

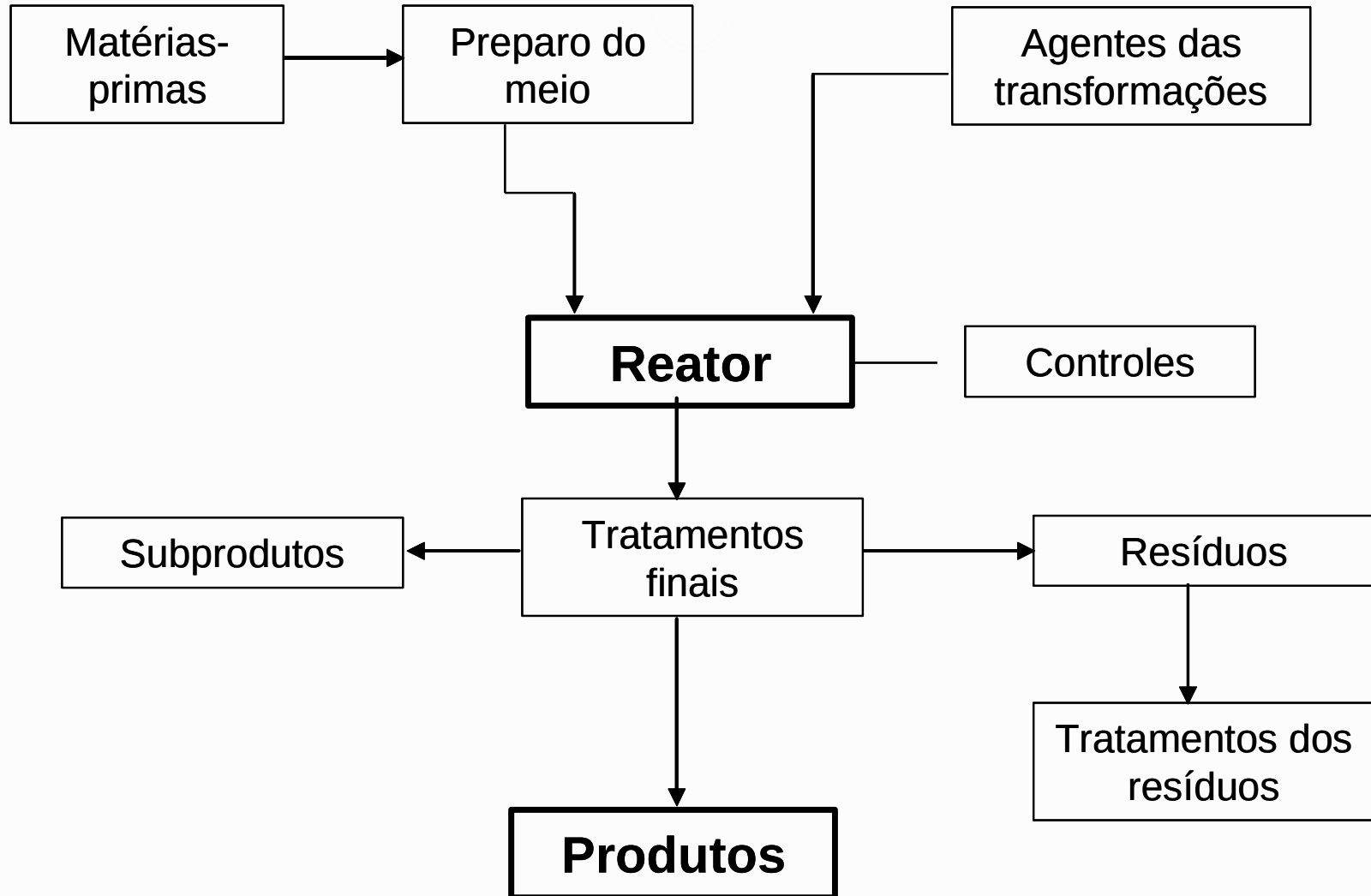
Agentes da fermentação

1 alcoólica

ESALQ / USP

PROF. SANDRA

Representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico



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

Toluraspora - *Torulaspora pretoriensis* (*Saccharomyces pretoriensis*)

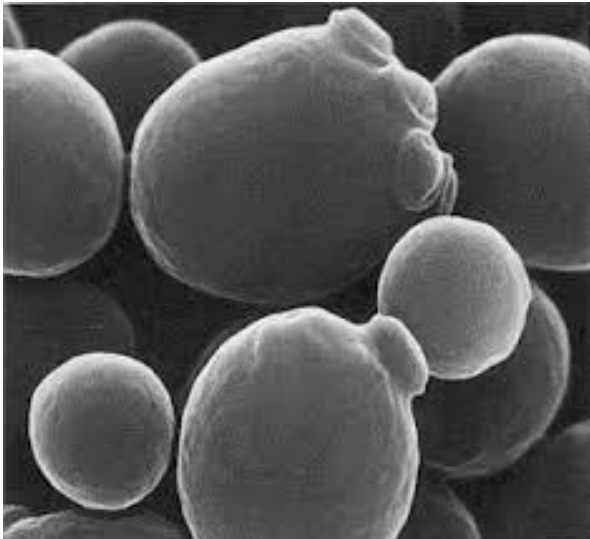
MORFOLOGIA DAS LEVEDURAS

5

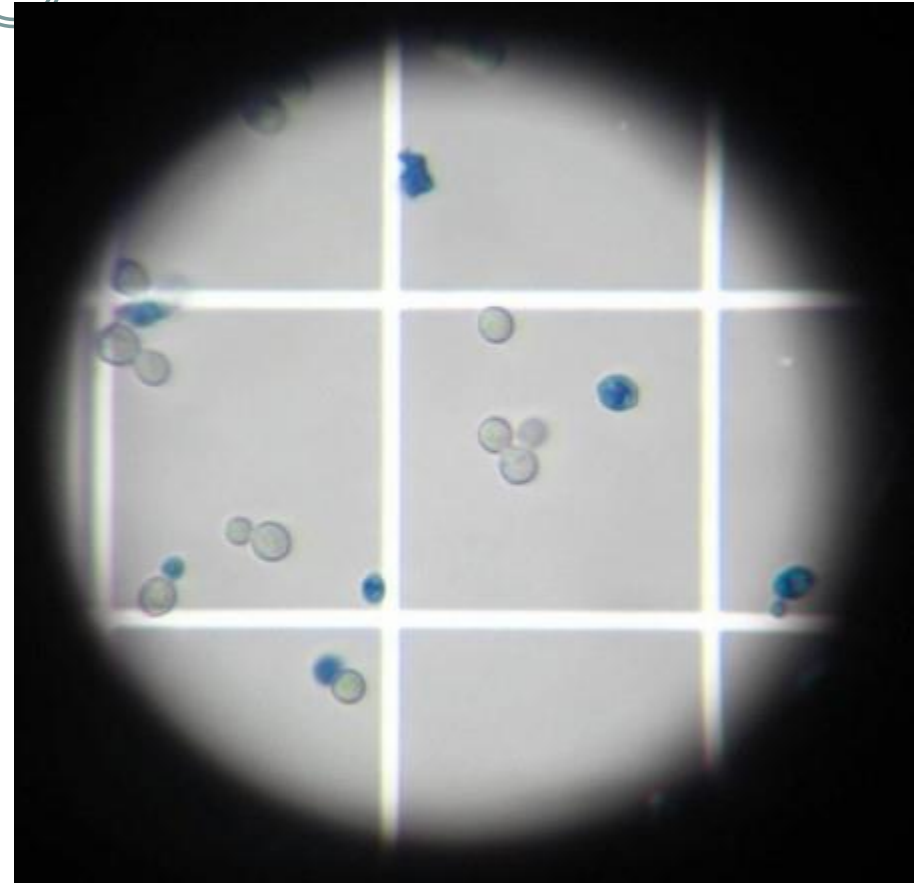
- leveduras → unicelulares, frequentemente ovais, arredondadas e as elípticas.
 - Comprimento: 5 - 16 micra
 - largura: 3 - 7 micra
 - afetado por deficiências: nutrientes, (P e Mg), vitaminas (biotina, niacina, ác. pantotênico e piridoxina).
 - ✦ Obs: 5 vezes maior que bactérias.
 - permite a separação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

Levedura

6



https://www.google.com.br/search?q=fermenta%C3%A7%C3%A3o+alco%C3%B3lica&espv=2&biw=1280&bih=855&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIwpTE8LjgyAIVDCGQCh3RxQ2r#imgsrc=CH6X7qFNCwM03M%3A



<http://www.fermenta.pt/album/www-fermenta-com/levedura-045-jpg/>

CITOLOGIA

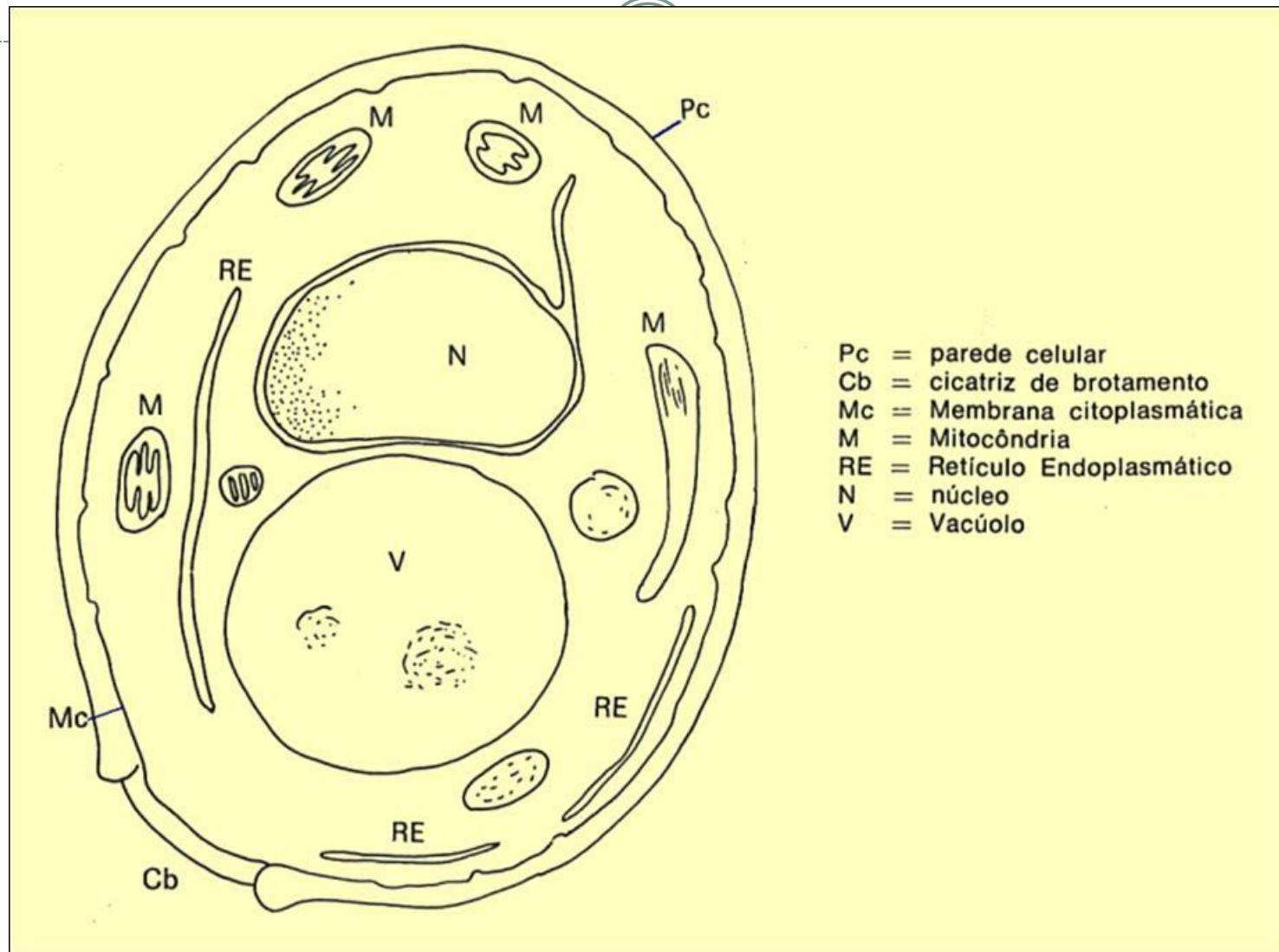
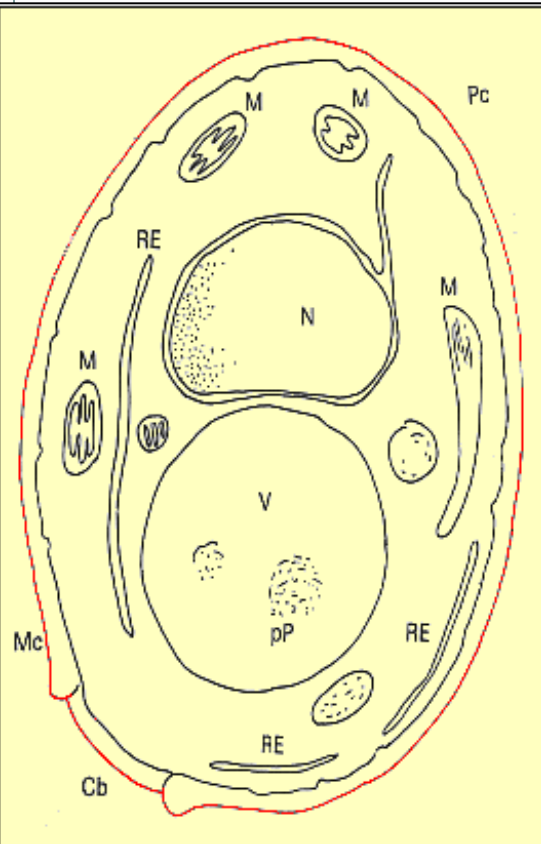


