e cana deteriorada. Esses tipos de amostras contêm substâncias redutoras infermentescíveis que reagem com os íons de cobre, gerando interferência nas metodologias de Eynon & Lane e Somogyi & Nelson. Essa interferência contribui para uma superestimação da concentração de Açúcares Totais e, consequentemente, distorce o balanço de massas e prejudica o controle operacional.

2.2 Determinação de Etanol

Em 1975, a determinação da concentração de etanol era realizada com o uso do ebuliômetro ou por reação química (oxidativa). O ebuliômetro, contudo, carecia de exatidão e sensibilidade para a quantificação de baixas concentrações de etanol na vinhaça. Essa concentração residual, embora pareça baixa, pode representar uma perda expressiva dado o enorme volume de vinhaça gerado; em uma destilaria média, uma concentração de 0,05% (v/v) de etanol na vinhaça, por exemplo, pode representar o equivalente a 0,6% de perda em relação a produção total de etanol. Por sua vez, a metodologia por reação química (oxidativa) era demorada e exigia mão de obra intensiva.

Diante desse cenário, em 1978, a Fermentec adaptou um aparato de destilação Kjeldahl (destinado a determinação de nitrogênio total) para destilar o vinho ou a vinhaça. Esse processo permitia a extração completa do etanol contido na amostra, através de arraste a

vapor, em poucos minutos. Após a destilação, a densidade da solução hidroalcoólica resultante era medida com um densímetro digital e, a partir deste valor, calculava-se a concentração de etanol nas amostras.

Em comparação com a técnica de Cromatografia Gasosa para determinar etanol, o procedimento por destilação e densimetria digital é consideravelmente mais robusto e não requer o uso de reagentes ou gases especiais para realizar a análise. Desta forma, o custo por determinação é menor.

O monitoramento de processos é fundamental para assegurar que as operações permaneçam estáveis e sob controle. Esse acompanhamento permite que os operadores desempenhem um papel ativo na manutenção da estabilidade operacional e, consequentemente, na melhoria contínua do processo (KUBIAK & BENBOW, 2009). Desta forma, como pode ser observado na Figura 2, a capacidade de medir com maior exatidão (precisão e veracidade) a perda de etanol residual na vinhaça, mediante ao uso do densímetro digital, permitiu otimizar o processo de destilação e, consequentemente, mitigar essas perdas. Na figura é apresentado o decréscimo das perdas de etanol obtido a partir da implementação deste monitoramento por densimetria após 1978. Mediante a essa ação foi possível reduzir a perda de etanol na vinhaça de 4% para 0,2% em relação ao etanol produzido. Ou seja, um ganho direto de 3,8% na quantidade de etanol produzido.

2.3 Determinação de Glicerol

A quantificação do glicerol é fundamental, não apenas para o cálculo do rendimento fermentativo através do balanço de massa, mas também para o monitoramento do comportamento fisiológico da levedura. Uma produção elevada de glicerol pode indicar que a levedura está sob estresse (seja

osmótico, térmico ou por contaminantes) ou, alternativamente, que está em fase de multiplicação vigorosa (BASSO et al., 2011).

No período de 1975 a 1985, este parâmetro não era monitorado em nível industrial, sendo sua análise restrita a laboratórios de pesquisa. A partir de 1985, as usinas iniciaram a quantificação do glicerol por meio de reação química que era trabalhosa e pouco seletiva. Posteriormente, em 1995, a Fermentec adaptou um kit de reação enzimática (DIASYS, s.d.), originalmente destinado à determinação de triglicerídeos em soro ou plasma, para a análise de glicerol no vinho. A decisão de utilizar um kit de ensaio voltado para análises clínicas foi uma estratégia para reduzir o custo analítico, visto que este kit possuía um custo significativamente inferior ao da aquisição de enzimas e reagentes de forma separada.

Atualmente, com a popularização e acessibilidade das técnicas cromatográficas nas usinas e destilarias, o glicerol passou a ser quantificado rotineiramente também por cromatografia.

2.4 Determinação de Ácidos Orgânicos e Nitrogênio

O aumento da acidez durante a fermentação é um indicativo direto do aumento da contaminação bacteriana (BASSO et al., 2011). A análise deste parâmetro, portanto, é crucial para o controle e a gestão do processo. Este parâmetro pode ser monitorado por meio da titrimetria (acidez total). Contudo, hoje em dia monitora-se especificamente a formação de ácido lático (o principal ácido orgânico gerado pela contaminação bacteriana), seja por meio de kits enzimáticos ou por metodologias de HPLC e HPIC.

Em relação ao nitrogênio, este é um nutriente que deve ser monitorado no processo, em

vista da sua importância para o metabolismo das leveduras (THOMAS & INGLEDEW, 1990). Durante o período de 1975 a 1985, o Nitrogênio Total (N-Total) era quantificado, mas nenhuma correlação significativa foi estabelecida com o tempo de fermentação, rendimento ou outros parâmetros do processo. Diante disso, em 1985, a Fermentec adaptou um método para a determinação de Nitrogênio Amoniacal (SILVA, 1971), que permitindo quantificá-lo no mosto e no vinho. Com esta nova metodologia, foi possível observar correlações entre o tempo de fermentação e a concentração de nitrogênio amoniacal no mosto, bem como no processo de propagação da levedura (AMORIM & LEÃO, 2005).

