

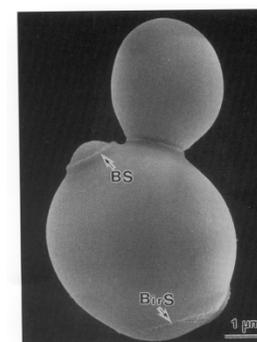
Universidade de São Paulo – USP



Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição - LAN

LAN 685 - Tecnologia do Álcool

MICROORGANISMOS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA - LEVEDURAS E BACTÉRIAS



Prof. Antonio Sampaio Baptista



Microorganismos para a fermentação industrial

1. INTRODUÇÃO

2 Microbiologia da fermentação alcoólica

3. Leveduras

- Fisiologia e bioquímica das leveduras
- Fatores que interferem no crescimento das leveduras
- Leveduras no processo de obtenção do etanol

4. Bactérias

5. Conseqüências da contaminação bacteriana na fermentação industrial

6. Considerações finais

Leveduras - novas oportunidades para o Setor Sucroenergético

Introdução

As leveduras são microrganismos unicelulares, eucarióticos, normalmente, não patogênicos e são classificados como fungos.

- ✓ Esse grupo de microrganismo já utilizado pela humanidade a mais de 5000 anos;
- ✓ As leveduras foram descritas pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek, em 1680;
- ✓ Em 1857, Louis Pasteur associou a fermentação alcoólica à presença de leveduras;

Leveduras - novas oportunidades para o Setor Sucroenergético

Introdução

- ✓ Os principais estudos de classificação das leveduras se deram entre 1930 e 1960;
- ✓ Em 1978, foi realizada a primeira transformação genética em leveduras;
- ✓ Em 1990, foi aprovado o uso da primeira levedura transgênica para panificação.
- ✓ Na indústria da cerveja, em 1994, teve início o uso de leveduras transgênicas.
- ✓ Em 1996, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se o primeiro ser vivo a ter todo o genoma mapeado.

Tipos de leveduras



2.2 Predominantemente:

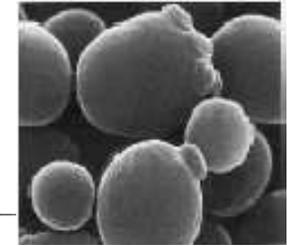
- *Saccharomyces cerevisiae*

Até 1984, existiam várias espécies, mas pela nomenclatura atual são todas classificadas como *Saccharomyces cerevisiae*

2.3 Não-convencionais:

Pichia, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Schwanniomyces*,
Yarrowia, *Phaffia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*,
Zygosaccharomyces

LEVEDURAS



Introdução - Habitat – **Morfologia** – Citologia – Fisiologia - Aplicações

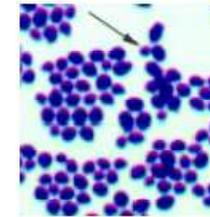
Redondas



Trigonopsis
Candida
Saccharomyces

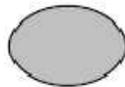


Saccharomyces cerevisiae



Candida albicans

Ovais



Hansenula
Saccharomyces
Trigonopsis

Saccharomyces cerevisiae

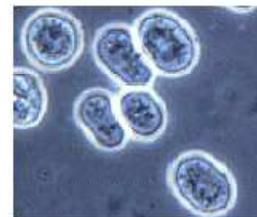
Hansenula



Cilíndricas

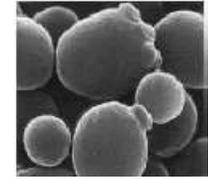


Hansenula
Saccharomyces
Kloëckera



Saccharomyces cerevisiae

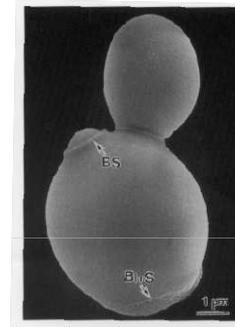
LEVEDURAS



Introdução - Habitat – **Morfologia** – Citologia – Fisiologia - Aplicações

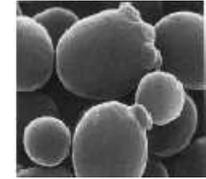
Leveduras → unicelulares, frequentemente ovais, arredondadas e as elípticas.

- ✦ - Comprimento: 5 - 16 micra
- Largura: 3 - 7 micra
- Crescimento: afetado por deficiências → nutrientes, (P e Mg), vitaminas (biotina, niacina, ác. pantotênico e piridoxina).
- Tamanho: 5 vezes maior que bactérias (observação ao microscópio - 100 a 400 x).

