

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA: FATORES LIMITANTES DA PRODUTIVIDADE



LUIZ CARLOS BASSO

ZIMOTEC – ASSIST. TECN. BIOPROCESSOS S/S

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS ESALQ/USP

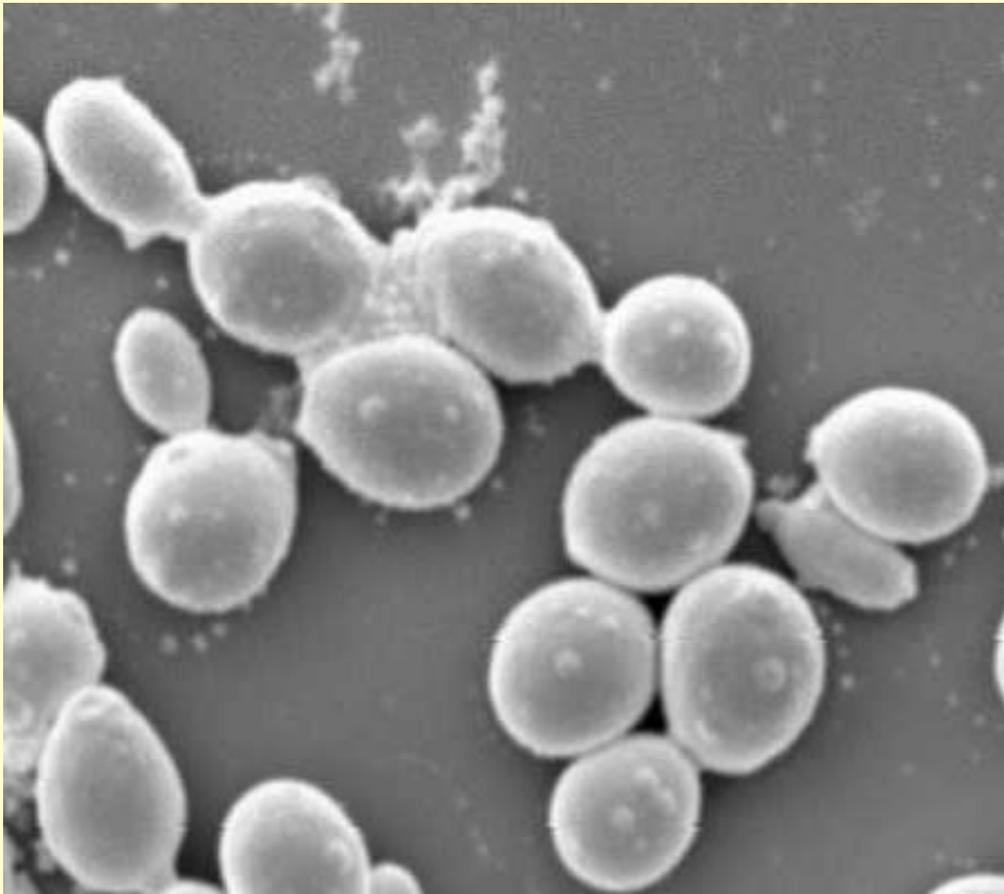
IV SIMPOSIO INTERNACIONAL – STAB SUL, Ribeirão Preto, Fevereiro, 2019

CONTEÚDO DA APRESENTAÇÃO

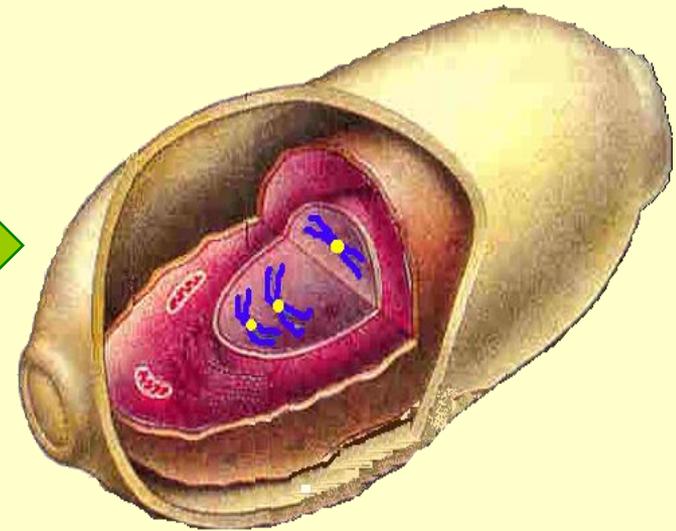
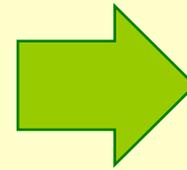
- **A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E O BALANÇO DE MASSA**
- **FATORES LIMITANTES DA PRODUTIVIDADE INDUSTRIAL**
- **O ESTRESSE OSMÓTICO E A CONTAMINAÇÃO BACTERIANA**
- **SELEÇÃO DE LEVEDURAS NA ATUALIDADE**
- **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O AGENTE DA FERMENTAÇÃO :

