



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2012

**Joel Ricardo Simões
dos Santos**

**Produção de espumante pelo Método Charmat com
leveduras imobilizadas**



**Joel Ricardo Simões
dos Santos**

**Produção de espumante pelo Método Charmat com
leveduras imobilizadas**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Industrial, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor Filipe Centeno, Diretor de Produção e I&D da Proenol.

o júri

Presidente

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro

Professor auxiliar com agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Filipe Miguel Monteiro Centeno da Costa

Diretor de Produção e I&D da Proenol – Indústria Biotecnológica, Lda

agradecimentos

Ao concluir este trabalho são várias as pessoas a quem devo um especial agradecimento por terem contribuído direta ou indiretamente para que ele se realizasse.

À Proenol pela possibilidade de realizar o estágio em ambiente empresarial que esteve na base desta dissertação, permitindo-me adquirir competências e conhecimentos que não são acessíveis num ambiente exclusivamente académico.

Ao Doutor Filipe Centeno, Diretor de Produção e I&D da Proenol, pelo apoio e orientação ao longo do trabalho desenvolvido.

À Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier pela disponibilidade mostrada, orientação científica e incentivo durante o decorrer do trabalho.

Ao Professor António Calado e à Doutora Sandra Calado pela total disponibilidade demonstrada durante as análises por microscopia ótica.

À Susana Pereira e ao Daniel Fernandes pela importante ajuda durante as análises por HPLC e tratamento de resultados.

Aos colaboradores da Proenol pela ajuda e colaboração prestada durante todo o desenvolvimento do trabalho prático, com especial apreço à Ana e à Rute do laboratório, e ao Departamento de Produção.

Por fim, mas não menos importante, à minha família e amigos pelo apoio e incentivo necessários à concretização deste trabalho.

palavras-chave

fermentação de espumante, Método de Charmat, leveduras imobilizadas, fermentador de cuba fechada, leite fixo, leite fluidizado, reator batch sequencial

resumo

A produção de vinho espumante tem sido alvo de intenso estudo e desenvolvimento nas últimas décadas. Partindo das mais recentes inovações no processamento deste vinho, neste trabalho estudou-se a cinética fermentativa de espumante em descontínuo pelo Método de Charmat, num fermentador de cuba fechada com recirculação, utilizando leveduras imobilizadas em alginato de cálcio (ProElif[®]).

A primeira fase do trabalho, que precedeu os estudos cinéticos da fermentação, consistiu na caracterização física das esferas de ProElif[®] e do leite para determinação da velocidade mínima de fluidização, um dos parâmetros mais importantes quando se trabalha com fermentadores de leite fluidizado.

Na segunda fase realizaram-se três estudos independentes para avaliação da influência de algumas variáveis na cinética fermentativa de vinho espumante. Avaliou-se o efeito do caudal de recirculação do vinho base e o efeito da dose de ProElif[®] aplicada. A cinética de consumo de açúcares foi bem descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, tendo-se obtido um valor de K_M médio de 25,2 g/L. O aumento da dose de esferas levou ao aumento da velocidade máxima da reação, como esperado. O estudo da influência do caudal de recirculação parece indicar que as limitações à transferência de massa externa são desprezáveis em relação internas neste sistema de células imobilizadas. Seguiu-se o estudo de estabilização tartárica do vinho base com aplicação da mais recente tecnologia de prevenção da precipitação dos sais de tartarato, a carboximetilcelulose (CMC). A CMC comprovou ser eficaz na estabilização tartárica do vinho para a dose máxima legal (10g/hL), mas mostrou ter influência na cinética do processo, verificando-se um aumento do tempo de fermentação.

Por último, testou-se o reator batch sequencial (SBR), de forma a verificar a viabilidade de utilização das esferas de ProElif[®] em vários ciclos fermentativos consecutivos. Reutilizando-se as esferas durante oito ciclos consecutivos, verificou-se um aumento gradual da taxa máxima de consumo de substrato e uma diminuição do tempo total estimado de fermentação. O SBR poderá permitir o processamento de elevados volumes de vinho espumante, com muito menor tempo de operação e mão-de-obra associada.

keywords

sparkling wine fermentation, Charmat Method, immobilized yeast, cuve close fermentator, fixed bed reactor, fluidized bed reactor, sequential batch reactor

abstract

Sparkling wine production has been the subject of intense study and development for the last decades. Based on recent innovations, the aim of this work was to study the sparkling wine fermentation kinetics by Charmat Method, in a cuve close system with recirculation, using immobilized yeasts in a calcium alginate matrix (ProElif[®]).

The first stage of this work consisted on physical characterization of ProElif[®] beads in order to determine the minimum fluidization velocity, one of the most important parameters in fluidized bed reactors.

In the second phase three independent studies were done to assess the influence of some variables on the kinetics of fermentation of sparkling wine. Evaluation of the effect of recirculation flow rate of base wine and the effect of applied dose of ProElif[®] was made. The kinetics of sugar consumption was well described by the Michaelis-Menten model, yielding a value of average K_M of 25,2g/L. As expected the dose of beads has led to increased reaction rates. The study of recirculation appears to indicate that the external mass transfer limitation are negligible in relation to the internal ones.

The stabilization of wine base with application of latest technology to prevent the precipitation of tartrate salts, carboxymethylcellulose (CMC). The highest dose of CMC legal allowed (10g/hL) was effective in the stabilization of wine, but the process kinetics are slower, proving an increase in the fermentation time.

Finally, in order to assess the feasibility of using ProElif[®] beads in several consecutive fermentations cycles, a sequential batch reactor (SBR) was assayed. Reusing the beads during eight consecutive cycles, promoted a gradual increase in the maximum rate of substrate consumption and a reduction of estimated fermentation time. Concluding, using immobilized yeast (ProElif[®]) in a cuve close system operated in SBR mode, allows processing of high volumes of sparkling wine, reducing operating time and manpower associated.

Sumário

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Nomenclatura.....	v
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Vinho espumante: conceito e métodos de produção.....	3
2.1.1. Método Tradicional (<i>Champenoise</i>).....	5
2.1.2. Método de Charmat (<i>Cuve Close</i>)	7
2.1.3. Método de Transferência	9
2.1.4. Método Contínuo.....	10
2.1.5. Outros métodos (Método Ancestral e Método Asti)	11
2.2. Leveduras utilizadas na produção de espumante	11
2.2.1. Seleção de estirpes.....	11
2.2.2. Imobilização de leveduras	12
2.2.3. Imobilização em alginato de cálcio	13
2.2.4. Limitações difusionais de sistemas de células imobilizadas	14
2.3. Bioquímica da fermentação de espumante	15
2.3.1. Glicólise.....	16
2.3.2. Fermentação alcoólica	18
2.4. Cinética de Michaelis-Menten	20
2.5. Estabilização tartárica do vinho base.....	22
2.5.1. Carboximetilcelulose para estabilização tartárica de espumantes.....	24
2.6. O bioreator	26
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Microrganismo.....	29
3.2. Vinho base	29
3.3. Fermentação.....	30
3.4. Montagem experimental.....	30
3.5. Desinfecção do sistema e esterilização do vinho base.....	31
3.6. Métodos analíticos	32
3.6.1. Açúcares redutores	32
3.6.2. Etanol.....	33

