

The background of the slide is a photograph of a large industrial facility, likely a brewery or distillery, at night. The facility is illuminated with warm lights, and its complex structure of pipes, tanks, and scaffolding is visible. Overlaid on the bottom half of the image is a network diagram consisting of numerous small circular nodes connected by thin lines, creating a web-like pattern. In the top-left corner, there is a solid orange triangle pointing to the right.

# **DESMISTIFICANDO A FEMENTAÇÃO**

Silvio Roberto Andrietta

Dezembro/2023

# INTRODUÇÃO

A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA APRESENTA UMA SÉRIE DE PARADIGMAS CRIADOS AO LONGO DOS ANOS, PRINCIPALMENTE NOS PRIMORDIOS DESTA INDÚSTRIA QUE CONTAVA COM POUCA ESTRUTURA DE MONITORAMENTO E PERSISTE ATÉ OS DIAS DE HOJE.

A INTENÇÃO DESTA APRESENTAÇÃO É ABORDAR OS ASSUNTOS MAIS POLÊMICOS CUJA INFLUÊNCIA DESTES PARADIGMAS AINDA AFETAM A AVALIAÇÃO E A FORMA DE OPERAÇÃO DA PLANTA

# TÓPICOS

- EFEITO DA PRODUÇÃO DA MASSA CELULAR NO RENDIMENTO FERMENTATIVO
  - CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO
  - EFEITO DA VELOCIDADE DE ENCHIMENTO DAS DORNAS NA VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO E RENDIMENTO FERMENTATIVO
- 
- CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
  - FLOCULAÇÃO
  - RENDIMENTO FERMENTATIVO

# MASSA CELULAR PRODUZIDA E RENDIMENTO FERMENTATIVO



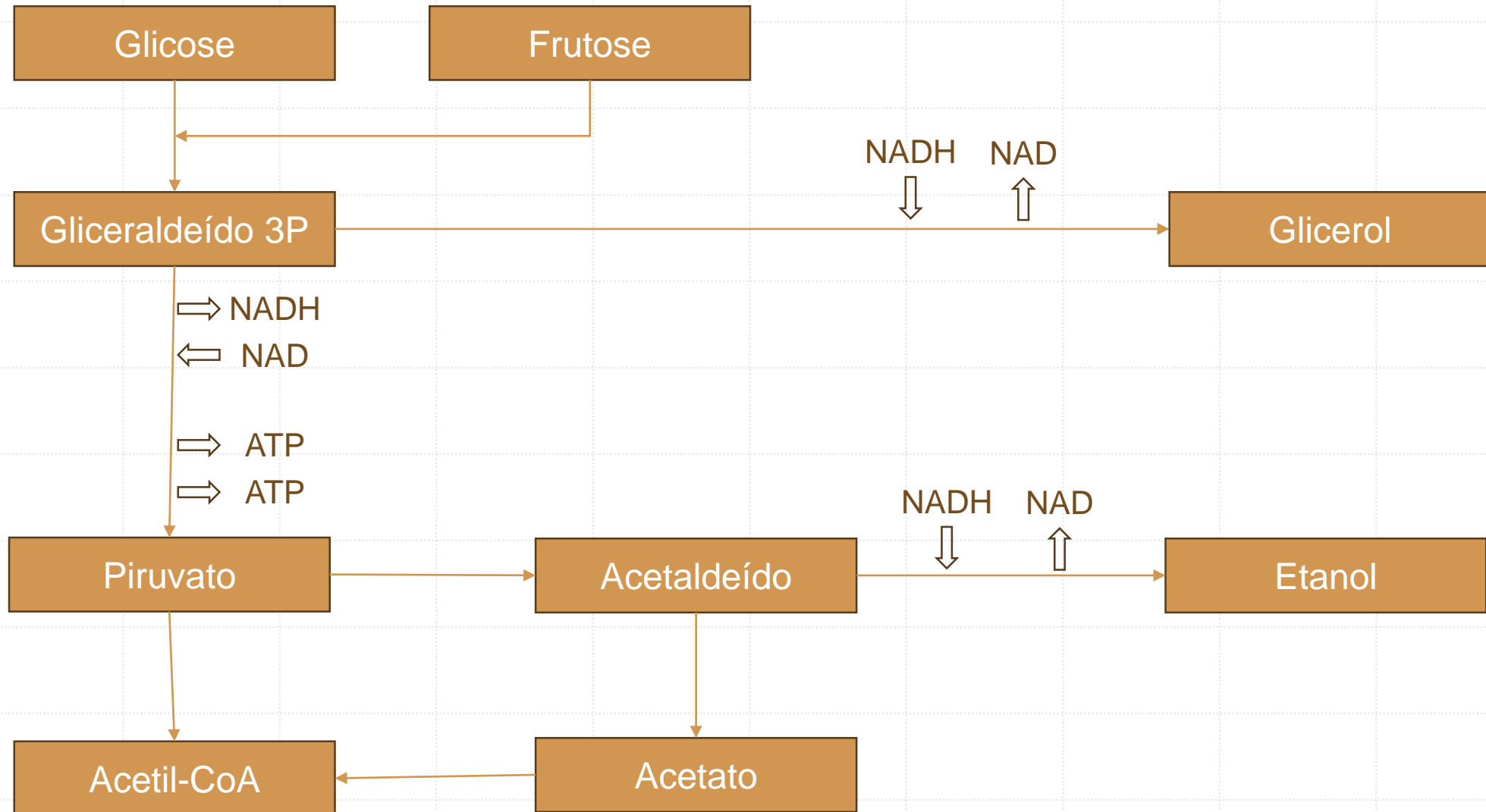
# FORMA DE CULTIVO DAS CÉLULAS DE LEVEDURA

