TECNOLOGIA DAS FERMENTAÇÕES

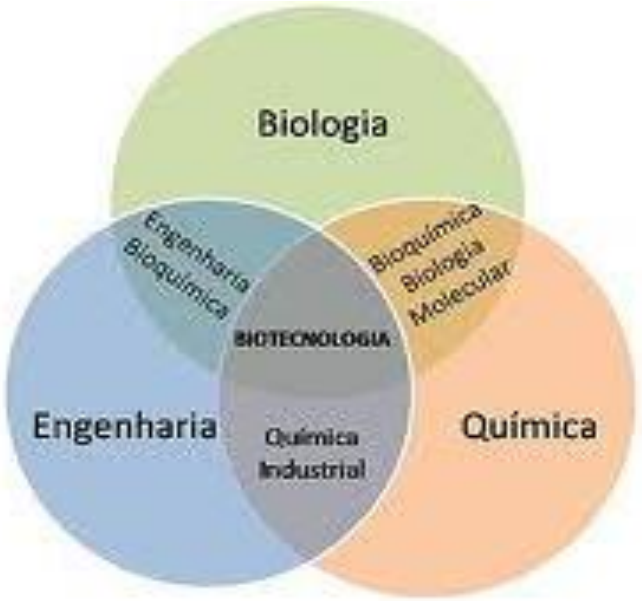
Processos Biotecnológicos

ESALQ / USP

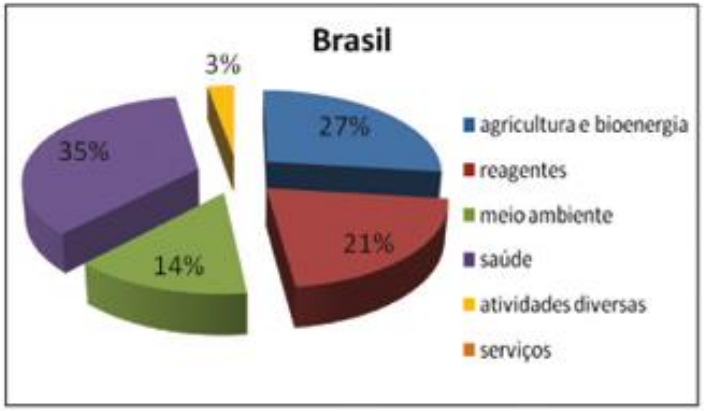
PROF. SANDRA

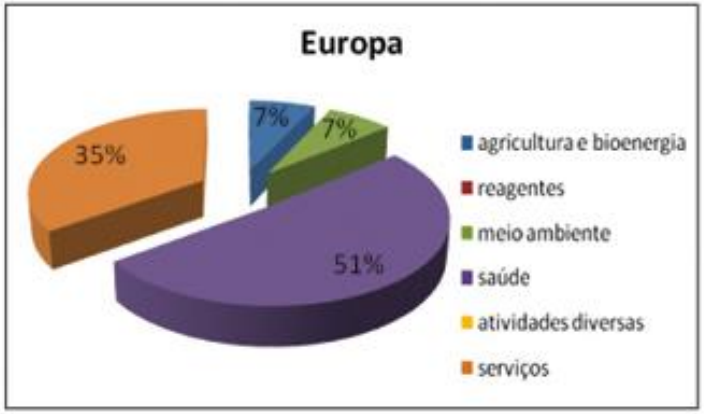
Biotecnologia

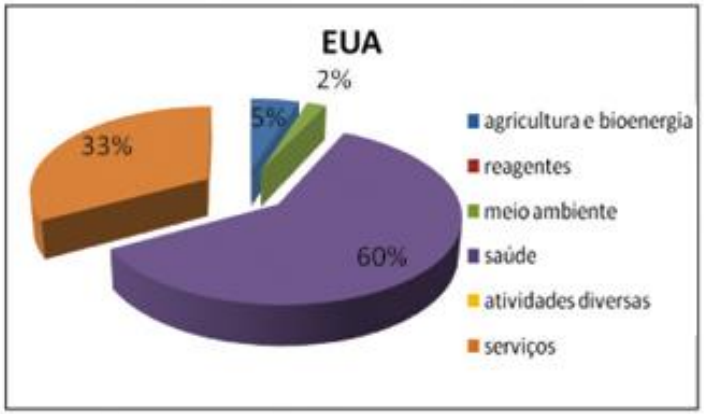
- conjunto de conhecimentos que permite a utilização de agentes biológicos
  - (organismos, células, organelas, moléculas)
- para obter bens ou assegurar serviços.



Uso e aplicações da biotecnologia







Oliveira, L. G. de; Mantovani, S. M.. (2009). Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Química Nova*, *32*(3), 742-756. https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300018

Produtos de origem biotecnológica, por setor

Setores	Bens e Serviços
Agricultura	Adubo composto, pesticidas, silagem, mudas de plantas ou de árvores, plantas com propriedades novas etc.
Alimentação	Pães, queijos, picles, cerveja, vinho, proteína unicelular, aditivos, etc.
Ind. Química	Butanol, acetona, glicerol, ácidos orgânicos, enzimas etc.
Eletrônica	Biosensores
Energia	Etanol, biogás
Meio Ambiente	Recuperação de petróleo, tratamento do lixo, purificação da água etc.
Pecuária	Embriões
Saúde	Antibióticos, hormônios e outros medicamentos, vacinas, reagentes e testes de diagnóstico, etc.

Importância dos processos fermentativos

- Na indústria de alimentos

Produto	Microrganismo
Queijo	Bactérias e fungos
Iogurtes	Bactérias lácticas
Manteiga	Bactérias lácticas
Bebidas alcoólicas ocidentais	Leveduras alcoólicas
Bebidas alcoólicas orientais	Fungos e leveduras
Produtos de panificação	Levedura alcoólica
Picles, azeitonas, chucrute	Bactérias lácteas
Carnes fermentadas	Bactérias lácticas
Vinagre	Bactérias acéticas
Café	Bactérias lácteas, etc.
Cacau	Leveduras e bactérias
Chá	Enzimas oxidases
Soja fermentada	Fungos, leveduras e bactérias
Leveduras comestíveis	Leveduras
Gorduras	Leveduras
Desenvolvimento de sabor	Fungos
Aromas	Fungos
Proteínas unicelulares (SCP)	Fungos, leveduras e bactérias
Ensilagem	Bactérias lácteas

Evolução histórica

10000 a.C. – preparo de queijo (cabras)
8000 a.C. – preparação de cerveja e vinho
6000 a.C. – fabricação de pão

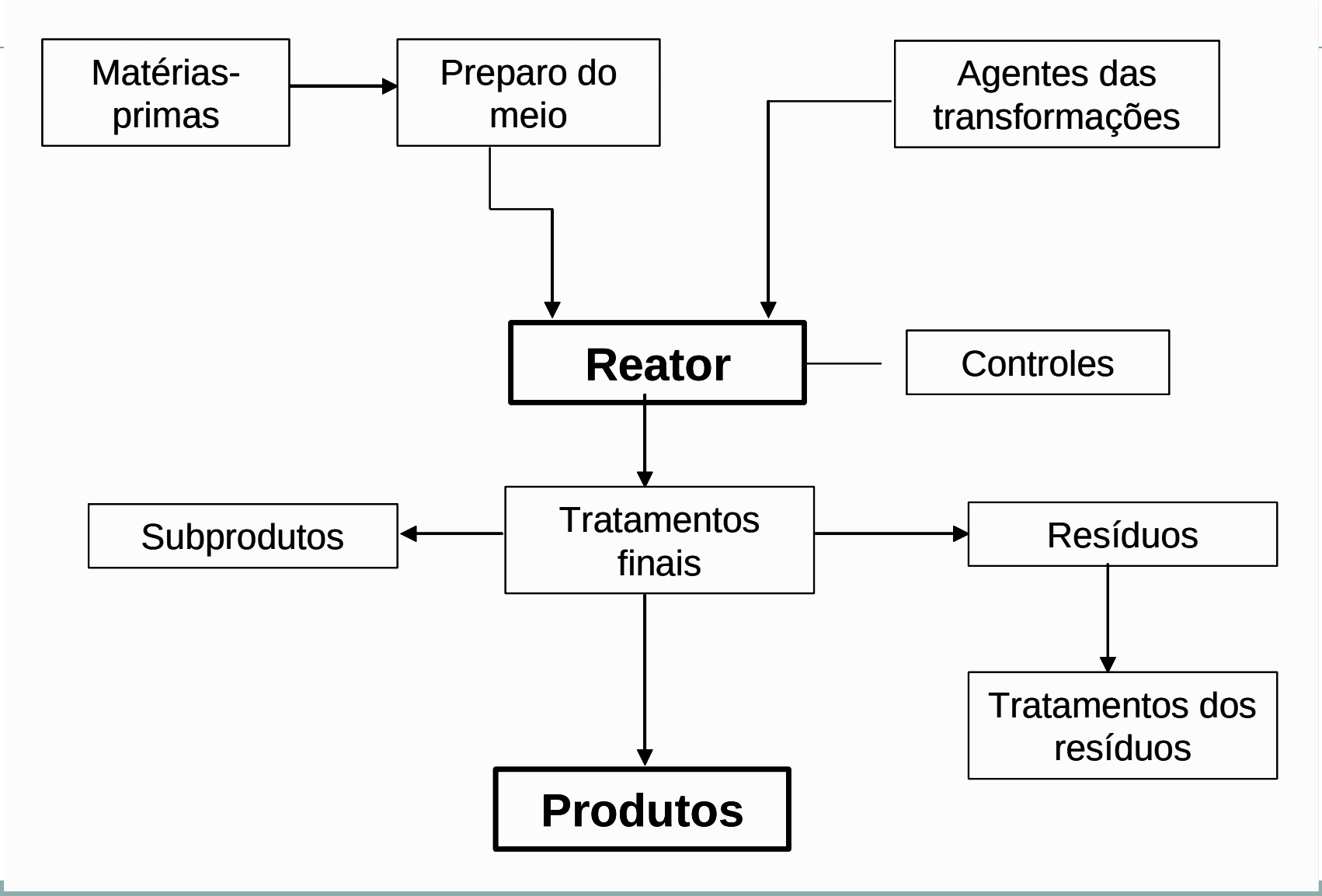


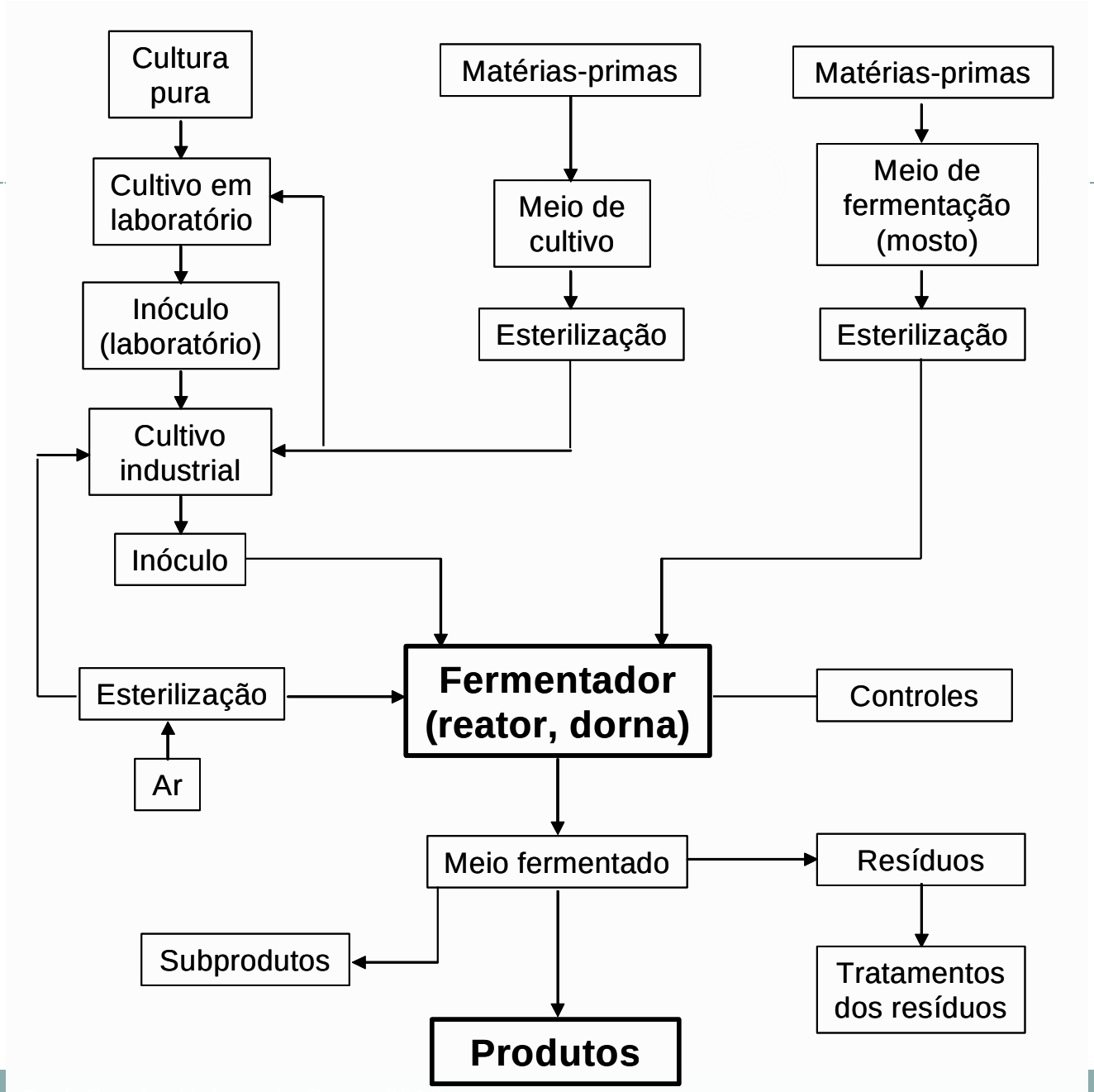
- Vinho e vinagre - 10.000 AC
- Cerveja 5.000 – 6.000 AC Egito
- Pão 4.000 – 7.000 AC Egito
- Queijo e leite fermentado - 5.000 AC
- Soja fermentada - 3.000 AC China

http://dgta.fca.unesp.br/docentes/waldemar/antigos/tecfer/processosfermentativos.PDF

1650 – aparecimento do microscópio
1789 – Antoine Laurent Lavoisier descreve a química da fermentação
1815 – Gay Lussac esclarece a reação da fermentação alcoólica
1836 – 1839 – Berzelius e Liebig formulam a teoria da fermentação como processo catalítico
1857 – Pasteur estabelece a teoria vitalista da fermentação
1871 – Pasteur mostra que o levedo vivo é necessário para a fermentação
1898 – Harold Wager fornece descrições gerais das células de diversas leveduras
1908 – Harden e Young elaboram a equação global da fermentação alcoólica

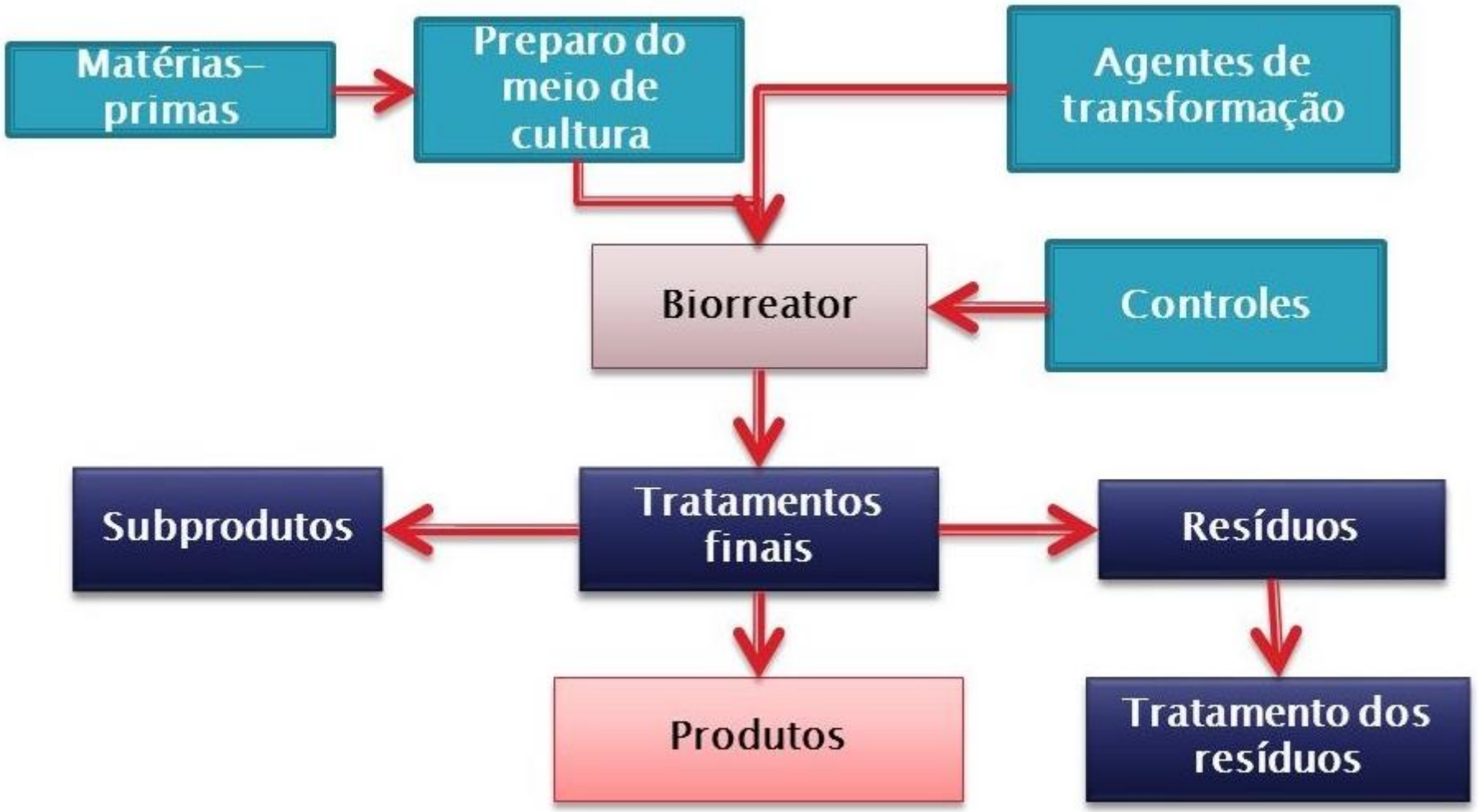
Representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico





Principais etapas de um processo fermentativo industrial genérico

Processo biotecnológico



Processo biotecnológico

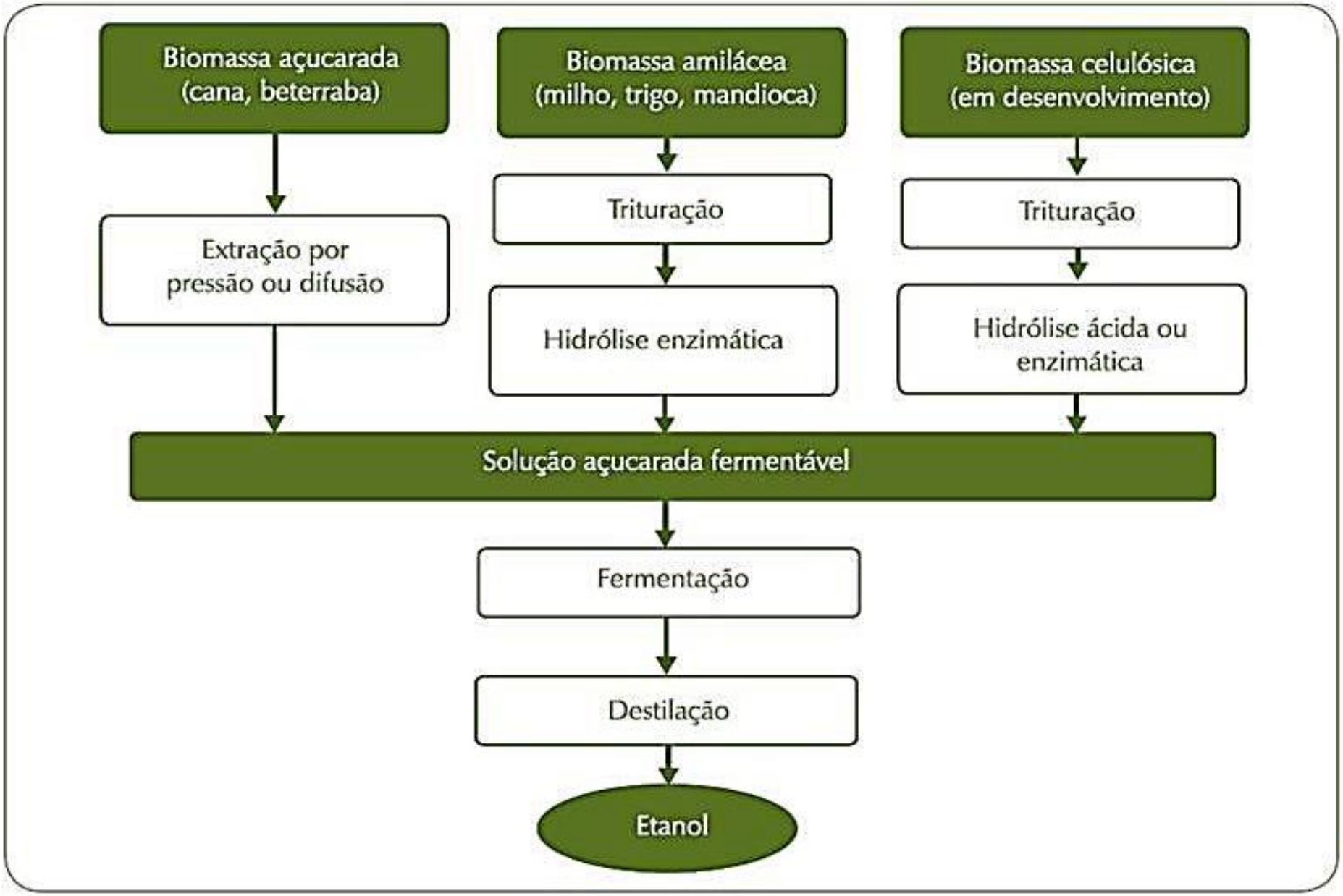
- Tratamentos iniciais – upstream processes
  - MP e meios de cultura
  - agente da fermentação
- Fermentação
  - Reator / fermentador
  - Controles
- Tratamentos finais – downstream processes
  - Métodos de separação
  - Tratamentos de resíduos

Tratamentos iniciais - Matéria Prima e Agentes da Fermentação

Tratamentos iniciais: A. MP

- MP amiláceas
- MP sacarinas
- Celulósicas

- Preparo do mosto



Fonte: Elaboração de Luiz Augusto Horta Nogueira.