3.6.3.	Viabilidade celular.....	33
3.7.	Observação das esferas de alginato ao microscópio ótico	33
3.8.	Determinação dos parâmetros cinéticos	34
4.	Resultados e Discussão.....	35
4.1.	Caracterização física das esferas ProElif [®] e determinação de alguns parâmetros operacionais do sistema	35
4.1.1.	Caracterização das esferas de alginato ProElif [®]	35
4.1.2.	Determinação da velocidade terminal das partículas	39
4.1.3.	Determinação do número de Reynolds.....	40
4.1.4.	Velocidade mínima de fluidização	40
4.1.5.	Fluidização do leite	41
4.2.	Efeito do caudal de recirculação e dose de ProElif [®] aplicada	43
4.3.	Fermentação de vinho não estabilizado para aplicação de CMC	55
4.4.	Operação em reator batch sequencial (SBR)	58
4.4.1.	Observação ao microscópio das esferas de alginato.....	61
5.	Conclusões e Proposta de Trabalho Futuro	65
6.	Referências Bibliográficas.....	67
7.	Anexos.....	71
	ANEXO A: Caracterização das esferas de ProElif [®]	71
	ANEXO B: Efeito do caudal de recirculação e dose de ProElif [®] aplicada	71
	ANEXO C: Fermentação de vinho não estabilizado para aplicação de CMC	73
	ANEXO D: Operação em reator batch sequencial (SBR).....	74

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquemática da produção de espumante pelo Método Tradicional	6
Figura 2 - Representação esquemática da produção de espumante pelo Método de Charmat.	8
Figura 3 - Leveduras imobilizadas em dupla camada de alginato.	13
Figura 4 - Mecanismo bioquímico da glicólise	16
Figura 5 - Mecanismo bioquímico da fermentação alcoólica	19
Figura 6 - Estrutura química da tiamina pirofosfato (TPP)	19
Figura 7 - Dissociação do ácido tartárico e respetivos valores de pKa	23
Figura 8 - Estrutura molecular da CMC	25
Figura 9 - Representação esquemática da montagem experimental do fermentador de cuba fechada.....	31
Figura 10 - Fotografia à lupa de esferas desidratadas	36
Figura 11 - Fotografia à lupa de esferas hidratadas	36
Figura 12 - Regressão linear para U_t de esferas de alginato hidratadas	39
Figura 13 - Queda de pressão em função da velocidade superficial do fluido	43
Figura 14 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif [®] , com caudal máximo de recirculação (207 L/h)	45
Figura 15 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif [®] , com caudal mínimo de recirculação (38 L/h)	46
Figura 16 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif [®] , com caudal máximo de recirculação (207 L/h) e ajuste do modelo de Michaelis-Menten	48
Figura 17 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif [®] , com caudal mínimo de recirculação (38 L/h) e ajuste do modelo de Michaelis-Menten	48
Figura 18 - Representação gráfica de $v_{máx}$ em função da dose de ProElif [®] e caudal de recirculação.....	50
Figura 19 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação e ajuste do modelo de Michaelis-Menten para os ensaios com e sem adição de CMC.....	56
Figura 20 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para os diferentes ciclos de reutilização e ajuste do modelo de Michaelis-Menten	58
Figura 21 - Secção transversal da esfera de alginato antes da fermentação em aplicação 100x (A) e 400x (B)	61
Figura 22 - Secção transversal da esfera de alginato após o oitavo ciclo de fermentação em aplicação 100x	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação do vinho espumante de acordo com a sua concentração em açúcares	5
Tabela 2 - Caracterização dos dois lotes de vinho base utilizados nos ensaios.....	29
Tabela 3 - Área e diâmetro das esferas desidratadas	
Tabela 4 - Área e diâmetro das esferas hidratadas.....	37
Tabela 5 - Resultados obtidos na determinação da densidade das esferas e porosidade do leito	38
Tabela 6 - Avaliação visual da fluidização do leito a diferentes velocidades superficiais do fluido.....	42
Tabela 7 - Planejamento experimental para avaliação do caudal de recirculação e dose de ProElif [®] aplicada	44
Tabela 8 - Parâmetros KM e $v_{máx}$ determinados pela equação de Michaelis-Menten para os ensaios 1-6	49
Tabela 9 - Resumo das análises realizadas para os diferentes ensaios.....	53
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos determinados pela equação de Michaelis-Menten para os ensaios com e sem adição de CMC	55
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos, tempo de fermentação estimado e viabilidades para os ensaios de reutilização da biomassa	60

Nomenclatura

Da – número de Damköhler (-)

d_p – diâmetro da partícula (cm)

K_M – constante de Michaelis-Menten ($g L^{-1}$)

k_s – coeficiente de transferência de massa (h^{-1})

m – massa (g)

Re_p – número de Reynolds da partícula (-)

S – concentração de substrato (gL^{-1})

S_0 – concentração inicial de substrato ($g L^{-1}$)

t – tempo (h)

U – velocidade terminal do fluido ($cm s^{-1}$)

U_{mf} – velocidade mínima de fluidização ($cm s^{-1}$)

U_t – velocidade terminal da partícula ($cm s^{-1}$)

V – volume (cm^{-3})

v_0 – velocidade inicial de consumo de substrato ($g L^{-1}$)

$v_{máx}$ – velocidade máxima de consumo de substrato ($g L^{-1} h^{-1}$)

ϵ – porosidade do leito (-)

μ_f – viscosidade do fluido ($g cm^{-1} s^{-1}$)

ρ – densidade ($g cm^{-3}$)

ρ_f – densidade do fluido ($g cm^{-3}$)

1. Introdução

O vinho espumante é um dos mais requintados produtos da enologia, um vinho que pelas suas características e processo particular de produção pertence à classe dos vinhos especiais. Apesar de a sua produção ser incomparavelmente menor em relação a outros vinhos, como o vinho tinto, o seu impacto económico é notório, tratando-se de um produto de alto valor acrescentado (Torresi *et al.*, 2011).

A produção de vinho espumante teve início no final do século XVII, o que faz com que este produto tenha uma origem relativamente recente em relação a outras bebidas alcoólicas fermentadas. No entanto, o aperfeiçoamento de métodos de produção e a acumulação de conhecimento, especialmente durante o século XX, permite chegar à atualidade com um grande desenvolvimento nesta área específica da enologia.

Convencionalmente produzido pelo Método Tradicional, a produção de vinho espumante está atualmente implementada em países com tradição vitivinícola de todo o mundo, mas a mão-de-obra intensiva que o método requer juntamente com o facto de exigir grandes áreas nas indústrias, criaram nas últimas décadas a necessidade de desenvolver novos métodos e técnicas de produção.

Desde processamento em larga escala até à utilização das mais recentes tecnologias de imobilização de microrganismos, são inúmeros os métodos de produção que existem atualmente. Partindo das mais recentes inovações no processamento deste vinho, este trabalho consistiu em estudar a cinética fermentativa da produção de espumante em descontínuo, num fermentador de cuba fechada, utilizando leveduras imobilizadas em alginato de cálcio (ProElif[®]).

Desenvolvido na Proenol no período de Setembro de 2011 a Maio de 2012, o trabalho iniciou-se com a caracterização das esferas de ProElif[®] e determinação de alguns parâmetros operacionais do sistema, partindo-se posteriormente para os ensaios de avaliação do efeito do caudal de recirculação do vinho base e da dose de ProElif[®] aplicada na cinética fermentativa, ensaios com vinho não estabilizado para avaliar o efeito da aplicação de carboximetilcelulose, e finalmente ensaios de reutilização da biomassa (esferas de ProElif[®]).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Vinho espumante: conceito e métodos de produção

O espumante é um vinho que se caracteriza de forma geral por conter dissolvida uma certa quantidade de dióxido de carbono que permita obter uma sobrepressão superior a 3,5 bar a 20 °C (Lepe and Leal, 2004). Existem vários métodos de produção de espumante, mas o termo refere-se exclusivamente a vinhos cujo dióxido de carbono tem origem endógena, como resultado da fermentação alcoólica secundária (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

O Champanhe é o mais conhecido e prestigiante vinho espumante, produzido em França de acordo com regulamentações de origem controlada (*Appellation d'origine contrôlée*), como restrição da região de produção à província de Champagne, a partir de castas definidas e por técnicas específicas. Além deste caso particular, a produção de espumantes é realizada um pouco por todo o mundo em países com tradição vitivinícola, como Portugal, Espanha, Itália, Grécia, Rússia, Argentina, Austrália, entre outros.