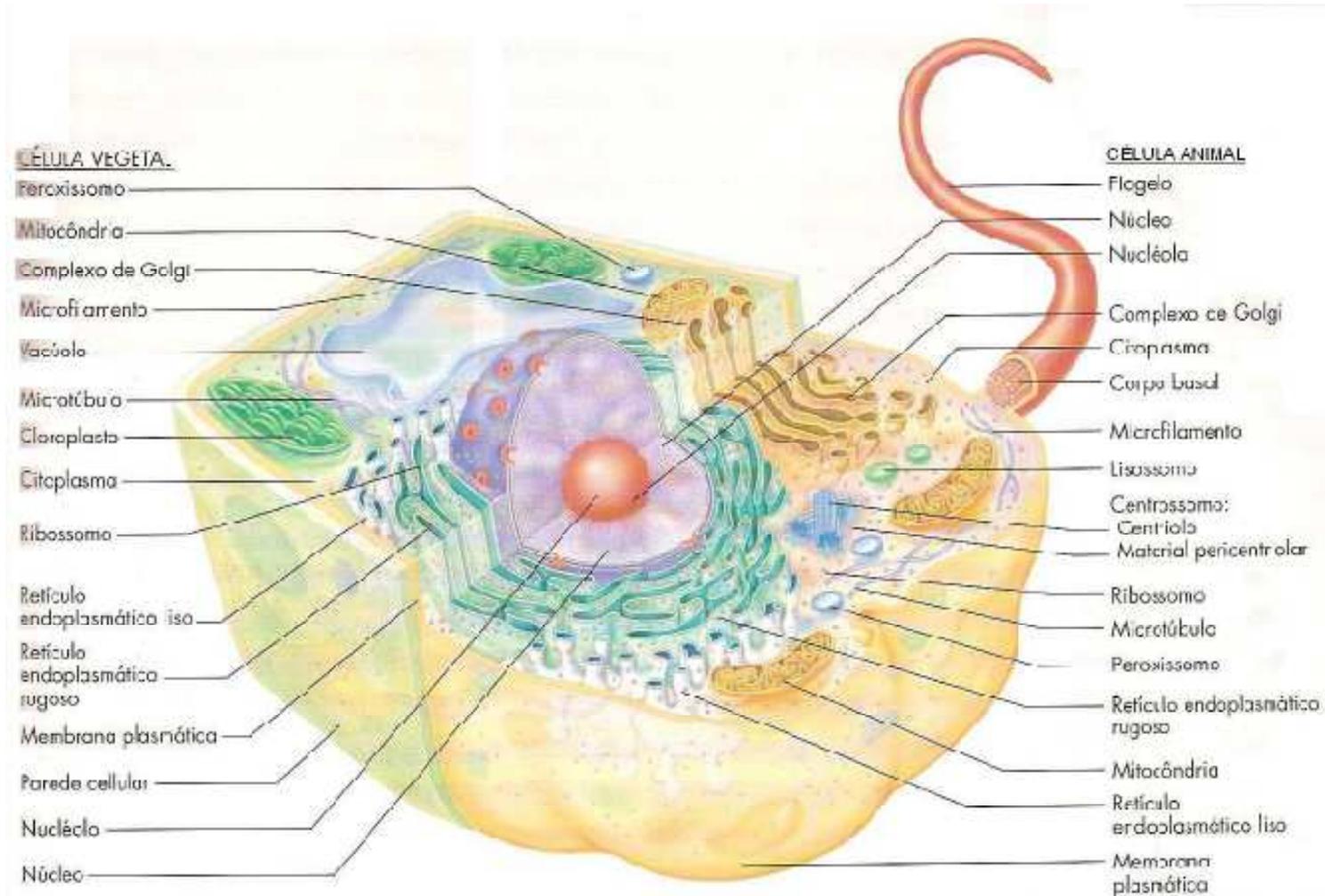


LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – **Citologia** – Fisiologia - Aplicações



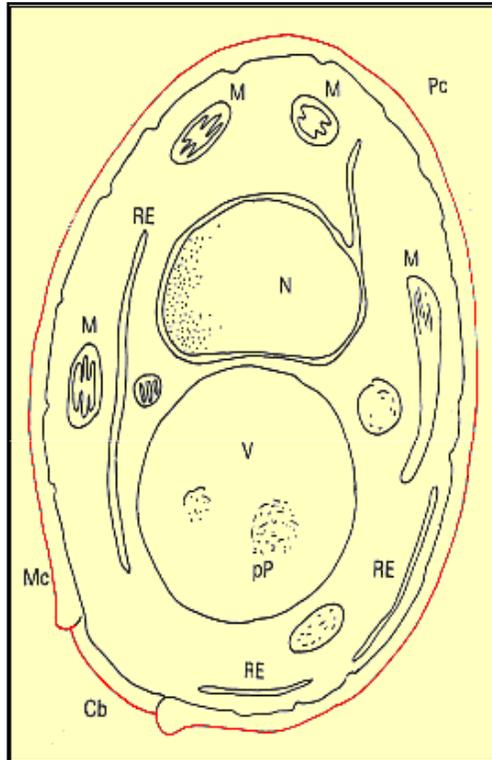
A CÉLULA EUCARIÓTICA



(a) Diagrama altamente esquemático de uma célula eucariótica composta, metade planta metade animal

LEVEDURAS

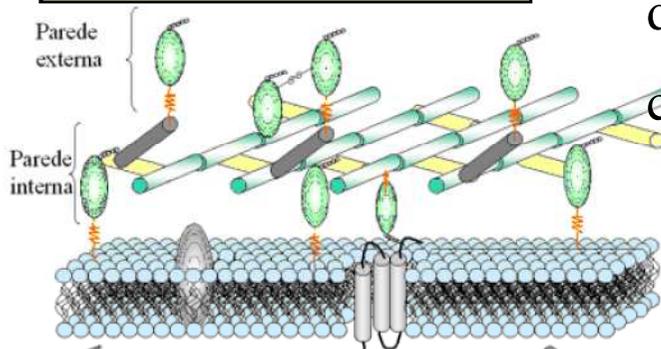
Introdução - Habitat – Morfologia – **Citologia** – Fisiologia - Aplicações



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

Composição: polímeros de glucana (“celulose”), manana (“goma”), quitina, lipídeos, fosfatos e esteróides.

Enzimas extracelulares: invertase, fosfatase, amilopectidases, glucoamilase, etc. (translocação e desdobramento das fontes para utilização pelo citoplasma).



LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – **Citologia** – Fisiologia - Aplicações

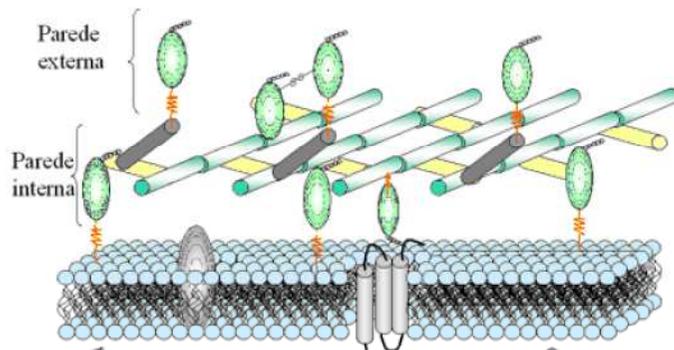
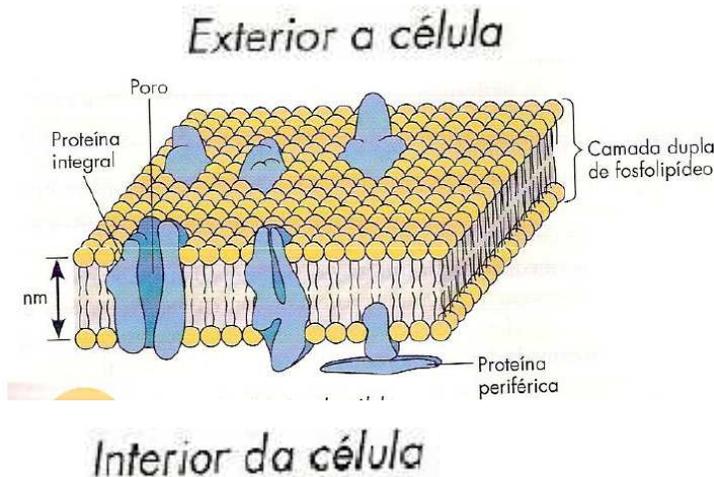
- Membrana Plasmática

(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).