No mosto, além do íon amônio (NH_4^+), estão presentes também aminoácidos, que igualmente são metabolizados pela levedura. Portanto, a Fermentec adaptou um método que utiliza formaldeído (GUMP et al., 2002) para quantificar o Nitrogênio Assimilável. Esta medição engloba todas as fontes de nitrogênio que estão disponíveis e são prontamente metabolizadas pela levedura (NH_4^+ e aminoácidos livres). Este parâmetro apresentou excelente correlação com os indicadores de desempenho mencionados anteriormente.

2.5 Infravermelho Próximo (NIR)

A Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR, do inglês Near Infrared) é uma técnica analítica que se baseia na interação da radiação eletromagnética com a matéria na região do infravermelho próximo. Esta interação gera espectros que, por meio de modelos matemáticos robustos (conhecidos como calibrações quimiométricas), permitem correlacionar dados espectrais com propriedades físico-químicas de interesse (COZZOLINO et al., 2006). As principais vantagens da técnica incluem a rapidez

(análises em menos de um minuto), a natureza não destrutiva da análise e a dispensa do uso de reagentes químicos.

No Brasil, a técnica NIR é utilizada na indústria sucroalcooleira desde 1993, sendo a Fermentec uma das pioneiras mundiais em sua aplicação neste setor. Historicamente, o custo elevado e as dificuldades associadas à manutenção e à calibração quimiométrica representaram limitações para a ampla disseminação desta tecnologia.

Contudo, os avanços tecnológicos recentes em equipamentos, programas de computador e poder computacionais, aliados ao maior interesse de fabricantes pelo setor e a um suporte técnico mais intensivo, permitiram a ampla difusão da técnica NIR. Atualmente, ela é empregada extensivamente nas usinas e destilarias, principalmente para o controle das etapas do processo. Devido à sua capacidade de fornecer dados rapidamente, o NIR é considerado uma ferramenta essencial para a Tecnologia Analítica de Processo e para os conceitos da Indústria 4.0.

O NIR é empregado para a quantificação de múltiplos parâmetros químicos nas unidades agroindustriais. Dentre suas aplicações, destacam-se a determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) no mosto ou diretamente na cana desfibrada, bem como a quantificação da concentração de etanol, glicerol e fração de levedura (v/v) no vinho. O potencial da tecnologia é notável, especialmente pela capacidade de quantificar múltiplos parâmetros simultaneamente em curto intervalo de tempo. Contudo, enfatiza-se que o sucesso na aplicação do NIR depende fundamentalmente da robustez dos modelos de calibração e da verificação periódica da validade desses modelos.

Historicamente, a usina Vale do Rosário foi pioneira mundial ao utilizar, a partir de 1993, um espectrômetro NIR para a medição direta

de açúcar na cana, aplicando esse método no pagamento de fornecedores por muitos anos. Essa inovação mostrou uma forte correlação entre os Açúcares Redutores Totais quantificados pelo NIR diretamente na cana desfibrada e os valores obtidos por análise química convencional do caldo no laboratório de pagamento de cana, demonstrando a confiabilidade do método.

2.6 Análises Microbiológicas

A fermentação é um processo biológico e, como tal, o monitoramento rigoroso da população de leveduras e de seus contaminantes é essencial para o sucesso da produção de etanol (LOPES et al., 2016; AMORIM & LEÃO, 2005). A gestão eficaz do processo requer o uso de ferramentas analíticas adequadas.

2.6.1 Monitoramento da Viabilidade Celular

Para que a fermentação ocorra eficientemente, a levedura deve estar viável (viva), tornando a medição da viabilidade um parâmetro crítico. Entre 1975 e 1985, a Fermentec utilizava o método tradicional de coloração (COLLINS et al., 1970). Contudo, em diversas usinas, a distinção da cor não se apresentava nítida, o que dificultava o discernimento entre leveduras viáveis e inviáveis. Em 1995, a Fermentec introduziu outro método consagrado, baseado no corante eritrosina. Este método mostrou-se superior, pois, devido à sua coloração vermelha intensa, menos problemas de interpretação foram observados (AMORIM & LEAO, 2005).

2.6.2 Controle da Contaminação Bacteriana

No processo fermentativo, a levedura compete com bactérias pelo substrato. A metodologia padrão para a contagem de bactérias viáveis (contagem em placa) requer de dois a três dias para a obtenção de resultados. Visando agilizar esta análise, a Fermentec adaptou um método, originalmente usado para a contagem de bactérias em leite, para a quantificação de bactérias viáveis no mosto fermentado e em amostras análogas, com um limite de detecção de 10^5 bactérias/mL (AMORIM et al., 1982).