Este vinho é obtido por métodos de produção particulares que incluem geralmente duas fases, a fermentação primária e a fermentação secundária. A primeira engloba a fermentação do mosto de uvas para produção do vinho base com características específicas. Posteriormente, na fermentação secundária do vinho base há a formação do dióxido de carbono responsável pela efervescência característica dos espumantes, como resultado da metabolização pelas leveduras dos açúcares residuais da primeira fermentação ou adicionados ao vinho base (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Apesar de as particularidades do processo de produção de espumante se expressarem essencialmente ao nível da fermentação secundária, a obtenção de vinho base de qualidade é de igual forma importante. Por um lado porque contribui para as propriedades organoléticas do produto final (espumante), e por outro porque a cinética fermentativa está dependente de alguns parâmetros químicos do vinho. Embora se encontrem disponíveis as variedades tinto e rosé, o espumante é maioritariamente produzido a partir de castas selecionadas de uvas brancas, e o vinho base é obtido pelo processamento tradicional das uvas brancas para produção do vinho branco. Este apenas deve possuir algumas características típicas que contribuam para uma boa qualidade do espumante, como aroma afrutado, baixa concentração de açúcares residuais, teor alcoólico

moderado, baixa acidez volátil e deverá ter sido sujeito a estabilização tartárica (Torresi *et al.*, 2011).

Uma vez obtido o vinho base é-lhe adicionado o licor de tiragem para se obter uma concentração de açúcares total de 20-25 g/L permitindo que ocorra a fermentação secundária. O licor de tiragem é um termo que se refere a uma solução de vinho que contém, para além de uma grande concentração de açúcares, nutrientes e outros compostos (compostos azotados, tiamina, bentonite, dióxido de enxofre, entre outros) e tradicionalmente as leveduras (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b; Carrascosa *et al.*, 2011). Estima-se que sejam necessárias 4-4,30 gramas por litro de açúcares para produzir um bar de pressão, sendo a pressão final desejada de cerca de 6 bar (Torresi *et al.*, 2011).

A fermentação secundária é o processo central na produção de vinho espumante e ocorre em garrafa ou tanques herméticos sob condições controladas (i.e. temperatura) durante um período de tempo adequado. Durante a fermentação há metabolização dos açúcares do meio até níveis residuais e sua conversão essencialmente em etanol e dióxido de carbono. Após a segunda fermentação, a concentração de etanol sobe cerca de 1% em relação ao vinho base e o dióxido de carbono dissolvido no vinho é de 11 a 15 g/L (Hornsey, 2007; Ronald S, 2008b). Posteriormente, o vinho fermentado é por norma deixado a maturar em contacto com as leveduras durante um período de tempo cuja duração varia de apenas alguns meses até anos. O vinho espumante que matura em contacto com as leveduras tira partido dos compostos que se libertam e solubilizam no meio após a autólise das leveduras. A autólise é um fenómeno bioquímico que ocorre em algumas vinificações especiais onde se dá a rutura da membrana celular das leveduras e libertação do conteúdo intracelular para o vinho (como aminoácidos, péptidos, polissacarídeos, glicoproteínas e manoproteínas), que pode contribuir significativamente para a qualidade do espumante, com alterações da composição final e propriedades organolépticas do mesmo (Martinez-Rodriguez and Pueyou, 2009).

No final desta fase as leveduras são separadas do vinho e procede-se à realização dos ajustes necessários ao nível do volume final da garrafa e concentração de açúcares, com adição de licor de expedição. O licor de expedição é tipicamente um vinho de reserva com uma elevada concentração de açúcares e em alguns casos constituído ainda por outros compostos, como dióxido de enxofre e ácido ascórbico, que inibem o crescimento microbiano e previnem a oxidação do vinho, ou ácido cítrico, usado como agente acidificante (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b; Ronald S, 2008b). Embora os espumantes

sejam classificados em relação ao seu método de produção, esta é uma prática de pouco valor para os consumidores, sendo a concentração de açúcar e a dose utilizada de licor de expedição os principais parâmetros que condicionam a classificação do vinho espumante. Independentemente do método de produção, o vinho espumante é classificado em distintas categorias de acordo com a sua concentração em açúcares (Tabela 1) (Regulamento (CE) N°607/2009).

Tabela 1 - Classificação do vinho espumante de acordo com a sua concentração em açúcares

Classificação	Concentração em açúcares
Extra bruto	< 6 g/L
Bruto	< 12 g/L
Extra seco	12 - 20 g/L
Seco	17 - 32 g/L
Meio seco	32 - 50 g/L
Doce	> 50 g/L

A distinção dos vinhos produzidos por diferentes métodos muitas vezes só é possível com uma análise sensorial cuidada e detalhada. As diferenças sensoriais têm maioritariamente origem na cor e aroma do vinho base, grau de saturação em dióxido de carbono, tempo de maturação do espumante e concentração em açúcares do produto final (Ronald S, 2008b).

2.1.1. Método Tradicional (*Champenoise*)

O Método Tradicional é largamente utilizado para produção de espumante e caracteriza-se por a fermentação secundária ocorrer em garrafa. Também conhecido por Método Clássico ou *Método Champenoise*, o Método Tradicional é utilizado desde a produção das primeiras garrafas de espumante, foi intensamente aperfeiçoado durante séculos na região de Champanhe (França) e possui um aspeto muito particular: a garrafa de vidro acompanha o vinho desde que este inicia a segunda fermentação até que chega ao consumidor.

Uma vez produzido e engarrafado, ao vinho base é adicionado o licor de tiragem e a garrafa é hermeticamente selada de forma a evitar a libertação do dióxido de carbono que se forma durante a fermentação secundária. As garrafas são armazenadas em locais apropriados a baixas temperaturas (10 – 15 °C) com flutuações mínimas, luminosidade

mínima, em repouso absoluto e na horizontal (Ronald S, 2008b; Torresi *et al.*, 2011). É importante que as garrafas sejam dispostas na horizontal, primeiro para garantir que não ocorram trocas gasosas com o exterior, e segundo para proporcionar uma maior interface nas trocas entre o meio fermentativo (vinho) e as leveduras (Torresi *et al.*, 2011).

Durante a fase fermentativa os açúcares são consumidos e produz-se dióxido de carbono e etanol. A cinética da fermentação secundária está dependente das estirpes de leveduras utilizadas, temperatura e composição química do vinho base, mas ocorre geralmente num período mínimo de 15 a 45 dias (Torresi *et al.*, 2011), seguindo-se a fase de maturação cuja duração está sujeita à regulamentação de cada país, mas que poderá ser no mínimo de nove meses (Ronald S, 2008b).