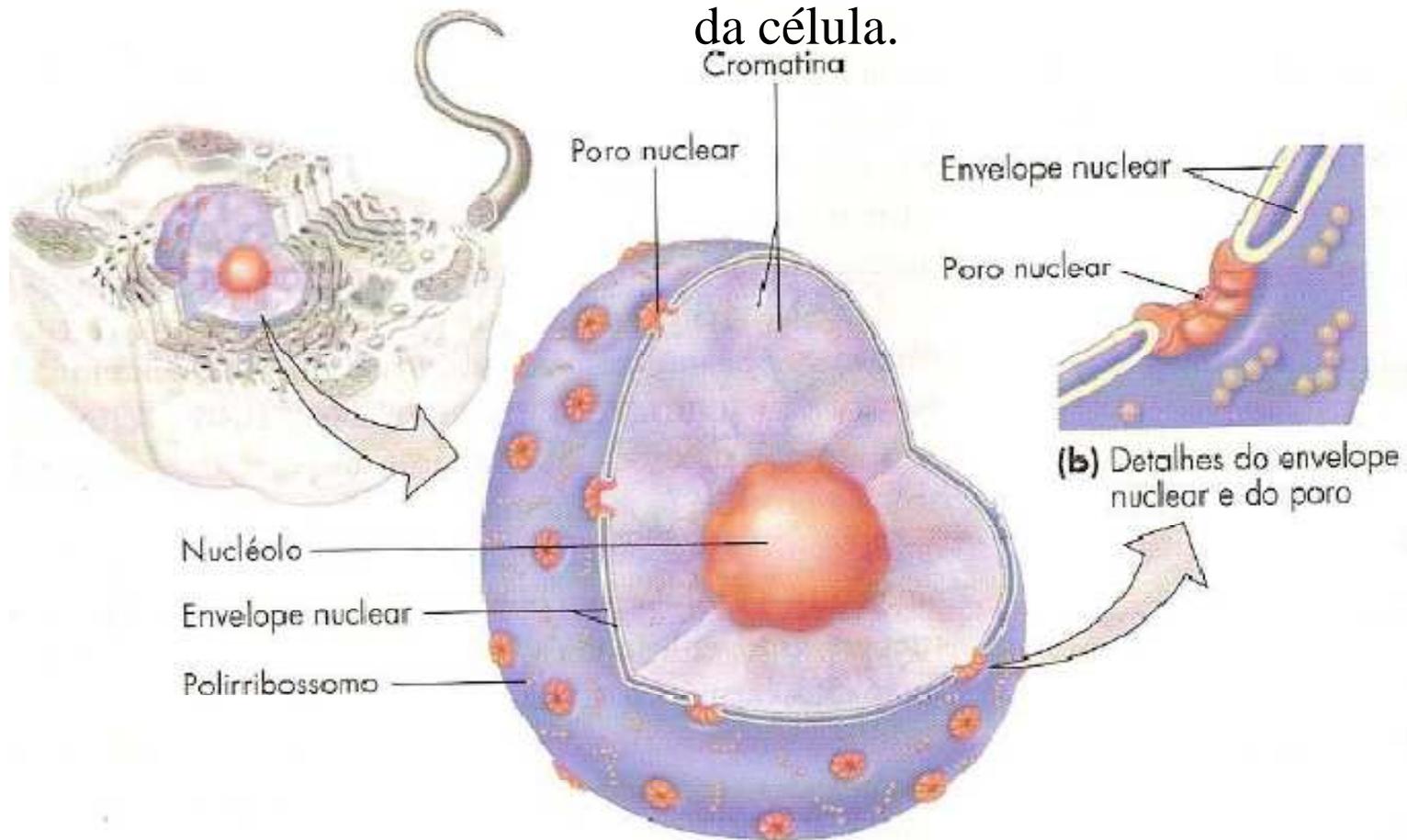
LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – **Citologia** – Fisiologia - Aplicações

- O Núcleo

(5) Núcleo

Onde está contido o material genético da célula.





LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – **Citologia** – Fisiologia - Aplicações

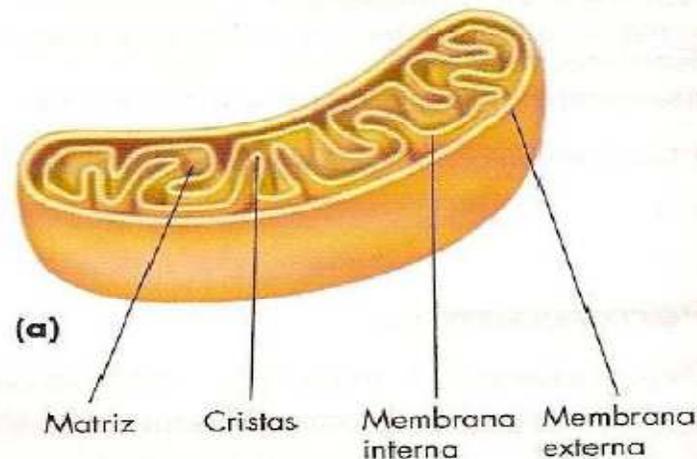
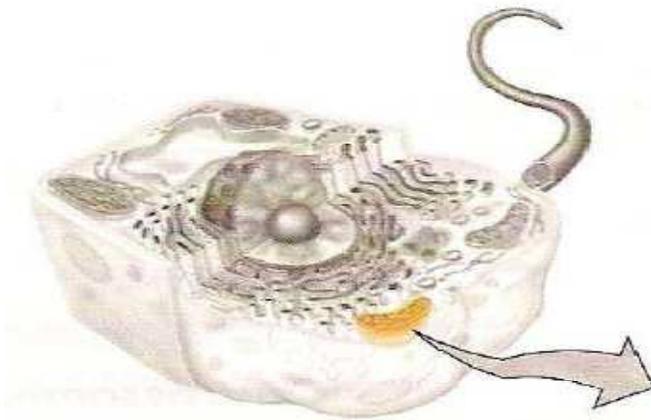


- Mitocôndria

(5) Mitocôndria

pequenas organelas com membrana dupla com “invaginações internas” (cristas);

a função é conversão da energia aeróbica (ATP); síntese de proteínas e RNA.

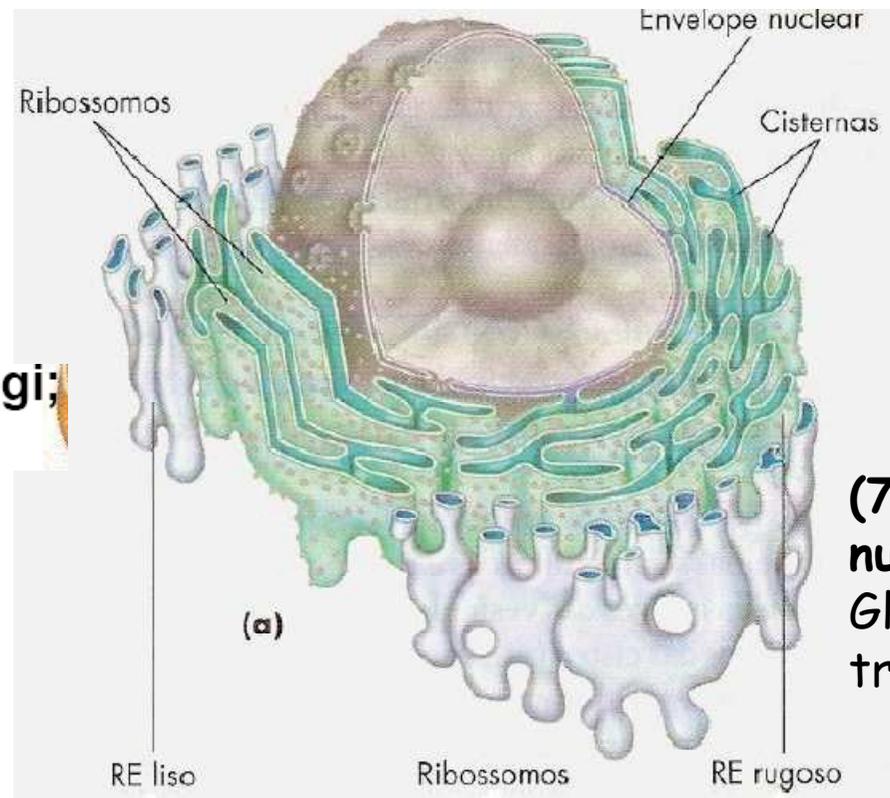


Organelas:

- Retículo Endoplasmático;
- Ribossomos
- Complexo de Golgi;
- Vacúolo;

(6) Ribossomos

Ligado à síntese protéica.



