



*Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas*

# dossiê técnico

## Biotecnologia na Produção de Alimentos

**Carolina Paz de Almeida**  
**Jéssica Cristina Rocha**  
**Juliana Sena Caritá**  
**Tamyres Martines de Almeida Souza**  
**Paulo Vitor dos Santos Souza**  
Universidade de São Paulo - USP





Serviço Brasileiro de **Respostas Técnicas**

# dossiê técnico

## Biotecnologia na Produção de Alimentos

O Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT fornece soluções de informação tecnológica sob medida, relacionadas aos processos produtivos das Micro e Pequenas Empresas. Ele é estruturado em rede, sendo operacionalizado por centros de pesquisa, universidades, centros de educação profissional e tecnologias industriais, bem como associações que promovam a interface entre a oferta e a demanda tecnológica. O SBRT é apoiado pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE e pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI e de seus institutos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia – IBICT.



TÊCPAR



FIERGS SENAI



SENAI



Ministério da  
Ciência, Tecnologia  
e Inovação

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA



Dossiê Técnico	ALMEIDA, Carolina Paz de ROCHA, Jéssica Cristina CARITÁ, Juliana Sena SOUZA, Tamyres Martines de Almeida SOUZA, Paulo Vitor dos Santos Biotecnologia na Produção de Alimentos Universidade de São Paulo - USP 16/12/2011
Resumo	Informações sobre aplicações da biotecnologia em processos fermentativos para produção de alimentos: microrganismos responsáveis pela fermentação, enzimas envolvidas em processos fermentativos, bebidas alcoólicas (cerveja e vinho), panificação, fermentação industrial (ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico), aminoácidos sintetizados por via fermentativa e outros alimentos produzidos através de processos fermentativos.
Assunto	FABRICAÇÃO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS NÃO ESPECIFICADOS ANTERIORMENTE
Palavras-chave	<i>Biotecnologia; fabricação; fermentação; produção do alimento</i>



Salvo indicação contrária, este conteúdo está licenciado sob a proteção da Licença de Atribuição 3.0 da Creative Commons. É permitida a cópia, distribuição e execução desta obra - bem como as obras derivadas criadas a partir dela - desde que dado os créditos ao autor, com menção ao: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - <http://www.respostatecnica.org.br>

Para os termos desta licença, visite: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
<b>2 BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS</b>	<b>4</b>
<b>3 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Fermentação Láctica</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Fermentação Cítrica</b>	<b>6</b>
3.2.1 Em superfície	7
3.2.2 Submerso	8
<b>3.3 Fermentação Butírica</b>	<b>9</b>
<b>3.4 Fermentação Alcoólica</b>	<b>9</b>
<b>3.5 Fermentação Acética</b>	<b>9</b>
<b>4 MICROORGANISMOS FERMENTADORES</b>	<b>9</b>
<b>4.1 Fungos</b>	<b>9</b>
<b>4.2 Bactérias</b>	<b>10</b>
<b>5 FABRICAÇÃO DE PÃO</b>	<b>10</b>
<b>5.1 Potencial de panificação da farinha de trigo</b>	<b>10</b>
<b>5.2 Características e funções dos ingredientes</b>	<b>11</b>
5.2.1 Água	11
5.2.2 Sal	11
5.2.3 Fermento	11
5.2.4 Aditivos	12
5.2.5 Enzimas em panificação	12
5.2.6 Amilases	12
5.2.7 Proteases	13
<b>5.3 Processamento do pão</b>	<b>13</b>
5.3.1 Misturas	13
5.3.2 Fermentação principal	13
5.3.3 Divisão	13
5.3.4 Boleamento	14
5.3.5 Fermentação secundária	14
5.3.6 Moagem	14
5.3.7 Fermentação final	14
5.3.8 Cozimento	14
5.3.9 Resfriamento	14
<b>6 FABRICAÇÃO DE VINHO</b>	<b>14</b>
<b>6.1 Composição do vinho</b>	<b>15</b>
<b>6.2 pH</b>	<b>15</b>
<b>6.3 Microbiologia do vinho</b>	<b>15</b>
6.3.1 Sucessão de espécies de levedura durante a vinificação	15
6.3.2 Leveduras de contaminação	16
<b>6.4 Fermentações</b>	<b>16</b>
6.4.1 Fermentação alcoólica	16
6.4.2 Fermentação malolática	17
<b>6.5 Alterações no vinho</b>	<b>17</b>
6.5.1 Alterações microbianas	17
6.5.2 Alteração enzimática	18
6.5.3 Alterações químicas	18
<b>7 FABRICAÇÃO DE CERVEJA</b>	<b>18</b>
<b>7.1 Matérias-primas</b>	<b>19</b>
7.1.1 Malte	19
7.1.2 Adjuntos	19

7.1.3 Lúpulo ( <i>Humulus lupulus</i> ) .....	19
<b>7.2 Leveduras e bactérias .....</b>	<b>19</b>
7.2.1 Classificação.....	19
7.2.2 Seleção de levedura cervejeira .....	20
7.2.3 Cultivo puro.....	20
7.2.4 Leveduras selvagens .....	20
7.2.5 Bactérias contaminantes.....	20
<b>7.3 Processamento .....</b>	<b>20</b>
<b>7.4 Fermentação .....</b>	<b>20</b>
<b>7.5 Maturação.....</b>	<b>21</b>
<b>8 FABRICAÇÃO DE VINAGRE.....</b>	<b>21</b>
8.1 Matérias-primas .....	21
8.2 Utilização de microorganismos na fabricação de vinagre .....	22
8.3 Contaminantes.....	22
<b>9 FABRICAÇÃO DE QUEIJOS E LEITES FERMENTADOS .....</b>	<b>22</b>
9.1 A produção de laticínios .....	22
9.2 Microrganismos e enzimas .....	23
9.3 Queijos .....	23
9.3.1 Matéria prima e ingredientes.....	23
9.3.2 Processo de fabricação de queijos.....	24
9.3.3 Leites fermentados .....	24
9.3.4 Iogurte .....	25
<b>10 APLICAÇÃO DE ENZIMAS NAS TECNOLOGIAS DE ALIMENTOS.....</b>	<b>25</b>
10.1 Uso de enzimas em panificação .....	25
10.2 Uso de enzimas na indústria de sucos e de frutas.....	25
10.3 Uso de enzimas na modificação de proteínas .....	25
10.4 Uso de enzimas na indústria de laticínios .....	26
10.4.1 Enzimas coagulantes .....	26
10.4.2 Hidrólise da lactose.....	26
10.4.3 Outras enzimas.....	26
10.4.4 Uso de enzimas em bebidas alcoólicas.....	26
10.4.5 Aplicação de enzimas diversas .....	27
<b>11 PROTEÍNAS DE ORIGEM MICROBIANA.....</b>	<b>27</b>
11.1 Bactérias.....	28
11.2 Fungos.....	28
11.3 Leveduras.....	28
<b>12 PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR MICROORGANISMOS.....</b>	<b>28</b>
12.1 Bactérias.....	28
12.2 Fungos.....	29
12.3 Leveduras.....	29
12.4 Matérias-primas .....	29
12.5 Substratos, nutrientes, separação dos lipídeos e extração da gordura .....	30
<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>

## Conteúdo

### 1 INTRODUÇÃO

Abrangendo diferentes áreas do conhecimento, incluindo a ciência básica e a aplicada, a biotecnologia é uma tecnologia que permite o uso de agentes ou sistemas biológicos para a produção industrial e realização de serviços.

A biotecnologia utiliza a matéria viva para degradar, sintetizar e produzir materiais (bioconversões, biossíntese), com a finalidade de uma atividade agrônômica ou industrial que tenha uma boa factividade e um bom rendimento econômico. Emprega largamente as enzimas livres ou fixas, os microorganismos e as estruturas subcelulares ativas (biocatalisadores). Caracteriza-se por seu aspecto interdisciplinar e sistêmico, sendo um ponto de encontro de ciências como: química, bioquímica, engenharia enzimática, engenharia química e industrial, microbiologia, engenharia genética, engenharia microbiológica, matemática, informática, automação, engenharia clássica, pesquisa em economia (alto valor agregado), além de ser formação básica e contínua de engenheiros e técnicos (RENÉ, 1985).

Atualmente, por se tratar de uma coleção de tecnologias diversas, a biotecnologia é a responsável pela produção de plantas resistentes às doenças, plásticos biodegradáveis, detergentes mais eficientes, biocombustíveis, processos industriais menos poluentes, menor necessidade de pesticidas, biorremediação de poluentes e também centenas de testes de diagnósticos e medicamentos novos (VICENZI, 2011).

### 2 BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS

O emprego de microorganismos no preparo de alimentos está intimamente relacionado com a microbiologia industrial, ciência que trata de possíveis utilizações dos microorganismos em processos industriais, ou em processos nos quais suas atividades podem se tornar de significância industrial (VICENZI, 2011).

Desde os tempos mais longínquos, o homem utilizou microorganismos para preparar bebidas, alimentos e vestimentas, muito antes que a existência deles tivesse sido reconhecida e estudada no século XIX. A descoberta dos processos fermentativos é um acontecimento que ocorreu várias vezes em momentos diferentes da história da humanidade. A fermentação trazia duas vantagens fundamentais: uma era a eliminação das substâncias tóxicas de alguns grãos, e a outra, a preservação dos alimentos (VICENZI, 2011).

Fermentação é um termo que deriva do latim *fervere* (ferver), decorrente do aparecimento de bolhas ocasionado pela produção de dióxido de carbono resultante da ação de microorganismos (leveduras ou bactérias) sobre o material orgânico. Microorganismos diferentes correspondem a fermentações diferentes (VICENZI, 2011).

Alimentos fermentados são definidos como aqueles alimentos sujeitos à ação de microorganismos ou enzimas, para que mudanças bioquímicas desejáveis causem modificações significativas nos mesmos. Pela fermentação, os alimentos tornam-se mais nutritivos, aumentam a digestibilidade e a palatabilidade, além de serem mais seguros ou adquirirem um odor melhor. A fermentação é um processo de preservação relativamente eficiente, de baixa energia, que aumenta a vida do produto e reduz a necessidade de refrigeração ou outras operações de energia intensiva para a preservação dos alimentos (MALAJOVICH, 2011).

A aquisição de conhecimentos sobre os microorganismos e as enzimas possibilitou, a partir da segunda metade do século XIX, o desenvolvimento da indústria de alimentos. Esta soube se apropriar de todas as ciências relacionadas (microbiologia, bioquímica, engenharia química, automação etc.) (MALAJOVICH, 2011).

Os alimentos fermentados constituem hoje a terceira parte da dieta humana. Seja por facilitar a assimilação dos nutrientes, seja por apresentar menos substâncias tóxicas e boa parte desses alimentos entram na categoria dos denominados alimentos funcionais, isto é, alimentos que trazem benefícios extras, além dos que seriam esperados em função dos componentes (MALAJOVICH, 2011).

Afora os produtos de panificação, as bebidas alcoólicas e os laticínios, existem muitos outros tipos de alimentos fermentados. Alguns são de origem animal (pescado, embutidos e presuntos), mas a maioria é de origem vegetal, tanto no Ocidente (chucrute, pickles, azeitonas, café, cacau, chá) como no Oriente (*shoyu, misó, tempeh, kimchi*, etc.) e na África (*gari, kokonteoulafun, agbelima, togwa, kenkey*, etc.) (MALAJOVICH, 2011).