Após a maturação procede-se à separação das leveduras e possíveis sedimentos do vinho numa etapa designada de *remuage*. As garrafas são regularmente rodadas 1/8 manualmente ou por sistemas automatizados (*gyropallete*) durante aproximadamente 15 dias, até que fiquem numa posição perpendicular ao chão, levando à deposição dos sedimentos no gargalo da garrafa por efeito da gravidade e o vinho fica límpido. Esta fase é bastante exigente no que respeita à mão-de-obra necessária e ao período de tempo que necessita, pelo que atualmente se aposta cada vez mais na utilização de leveduras imobilizadas em suportes sólidos (i.e. alginatos) que simplificam o processo. Neste caso a deposição dos sedimentos ocorre quase instantaneamente quando as garrafas são invertidas, reduzindo o tempo de *remuage* de semanas para alguns segundos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Quando os sedimentos estão totalmente depositados, as garrafas entram na etapa do *dégorgement*, onde há remoção do depósito acumulado no gargalo da garrafa durante a *remuage*. O gargalo da garrafa é

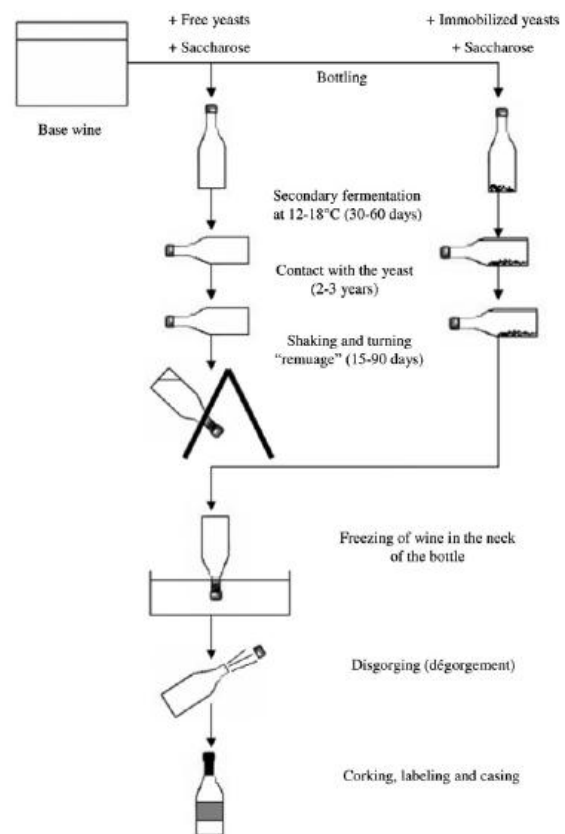


Figura 1 - Esquemática da produção de espumante pelo Método Tradicional (Colagrande *et al.*, 1994)

mergulhado numa solução congelante de cloreto de cálcio ou glicol que congela o vinho e sedimentos nessa zona. As garrafas são então abertas e a pressão do interior da garrafa expelle o vinho congelado juntamente com os sedimentos. Normalmente o vinho é refrigerado a temperaturas entre 4 e 10 °C (Torresi *et al.*, 2011) aumentando a solubilidade do dióxido de carbono e minimizando as suas perdas com a abertura da garrafa.

O processo termina com a adição do licor de expedição, rolhamento e rotulagem das garrafas que ficam aptas para seguirem para comercialização.

2.1.2. Método de Charmat (*Cuve Close*)

A produção de espumante pelo Método Tradicional é do ponto de vista prático bastante exigente e demorada, apenas justificada pela elevada qualidade do produto final, para a qual contribuem simultaneamente a qualidade do vinho base e o processo de maturação do espumante juntamente com as leveduras responsáveis pela fermentação.

O processo de envelhecimento em garrafa para além de aumentar o custo de produção pelo tempo e mão-de-obra que requer, não é economicamente viável quando se pretendem produzir espumantes a partir de mostos de menor qualidade (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Desta forma, foi desenvolvido no início do séc. XX por Eugène Charmat o Método de Charmat, que possibilita a produção de espumante em larga escala com redução significativa dos custos e tempo associados, procurando preservar as características típicas e únicas do produto final (Hornsey, 2007).

Neste método, também designado de *Cuve Close* (cuba fechada), a fermentação secundária ocorre em cubas herméticas de grande capacidade volúmica, ao contrário da típica fermentação em garrafa do Método Tradicional. O diagrama geral simplificado da produção de espumante pelo Método de Charmat está representado na Figura 2.

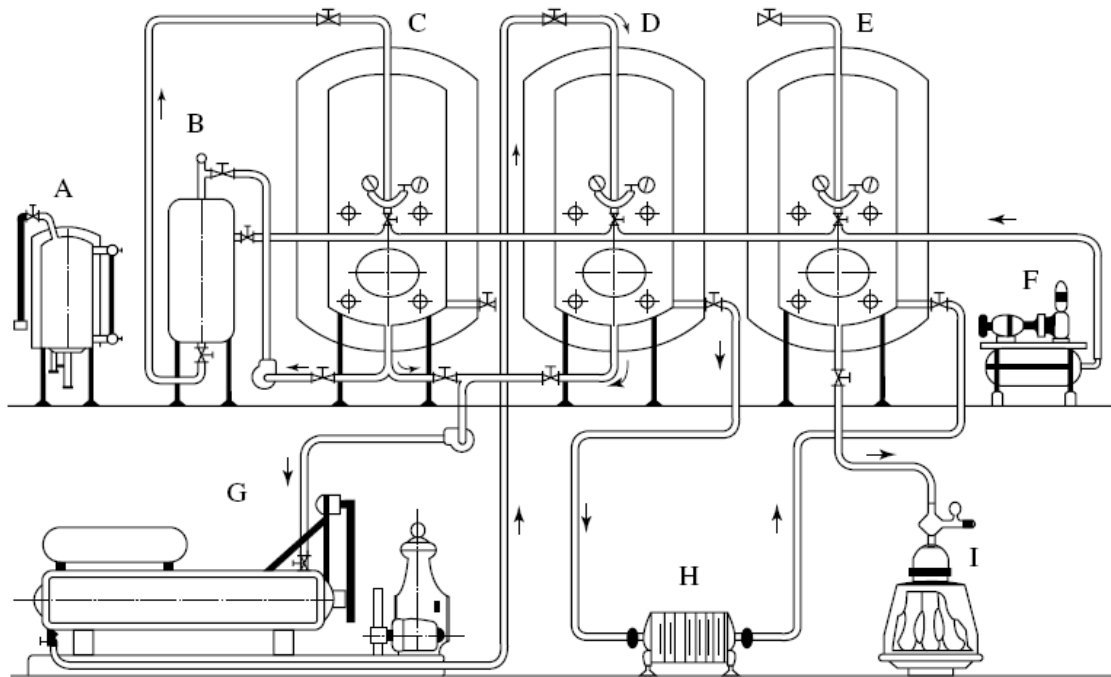


Figura 2 - Representação esquemática da produção de espumante pelo Método de Charmat. A, pé de cuba; B, licor de tiragem; C, cuba onde ocorre fermentação secundária; D, cuba de refrigeração; E, cuba acoplada à linha de engarrafamento; F, compressor que mantém toda a linha isobárica; G, módulo de refrigeração; H, filtro; I, linha de engarrafamento. (Ribéreau-Gayon *et al*, 2006)

O sistema é constituído por três cubas de grande capacidade volúmica interligadas entre si e equipamentos secundários de pressurização, refrigeração, centrifugação e/ou filtração e engarrafamento. O processo inicia-se com a transferência do vinho base para a cuba de fermentação (C) e adição do licor de tiragem. Ainda nesta cuba, após a homogeneização da solução, são inoculadas as leveduras. A cuba da fermentação deverá estar equipada com um sistema de monitorização e controlo da temperatura que permita manter este parâmetro constante durante o processo fermentativo.