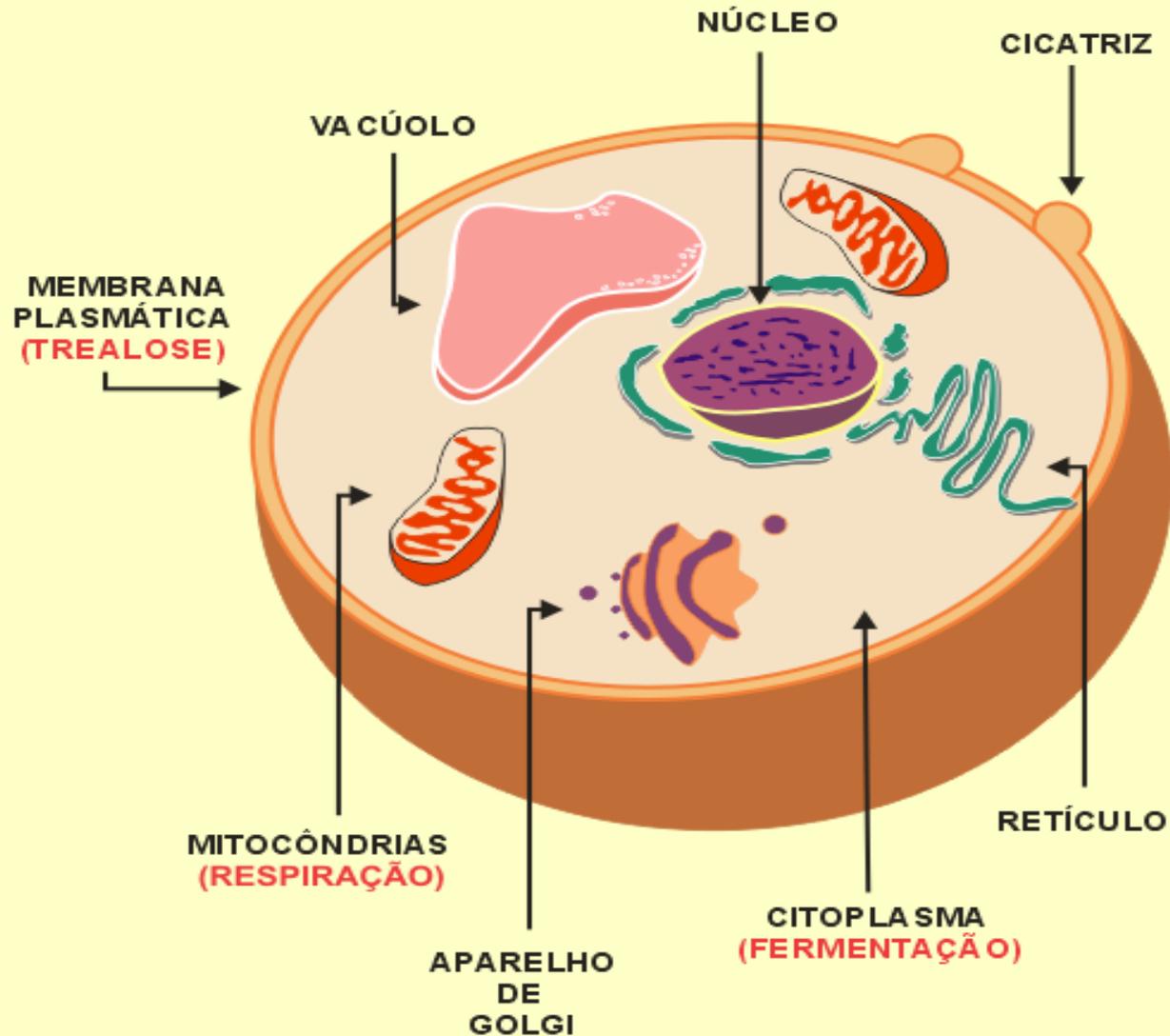
A LEVEDURA - *Saccharomyces cerevisiae*



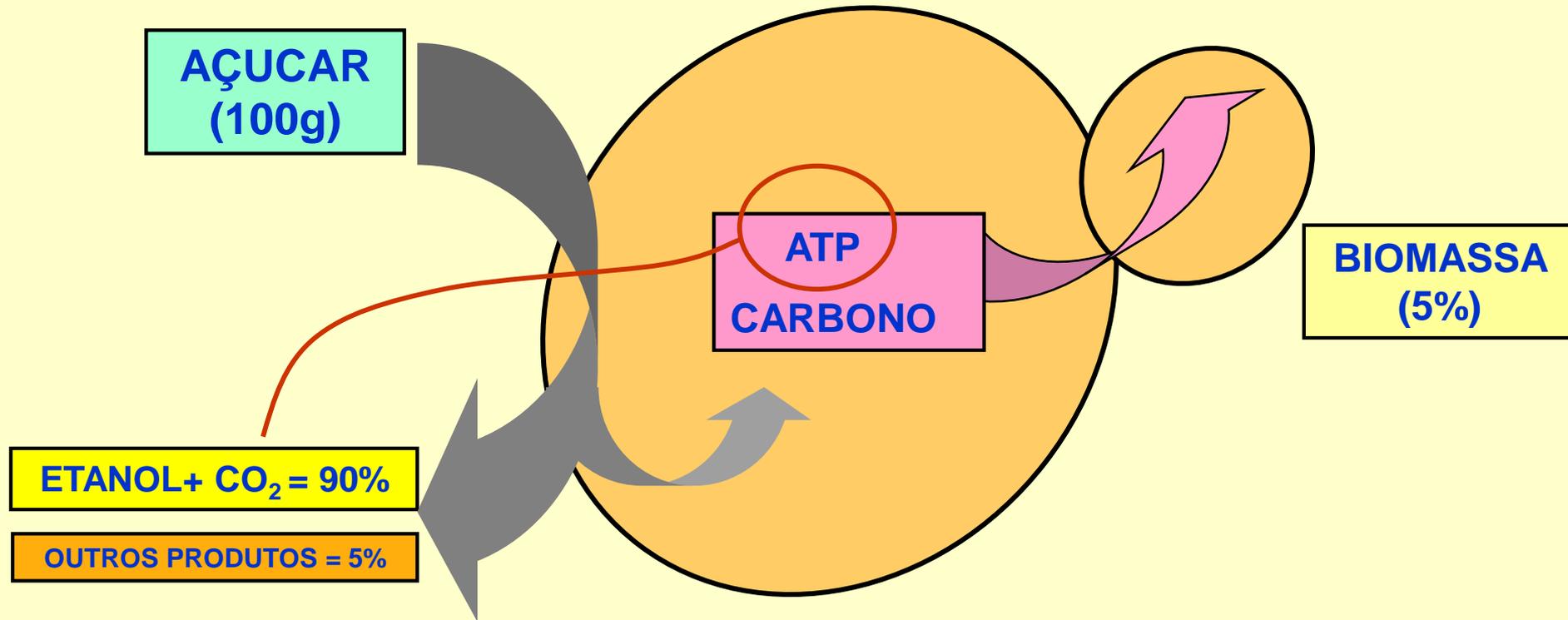
5 – 10 μ



A CÉLULA DE LEVEDURA E SEUS COMPARTIMENTOS

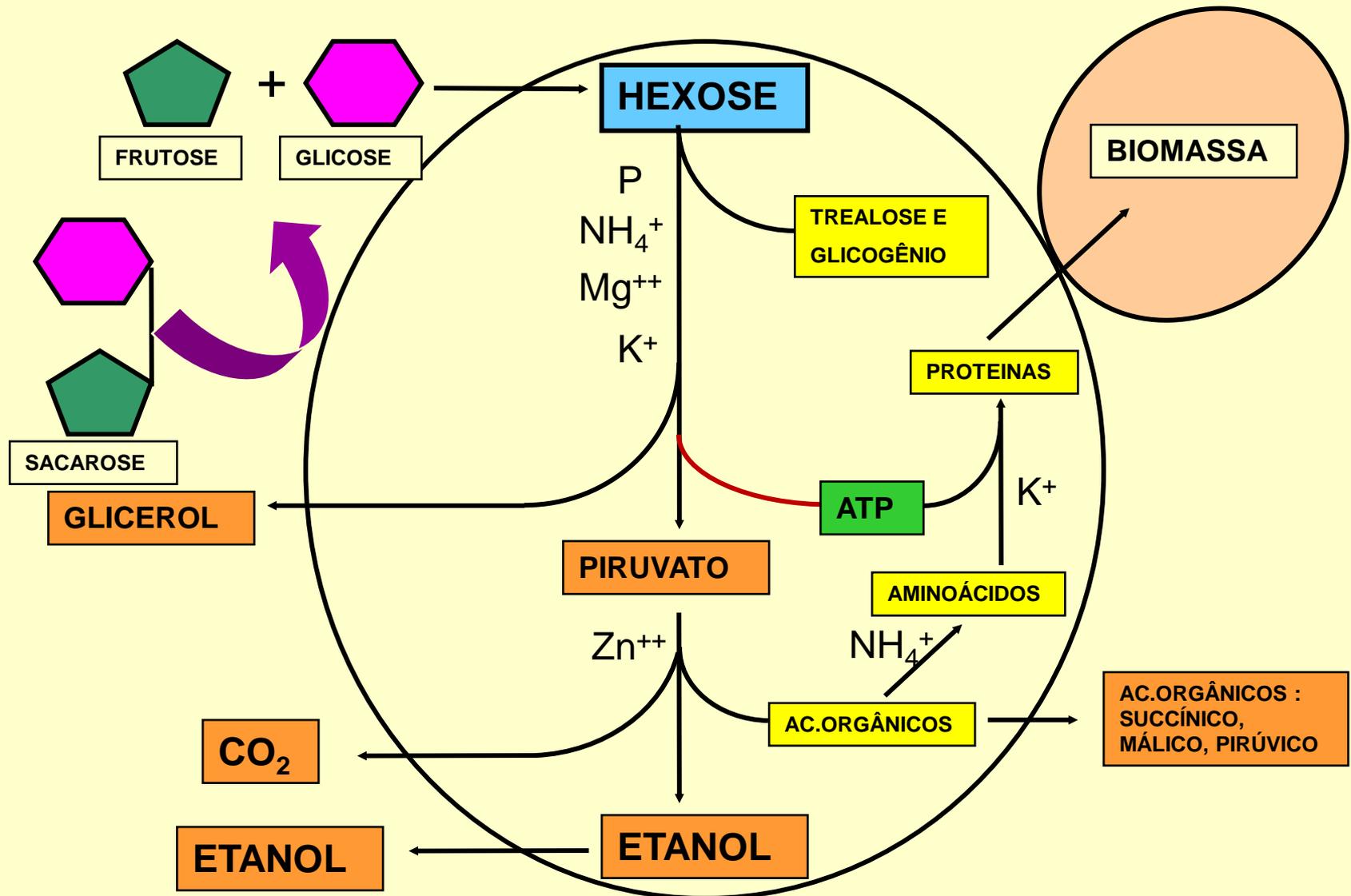


PORQUE A LEVEDURA TRANSFORMA O AÇÚCAR EM ETANOL?

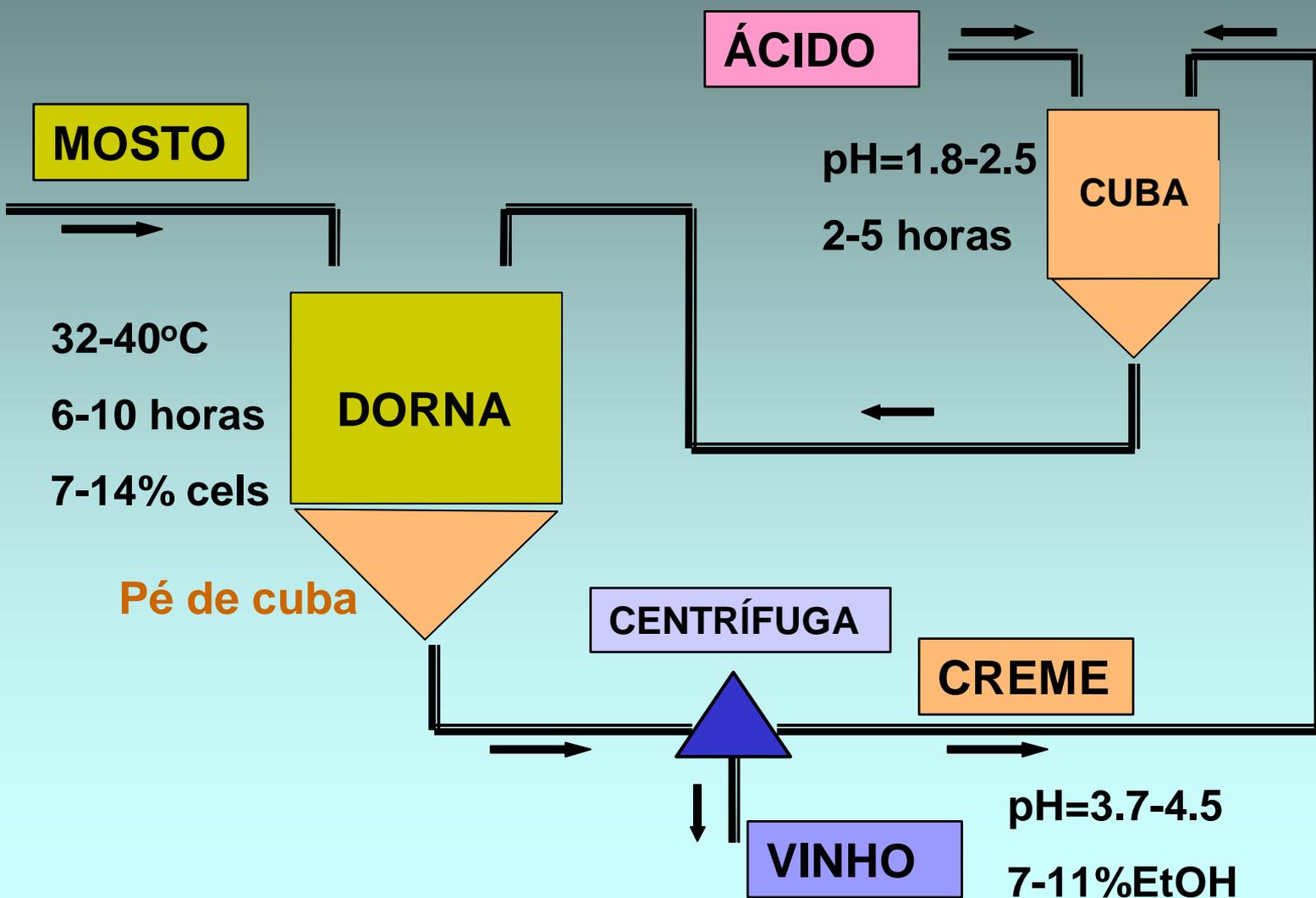


NO PROCESSO INDUSTRIAL A PRODUÇÃO DE BIOMASSA É EXTREMAMENTE VARIÁVEL: DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES E INTENSIDADE DE FATORES ESTRESSANTES (TEMPERATURA, ETANOL, ÁCIDO, ETC.). **A SIMULAÇÃO DO PROCESSO EM LABORATÓRIO MOSTRA DESVIOS MENORES DE 2% DO ART PARA BIOMASSA!!!** EM CERTAS CONDIÇÕES DE ESTRESSE SE PODE FERMENTAR SEM CRESCIMENTO EM BIOMASSA

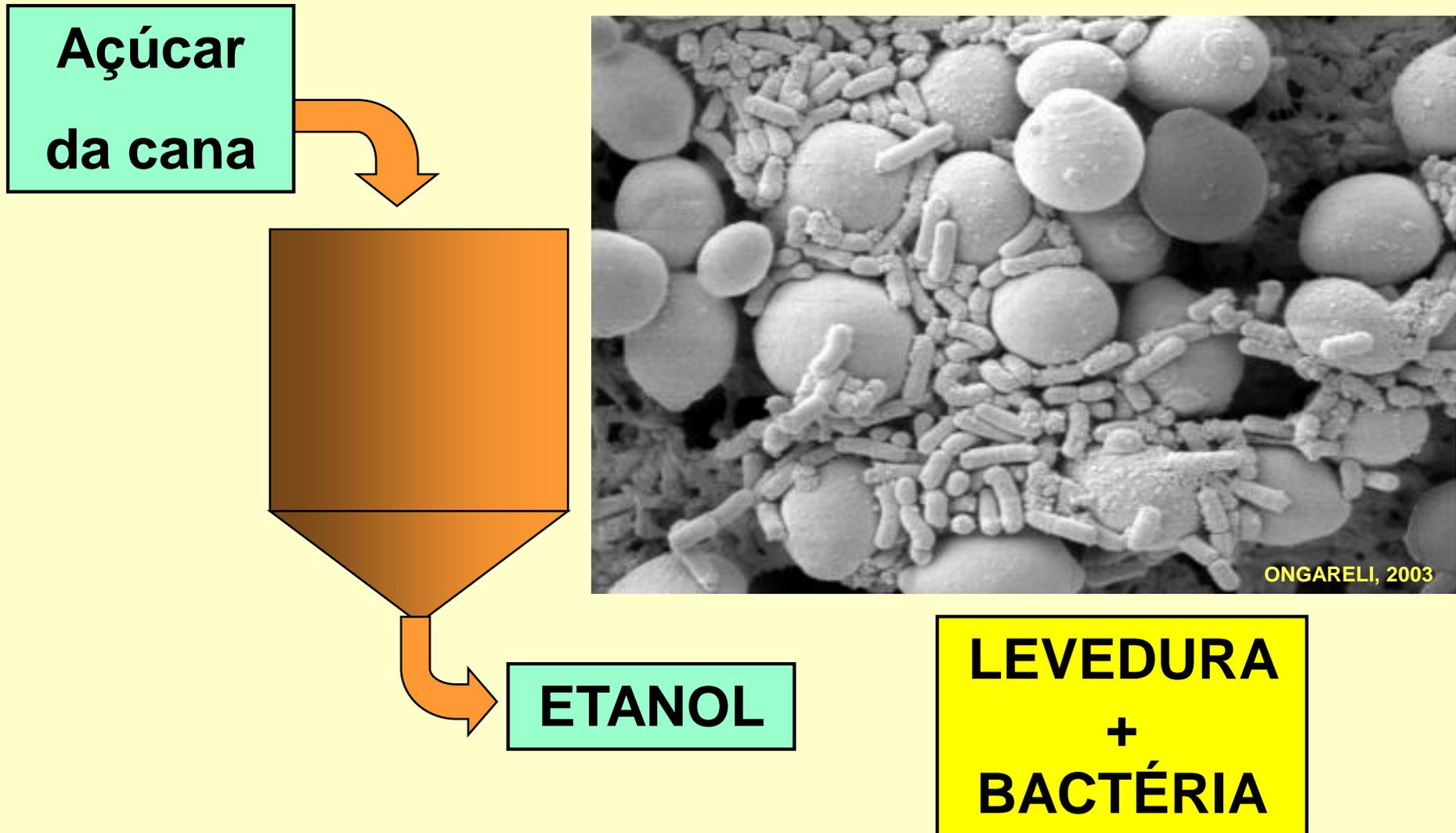
A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA



O PROCESSO FERMENTATIVO COM RECICLO DE CÉLULAS



CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO



AS CONDIÇÕES ESTRESSANTES IMPOSTAS À LEVEDURA

Alta densidade de células (10-14%) : deficiências minerais-N,P,Mg,Mn,Zn

Fermentação rápida (6-10 h)