- **AERÓBICO COM METABOLISMO PURAMENTE OXIDATIVO**
  - Produtos – dióxido de carbono, água, NAD e 38 ATP
  - Rendimento em células – 0,5 gMS/gART
  - Rendimento em etanol – 0 gEtanol/Gart
- **AERÓBICO COM TRANSBORDO METABÓLICO**
  - Produtos – Etanol, Dióxido de carbono, Água, NAD E ATP
  - Rendimento em células – 0,12 gMS/gART
  - Rendimento em etanol – 0,38 gETANOL/gART
- **ANAERÓBICO OU FERMENTAÇÃO**
  - Produtos – Etanol, Dióxido de carbono, NAD E ATP
  - Rendimento em células – 0,05 gMS/gART
  - Rendimento em etanol – 0,46 gETANOL/gART

# UTILIZAÇÃO DA ENERGIA PELA CÉLULA

- SÍNTESE DE MOLÉCULAS (CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO)
- TRANSPORTE (MEMBRANA)
- LOCOMOÇÃO (ENERGIA MECÂNICA)

# FLUXO METABÓLICO SIMPLIFICADO



# TIPOS DE METABÓLICOS

- **PRIMÁRIO**

- Associado ao crescimento celular
- Sua obtenção está vinculada a rota metabólica de produção de energia
- Se não houver aparecimento de produto não haverá crescimento celular

- **SECUNDÁRIOS**

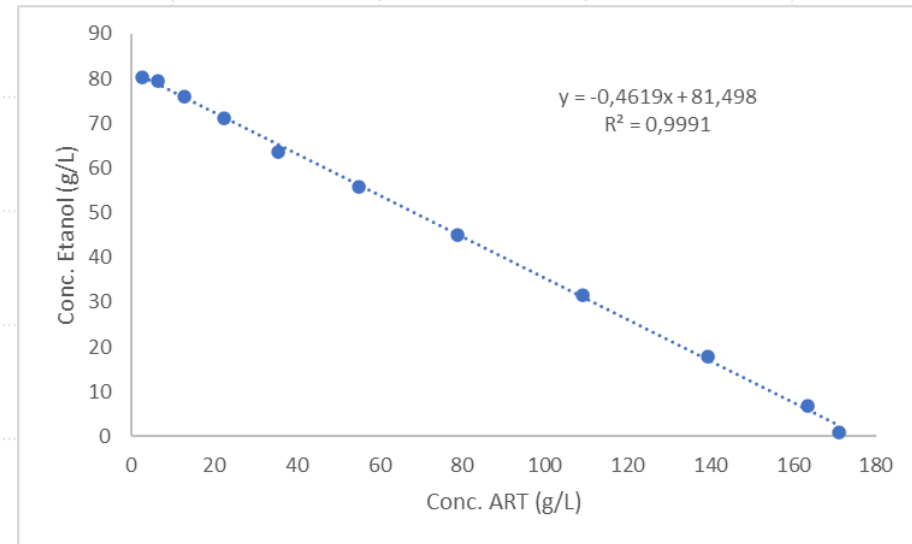
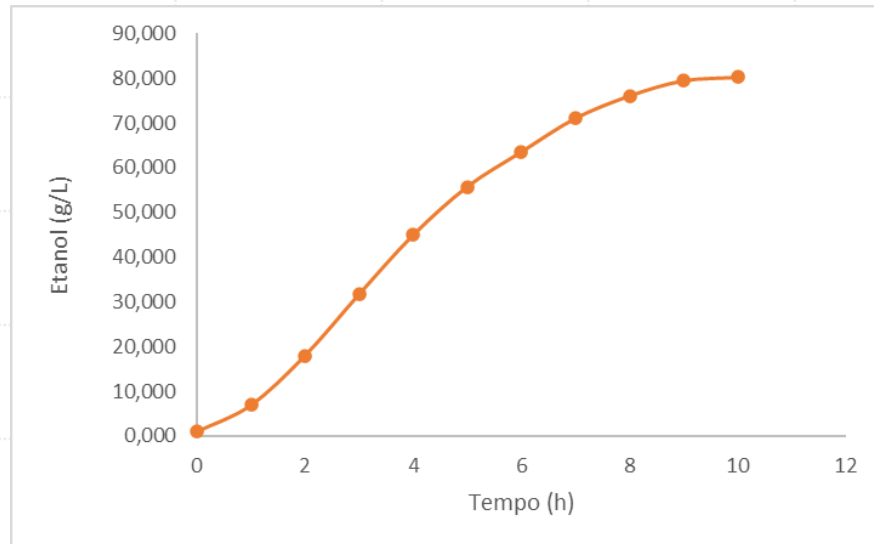
- Não associado ao crescimento celular
- Sua obtenção não está vinculada com a rota de produção de energia
- Exemplo: antibióticos