As bactérias, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, afetam o rendimento da fermentação alcoólica ao inibirem a levedura e desviarem o substrato (açúcar) para a produção de seus próprios metabólitos, como ácidos orgânicos (Basso et al., 2011). Como consequência, a produção de etanol diminui e a de glicerol (um subproduto da levedura sob estresse) aumenta. A Figura 3 demonstra como o aumento da população bacteriana afeta negativamente o rendimento fermentativo. Nesse sentido, a Fermentec desenvolveu um teste rápido (com duração de 6 horas) para avaliar a sensibilidade (susceptibilidade) de cepas bacterianas a agentes antimicrobianos. Com isso, os custos com o controle bacteriano são minimizados, assegurando que apenas o composto mais eficaz seja aplicado.

2.7 Amostragem Industrial e da matéria-prima

O processo industrial para a produção de açúcar e etanol consiste em uma complexa série de operações unitárias que exigem um controle de processo rigoroso. Este controle é necessário a fim de mitigar as perdas de açúcar e incrementar a eficiência na produção de etanol.

A metodologia analítica é de fundamental importância, e muitos avanços nos rendimentos industriais advêm da implementação de novos métodos ou do aperfeiçoamento dos existentes. As técnicas laboratoriais modernas minimizam a incerteza analítica; contudo, a obtenção de dados confiáveis é, antes de tudo, dependente da representatividade da amostra, que deve possuir características físico-químicas que reflitam o mais fielmente possível as condições vigentes no processo. Caso a amostra não seja coletada de maneira apropriada, a análise subsequente perde seu valor, independentemente da sua exatidão. Portanto, é essencial que o procedimento de amostragem assegure tal representatividade.

Para que a amostra represente fielmente o processo, é necessário considerar diversas oscilações que ocorrem nos parâmetros industriais, tais como: variações de vazão nos pontos de coleta, interrupções de fluxo e a manutenção da assepsia nas tubulações do processo. Esses fatores dificultavam a coleta de uma amostra representativa.

Entre 1975 e 1985, a amostragem era realizada manualmente por técnicos, de forma instantânea (ou pontual). No entanto, devido às flutuações do processo, uma única amostra pontual não era representativa de um período operacional. Uma alternativa para o problema de representatividade da coleta pontual foi a coleta de um número maior de alíquotas (subamostras), formando amostras compostas, obtendo-se assim uma amostra mais representativa do processo. Nesse sentido, a Fermentec introduziu a automação do processo de amostragem, aliada à conservação da amostra. Ao compor a amostra ao longo de um período, as medições tornaram-se muito mais consistentes, e os desvios decorrentes de deficiências na amostragem foram consideravelmente reduzidos.

Após 1995, a frequência de composição da amostra, realizada por amostradores

automáticos contínuos, passou a ser ponderada e proporcional à vazão da moagem, em vez de ser baseada apenas no tempo decorrido. Essa metodologia permitiu representar ainda melhor as características do processo e quantificar o valor absoluto de açúcar perdido, visto que maior quantidade de amostras são coletadas em períodos de maior atividade do processo (AMORIM & LEÃO, 2005). Atualmente, os amostradores são equipados com sistemas de refrigeração, a fim de preservar a amostra, e sistemas de limpeza automática, para evitar a contaminação bacteriana.

Considerando a amostragem de cana desfibrada destinada às análises da matéria-prima, com o objetivo de melhorar a homogeneidade das partículas sólidas, a Fermentec introduziu o uso de um pequeno misturador de concreto (betoneira) modificado para homogeneizar a amostra antes das análises, conforme mostrado na Figura 4. O uso do misturador melhorou a repetibilidade e a confiabilidade dos resultados.

3. Produção de etanol e seleção de leveduras

Para o monitoramento e a seleção de leveduras, durante a safra de produção de etanol, emprega-se a cariotipagem dos cromossomos. Essa abordagem permite identificar se as leveduras presentes nos fermentadores pertencem ou não ao gênero *Saccharomyces* e, também verificar se correspondem às cepas originalmente utilizadas para o início da fermentação. E foi por meio da utilização dessa análise, a partir de 1990, que se constatou que a levedura tradicional de panificação não era capaz de sobreviver às condições estressantes da fermentação industrial, especialmente em processos com reuso celular, passando a ser substituída por outras cepas já nas primeiras semanas de safra (AMORIM & LEAO, 2005;

LOPES et al., 2016, BASSO et al., 2008). Na Figura 5 é apresentado o gel de eletroforese resultado da análise de cariotipagem. Na figura é possível observar a alta resolução da técnica na separação dos cromossomos identificando onze diferentes cepas de *Saccharomyces*, sendo algumas com proximidade genética entre elas.

Além disso, o monitoramento das cepas ao longo das safras industriais, em fermentações com mostos à base de cana-de-açúcar, possibilitou a detecção de cepas “selvagens” capazes de sobreviver e dominar o processo fermentativo, apresentando características tecnológicas desejáveis, tais como: elevado rendimento alcoólico, baixa produção de glicerol, reduzida formação de espuma e alta viabilidade celular.