### Áreas de aplicação da fermentação na indústria de alimentos

- Massas fermentadas (pão, panetone);
- Carnes fermentadas (salame, linguiça);
- Bebidas fermentadas (cerveja, vinho);
- Bebidas destiladas (conhaque, aguardente);
- Leite fermentado (iogurte, queijo);
- Enzimas (proteases, amilases, glicose oxidase);
- Condimentos (vinagre, glutamato);
- Aminoácidos (lisina, ácido glutâmico);
- Polissacarídeos (dextrano) (VICENZI, 2011).

## 3 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

É um processo anaeróbio de transformação de uma substância em outra, produzida a partir de microorganismos, tais como bactérias e fungos, denominados fermentos (FERREIRA, 2007).

Segundo Ferreira (2007), há dois tipos de fermentação:

- Fermentação aeróbica: ocorre na presença de oxigênio do ar. Exemplo: fermentação do ácido cítrico e da penicilina.
- Fermentação anaeróbica: ocorre na ausência de oxigênio. Exemplo: na fermentação da cerveja, do vinagre, do iogurte, do vinho e até em câimbras (ácido láctico).

### 3.1 Fermentação Láctica

Trata-se de uma oxidação anaeróbica parcial de carboidratos com a produção final de ácido láctico, além de várias outras substâncias orgânicas. As bactérias utilizadas industrialmente são as anaeróbicas e microaerófilas, para a produção de alguns tipos de ácido ou para a produção de alimentos. Os fungos também são usados na produção de ácidos por via fermentativa (FERREIRA, 2007).

O ácido láctico, na indústria de alimentos, é utilizado para a fabricação de sucos, refrigerantes, iogurtes e conservação de carnes. Para a produção do ácido láctico são escolhidas, preferencialmente, as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*. É possível utilizar as duas ou escolher uma delas (CAPELLARI, 2010). Segundo Ferreira (2007), a escolha depende do carboidrato aplicado como reagente e da temperatura que será empregada:

- *Lactobacillus delbrueckii*: temperatura na faixa de 45 - 50°C;
- *Streptococcus/ actis*: temperatura de aproximadamente 30°C;
- *Lactobacillus bulgaricus*: catalisador quando lactose é utilizada como substrato (FERREIRA, 2007).



Figura 1 - *Lactobacillus*  
Fonte: (CATALICE, 2011)

Para a fermentação industrial são usados tanques de aço inoxidável. Na sua parte inferior há um tubo que auxilia na injeção de vapor, que serve como regulador da temperatura. O ácido láctico é altamente corrosivo, portanto são necessários alguns cuidados. O tântalo e a prata resistem ao ácido láctico, apesar do alto custo; já o níquel também resiste bem e possui custo menor (FERREIRA, 2007).

Na produção, a temperatura deve ser mantida em torno de 43°C e o tempo de fermentação é de 42 horas. A cada 6 horas é inserida uma suspensão de hidróxido de cálcio a fim de se controlar o valor de pH (faixa favorável em torno de 5,0 – 5,8). O pH deve ser constante durante todo o experimento, pois o aumento da acidez leva a inibição do processo de fermentação (FERREIRA, 2007).

É importante que ao final da fermentação alguns cuidados sejam tomados. O primeiro é aquecer o material até 82°C com o objetivo de destruir os microorganismos. Se a matéria-prima tiver sido soro de leite, a temperatura atingida deve ser de 96°C para que a lactalbumina produzida seja precipitada. O próximo passo é elevar o pH do meio em torno de 12, com lixívia de cálcio, e aquecer em fogo brando por 20 a 30 minutos. Esse processo ocasiona a precipitação do lactato de cálcio que pode ser separado por filtração (FERREIRA, 2007).

### 3.2 Fermentação Cítrica

O ácido cítrico, atualmente é obtido por oxidação parcial aeróbica de carboidratos (principalmente sacarose) e pela ação de certos fungos, entre os quais *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *Mucor spp.*, etc. É muito utilizado nas indústrias de alimentos, refrigerantes, medicamentos, tintas e outras. Antigamente era extraído de frutos cítricos (FERREIRA, 2007).



Figura 2 - *Aspergillus niger*

Fonte: (TOMÉ; MARQUES, 2011)

Na indústria alimentícia, o ácido cítrico é usado como acidulante, agente intensificador de sabor, antioxidante em óleos e gorduras, agente tamponante em geleias e gelatinas e estabilizante. Também é usado como antibacteriano, pois além de acidificar o meio, apresenta ação quelante de íons cálcio. Atualmente, a produção se dá por fermentação aeróbia realizada por fungos da espécie *Aspergillus niger*. De acordo com Ferreira (2007), para que isso ocorra, existem mais de um processo:

### 3.2.1 Em superfície

- Meio de cultura sólido

Também chamado de Processo *Koji*, consiste no desenvolvimento do fungo em superfícies sólidas, com teor de umidade de cerca de 70%. São bastante utilizados resíduos agroindustriais, como cascas e bagaços, o que torna este processo muito importante (FERREIRA, 2007).

Primeiramente, o substrato deve ser esterilizado e tem seu pH ajustado na faixa de 4,5 a 6,0. Quando o farelo está numa temperatura de 30 a 36°C, é inoculado com esporos de uma cepa específica de *A. niger* e o preparado *Koji* (que contém amilases e proteases) são colocados em um biorreator, normalmente em bandejas (com profundidade de 3 a 5 cm), para aumentar a superfície de contato com o ar. A temperatura deve ser mantida entre 28 e 30°C com um tempo de fermentação de 4 a 6 dias. Para aumentar a produção, pode-se adicionar de 3 a 7 % de massa filtrada (*filtercake*) de fermentação de ácido glutâmico (FERREIRA, 2007).

Depois do tempo necessário, ele é recolhido, colocado em percoladores e o ácido cítrico é extraído com água. Porém, apresenta algumas limitações para a utilização industrial: dificuldade de remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria; tipos de substratos limitados e a dificuldade de se medir parâmetros como pH, oxigênio dissolvido; quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido. Industrialmente, a matéria-prima mais utilizada nesse processo é o farelo de trigo (FERREIRA, 2007).

- Meio de cultura líquido

Nesse processo, a fermentação ocorre na superfície de meios líquidos. Foi a primeira técnica a ser desenvolvida e é utilizada devido a sua facilidade de operação e instalação, e também por apresentar baixo custo energético (FERREIRA, 2007).

Inicialmente, é necessária a inoculação com *A. niger* do mosto (líquido com grande quantidade de açúcares, como o sumo das frutas), e este preparado é distribuído em bandejas rasas feitas de alumínio com alto teor de pureza ou de aço inoxidável. Durante 5 a 6 dias, sopra-se ar úmido sobre o mosto, sendo utilizado depois o ar seco. Os esporos começam a germinar dentro de 24 horas e o micélio cobre a superfície do mosto (FERREIRA, 2007).

Após oito ou dez dias, há uma redução da concentração de açúcares no mosto de 20 a 25% (inicial) para 1 a 3% (final). Quando a fermentação terminar, o mosto pode ser drenado e substituído por outro novo (FERREIRA, 2007).

Para esse caso, devem ser tomados os cuidados necessários que garantam que o micélio continue flutuando sobre a superfície (se ele for submerso, torna-se inativo). Isso faz com que o tempo do ciclo de fermentação seja reduzido (já que o período inicial de crescimento de três dias, no qual a produção de ácido cítrico é pequena, estará sendo eliminado). Contudo, não é recomendado esse método para produção em larga escala (FERREIRA, 2007).

A matéria-prima mais comum para formação do o mosto é o melaço de cana e de beterraba, que contém de 50 a 60% de sacarose e que não pode ser removida por simples cristalização (FERREIRA, 2007).

Como a concentração de íons metálicos interfere no rendimento da fermentação, estes devem ser removidos ou ter a sua concentração reduzida, quando estiverem presentes em quantidades indesejáveis no mosto (por adsorção com uma combinação de  $\text{CaCO}_3$ , sílica gel, fosfato de cálcio e amido). O pH do meio de cultura para a produção de ácido cítrico é usualmente de 5 a 6 (faixa inicial), caindo na fase de germinação do esporo rapidamente para a faixa de 1,5 a 2,0 devido à remoção de íons amônio do meio. Se aumentar ou for ajustado para aproximadamente 3,5 depois da mudança inicial, ocorre a formação de ácido oxálico no micélio que, às vezes, é excretado para o meio e dificulta a purificação do ácido cítrico. A produção nesse processo é de aproximadamente 80 a 85% da massa de carboidratos inicialmente fornecida (FERREIRA, 2007).

### 3.2.2 Submerso

Esse processo é o mais utilizado industrialmente, devido a requerer um espaço pequeno, menos mão-de-obra e alta taxa de produção. A fermentação é realizada em fermentadores aerados do tipo torre ou STR (*Sterred Tank Reactor* – Reatores agitados mecanicamente), feitos de aço inoxidável para impedir a lixiviação de metais pesados que interfiram na produção de ácido (FERREIRA, 2007).

Como matéria-prima fonte de carboidratos, é recomendado utilizar açúcares como glicose e sacarose em concentrações 120 a 250g/L, pois, devido a sua fácil metabolização, favorecem a obtenção de melhores rendimentos e taxas de produção. O meio de cultura deve então ser esterilizado, através da passagem de vapor com fluxo turbulento em tubos de trocadores de calor com camisas de vapor, e imediatamente resfriado, até aproximadamente 30°C, em outro trocador de calor (FERREIRA, 2007).

A composição do meio de cultivo deve ser analisada quanto à presença de certos íons, pois a falta ou excesso destes podem afetar a produção de ácido cítrico. Em particular, a concentração de manganês, ferro, cobre e zinco deve ser controlada rigidamente (FERREIRA, 2007).

Na sequência é feito o inóculo, em que se utilizam esporos de uma cepa adequada de *A. Niger*, crescida em meio nutriente sólido. Caso o meio contenha uma quantidade de ferro muito baixa, deve-se suprir essa deficiência, até que se atinja uma faixa de 0,1 a 0,2mg/L. O pH deve ser ajustado antes da inoculação com íon de amônio para aproximadamente 4,0 (FERREIRA, 2007).

Durante a fermentação, o pH muda rapidamente para a faixa de 1,5 a 2,0. Pouco ácido cítrico é formado antes do pH atingir esse nível. A aeração da cultura submersa deve ser contínua na taxa de 0,5 a 1,15 v/v de solução por minuto e não pode ser interrompida, pois mesmo um breve lapso no suprimento de ar pode cessar o processo por vários dias. A agitação mecânica não é necessária. Agentes antiespumantes (livres de ferro, cobalto ou níquel) devem ser adicionados para evitar perdas devidas ao excesso de espuma. Os fermentadores de aço comum têm de ser adequadamente revestidos para evitar a contaminação com íons metálicos (FERREIRA, 2007).

Para extração do ácido cítrico, o meio filtrado deverá ser submetido à outra filtração, caso esteja turvo devido à presença de resíduos de anti-espumante, de micélio ou de oxalato. O citrato é precipitado da solução por adição de suspensão de hidróxido de cálcio (que deverá ter um baixo teor de magnésio para não haver formação de citrato de magnésio, solúvel em água). Em seguida, o citrato de cálcio é filtrado e a massa transferida para um tanque, onde ela vai ser tratada com ácido sulfúrico para precipitar o sulfato de cálcio. O sobrenadante contendo o ácido cítrico é purificado por tratamento com carvão ativado e desmineralizado por sucessivas passagens através de colunas com resina de troca iônica, sendo, então, a solução purificada e cristalizada por evaporação, com os cristais removidos por centrifugação (FERREIRA, 2007).