A.1 Matérias-primas amiláceas

- Mandioca
- Milho
- Trigo
- Cevada
- Malte

Matéria-prima (requisitos)

(1) teor de açúcar fermentescível

(2) preço de produção de açúcar fermentescível

(3) preço da sua transformação

(4) quantidade existente (grande)

(5) facilidade de aquisição e transporte

(6) balanço energético

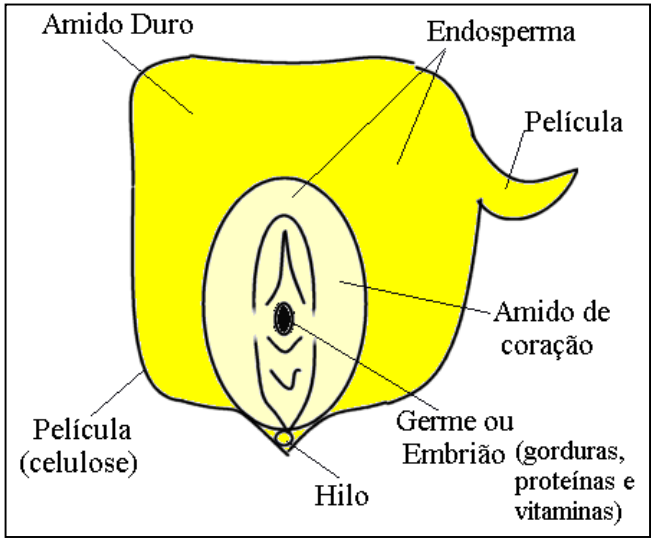


Mandioca (*Manihot esculenta)*

Componentes	Película parda %	Entre casca %	Cilindro central %	Raiz total %
Água	60 – 70 %	70 – 80	60 – 70	60 – 70
Fécula	——	15 – 20	25 – 35	18 – 35
Açúcares	——	0,1 – 0,5	——	——
Celulose	13 – 18	1,0 – 2,0	0,2 – 0,5	0,3 – 1,5
Proteínas	1,3 – 1,8	1,5 – 2,0	0,4 – 0,7	0,5 – 1,5
Mat. Graxas	1,5 – 2,0	0,2 – 0,4	0,1 – 0,2	0,1 – 0,3
Cinzas	2,0 – 3,0	0,7 – 1,0	0,5 – 0,8	0,5 – 1,2
Não dosadas	1,0 – 2,0	2,3 – 2,8	0,1 – 0,2	0,5 – 1,0

Milho (*Zea mays*)

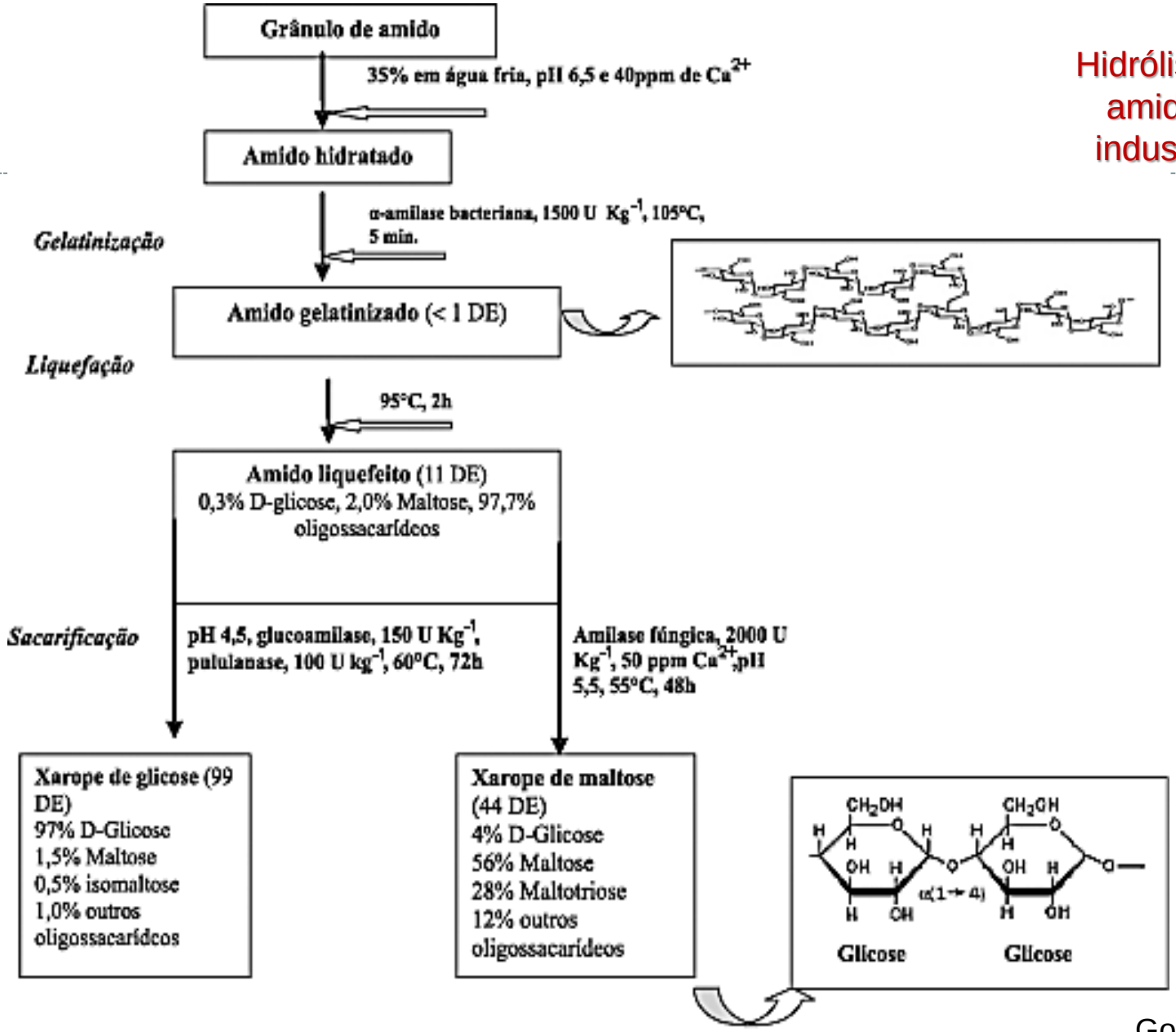




Elemento	Porcentagem
Água	10,5 (9,2 – 15,4)
Sólidos Totais	89,5 (78 – 96)
Carboidratos totais	70,5 (60 – 78)
Amido	66,5 (56 – 78)
Fibras totais	2,5 (2 – 4)
Matéria Nitrogenadas (zeina)	11,0 (6 – 12)
Matéria graxa	4,0 (3,0 – 6,0)
Celulose	3,0 (1,0 – 8,5)
Cinzas, %	1,5 (1,0 – 2,5)
P_2O_5	0,3
K_2O	0,3
MgO	0,11
CaO	0,02
Vitaminas A, B1, B2 e E	Variável

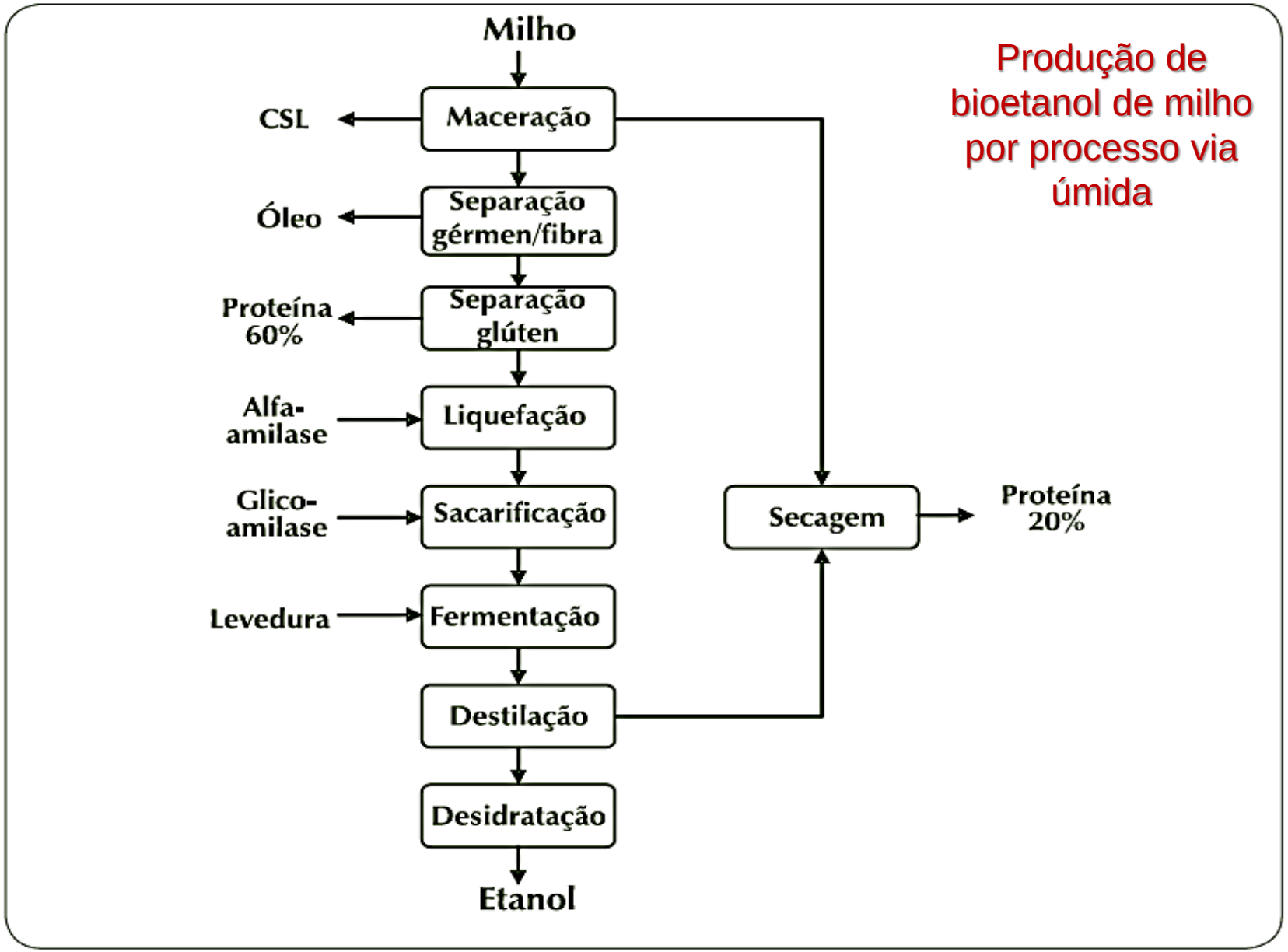
Fonte: Watson (1987), Johnson (1991), Hoseney (1986) e Embrapa Milho e Sorgo (2000).

Hidrólise enzimática do amido na produção industrial de xaropes

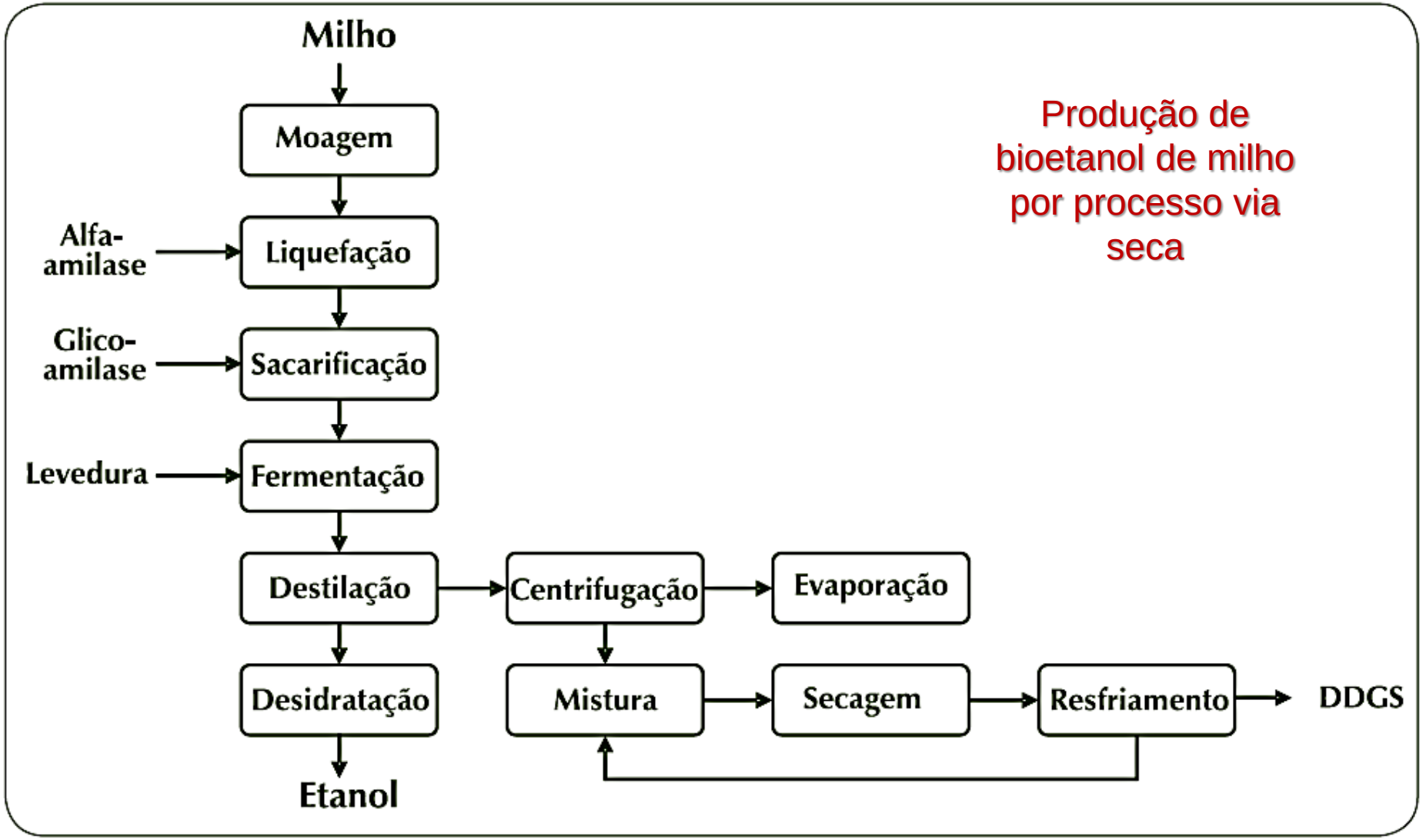


Gomes et al., 2007

Produção de bioetanol de milho por processo via úmida



Fonte: Wyman (1996).



Produção de bioetanol de milho por processo via seca

Fonte: Wyman (1996).



Trigo (*Triticum aestivum*)

Ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial. No Brasil, a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas.

Proteína bruta	7 – 18%
Amido	60 – 68%
Umidade	8 – 18%
Extrato etéreo	1,5 – 2%
Minerais	1,5 – 2 %
Celulose	2 – 2,5%

Lima, 2010 Matérias- primas dos alimentos



Cevada (*Hordeum vulgare*)

- 4º cereal mais colhido no mundo
- Sacarificação ⟶ malte

Composição da semente de cevada e do cereal moído

Sementes	Cevada
Farinha	70,05
Cascas	18,75
Umidade	11,2
	100,0
Farinha	
Amido	67,18
Matéria fibrosa (glúten, amido e lignina)	7,29
Gomas	4,62
Glúten	3,52
Albumina	1,15
Fosfato de cálcio com albumina	0,24
Umidade	9,37
Perdas	1,49
	100,00

A.2 Matérias-primas sacarinas

- Beterraba açucareira



1 Composição centesimal de raiz de beterraba açucareira

Componente	Mínimo	Máximo	Média
Umidade	78	82	80,5
Matéria seca	17	21	19,5
Cinza	0,9	1,25	1,13
Fibra e celulose	1,52	2,2	1,90
Matéria graxa	0,28	0,47	0,30
Açúcares	12,5	16,7	14,5
Material nitrogenado	1,11	2,6	1,32
Nitrogênio	0,178	0,41	0,26

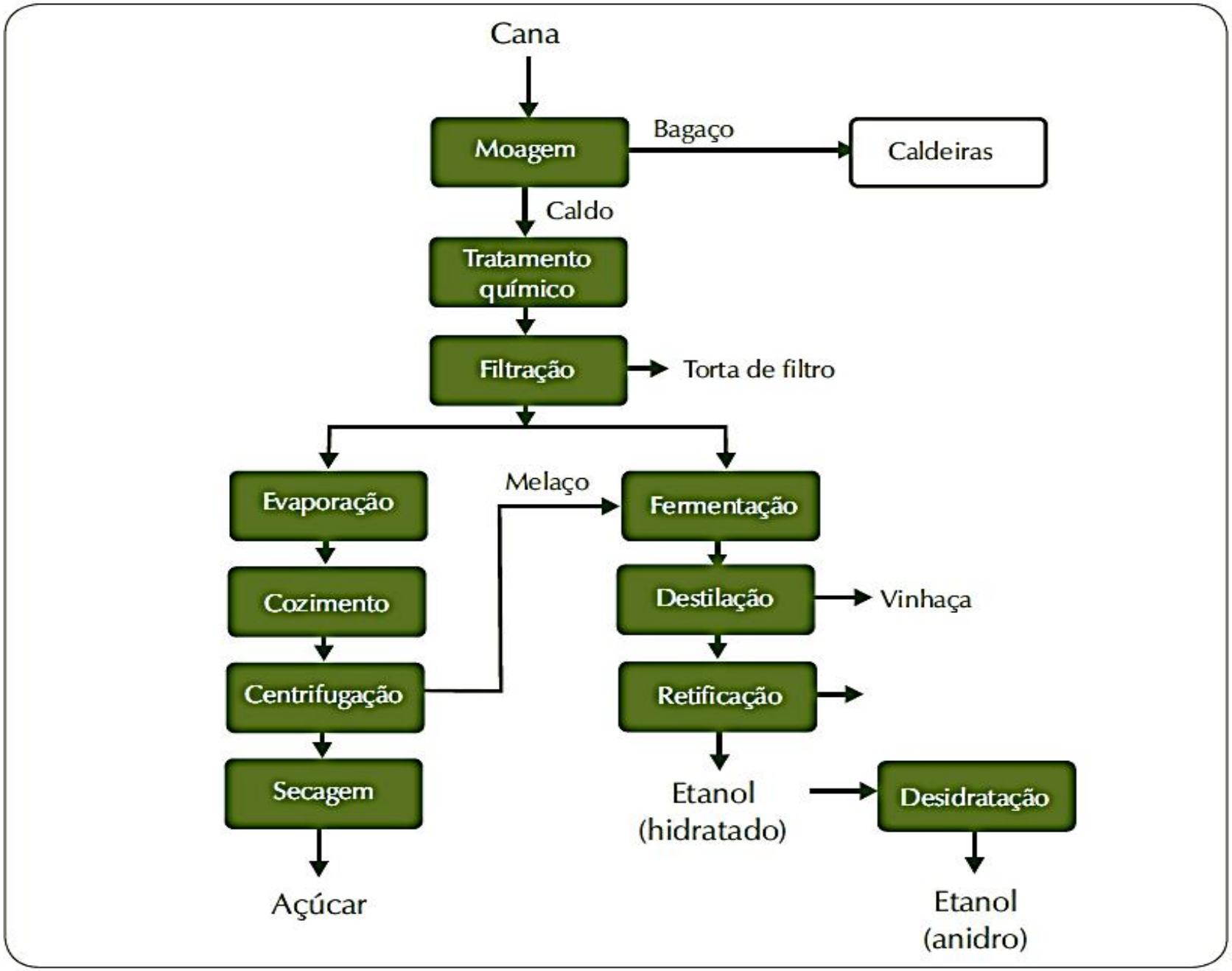
Fonte: HORSIN-DÉON, 1900.

Matérias-primas sacarinas

- Cana-de-açúcar



Elementos		Valores Médio (%)
Água, %	69 – 75 Variação (1)	74
Açúcares, %	12 – 20	13,5
Sacarose, %	11 – 18	12,2
Glicose, %	0,2 – 1	0,70
Levulose, %	0,2 - 0,5	0,40
Fibra, %	11 - 13	12,5
Celulose, %	6 – 8	6,88
Lignina, %	2 – 3	2,50
Pentosana (xilana), %	2 – 3	2,50
Goma (arabana), %	0,4 – 0,7	0,62
Cinzas, %	0,35 – 0,8	0,65
SiO_2, $mg.Kg^{-1}$		0,33
K_2O, $mg.Kg^{-1}$	1200 - 2500	0,16
P_2O_5, $mg.Kg^{-1}$	60 – 300	0,09
CaO , $mg.Kg^{-1}$	100 – 350	0,03
SO_3, $mg.Kg^{-1}$	120 – 300	0,03
N , $mg.Kg^{-1}$	200 – 600	0,01
MgO , $mg.Kg^{-1}$	44 - 200	0,01
Matéria Nitrogenadas, $mg.\ Kg^{-1}$	200 - 600	0,40
Aminoácidos (como ác. Aspático), %	0,10 a 0,30	0,20
Albuminóides, %	0,07 a 0,15	0,12
Amidas, %	0,03 a 0,11	0,07
Gorduras e Ceras, $mg.\ Kg^{-1}$	150 - 350	250
Substâncias pécticas, gomas e muscilagem	150 - 250	200
Ácidos Orgânicos, $mg.\ Kg^{-1}$	100 – 550	150



Fonte: Seabra (2008).