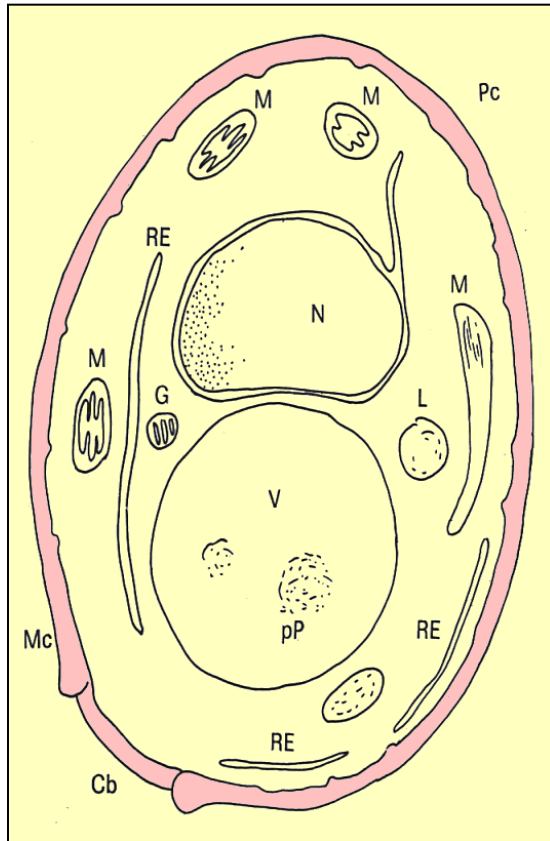
Diagrama de uma célula de *S. cerevisiae*

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



- composição: polímeros de glucana (“celulose”), manana (“goma”), quitina, lipídeos, fosfatos e esteróides.
- Aspecto: Poroso (filtros)/ seletividade, propriedades para substâncias < 4800 (peso molecular) até sítio de absorção.
- Enzimas Extracelulares: 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).

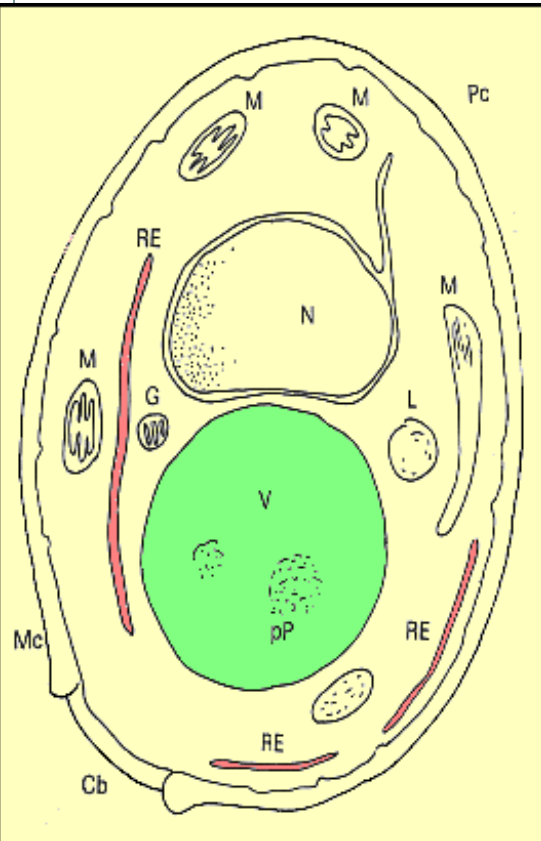


(3) Retículo Endoplasmático

- 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

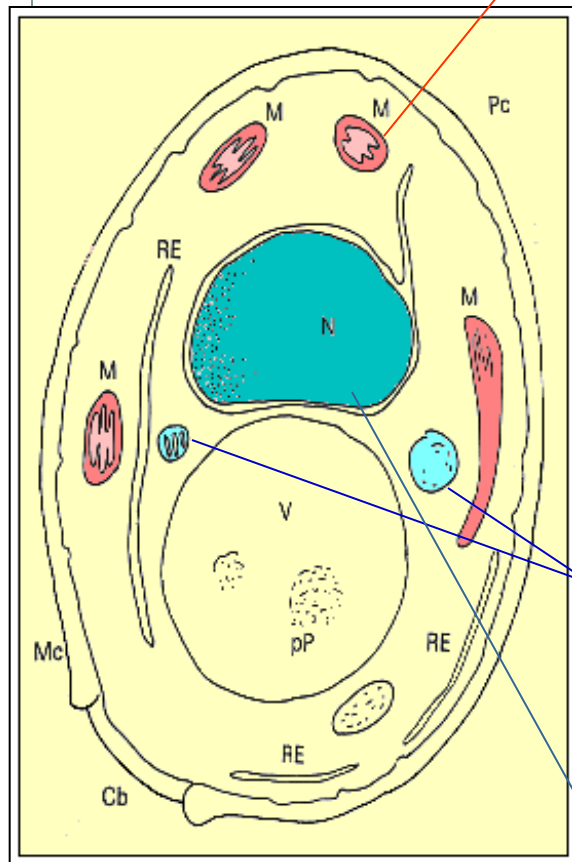
- ligado à síntese protéica.
(ocorre no citoplasma)

(7) A célula contém reserva de nutrientes.

- Glicogênio, lipídeos,...

(8) Núcleo

- cromossomos que são desoxiribonucleoproteínas e ribonucleoproteínas.

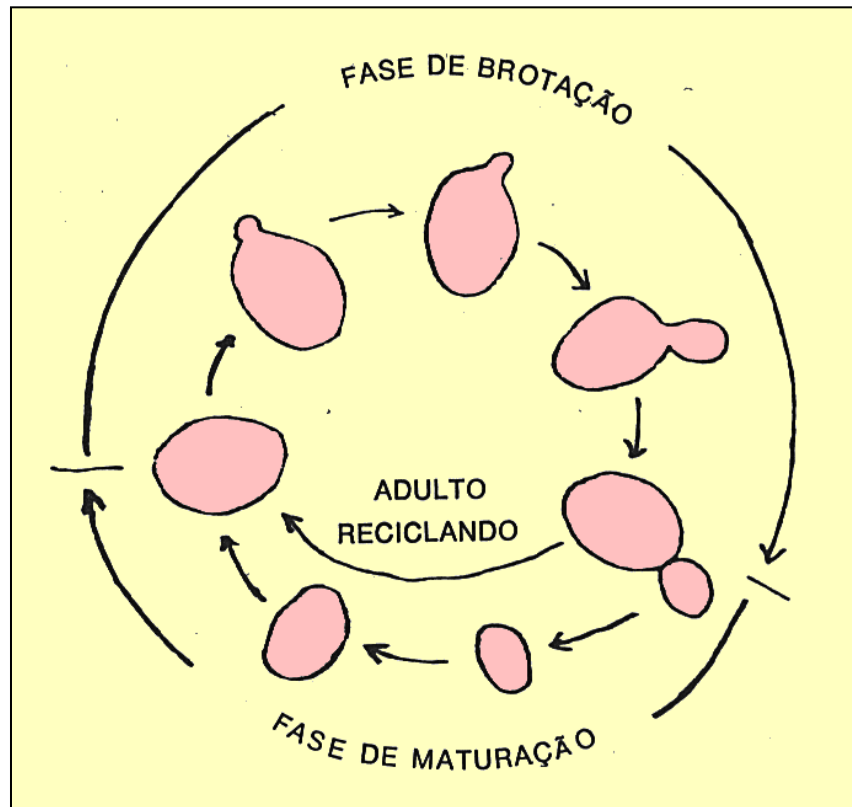


REPRODUÇÃO EM LEVEDURAS

- (a) brotamento ou gemulação (multiplicação vegetativa) - assexuado -
- (b) esporulação (formação de “ascos”) - sexuais sob estresse -

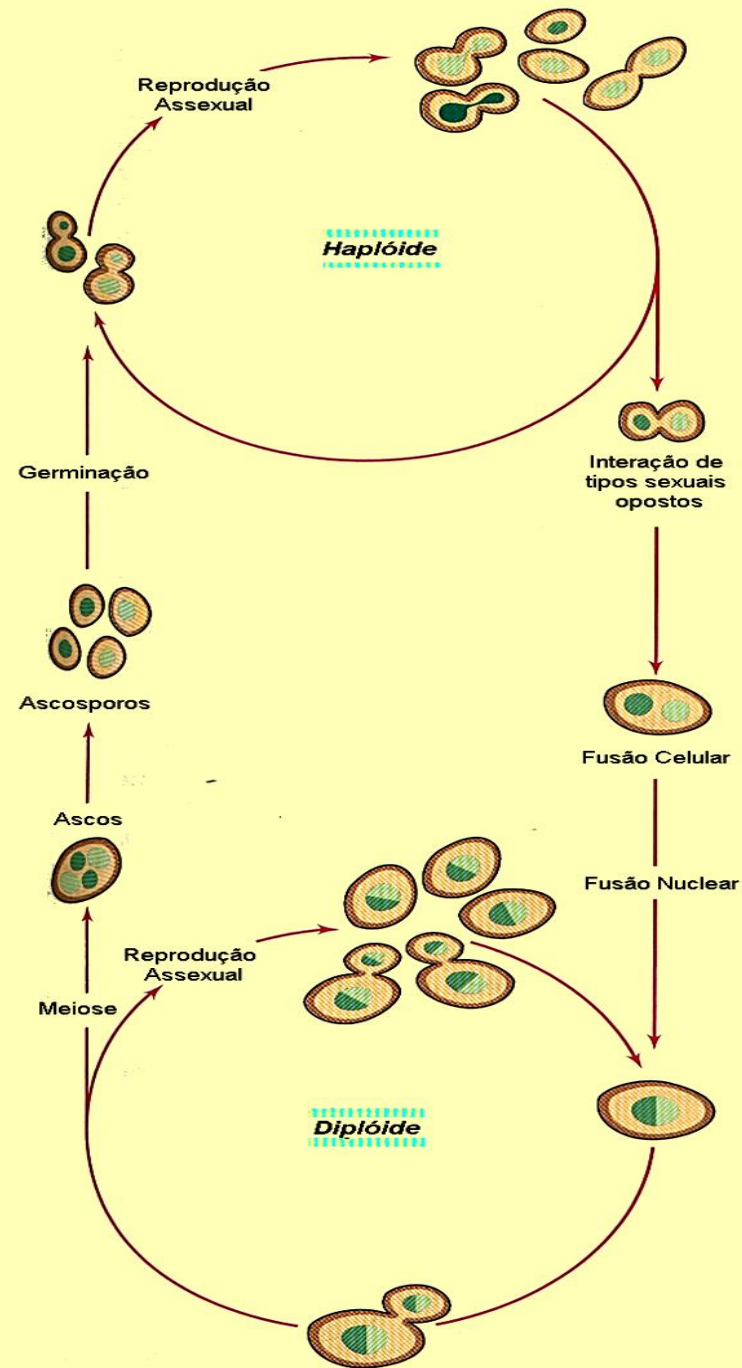
(a) brotamento

Ciclo vegetativo de
leveduras alcoólicas.
(Horii, 1980)



Ciclo vital de *S. cerevisiae*

(Bergey's Manual, 2000)