(7) A reserva de nutrientes da célula. Glicogênio, lipídeos, trealose...

(8) Vacúolo

Membrana vacuolar → natureza lipoprotéica.

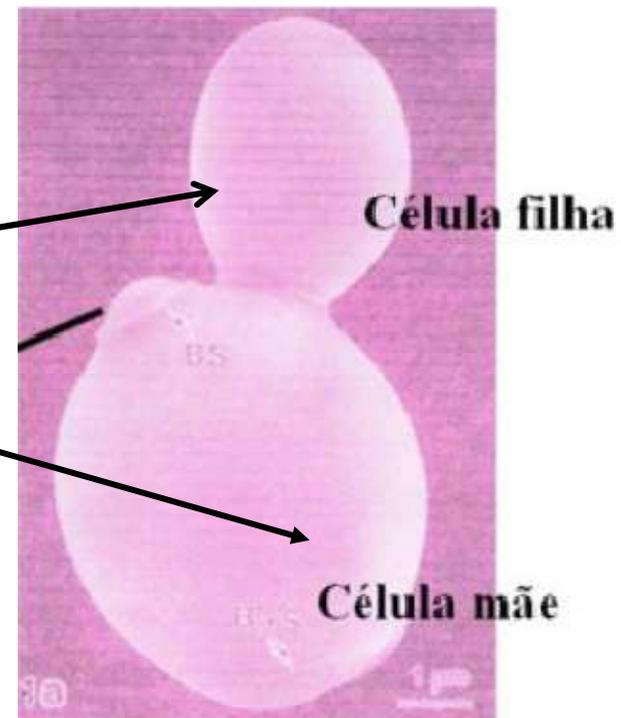
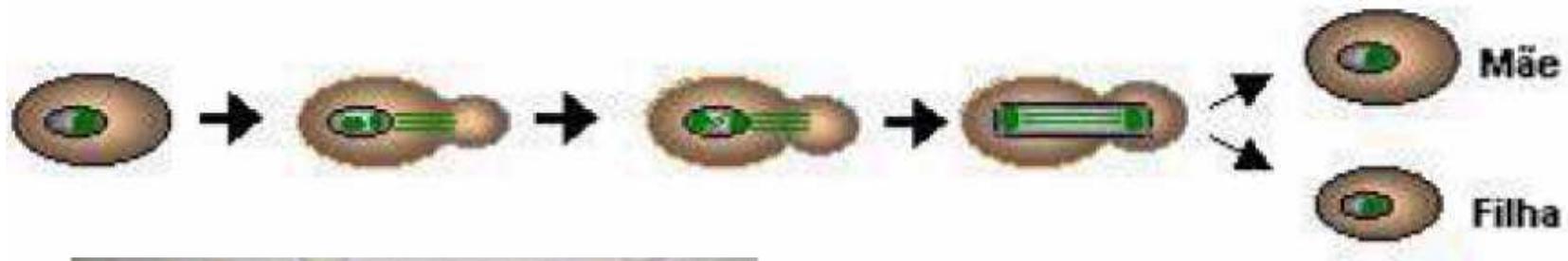
Armazenador temporário polifosfatos e lipídeos enzimas

LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

- Reprodução

(a) Reprodução assexuada - brotamento

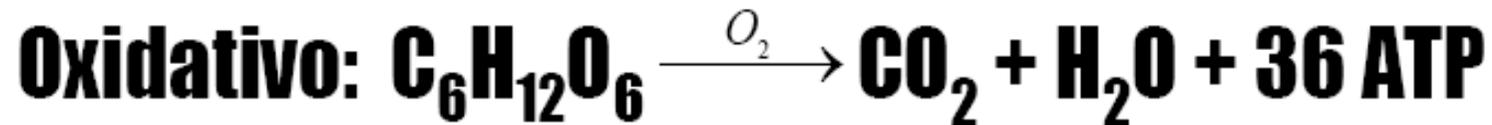


LEVEDURAS

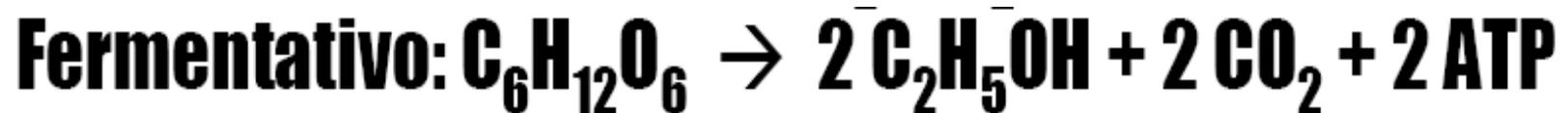
Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

- Metabolismo

1 - Respiração



2 - Fermentação



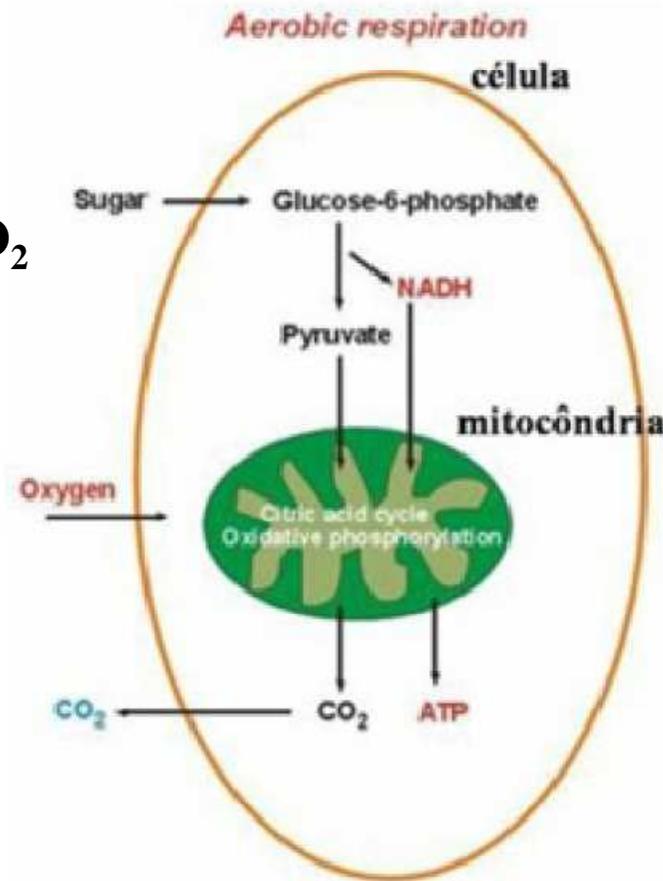
LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