SUBSTRATOS PARA FERMENTAÇÃO

1. Fontes de carbono:

Carboidratos

- ✓ Cana de açúcar, sorgo sacarino, etc.
- ✓ Frutas - uva, laranja, jabuticaba, etc.
- ✓ Malte - cevada, trigo, milho, etc.
- ✓ Melaço - subproduto da fabricação do açúcar
- ✓ Licor sulfítico - subproduto da fabricação do papel
- ✓ Lígno-celulósicos - palha, bagaço cana, resíduos madeira
- ✓ Carboidratos puros - açúcares e amidos - preços elevados

Óleos vegetais - soja, algodão, palma - co-substratos

Álcoois - etanol, metanol

Alcanos - C12 – C14

2. Fontes de nitrogênio

- ✓ Inorgânico - amônia e sais de amônio
- ✓ Orgânica
  - ✓ Líquido de maceração de milho - subproduto amido
- ✓ Farinha de soja - subproduto da fabricação de óleo
- ✓ Extrato de levedura - preço elevado
- ✓ Peptonas - preço elevado
- ✓ Uréia - adubo

Tratamentos iniciais:
B. PREPARO DO MOSTO

- Líquido açucarado passível de ser fermentado
- Cuidados:
  - Concentração de açúcares totais
  - Acidez total e pH
  - Suplementação com nutrientes

Preparo do mosto

→ condicionar a MP p/ atender as exigências da fermentação

(Objetivos)

- ✓ eliminar impurezas grosseiras;
- ✓ eliminar partículas coloidais;
- ✓ preservar os nutrientes e equilibrá-los (vitaminas, aminoácidos, etc.);
- ✓ redução da formação de espuma;
- ✓ reduzir a contaminação microbiana;
- ✓ teores adequados de Brix e açúcar total (sólidos), através de sua concentração;
- ✓ controle da acidez do meio (indireto - pH 2,5 de cuba) de da temperatura.
- ✓ Remoção dos gases (bolhas aderidas aos flocos, reduzem a velocidade de decantação)

<u>Conseqüências dos cuidados no tratamento do caldo</u>

- maior eficiência do processo;
- economia de vapor e água;
- proteção dos equipamentos;
- continuidade do processo fermentativo em paradas eventuais de moagem.

Mosto Ideal

(1) Brix e Açúcares Totais

Brix - 14 a 28*% → outras MP e Melaço esgotado → equilíbrio multiplicação/ fermentação

AT - 10 a 18%

(2) Acidez total e pH

* outras MP e melaço esgotado

levedura vs. bactérias { pH - 4,5; Acidez - 2,0 a 2,5 g/L (sulfúrica)

(*Saccharomyces* e *Hansenulas*) dos grupos do ácido lático e acético

(3) Nutrientes

Principais nutrientes e suas funções (fonte: Rodney e Greenfield (1984))

Nutrientes	Funções
K	Ativador enzimático inclusive de reações da glicólise; estabilizador de membranas; necessário para a absorção do H2P04 aumenta a tolerância para iônios tóxicos, inclusive H, controlando o pH intracelular; participa da absorção, por troca, de catiônios bivalentes (Zn e Co).
Mg	Ativador enzimático no processo glicolítico de transferases e carboxilases; estimula a absorção de H2P04 incrementando a fermentação; mantém a integridade e permeabilidade das membranas e regula o transporte de catiônios bivalentes. Sofre ação antagônica do Ca++.
Ca	Parece não ser importante para fermentações e multiplicação. Mantém integridade da membrana plasmática em condições adversas. Ativa ATPase em concentração 1 mM, mas se mostra inibidor a 10 mM. Inibe absorção de aminoácidos em conc. de 1 mM e inibe o crescimento em conc. de 25 mM.
Ti	Participa da glicólise e da síntese de vitaminas, sendo essencial ao crescimento e á fermentação. Não é substituído por nenhum outro íon em suas funções; é integrante de desidrogenases, aldolases e desulfidrases. A absorção é reduzida, em pH abaixo de 5 e é efetuada mediante troca com 2 íons K+.
Mn	Estimula a síntese de proteínas e tiamina; aumenta o teor de desidrogenase.
Fe	Participa do sitio ativo de diversas enzimas (hemoenzimas). Requerido para multiplicação na concentração de 1 a 3 µM. Concentrações de 10 a 15 µM inibem crescimento e fermentação.
Cu	Integrante de algumas enzimas; em concentrações de 1 a 1,5 µM estimula fermentação e crescimento, já em conc. de 10 µM inibe o crescimento
Mo. Co, B	Estimulam crescimento e fermentação em baixas concentrações (1µM). Inibição com concentrações acima de 5µM.

(4) Compostos Nitrogenados
Levedura vs. Assimilação

NH_4 > amídica
(40 - 70 mg/L)

Distribuição de % de nitrogênio amínico em relação ao nitrogênio total:

Aminoácidos	%
Arginina	11,0
Histidina	3,0
Lisina	11,4
Cistina	1,6
Triptofano	0,9
Tirosina	2,5

(5) Vitaminas
Preferência vs. Velocidade enzimática

Vitaminas do complexo B (B1/B6)

CO → síntese da vitamina B_{12}

(6) Temperatura
26 a 30°C (até 35°C)

(7) Antissépticos

- reduz a viabilidade bacteriana e multiplicação

Ac. Sulfúrico e antibiótico (Kamuran)

Mosto

- Condições ótimas:
  - temperatura, pH, nível de oxigênio dissolvido, etc.
- fontes dos elementos “principais”
  - C, H, O, N
- fontes dos elementos “secundários”
  - P, K, S, Mg
- vitaminas e hormônios
- fontes de elementos “traços” (quantidades mínimas)
  - Ex. Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, etc.

Meio de cultivo

- **Meios naturais** = a partir de extratos de plantas ou animais. Composição indefinida e variável.
- **Meios sintéticos** = meios quimicamente definidos

- Industrialmente $\Rightarrow$ custo do substrato é crucial
- Outros: suprimento do substrato, disponibilidade, transporte, etc.

- Alguns substratos utilizados: açúcares, melaços, soro de leite, celulose, amido, resíduo como água de maceração de milho, metanol, etanol, alcanos, óleos e gorduras, etc.

MICRORGANISMOS INDUSTRIAIS

Tipos de micro-organismos

- ✓ Bactérias - procariotos, quimioorganotróficos
- ✓ Fungos - eucariotos, quimioorganotróficos
  - ✓ Bolores
  - ✓ Leveduras

C. Agentes da Fermentação: LEVEDURAS

- Fungos do Filo Ascomycetes, da classe *Hemiascomycetes*
  - ordem principal da *Saccharomycetales*
  - 10 famílias no mínimo

- Genoma de *Saccharomyces cerevisiae*
  - Sistema modelo da genética molecular
  - mecanismos básicos de replicação são convertidas na recombinação.

→ **Família 9:** Saccharomycetaceae

gêneros

Arxiozyma, Citeromyces, Debaryomyces, Dekkera, Holleya, Kazachstania, Kodamaea, Lodderomyces, Pachysolen, Saturnispora, Starmera, Tetrapisispora, Williopsis, Zygosaccharomyces,

Espécies

Issatchenkia - *Issatchenkia terricola (Torulopsis dattila)*

Kluyveromyces - *Kluyveromyces thermotoleraes (Torulopsis dattila)*

Pichia - *Pichia etchellsii, P. spartinae, P. ohmeri, P. terricola*

Saccharomyces { *Saccharomyces cervisiae, S. bayanus, (estirpes: S. uvarum, S. chevalieri, S. beticus, S. capensis), S. cariocus, S. castellii, S. globosus.*

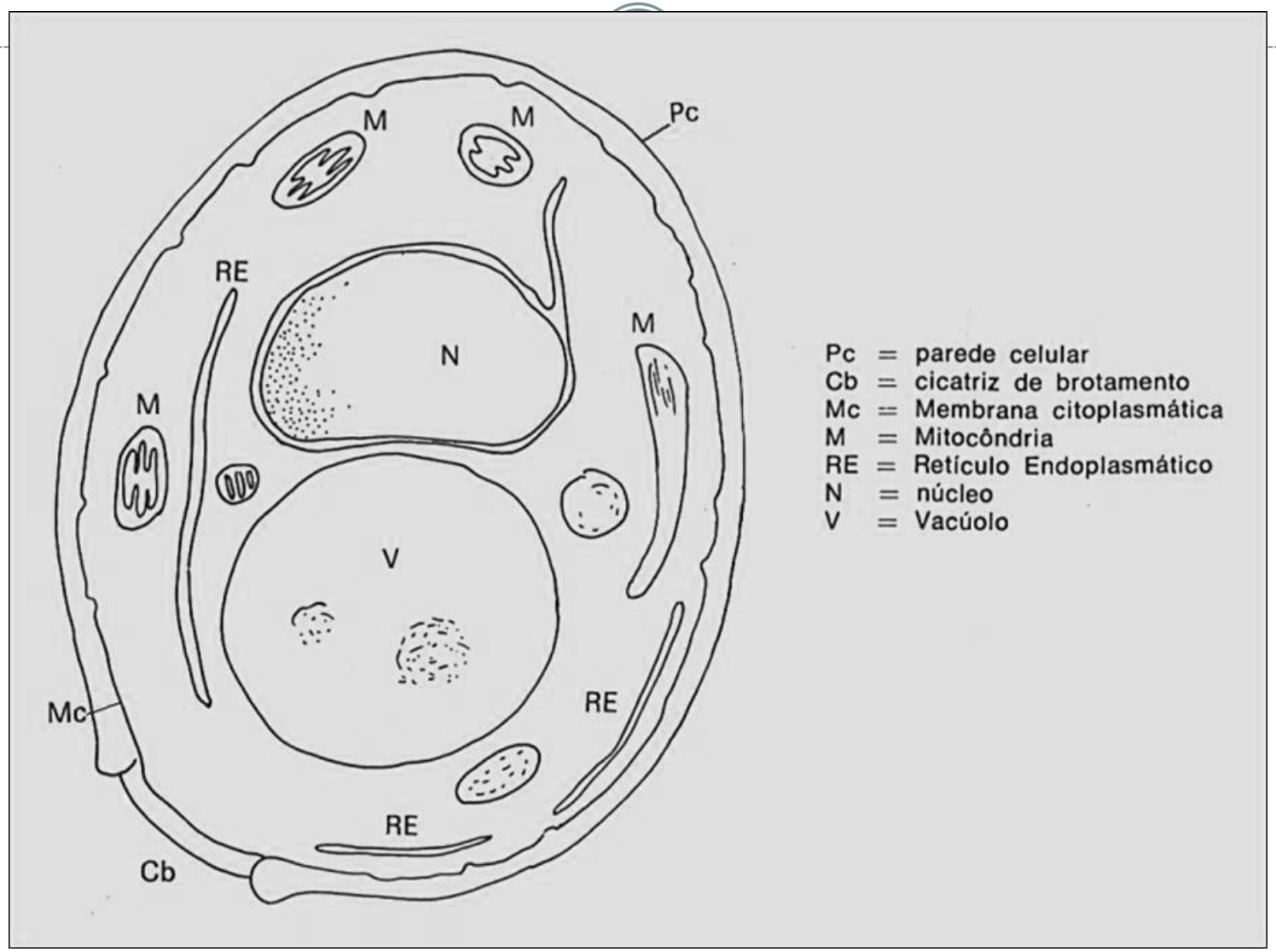
Toluraspora - *Torulaspora pretoriensis (Saccharomyces pretoriensis)*

MORFOLOGIA DAS LEVEDURAS

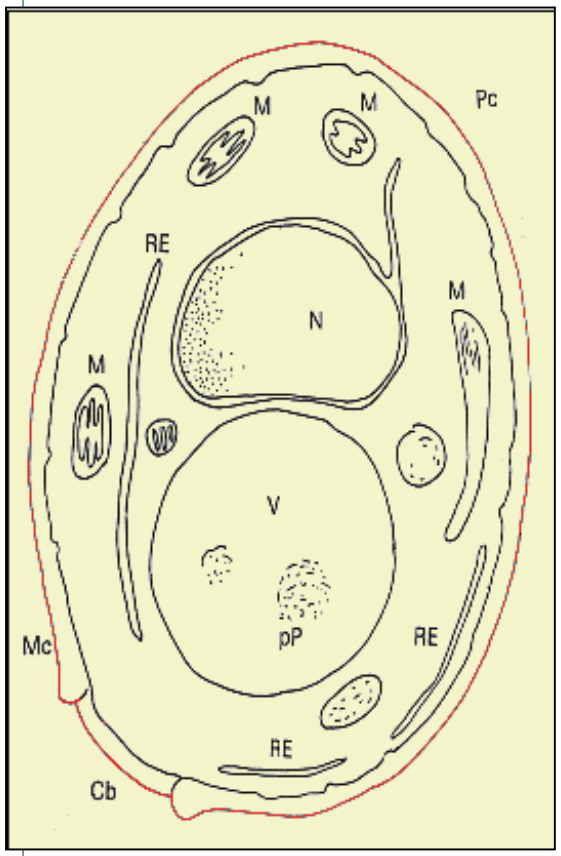
- leveduras → unicelulares, frequentemente ovais, arredondadas e as elípticas.
  - Comprimento: 5 - 16 micra
  - largura: 3 - 7 micra
  - afetado por deficiências: nutrientes, (P e Mg), vitaminas (biotina, niacina, ác. pantotênico e piridoxina).
    - Obs: 5 vezes maior que bactérias.
      - permite a separação na centrifugação

CITOLOGIA

Diagrama de uma célula de *S. cerevisiae*

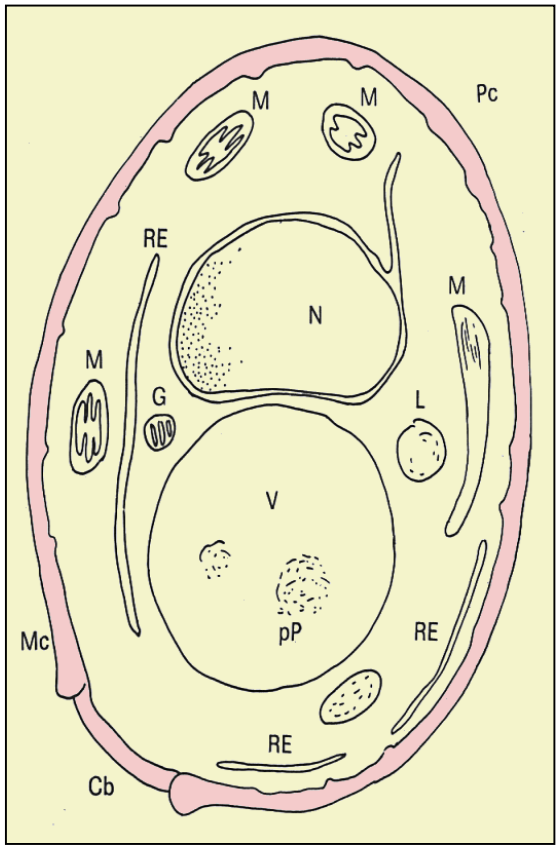


(1) Parede celular → 30% peso seco/célula;

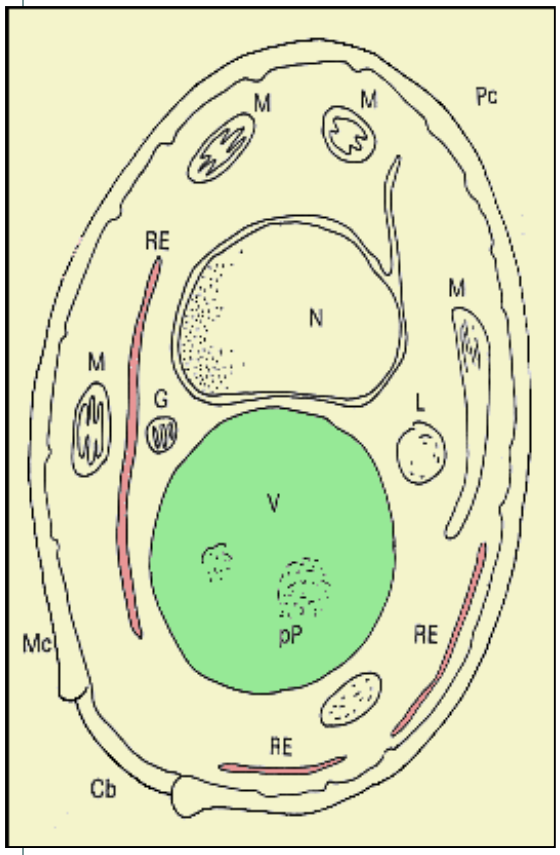


- composição: polímeros de glucana (“celulose”), manana(“goma”), quitina, lipídeos, fosfatos e esteróides.
- Aspecto: <u>Poroso</u> (filtros)/ seletividade, propriedades para substâncias < 4800 (peso molecular) até sítio de absorção.
- <u>Enzimas Extracelulares</u>: invertase, melibiase, glucoamilase, etc. (translocação e desdobramento das fontes para utilização pelo citoplasma).

(2) Membrana citoplasmática ou plasmalema



- Posição: abaixo da parede celular e delimita em seu interior todas as microestruturas e o hialoplasma.
- Integridade e estabilidade → cátions inorgânicos (Mg^{2+}, Ca^{2+} e K^{+}).
- Permeabilidade seletiva (controle de translocação de compostos do meio externo ao interior da célula e vice-versa).

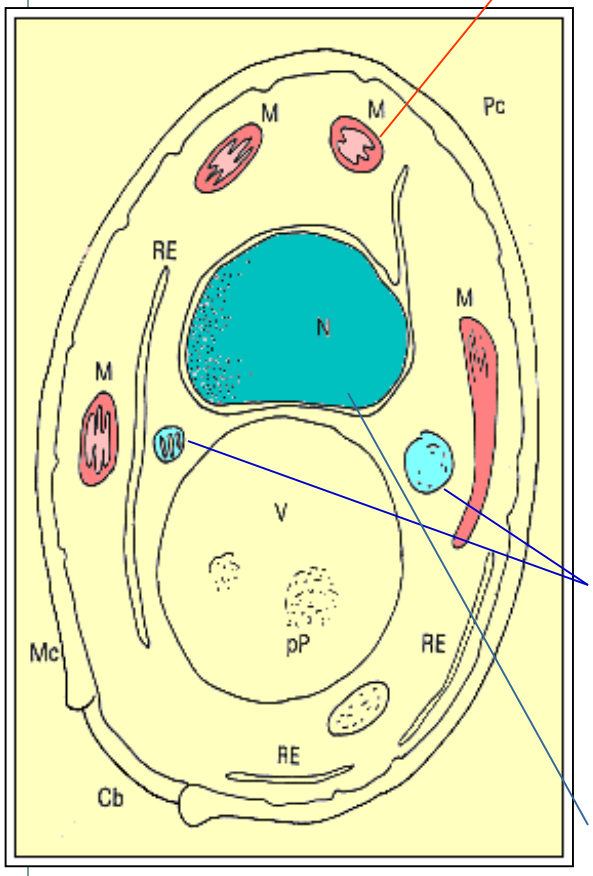


(3) Retículo Endoplasmático

- Ligada à síntese de proteínas.

(4) Vacúolo

- Membrana vacuolar → natureza lipoprotéica.
- Armazenador temporário { polifosfatos e lipídeos; enzimas



(5) Mitocôndria

- pequenas organelas com membrana dupla com "invaginações internas" (cristas);
- a função é conversão da energia aeróbica (ATP); síntese de proteínas e RNA.

(6) Ribossomos

- ligado à síntese protéica.

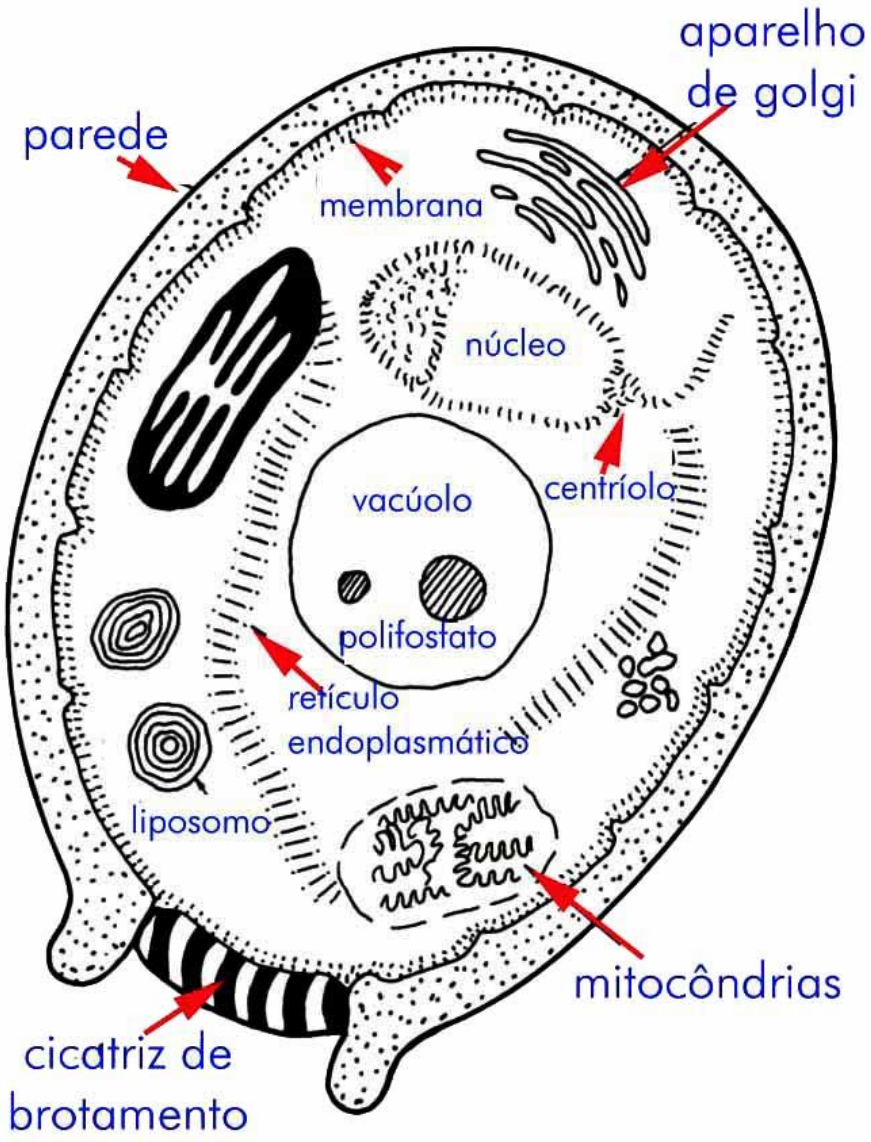
(ocorre no citoplasma)

(7) A célula contém reserva de nutrientes.