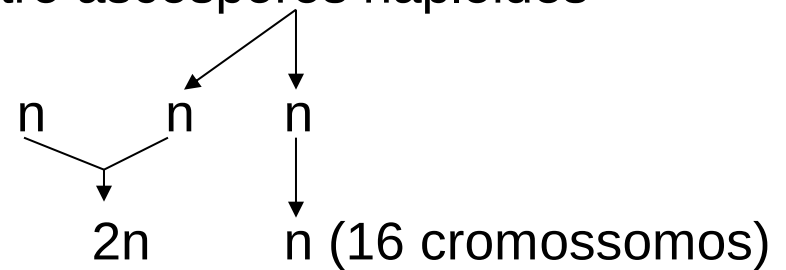




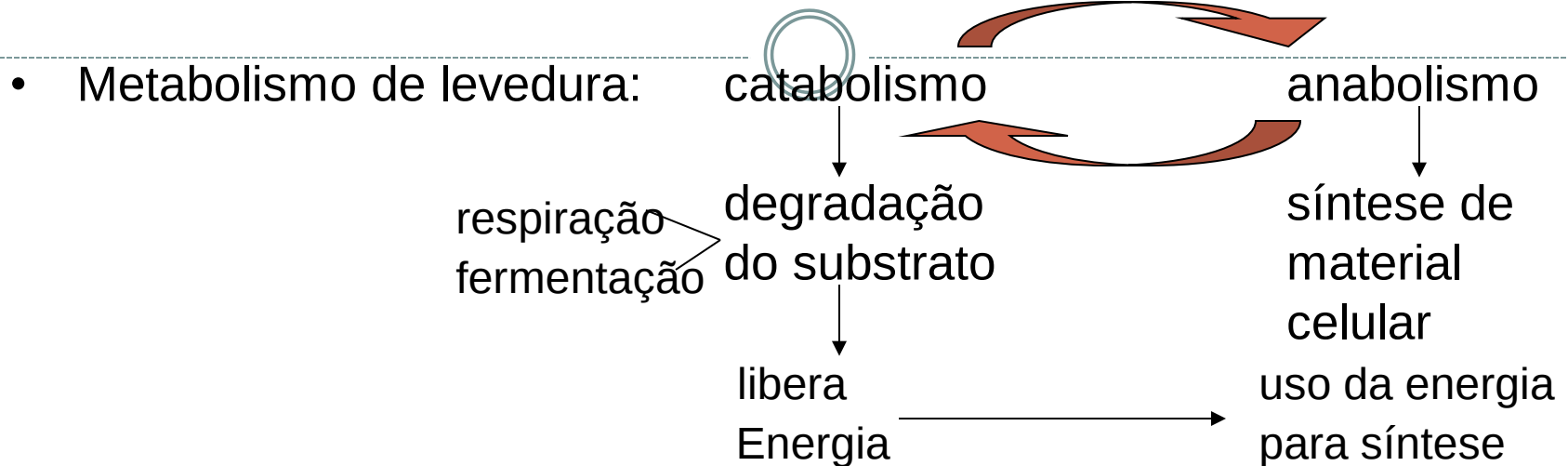
(b) Esporulação (reprodução)

Ascomycetos → ascósporos “ascos”:

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



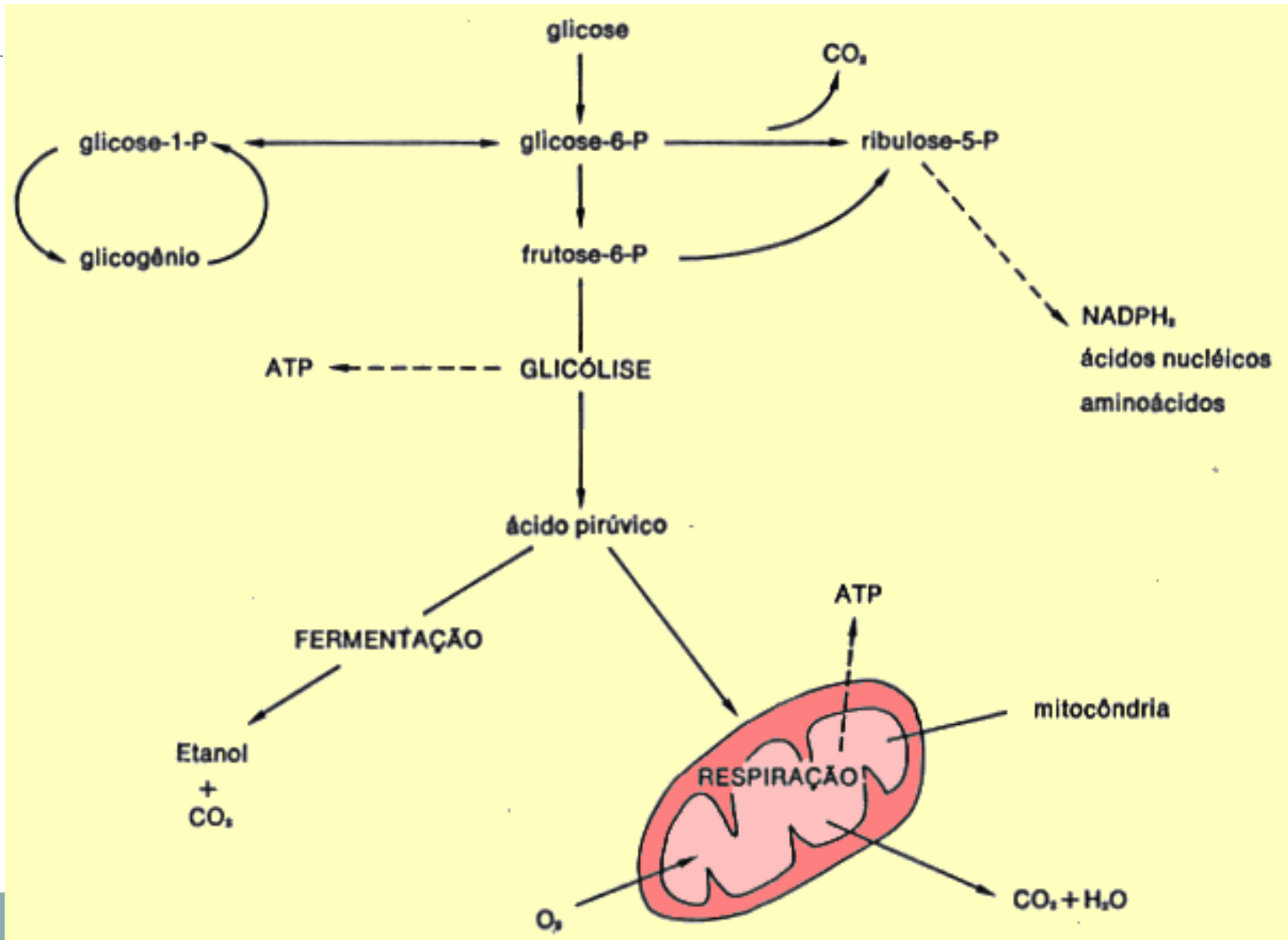
FISIOLOGIA E E METABOLISMO DAS LEVEDURAS

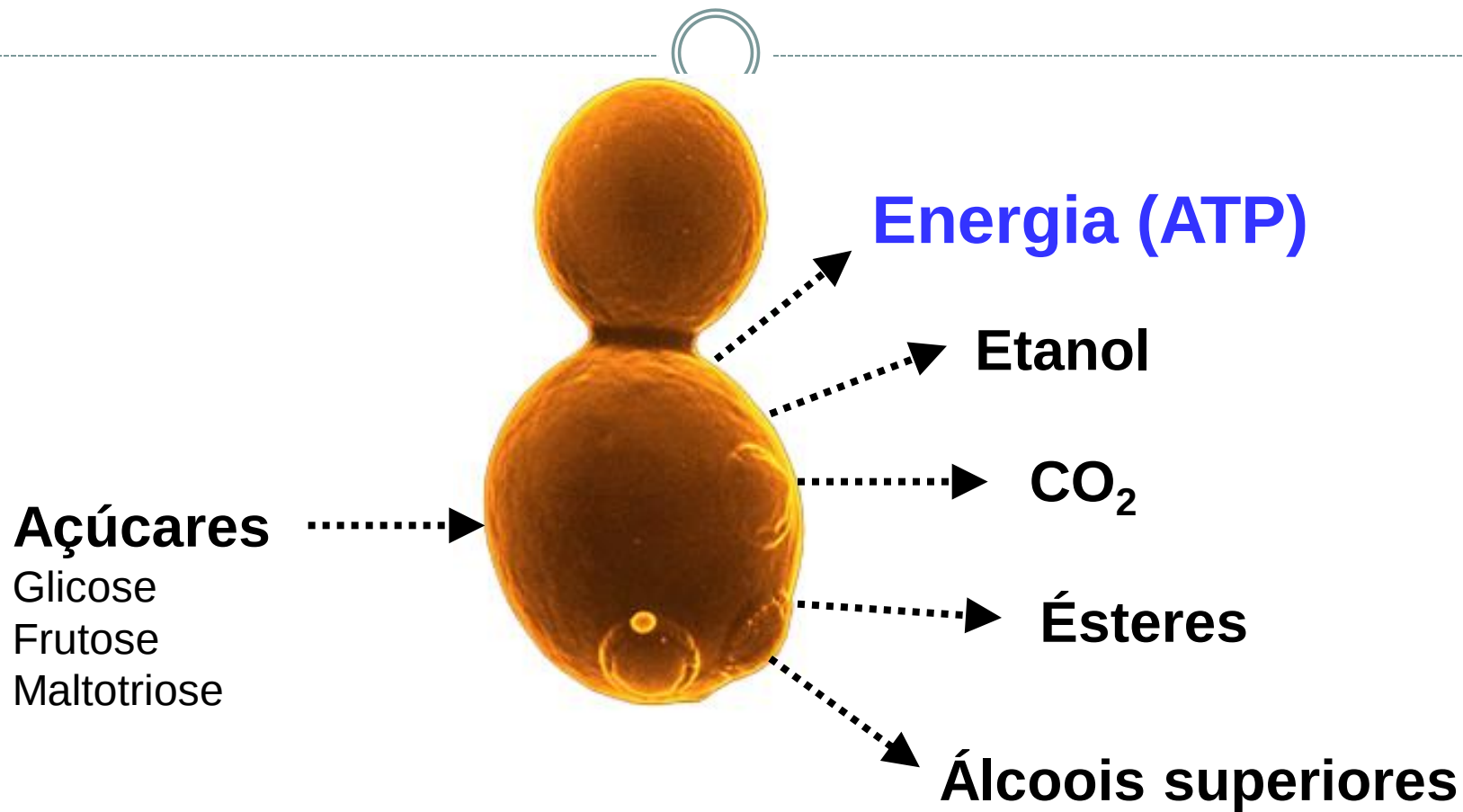


(1) Respiração → oxidação biológica de substratos orgânicos sob sistemas multienzimáticos que catalisam a oxidação → transporte de elétrons na cadeia respiratória onde há ativação do oxigênio (acceptor e-) e formação de água.

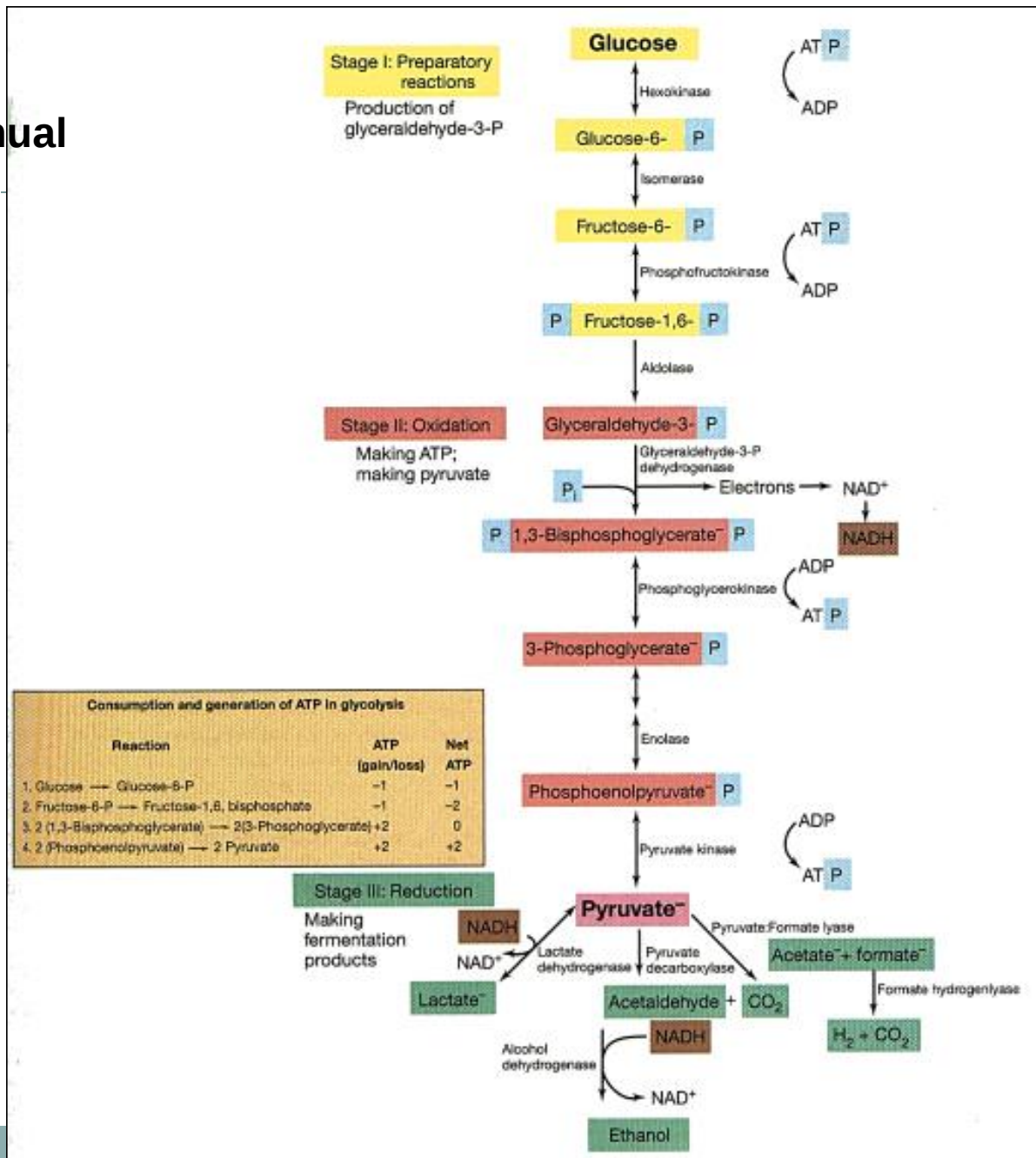
(2) Fermentação → reações em que compostos orgânicos atuam como substratos e como agentes de oxidação, em uma seqüência ordenada de reações enzimáticas.