Esse processo de triagem tem sido contínuo ao longo dos últimos 35 anos e resultou na seleção de cepas com elevado potencial fermentativo. Atualmente, a Fermentec dispõe, entre outras, de quatro leveduras selecionadas comercialmente que respondem por aproximadamente 70% de todo o etanol produzido no Brasil: PE-2, CAT-1, FT858L e Fermel®.

O monitoramento sistemático das leveduras nos processos fermentativos proporcionou descobertas relevantes acerca da capacidade de determinadas cepas de leveduras em dominar e se manter por toda a safra, em uma destilaria específica (AMORIM et al., 2017). Assim, tornou-se possível isolar e selecionar cepas adaptadas às condições particulares de cada unidade industrial, originando as chamadas leveduras personalizadas.

Desde 2007, a Fermentec vem selecionando, em parceria com as usinas e destilarias, leveduras “personalizadas”, isto é, linhagens selecionadas e adaptadas às condições específicas de uma unidade industrial. Em 2024, a produção de etanol proveniente

dessas cepas ultrapassou 5 bilhões de litros. A superioridade dessas leveduras é amplamente reconhecida, tendo atingido 90% de persistência nos fermentadores e uma média de 89% de dominância, portanto, maior taxa de implantação nas dornas o que resulta em maior estabilidade e robustez do processo fermentativo.

Por serem isoladas e reintroduzidas na mesma unidade industrial, essas leveduras apresentam melhor adaptação ao processo específico, resultando em maior persistência e dominância competitiva (AMORIM et al., 2017). Na safra de 2024, 67 leveduras personalizadas foram reintroduzidas nas unidades industriais para o início da Safra, sendo responsáveis por cerca de 15% do etanol produzido no Brasil, nesse ano.

Considerando que, em alguns casos, a cariotipagem não é suficiente para distinguir se determinadas leveduras são geneticamente idênticas, desde 2007 a Fermentec passou a empregar análises de DNA mitocondrial como técnica complementar, permitindo verificar com maior precisão se as cepas são equivalentes, distintas ou geneticamente relacionadas. Na Figura 6 é apresentado o resultado desta análise realizada na mesma amostra analisada na Figura 5. A análise por cariotipagem (DNA nuclear) permitiu distinguir 11 perfis distintos, correspondentes a 11 cepas diferentes. Por sua vez, a análise de DNA mitocondrial agrupou esses isolados em quatro perfis mitocondriais, indicando que algumas cepas, embora distintas no DNA nuclear, apresentam mesma origem. Nesse contexto, os isolados que compõem a Sacch 1 apresentaram perfis mitocondriais idênticos entre si, representando 45% da amostra, enquanto os isolados que compõem a Sacch 2, distintos da Sacch 1, também apresentaram perfis mitocondriais idênticos entre si, correspondendo a 36% da amostra.

CONCLUSÕES

A experiência acumulada ao longo de quase cinco décadas demonstra que a pesquisa aplicada foi determinante para os ganhos de eficiência observados na indústria brasileira de etanol. Esses avanços não foram fruto de iniciativas isoladas, mas sim da integração consistente entre pesquisa aplicada, monitoramento sistemático e atuação direta sobre o processo industrial. A evolução das metodologias analíticas, da estatística clássica às técnicas modernas de aprendizado de máquina, aliada ao aprimoramento da amostragem, do controle microbiológico e da seleção de leveduras, possibilitou a transformação de dados laboratoriais e operacionais em conhecimento acionável, sustentando decisões técnicas mais precisas e uma gestão cada vez mais proativa do processo fermentativo. Em um cenário de crescente digitalização e incorporação dos conceitos da Indústria 4.0, esse legado técnico-científico torna-se ainda mais relevante, servindo de base para novas inovações, para a ampliação do uso de ferramentas avançadas de análise de dados e para a contínua otimização do processo de fermentação alcoólica no Brasil.