- Metabolismo

1 - Respiração

- Formação de ATP, CO₂ e biomassa



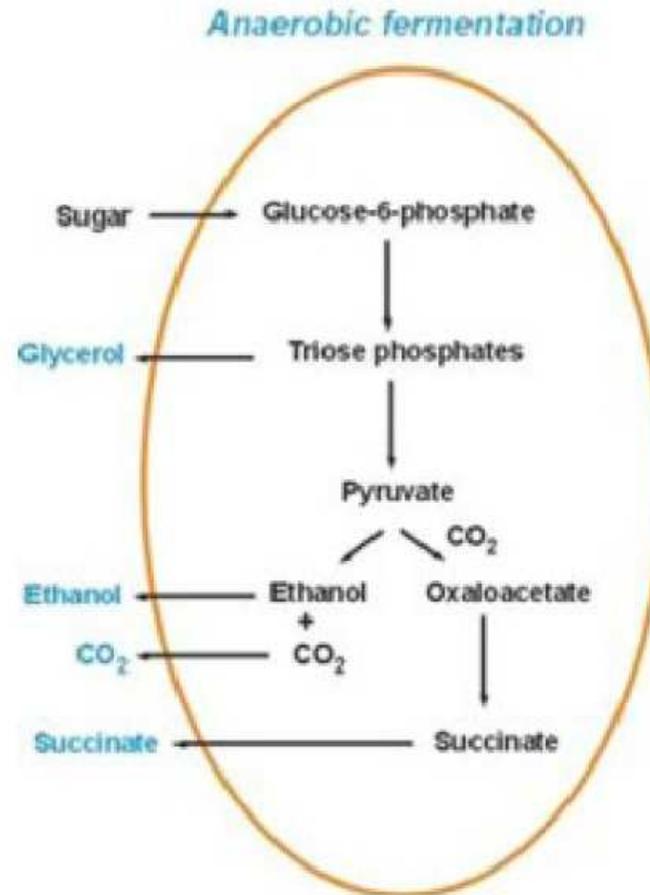
LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

- Metabolismo

2 - Fermentação

- Formação de etanol, glicerol, ácido succínico e CO₂



LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

- Metabolismo

3 – Efeito da concentração de açúcar

1 – Presença de altas concentrações de oxigênio e de açúcar – Efeito Crabtree;

2 – Presença de altas concentrações de oxigênio e de baixa de açúcar – Efeito Pasteur;

3 – Ausência de oxigênio e altas concentrações de açúcar;

4 – Ausência de oxigênio e baixas concentrações de açúcar;

Efeito Crabtree:

✓ Valor crítico da concentração de açúcar varia de 0,05 a 0,75 %;

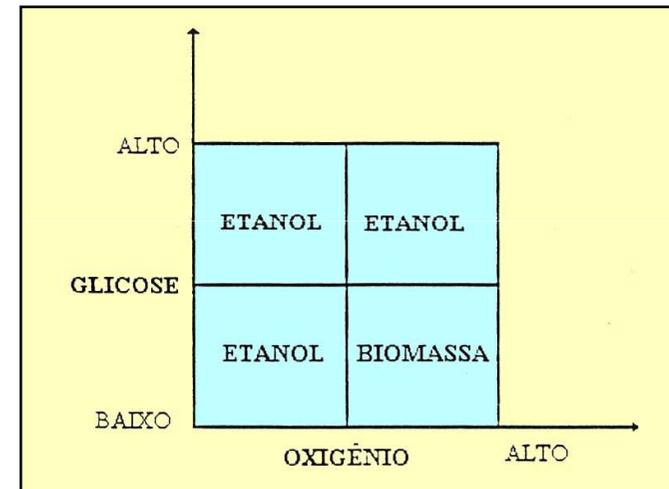
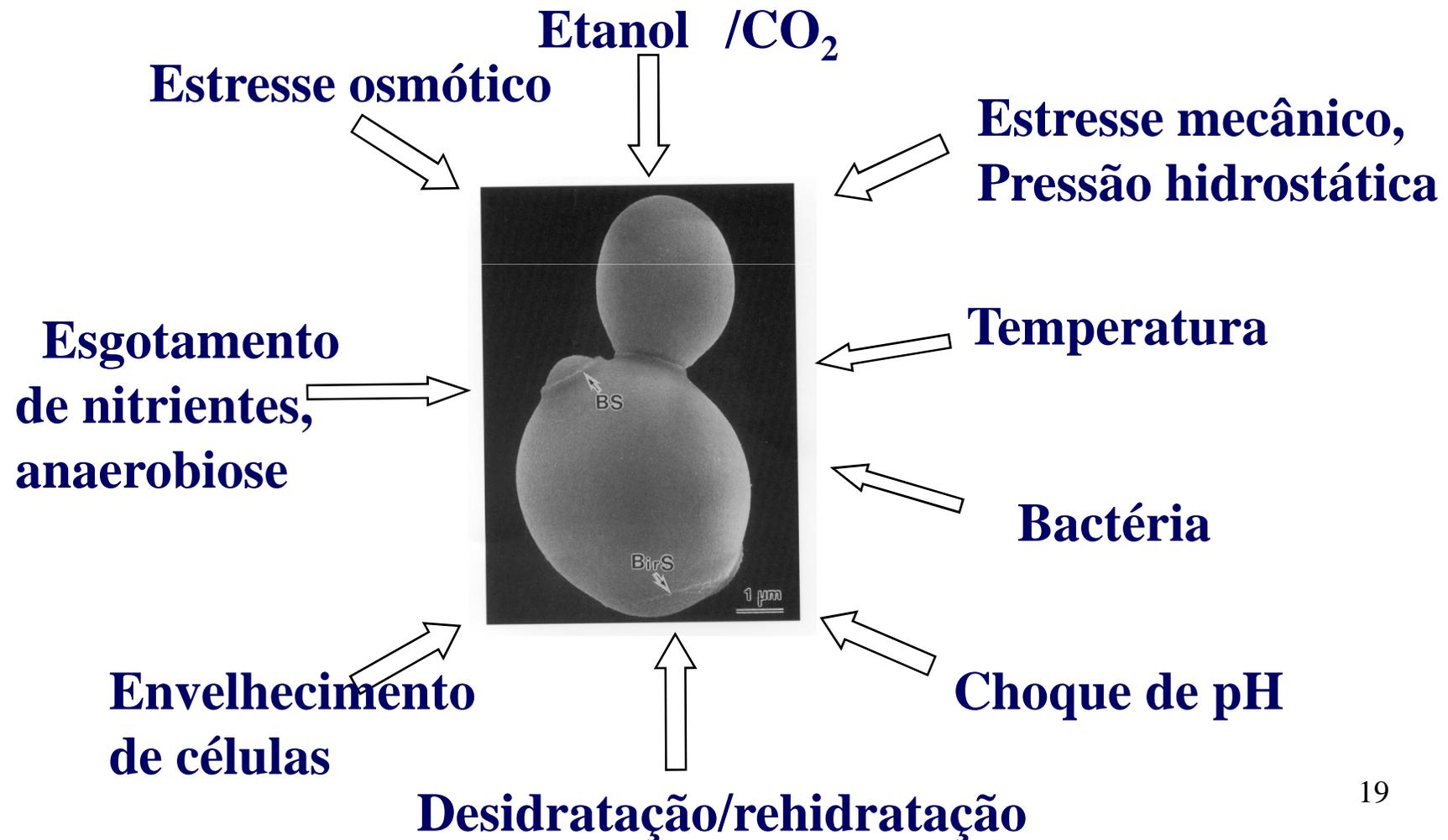


