



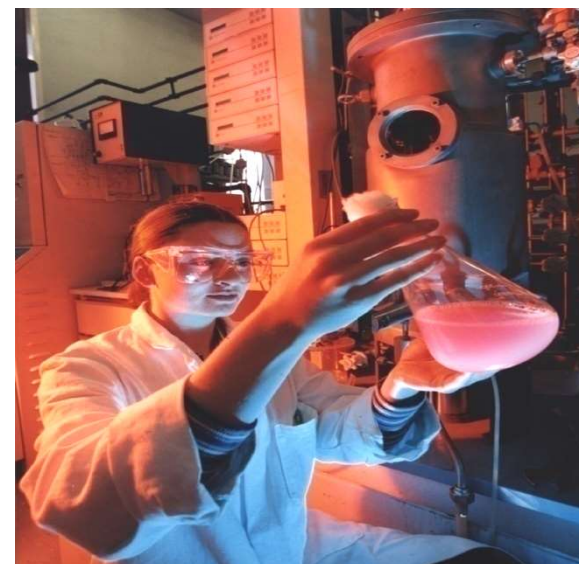
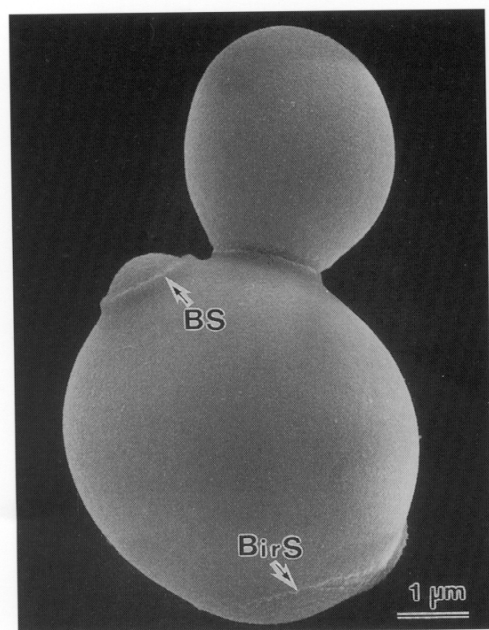
Universidade de São Paulo – USP

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição - LAN

LAN 1458 - Açúcar e Álcool

Agentes da fermentação alcoólica, bioquímica do processo fermentativo. Preparo do fermento industrial



Prof. Antonio Sampaio Baptista



Agentes da fermentação alcoólica, bioquímica do processo fermentativo. Preparo do fermento industrial



1. INTRODUÇÃO
- 2 Microbiologia da fermentação alcoólica
3. Leveduras
4. Bactérias
5. Fisiologia de leveduras
- 6 . Preparo do inóculo
6. Considerações finais



1. INTRODUÇÃO



Na fermentação alcoólica, o que é mais importante no microrganismo?

O micro-organismo mais utilizado para produzir etanol é a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*;

No Brasil, a fermentação alcoólica industrial não é conduzida sob condições estéreis.

✓ Conseqüência: - presença de leveduras selvagens no processo;
- presença de BACTÉRIAS INDESEJÁVEIS.

➤ Microrganismo no processo industrial de produção do álcool

- Leveduras
- Bactérias

2. MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

✓ Microrganismo produtor de álcool e microrganismos produtores de não-alcóis.

Isso é questão de vida
ou morte! **Tem que
saber.**

- Qual microrganismo é o mais interessante para a produção de álcool, no processo industrial??

- A levedura - *Saccharomyces cerevisiae*

**Essa é questão de prova.
Tem que saber!!.**

- Quais são os microrganismos indesejáveis no processo de produção de álcool? - As bactérias

-Coexistência no processo industrial

Desejável: somente as leveduras



Preparo do inóculo.



CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE NAS LEVEDURAS

- **Velocidade de fermentação;**
 - **Tolerância ao álcool;**
 - **Rendimento fermentativo;**
 - **Resistência à acidez;**
 - **Estabilidade.**
-
- ✓ **Alta produtividade: g de álcool/L de vinho/hora.**
 - ✓ **Alto rendimento fermentativo: g de álcool/g de açúcar**