No final da fermentação as leveduras são removidas por centrifugação e/ou filtração, o vinho espumantizado é transferido para uma segunda cuba (D) e mantido a baixa temperatura (-5 a 0 °C) durante alguns dias para que ocorra a estabilização por frio. Nesta fase são realizados os necessários ajustes ao vinho, com adição do licor de expedição para produção de cada tipo específico de espumante.

Após estabilização e realização dos necessários ajustes, procede-se à filtração esterilizante do vinho e à sua transferência para a terceira cuba (E), que se encontra acoplada a uma linha de engarrafamento para que se proceda ao engarrafamento final do produto.

As atuais práticas implicam que o vinho seja transferido entre cubas que deverão suportar pressões entre 6 e 8 bar e possuir atmosfera controlada. Para além destes requisitos, é fundamental que toda a operação ocorra em linhas isobáricas sob pressurização com dióxido de carbono, de forma a evitar a libertação deste gás do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

O processamento em largo volume característico do Método de Charmat está associado à produção de espumantes de menor qualidade (Stevenson, 2005). Isto deve-se essencialmente à rapidez com que todo o processo ocorre relativamente ao Método Tradicional, eliminando ou reduzindo significativamente o tempo de interação entre leveduras e vinho durante o envelhecimento. No entanto, a qualidade do produto final que se obtém está fortemente dependente da qualidade do vinho base.

Contrariamente à opinião popular, não existe nenhuma evidência que sugira que este método seja um método inferior para produção de vinho espumante. Geralmente, o que acontece é que se recorre ao Método de Charmat para produzir espumante a partir de vinhos base que são de baixa qualidade. Alguns especialistas acreditam que também se pode produzir espumante de qualidade por este método, se se tiver por base vinho de qualidade e se se permitir a maturação do espumante em contacto com as leveduras durante o tempo adequado antes do engarrafamento (Stevenson, 2005).

O Método de Charmat está atualmente mais direcionado para a produção de vinho espumante a partir de castas mais aromáticas, cultivadas em climas quentes, preservando a frescura e característica frutada do vinho base. Um dos exemplos mais bem conhecido é o das castas Moscatel, onde um envelhecimento em contacto com as leveduras atenua as características desta variedade sem aumento significativo de qualidade (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.1.3. Método de Transferência

O Método de Transferência surgiu na primeira metade do séc. XX na Alemanha (Hornsey, 2007) com o objetivo principal de usufruir das vantagens da fermentação secundária e envelhecimento em garrafa característico do Método Tradicional, enquanto evita simultaneamente os problemas associados às etapas de *remuage* e *dégorgement*.

Após a fermentação secundária e envelhecimento adequado em garrafa, o vinho é transferido para cubas de inox com uma atmosfera de dióxido de carbono controlada e pressão equivalente àquela que resultou da fermentação em garrafa. Já na cuba procede-se à refrigeração e adição de licor de expedição para ajuste da concentração final de açúcares, ficando em repouso durante alguns dias. Antes do engarrafamento submete-se o vinho a um processo de filtração esterilizante. Uma vez que o vinho é mantido a baixa temperatura sob atmosfera controlada, as perdas de dióxido de carbono dissolvido são reduzidas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

A principal vantagem deste método é a redução do tempo de produção de espumante relativamente ao método tradicional. A refrigeração do vinho antes da filtração e engarrafamento permite ainda realizar uma estabilização tartárica do vinho, prevenindo a precipitação dos sais de tartarato.

No entanto, atualmente com a automatização da etapa de *remuage* e o desenvolvimento e aplicação de leveduras imobilizadas na fermentação de espumantes, a maioria das vantagens do Método de Transferência em relação ao Método Tradicional deixaram de existir (Ronald S, 2008b). Para além destes factos, este método requer elevado investimento na montagem e manutenção dos equipamentos, que não se reflete num aumento da qualidade e valor comercial do produto final.

2.1.4. Método Contínuo

O Método Contínuo ou Método Russo é considerado uma variante do Método de Charmat, que envolve a produção de espumante por um sistema de tanques interligados entre si sequencialmente (Rankine, 1989). No primeiro tanque dá-se a fermentação secundária com a adição contínua de vinho base e licor de tiragem. O vinho fermentado passa para os tanques seguintes onde as células são separadas e se favorece a sua autólise pela presença de aparas de carvalho. Finalmente o vinho é filtrado e engarrafado no último módulo da linha de produção, que deverá estar em condições isobáricas em toda a sua extensão.

2.1.5. Outros métodos (Método Ancestral e Método Asti)

Uma pequena percentagem do vinho espumante é produzida por métodos alternativos, como o Método Ancestral e Método Asti. No Método Ancestral, também conhecido como Método Rural ou Método Natural, não está envolvida uma fermentação secundária típica da produção de espumantes. Ao contrário do que é normal, neste método o vinho base é engarrafado antes do fim da primeira fermentação e o consumo dos açúcares residuais do mosto leva à formação de dióxido de carbono que provoca a efervescência do vinho (Stevenson, 2005). Por sua vez, o Método Asti é em tudo semelhante ao Método Rural, no entanto a fermentação primária não ocorre em garrafas, mas sim em tanques de aço inox de grande volume. Neste caso, a fermentação é interrompida quando se atinge um teor alcoólico de 6 a 9%, permanecendo ainda no vinho uma boa quantidade dos açúcares naturais das uvas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

2.2. Leveduras utilizadas na produção de espumante

2.2.1. Seleção de estirpes

Tal como a fermentação alcoólica primária de mostos, a fermentação alcoólica secundária é um fenómeno maioritariamente conduzido por leveduras do género *Saccharomyces*. Muitos dos aspetos microbiológicos e bioquímicos são transversais às duas fermentações, no entanto a segunda fermentação é caracterizada por ocorrer num ambiente mais hostil para as leveduras, nomeadamente com concentração de etanol elevada, pH baixo e presença de antissépticos, como é o caso do dióxido de enxofre adicionado durante a vinificação. O processo de produção de espumante ocorre em condições muito particulares que tornam a criteriosa seleção de estirpes, baseada nas suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, um passo importante.

As leveduras responsáveis pela fermentação secundária do vinho base deverão possuir características adicionais relativamente às responsáveis pela fermentação primária. Especificamente, deverão (1) possuir resistência ao etanol, uma vez que o vinho base possui um teor alcoólico superior a 9,5°, que aumenta durante a segunda fermentação, (2) possuir atividade fermentativa a baixas temperaturas, tipicamente entre 10 e 15 °C, (3) resistir à pressão causada pela produção de dióxido de carbono (geralmente até 6 bar) e (4)

não sintetizar compostos que originem alterações organolépticas indesejadas, uma vez que as características dos espumantes não são influenciadas unicamente pelo vinho base, mas também pelos produtos do metabolismo das leveduras durante a fermentação secundária (Carrascosa *et al.*, 2011).

2.2.2. Imobilização de leveduras

Com o objetivo de se obterem biocatalisadores mais eficientes e um maior controle das condições operacionais, os últimos anos têm sido marcados pela investigação e aplicação de sistemas de células imobilizadas na produção de espumantes (Strehaiano *et al.*, 2006; Kosseva, 2011). A imobilização de biocatalisadores numa matriz polimérica ou por adesão a uma superfície de imobilização apresenta diversas vantagens, nomeadamente quando se tratam de processos a nível industrial, por possibilitar a intensificação dos processos, a reutilização da biomassa sem perda de atividade microbiana, o aumento da produtividade das fermentações em reatores de elevada densidade celular, uma maior adaptação a processos contínuos e uma maior tolerância a substâncias inibidoras e condições adversas (Martynenko and Gracheva, 2003; Divies and Cachon, 2005).