Figura 8 - Efeito da condição ambiental sobre o comportamento metabólico em *S. cerevisiae*

LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

Fatores que afetam o estresse em leveduras



LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

(7.3) Efeito da concentração de Etanol

Inibe a atividade metabólica e leva as células de leveduras à morte (sem condição de sobrevivência);

Limite no vinho: 12% de álcool → variável por: espécie e linhagem de leveduras e condições da fermentação. Há estudos que relatam a fermentação com produção de vinhos com 23 % (m/v) de etanol.

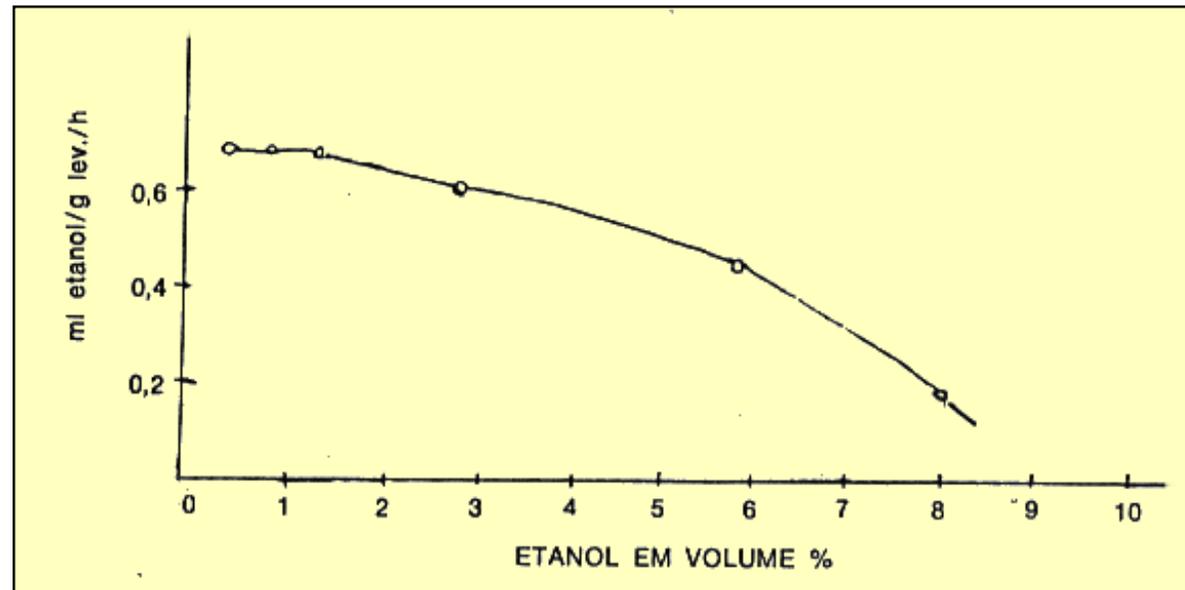


Figura 10 - Influência do etanol na fermentação (Franz, 1961)

LEVEDURAS

Introdução - Habitat – Morfologia – Citologia – **Fisiologia** - Aplicações

(7.4) Efeito da temperatura

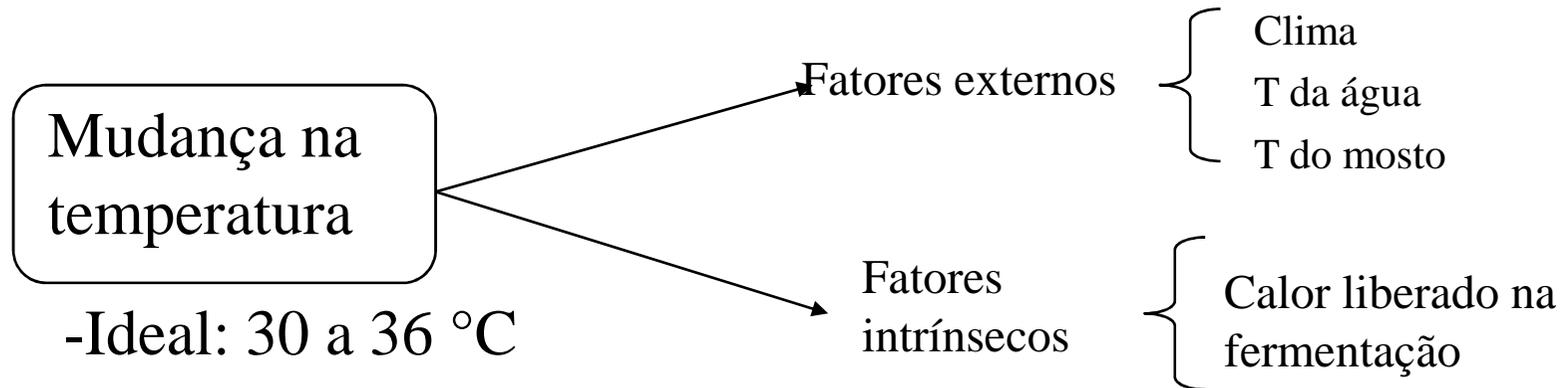


Tabela 1 - Influência da temperatura na variação do tempo de geração e do coeficiente específico de crescimento em uma linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

| Temperatura | Tempo de geração (h) | Coef. espec. de cresc. g/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 | - |

LEVEDURAS

Fermentação - produtos e objetivos

NUTRIENTES

(açúcares, aminoácidos, etc.
no mosto)

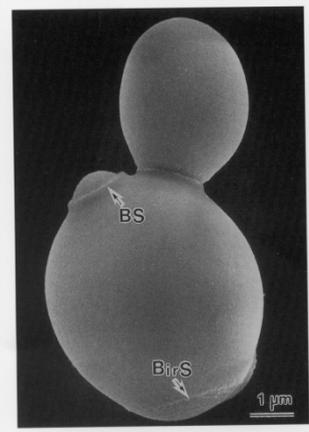
Mais leveduras

Compostos da
autólise de leveduras

Fenóis

Compostos sulfurados

Aldeídos e cetonas



Esteres

Ácidos (orgânicos & graxos)

Alcoóis superiores
(etanol & fusel oils)

CO₂

Glicerol

Walker, 2003.