- Glicogênio, lipídeos,...

(8) Núcleo

- cromossomos que são desoxiribonucleoproteínas e ribonucleoproteinas.



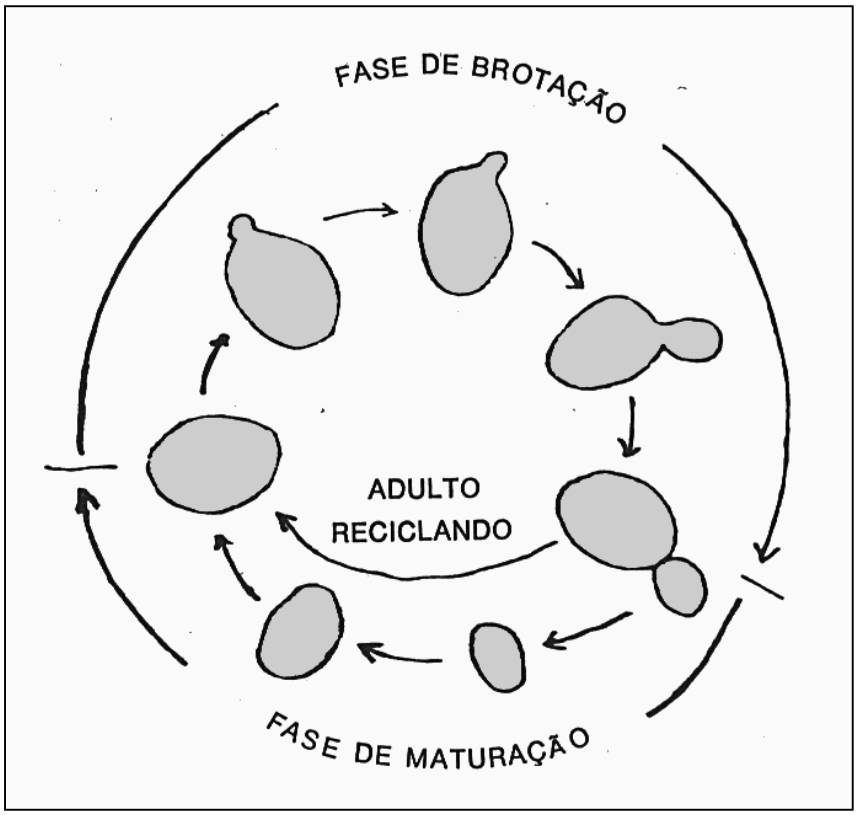
Estruturas de uma levedura típica, como a *Saccharomyces cerevisiae*

REPRODUÇÃO EM LEVEDURAS

(a) brotamento ou gemulação (multiplicação vegetativa) - assexuado -

(b) esporulação (formação de “ascos”) - sexuados sob estresse -

(a) <u>brotamento</u>

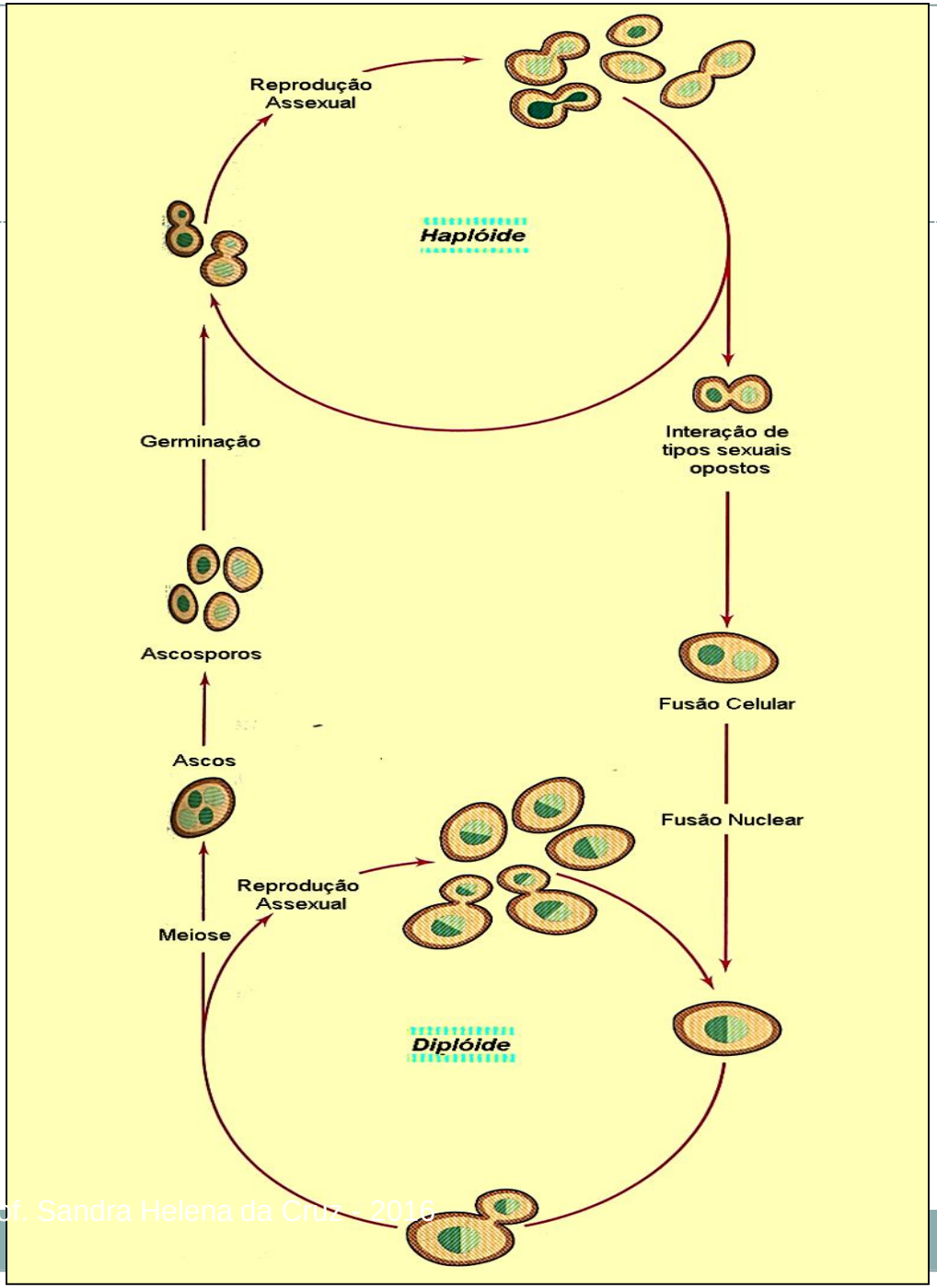


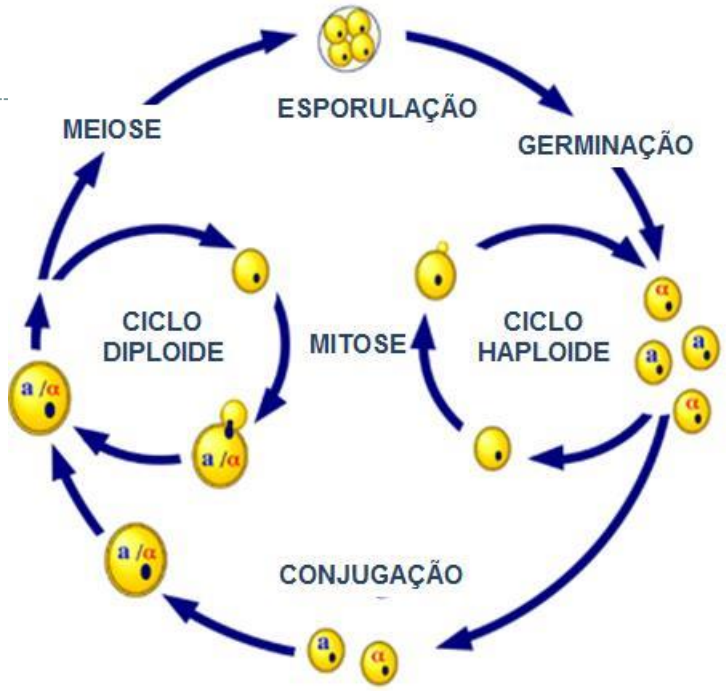
Ciclo vegetativo de leveduras alcoólicas.

(Horii, 1980)

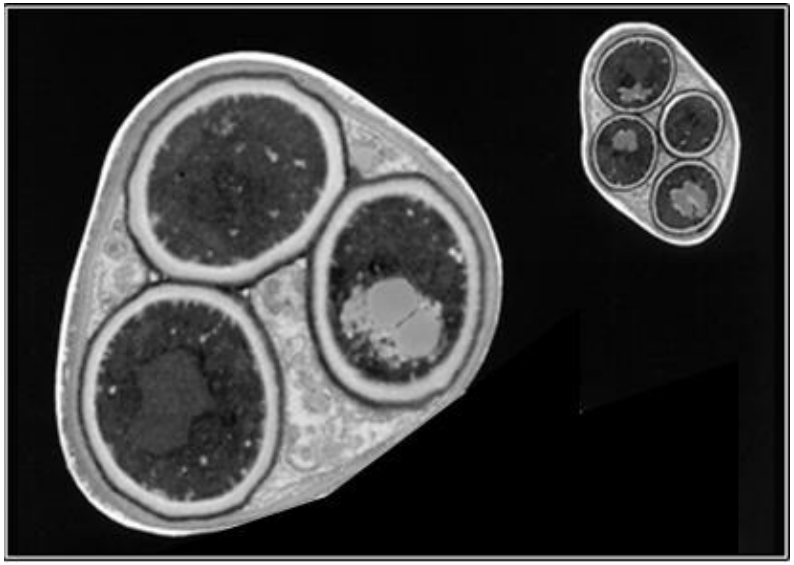
Ciclo vital de *S. cerevisiae*

(Bergey´s Manual, 2000)





Esquema representando o ciclo de vida de *S. cerevisiae*.
Fonte: Lucas C

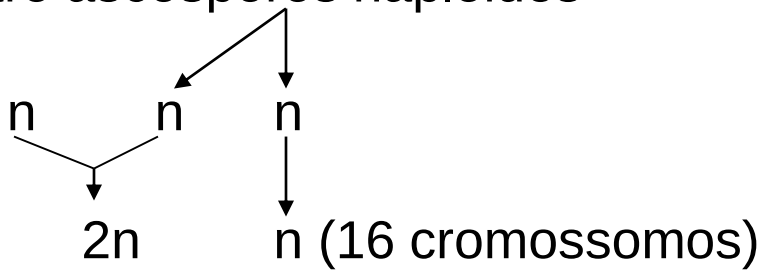


Micrografia de microscopia electrónica mostrando 2 ascos de *S. cerevisae*, um deles tendo perdido o 4º esporo
Fonte: Adaptado de Pack & Segal (2002) Mol. Cell. Biol. 22(18): 6430-6440

(b) Esporulação (reprodução)

<u>Ascomycetos</u> → ascosporos “ascos”:

Núcleo → Meiose → quatro ascosporos haplóides “ruptura do asco”



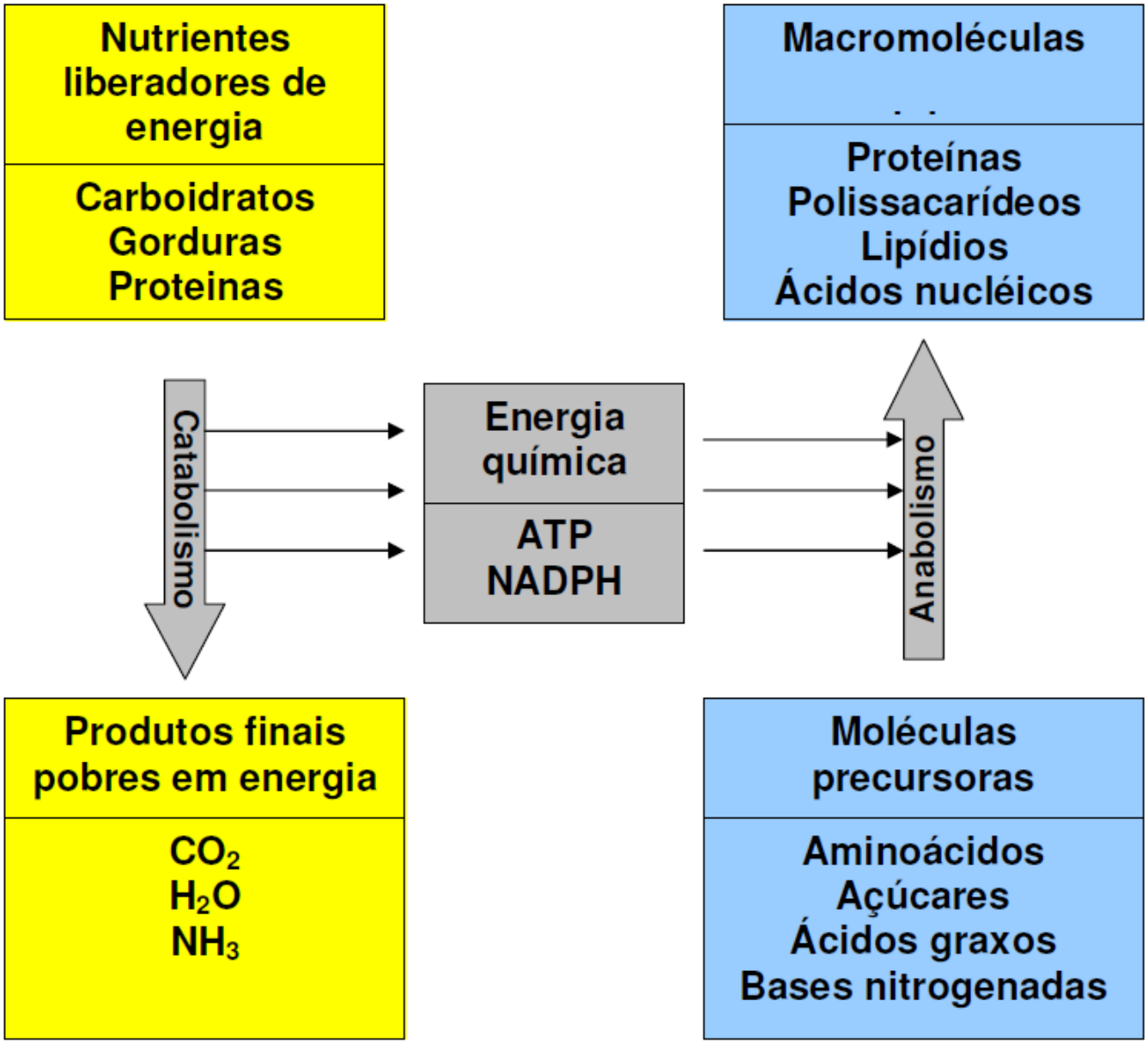
Metabolismo microbiano

Metabolismo $\Rightarrow$ Toda atividade química realizada pelos microrganismos.

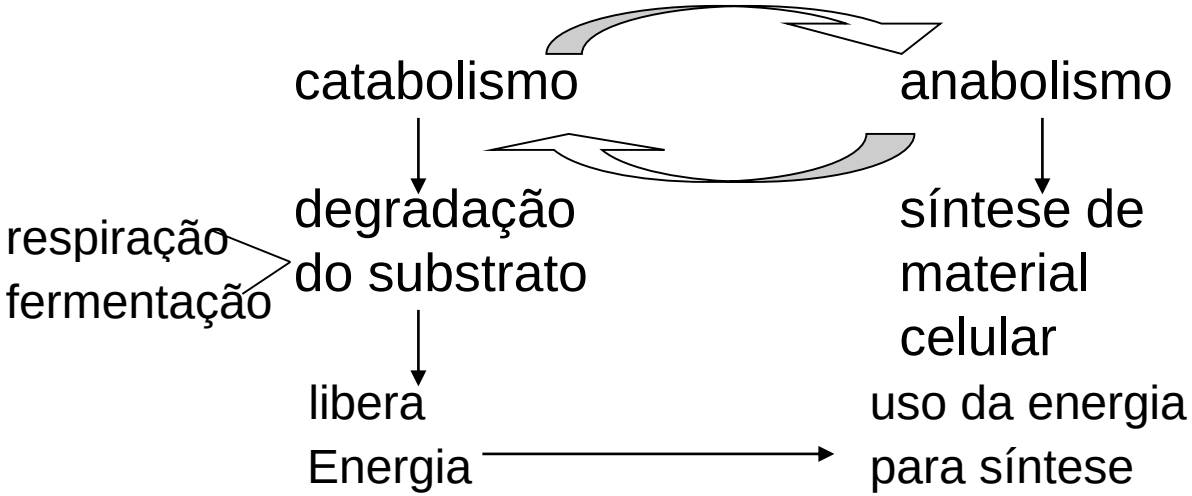
Dois tipos de Atividade

- -Liberação de energia;
- - Utilização de energia.

Metabolismo microbiano



Metabolismo de levedura



(1) Respiração → oxidação biológica de substratos orgânicos sob sistemas multienzimáticos que catalisam a oxidação → transporte de elétrons na cadeia respiratória onde há ativação do oxigênio (aceptor e-) e formação de água.

(2) Fermentação → reações em que compostos orgânicos atuam como substratos e como agentes de oxidação, em uma seqüência ordenada de reações enzimáticas.

Respiração celular

Processo de produção de energia a partir da degradação completa de compostos orgânicos energéticos (ex.: glicose) à compostos inorgânicos (ex.: H_2O e CO_2).