As vantagens desta tecnologia são claramente evidentes no Método Tradicional, onde a simples separação das leveduras do produto final permite eliminar praticamente o tempo necessário da fase de *remuage*, reduzindo a mão-de-obra e os custos associados ao produto final.

Uma análise cuidadosa da literatura mostra que entre as várias técnicas de imobilização, a de aprisionamento é a mais utilizada e a que apresenta melhores resultados na produção de espumantes. Esta técnica consiste na incorporação dos microrganismos numa matriz sólida formada por polissacarídeos (como alginatos, agarose, carragenano ou quitosano), proteínas (como o colagénio) ou ainda por polímeros sintéticos (como poliacrilamida ou álcool polivinílico) (Martynenko and Gracheva, 2003; Nussinovitch, 2010). A matriz de imobilização impõe uma restrição espacial aos microrganismos, ao mesmo tempo que permitir a difusão das moléculas de substrato ou produto a taxas que não comprometam a sua viabilidade celular ou o desempenho do microrganismo.

2.2.3. Imobilização em alginato de cálcio

Apesar das diversas soluções para imobilização das leveduras, a imobilização em alginato de cálcio é atualmente a mais estudada e a mais aplicada, por ser uma técnica simples, que não compromete a viabilidade dos microrganismos e segura do ponto de vista tóxico, geralmente aplicável para qualquer tipo de microrganismo, como leveduras, bactérias ou fungos (Nussinovitch, 2010).

O alginato é um heteropolímero natural linear formado por monómeros de ácido D-manurónico e L-gulurónico em percentagem variável. Quando em contacto com iões di ou multivalentes (i.e. Ba^{2+} , Ca^{2+}) o alginato forma um gel com uma estrutura tridimensional que possibilita o aprisionamento das leveduras no seu interior (Nussinovitch, 1997; Wang *et al.*, 2003). Para aplicações biotecnológicas, particularmente na indústria alimentar, as soluções de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) são as mais usadas, pois o cálcio não confere toxicidade alimentar (Nussinovitch, 2010).

Um problema associado à utilização deste tipo de imobilização está na libertação de microrganismos que se encontrem à superfície do suporte de imobilização, e o seu crescimento e replicação no meio fermentativo. Se em processos como a fermentação de mostos este fenómeno não traz problemas e poderá ser ainda vantajoso, na fermentação de espumante provoca turvação do vinho e formação de um depósito difícil de eliminar. Uma solução para este problema passa por utilizar células imobilizadas em dupla camada de alginato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Neste caso, o núcleo interno das esferas é constituído por alginato e células de levedura imobilizadas, enquanto a camada externa é desprovida de leveduras. Mantendo-se a integridade da camada externa evita-se a libertação e crescimento das células fora da matriz polimérica (Figura 3).

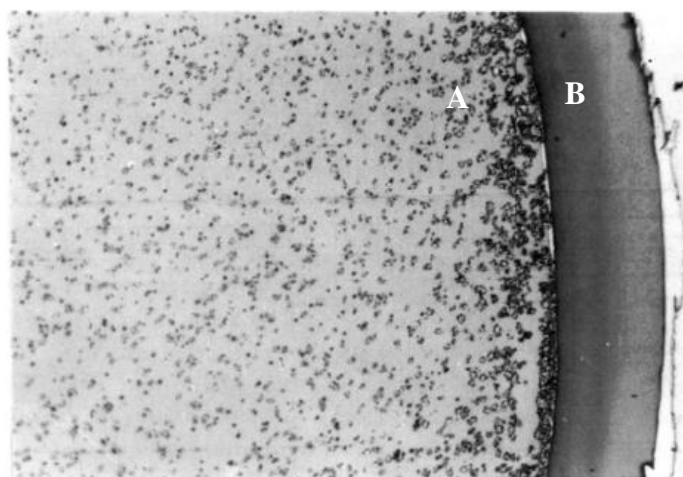


Figura 3 – Leveduras imobilizadas em dupla camada de alginato. A, camada interna composta por alginato e leveduras imobilizadas; B, camada externa de alginato desprovida de leveduras (Godia *et al.*, 1991)

A imobilização de microrganismos numa matriz de alginato é um processo inovador industrializado pela empresa Proenol que resultou de anos de investigação e desenvolvimento. Atualmente a empresa é líder mundial e disponibiliza ao enólogo uma larga gama de produtos para diferentes aplicações, onde se podem destacar as leveduras imobilizadas para produção de vinhos efervescentes (ProElif[®]) (Silva *et al.*, 2002a; Silva *et al.*, 2002b; Silva *et al.*, 2003; Portugal *et al.*, 2011).

2.2.4. Limitações difusionais de sistemas de células imobilizadas

Apesar das inúmeras vantagens que os sistemas de células imobilizadas trazem a vários bioprocessos, como é o caso da fermentação de espumantes, a imobilização poderá causar limitações difusionais acrescidas em comparação com culturas em suspensão (Shuler and Kargi, 2002b; Kosseva, 2011). A presença e a importância das limitações difusionais dependem das taxas relativas de bioconversão e de difusão, e poderão ser descritas pelo número de Damköhler (Da) (Bailey and Ollis, 1986; Shuler and Kargi, 2002b),

$$Da = \frac{v_{m\acute{a}x}}{k_s S_0} = \frac{\text{Taxa m\acute{a}xima de bioconvers\~{a}o}}{\text{taxa m\acute{a}xima de difus\~{a}o}} \quad (1)$$

onde $v_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade m\acute{a}xima da rea\~{c}\~{a}o, k_s o coeficiente de transfer\~{e}ncia de massa e S_0 a concentra\~{c}\~{a}o de substrato no meio de fermenta\~{c}\~{a}o.

Se $Da > 1$, a taxa de bioconvers\~{a}o (consumo de substrato) est\~{a} sujeita a limita\~{c}\~{o}es impostas por transfer\~{e}ncia de massa, ou seja, o sistema \acute{e} controlado pelos processos de difus\~{a}o; para $Da < 1$, o processo encontra-se controlado pela rea\~{c}\~{a}o de bioconvers\~{a}o, e as limita\~{c}\~{o}es \`{a} transfer\~{e}ncia de massa impostas pela imobiliza\~{c}\~{a}o s\~{a}o desprez\~{a}veis; por \acute{u}ltimo, se $Da \approx 1$, as taxas de bioconvers\~{a}o e de difus\~{a}o s\~{a}o semelhantes (Shuler and Kargi, 2002b).

As limita\~{c}\~{o}es \`{a} transfer\~{e}ncia de massa, que t\~{e}m origem nas resist\~{e}ncias difusionais de substratos e produtos entre o biocatalisador imobilizado e o meio fermentativo, podem ser classificadas como externas (entre o meio e a superf\~{i}cie do suporte de imobiliza\~{c}\~{a}o), internas (difus\~{a}o dos substratos/produtos no interior da matriz de imobiliza\~{c}\~{a}o) ou ambas.

As limitações internas são independentes do modo de operação ou geometria do bioreator, tendo origem nas propriedades do suporte de imobilização. Poderão ser minimizadas reduzindo o tamanho das partículas ou aumentando a porosidade da matriz. Note-se que a porosidade da matriz, tal como a sua resistência mecânica, é um parâmetro dependente da composição do alginato em ácido D-manurónico e L-gulurónico (Nussinovitch, 1997).