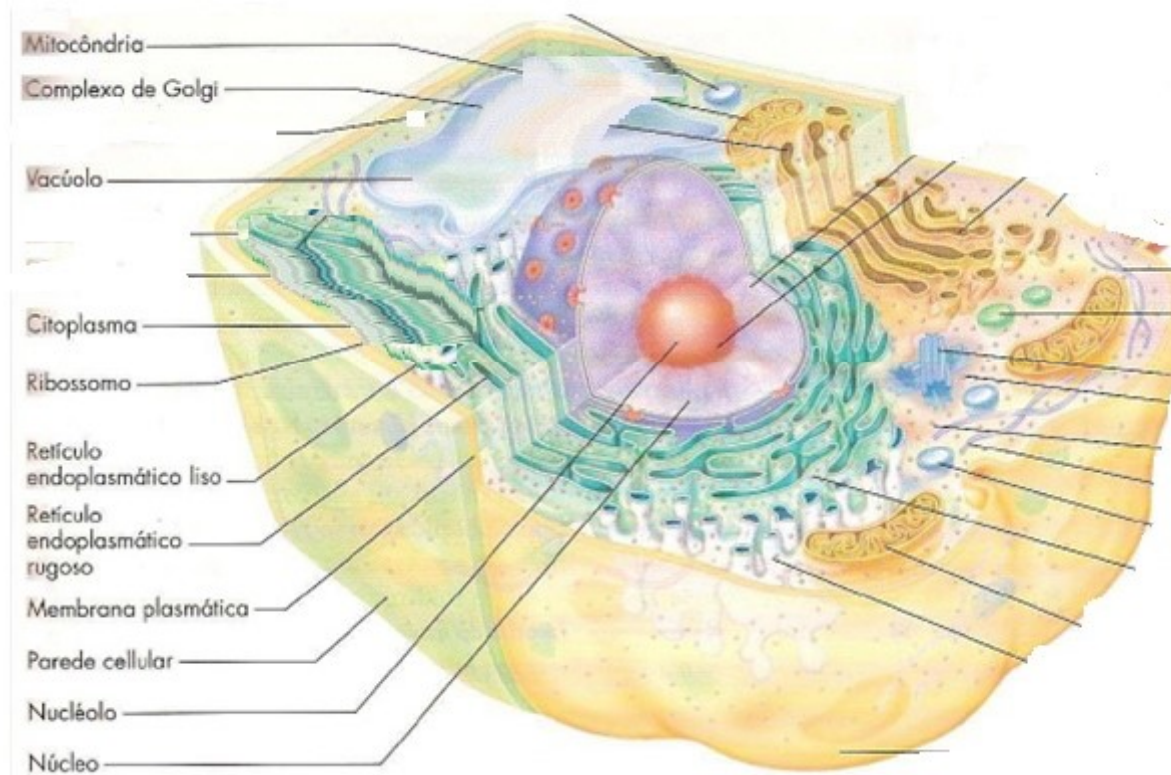


LEVEDURAS

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



A CÉLULA EUCARIÓTICA

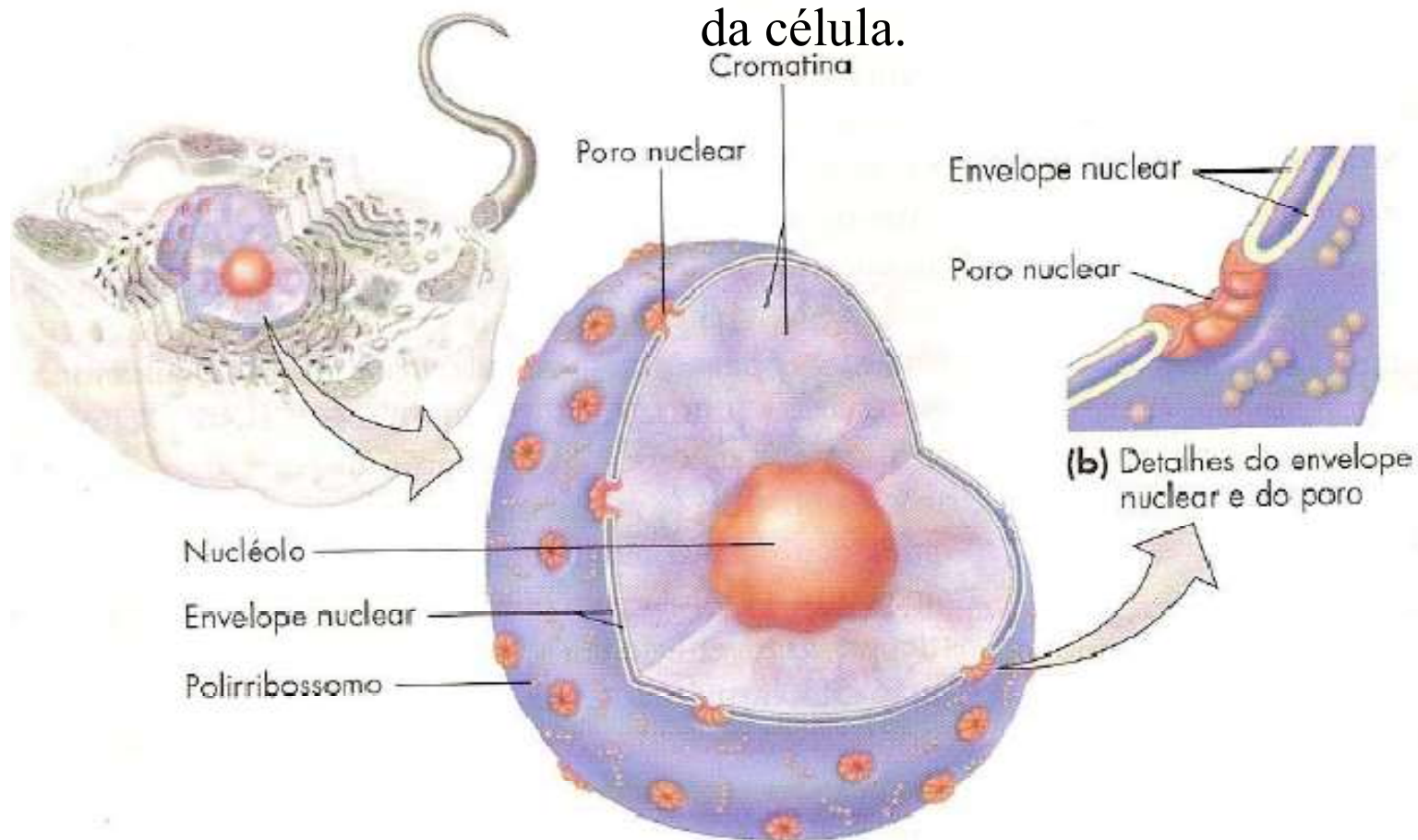


A reserva de nutrientes da célula. Glicogênio, lipídeos, trealose...

- O Núcleo

(5) Núcleo

Onde está contido o material genético da célula.