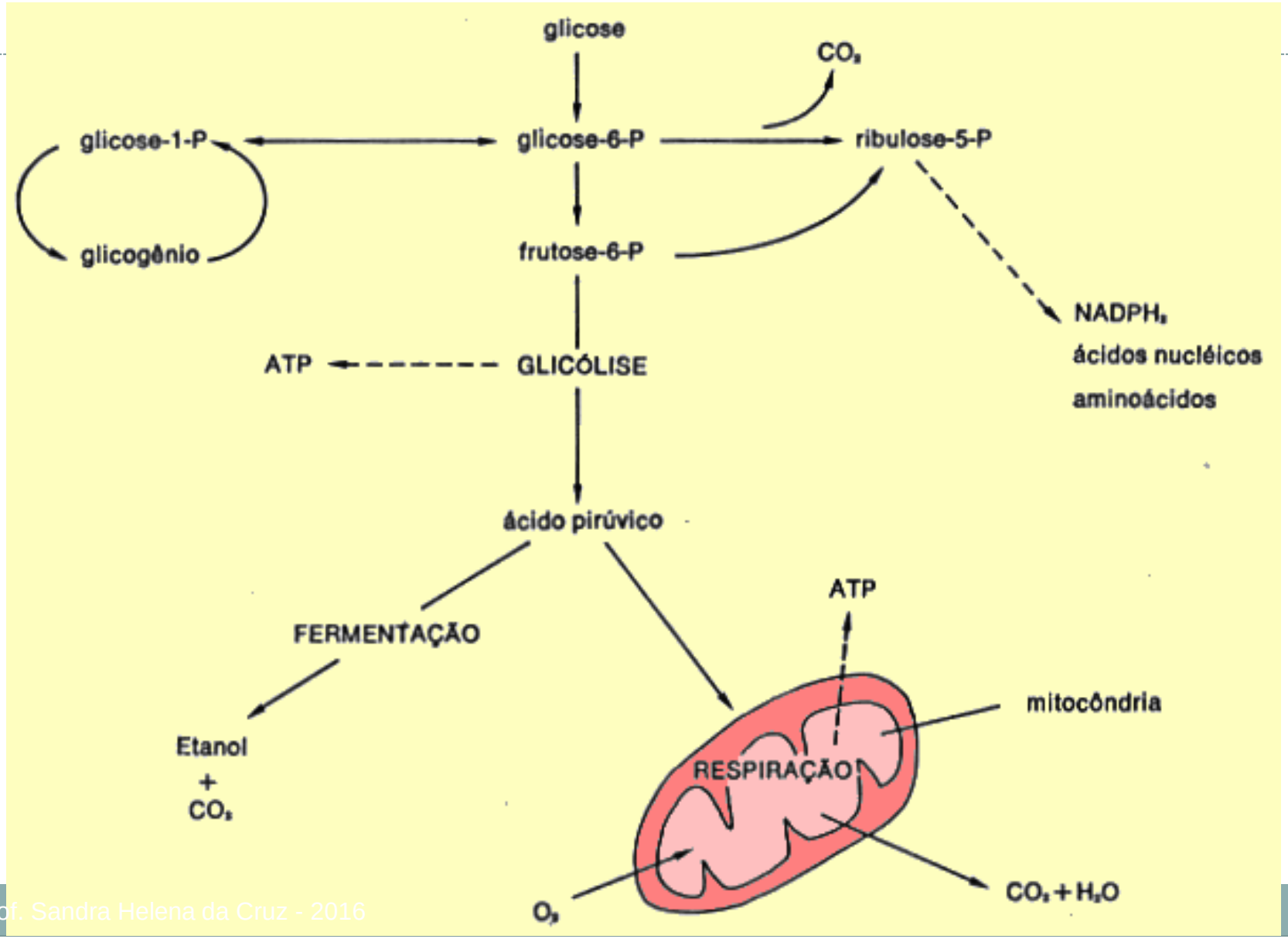
– Com participação de oxigênio: Respiração Celular Aeróbica

– Sem participação de oxigênio: Respiração Celular Anaeróbica

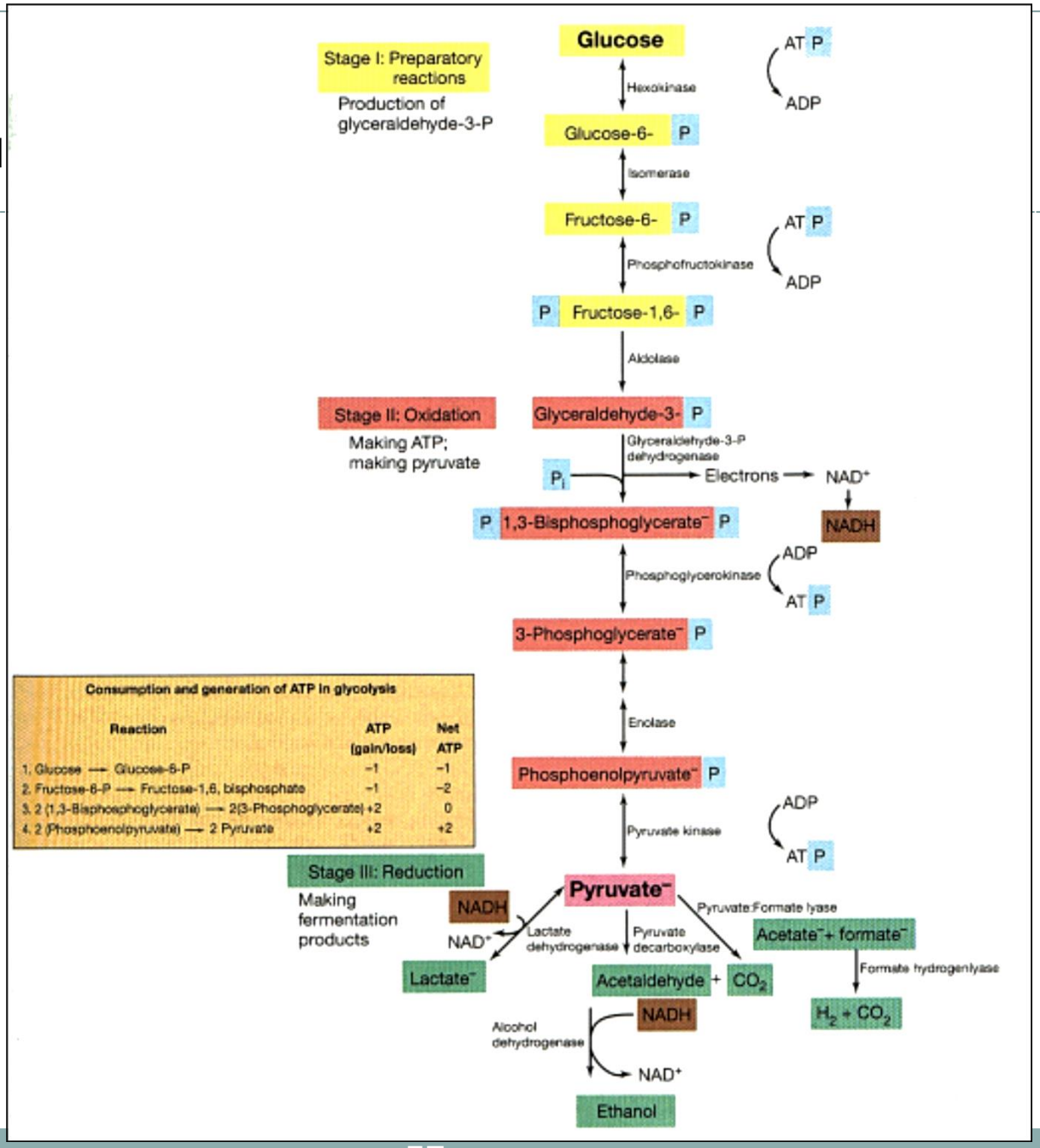
FERMENTAÇÃO

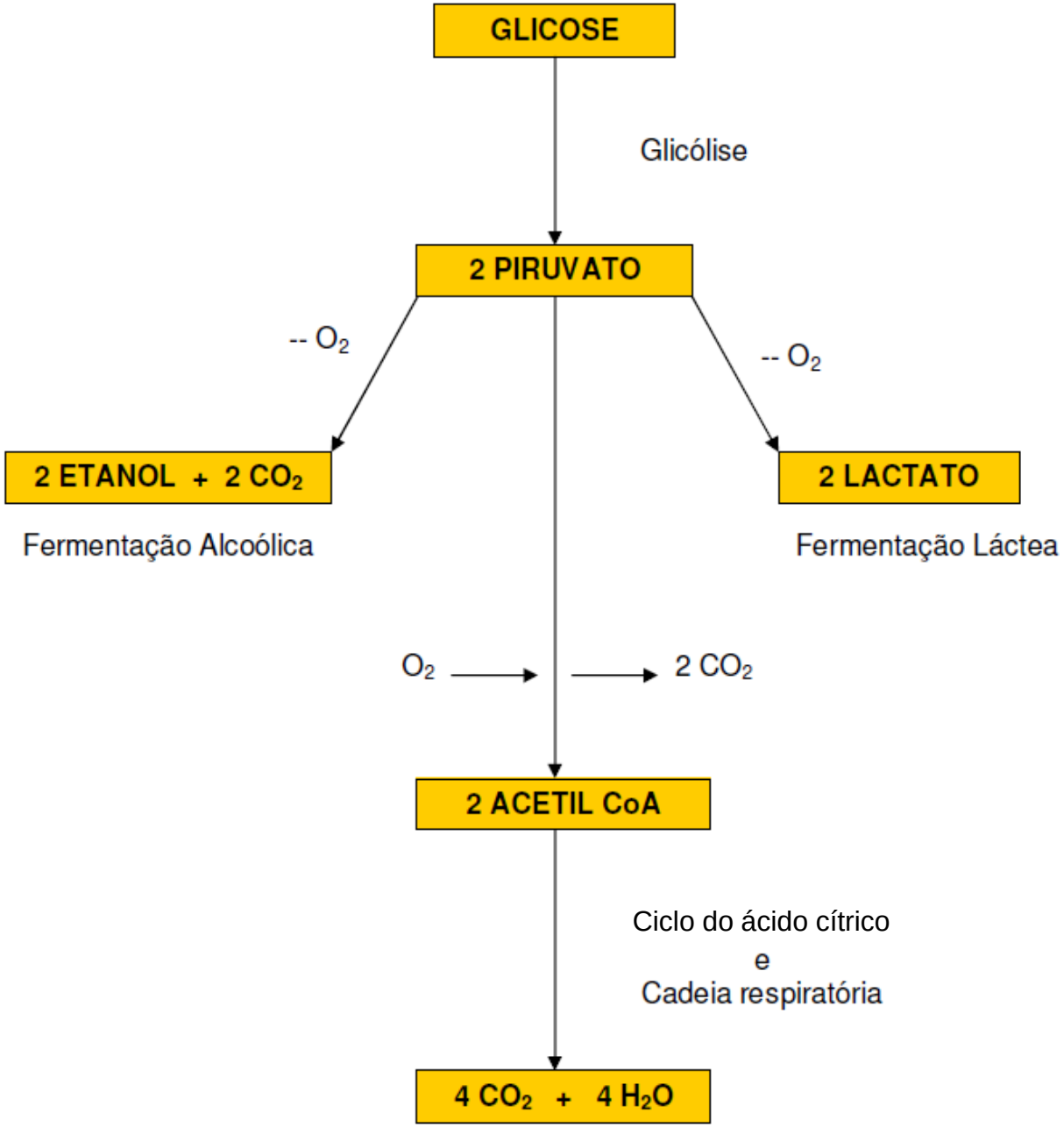
Mecanismo anaeróbio de produção de energia que não envolve cadeia respiratória ou citocromos

Esquema representando o interrelacionamento das vias de degradação de carboidratos e a produção de etanol

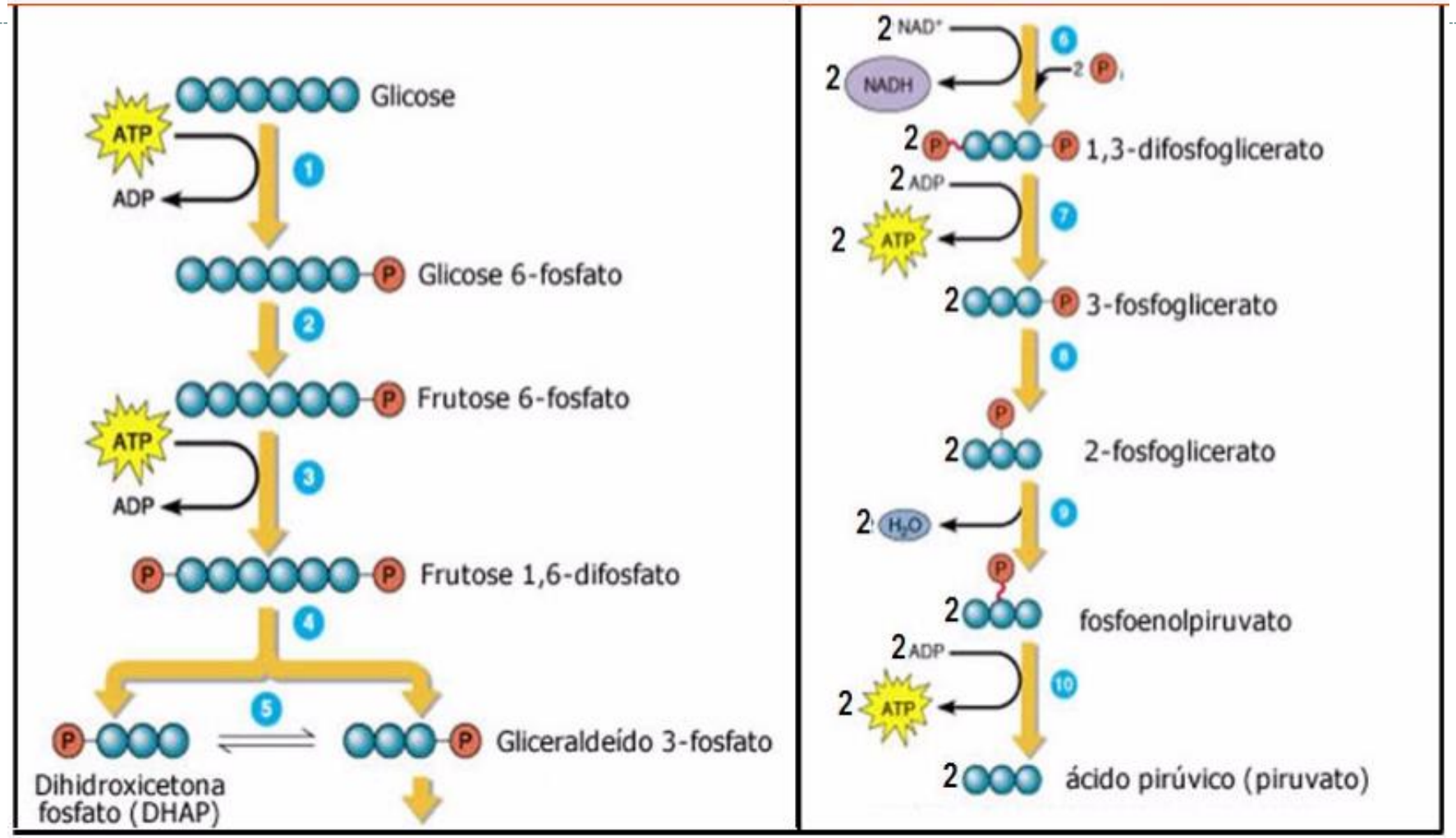


Bergey´s Manual (2000)

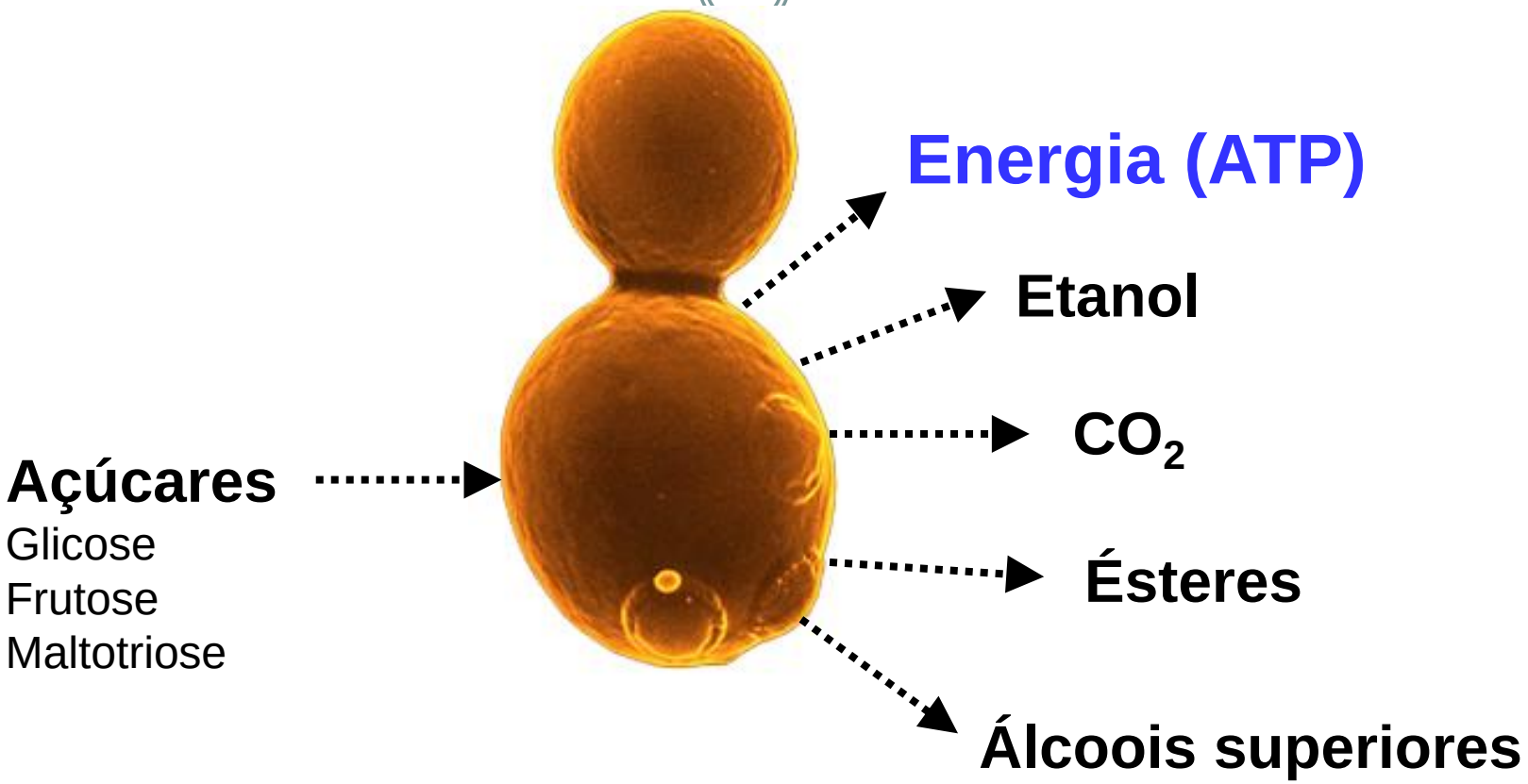



GLICOSE
Glicólise
2 PIRUVATO
-- O_2
-- O_2
2 ETANOL + 2 CO_2
2 LACTATO
Fermentação Alcoólica
Fermentação Láctea
O_2
2 CO_2
2 ACETIL CoA
Ciclo do ácido cítrico
e
Cadeia respiratória
4 CO_2 + 4 H_2O

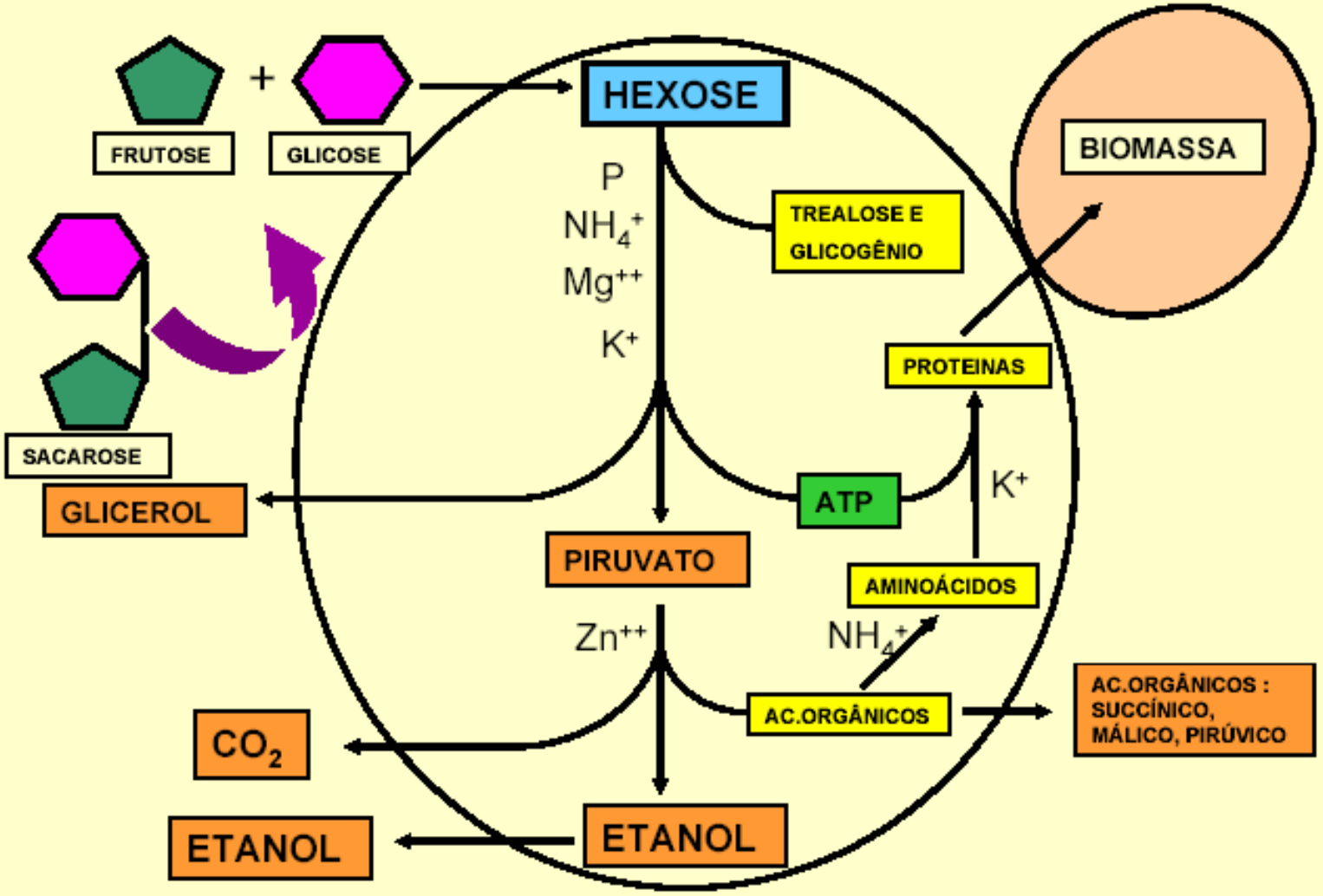
Glicólise



http://docplayer.com.br/13036805-Metabolismo-energetico-respiracao-celular-fermentacao-fotossintese-quimiossintese.html


Energia (ATP)
Etanol
CO_2
Ésteres
Álcoois superiores
Açúcares
Glicose
Frutose
Maltotriose

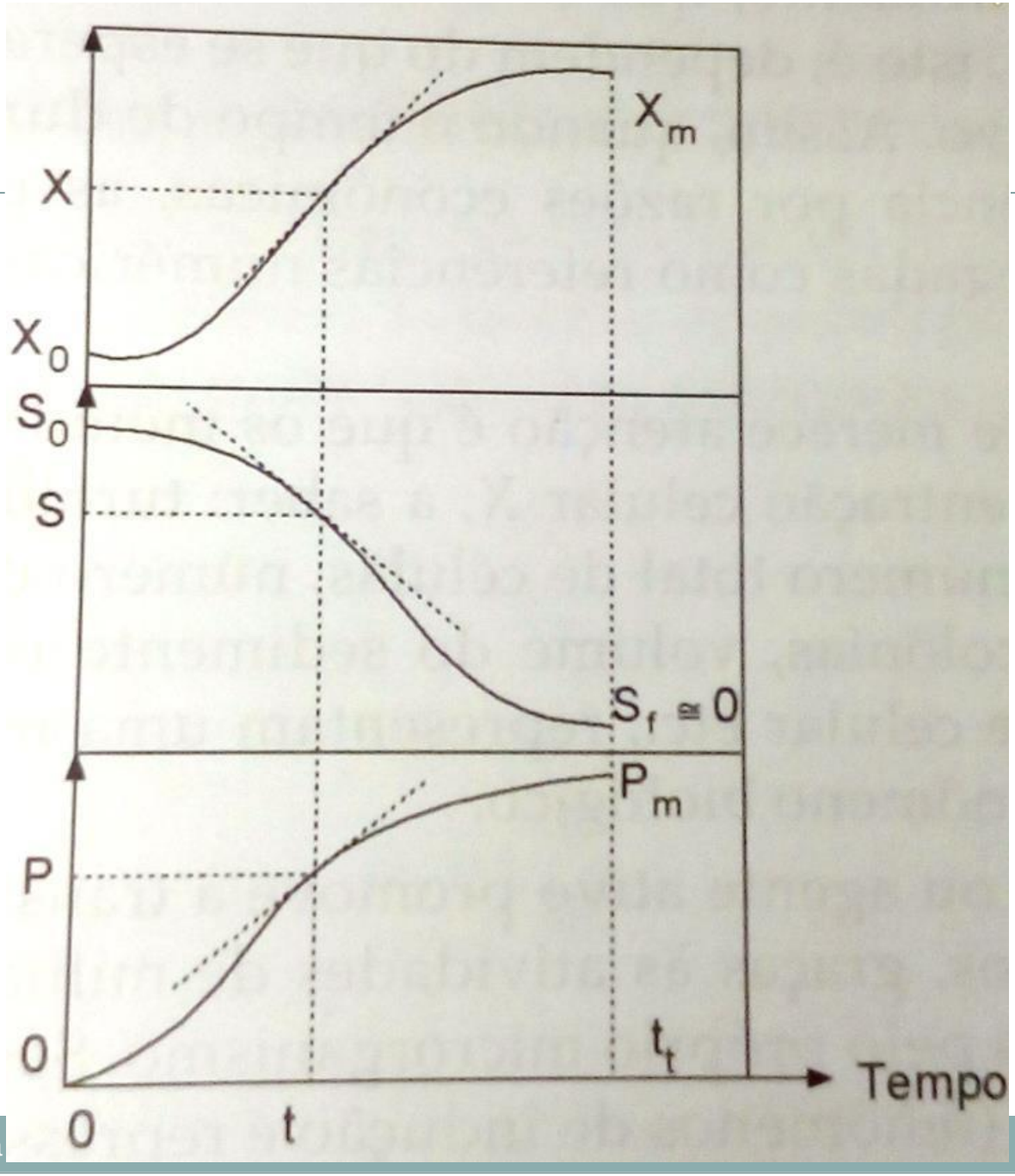
A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA



7

Cinética de crescimento de leveduras

- Avaliar as velocidades de transformações que ocorrem durante os processos fermentativos
  - consumo de substratos,
  - acumulo de produtos e
  - biomassas
- Estudar a influencia de fatores nas velocidades de transformações
  - temperatura, pH, geometria dos biorreatores, etc.