REFERÊNCIAS

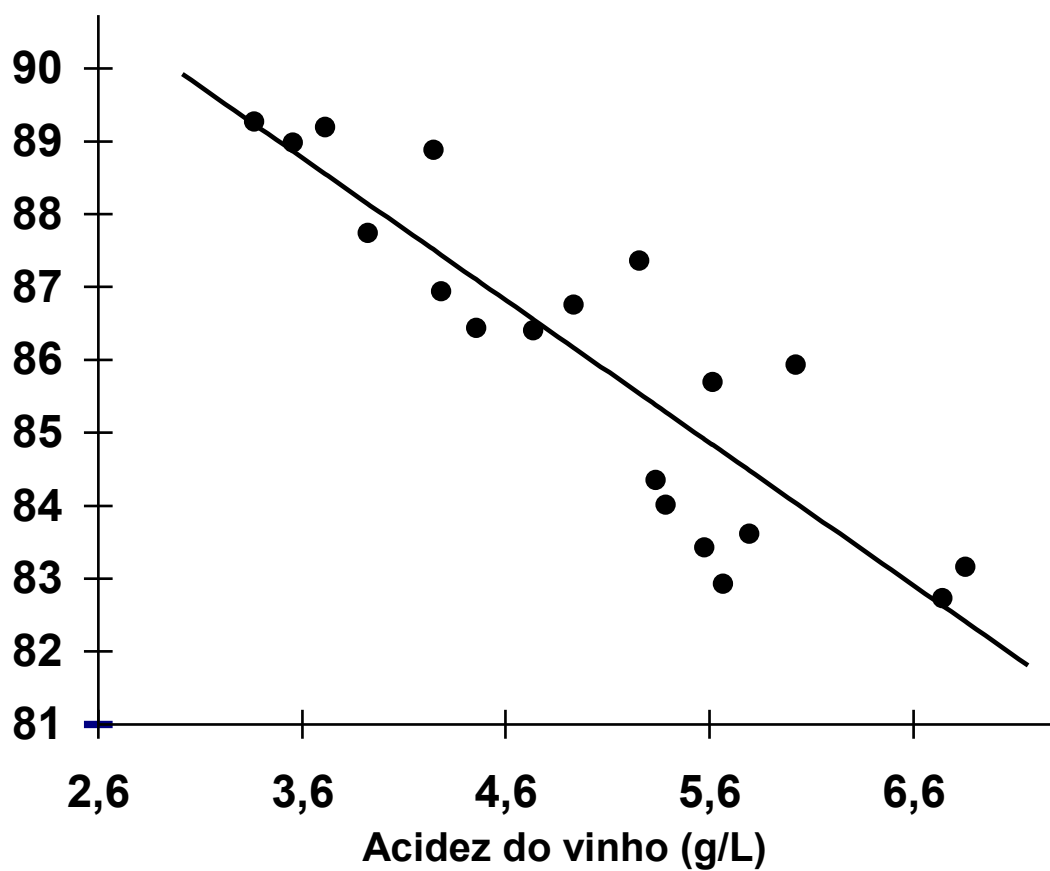
- ALVES, L. R. A.; BARROS, M. B. 2011. Ganhos econômicos da eficiência industrial de destilarias de álcool que receberam consultoria: o caso de empresas atendidas pela Fermentec Ltda. **Informe GEPEC**, Toledo, v.15, n.1, p.36-58.
- AMORIM, H. V.; AMORIM NETO, H. B.; LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L. 2017. Evolution of Yeast Selection for Fuel Ethanol: Breaking Paradigms. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (eds). **Diversity and Benefits**

- of Microorganisms from the Tropics.** Basel: Springer, p.391-401.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. 2004. Evolution of ethanol fermentation in Brazil. In: BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. (Eds.). **Distilled Spirits: Tradition and Innovation.** Nottingham: Nottingham University Press, p.143-148.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. 2005. **Fermentação alcoólica – ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec. 448p.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; GOLDMAN, G. H. 2011. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.91, p.1267-1275.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. 2005. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian experience. **Sugar Journal**, New Orleans, v.67, p.11-14.
- AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; OLIVEIRA, A. J. 1982. **Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 58p.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v.8, n.7, p.1155-1163.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. 2011. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel Production – Recent Developments and Prospects.** London: IntechOpen, p.85-100.
- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. 1970. **Microbiological Methods.** 3rd ed. London; Baltimore: Butterworths. 454p.
- COZZOLINO, D.; PARKER, M.; DAMBERGS, R. G.; HERDERICH, M.; GISHEN, M. 2006. Chemometrics and visible-near infrared spectroscopic monitoring of red wine fermentation in a pilot scale. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v.95, p.1101-1107.
- DIASYS (Diagnostic Systems GmbH). s.d. **Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of triglycerides in serum or plasma on photometric systems.** Triglycerides FS. Holzheim, Germany: DiaSys Diagnostic Systems GmbH. Catalog number: 10 571 023.
- EGGLESTON, G.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; PAULILLO, S. C.; BASSO, T. O. 2007. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **ZuckerIndustrie**, Berlin, v.132, p.33-39.
- EGGLESTON, G.; BORGES, E. P. 2015. Multiple applications of ion chromatography oligosaccharide fingerprint profiles to solve a variety of sugar and sugar-biofuel industry problems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.63, p.2841-2851.
- GUMP, B. H.; ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; WHITON, R. S. 2002. Comparison of analytical methods for prediction of pre-fermentation nutritional status of grape juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis,