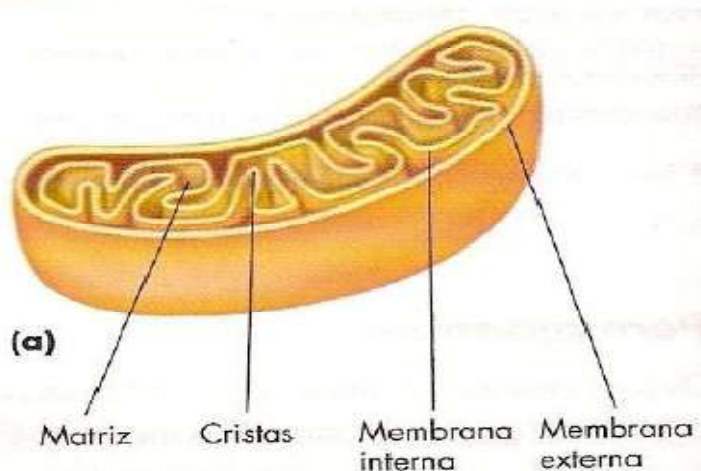


- Mitocôndria

(5) Mitocôndria

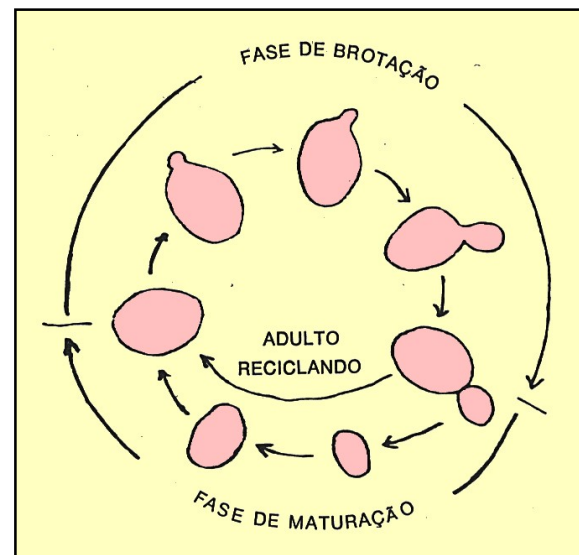
pequenas organelas com membrana dupla com “invaginações internas” (cristas);

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



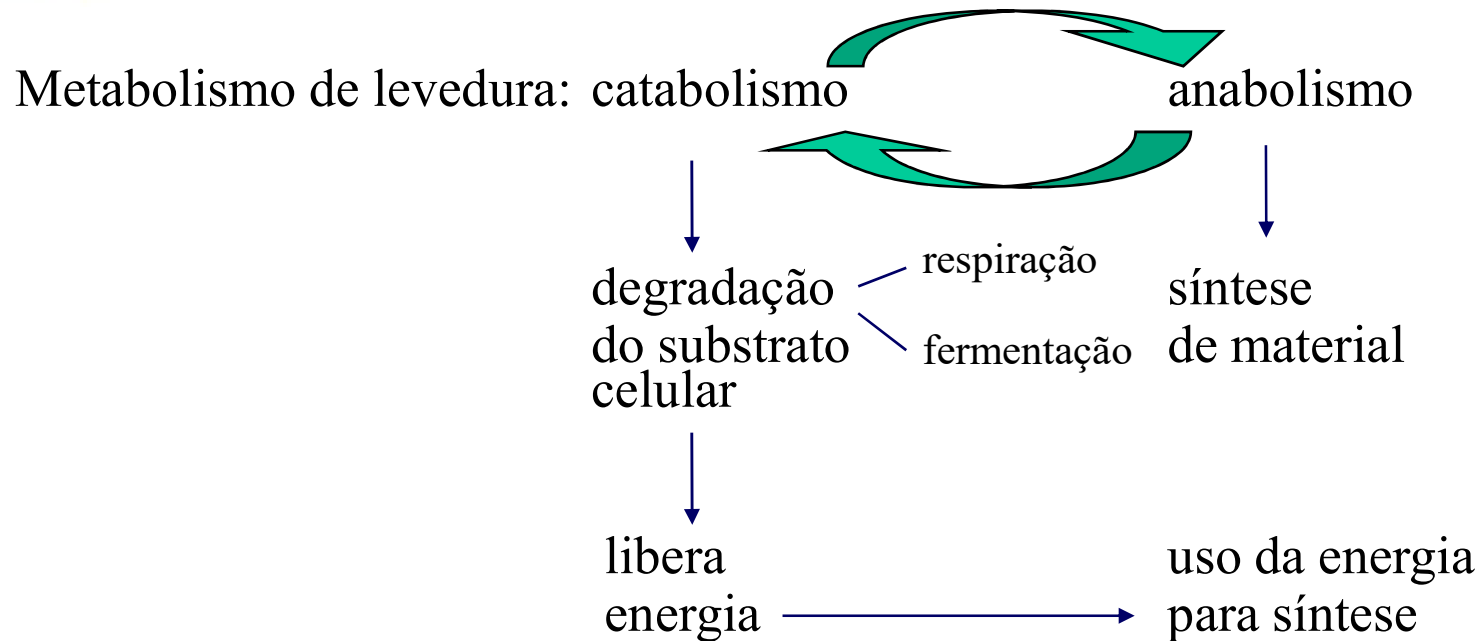
4. REPRODUÇÃO EM LEVEDURAS

- Reprodução
- (a) brotamento ou gemulação (multiplicação vegetativa)
 - assexuada -
 - (b) esporulação (formação de “ascos”)
 - sexuada sob estresse -



Brotamento

Figura 4 - Ciclo vegetativo de leveduras alcoólicas. (Horii, 1980)