### 3.3 Fermentação Butírica

Geralmente está associada ou ocorre depois da fermentação láctica. É a reação química realizada por bactérias anaeróbias, através da qual se forma metabolicamente o ácido butírico acético, fórmico, CO<sub>2</sub>, alcoóis e etc. (FERREIRA, 2007).

Este processo foi descoberto por Louis Pasteur em 1861. É realizado por bactérias do gênero *Clostridium* e se caracteriza pelo surgimento de odores pútridos e desagradáveis (FERREIRA, 2007).

### 3.4 Fermentação Alcoólica

É o processo através do qual certos carboidratos, principalmente a sacarose, glicose e frutose, são transformados em álcool etílico (ou etanol) (FERREIRA, 2007).



Figura 3 - *Saccharomyces cerevisiae* em uma placa com meio de cultura  
Fonte: (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2004)

Leveduras e algumas bactérias, destacando-se os chamados “fungos de cerveja” da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são os responsáveis por esta reação. Utilizam-se os dois produtos dessa fermentação: o álcool etílico empregado há milênios na fabricação de bebidas alcoólicas (vinhos, cervejas, cachaças etc.), e o gás carbônico importante na fabricação do pão, um dos mais tradicionais alimentos da humanidade. Mais recentemente têm-se utilizado esses fungos para a produção industrial de álcool combustível (FERREIRA, 2007).

### 3.5 Fermentação Acética

Consiste na oxidação parcial aeróbica do álcool etílico, com produção de ácido acético. É realizada por bactérias denominadas acetobactérias, produzindo ácido acético e CO<sub>2</sub>, sendo que as espécies mais comuns são: *Acetobacteraceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter schützenbachii* e *Gluconobacter oxydans*. As bactérias acéticas constituem um dos grupos de microrganismos de maior interesse econômico, devido a sua função na produção do vinagre e pelas alterações que provocam nos alimentos e bebidas. Esse processo é utilizado na produção de vinagre comum, do ácido acético industrial, na deterioração de bebidas de baixo teor alcoólico e na de certos alimentos (FERREIRA, 2007).

## 4 MICROORGANISMOS FERMENTADORES

### 4.1 Fungos

Os fungos são os principais decompositores da biosfera, degradando os compostos orgânicos e reciclando carbono, nitrogênio e outros compostos do solo e do ar (FERREIRA, 2007).

Muitos deles são economicamente importantes para o homem como destruidores de alimentos estocados e outros materiais orgânicos. O reino também inclui leveduras, *Penicillium* e outros produtores de antibióticos, além de fermentadores de queijos e cogumelos comestíveis (FERREIRA, 2007).

São os responsáveis por mofar pães, estragar sapatos e tingir paredes com manchas verdes. Ao mesmo tempo, são fontes de remédios, sobretudo antibióticos, e provocadores de doenças. Também são mundialmente consumidos na forma de pratos nobres, como as trufas e o *champignon* (FERREIRA, 2007).

## 4.2 Bactérias

Algumas bactérias necessitam de oxigênio (aeróbias) e outras não (anaeróbias) e muitas podem adaptar-se à presença ou ausência desse gás (anaeróbias mistas ou facultativas). A maioria das bactérias são parasitas ou saprófitas e algumas são autotróficas (FERREIRA, 2007).

Sua riqueza enzimática lhes confere intensa atividade bioquímica: degradação de substâncias orgânicas, produção de gases, pigmentos e toxinas (exotoxinas e endotoxinas), além de criarem depósitos de ferro ou enxofre. Sua proliferação só é possível em certos limites de temperatura (FERREIRA, 2007).

Devido à sua vasta ação sobre a matéria, as bactérias são os agentes das fermentações e das putrefações, transformam as substâncias orgânicas do solo em substâncias minerais e em gases, fixando também os gases do ar e enriquecem o solo de nitrogênio, fornecendo aos vegetais uma parte dos alimentos inorgânicos de que necessitam e interferindo também na digestão intestinal de muitos animais superiores. Algumas são patogênicas para o homem e animais, atuando pelas toxinas e pela perturbação digestiva que acarretam. Outras são comensais dos meios internos do homem e de animais, podendo até mesmo intervir em seu metabolismo (FERREIRA, 2007).

Quanto às bactérias do solo, a maioria delas assegura a mineralização dos excrementos e de espécies mortas (nitrificação), fechando assim os ciclos bioquímicos, enquanto algumas espécies (bacilos tetânicos, botúlico, perfringente, etc.) podem tornar-se patógenas. As bactérias também têm contribuído para a formação de rochas combustíveis (carvão, petróleo) (FERREIRA, 2007).

## 5 FABRICAÇÃO DE PÃO

Apesar de alguns padeiros conservarem a prática da fermentação natural, os processos artesanais estão desaparecendo, sendo substituídos pela tecnologia da panificação industrial. Prepara-se a massa misturando farinhas de um ou mais tipos, além de água, leveduras e diversos aditivos: emulsificadores, agentes oxidantes e redutores, enzimas ( $\alpha$ -amilases, hemicelulases, lipases etc.) e aceleradores da fermentação (AQUARONE et al., 2002).

O processo envolve três etapas de fermentação, durante as quais o  $\text{CO}_2$  liberado forma bolhas que, retidas na massa, aumentam o seu volume. Entre uma e outra etapa, a massa é dividida e boleada, facilitando a redistribuição dos ingredientes e o desenvolvimento das características organolépticas. A moldagem visa o alinhamento das fibras protéicas do glúten. Durante a cocção, a mistura etanol-água se transforma em vapor e a crosta adquire uma cor dourada. A seguir, os pães são cortados e embalados (AQUARONE et al., 2002).

### 5.1 Potencial de panificação da farinha de trigo

Para a produção de pão com boas características de volume, uniformidade e cor, é recomendado o uso de farinha de trigo com elevado potencial de panificação. Os fatores de qualidade da farinha de trigo podem ser divididos em (AQUARONE et al., 2002):

- Inerentes ao trigo e que resultam da composição genética e das condições de crescimento da planta (AQUARONE et al., 2002);
- Dependentes do processo de armazenamento e moagem do trigo em farinha (AQUARONE et al., 2002).

Durante o processo de mistura, as proteínas insolúveis (gliadinas e gluteninas) da farinha de trigo hidratam-se, formando o glúten, que após um tempo adequado de mistura é capaz de reter os gases produzidos pelas leveduras, resultando desta forma em um produto fermentado de baixa densidade (pão e outros fermentados). As gliadinas são as principais responsáveis pelo controle do volume do pão, enquanto que as gluteninas respondem pelos tempos de mistura e de desenvolvimento da massa, sendo essa fração a mais elástica e coesa das duas (AQUARONE et al., 2002).

Além do glúten, o amido desempenha papel importante na manutenção da estrutura do pão no cozimento, ajudando na retenção dos gases produzidos durante a fermentação (AQUARONE et al., 2002).

## 5.2 Características e funções dos ingredientes

Os principais ingredientes dividem-se em dois grandes grupos (AQUARONE et al., 2002):

- Essenciais: farinha de trigo, água, fermento biológico e sal (AQUARONE et al., 2002);
- Não essenciais: açúcar, gordura, leite, enzimas e outros (AQUARONE et al., 2002).

### 5.2.1 Água

Importante para a formação da massa. Fornece meio propício ao desenvolvimento da atividade enzimática e, conseqüentemente, à fermentação do pão. A água entra em contato com produtos de decomposição, absorvendo dióxido de carbono do ar para formar ácido carbônico (AQUARONE et al., 2002).

### 5.2.2 Sal

Melhora as características de plasticidade da massa, melhorando a força do glúten. Normaliza a atividade do fermento, isto é, controla a fermentação. Melhora as características da crosta e o sabor do produto final do pão. Afeta também as características de conservação do pão devido às propriedades higroscópicas e a porcentagem mais indicada de sal numa massa é de 1,5% a 2,0%, no máximo (AQUARONE et al., 2002).

### 5.2.3 Fermento

O fermento usado normalmente pela maioria das padarias é do tipo fresco, e é oriundo da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, pertencente à família dos cogumelos. No processo de panificação, sua função principal é a de provocar a fermentação dos açúcares, produzindo o gás carbônico, que ao mesmo tempo é responsável pela formação de alvéolos internos e pelo crescimento da massa. Industrialmente o fermento é produzido a partir do melaço, utilizando-se culturas de leveduras adequadas para sua reprodução (AQUARONE et al., 2002).

- **Fermento fresco**

É o mais comumente empregado pelas padarias. Apresenta-se sob a forma de blocos, de cor creme ou marfim, com consistência compacta e homogênea e com teor de umidade elevado. Qualquer alteração da cor e odor indica problemas de qualidade fermentativa. À medida que o fermento envelhece, mesmo guardado em condições ideais de conservação, seu poder fermentativo diminui (AQUARONE et al., 2002).

- **Fermento seco**

A grande vantagem deste tipo de fermento é sua conservação ou vida de prateleira, que é longo, devido, principalmente, à sua baixa umidade. Hoje são comercializados dois tipos: o seco granulado não ativo e o desidratado instantâneo ativo. O primeiro possui células que estão em estado latente e que precisam ser revigoradas previamente; o segundo é produzido por processos mais sofisticados, usando-se *strains* de leveduras especiais e secagem em leite fluidizado (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.2.4 Aditivos

Normalmente atuam com a finalidade de equilibrar a atividade enzimática da farinha ou melhorar a força de massa e a tolerância ao processo de panificação. Em geral, são amilases de diferentes origens da cultura de *Aspergillus oryzae* ou *niger* (AQUARONE et al., 2002).

Outro aditivo utilizado é o ácido ascórbico ou vitamina C, que proporciona à massa maior tenacidade, além de branquear o miolo do pão e melhorar a retenção gasosa, acentuando a maturação da massa e diminuindo o tempo de fermentação (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.2.5 Enzimas em panificação

As enzimas apresentam muitas funções na produção do pão. Podem atuar nas moléculas de amido ou de proteínas e também atuar como branqueadores de farinhas com alto teor pigmentos escuros, dependendo de sua especificidade (AQUARONE et al., 2002).

Normalmente as farinhas de trigo contêm  $\beta$ -amilase suficiente para conversão de amido em maltose, mas são deficientes em  $\alpha$ -amilase. Essa condição tem sido corrigida através de suplementação enzimática e essa suplementação tem sido altamente benéfica para a maioria dos produtos de panificação (AQUARONE et al., 2002).

Para produção de pão de alta qualidade, é necessário utilizar farinha de trigo com glúten, baixo teor de cinzas, alta qualidade, boa tolerância à mistura e alta absorção de água (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.2.6 Amilases

Sua atividade afeta a consistência da massa, já que o grânulo de amido danificado tem alta capacidade de absorção de água e, quando este é degradado pela ação de amilases, provoca mudanças na extensibilidade e na capacidade de retenção de gás. As amilases aumentam os açúcares fermentescíveis, proporcionando uma maior produção de gás e açúcares residuais para a formação de cor da crosta; permitem modificação adequada do amido, evitando a produção de pão com miolo gosmento; retardam o envelhecimento precoce do pão; aumentam a capacidade de dextrinização do miolo, melhorando a cor da crosta e aumentam o volume através de maior capacidade de produção de gás, com a diminuição da viscosidade do amido gelatinizado (AQUARONE et al., 2002).

As amilases utilizadas em panificação são obtidas a partir de cereais, bactérias ou fungos e os fatores que influenciam em sua atividade enzimática são o tempo, o pH e a temperatura (AQUARONE et al., 2002).