# ENSAIO EM BATELADA SIMPLES

- O que é batelada simples?
  - Uma forma de operação de um biorreator
  - O meio de fermentação é adicionado de uma só vez ao biorreator contendo o inóculo
- É interessante utilizar batelada simples em ensaios de fermentação?
  - Sim, pois, podemos estudar todas as fases do processo fermentativo, desde meios com alta concentração de substrato e baixa concentração de produto até meios esgotados com alta concentração de produto.
  - Permite obtenção de parâmetros com cálculos simples de balanço

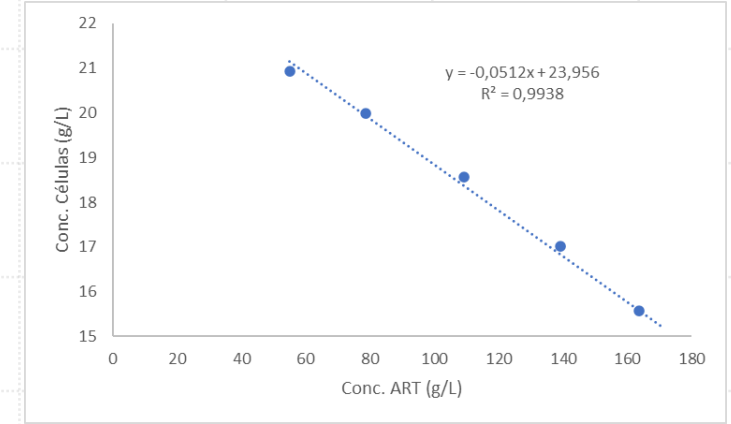
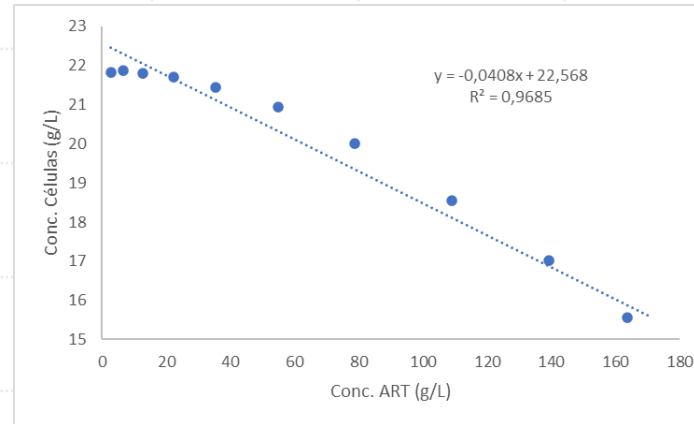
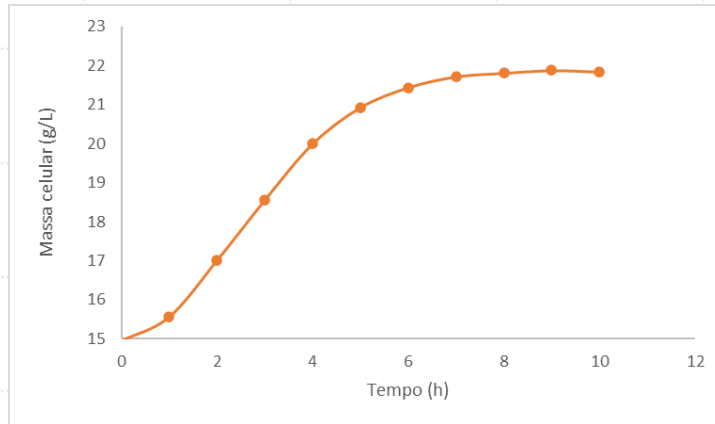
# COMPORTAMENTO DO RENDIMENTO FERMENTATIVO



$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}$$

$$\text{Tan}(\alpha) = \frac{CO}{CA} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \text{Inclinação da reta}$$

# COMPORTAMENTO DO RENDIMENTO EM CÉLULAS



$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

$$\text{Tan}(\alpha) = \frac{CO}{CA} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \text{Inclinação da reta}$$

$b =$  Coeficiente linear = Conc. Células p/ ART = 0 = 23,956 g/L

Conc. Células obtida ensaio = 21,838 g/L

Diferença = 2,118 g/L = massa de célula morta

# TIPOS DE MORTE CELULAR

- MORTE CELULAR

- Considera-se que uma célula morreu quando sua membrana se rompe

- ACIDENTAL

- Aquela causada por condições adversas no cultivo
- Principal causa de morte acidental: Temperatura elevada com concentração de etanol elevada – O etanol ataca a membrana celular

- PROGRAMADA

- As células mais velhas iniciam o processo de autólise para garantir que as mais jovens possam sobreviver
- Segunda causa de morte celular: células mantidas em meios com esgotamento nutricional (fim de fermentação)

# CONCLUSÃO

- O etanol é um metabólico primário
- O rendimento fermentativo é constante ao longo da fermentação
- Desta forma, o rendimento em célula deveria ser também, mas não é.
  - O rendimento em célula é constante e igual ao do início da fermentação
  - O que aumenta é a taxa de morte
- Isso é verdade, pois, o rendimento em etanol não aumenta no final da fermentação.
- Ter excesso de levedura no final da fermentação é sinal de taxa de morte baixa e fermentação saudável.
- A levedura não é capaz de definir entre uma produção maior ou menor de massa celular em uma mesma condição de crescimento.
- Não se perde rendimento em etanol devido a reprodução celular a não ser que se faça um crescimento aeróbico