- v.53, p.325-329.
- HORII, J.; GONÇALVES, R. H. 1991. Um método alternativo para determinação de AR e ART. **STAB**, Piracicaba, v.10, p.45-47.
- INTERNATIONAL COMMISSION FOR UNIFORM METHODS OF SUGAR ANALYSIS (ICUMSA). 2013. Official Methods GS7/3-7: The determination of Total Reducing Sugars in Molasses and refined syrups after hydrolysis by the Lane & Eynon constant volume procedure. **ICUMSA methods book**. Berlin: Verlag Dr. Albert Bartens KG.
- KAVAS, M.; EGGLESTON, G.; PARKIN, G.; WHITE, B.; SEZER, G.; PARDOE, K. 2008. Comparative study of copper reduction, chromatographic and enzymatic methods to determine reducing sugars in molasses. **Zuckerindustrie**, Berlin, v.133, p.129-134.
- KUBIAK, T. M.; BENBOW, D. W. 2009. **The Certified Six Sigma Black Belt Handbook**. 2nd ed. Milwaukee: ASQ Quality Press. 620p.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B.; AMORIM, H. V. 2016. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.47, p.64-76.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v.153, p.375-380.
- PEREIRA, R. D.; RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. 2018. A New Methodology to Calculate the Ethanol Fermentation Efficiency at Bench and Industrial Scales. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v.57, n.48, p.16182-16191.
- SILVA, M. O. S. A. 1971. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos**. São Paulo: Companhia de Saneamento Ambiental. 226p.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. 1993. Analytical chemistry: an introduction. 6th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing. 612p.
- THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. 1990. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mash. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.7, p.2046-2050.
- ZAGO, E. A.; SILVA, L. F. L. F.; AMORIM, H. V. 1992. Novo método de hidrólise e determinação potenciométrica para açúcares redutores e açúcares redutores totais. **STAB**, Piracicaba, v.10, p.40-42.
- ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BOM, E. P.; GIORDANO, R. C.; DE MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; DE CARVALHO NETO, C. C.; MACEDO, I. C.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. 2000. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v.84-86, p.1147-1161.

Rendimento da Fermentação (%)

Figura 1. Correlação entre o rendimento da fermentação e a acidez do vinho observada durante o monitoramento do processo.



$$Y = 95,37684 - 1,95622 X \quad (r = -0,88055)$$

Figura 2. Redução das perdas de etanol no processo de produção por meio do monitoramento da perda de etanol na vinhaça utilizando o procedimento do densímetro digital desenvolvido pela Fermentec

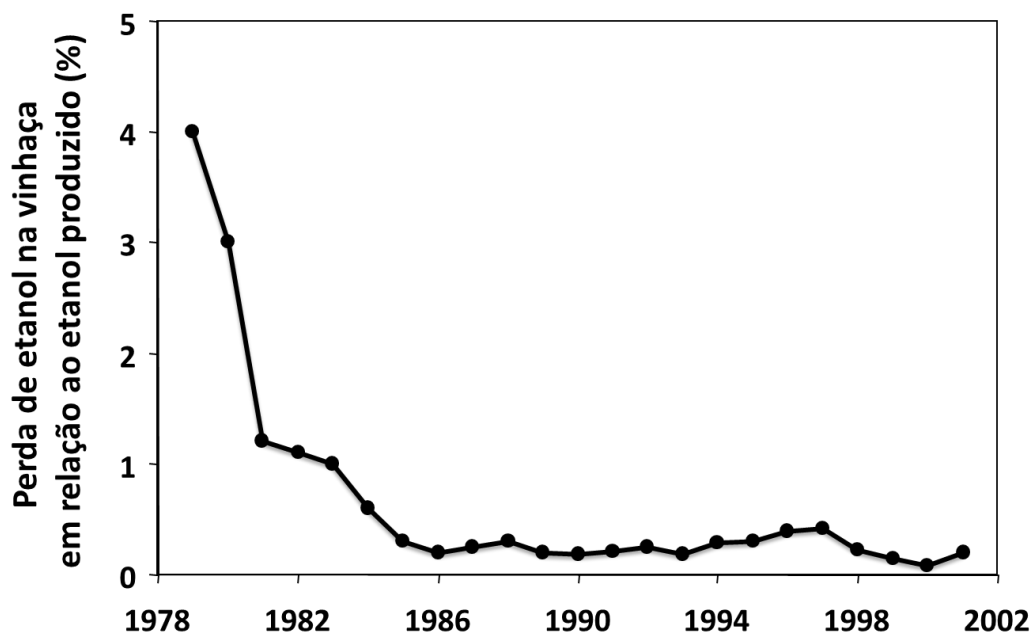


Figura 3. Correlação entre contagem de bactérias (bastonetes / mL) e o rendimento da fermentação.