X_m
X
X_0
S_0
S
$S_f \cong 0$
P_m
P
0
t_t
Tempo
0
t

DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS

Crescimento populacional da levedura
- suprimento de nutrientes;
- composição química do meio;
- composição física do meio;
- constituição e estágio de desenvolvimento dos microorganismos

→ Depende (função)

→ condição do meio
- nutrientes;
- acidez;
- temperatura;
- aeração;
- agitação;

PREPARO DO FERMENTO

- concentração fermento → limite

→ Esquemas/ fases do processo p/ preferência a multiplicação

(1) Fermento Prensado

(2) Fermento selecionado

(3) Reciclo de células

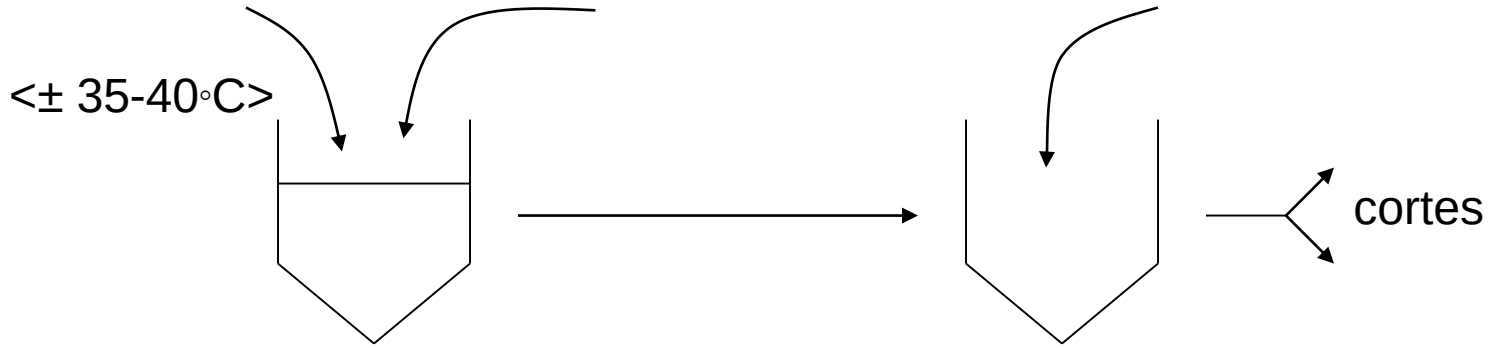
(1) Fermento Prensado

Esquema:

20 kg fermento prensado (suspenso em água morna)

1000L de mosto (30°C) Brix - 50% v.i

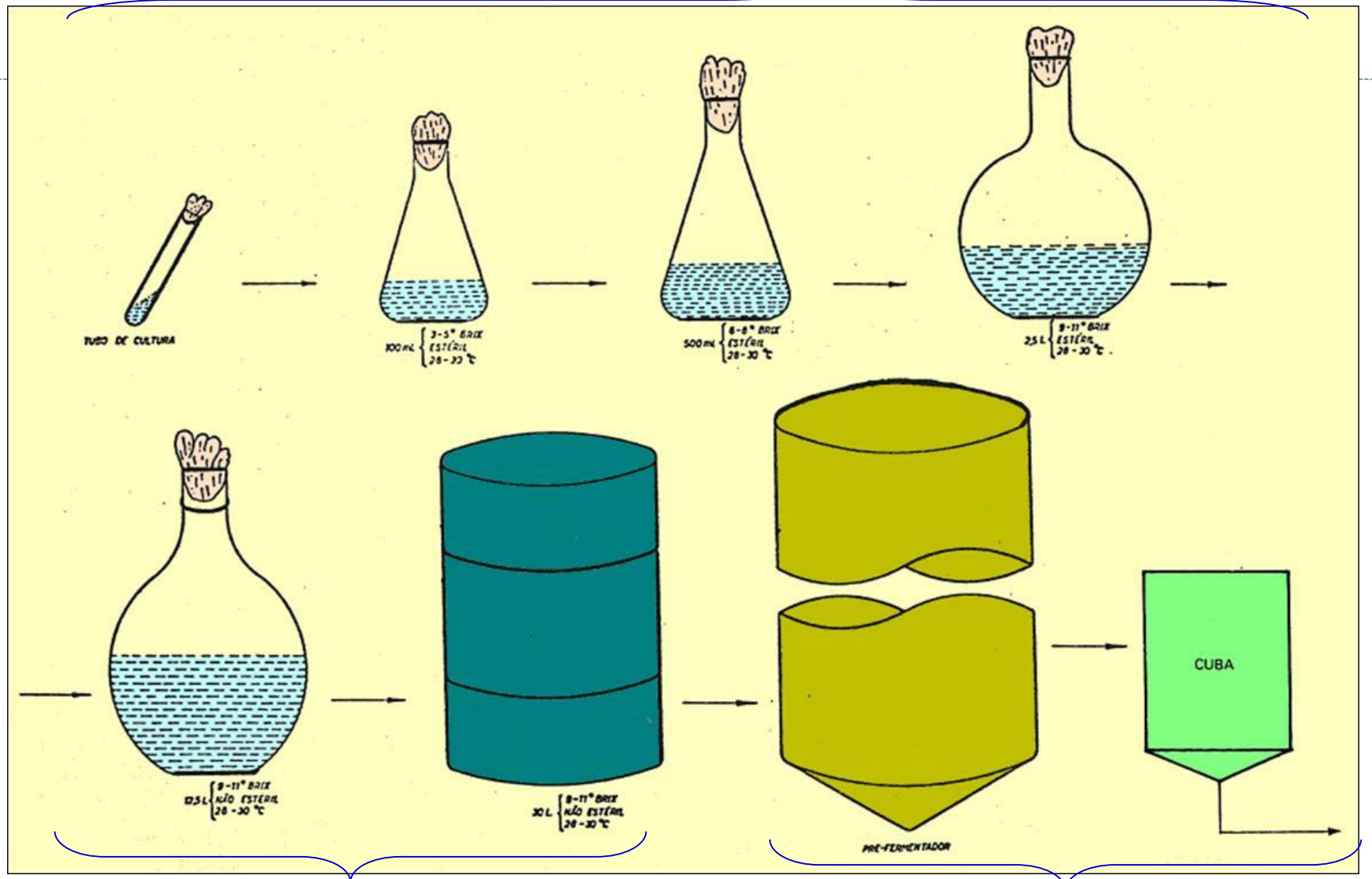
filete contínuo (1000L mosto)



- Fermento liofilizado - 3 vezes o peso seco da levedura (exclui a água e enchimento)

(2) Fermento Selecionado

1ª Fase - Laboratório



2ª Fase - Multiplicação celular

3ª Fase - Fermentação Alcoólica

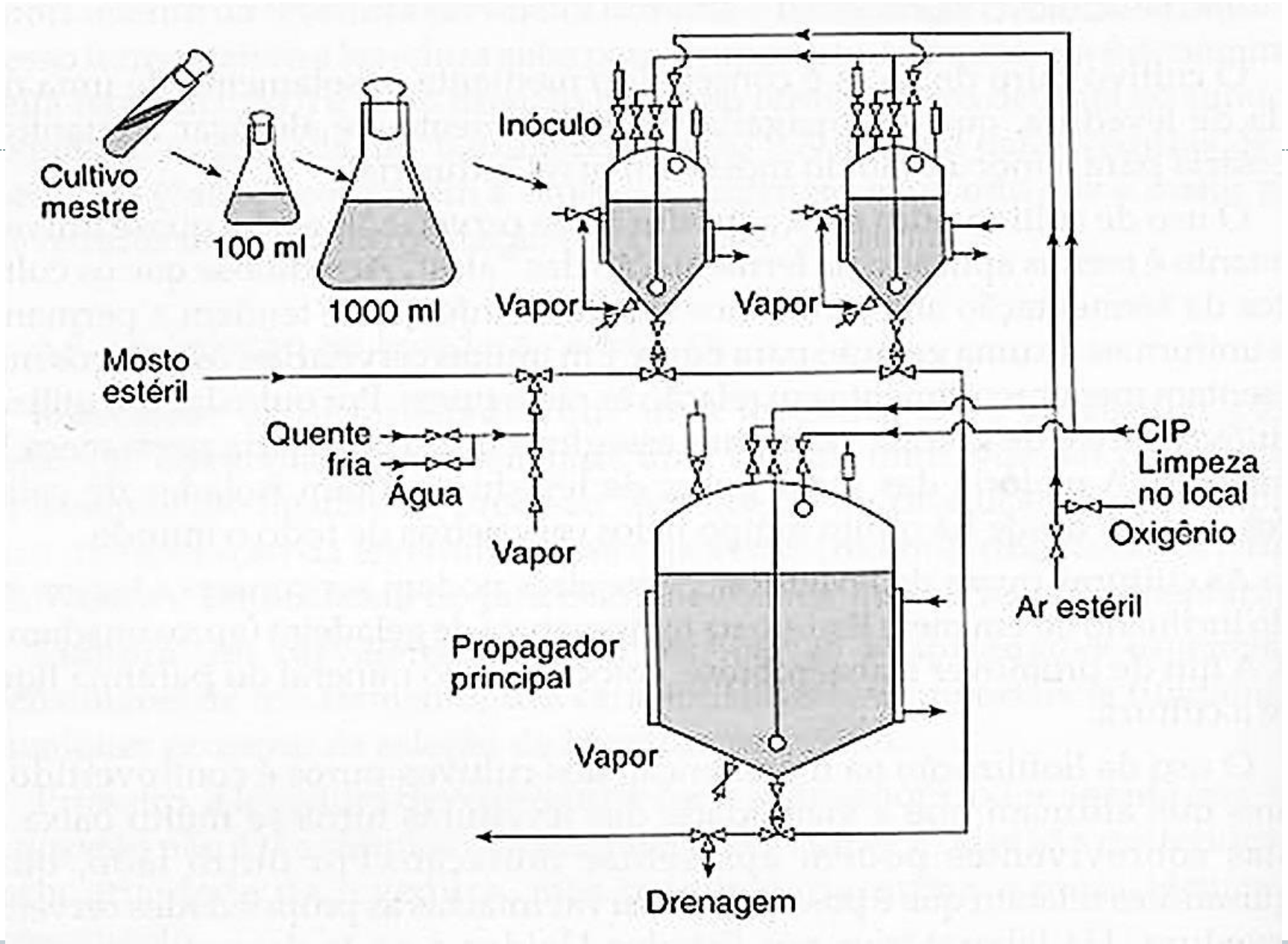
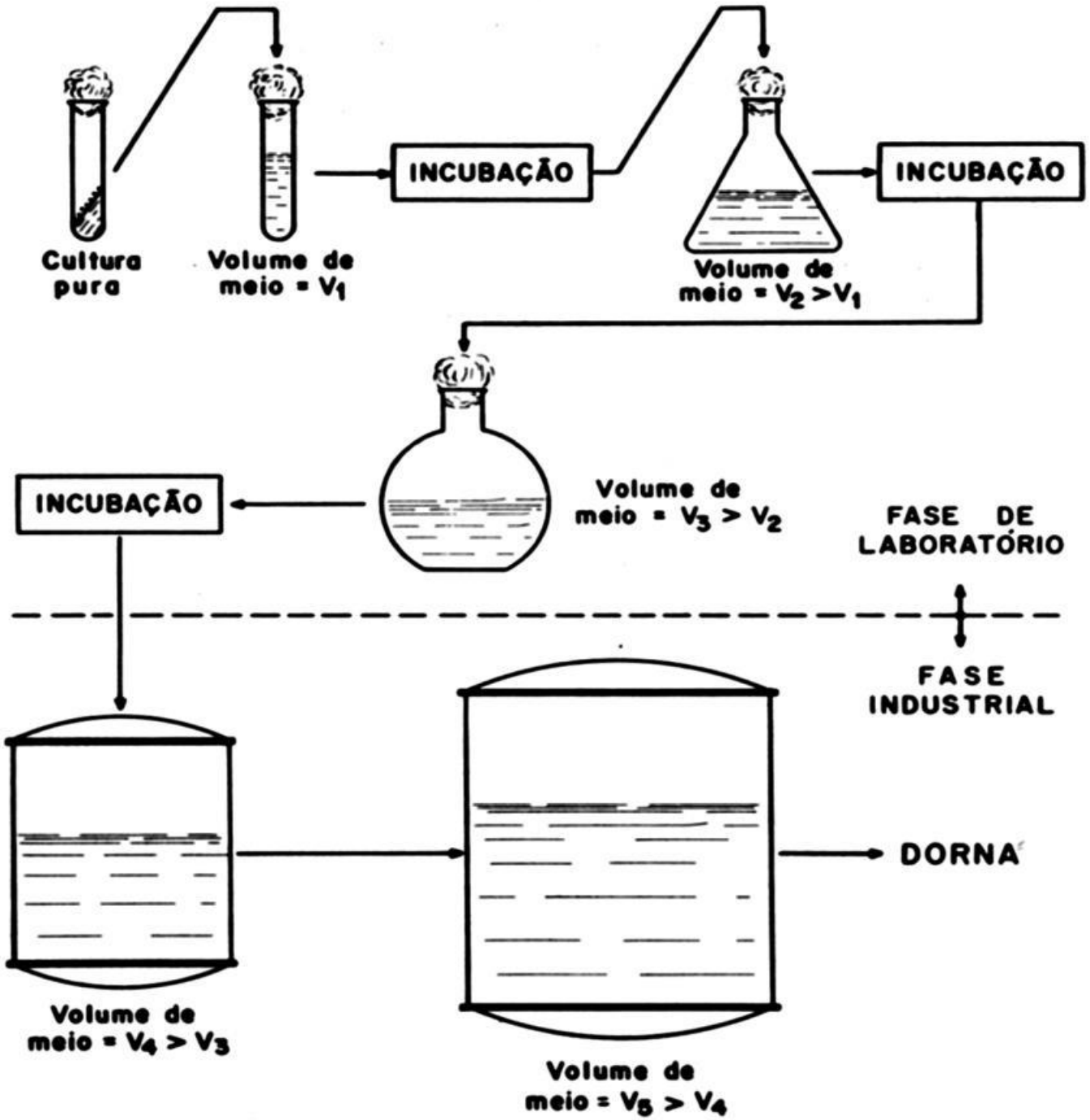
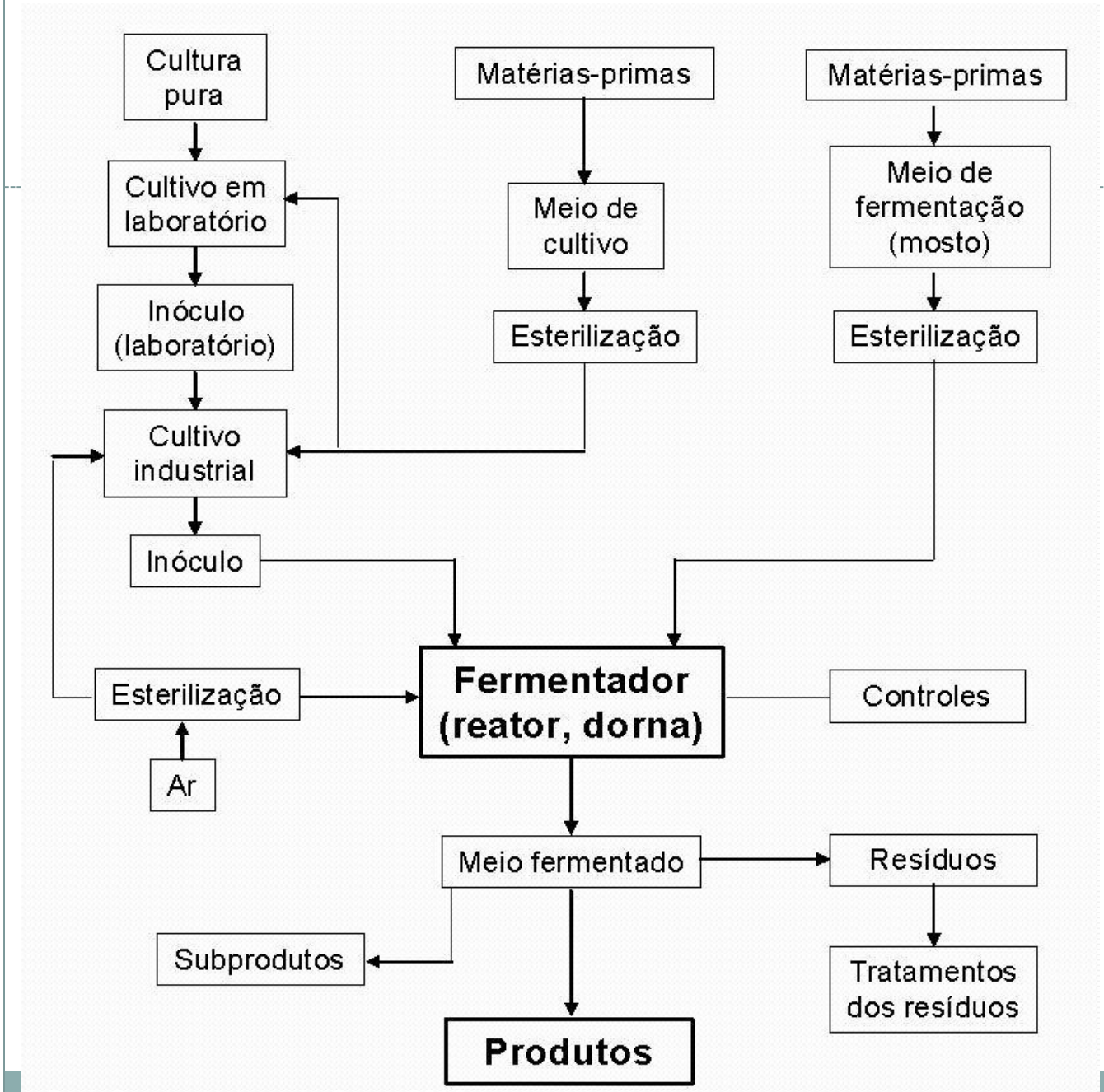


Diagrama esquemático de uma planta de propagação de cultura pura de levedura


Cultura pura
Volume de meio = V1
INCUBAÇÃO
Volume de meio = V2 > V1
INCUBAÇÃO
Volume de meio = V3 > V2
INCUBAÇÃO
FASE DE LABORATÓRIO
FASE INDUSTRIAL
Volume de meio = V4 > V3
Volume de meio = V5 > V4
DORNA



Principais etapas de um processo fermentativo industrial genérico

Bactérias como agentes da fermentação

- *Acetobacter ou Gluconobacter* – produção de ácido acético, principal componente do vinagre
- transformação do etanol em ácido acético
  - 1g de etanol pode fornecer 1,304 g de acido acético

$$H_3C\text{-}CH_2OH + O_2 \longrightarrow H_3C\text{-}COOH + H_2O.$$

46g 32g 60g 18g

Então: 46 gramas de etanol----------60 gramas de ácido acético

1 grama de etanol----------X grama de ácido acético

X = 1,304 g (rendimento 100%).