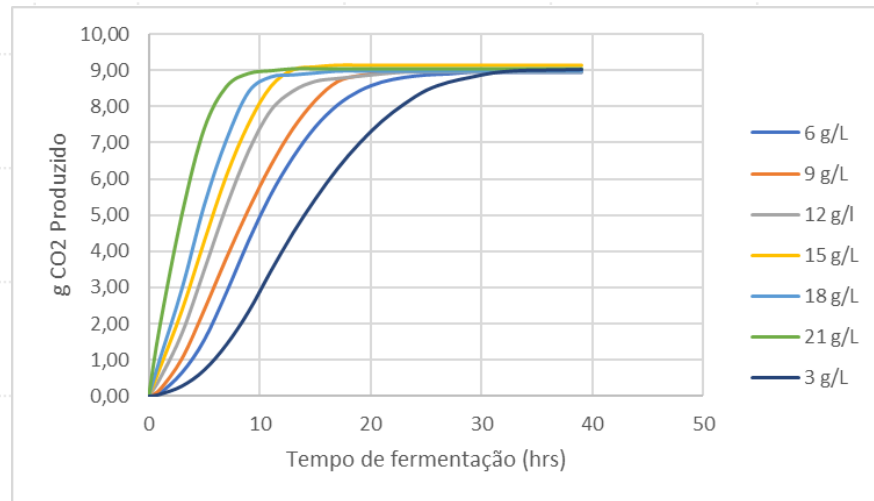
# CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO



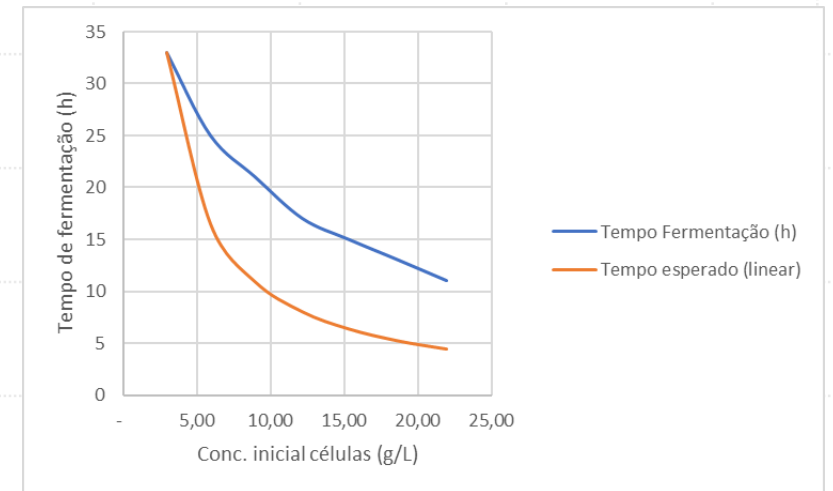
# INTRODUÇÃO

- As reações metabólicas das células de levedura que levam a formação de etanol são catalisadas por enzimas, então dependem:
  - Temperatura – pode ser controlada operacionalmente
  - pH – Controlado pelas células
- Além disto o que mais afeta a velocidade de conversão?
  - Quantidade de enzima – Concentração celular
  - Concentração de substrato – Maior, mais rápido
  - Concentração de etanol – vinculada a taxa de morte
  - Concentração celular – Auto regulação da glicolise

# FERMENTAÇÃO



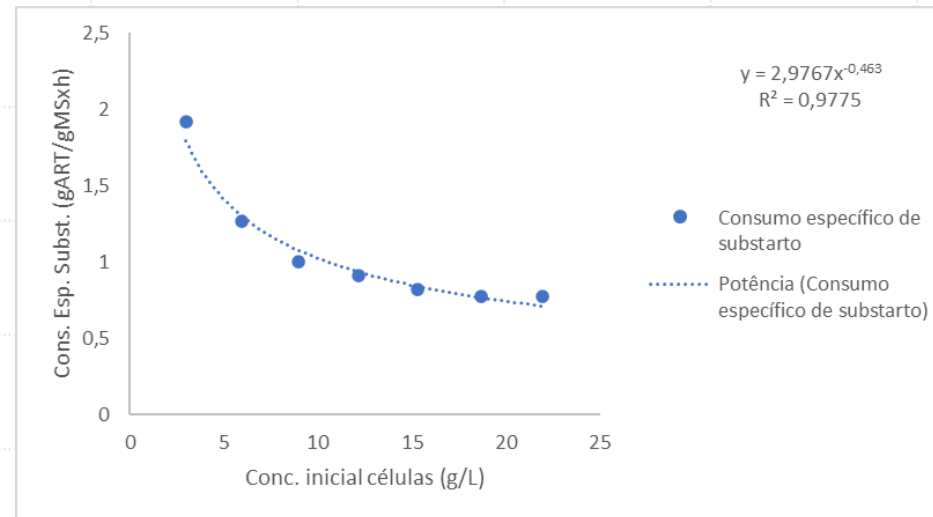
TEMPO DE FERMENTAÇÃO		
Conc. Inicial células (g/L)	Tempo Fermentação (h)	Tempo esperado (linear)
2,97	33	33,00
5,94	25	16,52
8,97	21	10,94
12,18	17	8,06
15,28	15	6,42
18,66	13	5,26
21,96	11	4,47