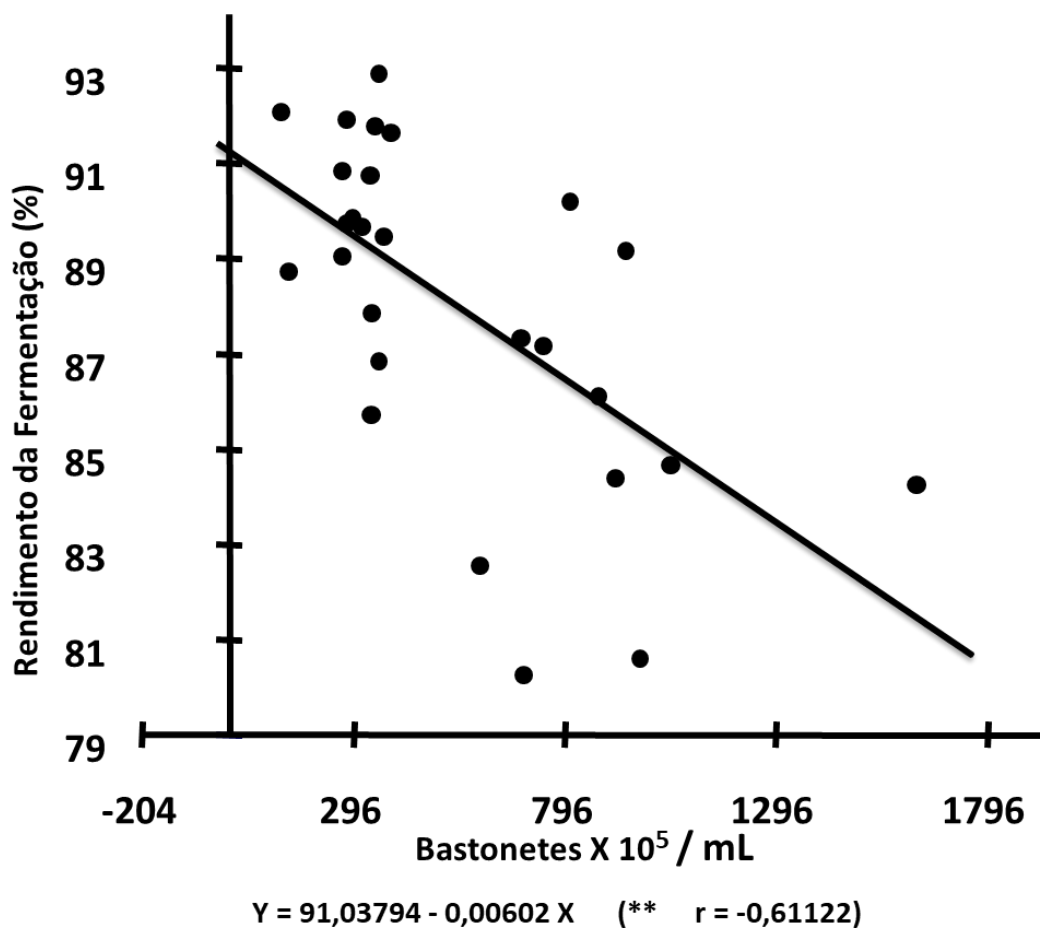
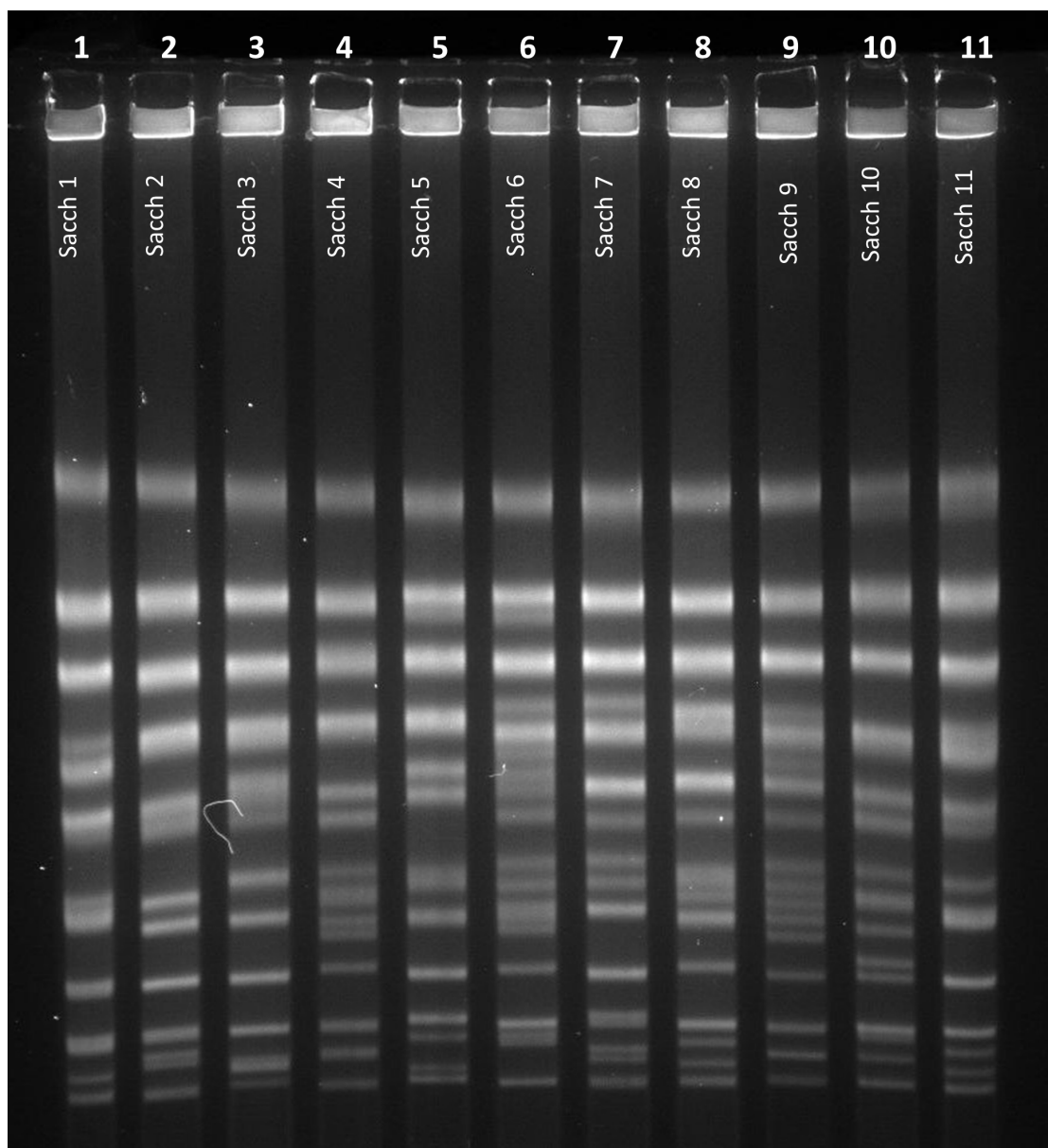