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

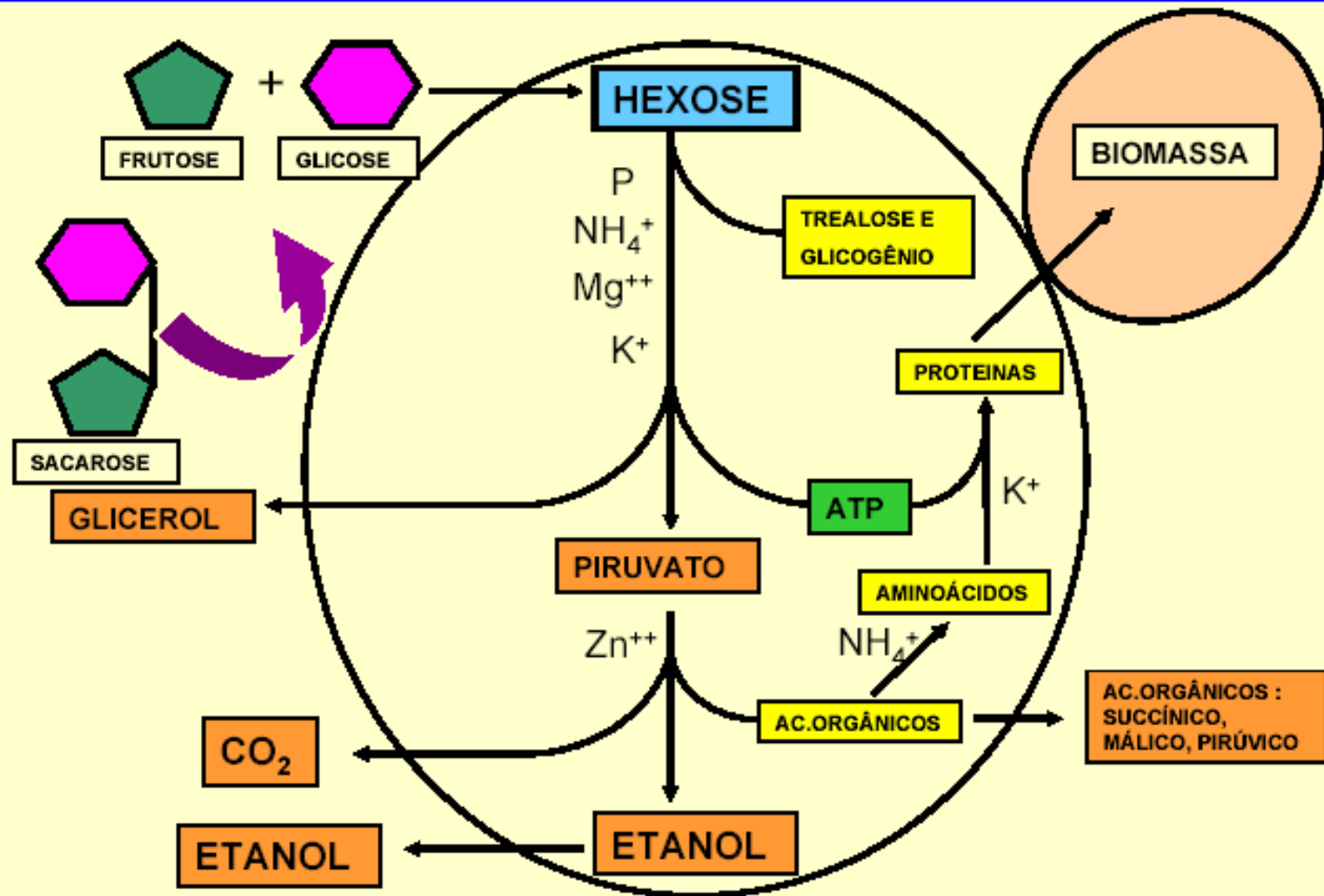




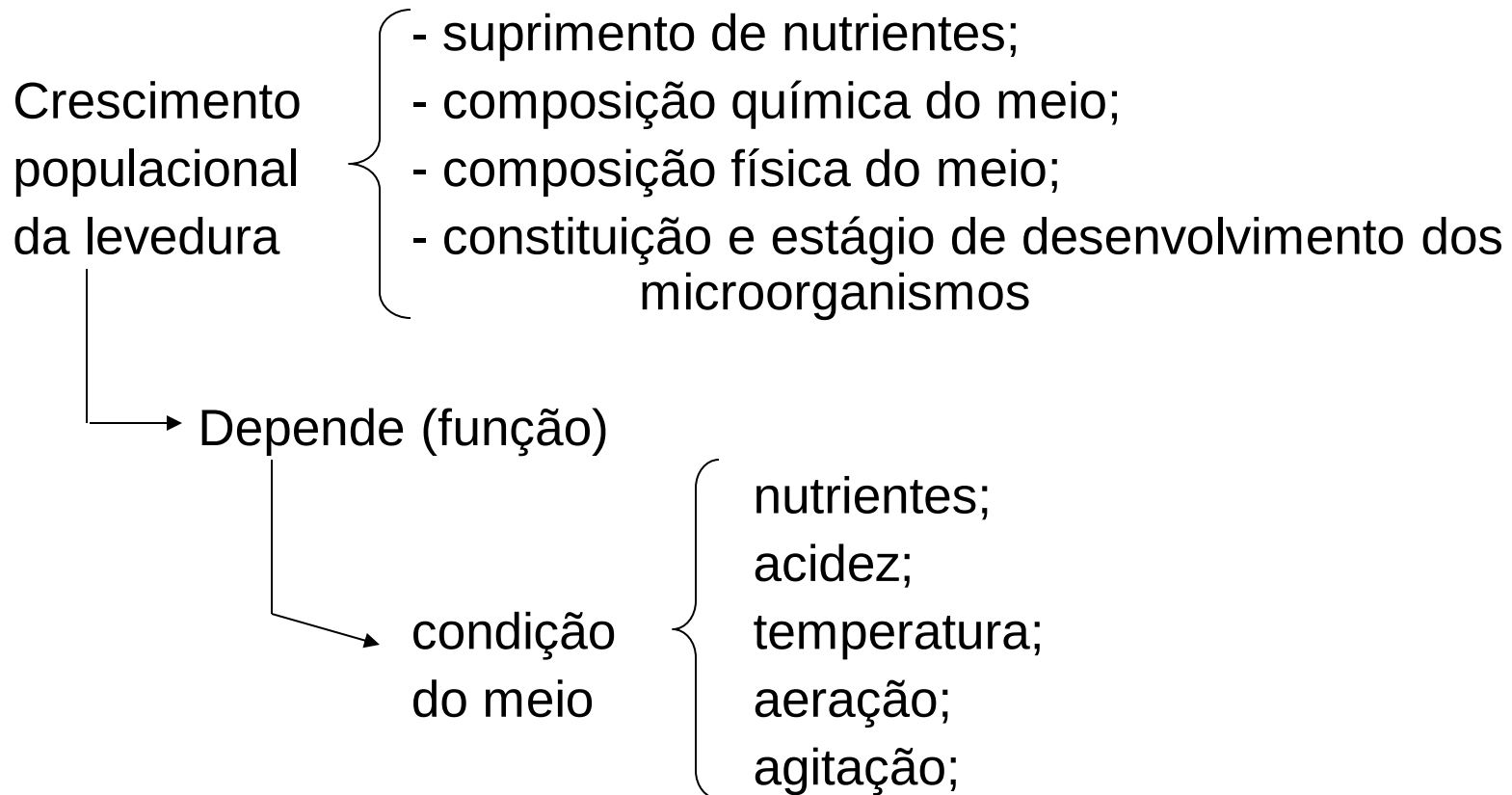
Bergey's Manual (2000)



A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

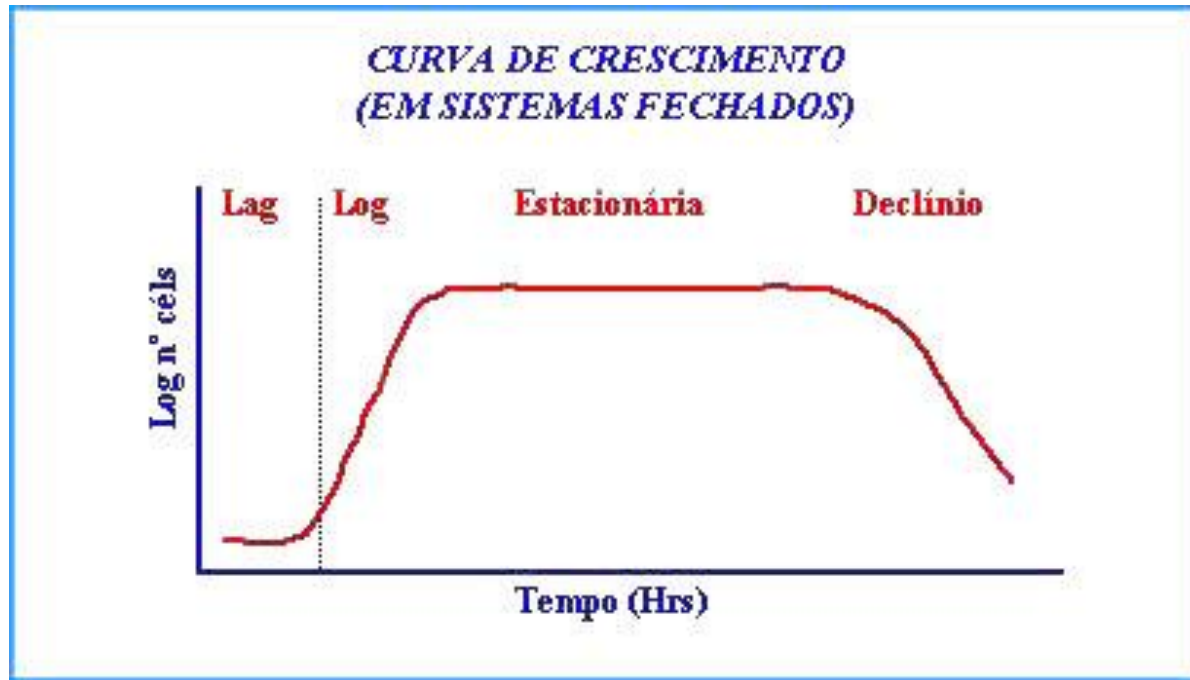


DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS



CINÉTICA:

Desenvolvimento ou crescimento → referente aumento populacional (multiplicação celular)





(1) **Fase “Lag”** → adaptação, reconstituição enzimática, degradação macromolecular, etc.

função:

- ✓ linhagem de levedura;
- ✓ idade do cultivo antes da transferência do meio;
- ✓ composição dos meios de cultivo anterior e novo.

(2) **Fase Exponencial** → aumento exponencial do número de células, cada célula se divide a intervalos constantes de tempo.