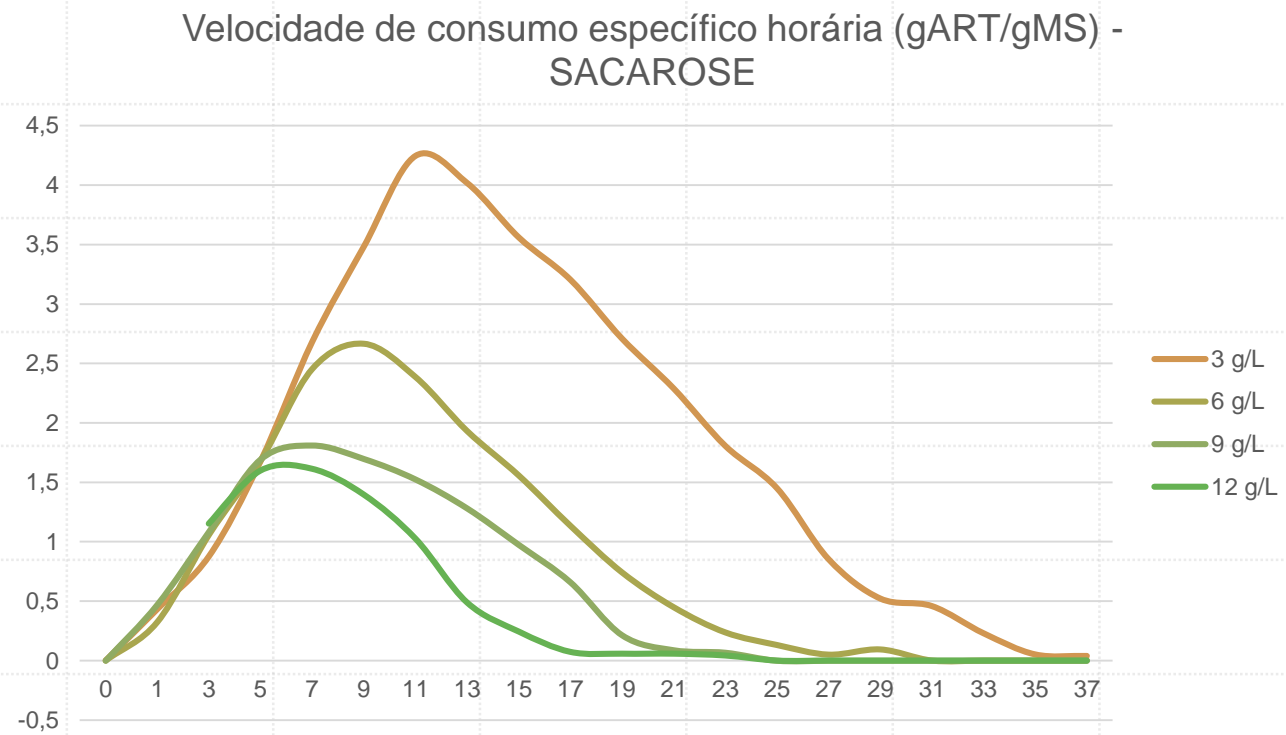


# FERMENTAÇÃO

Concentração de células (base vinho fermentado) (gMS/L)	Tempo de fermentação (hrs)	Consumo específico substrato (gART/gMSxh)
2,97	33,00	1,92
5,94	25,00	1,27
8,97	21,00	1
12,17	17,00	0,91
15,28	15,00	0,82
18,66	13,00	0,77
21,96	11,00	0,77



# FERMENTAÇÃO



# CONCLUSÃO

- A massa de células no meio fermentativo interfere significativamente no tempo de fermentação, mais células significa mais enzimas e menor tempo de fermentação
- No entanto, a queda no tempo de fermentação não é proporcional ao aumento da concentração de células, ou seja, dobrar a massa celular não implica em reduzir à metade o tempo de fermentação.
- Isto se deve ao fato de que o consumo específico de substrato diminuir de forma hiperbólica com o aumento da concentração celular, tendendo a um valor constante para concentrações muito elevada de células (superior a 18gMS/L)
- Esta limitação do valor CES aparentemente está ligado a auto regulação das células de levedura ou limitação de transferência de massa (ainda em avaliação)

# EFEITO DA VELOCIDADE DE ENCHIMENTO DAS DORNAS NA VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO E RENDIMENTO FERMENTATIVO



# PROCESSO BATELADA ALIMENTADA

## ▪ DESCRIÇÃO

- Após o inóculo ter sido adicionado ao fermentador inicia-se a alimentação do meio fermentativo