### 5.2.7 Proteases

As proteases bacterianas ou fúngicas são as mais utilizadas em panificação, pois causam cisão das ligações peptídicas na estrutura do glúten, sendo este tipo de ação diferente do papel dos agentes redutores, que quebram as fontes dissulfídicas do glúten. Consequentemente, a modificação do glúten pela ação da protease difere daquela obtida pela força física da mistura, ou da ação química de agentes redutores (AQUARONE et al., 2002).

Os fatores que afetam a atividade das proteases são os mesmos das amilases, ou seja: tempo, pH e temperatura (AQUARONE et al., 2002).

## 5.3 Processamento do pão

A estrutura da massa desenvolve-se mais lentamente que a produção de gás. Durante as primeiras horas de fermentação há gás suficiente, mas o glúten não está totalmente desenvolvido; desta forma, a massa não crescerá adequadamente, mesmo com a força do gás. A consequência é um pão de baixo volume e textura grosseira. Essas falhas podem ser corrigidas pelo ajuste do ótimo desenvolvimento da massa e ótimo poder de produção de gás, utilizando farinha de trigo forte e não muito forte, além do uso de protease e amilase, que permitem otimizar a produção e a retenção de gás (AQUARONE et al., 2002).

No caso do desenvolvimento da massa ser mais rápido que a produção de gás, esta se desenvolverá completamente em poucos minutos, ao passo que a produção máxima de gás ainda não atingiu seu ponto maior. Para se corrigir esses problemas, podem-se adicionar diretamente açúcares fermentescíveis nas primeiras horas de fermentação, ou incorporar farinha de trigo mais forte ou colocar mais sal na massa (AQUARONE et al., 2002).

Quando o desenvolvimento ótimo da massa coincide com o ótimo poder de produção de gás, tem-se um pão de ótima qualidade (AQUARONE et al., 2002).

### 5.3.1 Misturas

Tem como finalidade homogeneizar os ingredientes. A água é um dos principais ingredientes nesta etapa, responsável pela hidratação das proteases, rearranjando-se e formando o glúten e conferindo propriedades viscoelásticas à massa (AQUARONE et al., 2002).

### 5.3.2 Fermentação principal

É uma fermentação alcoólica e anaeróbica produzida pela ação do fermento biológico (leveduras) sobre os açúcares presentes na massa. Seu papel é produzir gás carbônico e modificações físico-químicas, as quais interferem nas propriedades plásticas da massa, participando da formação do sabor e aroma do pão, além de contribuir para sua boa conservação (AQUARONE et al., 2002).

### 5.3.3 Divisão

Tem por finalidade a obtenção de pedaços da massa de peso apropriado aos pães que devem ser fabricados (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.3.4 Boleamento

Tem por objetivo auxiliar a formação de uma superfície contínua (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.3.5 Fermentação secundária

Recupera parte da extensibilidade perdida durante a divisão e o boleamento (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.3.6 Moagem

Melhora a textura e a estrutura do pão (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.3.7 Fermentação final

Faz com que o pão readquira um volume adequado (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.3.8 Cozimento

O objetivo principal é o tratamento térmico do amido e da proteína, justamente com a inativação das enzimas e do fermento, permitindo a formação da crosta, desenvolvimento de aroma, gosto e melhor palatabilidade (AQUARONE et al., 2002).

#### 5.3.9 Resfriamento

Os pães devem ser resfriados aproximadamente à temperatura ambiente (AQUARONE et al., 2002).

### 6 FABRICAÇÃO DE VINHO

A definição bioquímica de vinho seria: bebida proveniente da fermentação alcoólica dos açúcares do suco de uva pelas leveduras e, em certos casos, pelas bactérias lácticas (AQUARONE et al., 2002).

A uva é composta por água (86%), açúcares fermentescíveis (12%) e moléculas diversas (2%). Retira-se o sumo espremendo ou prensando a polpa, sendo frequente o agregado de enzimas de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas) para melhorar o rendimento (AQUARONE et al., 2002).

O agente biológico da fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que se encontra na pele da uva. Na produção artesanal, a fermentação não depende das leveduras naturais da uva. A indústria vitivinícola conta com uma grande diversidade de linhagens selecionadas para favorecer o processo fermentativo (AQUARONE et al., 2002).

Na vinificação, monitora-se cuidadosamente a fermentação alcoólica até a conclusão do processo. Há uma segunda fermentação, denominada fermentação malolática. Esta etapa, que é uma das mais complexas na elaboração dos tintos, se deve à ação de bactérias lácticas, como *Oenococcus oeni*, que transformam o ácido málico (diácido) em ácido láctico (monoácido). Em consequência da fermentação malolática, a acidez do vinho diminui e aparecem as primeiras modificações aromáticas. Posteriormente, o vinho é clarificado e colocado para envelhecer em tonéis ou garrafas (AQUARONE et al., 2002).

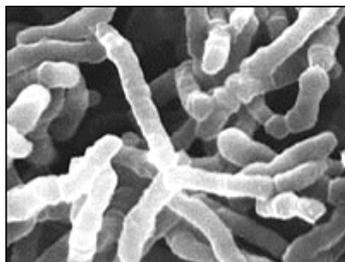


Figura 4 - *Oenococcus oeni*  
Fonte: (DIMSTON, 2010)

A obtenção de um vinho tinto ou branco depende basicamente do tipo de uva e do procedimento seguido. Se quisermos obter vinho branco, utilizaremos uvas brancas ou tintas sem a pele ou casca que as recobre. As uvas tintas com pele originam vinhos tintos, porque esta libera compostos fenólicos (antocianinas, flavonas, taninos) (AQUARONE et al., 2002).

### 6.1 Composição do vinho

As principais substâncias constituintes do vinho são: açúcares, alcoóis, ácidos orgânicos (ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico, ácido acético), sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, substâncias nitrogenadas, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos (ésteres, aldeídos e cetonas) vitaminas e anidrido sulfuroso (AQUARONE et al., 2002).

### 6.2 pH

O conhecimento de valor de pH do vinho é de suma importância, visto que por ele pode-se avaliar a resistência do vinho contra a contaminação bacteriana ou tendência à *casse ferrica* ou porcentagem do SO<sub>2</sub> presente na forma livre. O valor da concentração de íons H<sup>+</sup> nos vinhos é da ordem de 0,001 a 0,0001 g/L. Em pH, observa-se que vinho com teor 3,4 apresenta melhor resistência à contaminação bacteriana do que outro com pH 3,8 (AQUARONE et al., 2002).

### 6.3 Microbiologia do vinho

As leveduras são agentes de fermentação alcoólica. Sabe-se que existem cerca de doze gêneros de leveduras de vinho, cada uma dividida em espécies que se diferenciam pelo seu aspecto, suas propriedades, forma de reprodução e também pela maneira de transformar o açúcar (AQUARONE et al., 2002).

As leveduras se encontram na superfície da uva madura no momento da vindima (período entre a colheita da uva e o início da produção do vinho) e são transportadas para a cuba ou recipientes de vinificação. Outra parte prolifera nas cubas. No solo, que é seu habitat de inverno, encontram-se nas camadas mais superficiais. Os microorganismos encontrados na superfície das uvas são muito variados e numerosos. A presença de cera ou pruína na superfície da uva permite a sua retenção. Entre os microorganismos presentes existem os úteis e os indesejáveis, como micodermas ou fermento de “flor”, além de fungos, bactérias lácticas e bactérias acéticas (AQUARONE et al., 2002).

#### 6.3.1 Sucessão de espécies de levedura durante a vinificação

As leveduras apiculadas, como *Kloeckera apiculata* ou *Hanseniaspora uvarum*, são geralmente responsáveis pelo início e primeira fase de fermentação alcoólica até aproximadamente 4° a 5°GL, visto que se encontram na uva no estado ativo. Nas uvas com podridão, a fermentação pode ser iniciada com a *Torulopsis bacillaris*, capaz de produzir álcool, de 7° a 10°GL. Entretanto, pouco resistente ao anidrido sulfuroso, sua participação é reduzida no mosto sulfitado (AQUARONE et al., 2002).

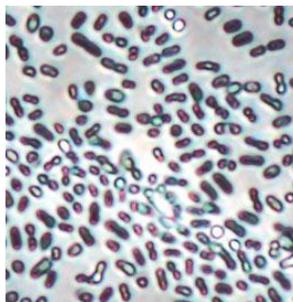


Figura 5 - *Hanseniaspora uvarum* no vinho  
Fonte: (WATER, 2009)

Os *Saccharomyces* invadem o meio muito rapidamente e nesse momento as leveduras iniciais desaparecem. Entre os *Saccharomyces*, o poder alcoagênico varia de 8° a 18°GL. Na fase final de uma fermentação alcoólica, as espécies dominantes são e *S. bayanus*, sendo esta última a mais alcoagênica e denominada de “acabadora” de vinhos de graduações alcoólicas elevadas (AQUARONE et al., 2002).

### 6.3.2 Leveduras de contaminação

Encontra-se normalmente sobre materiais de vinificação e dentro de recipientes vinários. Grande número de espécies de leveduras de contaminação está presente nas adegas de conservação. Os micodermas são leveduras oxidativas que formam a *flor*, e são particularmente abundantes na superfície do vinho. Entre as leveduras formadoras de *véu* na superfície ou sobre as paredes embebidas de vinho e em contato com o ar atmosférico, encontra-se a espécie *Candida mycoderma*, normalmente acompanhada de *Pichia* ou de *Bretanomyces*. Para evitar esse tipo de levedura, deve-se efetuar o atesto do recipiente periodicamente, isto é, manter sempre cheio o recipiente vinário, ou em outras palavras, evitar espaço vazio (AQUARONE et al., 2002).

## 6.4 Fermentações

### 6.4.1 Fermentação alcoólica

Nesse processo, os produtos são produzidos em frações equimolares, sendo que uma molécula de glicose é capaz de reagir e resultar em duas moléculas de ácido etílico, duas moléculas de dióxido de carbono e 33 calorias. Entretanto, a molécula de glicose passa por um processo anaeróbio através de doze etapas intermediárias, antes de ser transformada em etanol e gás carbônico. Formam também vários outros produtos constituintes do vinho (AQUARONE et al., 2002).

O mosto da uva apresenta proporções iguais de glicose e frutose, mas durante o processo de fermentação alcoólica com a espécie de levedura mais comumente empregada, *Saccharomyces ellipsoideus*, a glicose é fermentada mais rapidamente e a relação glicose/frutose decresce durante o processo (AQUARONE et al., 2002).

A temperatura da fermentação é extremamente importante: a temperatura baixa permite obter alto rendimento em álcool, não somente pela fermentação mais completa, mas também por minimizar a perda por evaporação. A temperatura também afeta a velocidade da fermentação e a natureza e quantidade de compostos secundários formados. A temperatura ótima para a fermentação na maioria das leveduras de vinhos é de 25 a 30°C, embora existam leveduras que atuam ao redor de 10°C. Para a fermentação de vinho branco recomenda-se manter a temperatura de fermentação abaixo de 20°C e, no caso de vinho tinto, nunca superior a 30°C (AQUARONE et al., 2002).

A aeração é necessária para a multiplicação de leveduras. Normalmente os processos de esmagamento, a separação das uvas do cacho e o bombeamento do mosto na cuba de fermentação exercem a aeração necessária. As leveduras se multiplicam vigorosamente no

mosto até que a maior parte do oxigênio dissolvido seja consumido, e então fermentam-se os açúcares. Essa operação é realizada com a remontagem (AQUARONE et al., 2002).