• 6 Velocidade de fermentação

Fermentação - CINÉTICA

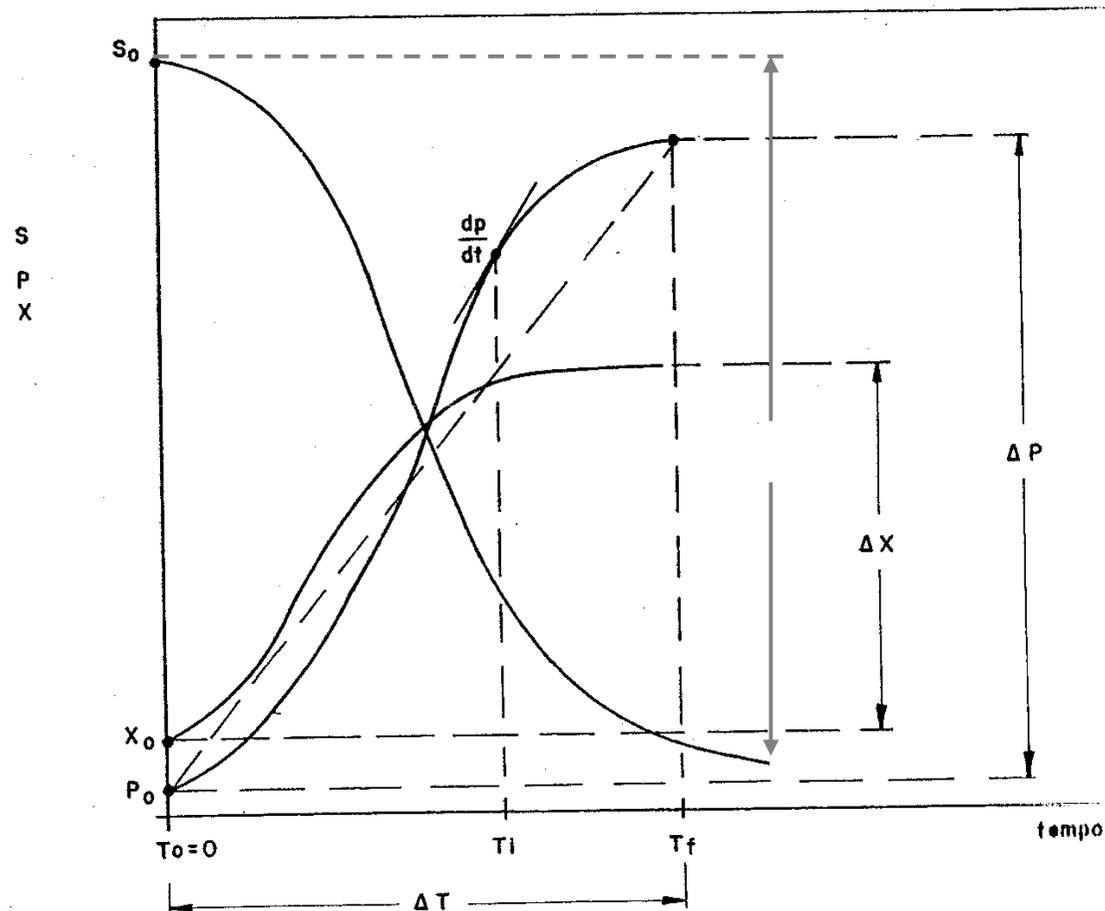


Figura 1 – Variação de teor de substrato (S), teor de leveduras (X) e do teor alcoólico (P) com o tempo em um processo descontínuo.

• 6 Velocidade de fermentação

Fermentação - CINÉTICA

A partir das curvas demonstradas na Figura 1 é possível determinar:

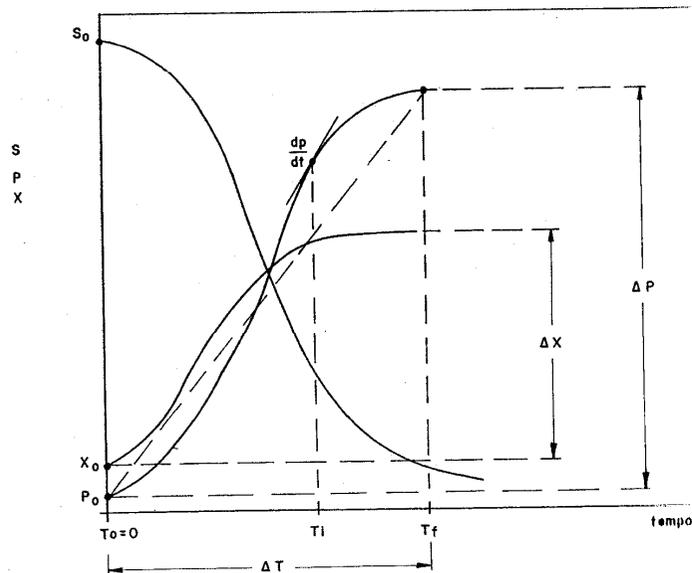
- 1) Velocidades médias que ocorrem as transformações (consumo de substrato, crescimento celular e formação de etanol);
- 2) Velocidades instantâneas que ocorrem as transformações.

A medida de velocidades médias pode ser de grande valia para a determinação do dimensionamento do fermentador (reator), para auxiliar a interpretar o fenômeno de fermentação;

A velocidade média no caso da formação de produtos (células e etanol, por exemplo) é também denominada produtividade.

• 6 Velocidade de fermentação

A título de exemplo são mostrada a seguir as velocidades médias de consumo de substrato (\bar{r}_s), de formação de produto (\bar{r}_p) – produtividade e de crescimento celular (\bar{r}_x), entre os instante inicial (t_0) e o final (t_f) do processo.



$$\bar{r}_s = \frac{\Delta S}{\Delta t} \Rightarrow \frac{S_0 - S_f}{t_f - t_0} \text{ (g/L.h)} \quad 1$$

$$\bar{r}_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \Rightarrow \frac{P_f - P_0}{t_f - t_0} \text{ (g/L.h)} \quad 2$$

$$\bar{r}_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \Rightarrow \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0} \text{ (g/L.h)} \quad 3$$



• 7 Fermentação



Segundo a equação de Gay-Lussac para a fermentação alcoólica, tem-se:



Rendimento alcoólico ideal:



180 gramas de ART ----- 92 gramas de etanol

100 gramas de ART----- X gramas de etanol

→ X = 51,11 gramas ou 64,75 mL de etanol a 20° C
(densidade do etanol a 20° C = 0,78932)