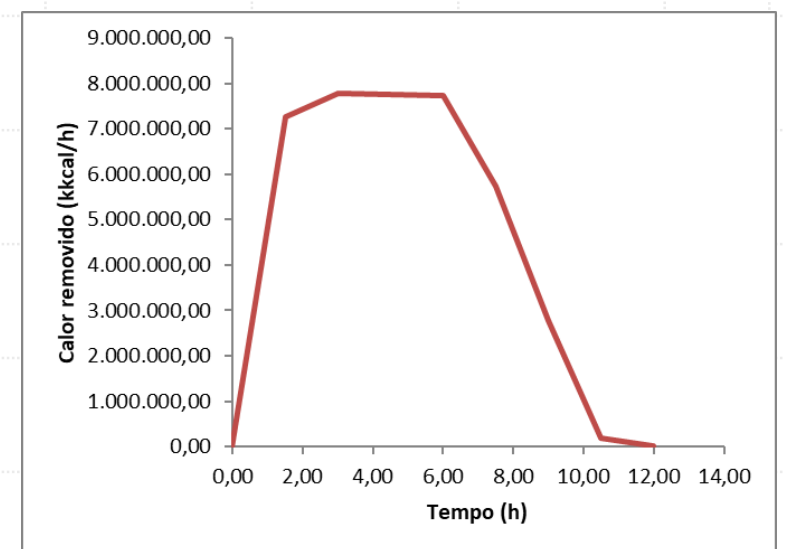
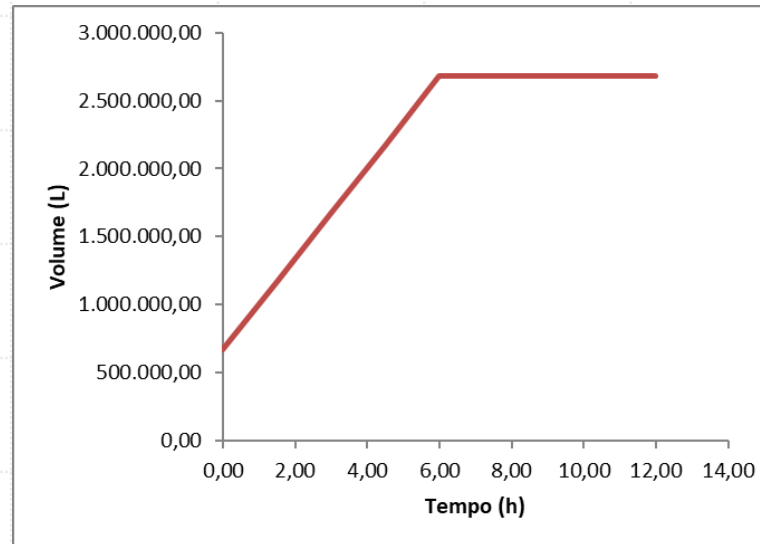
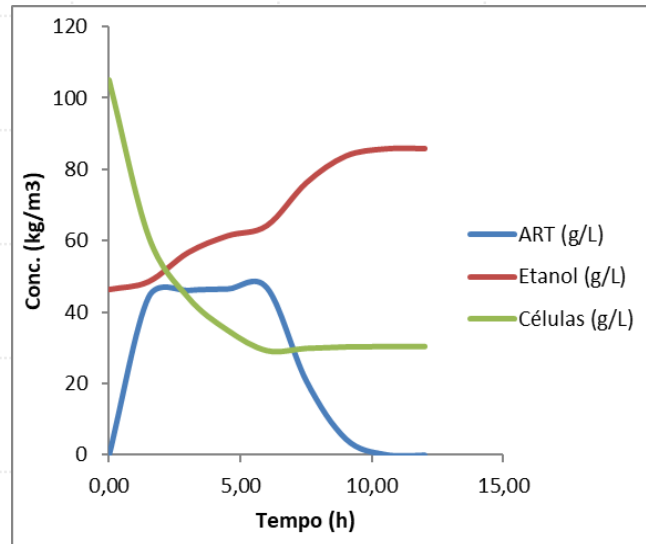
## ▪ QUANDO APLICAR

- Em processos onde se tem uma forte inibição pelo substrato
- Em processos onde se pretende controlar a velocidade de conversão das células para evitar saturação de rotas metabólicas com consequente desequilíbrio no potencial redox da célula.