Fermentações Anaeróbicas

Tipo de fermentação	Aplicação	Produto	Microrganismos envolvidos
ALCOÓLICA	Bebidas fermentadas	Cerveja Vinho Sake	*Saccharomyces calrsbergensis* *Saccharomyces uvarum* *Saccharomyces;* *Aspergillus orizae*
	Bebidas destiladas	Cachaça Aguardente de frutas Whisky, rum, tequila	*Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces cerevisiae*
	Produtos químicos	Álcool	*Saccharomyces cerevisiae*
Malo - Láctica	Bebidas	Vinhos em geral	Bacterias: *Lactobacillus, Leuconostoc*
Láctica	Alimentos tradicionais	Queijos, iogurte, leites, fermentados, manteiga	*Lactobacillus* e outros, como *Streptococus* e *Penicillium*
		Picles, azeitonas, chucrute	*Leuconostoc mesenteroides*
		Pescados	*Pediococcus, Clostridium botulinum, Leuconostoc. Lactobacillus* e outros
Butirica	Produtos quimicos	Acetona, butanol	*Clostridium*

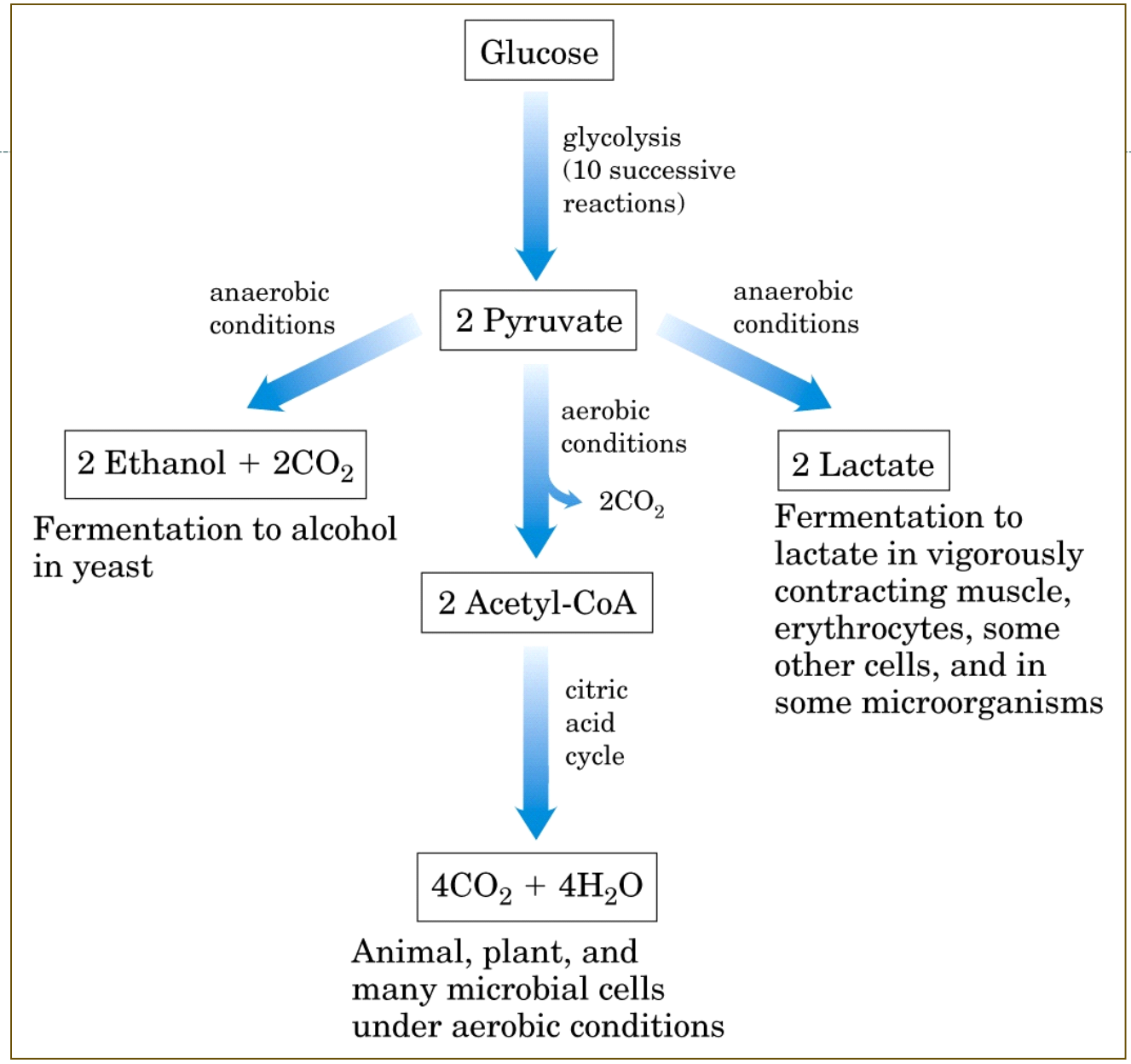
Fermentações Aeróbicas

	Alimentos	Pão, massas	*Saccharomyces*
Reprodução de microrganismos	Químicos e farmacêuticos	Biopolímeros (plásticos biodegradáveis)	*Beijerinckia sp*
	Cosméticos	Eritrucelulose	*Gluconobacter*
	Condimentos	Glutamato monossódico	Leveduras selecionadas
	Fármacos	Penicilina	*Penicillium notatum*
Acética	Condimento Químico	Vinagre Ácido acético	*Acetobacter aceti* *Acetobacter pasteurianus*

B. Bioquímica da fermentação alcoólica

- produtos primários: etanol e CO_2
- produtos secundários: aldeídos, ésteres, ácidos, álcoois superiores, compostos sulfurados, fenóis, biomassa, metanol, furfural

- Aldeídos: intermediários da formação de álcoois superiores
- oxidação de álcoois
- aa + ácido pirúvico



Destinos metabólicos comuns do piruvato

(Lehninger, 2000)

PONTO CHAVE - UTILIZAÇÃO DO **PIRUVATO**

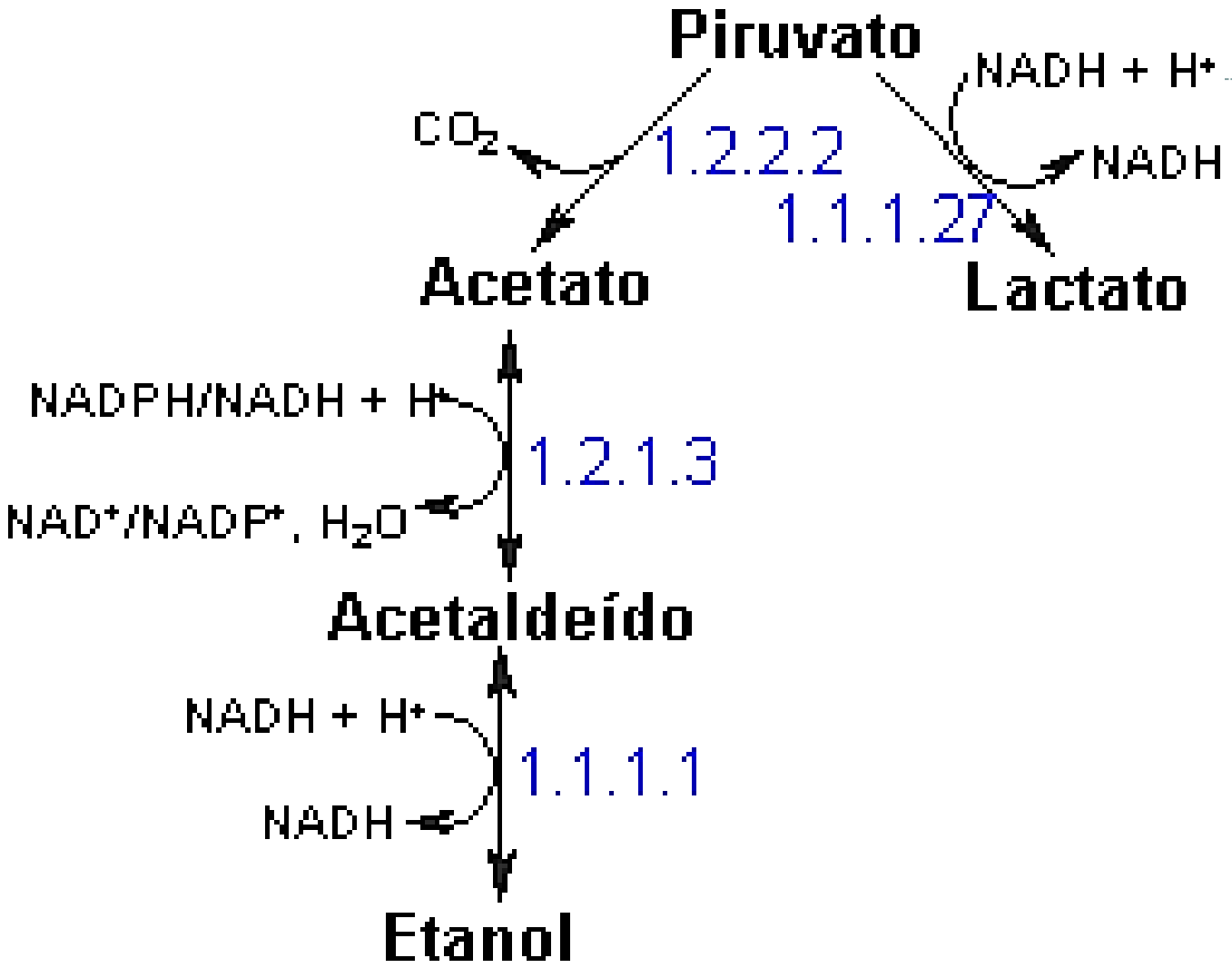
(um intermediário formado durante o catabolismo da glicose)

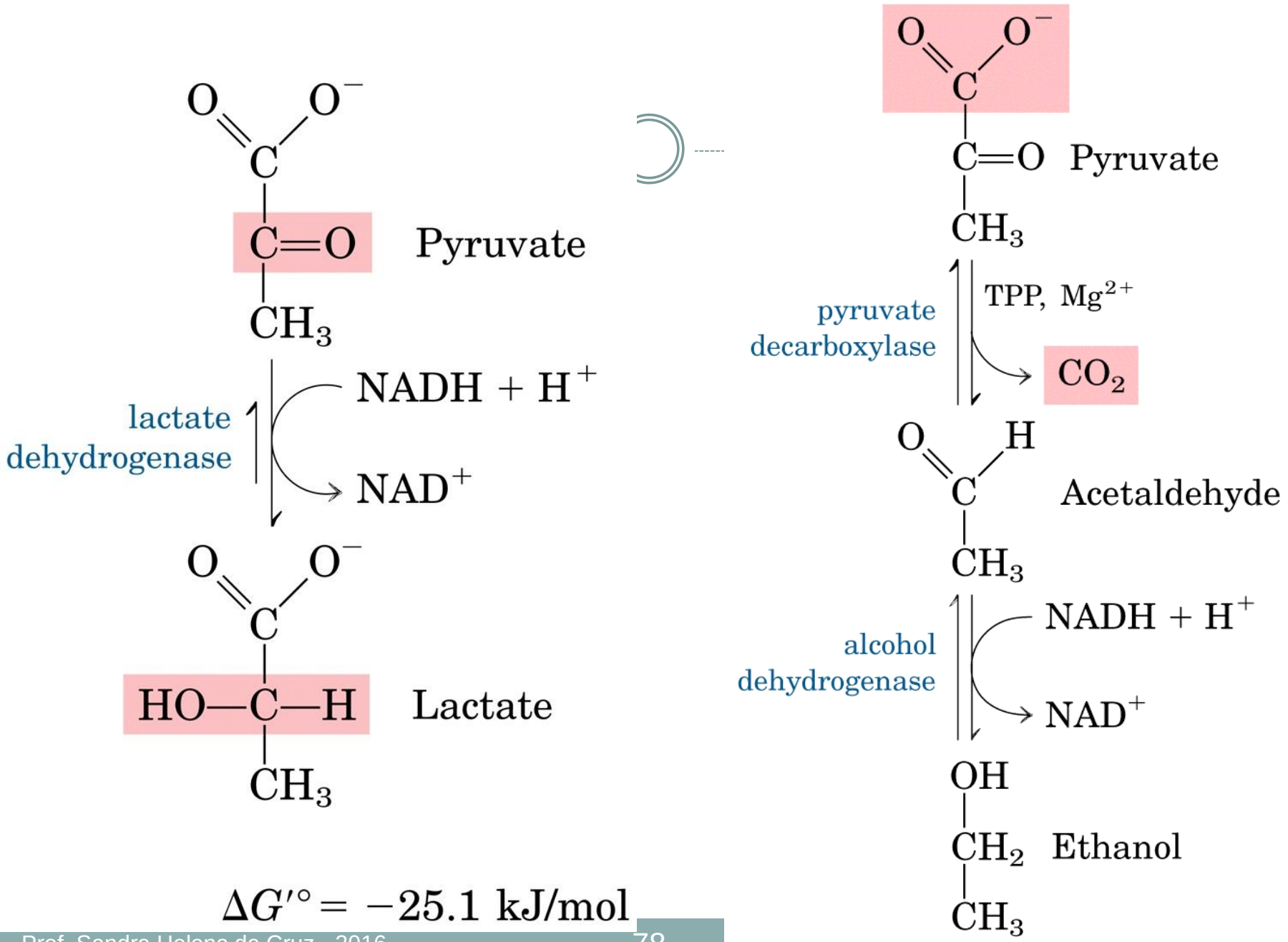
- Em condições **aeróbicas**, o piruvato é completamente oxidado, via ciclo do ácido cítrico a CO_2 e H_2O;

- Em condições **anaeróbicas**, o piruvato deve ser convertido em um produto final reduzido para reoxidar o NADH produzido pela reação de GAPDH. Isso ocorre de duas formas:

  Em leveduras, o piruvato é descarboxilado para produzir CO_2 e acetaldeído, o qual é reduzido a NADH para produzir NAD^+ e etanol. Esse processo é conhecido como fermentação alcoólica (portanto, fermentação e um processo de reação biológica anaeróbica);

  Em condições anaeróbicas em músculos, o piruvato é reduzido a lactato para gerar novamente NAD+ em um processo conhecido como fermentação láctica.


Piruvato
CO_2
1.2.2.2
NADH + H+
NADH
1.1.1.27
Acetato
Lactato
NADPH/NADH + H+
NAD+/NADP+, H_2O
1.2.1.3
Acetaldeído
NADH + H+
NADH
1.1.1.1
Etanol


Pyruvate
lactate dehydrogenase
NADH + H+
NAD+
Lactate
ΔG′° = −25.1 kJ/mol
Pyruvate
pyruvate decarboxylase
TPP, Mg2+
CO2
Acetaldehyde
alcohol dehydrogenase
NADH + H+
NAD+
Ethanol

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

- açúcares + leveduras → álcool etílico + CO_2

(mosto) (fermento) (vinho)

Saccharomyces cerevisiae

- formação de compostos secundários: congêneres

- Ésteres: processo oxidativo entre álcoois e ácidos

- Ácidos: acético (oxidação de aldeído acético), lático, succínico (aa = ácido glutâmico)

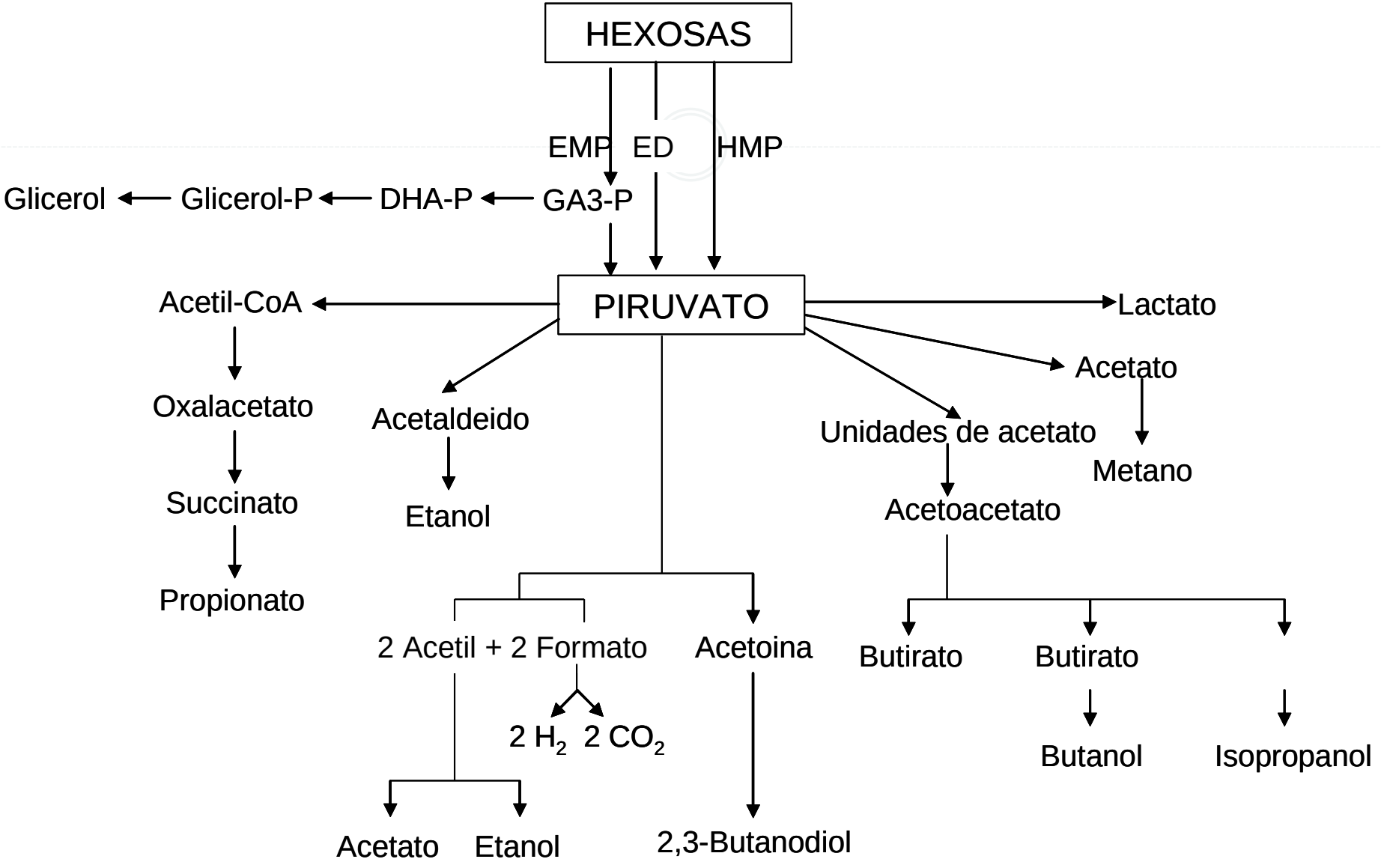
- Álcoois superiores: metabolismo de aa, microrg. contaminantes

- Glicerol: produto normal da fermentação alcoólica

- Metanol: decomposição de pectinas

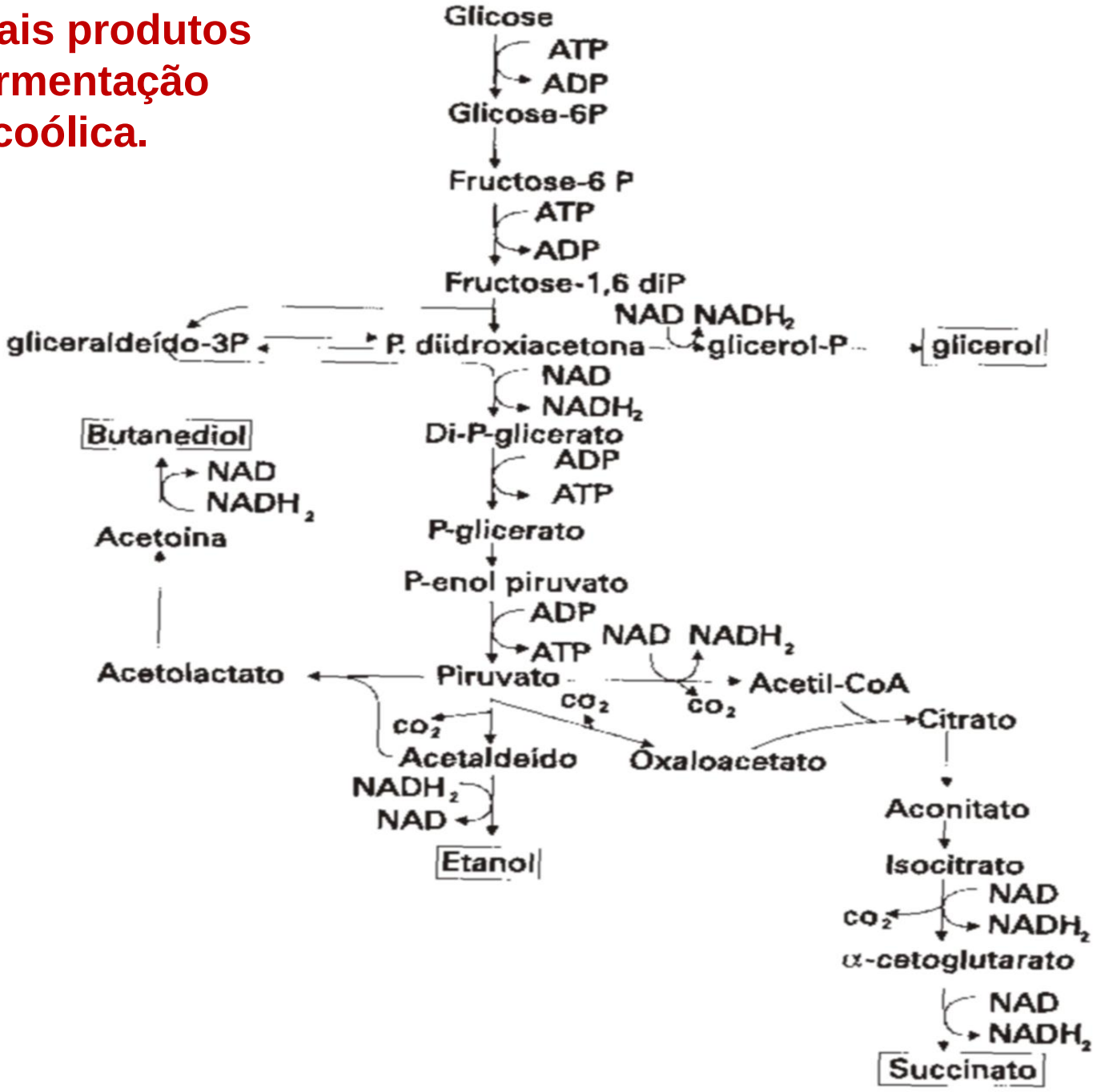
- Furfural: pirogenação de matéria orgânica, envelhecimento