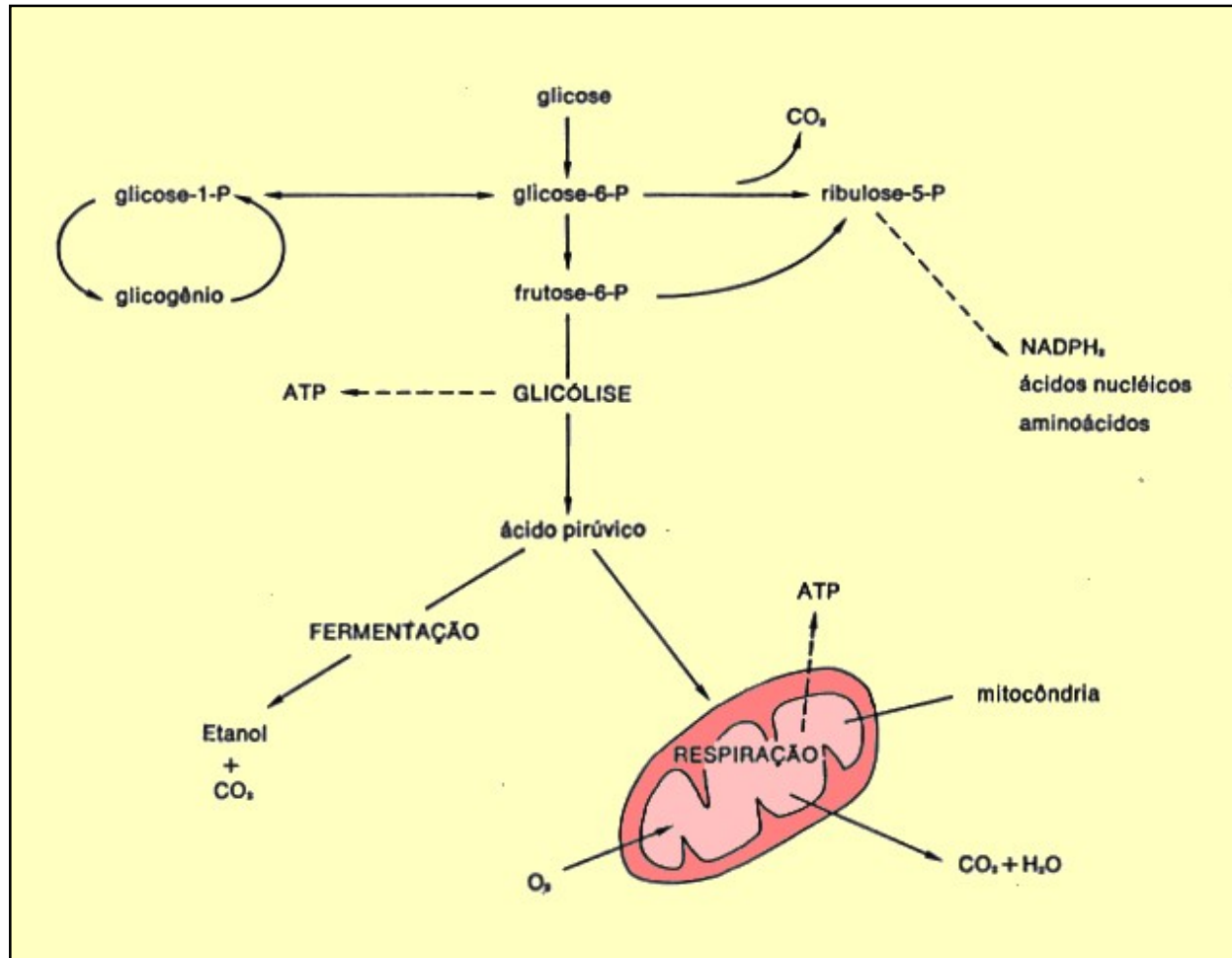


(1) Respiração → oxidação biológica de substratos orgânicos sob sistemas multienzimáticos que catalizam a oxidação → transporte de elétrons na cadeia respiratória onde há ativação do oxigênio (acceptor e-) e formação de água.

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



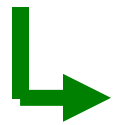
Bioquímica da fermentação





6. DESENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS

Crescimento populacional da levedura



Depende (função)