Figura 4. Adaptação de uma betoneira para homogeneização da cana desfibrada.

Figura 5. Perfis de DNA nuclear (cariotipagem) de 11 cepas diferentes de leveduras em uma amostra de vinho bruto, identificadas pelo sistema TAFE. Os números referem-se a 11 colônias isoladas da amostra.



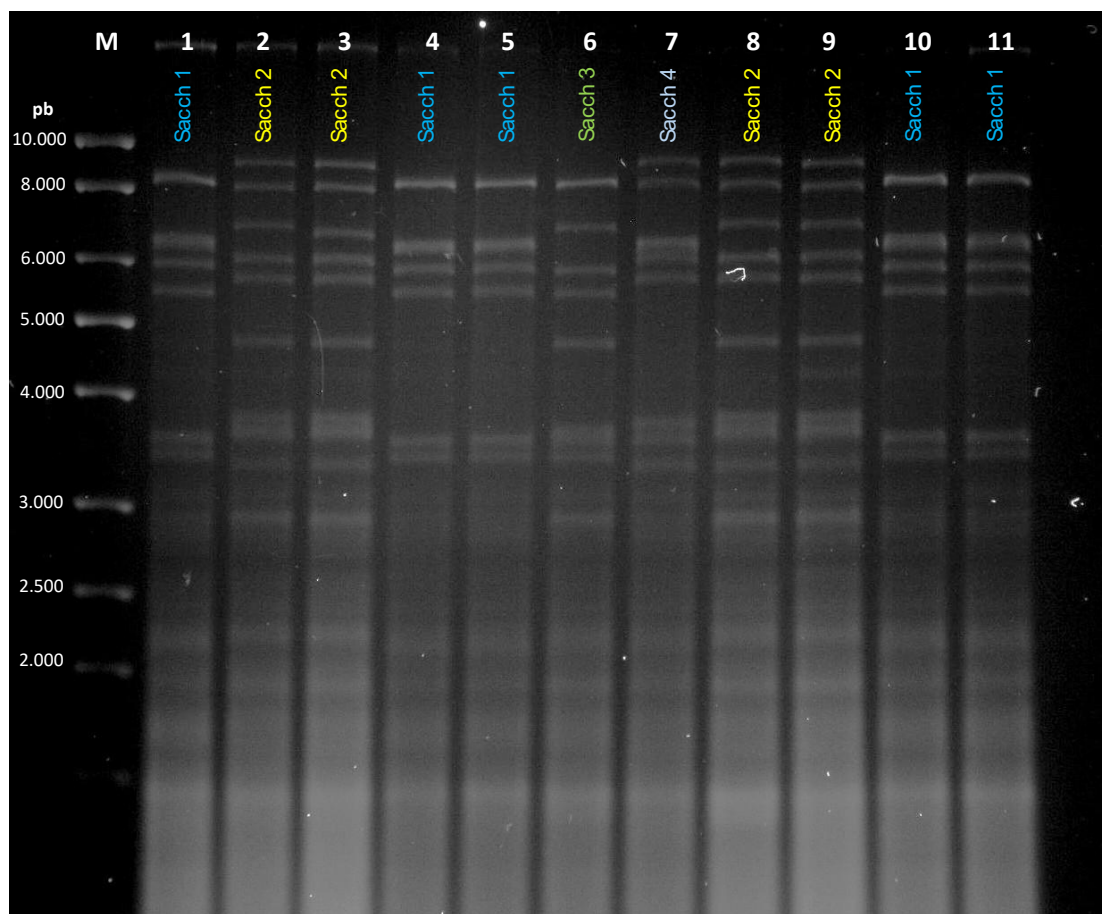


Figura 6. Perfis de DNA mitocondrial de quatro cepas de leveduras presentes em uma amostra de vinho bruto. A análise evidencia a dominância de duas cepas, Sacch 1 (45%) e Sacch 2 (36%). Os números correspondem às 11 colônias isoladas a partir da amostra analisada. Como marcador foi utilizado o marcador de DNA de 1 kb HighRanger (300 pb–10.000 pb), da empresa Norgen.