A remontagem consiste em escorrer o mosto em fermentação. A pressão da queda produz uma emulsão, que facilita a dissolução do oxigênio do ar. A remontagem deve ser realizada no início da fermentação, quando a multiplicação das leveduras estiver na fase exponencial, a qual corresponde, aproximadamente, ao segundo dia de fermentação (AQUARONE et al., 2002).

Além dos fatores que afetam a boa fermentação, o mosto deve conter substâncias nutritivas para as leveduras em quantidade suficiente (AQUARONE et al., 2002).

As substâncias nitrogenadas são indispensáveis. Para suprir eventuais deficiências em mostos, costuma-se empregar fosfato de amônio (AQUARONE et al., 2002).

#### 6.4.2 Fermentação malolática

Consiste essencialmente na descarboxilação bacteriana do ácido málico em ácido láctico, com a liberação de gás carbônico. Pode ocorrer durante ou logo após a fermentação alcoólica, ou ser tardia, isto é, após meses ou mesmo um ano (AQUARONE et al., 2002).

Para que essa fermentação aconteça é necessário que se coloque o vinho em ambiente de temperatura amena, realizar uma trasfega tardia (transferência do mosto fermentado ou vinho de uma vasilha para outra, separando o sedimento), adicionar moderadamente SO<sub>2</sub> e elevar o pH pela ação de carbonato de cálcio ou adicionar borra de vinho que tenha concluído recentemente a fermentação malolática. A inoculação de bactérias lácticas apropriadas pode influir favoravelmente na fermentação malolática. As bactérias lácticas responsáveis pela fermentação malolática são dos seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (AQUARONE et al., 2002).

A fermentação malolática apresenta três efeitos no vinho: a) reduz a acidez fixa; b) estabiliza o vinho, assegurando que a fermentação malolática não ocorra quando engarrafado; c) pode aumentar o aroma do vinho (AQUARONE et al., 2002).

### 6.5 Alterações no vinho

#### 6.5.1 Alterações microbianas

As alterações microbianas são denominadas de doenças do vinho. Existem basicamente duas categorias (AQUARONE et al., 2002):

- Doenças aeróbias: ocasionadas pelos microorganismos que se desenvolvem na superfície do vinho exposto ao ar. São os agentes da azedia e da flor (AQUARONE et al., 2002);
- Doenças anaeróbias: ocasionadas pelos microorganismos que vivem no interior da massa vínica, ao abrigo do ar, denominados microaerófilos ou anaeróbios facultativos. Podem atacar os açúcares, ácido tartárico ou o glicerol (AQUARONE et al., 2002).

A azedia é provocada por bactérias acéticas, sendo que as mais frequentes são *Acetobacter rancens* e *A. ascendens*. Ocasionam elevação considerável de acidez volátil. Para prevenir doenças de azedia, um dos principais cuidados é manter o recipiente sempre bem atestado (AQUARONE et al., 2002).

A flor é ocasionada por levedura oxidativa, principalmente do gênero *Candida*, sendo a espécie *Candidamycoforma* a principal. Existem leveduras de outros gêneros como: *Pichia*,

*Hansenula* e *Bretanomyces*, as quais desenvolvem um véu na superfície do vinho. Essas leveduras oxidam o álcool etílico à acetoaldeído (AQUARONE et al., 2002).

### 6.5.2 Alteração enzimática

É denominada *casse oxidásica* e ocorre normalmente em vinhos provenientes de uvas em condição sanitária inadequada ou com muita podridão (AQUARONE et al., 2002).

Caracteriza-se pela ocorrência de uma turvação devido à presença de elevado teor de polifenoxidase no vinho, além de provocar a insolubilização de tanino e de matérias corantes. Dessa forma, o vinho fica com coloração tinto-âmbar, amarelo-âmbar ou escuro, e o gosto de cozido e um pouco amargo, denominando-se vinho madeirizado. É possível evitar esse tipo de *casse* com dose conveniente de SO<sub>2</sub> (AQUARONE et al., 2002).

### 6.5.3 Alterações químicas

As alterações químicas podem ser de três tipos:

- *Casse férrica*: consiste na turvação do vinho devido ao teor elevado de ferro (AQUARONE et al., 2002).
- *Casse cúprica*: é uma turvação ocasionada por acidente, devido ao excesso de cobre enriquecido durante a manipulação inadequada do vinho (AQUARONE et al., 2002).
- *Casse protéica*: é uma floculação de proteínas naturais de vinhos brancos (AQUARONE et al., 2002).

## 7 FABRICAÇÃO DE CERVEJA

A fabricação da cerveja começa com a maltagem, processo em que os grãos de cevada germinados são secados e moídos. O malte, assim obtido, contém as enzimas desenvolvidas durante a germinação, capazes de catalisar a transformação do amido em açúcares fermentescíveis. Este processo é indispensável, porque não tendo amilases, as leveduras não fermentam o amido (AQUARONE et al., 2002).

Na brasagem, o malte é misturado com água, possibilitando a digestão do amido por ação enzimática. Mais tarde, o mosto é filtrado e fervido, sendo então acrescentadas as flores de lúpulo (*Humulus lupulus*, da família das *Canabinaceas*, que, além de ter uma ação antisséptica, conferem à bebida seu sabor amargo característico (AQUARONE et al., 2002).

A maltagem e a brasagem são atividades prévias à fermentação alcoólica, que será conduzida por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Os processos mais tradicionais utilizam leveduras que se acumulam no topo da cuba, originando as cervejas do tipo *ale*, com menos de 4% de álcool. Contudo, existem outras leveduras que sedimentam no fundo, gerando as cervejas de tipo *lager*, com mais de 6% de álcool. Uma vez concluída a fermentação do mosto, este recebe os tratamentos finais que consistem em maturação, clarificação, carbonatação, pasteurização e engarrafamento (AQUARONE et al., 2002).

No momento, a tecnologia do DNA-recombinante se limita a transformações com genes do mesmo gênero (*Saccharomyces*), visando conseguir linhagens mais eficientes em relação ao processo fermentativo, adequadas à cevada e ao lúpulo de diferentes regiões do mundo. Até o momento, essas linhagens não são utilizadas comercialmente (AQUARONE et al., 2002).

## 7.1 Matérias-primas

### 7.1.1 Malte

Embora vários cereais possam ser maltados satisfatoriamente, a cevada é que apresenta menores dificuldades técnicas durante esse processo. Além disso, a cevada apresenta alto teor de amido, ou seja, de extrato fermentável (AQUARONE et al., 2002).

### 7.1.2 Adjuntos

Podem ser genericamente definidos como produtos ou materiais que fornecem carboidratos para o mosto cervejeiro. Normalmente, os adjuntos são produtos do beneficiamento de cereais ou de outros vegetais ricos em carboidrato. Os cereais mais comumente utilizados na produção de adjunto cervejeiro são: milho, arroz, cevada, trigo e sorvo. Produtos de cana-de-açúcar apresentam pequena importância, enquanto centeio, aveia, batata e mandioca apresentam uso em potencial (AQUARONE et al., 2002).

O adjunto deve produzir açúcares fermentescíveis e dextrina não fermentáveis, em proporções semelhantes às que se obtêm em um mosto feito exclusivamente com malte e com o mínimo de incremento possível de proteínas solúveis (AQUARONE et al., 2002).

### 7.1.3 Lúpulo (*Humulus lupulus*)

O interesse industrial recai sobre a planta feminina, mais precisamente sobre as flores na forma de cone ou no fruto delas resultante, que são ricos em glândulas amarelas, contendo lupalina (resinas, óleos essenciais etc.), responsável pelo aroma e amargor característicos de lúpulo das cervejas. O lúpulo, além de conferir aroma e amargor, apresenta ação antisséptica (AQUARONE et al., 2002).



Figura 6 - *Humulus lupulus* L.: flores e frutos  
Fonte: (REB, 2009)

## 7.2 Leveduras e bactérias

### 7.2.1 Classificação

As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem ao gênero *Saccharomyces* e estão distribuídas nas espécies *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (antes classificada como *S. carlsbergensis*) (AQUARONE et al., 2002).

Nas cervejarias, entretanto, se faz uma classificação empírica baseada no comportamento da levedura cervejeira durante a fermentação. Assim, se durante o processo fermentativo a levedura sobe para a superfície do mosto, ela é denominada de alta fermentação; e se ao final decanta no fundo do fermentador, é chamada de baixa fermentação. A maioria das

leveduras de alta fermentação (*ales*) pertence à espécie *S. cerevisiae*, enquanto que a maior parte das leveduras de baixa formação (*lager*) são *S. uvarum* (AQUARONE et al., 2002).

### 7.2.2 Seleção de levedura cervejeira

A seleção de leveduras, que apresentam boas características cervejeiras, pode ser feita a partir de cepas (raças) existentes na própria cervejaria ou em outras fábricas que utilizam processo tecnológico semelhante ou, ainda, em coleções de cultivos mantidos por laboratórios em várias partes do mundo. Por outro lado, podem-se desenvolver novas raças mediante a utilização de agentes mutagênicos físicos (radiações ionizantes e luz ultravioleta) e químicos (nitrogênio mostarda, ácido nitroso, hidroxilamina etc.). Novas cepas podem ser obtidas pelo processo de hibridização de células (AQUARONE et al., 2002).

### 7.2.3 Cultivo puro

O cultivo puro de raças é conseguido mediante isolamento de uma única célula de levedura. Quando uma cepa é requerida para fermentação há necessidade de multiplicá-la. A propagação de levedura é feita da mesma forma tanto para as de alta como para as de baixa fermentação, com exceção para as menores temperaturas empregadas para a multiplicação de leveduras *lager* (AQUARONE et al., 2002).

### 7.2.4 Leveduras selvagens

Algumas raças de leveduras selvagens são da família das *Saccharomyces cerevisiae*, outras são de outras espécies do mesmo gênero e há, ainda, as pertencentes aos gêneros *Hansenula*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* e *Brettanomyces*. Podem causar defeitos, como é o caso da formação de película na superfície da cerveja; produção de turbidez; desenvolvimento de odores e sabores estranhos e fermentação com desvio na atenuação (AQUARONE et al., 2002).

### 7.2.5 Bactérias contaminantes

Frequentemente causam turbidez e anormalidade no sabor e odor da cerveja. Bactérias lácticas (gram-positivas) são as principais causadoras da deterioração de cerveja. Dois gêneros são particularmente importantes: *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Bactérias acéticas (gram-negativas) podem infeccionar a cerveja quando a bebida fica exposta ao ar. As *Zymomonas* e *Pectinatus* estão entre as mais comuns (AQUARONE et al., 2002).

## 7.3 Processamento

Segundo Aquarone et al. (2002), o processamento industrial da cerveja pode ser dividido em três fases:

- produção de mosto: moagem do malte, mosturação, filtração, fervura e clarificação do mosto;
- processo fermentativo: subdividido em fermentação e maturação;
- acabamento ou pós-tratamento da cerveja: filtração, carbinatação, modificação de aroma e sabor, standardização de cor, pasteurização, etc. (AQUARONE et al., 2002).

## 7.4 Fermentação

As leveduras cervejeiras podem catabolizar açúcares seguindo dois caminhos metabólicos distintos. Sob condições de anaerobiose, as leveduras fermentam uma molécula simples de açúcar, por exemplo, glicose, produzindo duas moléculas de etanol, duas de gás carbônico e energia. Na presença de oxigênio, pode ocorrer a oxidação completa das moléculas de açúcar e a produção de gás carbônico, água e energia. A via respiratória é utilizada no início

do processo de fermentação, com a finalidade de promover o crescimento e o revigoramento do fermento. A via fermentativa tem a função de promover a transformação do mosto em cerveja, através da conversão do açúcar em álcool e gás carbônico (AQUARONE et al., 2002).