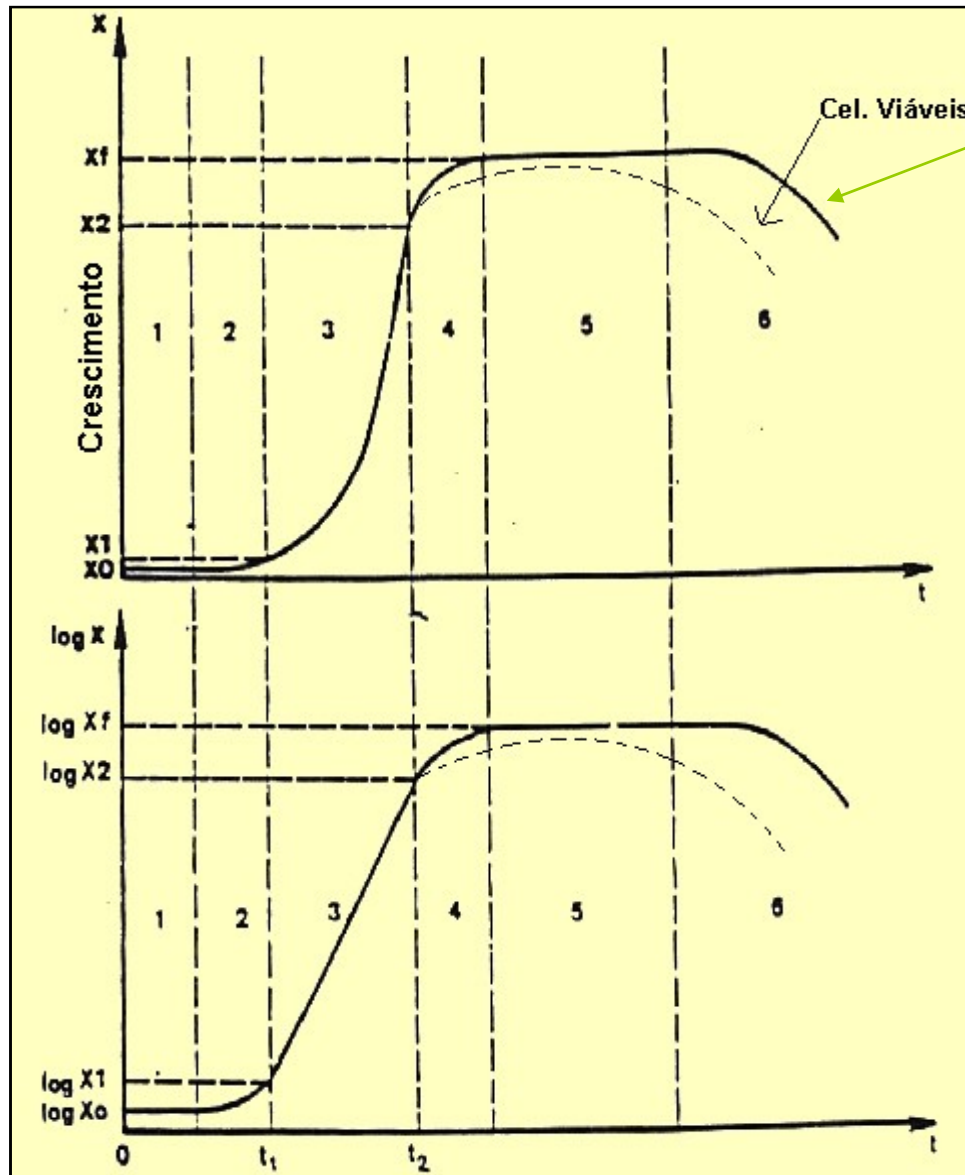
condição do meio

- suprimento de nutrientes;
- composição química do meio;
- composição física do meio;
- constituição e estágio de desenvolvimento dos microrganismos.

- nutrientes;
- acidez;
- temperatura;
- aeração;
- agitação;

6.1. CINÉTICA

Desenvolvimento ou crescimento → referente aumento populacional
(multiplicação celular)



células totais

- 1 - Lag-fase
- 2 - Fase de aceleração do crescimento
- 3 - Fase exponencial de crescimento
- 4 - Fase de desaceleração do crescimento
- 5 - Fase estacionária
- 6 - Fase de declínio

Figura 6 - Fases de crescimento das leveduras em fermentação



Crescimento populacional



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

- (2) → função: linhagem de levedura , idade do cultivo antes da transferência do meio e composição dos meios de cultivo anterior e novo.

- (2) Fase de Aceleração → aumento gradual da velocidade de multiplicação celular.
Ocorre diferentes capacidades individuais dos microrganismos ao meio e distintas velocidades individuais



Crescimento populacional



(3) Fase Exponencial → aumento exponencial do número de células, quando 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.



Crescimento populacional



(4) Fase Estacionária - caracteriza-se pelo n° de células na cultura permanecer quase constante por um período de tempo, há um baixo consumo de energia, ocorre a manutenção da viabilidade até esgotamento das reservas.

- Fatores que induzem esta fase:

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



Crescimento populacional



(5) Fase Declínio - o número de células que morre excede o número de células novas,

- Por que ocorre ?

Composição do meio (esgotamento de nutrientes, acúmulo de produtos finais, etc) e condições físicas e químicas do meio (pH, temperatura, etc.)

Quando deve ocorrer no processo industrial de produção de etanol?

NUNCA!?!?! POR QUE??

7. FATORES INTERFERENTES NO METABOLISMO DAS LEVEDURAS

Questão de vida ou morte!!! Tem que saber.

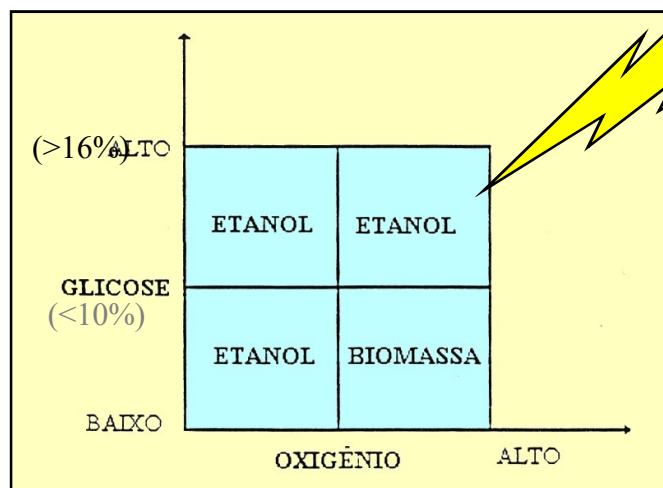


Figura 9 – Figura demonstrando o comportamento da fermentação, conforme a composição de açúcares e O₂ no meio.