## ▪ COMO ALIMENTAR

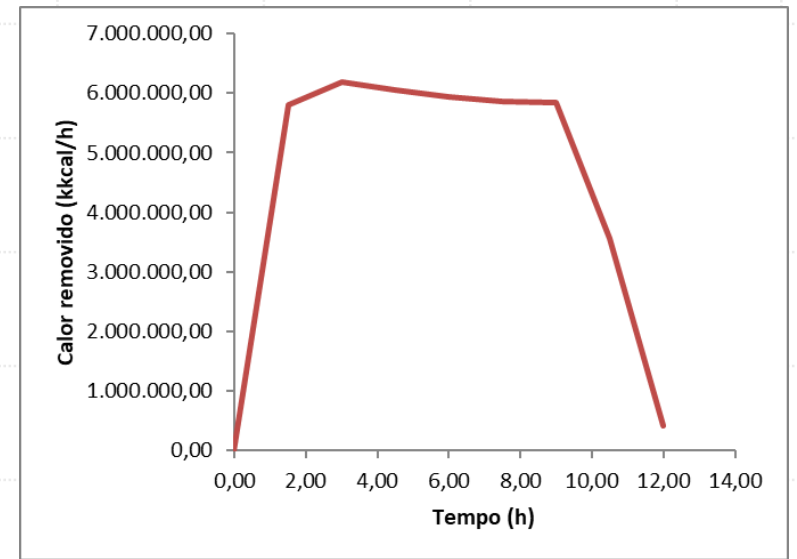
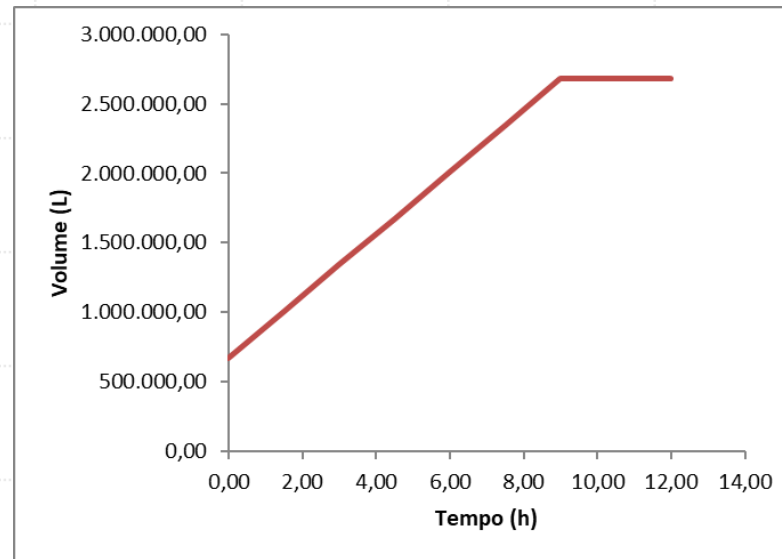
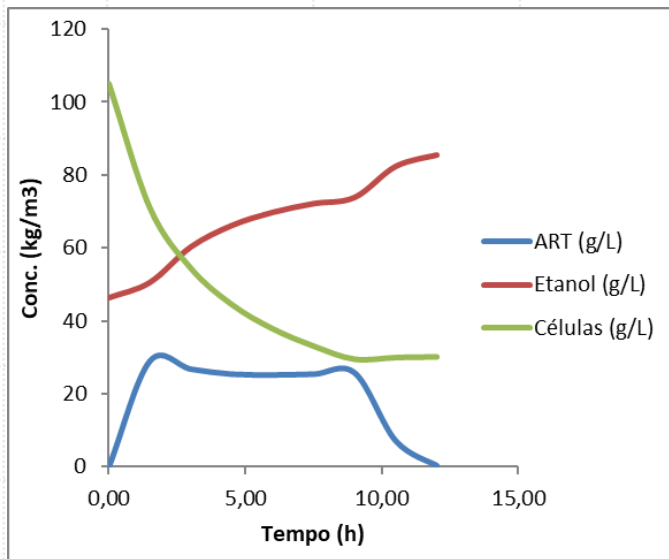
- De forma a manter a concentração de substrato no meio fermentativo constante.

# EXEMPLOS DE ENCHIMENTO DAS DORNAS



Tempo de fermentação = 10,72h  
Calor a ser removido máximo = 8.405 Mcal/h  
Conc. ART estabilidade = 46 g/L  
Tempo de enchimento = 6h

# EXEMPLOS DE ENCHIMENTO DAS DORNAS



Tempo de fermentação = 12,55h  
Calor a ser removido máximo = 6.283 Mcal/h  
Conc. ART estabilidade = 25 g/L  
Tempo de enchimento = 9h

# CONCLUSÃO PARA PRODUTIVIDADE

- Alimentação mais rápida leva a um tempo de fermentação menor, com liberação de calor mais concentrada, exigindo mais área de troca térmica.
  - Maior concentração de substrato, maior velocidade de conversão
  - As células de levedura não são inibidas pelo substrato (o fermento não afoga)
- O perfil de alimentação deve ser de vazão constante, pois, desta forma é possível manter constante a concentração de substrato no meio em fermentação.
  - Não é necessário ficar variando a vazão de alimentação e nem mesmo desenhar uma curva de alimentação complicada.



# OPERAÇÃO COM MEL E ÁGUA E CONCEITO DE BRUX DE ALIMENTAÇÃO MÁXIMO

- O brix de alimentação é uma função da concentração de etanol que se deseja no vinho fermentado
  - Depende de quanto de água foi adicionada à cuba (taxa de reciclo)
  - Quando se trabalha com mosto de mel e água, deve-se aumentar a quantidade de água adicionada ao fermento em tratamento e diminuir a água usada na diluição do mosto
  - O brix do mosto neste caso pode chegar a 40 se a quantidade de água adicionada ao fermento for suficiente para diluí-lo de forma a se atingir a concentração de etanol desejada
  - Assim, não tem limite para o brix de alimentação

# LIMITE DE BRUX NA DORNA DURANTE A ALIMENTAÇÃO

- Postulados antigos, da idade dos manuscritos do mar morto, limitavam o brix da dorna durante o enchimento em metade do brix do mosto + 1.
  - Se as células de levedura não são inibidas pelo substrato, não existe necessidade de se regular este brix
  - Esta instrução vem de tempos onde o caldo não era tratado e a alimentação das dornas seguiam a moagem. Muito caldo frio na dorna diminui a velocidade de fermentação, levando a aumento do tempo de fermentação
  - Além disto, nesta época a centrifugação era muito ruim devido a quantidade de sólidos insolúveis no vinho e a concentração de fermento nas dornas era baixa devido o descarte de fundo de dorna.
  - Serve como indicativo de baixa atividade do fermento em processo