Caracteriza-se por :

- aumento exponencial do n° de células da população
- intenso metabolismo e estabiliza o tempo de geração das leveduras
- grande quantidade de produtos de excreção, metabólitos intermediários, temperatura e outros fatores alteram rapidamente a composição
- duração é controlada → composição e estado físico do meio dependendo do n° de células por unidade de volume e a acumulação de metabólitos e produtos finais (inibidores);
- quantidade de inóculo não influencia o tempo de geração na fase exponencial, mas atrasa por prolongar a fase de multiplicação.

(3) Fase Estacionária - caracteriza-se

- ✓ n° de células na cultura permanece quase constante por um período de tempo
- ✓ há um baixo consumo de energia
- ✓ ocorre a manutenção da viabilidade até esgotamento das reservas.

Dentre os fatores decisivos tem-se:

- depleção de nutrientes do meio;
- acúmulo de produtos finais tóxicos.

(4) Fase Declínio –

- ✓ o número de células que morrem excede o número de células novas, que será função dos fatores:
 - ✓ composição do meio (esgotamento de nutrientes, acúmulo de produtos finais, etc);
 - ✓ condições físicas e químicas do meio (pH, temperatura, etc.)

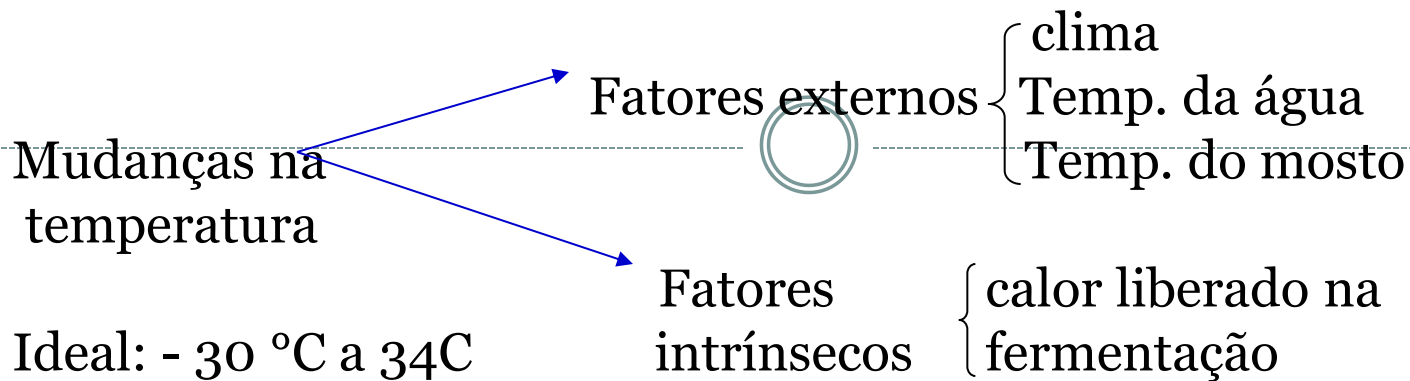
Obs: A autólise das células, as sobreviventes podem se multiplicar aumentando esta fase. → Podendo formar “esporos ou ascósporos”

Efeito da concentração de Etanol

inibe a atividade metabólica e levando a morte (sem condição de sobrevivência);

limite no vinho: 12% de álcool → variável por: espécie e linhagem de leveduras e condições da fermentação.

Efeito da temperatura



(a) Influência da temperatura na variação do tempo de geração e do coeficiente específico de crescimento em uma linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Temperatura	Tempo de geração (h)	Coef. espec. de cresc. g/l/h ⁻¹
20	5	0.15
24	3.5	0.21
27	3.0	0.30
30	2.2	0.31
36	2.1	0.29
38	-	0.19
40	4.0	-

Efeito da concentração de sólidos

- Mosto de melaço de baixa pureza necessita de concentração sólidos ($\text{Brix} \geq 25$) elevada para % de álcool no vinho seja satisfatório. **Efeito osmofilico.**
- Mosto de matéria prima de alta pureza se o Brix for elevado dará um vinho com alta concentração de álcool, e inibirá o fermento.
- Tecnicamente o mosto de caldo e mel não deverá ultrapassar a 22 Brix

PREPARO DO MOSTO E DO FERMENTO

28

INTRODUÇÃO

29

Preparo do mosto → condicionar a matéria prima para atender as exigências da fermentação

- 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)

Consequências dos cuidados no tratamento do mosto

30

- maior eficiência do processo;
- economia de água e vapor;
- proteção dos equipamentos
- continuidade do processo fermentativo e de destilação, e
- melhor qualidade do álcool.

2. Mosto Ideal

2.1 Brix e Açúcares Totais

Brix - 15 a 20

ART - 13 a 16 % (vinho → 8 a 10 GL)

→ e Melaço esgotado



equilíbrio
multiplicação/
fermentação

(2) Acidez total e pH

levedura
(Saccharomyces)

vs.

bactérias
dos grupos do
ácido láctico
e acético

{ índice pH 4,5

Acidez sulfúrica 2 a 2,5 g/L (<5,0 g/L)

2.2 Teor de fósforo no mosto

≥ 30 mg P_2O_5 / litro necessárias para formação do ATP e ADP

PREPARO DO FERMENTO



- concentração fermento → limite

→ Esquemas/ fases do processo p/ preferência a multiplicação

(1) Fermento Prensado

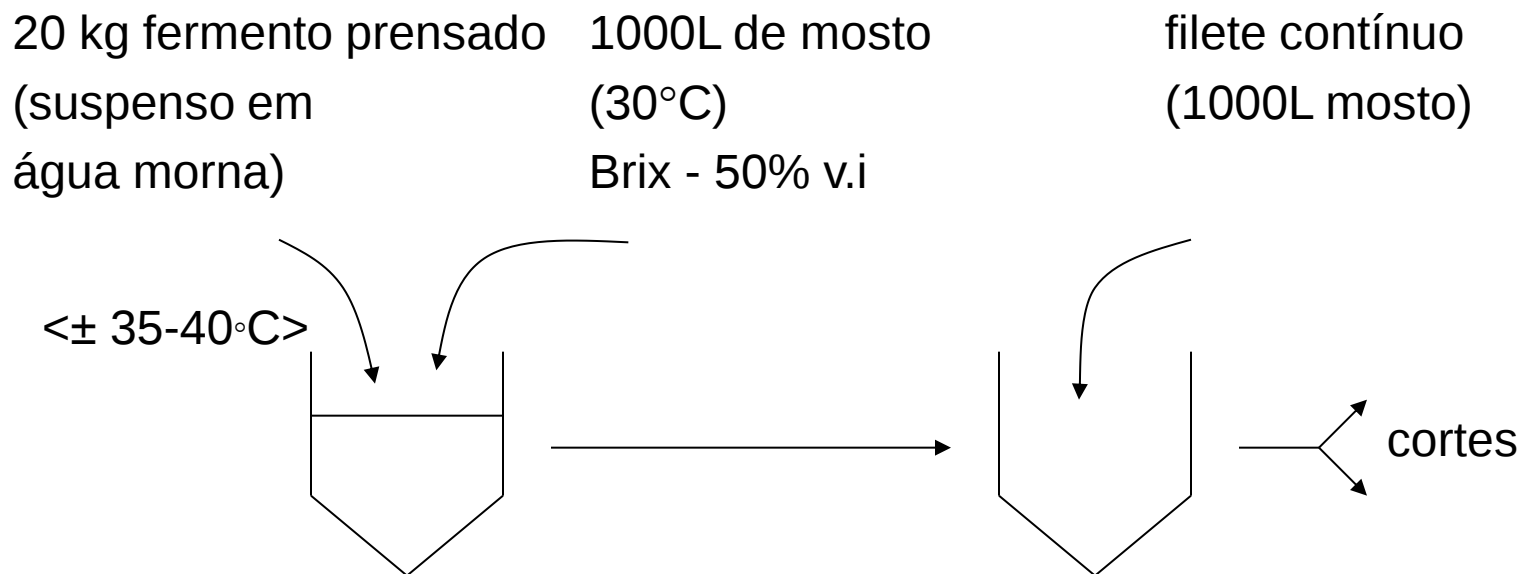
(2) Fermento selecionado

(3) Reciclo de células

(1) Fermento Prensado



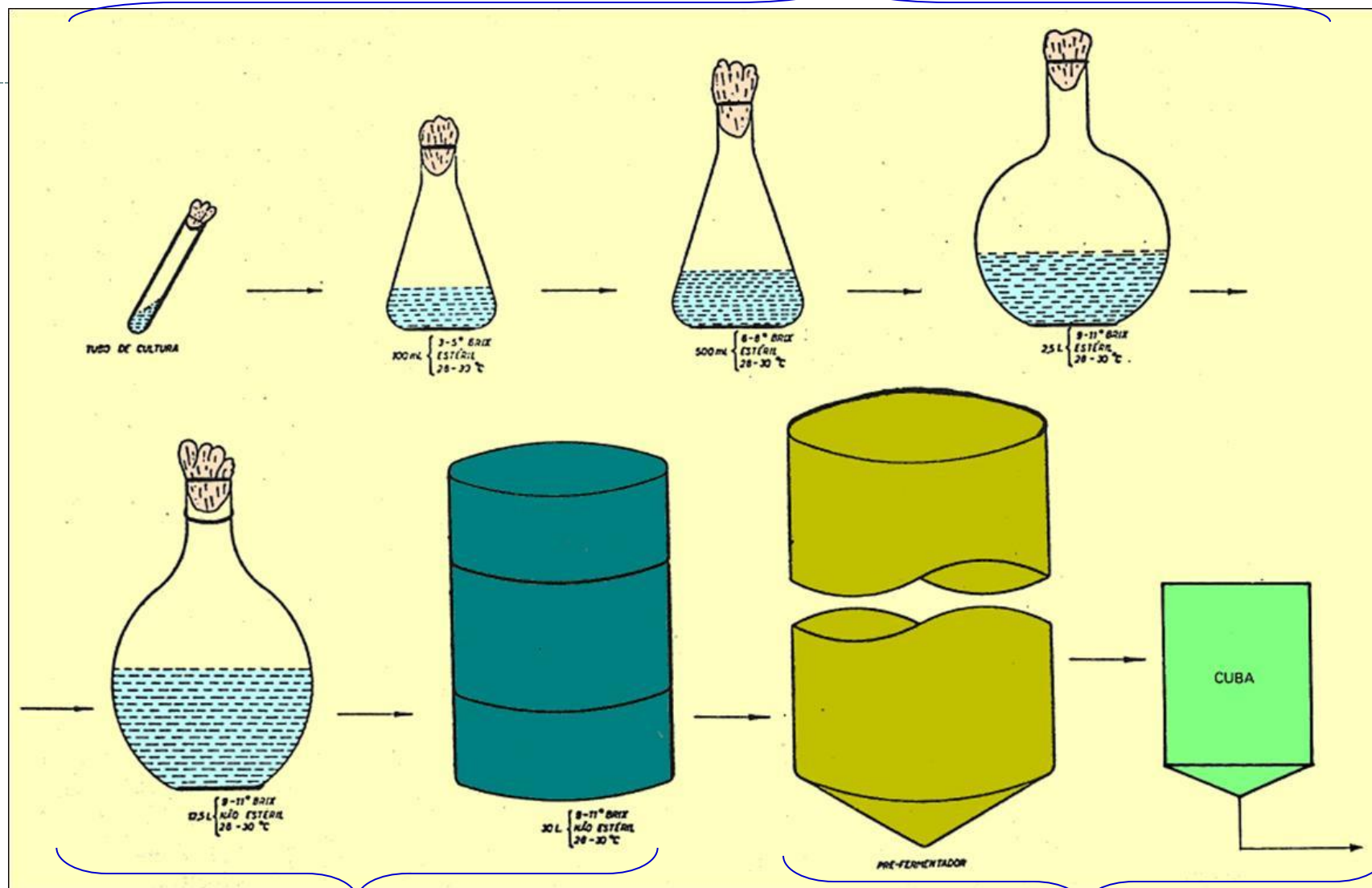
Esquema:



- 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

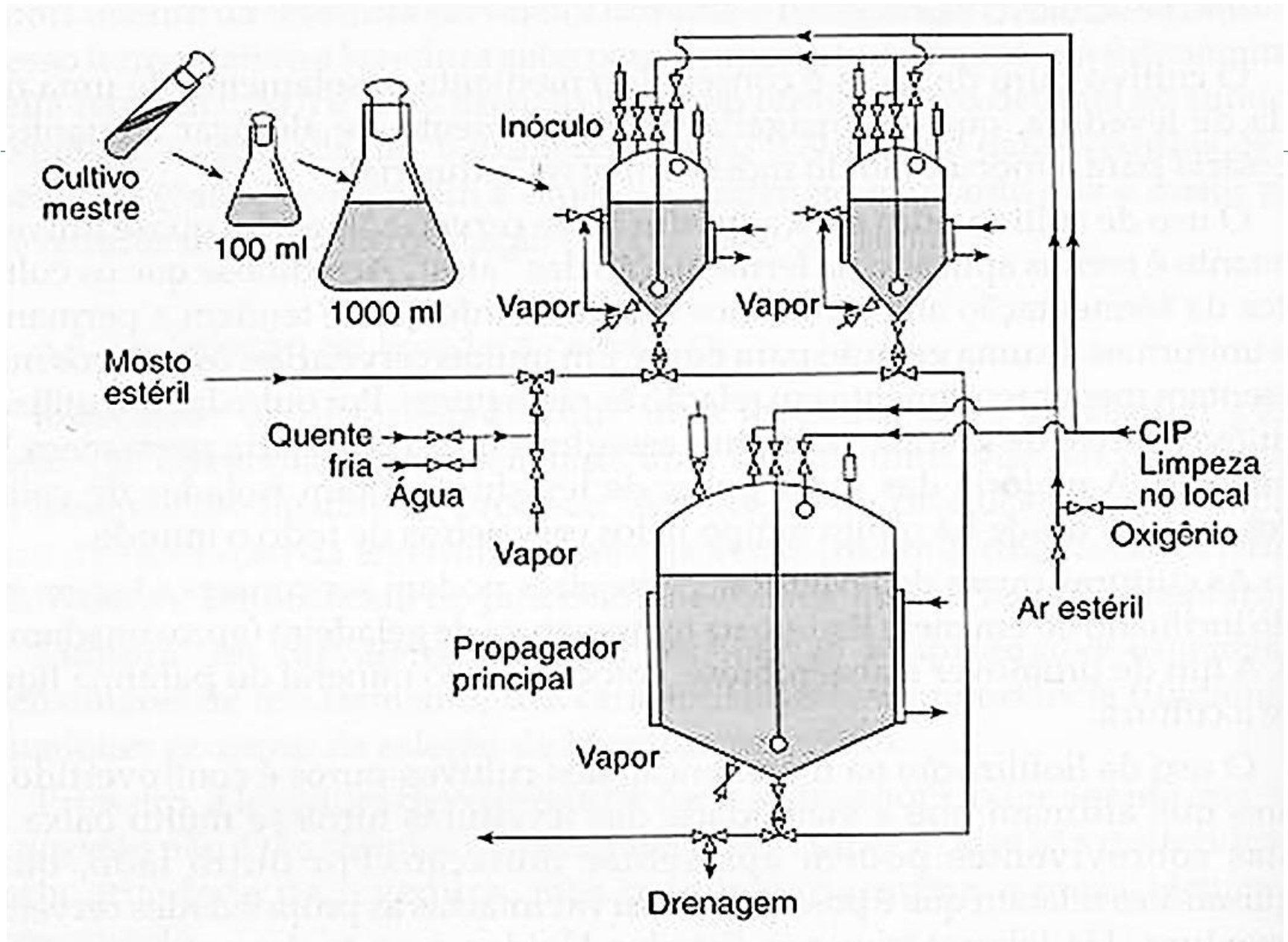
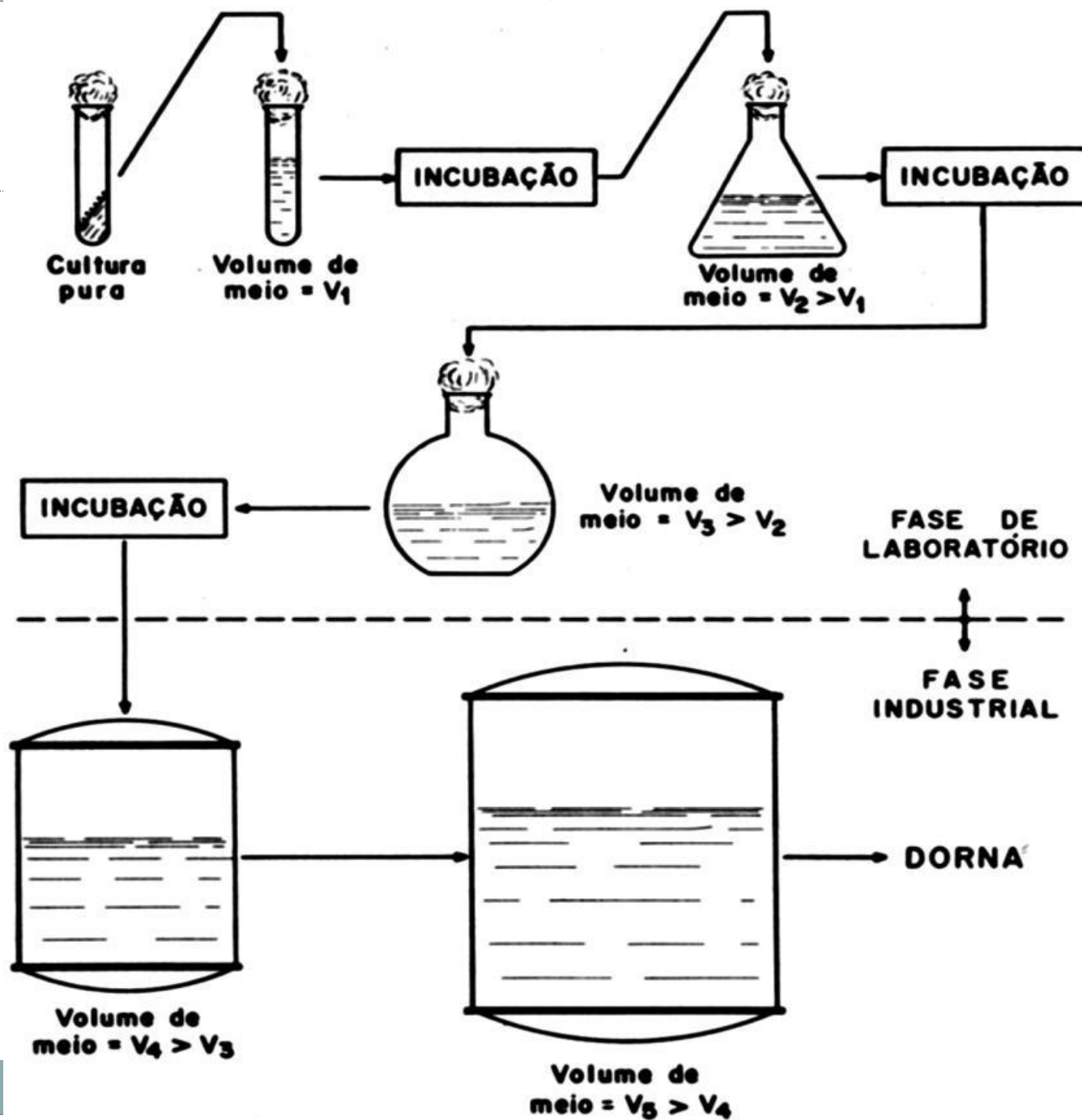
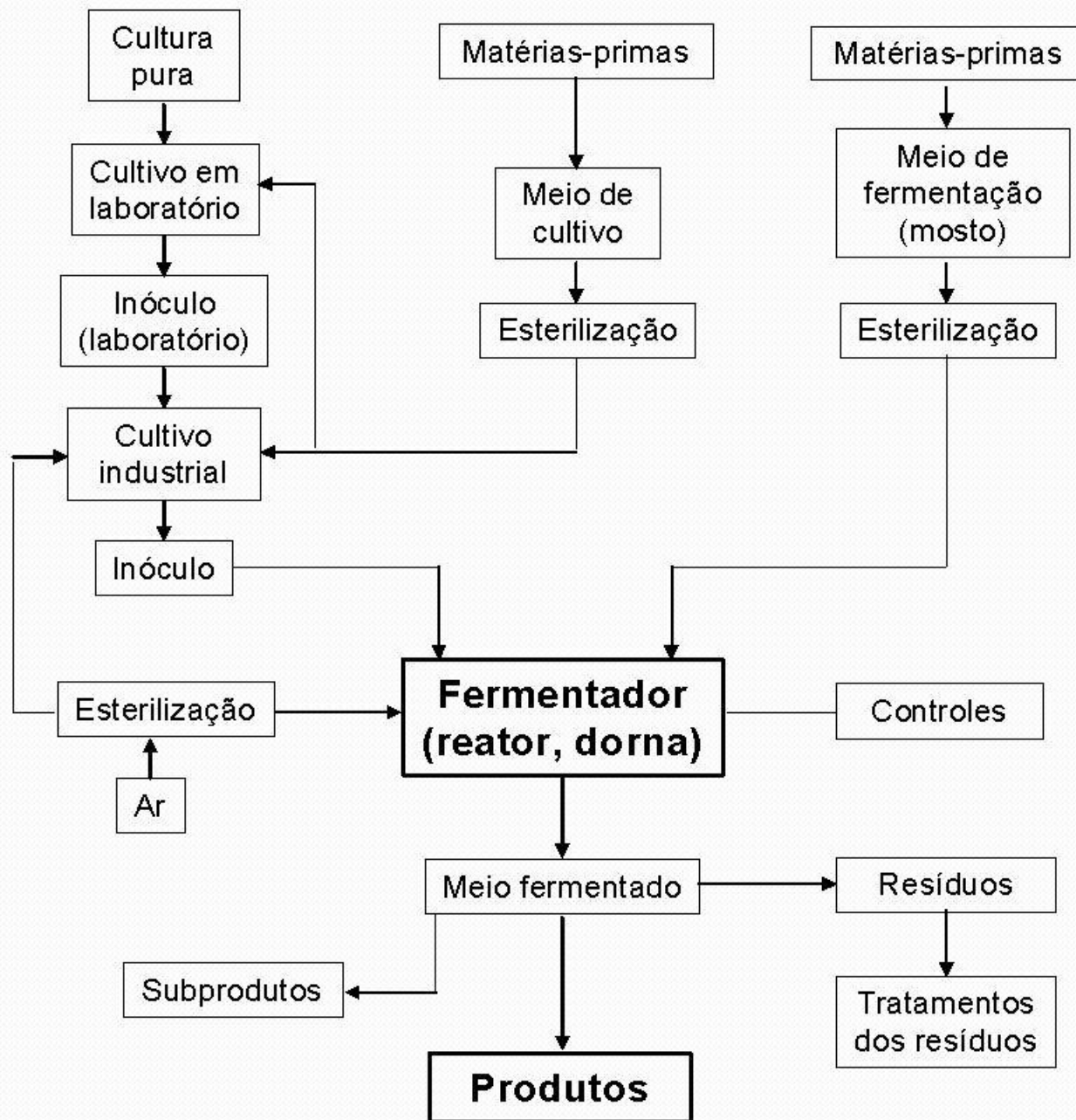