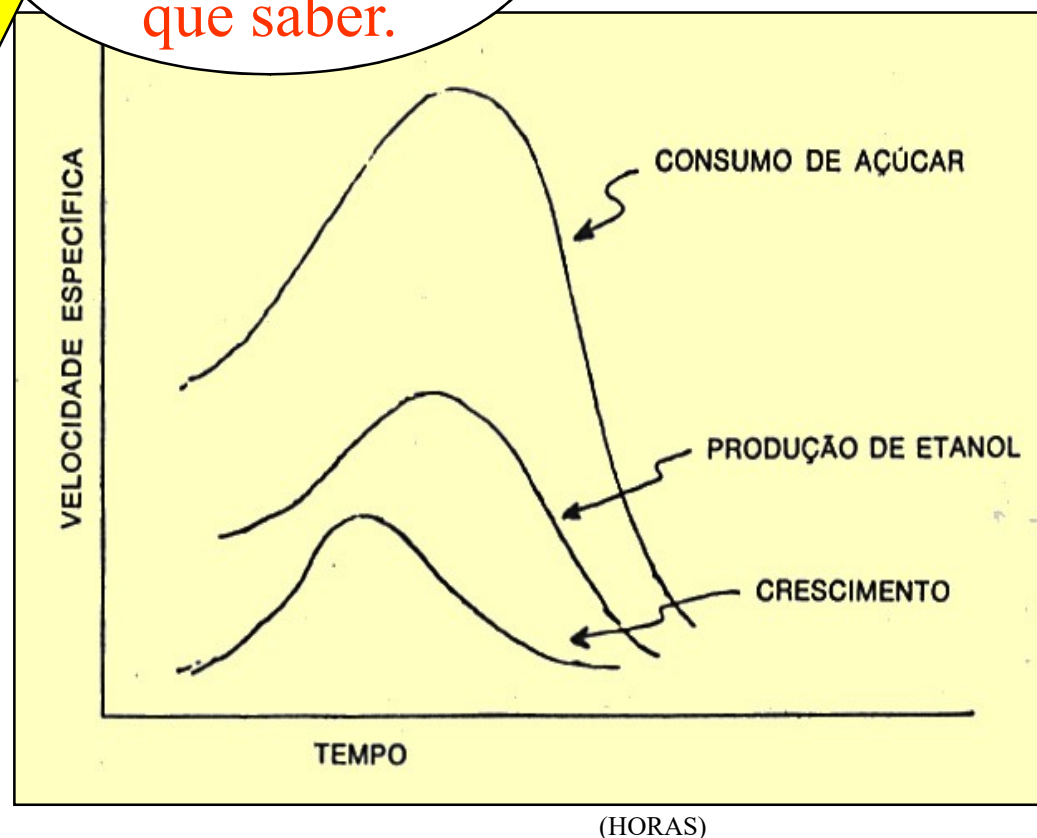


Figura 8 - Efeito da condição ambiental sobre o comportamento metabólico em *S. cerevisiae*



7. FATORES INTERFERENTES NO METABOLISMO DAS LEVEDURAS



(7.1) Influência da glicose

Conc. Glicose $>15,0\%$ (150 g/L) - pode inibir enzimas fermentativas.

Conc. Glicose de 0,3 a 0,75 % - inibição seletiva da respiração.

Conc. Glicose $\cong 5\%$ em meio aeróbico \rightarrow via fermentativa completa, pois mitocôndria é reprimida e citocromo não funcionam.

Conc. Glicose baixa e oxigênio alto \rightarrow catabolismo oxidativo/respiração (não há fermentação) \rightarrow efeito Pasteur

(7.2) Efeito do Oxigênio / Agitação

A moderada aeração (15 a 20 mm/dia) auxilia na suspensão das células mais do que efeito direto do oxigênio (maior superfície de contato).

É capaz de induzir a respiração, dependendo da concentração de glicose do meio.



7. FATORES INTERFERENTES NO METABOLISMO DAS LEVEDURAS



(7.3) Efeito da concentração de Etanol

- inibe a atividade metabólica e levando à morte das leveduras (sem condição de sobrevivência);
- limite no vinho: 12 % de álcool → variável por: espécie e linhagem de leveduras e condições da fermentação.

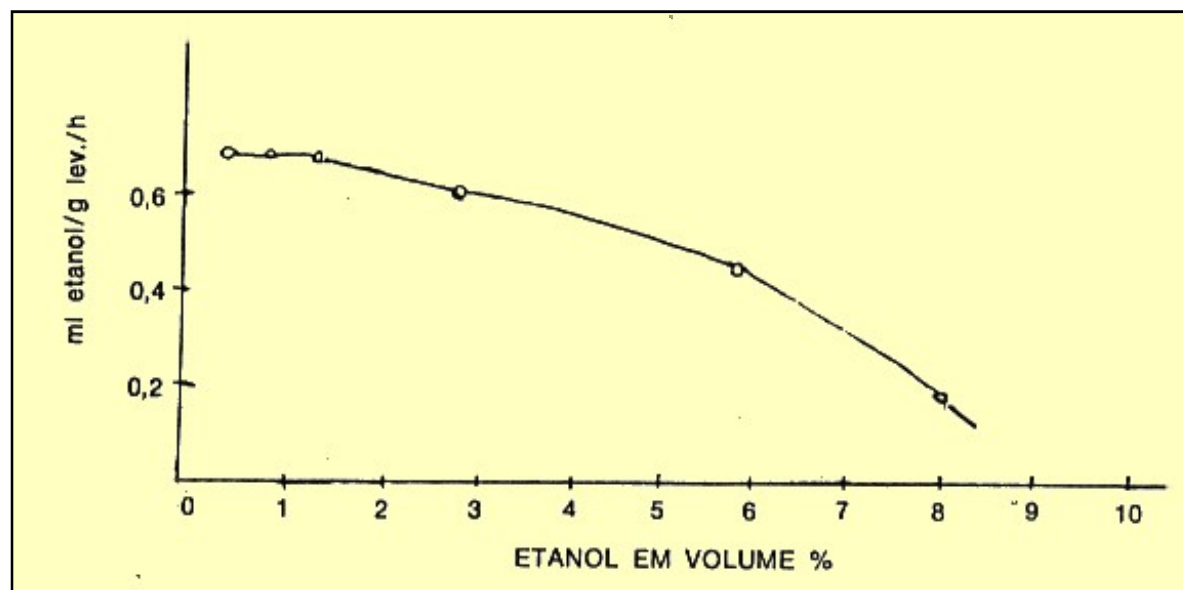
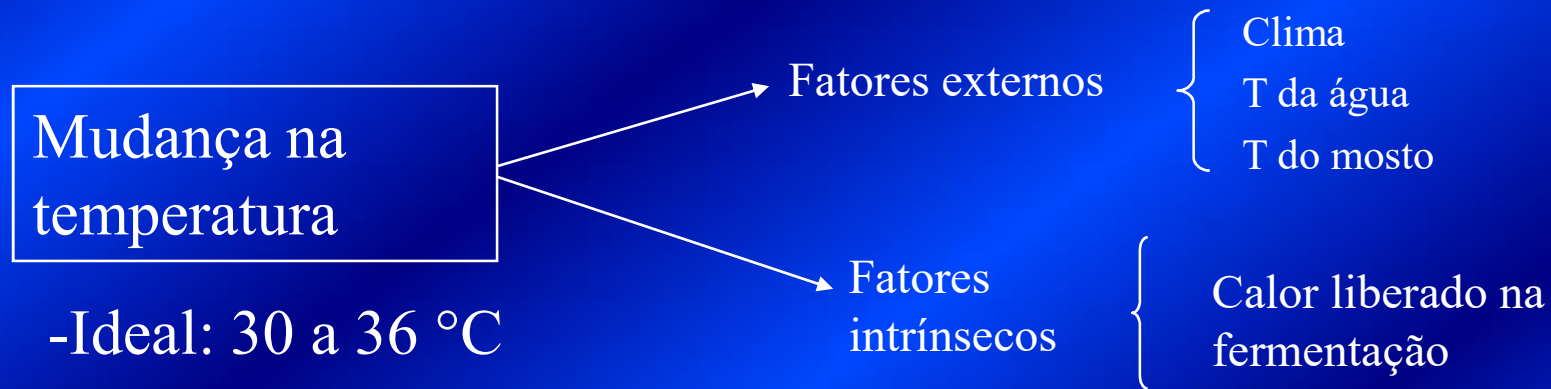


Figura 10 - Influência do etanol na fermentação.