Pressão osmótica (sais, açúcar)

Etanol (8-12%)

Acidez (pH=1.8-2.5)

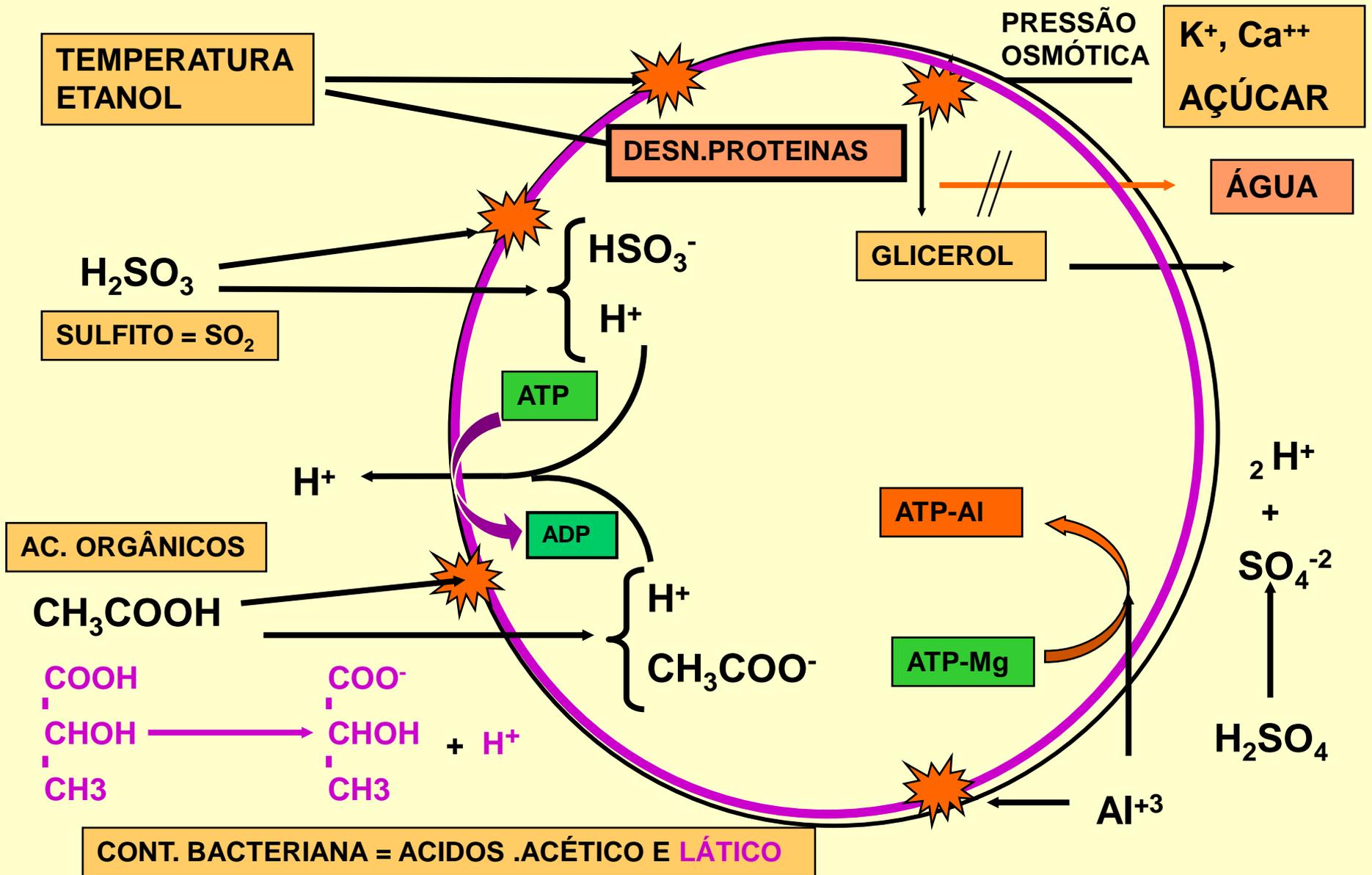
Temperatura (32 - 40°C)

Contaminação bacteriana

Sulfito, Alumínio, excesso K, Ca, Fe, etc



FATORES ESTRESSANTES



LINHAGENS DE LEVEDURAS TOLERANTES AO PROCESSO

**GLICOGÊNIO E TREALOSE
(CARBOIDRATOS DE RESERVA)**

**REPRESENTAM ATÉ 30% DA
MATÉRIA SECA DA LEVEDURA**

CARBOIDRATOS DE RESERVA

TREALOSE:

Mantém a integridade das membranas e das proteínas, conferindo tolerância aos diversos tipos de estresse (temperatura, etanol, acidez)

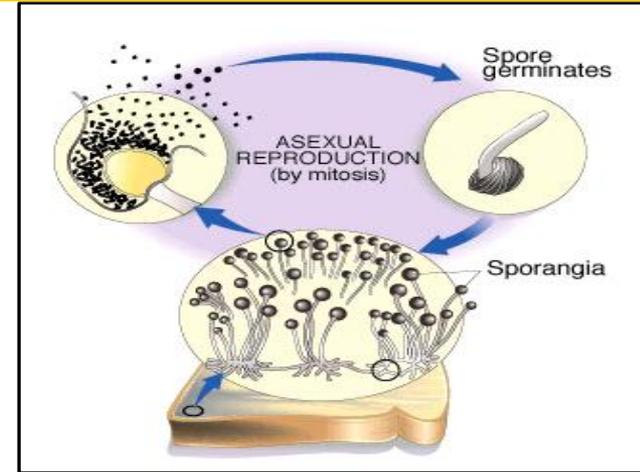
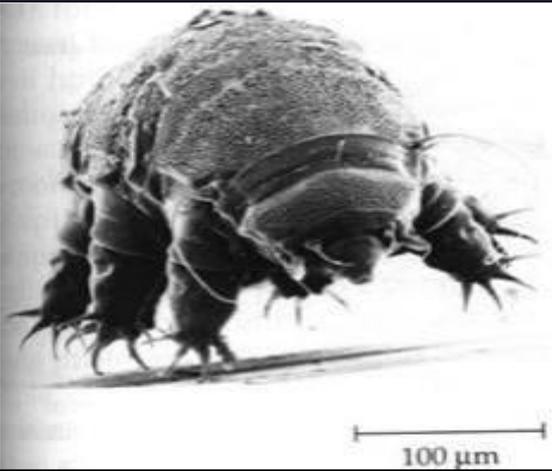
GLICOGÊNIO:

Reserva de energia em condições de limitação de açúcar.

GLICOGÊNIO E TREALOSE:

Responsáveis pela sobrevivência da levedura em condições adversas do processo fermentativo.

TREALOSE: A MOLÉCULA MÁGICA



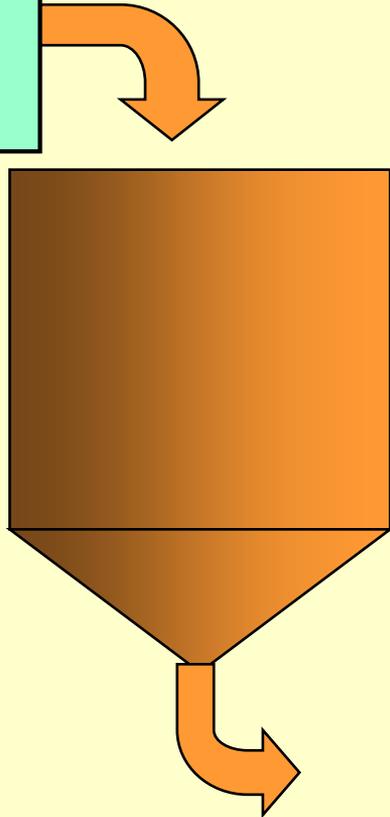
A **TREALOSE**, ESTABILIZANDO AS MEMBRANAS LIPOPROTÊICAS CONFERE TOLERÂNCIA A VÁRIOS ESTRESSES (COMO A DESIDRATAÇÃO), PERMITINDO A ALGUNS ORGANISMOS E CERTAS FORMAS DE VIDA (ESPOROS) A SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES DE QUASE COMPLETA DESIDRATAÇÃO (ANIDROBIOSE)

ETANOL E PRESSÃO OSMÓTICA CAUSAM DESIDRATAÇÃO

LEVEDURAS COM ALTOS TEORES DE RESERVAS SÃO MAIS TOLERANTES AOS ESTRESSES ETANÓLICO, ÁCIDO, TÉRMICO, OSMÓTICO E HIPERBÁRICO

A ESTEQUIOMETRIA DA FERMENTAÇÃO

**Açúcar
da cana**



**1% NO RENDIMENTO EM
ALCOOL TEM GRANDE
IMPACTO NO LUCRO !**

**ETANOL E CO₂: 80-90% DO AÇÚCAR
BIOMASSA
GLICEROL
ÁCIDOS ORGÂNICOS
OUTROS SUBPRODUTOS
AÇÚCAR RESIDUAL**

10-20%

BALANÇO DE MASSA

(EM ANAEROBIOSE)

PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO	% DO ART CONSUMIDO
ETANOL	} 84-92
GÁS CARBÔNICO	
BIOMASSA	1 - 5
GLICEROL	2 - 9
AC. SUCCÍNICO	0,3 - 1,2
AC. ACÉTICO	0,1 - 0,7
ÓLEO FUSEL	0,1 - 0,4
OUTROS	< 0,1

Para um consumo total do açúcar pela levedura

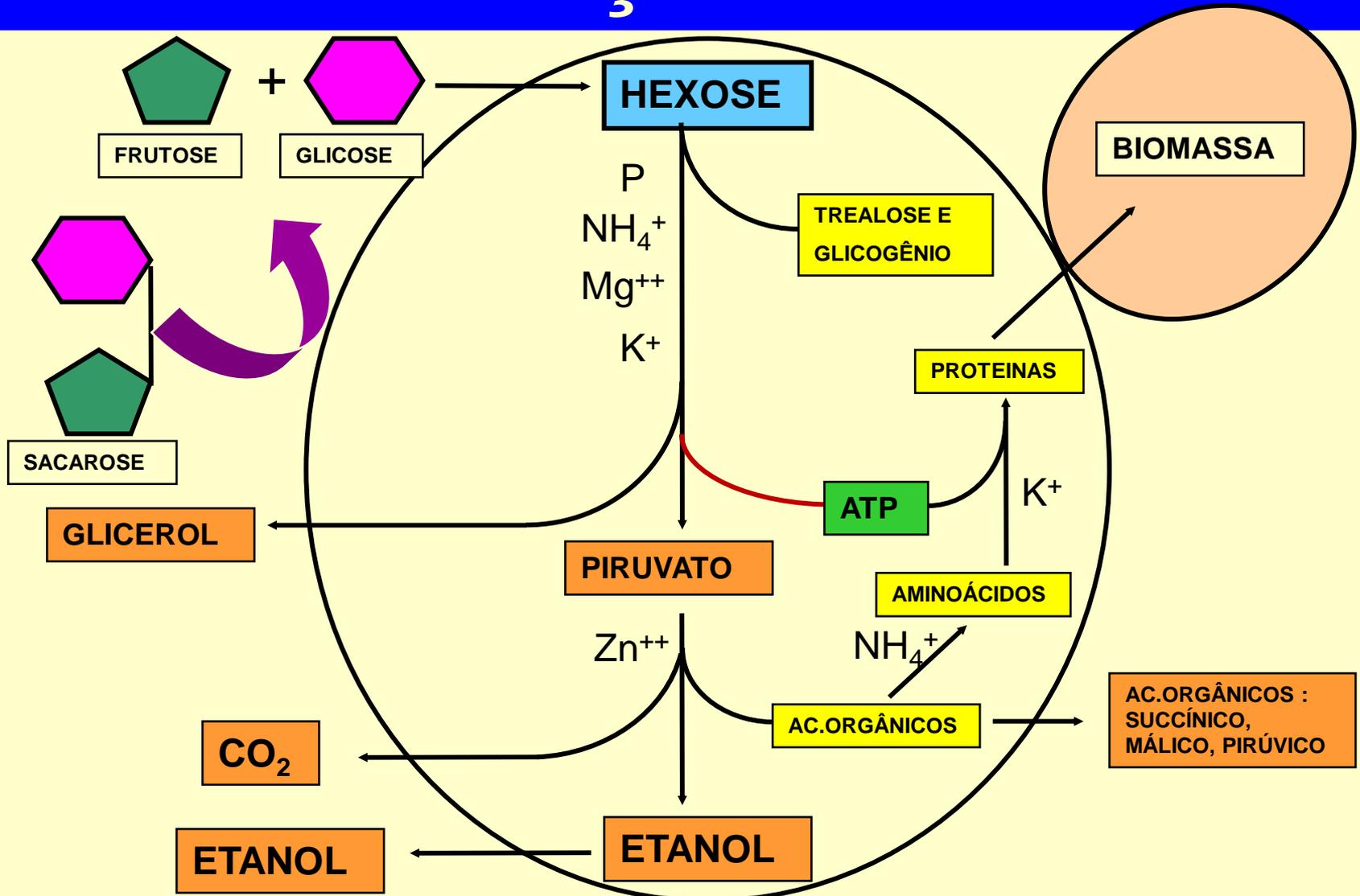
ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO NO RENDIMENTO EM ETANOL

**A FORMAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA
FERMENTAÇÃO CONSOMEM AÇÚCAR EM
DETRIMENTO DA FORMAÇÃO DE ETANOL**

**PODE-SE AUMENTAR A FORMAÇÃO DE ETANOL
DIMINUINDO A FORMAÇÃO DE BIOMASSA,
GLICEROL, ÁCIDOS ORGÂNICOS, ETC.**

COMO E ATÉ ONDE SE PODE FAZER ESSA REDUÇÃO?