## 7.5 Maturação

Pode-se dividir o processo de fermentação em duas etapas distintas. A primeira, denominada fermentação primária, vista no item anterior, cobre a fase de grande atividade metabólica da levedura, durante a qual, quase todo o extrato fermentável é convertido em álcool e gás carbônico. Essa fase dura apenas alguns dias (AQUARONE et al., 2002).

A segunda etapa, chamada de fermentação secundária, diz respeito ao período de maturação da cerveja. Após a fermentação primária, o extrato fermentável residual da cerveja verde continua a ser lentamente fermentado, mas o processo de maturação continua por um longo tempo, mesmo depois do término da fermentação secundária (AQUARONE et al., 2002).

A maturação tem por objetivo: a) iniciar a clarificação da cerveja mediante a remoção, por sedimentação, das células de leveduras, de material amorfo e de componentes que causam turbidez a frio na bebida; b) saturar a cerveja com gás carbônico, através da fermentação secundária; c) melhorar odor e o sabor da bebida, através de redução da concentração de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico, bem como o aumento do teor de éster; d) manter a cerveja no estado reduzido, evitando que ocorram oxidações que comprometam sensorialmente a bebida (AQUARONE et al., 2002).

## 8 FABRICAÇÃO DE VINAGRE

O vinagre, assim como o vinho, a cerveja, o pão, o queijo, o *kefir* e o iogurte, é um alimento fermentado conhecido há milhares de anos. Seu nome provém do francês *vinaigre* ou vinho azedo (AQUARONE et al., 2002).

Originalmente, o vinagre era obtido do vinho de uvas e da cerveja, por fermentação espontânea. Lavoisier e Pasteur estão entre seus estudiosos (AQUARONE et al., 2002).

O antigo processo lento de fermentação acética para a fabricação de vinagres finos é utilizado atualmente até em países com tecnologia desenvolvida, como o Japão, a Itália e a Espanha (AQUARONE et al., 2002).

### 8.1 Matérias-primas

Como o vinagre provém, em geral, de duas fermentações sucessivas (a alcoólica e a acética), toda matéria-prima usada para a produção fermentativa de álcool serve, em princípio, também para a fabricação do vinagre (AQUARONE et al., 2002).

Em função da matéria-prima da qual se inicia a produção, pode-se fazer a seguinte classificação genérica de vinagres (AQUARONE et al., 2002):

- vinagres de suco de frutas: uva, uva-passa, maçã, abacaxi, laranja, pêra, morando, framboesa, ameixa, figo, pêssego, jabuticaba, caqui etc;
- vinagres de tubérculos: batata, batata-doce, mandioca etc;
- vinagres de cereais: cevada, centeio, trigo, arroz, milho etc;
- vinagres de matérias-primas açucaradas: xarope de açúcar, mel, melaço, soro de leite, etc;

- vinagres de álcool: álcool propriamente dito diluído, aguardentes, outros destilados (AQUARONE et al., 2002).

## 8.2 Utilização de microorganismos na fabricação de vinagre

Primeiramente, faz-se uma fermentação alcoólica, processo anaeróbio, cujo agente fermentativo é a levedura e em seguida uma fermentação bacteriana, na presença de ar.

Já para a acética, não é coerente o uso de culturas puras. Emprega-se uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada mais eficiente (AQUARONE et al., 2002).

A bactéria acética ideal é aquela que resiste à elevada concentração de álcool e de ácido acético, com pouca exigência nutritiva, elevada velocidade de transformação do álcool em ácido acético, com bom rendimento e sem hiperoxidar o ácido formado, além de conferir boas características gustativas ao vinagre. Essas bactérias acéticas necessitam do oxigênio do ar para realizarem a acetificação e por isso multiplicam-se mais na parte superior do vinho que está sendo transformado em vinagre, formando um véu conhecido como “mãe do vinagre”. Esse véu pode ser mais ou menos espesso de acordo com o tipo de bactéria (AQUARONE et al., 2002).

Existem três processos básicos de acetificação:

- lento ou em superfície com aeração natural;
- rápido ou com utilização de materiais que aumentam a superfície de aeração;
- submerso ou com aeração forçada (AQUARONE et al., 2002).

## 8.3 Contaminantes

Na ordem microbiológica, existem bactérias acéticas que produzem material mucoso. A mais importante é a *Acetobacter pasteurianus* sub sp. *xylinum*. Outras espécies de *Acetobacter* podem oxidar o ácido acético formado, reduzindo a sua produção. Isso é facilitado pela aeração excessiva e insuficiência de álcool. Ocasionalmente, são mencionadas outras espécies contaminantes, como a *Gluconobacter*, a *Lactobacillus* e a *Leuconostoc*, além das butíricas e das putrefativas (AQUARONE et al., 2002).

## 9 FABRICAÇÃO DE QUEIJOS E LEITES FERMENTADOS

### 9.1 A produção de laticínios

Em torno de 2.000 a.C., a utilização de estômagos de cabras e de ovelhas como recipientes para o leite permitiu obter queijos mais sólidos e robustos. Mais tarde, os romanos introduziram extratos de plantas como o figo para coagular o leite. A explicação destes fenômenos é simples. As bactérias que normalmente se encontram no úbere dos animais contaminam o leite, proliferando e formando ácido láctico. Nesse meio ácido, as proteínas precipitam, separando-se do soro. A coagulação também ocorre em presença das enzimas renina e pepsina da mucosa estomacal e da ficina do figo (AQUARONE et al., 2002).

Várias espécies bacterianas podem fermentar o leite: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* etc. A maioria dos produtos vendidos como leite fermentado contém um número alto de microrganismos vivos, sendo consumidos como probióticos, para prevenir o desenvolvimento de outros microrganismos indesejáveis ou patogênicos, no tubo digestivo (AQUARONE et al., 2002).

Todos os queijos passam por três etapas de fabricação: a coagulação, o dessoramento e a maturação. No entanto, a tecnologia de produção de queijos permite uma série de variações que se traduz em mais de 400 tipos diferentes. Algumas dessas variações são a origem do

leite (vaca, cabra, ovelha, búfalo), o agente da coagulação (calor, enzimas, bactérias lácticas ou ambas), a umidade e consistência (mole, semiduro, duro e muito duro) e a maturação. Muitos países aceitam 35 variedades definidas por regras internacionais (AQUARONE et al., 2002).

## 9.2 Microrganismos e enzimas

A produção de queijos envolve a acidificação do meio pelas bactérias lácticas, geralmente a *Lactococcus lactise* e a *Streptococcus thermophilus*. O coalho, uma substância extraída do estômago de bezerros, foi utilizado como agente da coagulação enzimática durante séculos, mas a sua obtenção ficou cada vez mais cara e difícil (AQUARONE et al., 2002).

Para estabilizar a produção e satisfazer a grande demanda de produtos lácteos, usou-se transferir o gene da renina a uma bactéria (*Escherichia coli*) e, mais tarde, a uma levedura (*Kluyveromyces*) e um mofo (*Aspergillus*). Além da enzima produzida (quimosina) ser mais pura que a renina, os suplementos são constantes, aumentando a eficiência da produção de laticínios e diminuindo os custos (AQUARONE et al., 2002).



Figura 7 – *Escherichia coli*  
Fonte: (LINDISLAU, 2011)

O melhoramento de bactérias lácticas visa à obtenção de linhagens mais estáveis, resistentes aos vírus bacteriófagos e produtoras de bacteriocinas, que são substâncias com atividade antimicrobiana. Linhagens capazes de liberar mais rapidamente suas enzimas também poderiam contribuir, acelerando o processo de formação de aromas. Com o mapeamento do genoma, espera-se uma intensificação das pesquisas nessa direção (AQUARONE et al., 2002).

O desenvolvimento de bactérias e fungos durante a maturação confere características típicas a alguns queijos como, por exemplo, a presença de olhaduras produzidas por *Propionibacterium* no Gruyère, ou de um manto branco de *Penicillium* no Camembert e no Brie ou, ainda, as estrias azuis de *Penicillium* no Gorgonzola ou no Roquefort (AQUARONE et al., 2002).

## 9.3 Queijos

### 9.3.1 Matéria prima e ingredientes

- Leite

O leite de vaca é o mais utilizado. O principal constituinte do leite é a água. Os sólidos do leite são compostos por gordura, proteína, lactose e sais minerais (AQUARONE et al., 2002).

- Coalho

Nos queijos produzidos por coagulação enzimática, o coalho é o agente responsável pela coagulação do leite. O coalho é composto pela enzima (quimosina) ou pepsina, ou ainda a mistura das duas (AQUARONE et al., 2002).

- Cloreto de cálcio

A presença do cálcio solúvel, na forma ionizável, é essencial para que a coagulação ocorra. Como no tratamento térmico do leite, uma pequena parte do cálcio iônico é convertido em cálcio coloidal, é necessário adicionar cálcio ao leite pasteurizado para garantir a formação de um coágulo adequado (AQUARONE et al., 2002).

- Fermento láctico

As culturas lácticas são organismos que fermentam a lactose do leite a ácido láctico e outros produtos. Incluem os *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Para alguns tipos de queijo, adiciona-se também *Propionibacteria*, *Brevibacteria* ou espécies de fungos como *Penicillium* (AQUARONE et al., 2002).

A acidificação do leite é uma etapa essencial no processo de fabricação de queijos. É realizada através da adição de linhagens selecionadas de bactérias, que fermentam a lactose até ácido láctico. Tanto a extensão de produção de ácido, como a taxa de produção são importantes na fabricação do queijo. A produção de ácido é a principal função da bactéria acidoláctica. Durante a maturação, as bactérias morrem e liberam enzimas intracelulares, as quais continuam a atuar nos componentes do queijo, para dar-lhe as características adequadas de sabor, aroma, corpo e textura (AQUARONE et al., 2002).

O principal papel da cultura láctica é reservado para a cura do queijo, não sendo, portanto, essencial sua adição na etapa de coagulação. Entretanto, ao ser adicionado ao leite, o fermento láctico exerce uma efetiva inibição do crescimento de microorganismos ou contaminantes indesejáveis e ajuda na ação do coalho, na dessora e na coesão da massa. Além disso, durante a coagulação, o fermento se adapta ao meio, estando ativo para produzir ácido durante o tratamento da massa (AQUARONE et al., 2002).

- Sal

O sal é utilizado na fabricação de queijos com várias finalidades. Além de complementar e enriquecer-lhes o sabor, o sal melhora a textura e aparência do queijo. Ele controla a fermentação láctica, determinando o nível ideal de acidez, inibe o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis e auxilia na expulsão do soro (AQUARONE et al., 2002).

### 9.3.2 Processo de fabricação de queijos

A fabricação do queijo é, essencialmente, um processo de desidratação do leite, no qual a caseína, gordura e minerais do leite são concentrados de 6 a 12 vezes. Cerca de 90% da água presente no leite é removida. A adição de coalho, o desenvolvimento de ácido pelo fermento láctico, e o grau de tratamento térmico aplicado à massa após esta ter sido cortada, se constituem em etapas constantes, junto com diferentes microorganismos e condições de maturação, que resultam em diferentes tipos de queijo (AQUARONE et al., 2002).