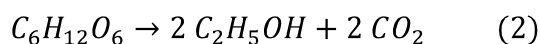
Por sua vez, as limitações externas são dependentes das condições de mistura do sistema, e poderão ser minimizadas impondo ou aumentando a agitação da fase líquida. Desta forma, uma eficiente mistura diminui dos gradientes de concentração de substrato no sistema, aumentando o contato superficial entre as fases sólida e líquida e conseqüentemente conduz a uma diminuição das limitações difusionais externas (Ferreira and Teixeira, 2003).

2.3. Bioquímica da fermentação de espumante

Tal como a maioria dos animais e bactérias, os fungos, onde se incluem as leveduras, são organismos quimiorganotróficos, que sintetizam a energia necessária ao seu metabolismo de crescimento e manutenção celular a partir da degradação de compostos orgânicos. Dependendo das condições aeróbias do sistema, as leveduras podem degradar os açúcares (glucose e frutose) por duas vias metabólicas distintas: respiração ou fermentação alcoólica.

À semelhança do que acontece em todos os vinhos, a produção de espumante é do ponto de vista bioquímico altamente complexa, englobando um conjunto de reações biológicas cujos produtos metabólicos estão na base das suas propriedades organolépticas. No entanto, no caso particular deste tipo de vinhos, a fermentação ocorre em condições anaeróbias estritas, pelo que a fermentação alcoólica é o metabolismo central que se verifica.

Esta via catabólica caracteriza-se pela transformação anaeróbia de monossacarídeos, glucose e frutose, em etanol e dióxido de carbono. O processo realizado por leveduras, onde se inclui o género *Saccharomyces*, pode ser traduzido de forma simplificada pela equação da reação:



Uma molécula de glucose/frutose origina duas moléculas de etanol e duas de dióxido de carbono através de um conjunto de reações enzimáticas que se iniciam com a glicólise para obtenção de piruvato (como acontece com a respiração) e posteriormente a sua conversão em dióxido de carbono e etanol (fermentação alcoólica). Neste capítulo serão descritas detalhadamente estas duas principais vias metabólicas.

2.3.1. Glicólise

A glicólise, que é provavelmente a via bioquímica mais bem estudada, consiste numa sequência de 10 reações enzimáticas que convertem uma molécula de glucose em duas de piruvato, com um balanço geral de produção de duas moléculas de ATP. Sendo uma via metabólica quase universal em sistemas biológicos, desempenha um papel fundamental no metabolismo energético das células, fornecendo uma parte significativa da energia livre usada pela maioria dos organismos e preparando a glucose e outros compostos para posterior degradação oxidativa (Voet *et al.*, 2006).

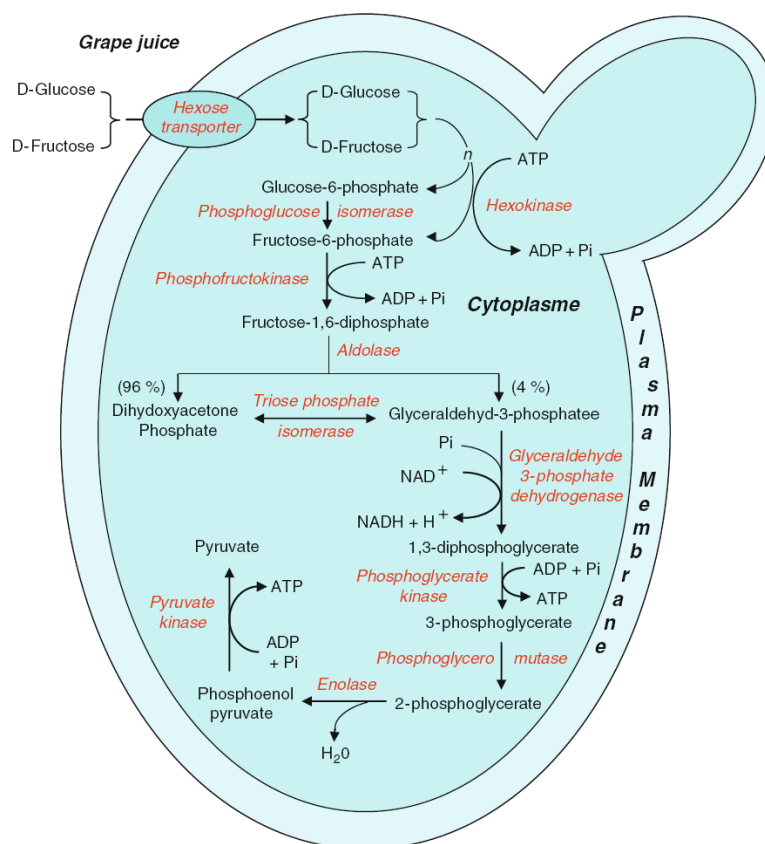


Figura 4 - Mecanismo bioquímico da glicólise (Moreno-Arribas e Polo, 2009)

A metabolização das hexoses (glucose e frutose) começa com o seu transporte através da membrana celular para o citoplasma, transporte que ocorre por gradiente de concentrações, nomeadamente por difusão facilitada, uma vez que a concentração dos açúcares no meio é superior à sua concentração no citoplasma. Não se trata de um sistema de transporte ativo, pelo que não há consumo de energia (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Após a entrada na célula, as hexoses são imediatamente fosforiladas, o que para além de permitir que estas moléculas entrem diretamente na via glicolítica, evita também que atravessem a membrana para o espaço extracelular, uma vez que as oses fosforiladas não atravessam a membrana com facilidade (Quintas and Ascenso, 2008).

A glicólise, que é a via mais utilizada pelas leveduras para obtenção de energia em condições anaeróbias, pode ser dividida em duas fases distintas, a fase de consumo de ATP, designada de fase preparatória, e a fase de retorno energético ou fase de produção de ATP.

Na fase preparatória, que engloba as cinco primeiras reações, há um investimento energético sob a forma de ATP para a sua realização, sendo todas as reações endergónicas. A glucose começa por ser fosforilada no grupo hidroxilo do carbono seis (C6) a glucose-6-fosfato por uma família de enzimas designadas de hexocinases (Zamora, 2009), havendo consumo de ATP. De seguida esta é isomerizada a frutose-6-fosfato pela fosfo-hexose isomerase. Catalisada pela fosfofrutocinase-1, a frutose-6-fosfato é fosforilada no primeiro carbono (C1) por transferência de um grupo fosfato do ATP obtendo-se a frutose-1,6-bisfosfato. Esta reação resulta no consumo de uma molécula de ATP. Na reação seguinte, a frutose-1,6-bisfosfato é clivada pela aldolase, originando duas moléculas de três carbonos cada, a gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona fosfato. Apenas um dos produtos da clivagem da aldolase (gliceraldeído-3-fosfato) continua a via glicolítica, pelo que o último passo da fase preparatória da glicólise consiste na conversão de di-hidroxiacetona em gliceraldeído-3-fosfato por ação da enzima triose-fosfato isomerase (Voet *et al.*, 1999b; Quintas and Ascenso, 2008).

Na segunda fase, fase de retorno, o gasto de duas moléculas de ATP é compensado pela formação de quatro moléculas. No primeiro passo desta segunda fase ocorre a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, com incorporação de um fosfato inorgânico. Esta reação envolve a oxidação do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enzima que tem como cofator uma molécula de NAD^+ . Na reação seguinte é produzida a primeira molécula de

ATP, através da transferência de um grupo fosfato do primeiro carbono da molécula de 1,3-bifosfoglicerato para uma molécula de ADP, formando-se o 3-fosfoglicerato. Nesta fase, catalisada pela fosfoglicerato cinase, as duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato provenientes da glucose geram duas moléculas de ATP. De seguida, a fosfoglicerato mutase converte o 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato, que é posteriormente desidratado a fosfoenolpiruvato pela enolase. Finalmente, o fosfoenolpiruvato transforma-se em piruvato, numa reação catalisada pela piruvato cinase, transferindo o seu grupo fosfato para uma molécula de ADP, formando-se uma molécula de ATP (Quintas and Ascenso, 2008).