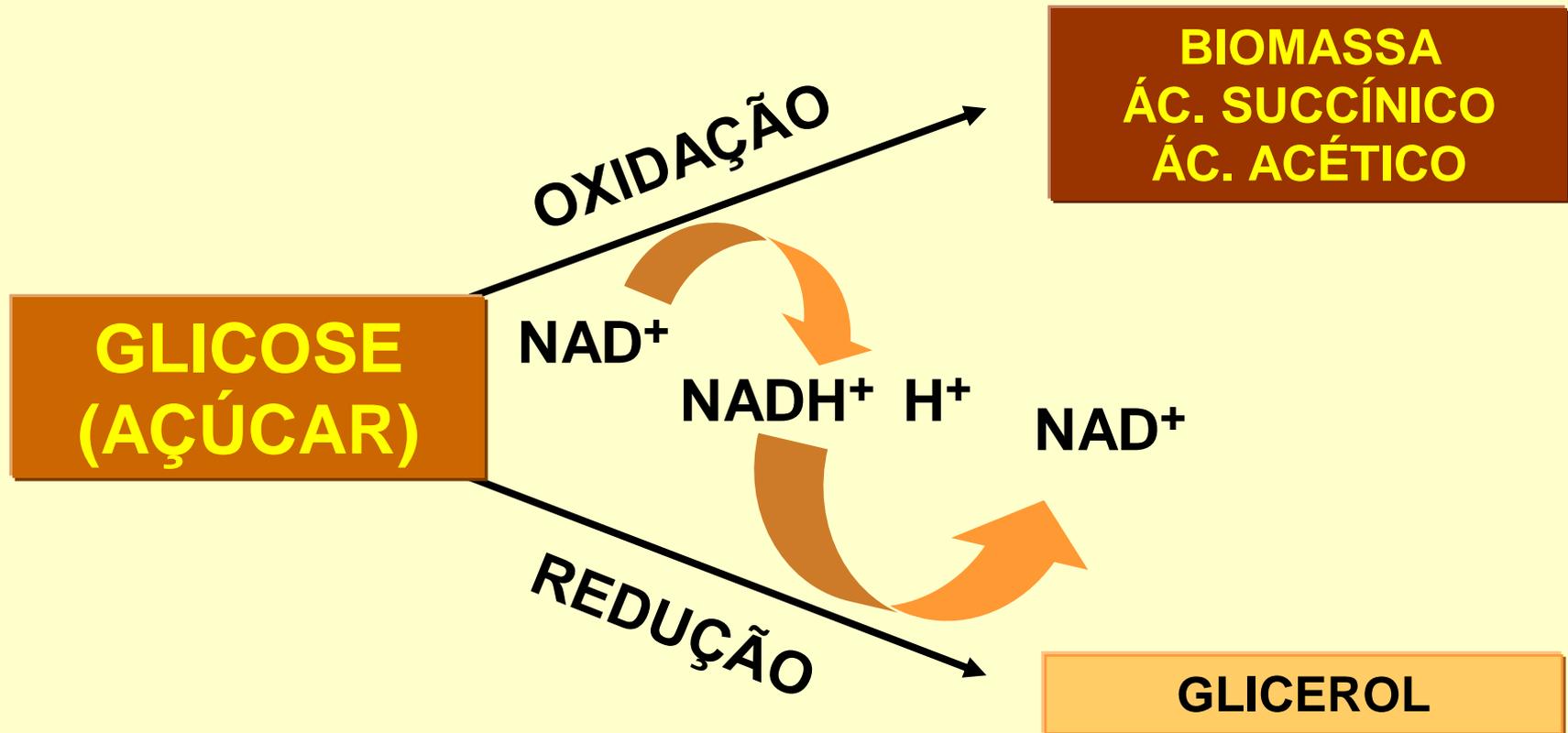
A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA



EXISTE UMA IMPORTANTE RAZÃO FISIOLÓGICA PARA A PRODUÇÃO DE GLICEROL!!!!

A FORMAÇÃO DO GLICEROL

O PRODUTO SECUNDÁRIO GERADO EM MAIOR PROPORÇÃO



➔ O $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ GERADO DEVE SER CONSUMIDO PARA MANTER O EQUILÍBRIO DE ÓXIDO-REDUÇÃO EM ANAEROBIOSE

REDUÇÃO DE SUBPRODUTOS

(QUAL O LIMITE ?)

BIOMASSA - SUFICIENTE PARA FAZER A REPOSIÇÃO
DA PARCELA PERDIDA A CADA RECICLO

GLICEROL - ACOPLADO À BIOMASSA E ÁC. ORG.
- ACOPLADO AOS ESTRESSES

**OSMÓTICO, TEMPERATURA,
SULFITO, BACTÉRIAS, EXCESSO DE K⁺**

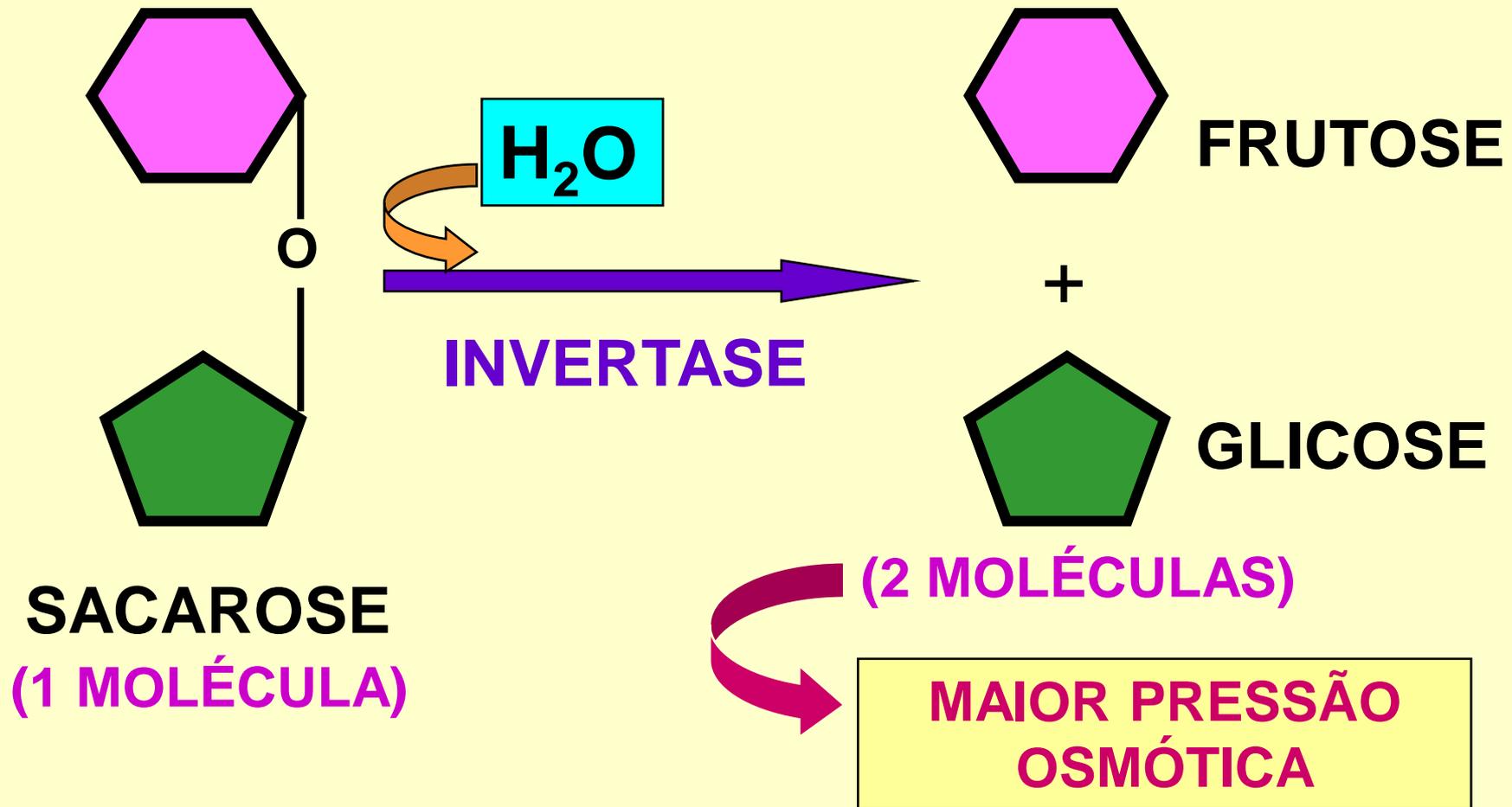
ÁCIDO SUCCÍNICO - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

ESTRESSE OSMÓTICO E VELOCIDADE DE ALIMENTAÇÃO

PARÂMETRO AVALIADO *	VELOCIDADE DE ALIMENTAÇÃO	
	4 HORAS	DE VEZ
GLICEROL (%)	3,46	4,04
TAXA CRESC.(%)	22	18
RENDIMENTO(%).	85,3	83,7