### 9.3.3 Leites fermentados

Entende-se por leite fermentado o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado por fermentos lácticos próprios. Compreende vários tipos: o *kefir*, o iogurte, o leite acidófilo e a coalhada, os quais podem ser obtidos da matéria prima procedente de qualquer espécie leiteira (AQUARONE et al., 2002).

### 9.3.4 Iogurte

Denomina-se iogurte o produto resultante da ação do *Lactobacillus bulgaricus* e do *Streptococcus lacticus* sobre o leite. Durante a fermentação, as duas bactérias crescem simbioticamente, produzindo ácido láctico e compostos aromáticos (AQUARONE et al., 2002).

## 10 APLICAÇÃO DE ENZIMAS NAS TECNOLOGIAS DE ALIMENTOS

As enzimas possuem destacado papel no setor alimentício, pois podem influir na composição, processamento e deterioração dos alimentos. Em linhas gerais, pode-se dizer que tais catalisadores ora são úteis, ora são indesejáveis (AQUARONE et al., 2002).

### 10.1 Uso de enzimas em panificação

É um procedimento necessário, já que as farinhas usadas como matérias-primas possuem baixa atividade enzimática, sobretudo, amilolítica e proteolítica (AQUARONE et al., 2002).

Enzimas utilizadas:

- Amilases: Degradam o amido. A  $\alpha$ -amilase ataca os grânulos de amidodanificados, formando dextrinas, as quais são hidrolisadas pela  $\beta$ -amilase.
  - $\alpha$ -amilase: Sua ação sobre a amilose se dá em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando em maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose. Amiloses diferentes produzem dextrinas diferentes. Pode ser obtido tanto por cultivo em superfície quanto submerso, sendo o *Aspergillus oryzae* o micro-organismo mais comumente usado (AQUARONE et al., 2002).
  - $\beta$ -amilase: Sua ação sobre a amilopectina é incompleta, obtendo-se cerca de 50-60% de maltose. A hidrólise da maltose pode não ser total (cerca de 90%) devido à não linearidade deste componente ao grânulo de amido (AQUARONE et al., 2002).
- Proteases: Atuam na hidrólise de proteínas em geral, sendo obtidas do *Bacillus subtilis* e *Aspergillus niger*. São utilizadas durante o estágio de fermentação para permitir um maior contato com o glúten (AQUARONE et al., 2002).

### 10.2 Uso de enzimas na indústria de sucos e de frutas

Na indústria de sucos há o uso de pectinases e também de celulase e amilase, porém em quantidade bem inferior. As enzimas pécticas podem ser divididas em dois grupos: despolimerizantes e saponificantes (pectinaesterase) (AQUARONE et al., 2002).

### 10.3 Uso de enzimas na modificação de proteínas

As enzimas proteolíticas, usadas para a modificação ou hidrólise de matérias-primas protéicas, provêm de animais, vegetais e microorganismos (AQUARONE et al., 2002).

Há a ocorrência dessas enzimas na modificação de enzimas presentes na soja, no leite, na produção de gelatina, no amaciamento de carne etc. O sangue resultante do abate de animais é de grande interesse econômico por ser uma matéria-prima rica em proteína (AQUARONE et al., 2002).

No comércio existem muitos preparados proteolíticos utilizáveis na hidrólise de proteínas, dentre os quais, somente a título de exemplo, citam-se: *Acid Protease*<sup>®</sup>, *Profix*<sup>®</sup>, *Rhozyme*<sup>®</sup>, *Maxatase*<sup>®</sup>, *TakamineBromelain*<sup>®</sup>, *Ficin*<sup>®</sup> e *Esperase*<sup>®</sup> (AQUARONE et al., 2002).

## 10.4 Uso de enzimas na indústria de laticínios

Uma parte das proteínas presentes no leite é representada por enzimas do tipo  $\alpha$ -amilase, catalase, lipase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, dentre outras (AQUARONE et al., 2002).

### 10.4.1 Enzimas coagulantes

A enzima coagulante típica é a renina (quimosina) obtida do quarto estômago de bezerro lactente. Dentre as enzimas que coagulam o leite, a quimosina é a mais específica, já que ela hidrolisa as ligações peptídicas da K-caseína formadas pelos aminoácidos fenilalanina e metionina. Ao longo dos anos, a indústria queijeira vem se expandindo a uma razão bem superior à disponibilidade de quimosina. Por isso, há alguns anos surgiram no mercado os coalhos de origem fúngica (*Mucormiehei*: Rennilase<sup>®</sup>, Marzyme<sup>®</sup>; *Mucorpusillus*: Emporase<sup>®</sup>) e combinações balanceadas, conforme o tipo de queijo, de pepsina e quimosina (AQUARONE et al., 2002).

### 10.4.2 Hidrólise da lactose

A lactose pode ser hidrolisada por via ácida ou enzimática. A vantagem da hidrólise enzimática reside no fato de que a reação se processa a temperatura relativamente baixa (ao redor de 40°C), permitindo uma maior economia energética, além de não se formarem produtos colaterais. A lactase ( $\beta$ -galactosidase) é obtida de vários microorganismos, sendo que os preparados comerciais obtidos de leveduras (*Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*) e fungos (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*) (AQUARONE et al., 2002).

### 10.4.3 Outras enzimas

Além da lactase e dos coalhos, são usadas na tecnologia do leite e derivados as lipases e/ou proteases com a finalidade de: a) modificar as propriedades funcionais das proteínas do leite; b) desenvolver sabores característicos; c) provocar alterações na gordura da manteiga, quando utilizada como ingrediente de produtos alimentícios, dentre os quais citam-se: caramelos, requeijão e condimentos (molhos) (AQUARONE et al., 2002).

### 10.4.4 Uso de enzimas em bebidas alcoólicas

- Bebidas alcoólicas destiladas

Os principais agentes da hidrólise de amiláceos são:

- Malte: Obtido geralmente de cevada onde são encontradas as enzimas alfa e beta-amilases, proteases, lipases, e hemicelulases (AQUARONE et al., 2002);
- *Koji*: Preparado a partir do arroz, que é debulhado, moído, lavado com água, cozido, além da adição e fermentação de cinzas de madeira e esporos do fungo *A. oryzae* (AQUARONE et al., 2002);
- Enzimas microbianas: em linhas gerais, o processo empregado na produção de bebidas seria: gelatinização do amido → hidrólise enzimática → fermentação → destilação → engarrafamento (AQUARONE et al., 2002).

- Vinhos

Nos vinhos há o uso de enzimas pectinolíticas, tendo como um dos objetivos tornar a fermentação mais rápida e menos turbulenta. É comum uvas serem contaminadas pelo fungo *Botrytis cinerea*, capaz de produzir glucanas que introduzem problemas nas operações de clarificação e filtração (AQUARONE et al., 2002).

- Cerveja

Tradicionalmente, as enzimas entram na produção da cerveja através do malte que é usado no estágio inicial do processamento. O emprego de malte misturado com outros materiais amiláceos praticamente introduz a obrigatoriedade da suplementação enzimática, já que a atividade das enzimas existentes no malte são insuficientes para a produção de mosto com nutrientes em concentrações adequadas para uma boa fermentação. As enzimas usadas para esse fim existem em diferentes graus de pureza, e se enquadram num dos três grupos: amilases, proteases e glucanases (AQUARONE et al., 2002).

#### 10.4.5 Aplicação de enzimas diversas

- Remoção da 2,3-butadiona da cerveja

Esta dicetona se forma durante o processo fermentativo, conferindo ao produto um sabor amanteigado. Pelo uso da diacetilredutase, pode-se converter a 2,3-butadiona em 2,3-butilenoglicol (AQUARONE et al., 2002).

- Solubilização de sólidos de chás instantâneos

É comum a presença de turbidez em chás de dissolução instantânea, devido à presença de tanuinos, que podem ser removidos pela tanase obtida de *A. niger* (AQUARONE et al., 2002).

- Remoção de tioglicosídeos

As sementes de mostarda possuem uma enzima chamada mirosinase, que atua sobre tioglicosídeos, liberando alilisotiocianato, o qual é separado por destilação (AQUARONE et al., 2002).

- Processamento do açúcar de beterraba

Durante a produção do açúcar a partir da beterraba, há um acúmulo de rafinose no liquor-mãe, que ao atingir o valor de 8%, cristaliza, contaminando o produto final. Por isso, preconiza-se a eliminação dessetrissacarídeo com a rafinase (melibiase ou  $\alpha$ -galactosidade) obtida do fungo *Mortierella vinacea* (AQUARONE et al., 2002).

- Remoção do dextrano do açúcar de cana

Durante o processamento do caldo de cana para a produção do açúcar, forma-se o polissacarídeo dextrano, a partir da atividade metabólica do *Leuconostoc mesenteroides*, que dificulta a clarificação. Para contornar o problema, utiliza-se dextranase obtida de *Penicillium funiculosum* (AQUARONE et al., 2002).

- Glicoseoxidase

Pode ser utilizada com antioxidante, para evitar alterações de cor e sabor dos alimentos, devido à presença do oxigênio. É empregado também na desglicosação, para desglicosar ovo integral, gema e/ou clara, evitando a reação de Maillard, quando estas matérias-primas são submetidas à secagem (AQUARONE et al., 2002).

## 11 PROTEÍNAS DE ORIGEM MICROBIANA

A utilização de microorganismos tem por meta principal suprir a carência de proteínas, embora em alguns casos os lipídeos e as vitaminas sejam complemento valioso para o valor nutritivo (AQUARONE et al., 2002).

### 11.1 Bactérias

O teor de proteínas e, sobretudo, a presença de aminoácidos sulfurados, tornam algumas espécies de bactérias viáveis como alimento. O teor em nitrogênio das bactérias é superior ao dos fungos e das leveduras (AQUARONE et al., 2002).

### 11.2 Fungos

O desenvolvimento da indústria de antibióticos apresenta o problema da disposição de resíduos, representado pela massa de micélio desenvolvida nos fermentadores. A produção de proteínas com fungos apresenta pequena taxa de crescimento e exige controle muito cuidadoso das condições de esterilidade por um longo período, o que eleva os custos de obtenção (AQUARONE et al., 2002).

### 11.3 Leveduras

As leveduras são os principais microorganismos usados como alimento em todo o mundo. As espécies mais estudadas pertencem aos gêneros *Candida* e *Saccharomyces* (AQUARONE et al., 2002).

As leveduras para alimento podem ser classificadas em leveduras de cultivo, também denominadas de primárias e as leveduras de recuperação, ou secundárias (AQUARONE et al., 2002).

Leveduras cultivadas com o objetivo de servirem como alimento são as primárias. Normalmente são usadas espécies rústicas, capazes de crescer sobre substratos diferentes e transformar o nitrogênio do meio em nitrogênio protéico. As de uso mais geral são do gênero *Candida* (AQUARONE et al., 2002).

As leveduras de recuperação são comumente utilizadas na produção de proteínas a partir do vinho (AQUARONE et al., 2002).

## 12 PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR MICROORGANISMOS

Diversas pesquisas estudam as sínteses de gorduras por via microbiana, buscando a possibilidade de se obter uma alternativa para a carência de alimentos e também para a produção de energia. Além dessas perspectivas, a biotecnologia de lipídeos acena com outros usos industriais, tais como a esterificação, obtenção de esteróis de ésteres de ceras, de biosurfactantes e modificações dos óleos comestíveis por lipases microbianas (AQUARONE et al., 2002).