Diagrama esquemático de uma planta de propagação de cultura pura de levedura



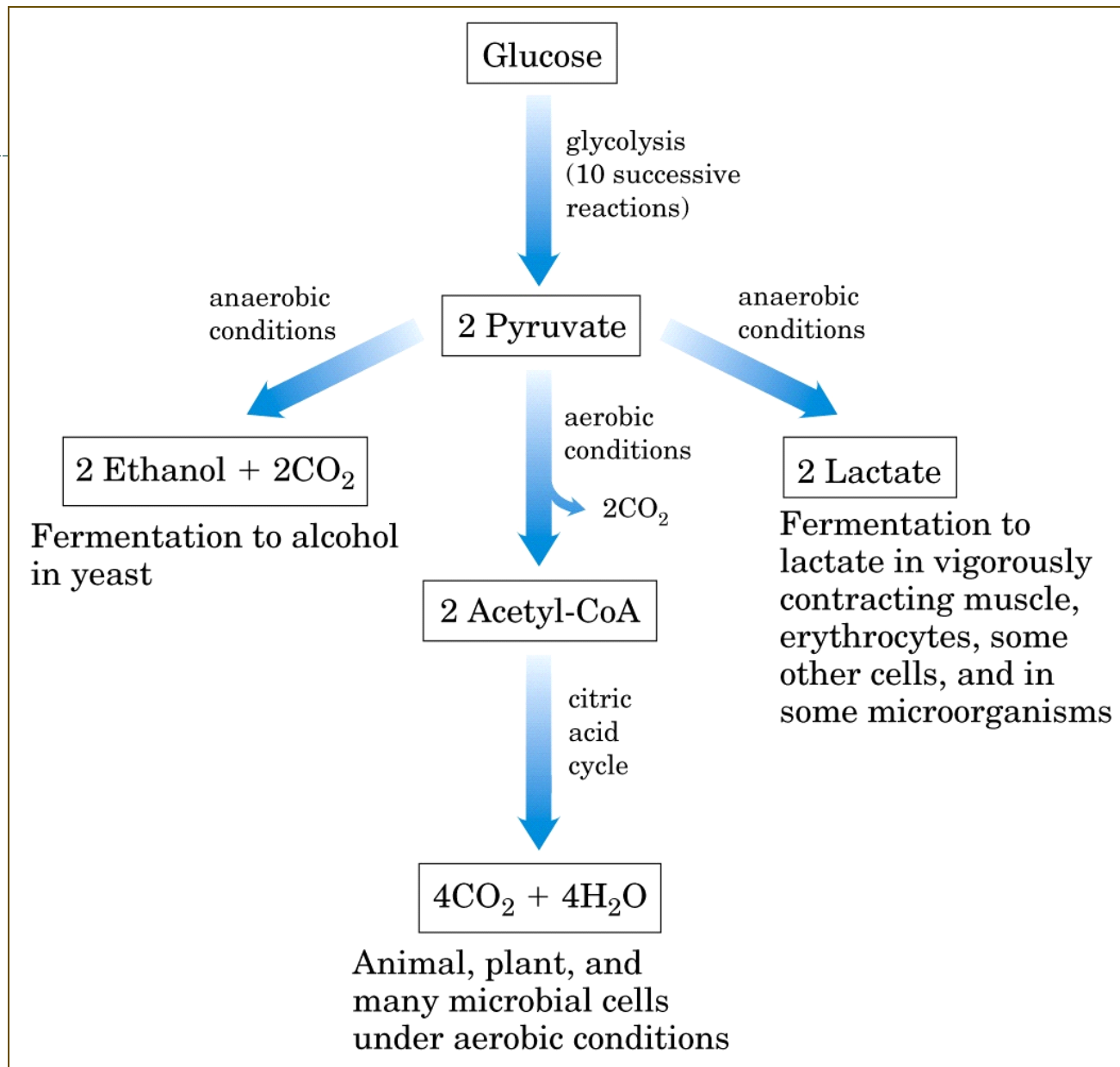


Principais etapas de um processo fermentativo industrial genérico

B. Bioquímica da fermentação alcoólica

38

- 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

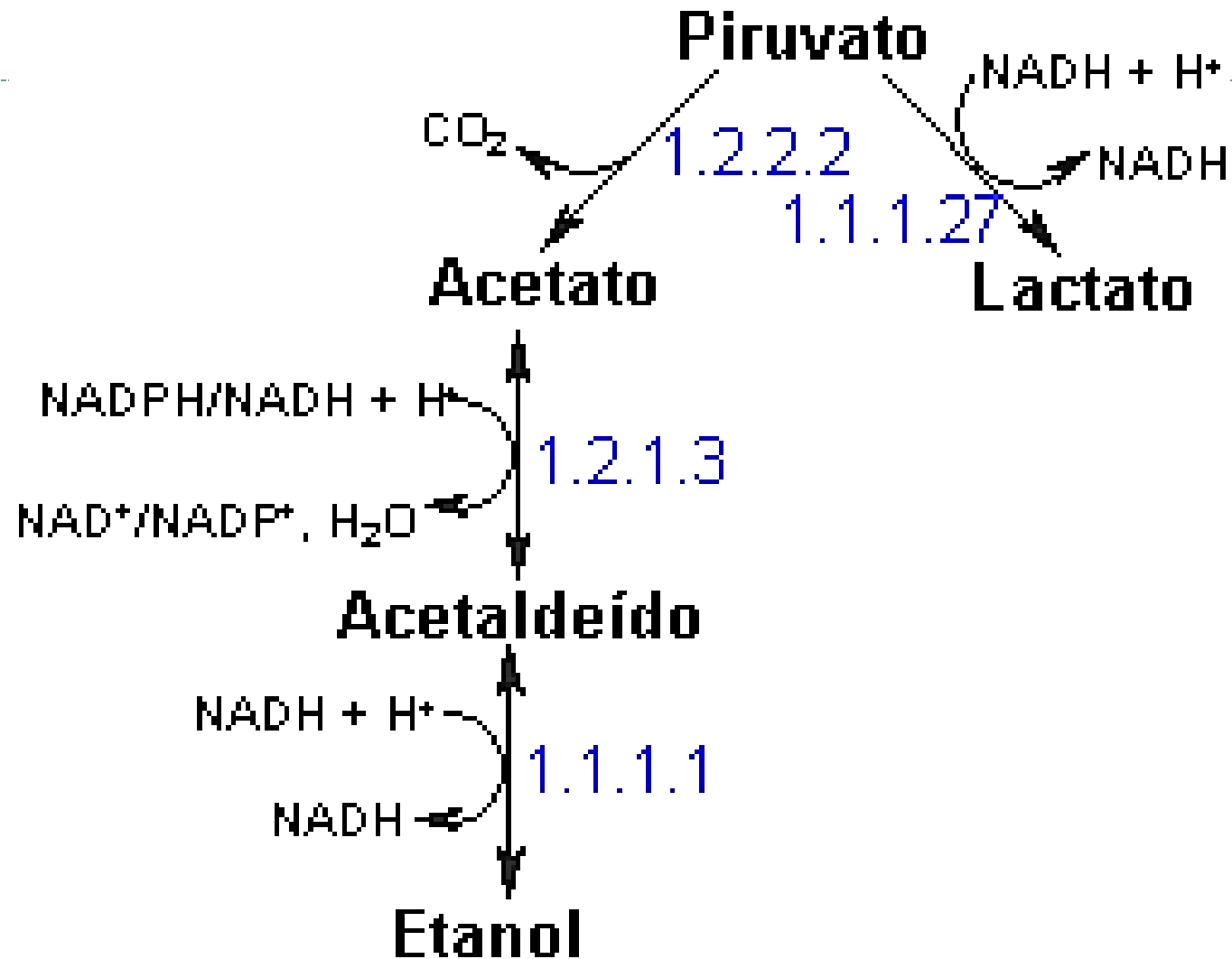


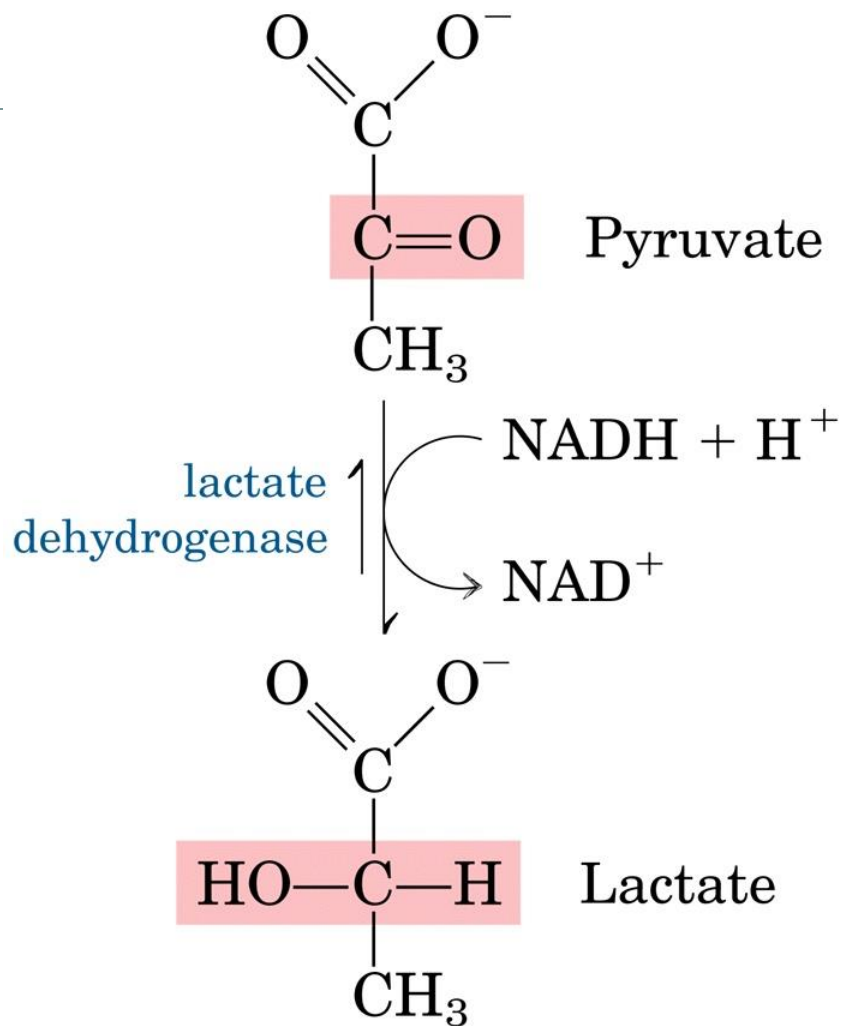
Destinos metabólicos
comuns do piruvato
(Lehninger, 2000)

PONTO CHAVE - UTILIZAÇÃO DO **PIRUVATO**

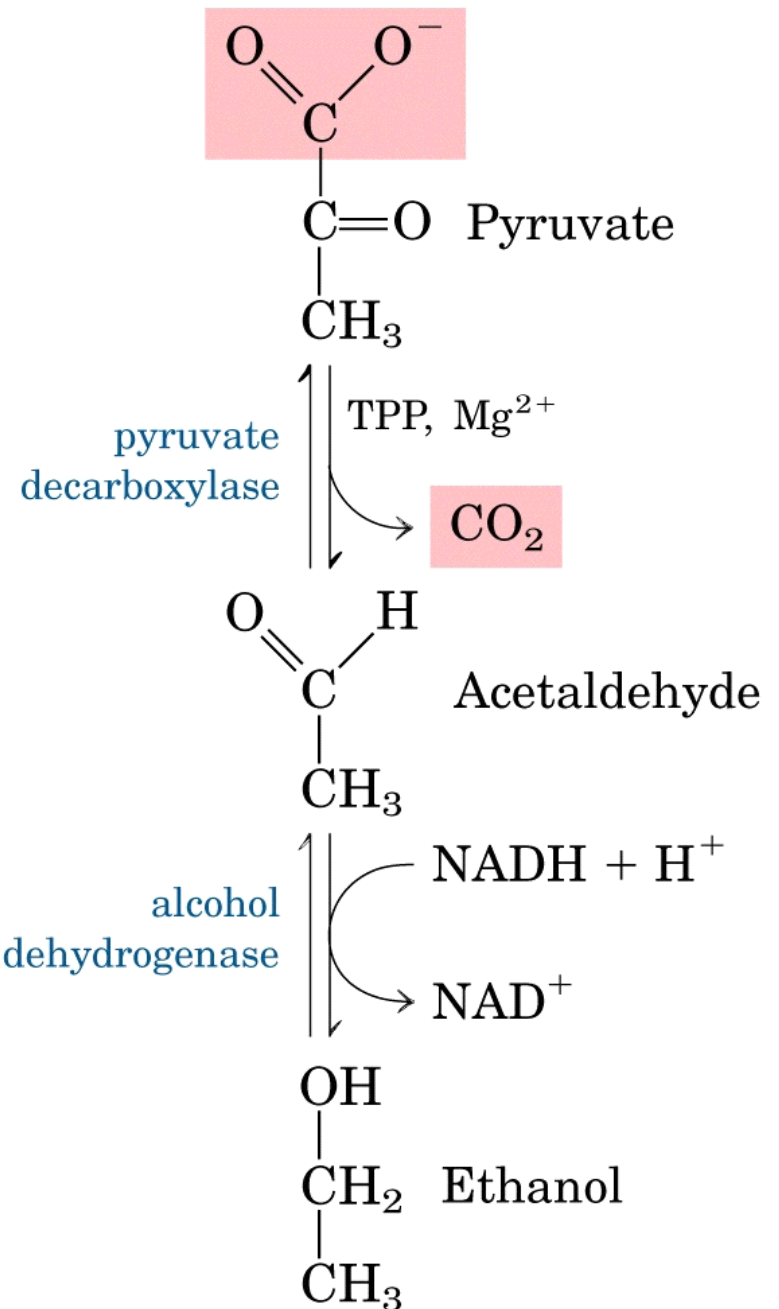
(um intermediário formado durante o catabolismo da glicose)

- 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 é 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.