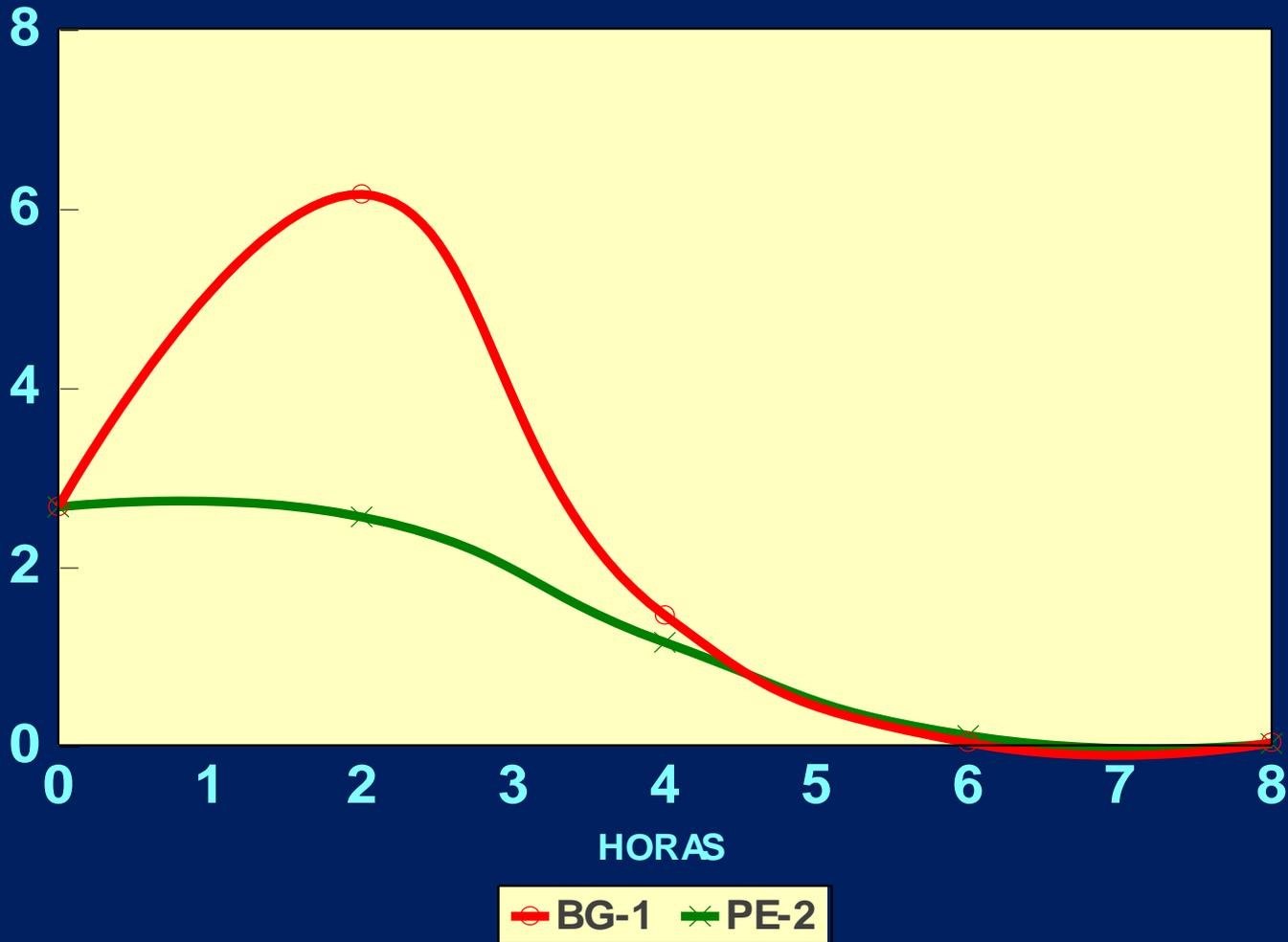
*VALOR MÉDIO DE 6 CICLOS FERMENTATIVOS

LEVEDURAS COM DIFERENTES ATIVIDADE DE INVERTASE: IMPACTO NO ESTRESSE OSMÓTICO



CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

AR (%)



LEVEDURAS COM DIFERENTES ATIVIDADES DE INVERTASE

PARÂMETRO	BG-1	PE-2
RENDIMENTO (%)	93,5	93,7
TAXA CRESCIMENTO (%)	164	195
GLICEROL (g/100g ART)	4,1	3,7
VIABILIDADE FINAL (%)	97	94
TREALOSE FINAL (%)	5,3	13,0
GLICOGÊNIO FINAL (%)	7,4	16,4

AVALIAÇÃO EM 10 CICLOS FERMENTATIVOS

RELAÇÕES TRÓFICAS ENTRE LEVEDURAS E BACTÉRIAS

REDUÇÃO DO RENDIMENTO EM ETANOL

-METABÓLITOS BACTERIANOS

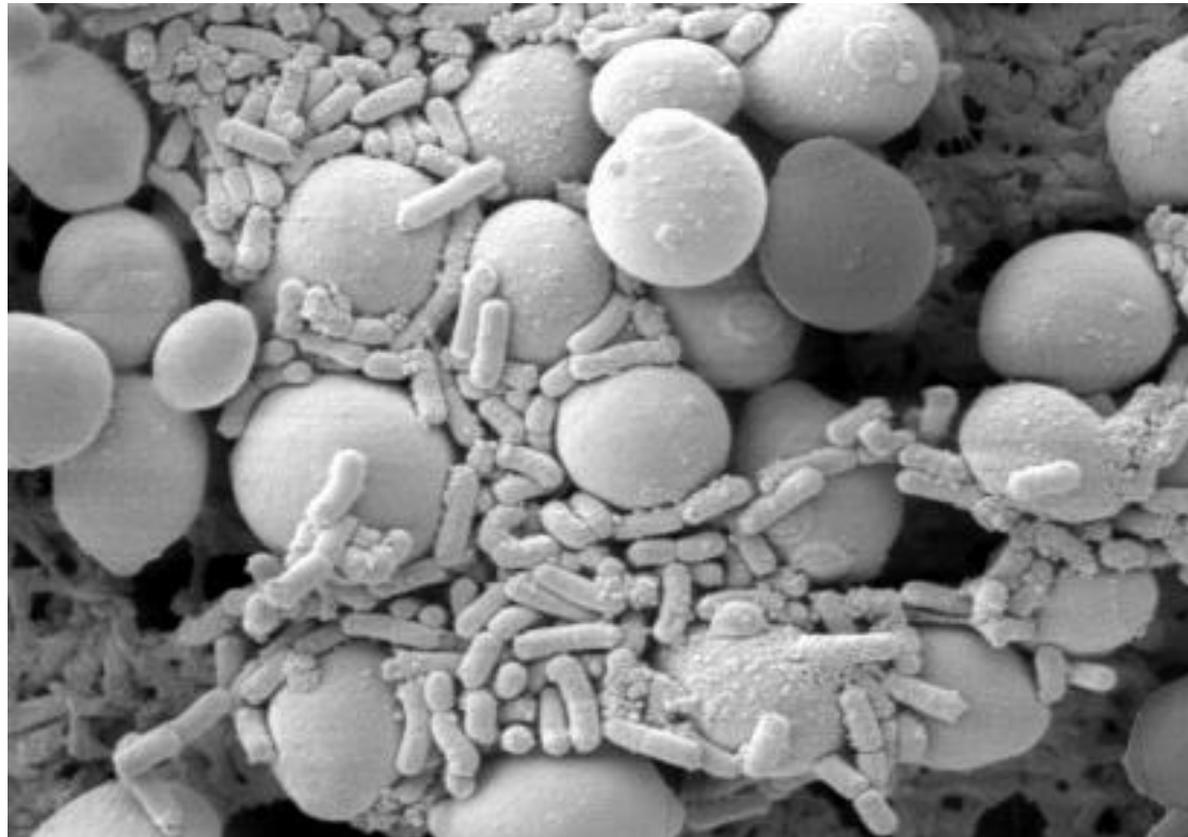
-BIOMASSA BACTERIANA

-MAIOR PRODUÇÃO DE GLICEROL PELA LEVEDURA

REDUZ A VIABILIDADE DA LEVEDURA

AUMENTA A FLOCULAÇÃO

AUMENTA A ESPUMA



Efeito da contaminação bacteriana na estequiometria da fermentação

Parâmetro	Sem bactérias	Com bactérias
Etanol	92,40	90,00
Biomassa	1,51	1,13
Glicerol	2,23	2,47
Ácido acético	0,14	1,11
Ácido succínico	0,17	0,24
Ácido láctico	0,22	3,21
Manitol	0,52	0,83
Indeterminados	1,40	2,32

Fração (%) do ART referente a cada produto da fermentação (média de 5 ciclos). Linhagem PE-2, mosto de melaço, 32°C, contaminação com lactobacilos (10^8). Florêncio (2014)

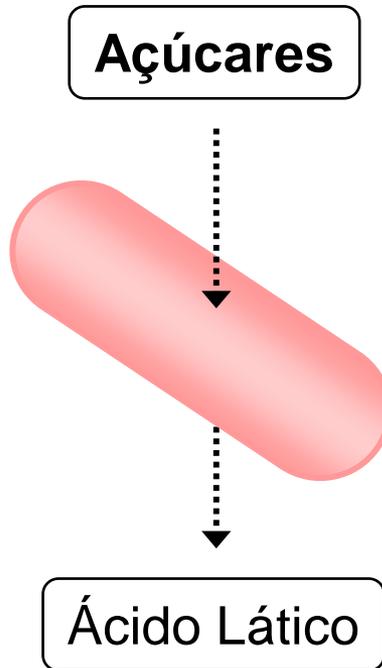
A IMPORTÂNCIA DA VIABILIDADE DA LEVEDURA

PARAMETROS	VIABILIDADE	
	ALTA	BAIXA
VIABILIDADE (%)	100 - 45	70 - 30
RENDIMENTO (%)	92	87
GLICEROL (%)	3,5	4,2
TREALOSE (%)	11,2	7,0
BACT.x10 ⁷ (cels/mL)	6,7	23,0