4 CÉLULA BACTERIANA

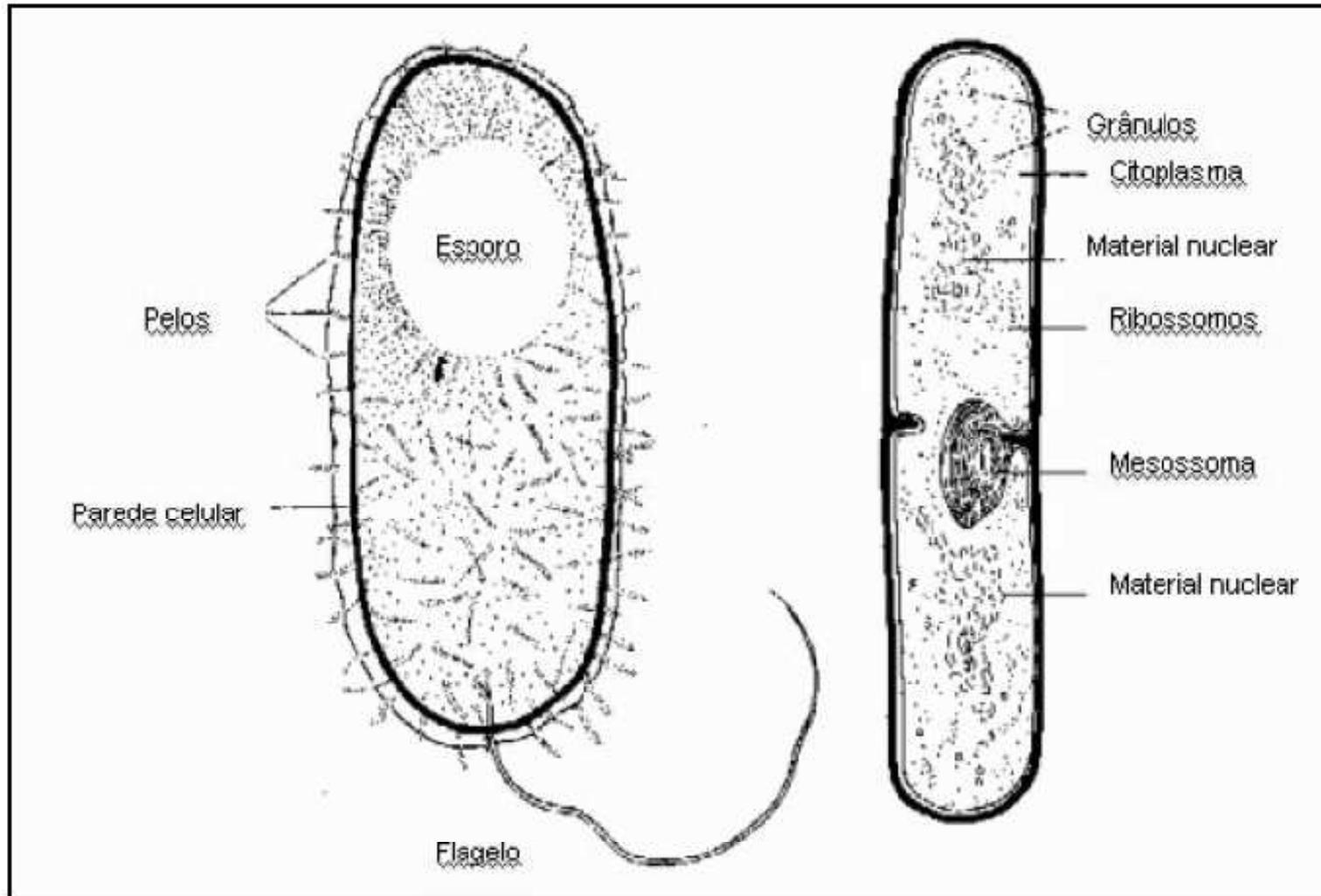


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura da célula bacteriana (Pelczar, 1980)



4 CÉLULA BACTERIANA



- ✓ ***Bactérias normalmente encontradas na fermentação alcoólica***

| Espécie | coloração de Gram |
|----------------------------------|--------------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | (+) |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | (+) |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | (+) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (+) |
| <i>Acetobacter acetii</i> | (-) |
| <i>Escherichia coli</i> | (-) |

4 CÉLULA BACTERIANA

✓ **Tipo de reprodução:**

- Fissão binária, onde uma única célula se divide em duas;
- Reprodução assexuada.

➤ **Tempo de geração:**

É o tempo necessário para a população duplicar o número de microrganismos. Em geral, as bactérias apresentam tempo de geral de 15 a 20 minutos.

***Nota:** Isso indica que os efeitos da presença de bactérias no processo podem ser observados rapidamente, se a população bacteriana inicial for grande.

5 *Conseqüências da contaminação bacteriana na fermentação industrial*

- ✓ ***Produtos produzidos na fermentação***

- ✓ **Produção de ácidos:**
 - Lactico
 - Acético
 - Butírico

- ✓ ***Produção de gomas***
 - Dextrana

5 Conseqüências da contaminação bacteriana na fermentação industrial

- ✓ Diminuição da produtividade e da eficiência fermentativa das leveduras
- ✓ **Causas:**
 - Consumo de açúcares e nutrientes pelos contaminantes
 - Consumo de parte do álcool produzido
 - Produção de toxinas
 - Floculação do fermento
 - Uso de biocidas para controlar infecções
 - Floculação do fermento
 - Formação de espumas

5 *Conseqüências da contaminação bacteriana na fermentação industrial*

✓ **Considerações importantes no processo industrial:**

- Contaminações bacterianas consideradas sob controle:

$\leq 10^6$ células/mL de mosto

- Contaminação considerada preocupante:

$\geq 10^7$ células/mL de mosto.

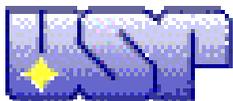
É necessário adotar alguma medida de controle. Químico -
Ex: KAMORAN 3 a 5 ppm.



6 Considerações finais



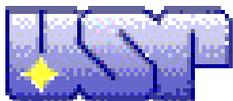
- ✓ A produção de álcool é realizada a partir da fermentação de açúcares por ação de um micro-organismo chamado levedura, especificamente a espécie Saccharomyces cerevisiae;
- ✓ Na produção industrial não é utilizado mosto esterilizado; por isso, há a presença de microrganismos indesejáveis (bactérias)



6 Considerações finais



- ✓ Na fermentação alcoólica as bactérias são contaminantes e causam prejuízos na produção de álcool que reduzem o rendimento e a produtividade industrial.
- ✓ O ideal é realizar a fermentação com mosto esterilizado, porque permite trabalhar eficientemente com leveduras de alta produtividade e eficiência fermentativa



7 Referências



COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR E
ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Centro de Tecnologia.
Divisão industrial. **Fermentação.** São Paulo, COPERSUCAR, 1987.
434p.

WALKER, G. **Yeast physiology and biotechnology.** New York: John Wiley
& Sons Ltd, 1998. 350p.

RIBEIRO, C., BLUMER, S., HORII. **Fundamentos de tecnologia
sucroalcooleira: tecnologia do açúcar.** Piracicaba: ESALQ/Depto de
Agroindústria, Alimentos e Nutrição, V.2, 1999. 66p.

USHIMA, A.K., RIBEIRO, A.M.M., SOUZA, M.E.P., SANTOS N.F.
Conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool. São Paulo,
IPT, 1990. 796p.