(7.4) Efeito da temperatura

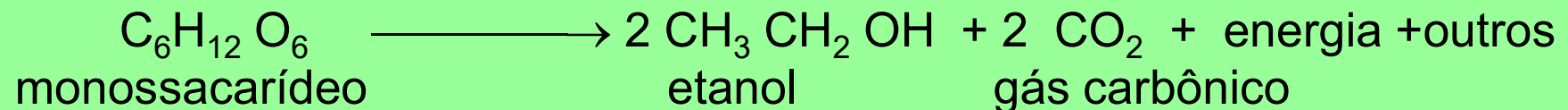


(a) Influência da temperatura na variação do tempo de geração e do coeficiente específico de crescimento em uma linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

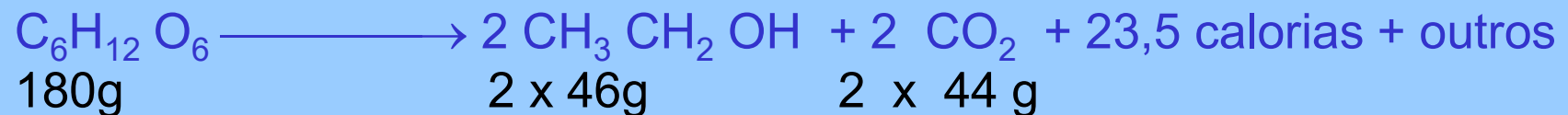
| Temperatura | Tempo de geração (h) | Coef. espec. de cresc. g/l/h ⁻¹ |
|-------------|----------------------|--|
| 20 | 5 | 0.15 |
| 24 | 3.5 | 0.21 |
| 27 | 3.0 | 0.30 |
| 30 | 2.2 | 0.31 |
| 36 | 2.1 | 0.29 |
| 38 | - | 0.19 |
| 40 | 4.0 | - |

Cálculo do rendimento da fermentação alcoólica

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



Rendimento alcoólico ideal:



180 gramas de ART ----- 92 gramas de etanol → x = 51,11 gramas
100 gramas de ART----- x gramas de etanol
ou 64,75 mL de etanol a 20° C (densidade do etanol a 20° C = 0,78932 g mL⁻¹)

Portanto, o rendimento ideal máximo que pode ser atingido é 51,11 % (m m⁻¹)
Contudo, na prática, o máximo que se atinge é **48,55 %**, ou seja, **95 %** do rendimento ideal.



PREPARO DO INÓCULO



PREPARO DO INÓCULO PARA INICIAR A SAFRA



- ✓ Fermento Prensado
- ✓ Fermento Reaproveitado do Ciclo Anterior
- ✓ Fermento Seleccionado (cultura pura)



PREPARO DO INÓCULO



- 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 (30 a 35 °C).