$$\Delta G'^{\circ} = -25.1 \text{ kJ/mol}$$



FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

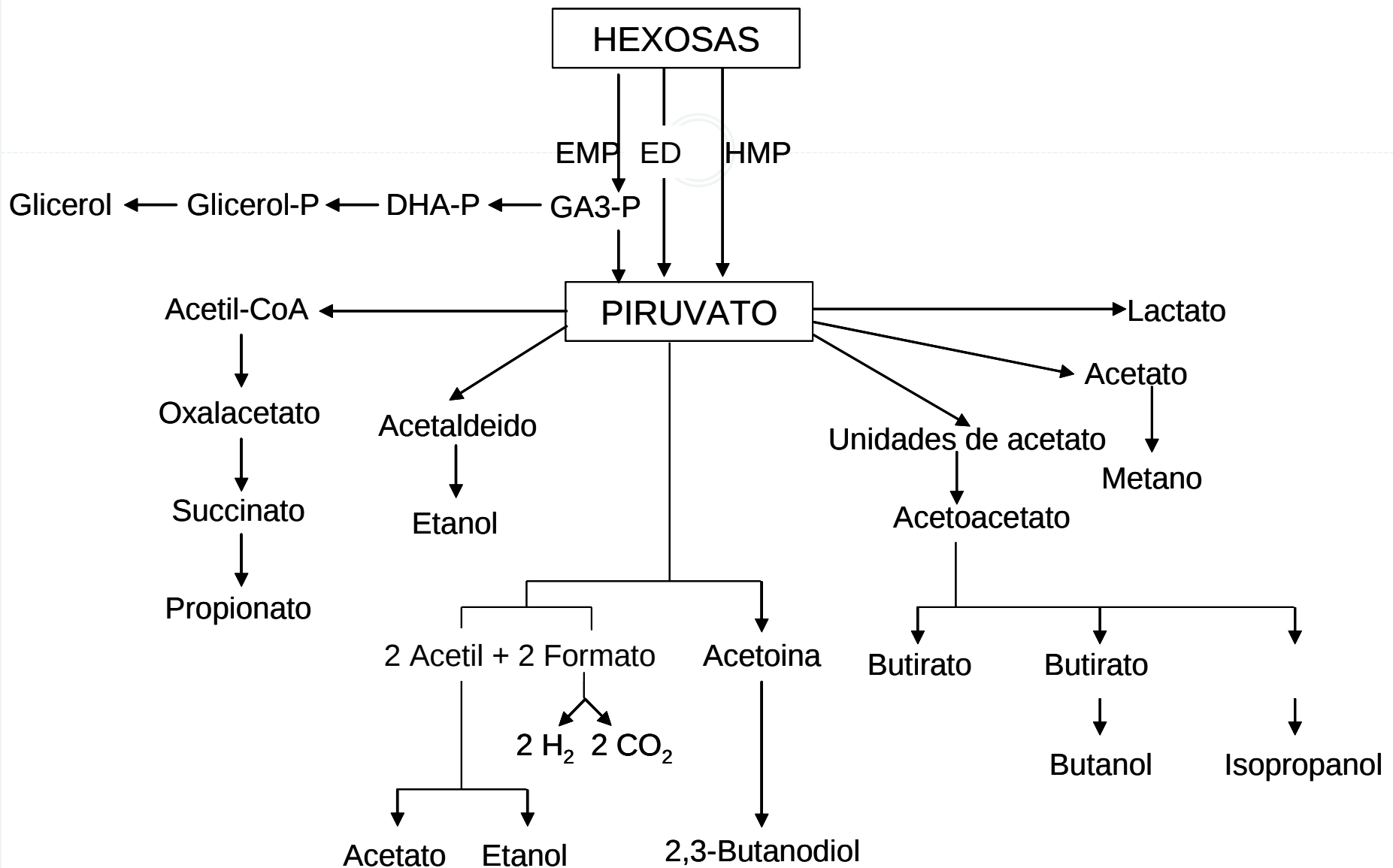
- açúcares + leveduras → álcool etílico + CO₂
(mosto) (fermento) (vinho)

*Saccharomyces
cerevisiae*

- formação de compostos secundários: congêneres

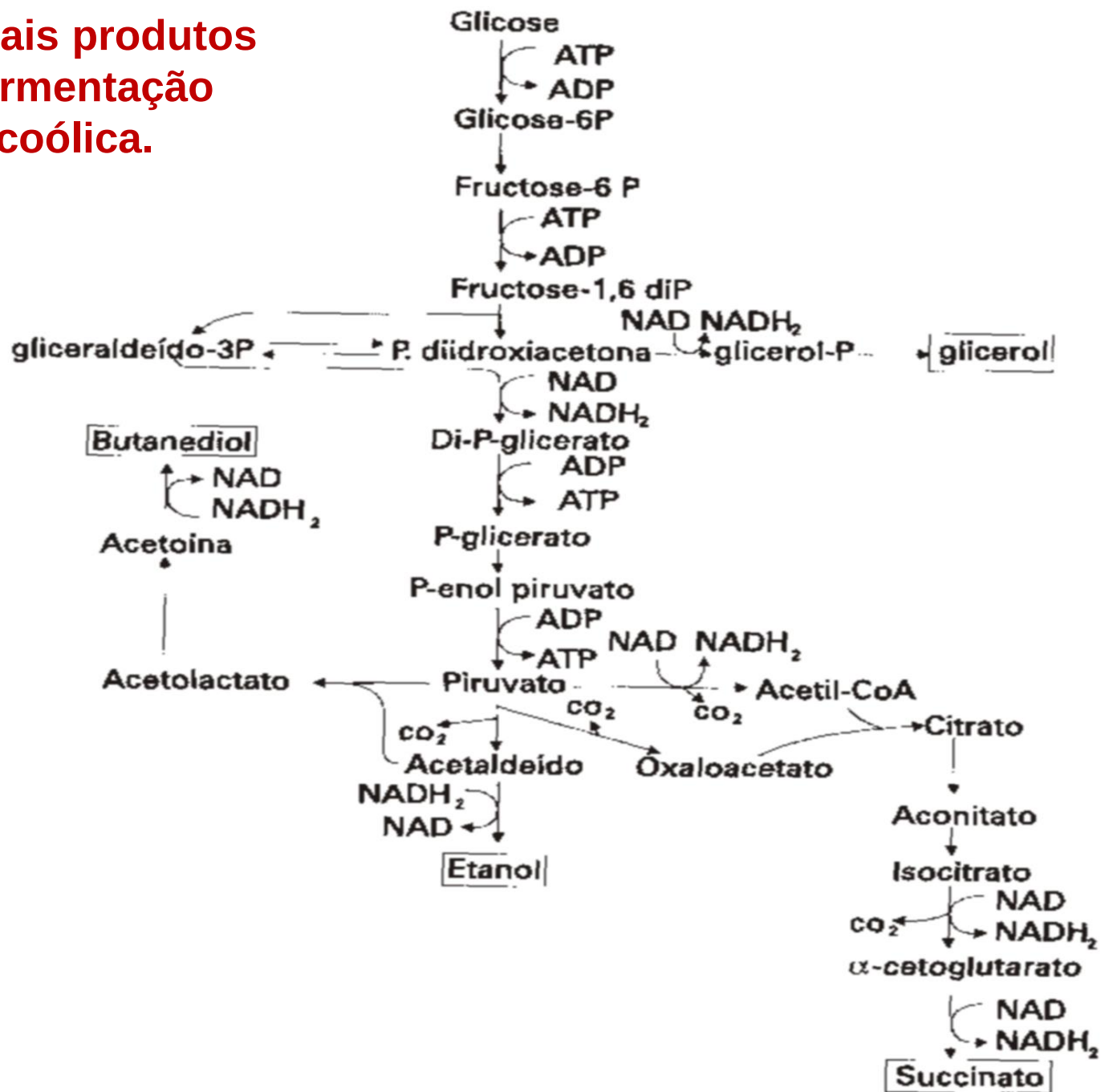
- Ésteres: processo oxidativo entre álcoois e ácidos
- Ácidos: acético (oxidação de aldeído acético), láctico, succínico (aa = ácido glutâmico)
- Álcoois superiores: metabolismo de aa, microrg. contaminantes
- Glicerol: produto normal da fermentação alcoólica
- Metanol: decomposição de pectinas
- Furfural: 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.



B. Fatores que afetam a fermentação

48

- **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:

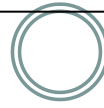
- descontínua
- contínua

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;

Sistemas de Partida

Fermentação



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°C).

Fermento Reciclado / Seleccionado (leite 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

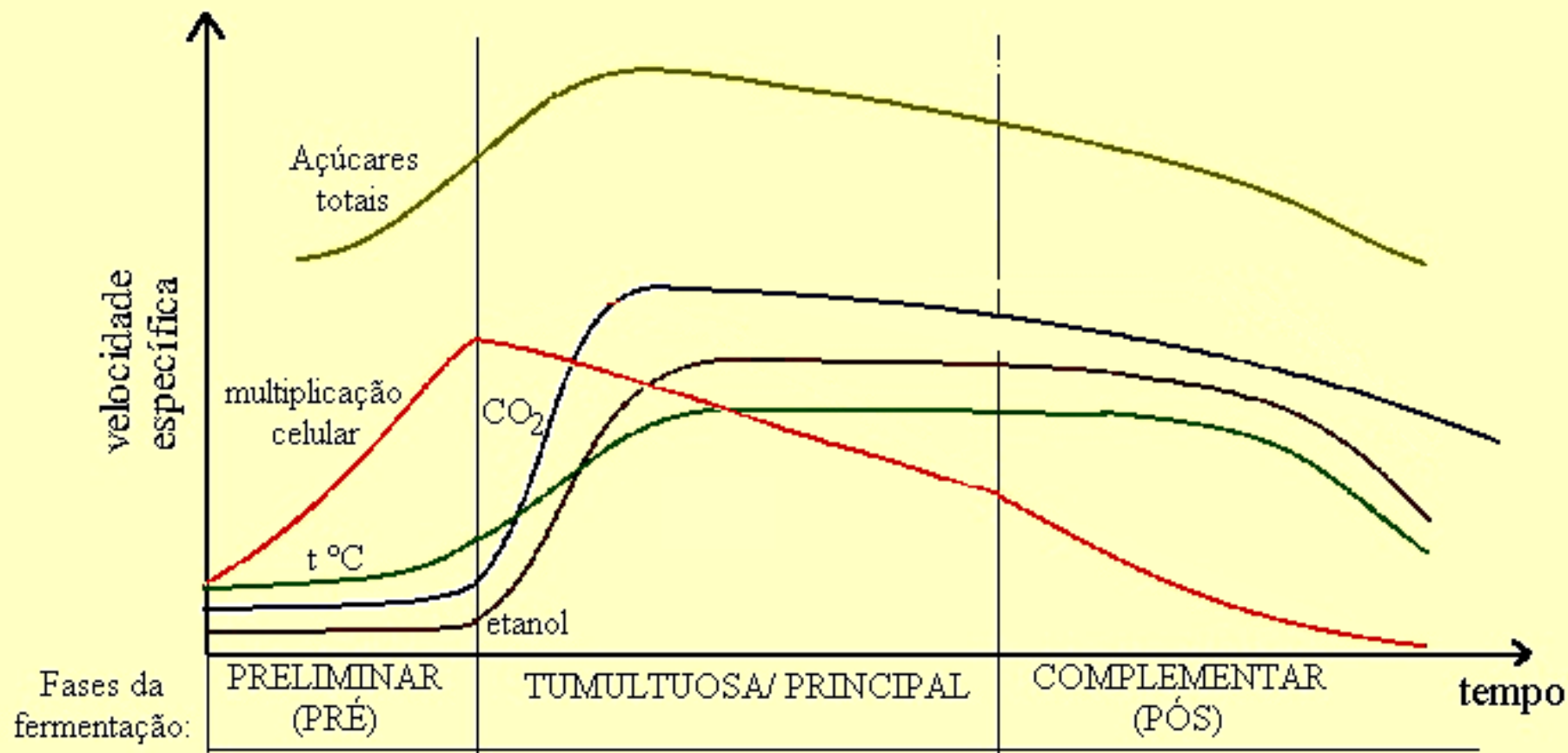
Função

desprendimento de CO₂

temperatura

produção de etanol

consumo de açúcares



Fases da fermentação (Horii, 1990)

a) Fermentação preliminar: Fatores

- adição do mosto em filete gradual
- concentração celular do pé-de-cuba
- seleção da levedura (utilizada)
- preparo do mosto

b) Fermentação Principal: Fatores

- temperatura vs. Refrigeração interna
- formação de espuma vs. tipo de mosto e levedura
- (mosto-melaço vs. anti-espumante)
- mosto-caldo misto vs. perdas
- moer canas maduras
- mostos corrigidos;
- enchimento de dorna
- temp. limite: 35°C
- filete contínuo

c) Fermentação Complementar ou Pós-Fermentação



- reduzir o período vs. contaminação vs. qualidade do pé remanescente (fundo de dorna)
- diminuição da viabilidade celular em função:
 - acúmulo de metabólitos, esgotamento nutricional e de carboidratos, e acúmulo das toxinas dos contaminantes
- dispêndio de tempo → reduz a capacidade das dornas.

Ex: processo de decantação