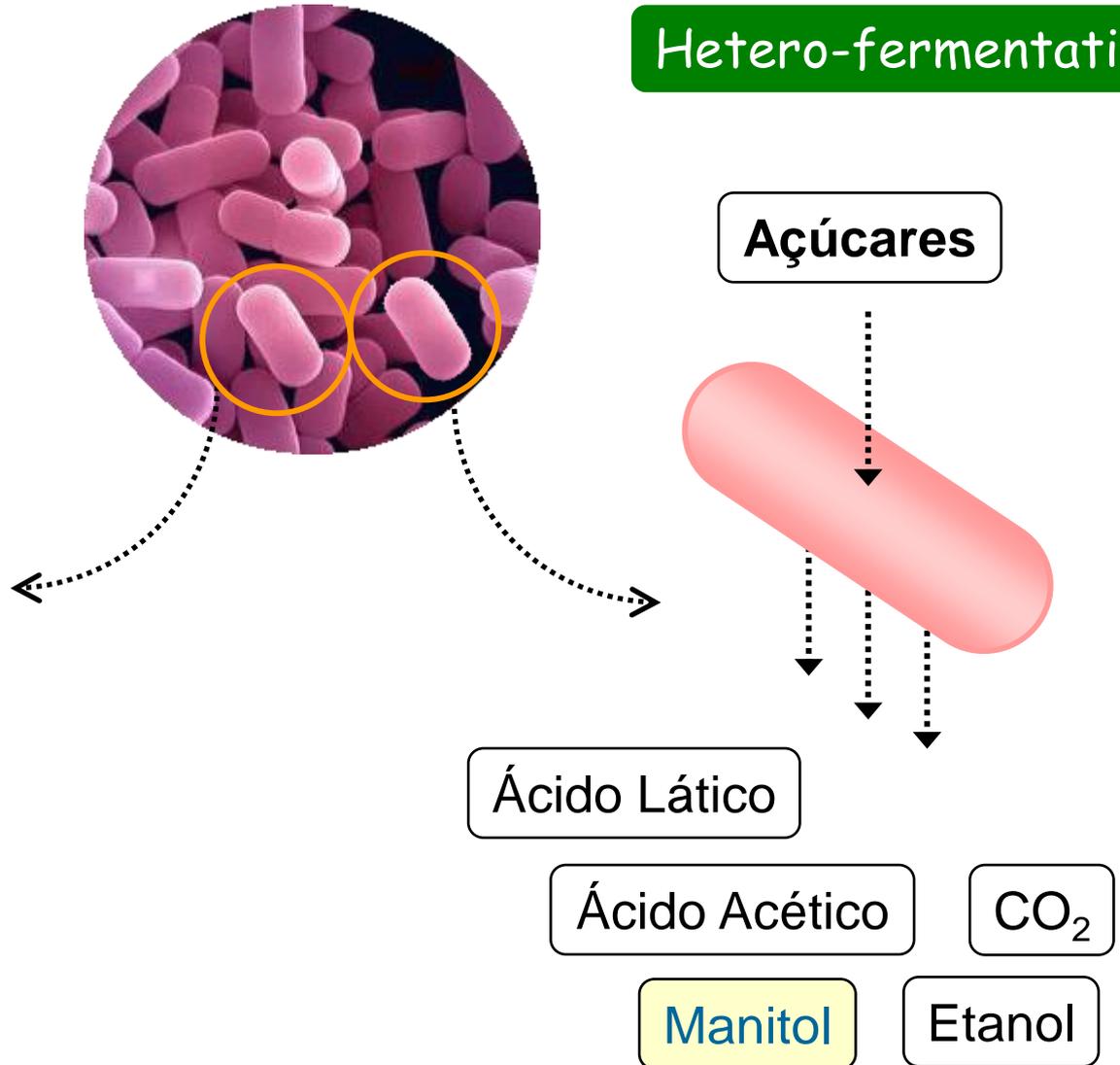
PE-2 X *Lactobacillus fermentum*

Lactobacilos: tipos de metabolismo

Homo-fermentativa



Hetero-fermentativa

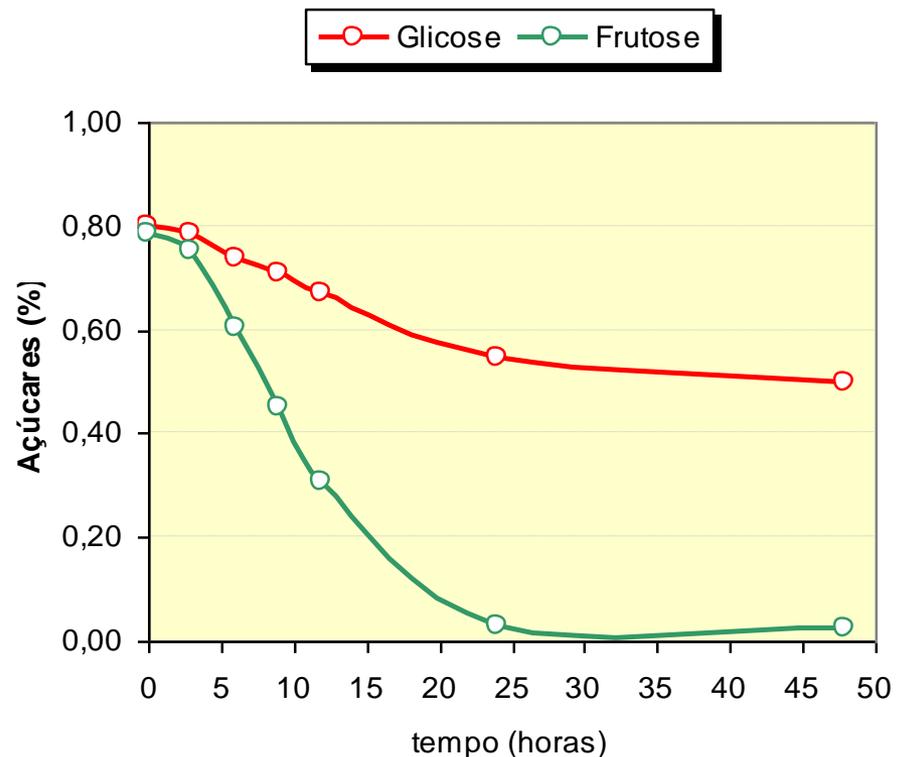
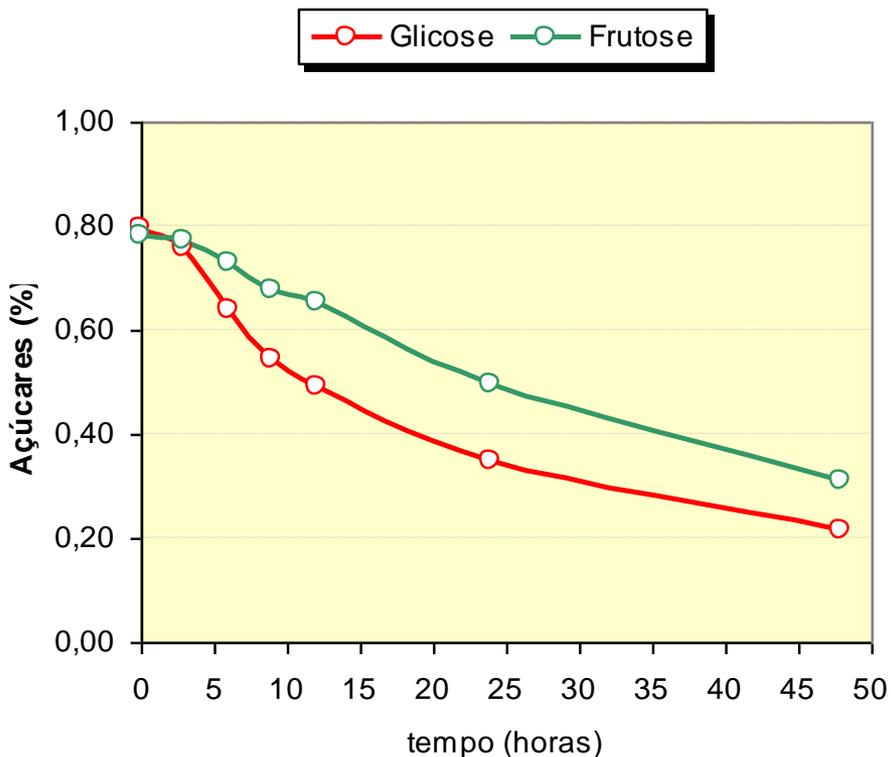


Consumo de glicose e frutose por Lactobacilos isolados de destilarias

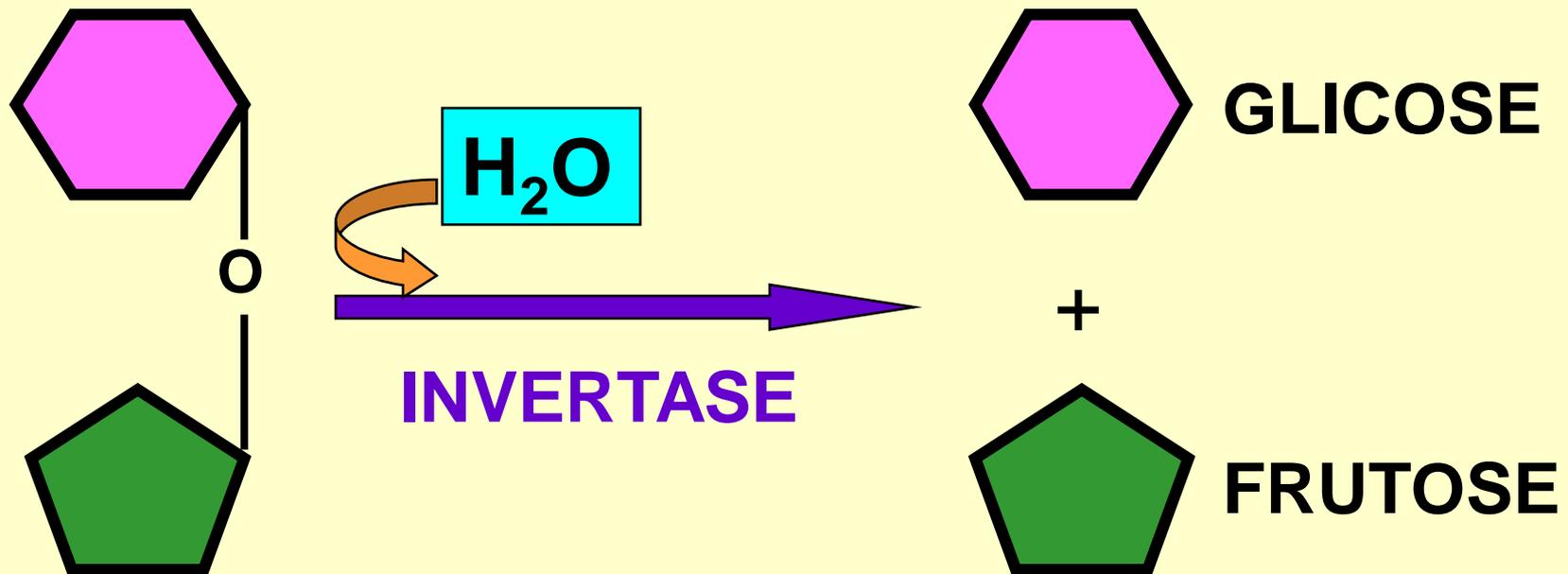
A bactéria hetero-fermentativa tem preferência pela frutose

Homo-fermentativo

Hetero-fermentativo



A ATIVIDADE DA INVERTASE É MAIOR QUE A VELOCIDADE DE ABSORÇÃO DA GLICOSE E FRUTOSE PELA LEVEDURA



SACAROSE

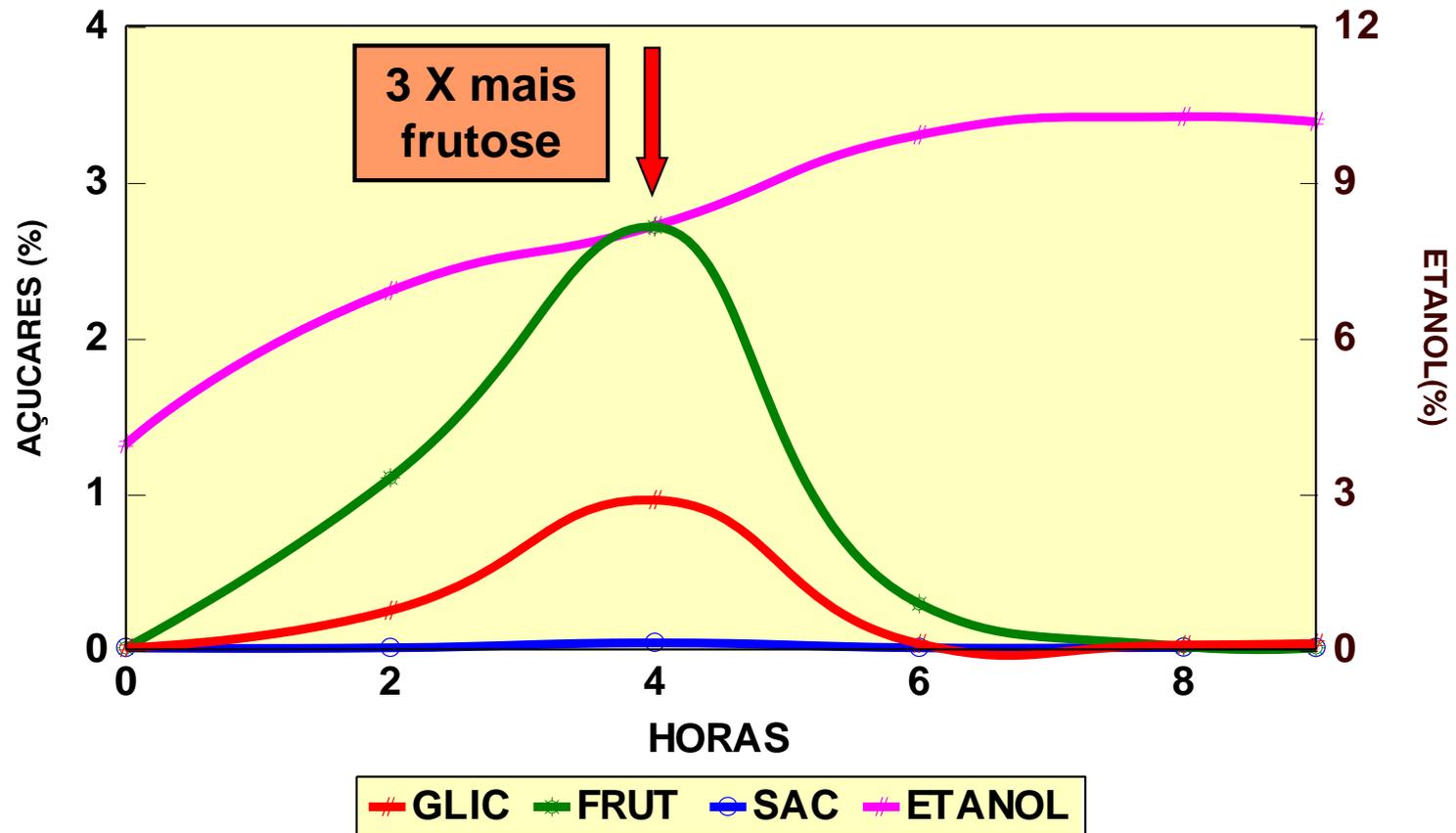
Não é absorvida pela levedura

Açúcares absorvidos pela levedura com preferencia pela glicose

A FERMENTAÇÃO FAVORECE O CRESCIMENTO DO TIPO HETEROFERMENTATIVO

CINETICA FERMENTAÇÃO

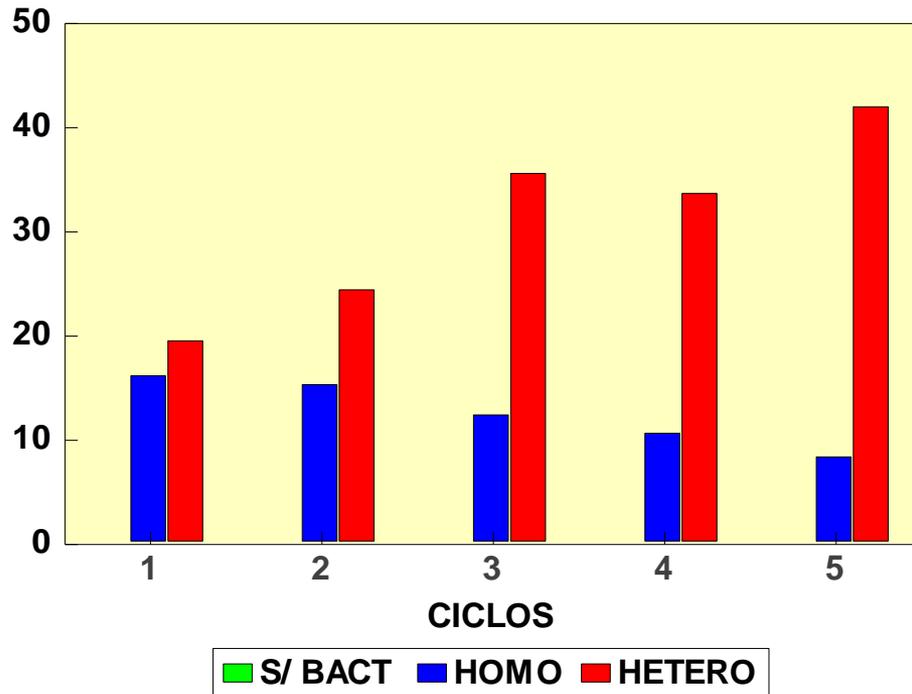
(4 HORAS DE ALIMENTAÇÃO)