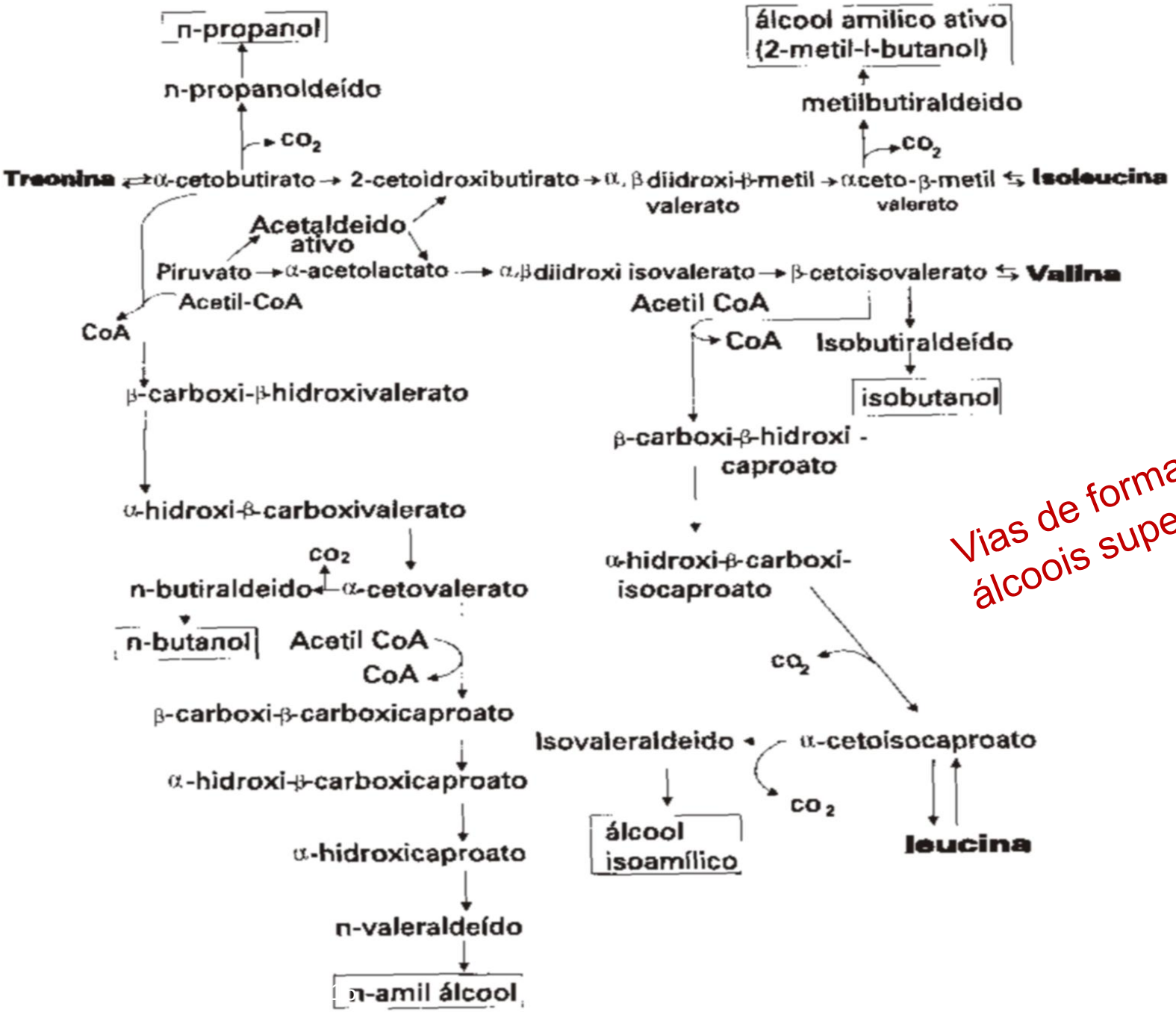
IDEAL: ésteres / álcoois superiores = 1 : 1



Principais rotas metabólicas e produtos finais formados (Ward, 1991)

Principais produtos da fermentação alcoólica.





Vias de formação de álcoois superiores

B. Fatores que afetam a fermentação

- Físicos
  - temperatura, pressão osmótica,
- Químicos
  - pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores e
- Microbiológicos
  - espécie, linhagem e concentração de levedura

afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em álcool.

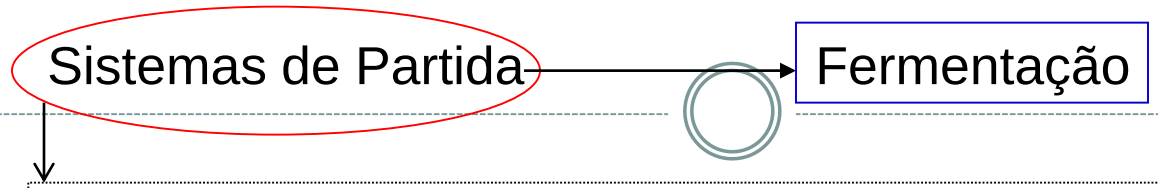
- Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa.

Sucesso da fermentação → converter açúcares em álcool (eficiente)

Condução:
- descontínua
- contínua

f

- número e estado fisiológico da população inicial de leveduras;
- limpeza das instalações: tubulações, caixas, válvulas, dornas, etc.;
- atualização de estoque de produtos químicos;
- condições de uso do laboratório;
- planejamento da propagação do fermento e paradas da indústria;
- tipo de fermento e sistemas de partida;
- adição do mosto ao levedo;



FERMENTO IDEAL:

(1) flexibilidade em suportar variações → composição e vazão

(2) compatibilidade do fermento c/ instalações

(3) baixa tendência à floculação e/ou decantação

(4) manutenção de t °C

(5) pH e acidez ótimos

(6) requisitos nutricionais

(7) estabilidade de comportamento do fermento

⇒ Fermento Selecionado (cultura pura)

⇒Fermento Prensado

⇒ Fermento Reaproveitado do Ciclo Anterior

Fermento Selecionado (cultura pura)

- Limitações:
- identidade do microrganismo no tubo de cultura (repiques x contaminação);
- assepsia completa nas fases iniciais de propagação;
- risco de contaminação;
- tempo de preparo.

Fermento Prensado

- Adaptação gradual (vem da panificação)
- Minimiza o tempo de partida - dita “partida direta”.
- Inóculo: 20 a 25 g de fermento por litro de mosto (razão em massa de fermento após partida)
- Acúmulo gradual de conc. de fermento na dorna
- Condições requeridas: resfriamento do mosto (35 a 40^{o}C).

Fermento Reciclado / Selecionado (creme de levedura)

- Pressupõe-se a levedura habilitada do ciclo anterior;

  → 10^8 células de leveduras/mL

  → 25 a 28°C

  → pH: 3,5 a 4,2

  → mosto diluído: 8°Brix

- Adição de N e P no mosto
- Aumento gradual do teor de açúcar (sem plasmólise).

C. FASES DA FERMENTAÇÃO

Preliminar ou Pré:

- pequena elevação de temperatura
- multiplicação fermento (dreno de energia)
- pouco etanol

Principal ou Tumultuosa:

- maior t°C
- produção de etanol
- maior espumas
- meio anaeróbico
- atenuação do Brix
- maior acidez

Complementar ou pós-fermentação:

- a tranqüilidade na superfície do vinho
- tendência de igualdade das temperaturas de fermentação e ambiente
- acentuado aumento da acidez

Função

desprendimento de CO_2

temperatura

produção de etanol

consumo de açúcares

2. Processo Fermentativo



A. Reator - Bioreator

- Historicamente, mais conhecidos por fermentadores e direcionado para o cultivo de células ou microrganismos,
- produzir metabólicos secundários, alcalóides, antibióticos, entre outros (Barruetto, 2002).
- Fermentador - relacionado etimologicamente com fermentação
  - sua raiz latina, deriva de fermentare, significado é ferver, i.é., produzir bolhas de ar,
  - alusão ao fato de os fermentadores serem destinados a processos fermentativos como, por exemplo, a produção de álcool

Capacidade dos biorreatores - bastante variável, depende do processo

- ✓ Reatores da ordem de algumas centenas de litros até 1 a 2 m^3 de capacidade
  - ✓ empregados no cultivo de microrganismos patogênicos, ou para o crescimento de células animais ou vegetais, em geral, objetivando a produção de produtos ligados à área de saúde.
- ✓ Escala intermediária, reatores da ordem de algumas dezenas de metros cúbicos até 100 a 200 m^3,
  - ✓ especialmente empregada na produção de enzimas, antibióticos e vitaminas.
- ✓ Para processos que exigem poucos ou até mesmo nenhum cuidado de assepsia (caso da fermentação alcoólica ou tratamento biológico de resíduos)
  - ✓ reatores com alguns milhares de metros cúbicos de capacidade.

Dimensão de fermentadores para alguns processos fermentativos

VOLUME DO FERMENTADOR (m^3)	PRODUTO
1 – 20	Enzimas de diagnóstico, substâncias para biologia molecular.
40 – 80	Algumas enzimas e antibióticos.
100 – 150	Penicilina, antibióticos aminoglicosídicos, proteases, amilases, transformação de esteróides, aminoácidos.
450	Aminoácidos (ácido glutâmico)

Fermentações industriais

- podem ser classificadas de acordo com os tipos de alimentação das dornas e desenvolvimento da fermentação,
  - processos contínuos
  - descontínuos (batelada).

Processos descontínuos

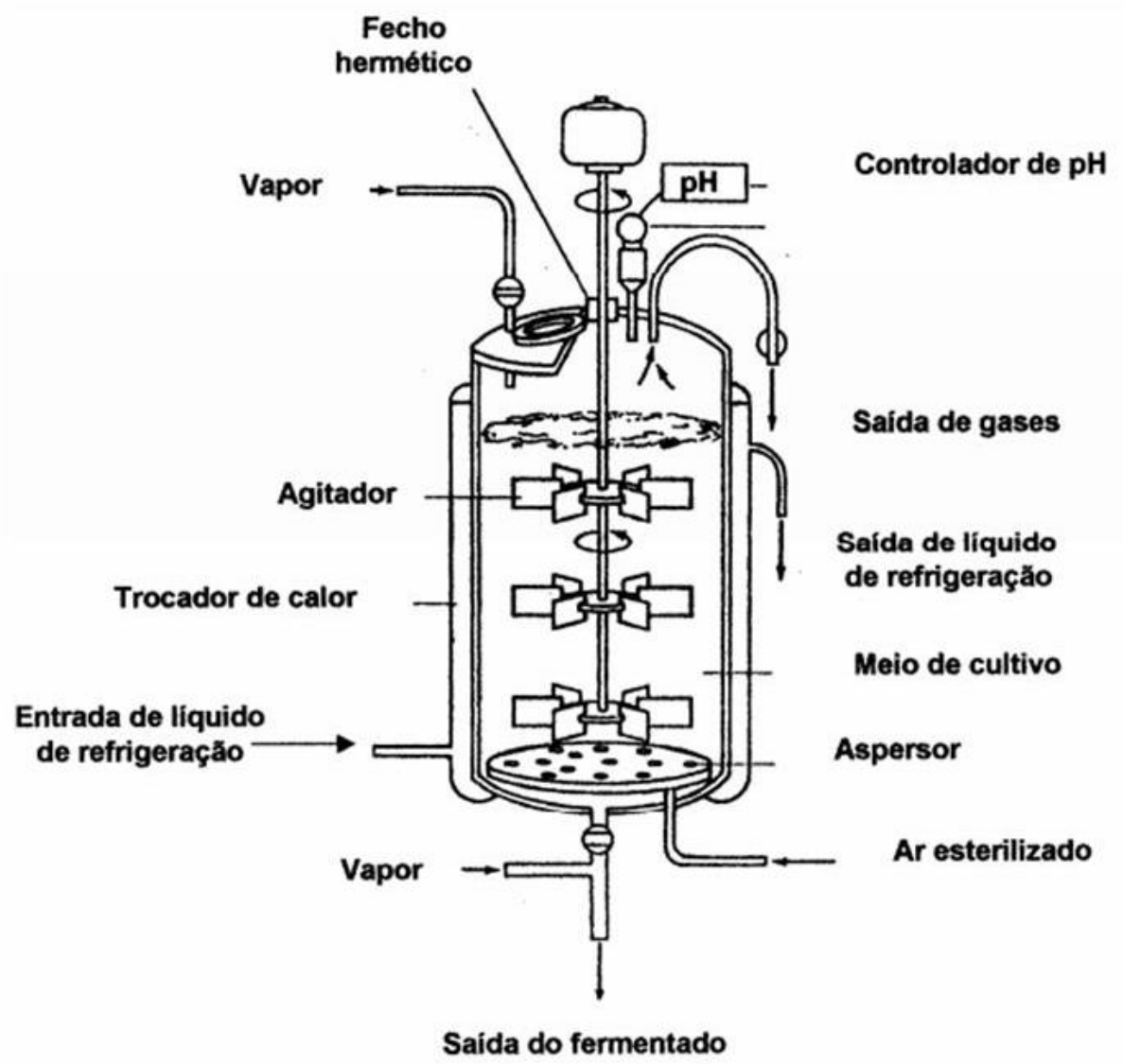
- intermitentes, denominados batelada simples ou batelada alimentada.
- Batelada simples - a fermentação só tem início após o preenchimento do fermentador, momento em que se mistura o mosto com o fermento.
  - é possível em condições de pequenas quantidades de mosto, não sendo viável para a indústria alcooleira, tendo uso restrito para fermentações laboratoriais e farmacêuticas.
- Batelada alimentada - mistura-se o mosto ao fermento conforme a dorna vai sendo abastecida.
  - Trata-se de um método mais produtivo e expõe as leveduras a menores riscos de se tornarem inativas que no processo de batelada simples.

Processos descontínuos

- Processo fermentativo caracterizado pela
  - inoculação e incubação de microrganismos,
- de tal forma, a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas.

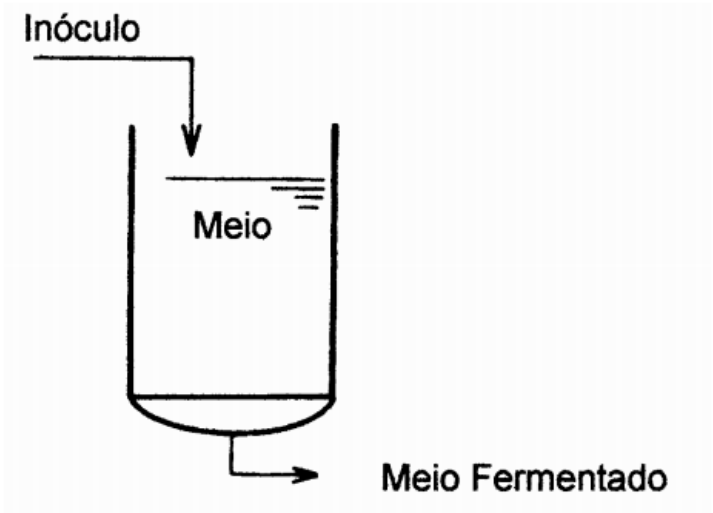
- Neste tipo de produção, nada é adicionado, exceto
  - oxigênio (processo
  - aeróbio), ácido ou base (controle de pH) ou antiespumante.

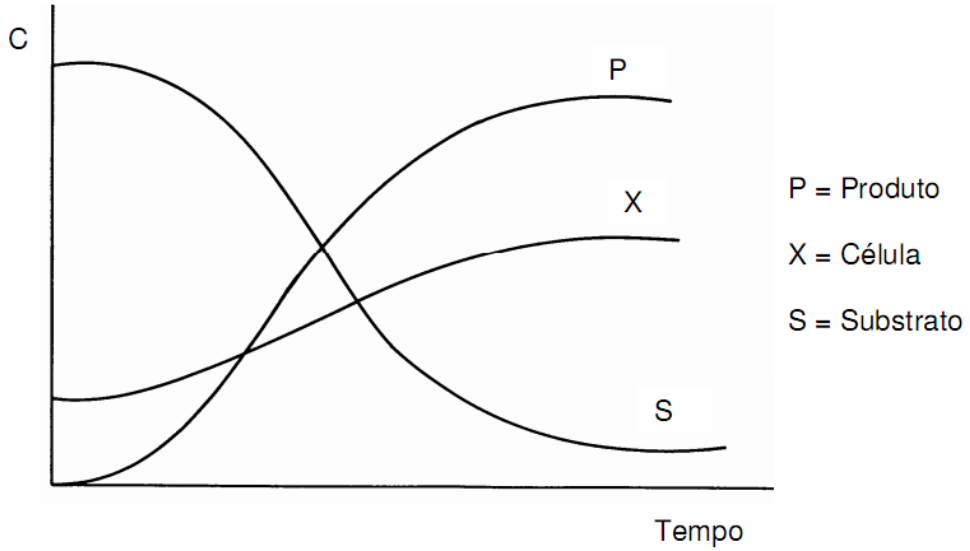
Desenho esquemático de fermentador



http://dgta.fca.unesp.br/docentes/waldemar/antigos/tecfer/processosfermentativos.PDF

Fermentação descontínua ou batelada





Processos descontínuos simples – Sem recirculação de células

- Vantagens:
  - Fácil operação;
  - Menor risco de contaminação;
  - Construção e instrumentação simples e barata;
  - Processo adequado para curtos períodos de tempo;
  - Versatilidade de usos
- Desvantagens:
  - Esgotamento do meio de cultivo e acúmulo de compostos tóxicos ou degradação do produto;
  - Menor produtividade volumétrica;
  - Preparo do reator entre uma batelada e outra reduz tempo útil e aumenta custos.

Processos contínuos

- os primeiros sistemas - dornas ligadas em série, com quantidade e tamanhos variados, em cascata, em que as primeiras dornas continham cerca de 70% do volume total em fermentação.
- Com a evolução dos processos da fermentação - uma otimização dos mesmos com redução dos volumes e do tempo de fermentação com aumentos na produção.
- O processo ainda é em cascata, com melhoramento nos sistemas de agitação e com diferenciado traçado geométrico das dornas.

- Algumas vantagens observadas na condução dos processos contínuos :
  - maior produtividade;
  - menor volume de equipamentos em geral;
  - amplas possibilidades de total automação e uso da informática;
  - Redução do consumo de insumos, de uma maneira geral.

Processos contínuos

- Mais complexo,
- sistema aberto e sensível à contaminações,
- maior custo com o meio de cultura,
- maior investimento no processo downstream (mais produto/dia)

Mais utilizados em bancada para desenvolvimento de processos, não são muito usados industrialmente



Esterilização do Equipamento

- Esterilizar um equipamento = eliminar todas as formas de vida de seu interior ou superfície.

- Indústria de laticínios = processos de pasteurização destroem a maior parte, mas não todos os microrganismos presentes.

Esterilização do Equipamento

- **Reatores bioquímicos e tubulações**: geralmente, esterilizados pela aplicação de calor úmido (vapor saturado).
- **Equipamentos** destinados ao processamento de produtos de fermentação (bombas, filtros, centrífugas, misturadores, separadores, colunas cromatográficas, homogeneizadores, etc.): preferencialmente esterilizados por calor úmido. Nos casos em que isto não é possível, empregam-se agentes químicos adequados.
- **Material de laboratório** utilizado durante o processo: esterilizado por calor úmido (autoclaves), seco (fornos) e mais raramente por radiação ultravioleta.

Esterilização do Equipamento

- **Meios de cultura:** esterilizados por calor úmido. Nos casos em que a inativação térmica de nutrientes é significativa (cultura de células animais, vegetais ou de insetos, por exemplo) emprega-se a filtração em membranas ou cartuchos esterilizantes para remover fisicamente os microrganismos.
- O **ar** para o processo fermentativo é esterilizado por filtração em cartuchos esterilizantes.
- **Embalagens** são em geral esterilizadas por radiação gama, calor úmido, por lavagem com produtos químicos adequados.
- Métodos de esterilização = destroem ou comprometem estruturas microbianas, como paredes celulares, ácidos nucléicos, etc., ou inativam enzimas, proteínas, etc.

Terminologia

- **Esterilização**: processo físico ou químico que destrói ou inativa todas as formas de vida presentes em um determinado material, especialmente microrganismos (bactérias, fungos - na forma vegetativa e esporulada - e vírus).

- **Desinfecção**: processo menos rigoroso de eliminação de microrganismos, envolvendo usualmente o uso de um agente químico, denominado desinfectante ou germicida, geralmente líquido e à temperatura ambiente.

Modo de ação dos agentes esterilizantes

A morte microbiana é determinada pelos mecanismos:

- ✓ desnaturação protéica: agentes químicos e físicos são capazes de eliminar a capacidade funcional da proteína pelo rompimento da estrutura terciária desta;
- ✓ ruptura da membrana ou da parede celular: capacidade que algumas substâncias têm de modificar as propriedades físicas e químicas da membrana, prejudicando seu funcionamento, destruindo ou inibindo o crescimento bacteriano;
- ✓ remoção dos grupamentos sulfidrilas livres: agentes oxidantes e metais pesados interferem no metabolismo celular;
- ✓ antagonismo químico: ocorre quando um antagonista com afinidade química combina-se com uma enzima de determinado microrganismo, impedindo o desenvolvimento da reação apropriada.

Métodos de Esterilização	Alternativas
MÉTODOS FÍSICOS	Calor úmido (vapor saturado/autoclaves)
	Calor seco
	Irradiação por luz ultravioleta (UV)
	Radiação ionizante (Gama/Cobalto)
MÉTODOS QUÍMICOS	Glutaraldeído
	Formaldeído
	Óxido de Etileno (ETO)