A gordura sintetizada pelos lipídeos é encontrada no interior das células sob forma de gotículas, nos vacúolos ou exteriormente difusa no citoplasma (AQUARONE et al., 2002).

Dentro do estudo da produção de lipídeos por microorganismos, é destacada a capacidade de produção de lipases extracelulares, capazes de causar o desdobramento e digestão de materiais lipídicos, catalisando a hidrólise de gorduras e produzindo ácidos graxos livres e glicerol (AQUARONE et al., 2002).

### 12.1 Bactérias

Um pequeno número de bactérias produz matéria graxa aproveitável. Algumas, como as *Nocardia*, *Micobacterium* e *Corinebacterium*, sintetizam gorduras em altos teores, mas geralmente em associação com produtos tóxicos ou alergênicos (AQUARONE et al., 2002).

As bactérias produzem glicolipídeos e dimetiltrealose, que podem ser usados como surfactantes. Algumas espécies do gênero *Arthrobacter* podem sintetizar lipídeos com predominância de triglicerídeos. As bactérias normalmente não sintetizam ácidos graxos

poliinsaturados, mas ácidos graxos simples, comumente monoenóicos (AQUARONE et al., 2002).

## 12.2 Fungos

Muitas espécies de fungos têm sido estudadas, principalmente entre os gêneros *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* e *Pythium*, acusando síntese de gordura acima de 50% em relação ao peso do micélio seco. Os fungos são capazes de acumular altas porcentagens de gordura em relação ao seu peso, mas há dificuldades em sua separação. Por isso, de forma geral, sua capacidade de bioconversão não é superior a 25% (AQUARONE et al., 2002).

De maneira geral, o desenvolvimento do fungo segue algumas fases, que se caracterizam inicialmente por um crescimento exponencial sem depósito de lipídeos; depois, pelo consumo de fósforo e magnésio e finalmente pelo consumo de material nitrogenado, com interrupção de crescimento. Nesse ponto, inicia-se uma fase estacionária, na qual há armazenamento do material lipídico, se houver fonte de carbono suficiente, pois, caso contrário, o material lipídico depositado é metabolizado. Após essas etapas, o micélio perde atividade (AQUARONE et al., 2002).

Em alguns casos há deposição de gordura mesmo na fase de crescimento. A síntese de lipídeos pelos fungos, assim como por outros microorganismos é influenciada pela estirpe e pelas condições do meio de desenvolvimento. A composição do material sintetizado é influenciada por esses mesmos fatores (AQUARONE et al., 2002).

## 12.3 Leveduras

As leveduras capazes de produzir lipídeos normalmente acumulam pouco óleo. A produção de material graxo passa a ser expressiva quando as fontes de nutrientes diminuem, especialmente quando o teor de nitrogênio chega ao limite das exigências. O teor de outros nutrientes, como para fungos, também influi na produção, porém, o de nitrogênio é o de maior efeito. A fonte de carbono é exigida sempre em quantidade elevada (AQUARONE et al., 2002).

Os gêneros *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsise*, *Trichosporon* se destacam por serem capazes de produzir 60% ou mais de gordura (AQUARONE et al., 2002).

As leveduras são capazes de modificar gorduras por fermentação, por alteração da composição em ácidos graxos. Essa ação, que é benéfica quando se trata de matéria graxa de menor qualidade, é realizada por leveduras sintetizadoras de gordura (AQUARONE et al., 2002).

O acúmulo de lipídeos depende das enzimas, mas também da fase de crescimento. Os triglicerídeos são acumulados na fase estacionária, sendo que no início da fase exponencial de crescimento a deposição é mínima, mas aumenta substancialmente no seu final e na fase estacionária (AQUARONE et al., 2002).

## 12.4 Matérias-primas

A fonte de energia para o crescimento de microorganismos é constituída de enzimas que permitem a obtenção de açúcares simples para as atividades de crescimento e de fermentação. Entre elas encontram-se os sucos de frutas ou de plantas sacarinas, melaço, matérias amiláceas (grãos), feculentas (raízes e tubérculos), celulósicas e resíduos sulfíticos de fábricas de celulose e papel (AQUARONE et al., 2002).

## 12.5 Substratos, nutrientes, separação dos lipídeos e extração da gordura

Os substratos usados para o crescimento dos microorganismos, além de fonte de energia, devem conter nutrientes capazes de estimular o crescimento e a síntese lipídica. As exigências em elementos minerais variam de acordo com o microorganismo escolhido para a produção de lipídeos. Pequenas variações nos nutrientes de menor proporção causam efeitos importantes nas atividades do fungo, incluindo a síntese lipídica (AQUARONE et al., 2002).

A melhor relação entre crescimento e síntese de lipídeos, para proporcionar a obtenção das melhores concentrações de gordura e boa qualidade dos ácidos graxos na composição do óleo, não depende somente do equilíbrio dos componentes no substrato, mas de condições inerentes ao próprio fungo. A escolha dos fungos para a produção de gordura deve ser prévia e estes devem ser cuidadosamente observados com relação às suas exigências, antes de serem utilizados industrialmente (AQUARONE et al., 2002).

Após o crescimento máximo do micélio, determinado pelo consumo da fonte de carbono, o substrato é separado por simples escoamento ou por centrifugação, lavado e seco à temperatura de 70°C. Depois, é submetido a um processo de extração de óleo por solventes. Grande parte dos lipídeos não está livre, o que dificulta sua extração. A escolha do solvente é importante, pois o mesmo deve ser barato, não tóxico, de baixa inflamabilidade, além de ser não explosivo e possibilitar a extração do máximo de lipídeos com o mínimo de impurezas (AQUARONE et al., 2002).

O termo gordura é utilizado para designar a fração que pode ser retirada por solventes comuns de substâncias graxas e consistem em uma mistura de ésteres de glicerol com ácidos graxos, fosfatídeos, esteróis, e outros. O isolamento da gordura dos microorganismos apresenta várias dificuldades, pois a extração completa, sem destruição prévia da estrutura celular, é dificultada pela ligação da gordura às proteínas (AQUARONE et al., 2002).

### Conclusões e recomendações

A Biotecnologia é amplamente e historicamente utilizada na área alimentícia, com ênfase em alimentos e bebidas que passam por processos fermentativos. Para que a fermentação ocorra, são utilizados diversos tipos de microorganismos, que proporcionam diversos produtos finais, com diferentes finalidades. Pão, vinho, vinagre, queijo e cerveja são exemplos de produtos alimentícios e bebidas que usufruem de algumas bactérias, fungos e leveduras, em especial, na sua confecção. Algumas proteínas e lipídios também podem ser produzidos a partir desses microorganismos.

Como leitura complementar, recomendam-se os seguintes documentos:

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação Específica de Alimentos**. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>>. Acesso em: 16 dez. 2011.

RIZZON, L. A. Como elaborar vinho artesanalmente. **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, RS, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/elaboracao.html>>. Acesso em: 16 dez. 2011.

### Referências

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial. In: **Biotecnologia na Produção de Alimentos**, v. 4, São Paulo: Edgard Blucher, 2002.

CATALICE, L. **BioCatalice**: Fermentação. [Salvador, BA], 24 maio 2011. Disponível em: <<http://lucianecatalicebiologia.blogspot.com/2011/05/fermentacao.html>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

- CAPELLARI, J.B. Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais. 2010. 70 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.
- DIMSTON, R. A. **Classification, environment, and bacterial confirmations and tests**, [S.l.], 2010. Disponível em: <<http://alexandrachel.pbworks.com/w/page/5193206/Classification,%20Environment,%20and%20Bacterial%20Confirmations%20and%20Tests>>. Acesso em: 14 nov. 2011.
- FERREIRA, J. **Fermentação**. Salvador, BA, 2007. Disponível em: <<http://julia3mcesb.blogspot.com/>>. Acesso em: 23 out. 2011.
- LINDISLAU, D. E. O. **Dom Escobar: Escherichia coli**, a bactéria que está aterrorizando a Europa. [S.l.], 2011. Disponível em: <<http://domescobar.blogspot.com/2011/06/escherichia-colia-bacteria-que-esta.html>>. Acesso em: 14 nov. 2011.
- MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia: ensino e divulgação**. Rio de Janeiro, [20--?]. Disponível em: <<http://www.bteduc.bio.br/guias.asp>>. Acesso em: 24 out. 2011.
- \_\_\_\_\_. **Biotecnologia: impacto na sociedade**. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia da ORT, 2010. Disponível em: <[http://www.bteduc.bio.br/livros/Biotecnologia\\_2.pdf](http://www.bteduc.bio.br/livros/Biotecnologia_2.pdf)>. Acesso em: 25 out. 2011
- MARTINS, A. S. Microorganismos e Indústria Alimentar; Fermentação e Actividade Enzimática. **BioHelp**: auxiliares de estudo em Biologia 12º, BioCell, Bioquímica e Genética. [Lisboa?], 2006. Disponível em: <<http://biohelp.blogs.sapo.pt/1800.html>>. Acesso em: 23 out. 2011.
- NITZKE, J.A.; BIEDRZYCKI, A. **Como fazer pão**. Porto Alegre, RS, 2004. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/alimentus/pao/fermentacao/levedura.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2011.
- INSTITUTO DE TECNOLOGIA ORT. **O que é biotecnologia**. Botafogo, 2011. Disponível em: <<http://www.ort.org.br/biotecnologia/o-que-e-biotecnologia>>. Acesso em: 22 out. 2011.
- REB, C. **As minhas plantas: Humulus lupulus**. [S.l.], 2009. Disponível em: <<http://asminhasplantas.blogspot.com/2008/08/humulus-lupulus.html>>. Acesso em: 14 nov. 2011.
- REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes. Food and feed production with microorganisms**, v. 5, Florida: VerlagChemie, 1983.
- RENÉ, S. (Org.). **Biotecnologia**. Porto Alegre: Manole, 1985.
- ROGERS, P. L.; FLEET, G. H. **Biotechnology and the Food Industry**. Gordon and Breach Science, 1987.
- ALIMENTOS FERMENTADOS. [S.l.], [2004?]. Disponível em: <<http://tecalim.vilabol.uol.com.br/fermentado.html>>. Acesso em: 25 out. 2011.
- TOMÉ, R.; MARQUES, G. **Atlas de Micologia**. [S.l.], 16 maio 2011. Disponível em: <<http://atlasmicologia.blogspot.com/2011/05/aspergillus-niger.html>>. Acesso em: 14 nov. 2011.
- ÁCIDO LÁCTICO. [Rio de Janeiro], [20--?]. Disponível em: <[http://www.eq.ufri.br/biose/nukleo/aulas/Microbiol/eqb353\\_aula\\_16.pdf](http://www.eq.ufri.br/biose/nukleo/aulas/Microbiol/eqb353_aula_16.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2011.
- VICENZI, R. **Biotecnologia de alimentos**. Ijuí, [20--?]. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/6703108/Apostila-Biotecnologia-de-Alimentos>>. Acesso em: 26 out. 2011.

WARD, O. P. **Biotecnologia de la fermentación**. Espanha: Acríbia, 1989.

WATER, L. V. Monitoring microbes during fermentation. **Practical and Winery & Vineyard Journal**. San Rafael, CA, set./out. 2009. Disponível em:  
<<http://www.practicalwinery.com/sepoct09/microbes1.htm>>. Acesso em:14 de nov. de 2011.

### Identificação do Especialista

Fernanda de Oliveira – Mestre em Biotecnologia

Jéssica Câmara Siqueira – Mestre em Ciência da Informação





*Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas*

[www.respostatecnica.org.br](http://www.respostatecnica.org.br)