Fermentação contaminada com bactérias homo- e heterofermentativa

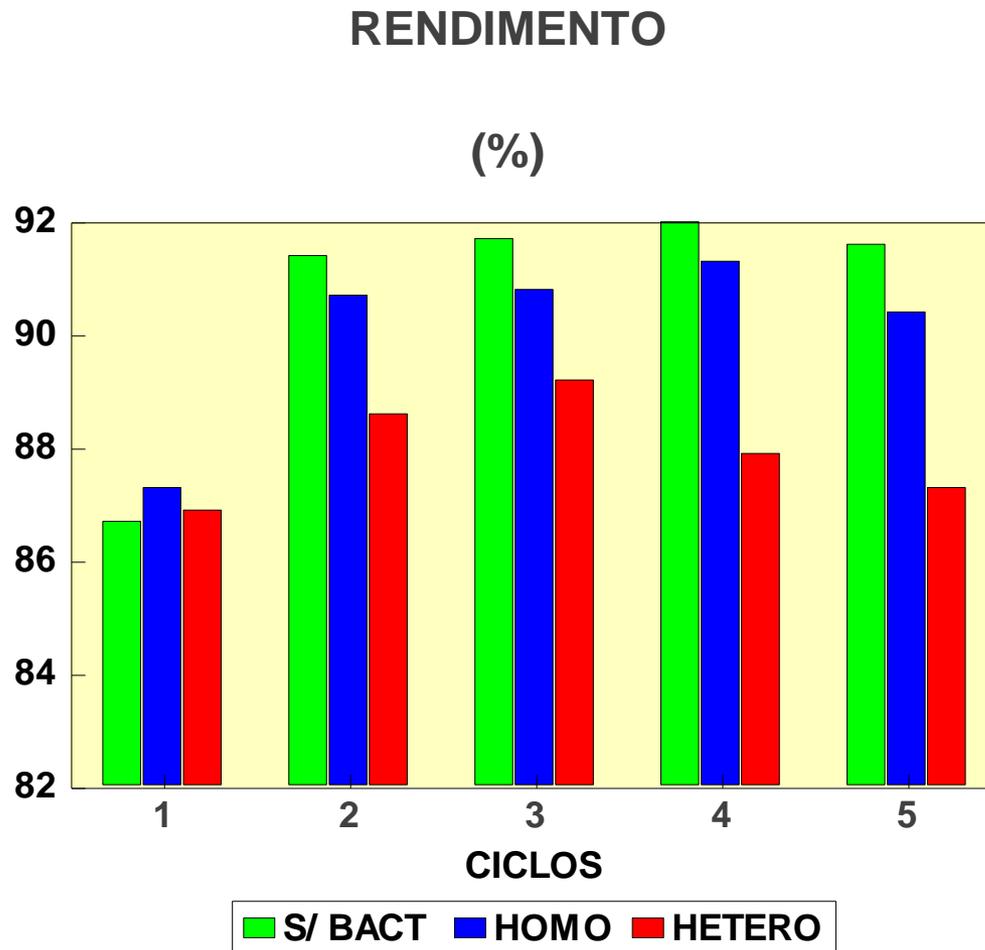
BACTERIAS

(Cel/mL x 10e7)



Parametro	Homo	Hetero	Varição(%)
Lactato (mg/L)	2400	3200	+33
Acetato (mg/L)	750	1800	+140
Manitol (mg/L)	200	1750	+620
Glicerol (%)	0,35	0,60	+71
Viabil. (%)	95	80	-10

A bactéria hetero-fermentativa afeta mais o rendimento



Haveria necessidade de combater todos os tipos de lactobacilos?

Como avaliar os antibacterianos (homo- e hetero)?

PODEMOS REDUZIR O CRESCIMENTO BACTERIANO ?



REDUZINDO OS ALIMENTOS PARA AS BACTÉRIAS:

AÇÚCARES

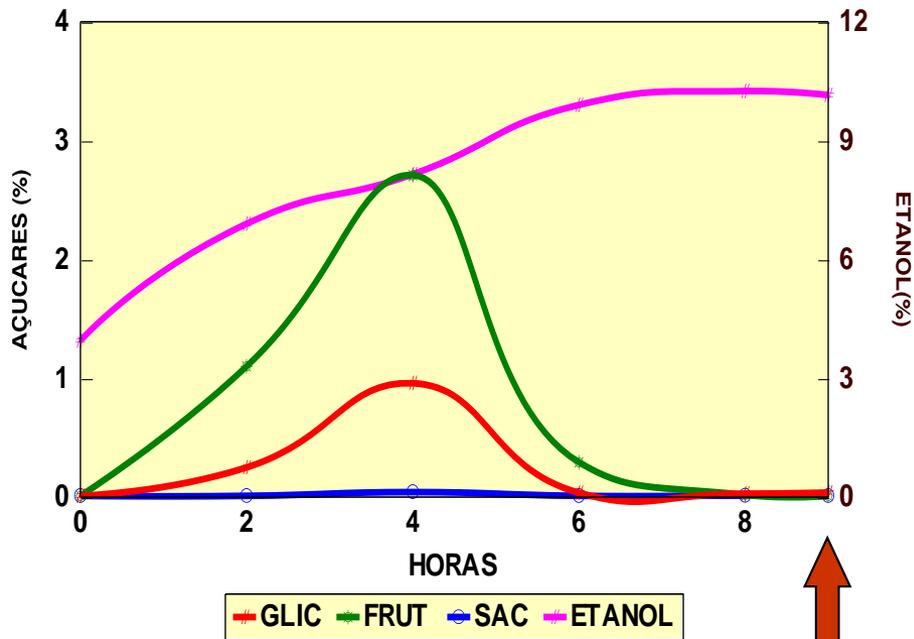
AMINOÁCIDOS E VITAMINAS (MOSTO E LEVEDURAS

MORTAS)

Controlando a contaminação pela disponibilidade de açúcar no meio

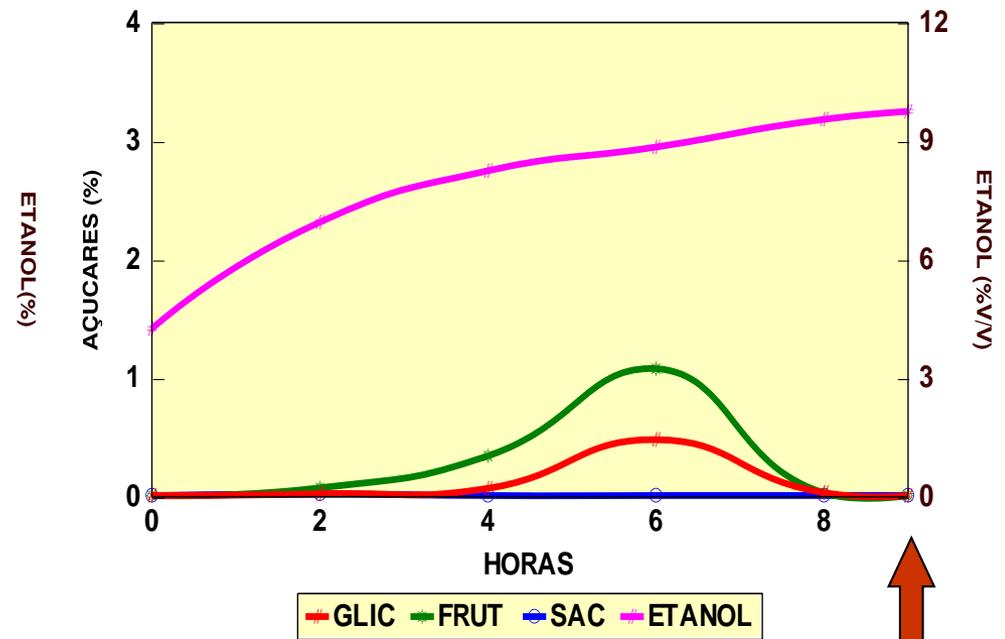
CINETICA FERMENTAÇÃO

(4 HORAS DE ALIMENTAÇÃO)



CINETICA FERMENTAÇÃO

(6 HORAS ALIMENTAÇÃO)