# PRODUÇÃO DE SECUNDÁRIOS

- SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS

- Glicerol, ácidos orgânicos e outros

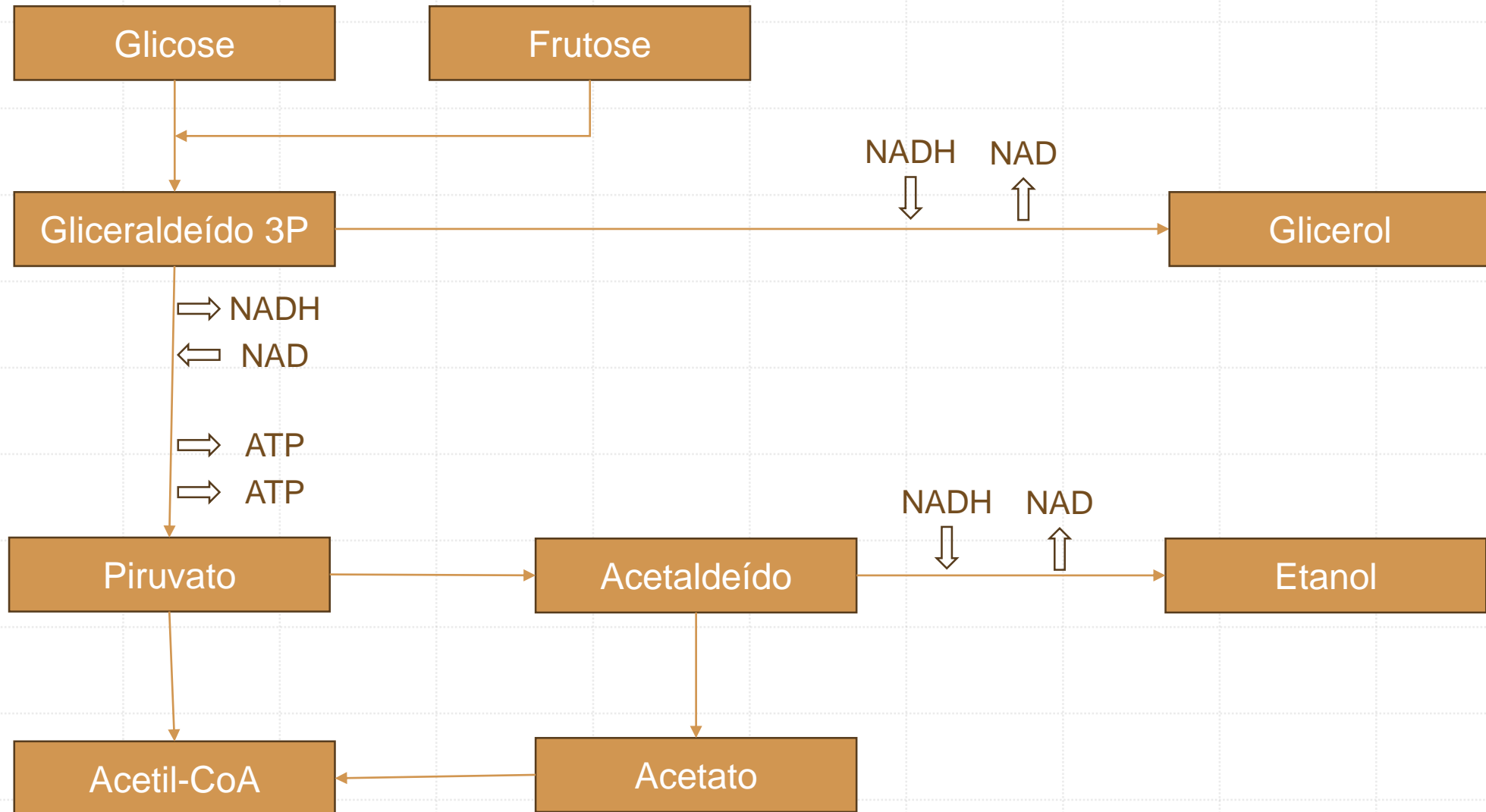
- GLICEROL

- Controla a pressão osmótica
- Controla o potencial redox das células (substitui o oxigênio em processos em anaerobiose)

- ÁCIDOS ORGÂNICOS

- Ácido acético – Desvio metabólico
- Ácido lático – eliminação não enzimática do fosforo do gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato para formação de metilglioxal, o qual é transformado em ácido lático e/ou propanodiol.

# FLUXO METABÓLICO SIMPLIFICADO



# CONCLUSÃO PARA RENDIMENTO FERMENTATIVO

- Alimentação mais rápida pode levar a um aumento na produção de secundários, tais como: glicerol e ácido láctico
  - Falta de NAD força a levedura a produzir mais glicerol
  - Maior concentração de gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato, aumenta a produção de metilglioxal e, portanto, maior produção de ácido láctico.
- Caso isto ocorra, teoricamente deve-se ter uma queda no rendimento fermentativo.
- Isto somente é verdade se a concentração de glicose e frutose no meio aumentar.
- Altas concentrações de células permitem alimentação mais rápida sem prejuízo ao rendimento desde que a concentração de glicose e frutose no meio permaneça baixa.



# CONTAMINAÇÃO – NOVO PONTO DE VISTA



# CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO

- Considerando que a dorna de fermentação é um ecossistema, temos que:
  - O controle de contaminação não se resume em eliminar as bactérias, mas sim em manter o equilíbrio do processo
  - Antes de eliminar as bactérias temos que cuidar das células de levedura
- Cuidados com a utilização de substância antimicrobiana de largo espectro para combater às bactérias, elas podem afetar as células de levedura
- O antibiótico deve ser usado com critério, somente quando o equilíbrio do processo for quebrado



OBRIGADO

[sr.Andrietta@gmail.com](mailto:sr.Andrietta@gmail.com)

19 9 8186 7229