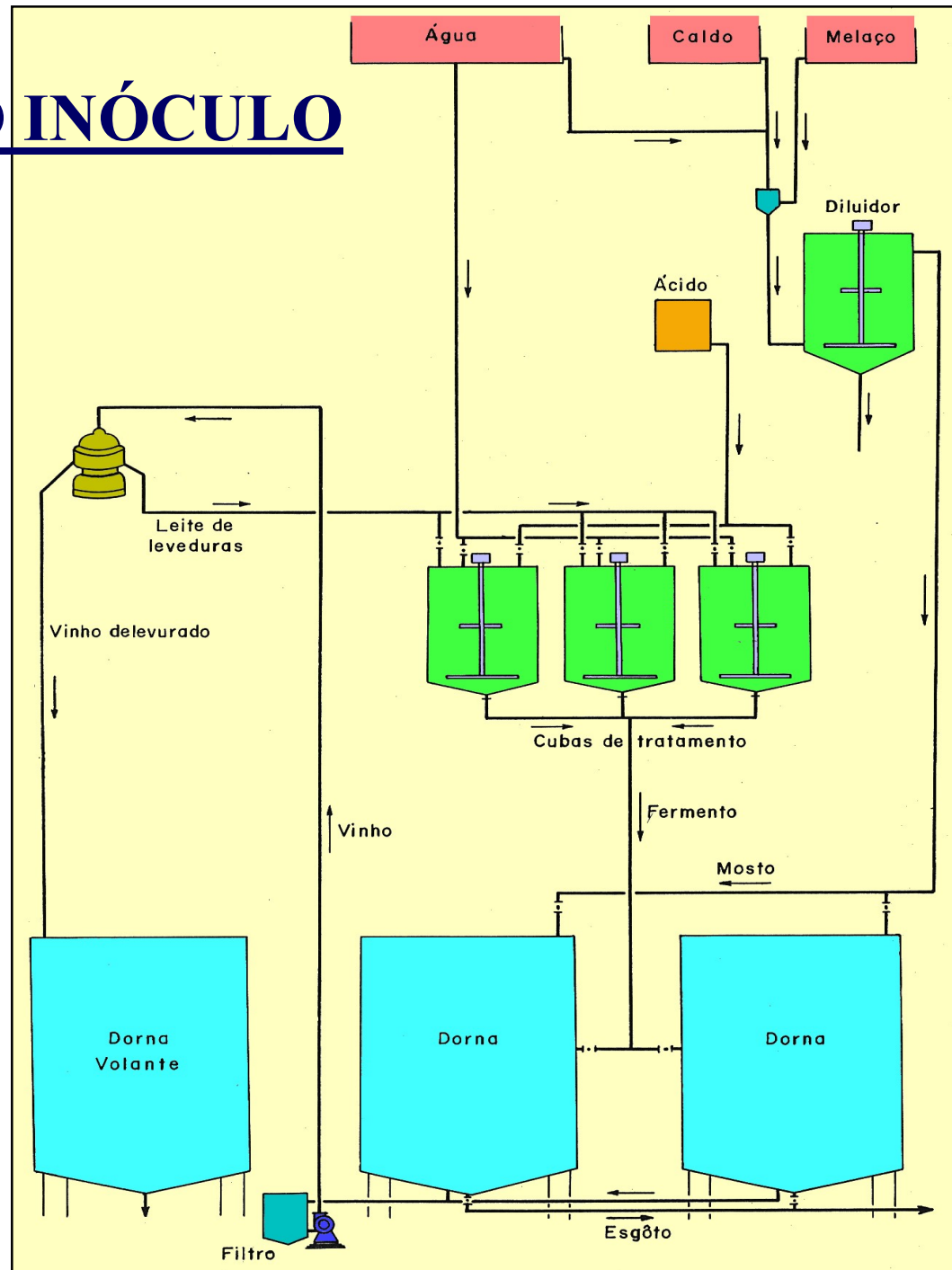
PREPARO DO INÓCULO



- **Fermento Reciclado / Selecionado** (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
- Aumento gradual do teor de açúcar

PREPARO DO INÓCULO

- Processo de Melle-Boinot (década 30)
- Evolução:
- (1) Substituição do decantador por filtro de tela e centrifugação do fermento.
- (2) Diluição do melaço com caldo tratado.



6.2 Propagação do fermento selecionado

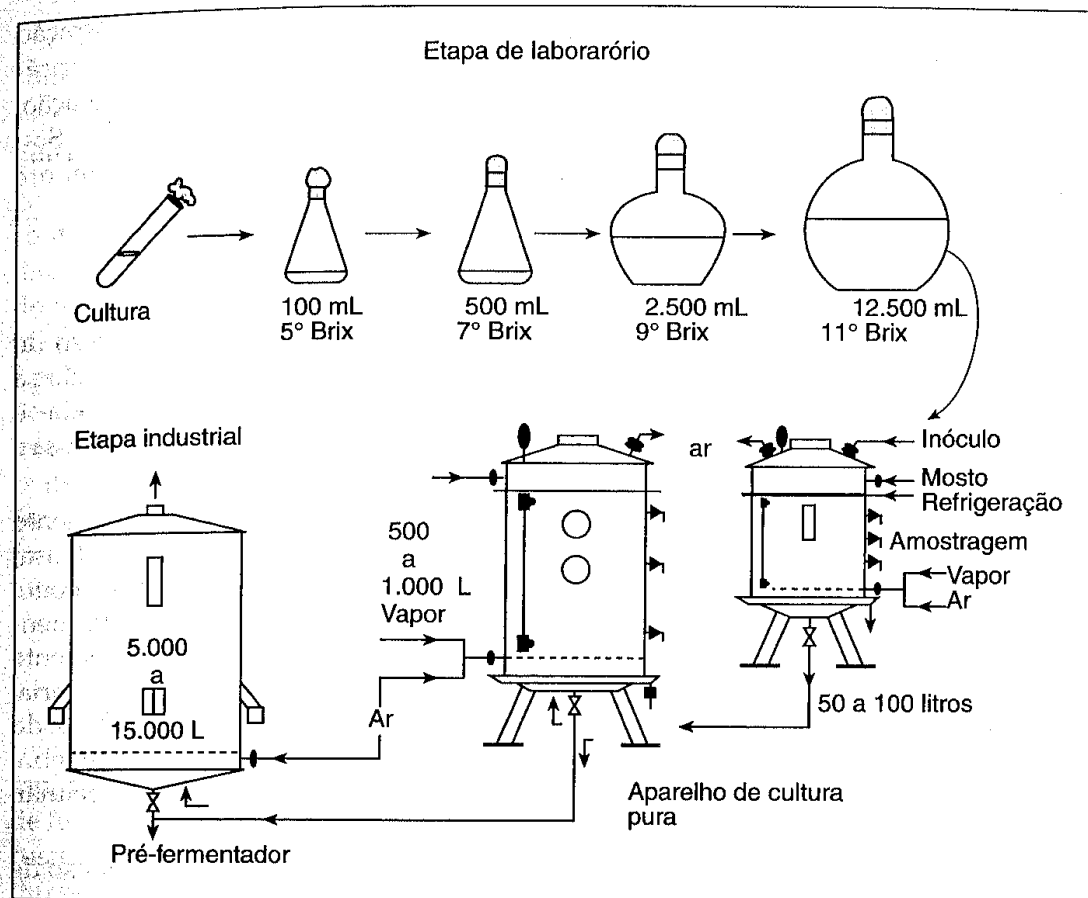


Figura 1.2 — Esquema da preparação do inóculo



Considerações finais



- ✓ A produção de etanol por via fermentativa é feita exclusivamente com uso de leveduras, da espécie *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Na presença de O_2 , o teor de açúcar no mosto é muito importante para definir a rota metabólica de degradação do açúcar adotada pela levedura;
- ✓ O preparo do fermento pode ser feito de três formas: cultura pura, fermento prensado e aproveitamento de ciclos de outros processos. Esta prática deve anteceder o início da colheita cana de 7 a 30 dias.



REFERÊNCIAS

DELGADO, A. ; CESAR, M.A.A. Elementos de Tecnologia e Engenharia do açúcar de cana. Piracicaba : Zanini,1990. 1061p.

PAYNE, J.H. Operações unitárias na produção de cana-de-açúcar. São Paulo: NOBEL, 1989. 245p.

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.