1700 ppm
lactato

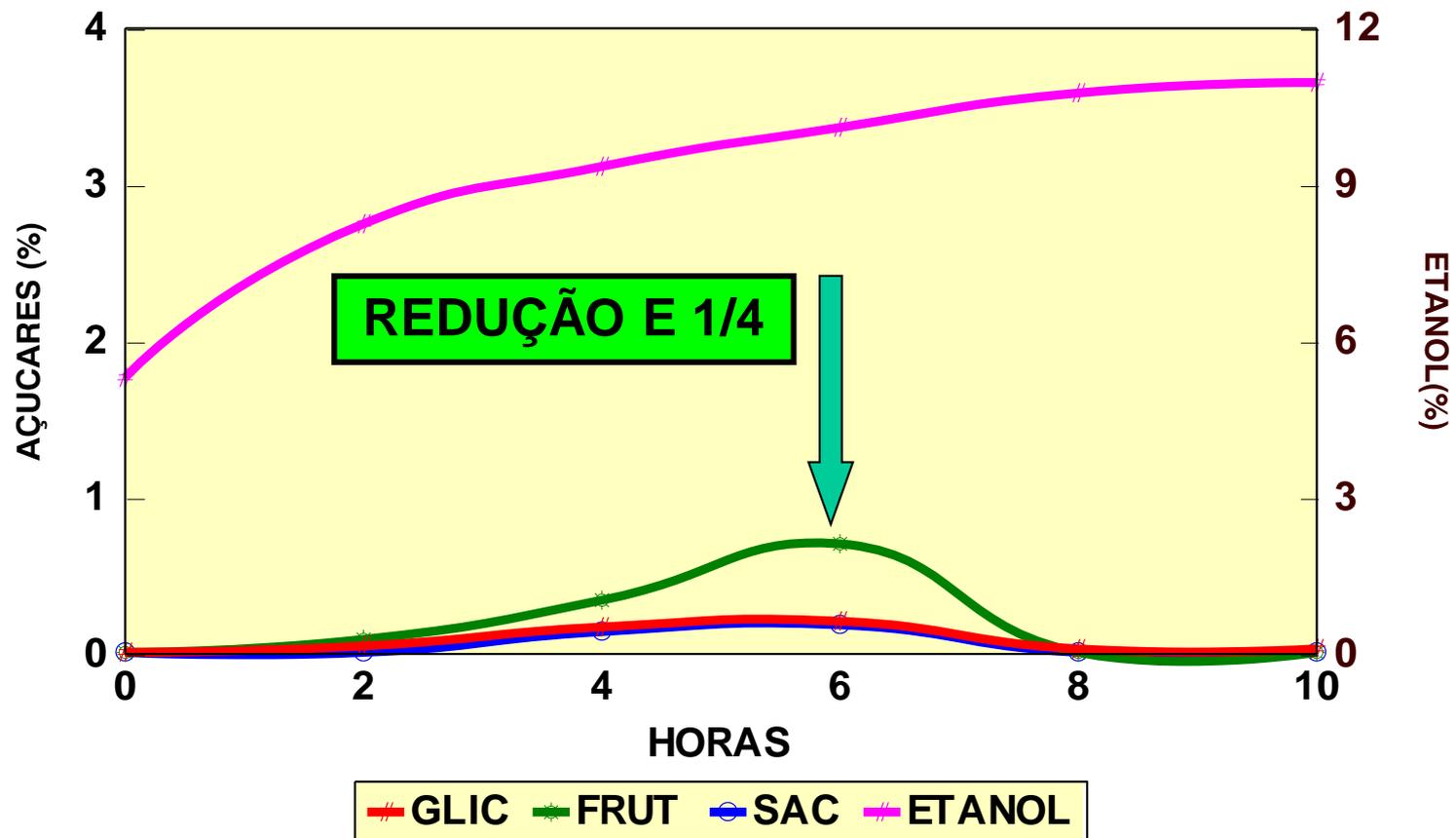
10^8 cel/ml

900 ppm
lactato

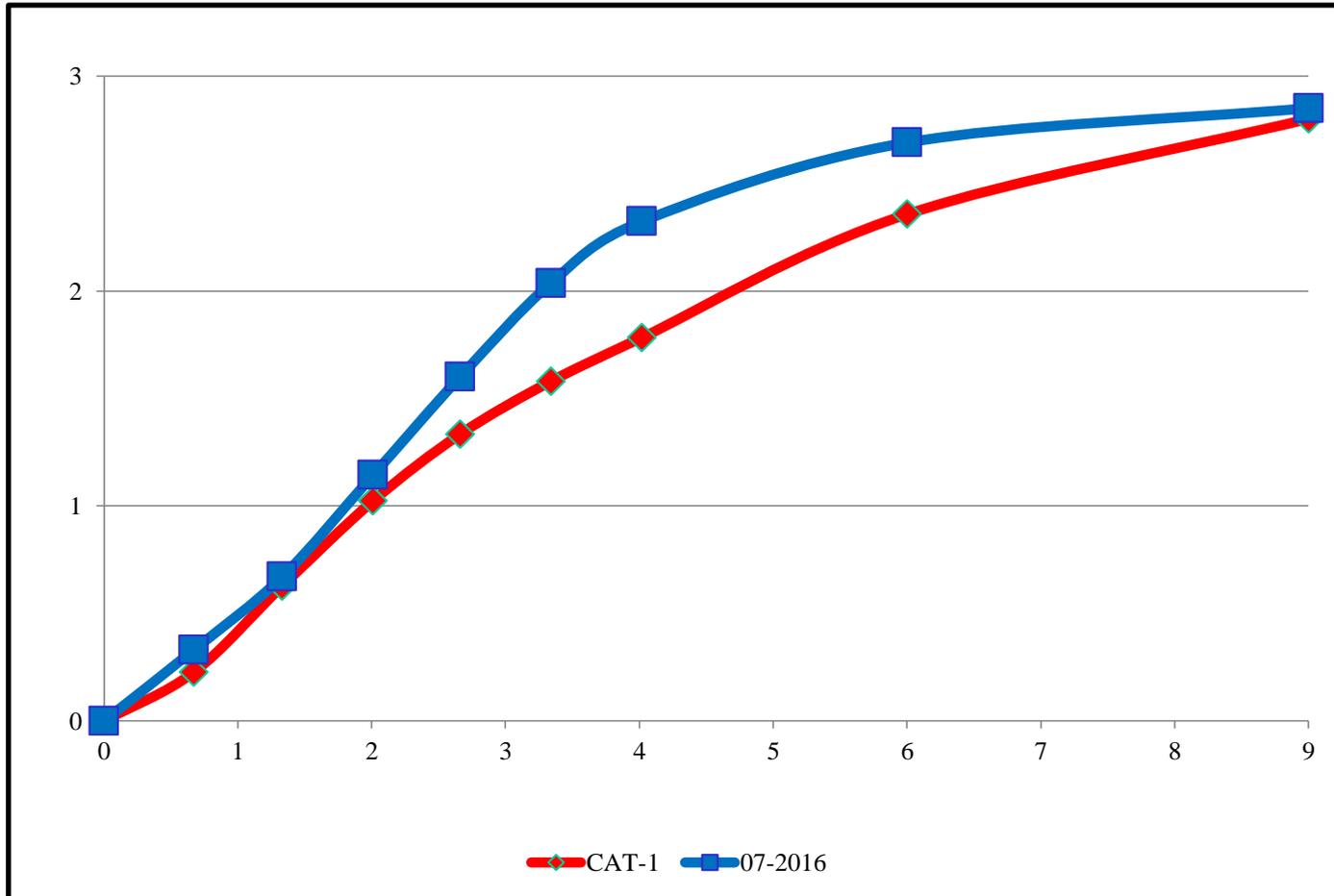
Levedura com maior velocidade de consumo de açúcar

LEVEDURA B

(6 HORAS DE ALIMENTAÇÃO)



ELEVANDO A PRODUTIVIDADE COM LINHAGENS E REDUZINDO O VOLUME DE DORNAS



FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL COM 4 HORAS!!!!

LEVEDURAS COM ALTO DESEMPENHO FERMENTATIVO

**SUPORTAR OS ESTRESSES DA FERMENTAÇÃO
INDUSTRIAL COM RECICLO DE CÉLULAS**

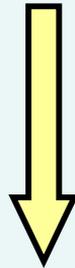
- ALTAS TEMPERATURAS**
- ELEVADOS TEORES ALCOÓLICOS**
- TRATAMENTO ÁCIDO**
- PARADAS (FALTA DE AÇÚCAR)**
- SULFITO, ALUMÍNIO, ETC**
- PRESSÃO OSMÓTICA**
- CONTAMINAÇÃO BACTERIANA**

**SUSTENTAR ALTA VIABILIDADE CELULAR DURANTE
RECICLOS E APRESENTAR BOA EFICIÊNCIA EM ETANOL**

O PROCESSO INDUSTRIAL COMO FONTE DE LINHAGENS APROPRIADAS

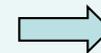
- GRANDE BIODIVERSIDADE
- LINHAGENS PERSISTENTES (TOLERANTES ?)
- LINHAGENS DOMINANTES (COMPETITIVAS ?)
- **POUCAS LINHAGENS DOMINANTES E PERSISTENTES**

**PRESSÃO SELETIVA DO PROCESSO COM
RECICLO DE CÉLULAS**



**2 CICLOS/DIA
200-250 DIAS**

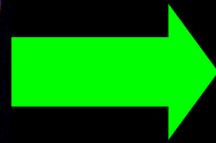
**SELEÇÃO OU ADAPTAÇÃO EVOLUTIVA
LEVANDO A LINHAGENS COM TOLERÂNCIA A
VÁRIOS TIPOS DE ESTRESSE, MESMO
DESCONHECIDOS**



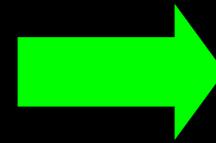
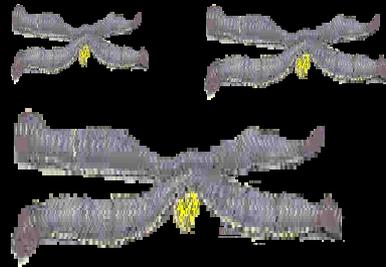
**RESISTENTES, MAS
NÃO
NECESSARIAMENTE
COM BONS
ATRIBUTOS
FERMENTATIVOS**

CARIOTIPAGEM : A FERRAMENTA PARA A OBTENÇÃO DAS LINHAGENS SUPERIORES

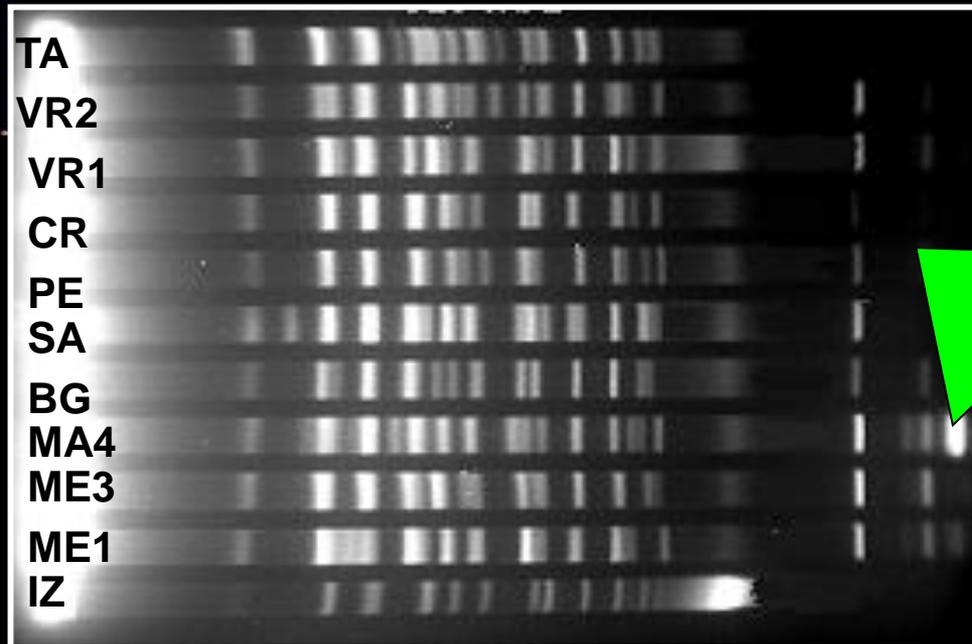
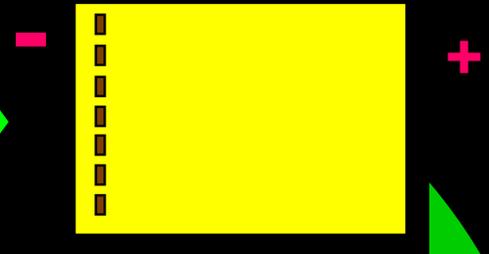
Colônias individuais



DNA intacto



Eletroforese



DESEMPENHO FERMENTATIVO

PARÂMETROS FERMENTATIVOS	LEV A	LEV B
RENDIMENTO EM ETANOL (%)	89	93
GLICEROL (%)	5.7	3.7
TAXA DE CRESCIMENTO (%)	5.8	8.2
VIABILIDADE (%)	48	97
GLYCOGENIO CELULAR (%MS)	9	16
TREALOSE CELULAR (%MS)	4	9

6 CICLOS FERMENTATIVOS A 33°C, MOSTO APENAS MEL, 10% ETANOL

ATUALMENTE SÃO EXIGIDAS LINHAGENS COM TOLERÂNCIA SUPERIOR À MAIORIA DAS LINHAGENS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS

A FERMENTAÇÃO IDEAL (?)

- **MANTER A VIABILIDADE DA LEVEDURA ELEVADA** (evitar estresse térmico que estimula as bactérias, nas paradas manter a levedura em baixa temperatura, baixa acidez e baixo teor alcoólico)
- **FERMENTAR COM ELEVADO TEOR ALCOÓLICO (>9% se a levedura permitir: ação antibacteriana)**
- **ALTA CONCENTRAÇÃO DE FERMENTO NA CENTRÍFUGA** (menor recirculação de vinho, menor consumo de ácido, menor estresse à levedura, maior produtividade; é difícil com levedura floculante)
- **MANTER BAIXA A CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR NA DORNA** (agitação da dorna, ajustar velocidade de alimentação)
- **AJUSTAR A TAXA DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA** (repor biomassa perdida ou removida; mas depende dos nutrientes do mosto - falta ou excesso)
- **EVITAR O ESTRESSES, ESPECIALMENTE O TÉRMICO** (reduz viabilidade e estimula as bactérias)
- **SELECIONAR LEVEDURAS DA PRÓPRIA DESTILARIA** (com atributos fisiológicos que permitam as condições favoráveis acima mencionadas)

**OBRIGADO PELA
ATENÇÃO !**