Os mecanismos bioquímicos descritos têm por base as reações que ocorrem partindo da molécula de glucose, mas aplicam-se de igual forma à frutose. Tal como a glucose, a frutose é uma hexose que entra diretamente na via glicolítica através da hexocinase que a fosforila no carbono seis (C6) a 6-fosfato de frutose.

2.3.2. Fermentação alcoólica

Como referido anteriormente, quando em condições anaeróbias, as leveduras direcionam o seu metabolismo essencialmente para a conversão do piruvato, sintetizado na glicólise, a etanol de forma a regenerar o NAD^+ . Este processo é designado de fermentação alcoólica (Zamora, 2009).

A fermentação alcoólica é composta por duas reações enzimáticas consecutivas, a primeira de descarboxilação do piruvato e a segunda de redução do acetaldeído. De enorme interesse prático, particularmente na indústria alimentar, a biossíntese de etanol é acompanhada pela biossíntese de dióxido de carbono em concentração equimolar: a descarboxilação do piruvato, com origem na glicólise, forma acetaldeído e CO_2 e é catalisada pela enzima piruvato descarboxilase (enzima que não se encontra presente nos animais). Posteriormente, dá-se a redução do acetaldeído a etanol pelo NADH, reação catalisada pela álcool desidrogenase, com regeneração de NAD^+ utilizado na glicólise (Voet *et al.*, 2006).

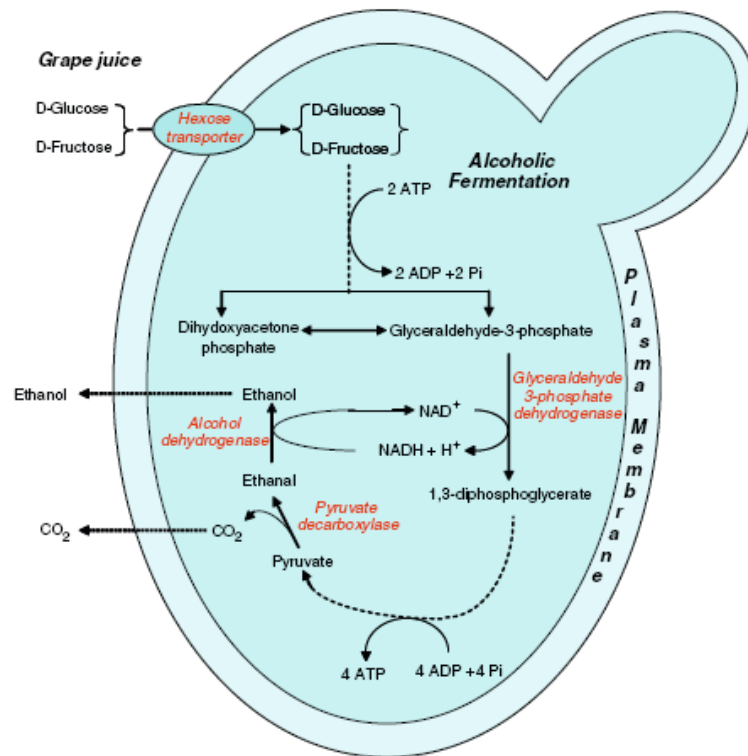


Figura 5 – Mecanismo bioquímico da fermentação alcoólica (Moreno-Arribas e Polo, 2009)

A enzima piruvato descarboxilase usa como cofator essencial a tiamina pirofosfato (TPP). Esta molécula, sintetizada a partir da tiamina (vitamina B1), forma uma forte ligação com a enzima, apesar de não covalente, dando origem a um complexo intermediário que facilita a redução do acetaldeído a etanol pelo NADH (Voet *et al.*, 2006). Mais precisamente, o átomo de carbono localizado entre o de azoto e enxofre do grupo tiazol é ionizado (Figura 6), formando um carboânion que rapidamente se combina com o grupo carbonilo do piruvato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). A descarboxilação do piruvato resulta na síntese e libertação de dióxido de carbono.

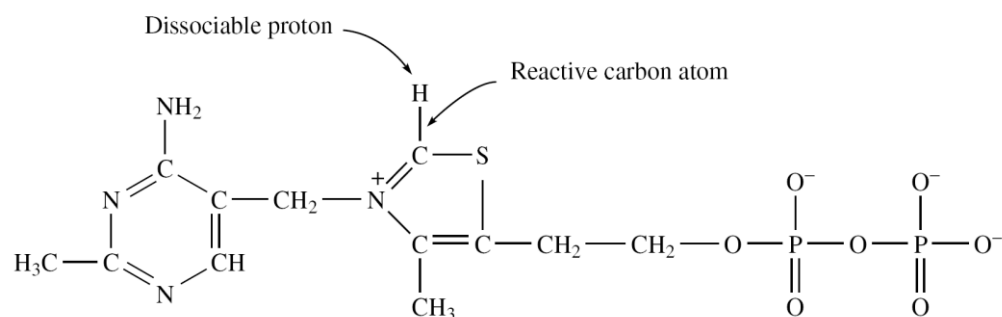


Figura 6 - Estrutura química da tiamina pirofosfato (TPP) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006)

Os produtos finais da fermentação alcoólica, etanol e CO₂, são libertados para o exterior da célula por difusão simples (Zamora, 2009).

Do ponto de vista energético, a glicólise seguida da fermentação alcoólica fornece à célula duas moléculas de ATP por cada molécula de glucose metabolizada, ou 14,6 kcal/mol de glucose. Do ponto de vista termodinâmico, a variação da energia livre durante a degradação de uma mole de glucose em etanol e dióxido de carbono é -40 kcal. A diferença, 25,4 kcal, é dissipada sob a forma de calor (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

2.4.Cinética de Michaelis-Menten

A atividade microbiana durante um bioprocessos pode ser considerada como um grande conjunto de reações bioquímicas que convertem os substratos em produtos do metabolismo ou que asseguram a manutenção e crescimento celular (equação 3) (Shuler and Kargi, 2002a; Nielsen, 2006).

$$\Delta S = \Delta S_{Biomassa} + \Delta S_{Manutenção\ celular} + \Delta S_{Produtos\ do\ metabolismo} \quad (3)$$

Quando se opera com microrganismos imobilizados, neste caso leveduras, admite-se que a restrição espacial a que as células estão sujeitas impede que se multipliquem, garantindo que o crescimento é bastante baixo e desprezável em relação a culturas livres do mesmo microrganismo. Por outro lado, em condições anaeróbias o metabolismo microbiano da fermentação alcoólica pode ser considerado como um conjunto de reações enzimáticas sequenciais que permitem a conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono. Assim considera-se que nesta fermentação o substrato utilizado é convertido apenas a produtos da fermentação alcoólica e não para funções de crescimento e manutenção microbiana. Partindo deste pressuposto, o tratamento cinético e o cálculo dos parâmetros cinéticos deste sistema foram determinados por aplicação do modelo de Michaelis-Menten, admitindo-se que há um comportamento meramente enzimático por parte das leveduras, que atuam apenas como biocatalisadores enzimáticos. Este tipo de abordagem já foi previamente adotada com outro tipo de leveduras imobilizadas em esferas de alginato ao usar o modelo de Michaelis-Menten (Nogueira, 2009).

A expressão matemática básica para descrição de cinéticas enzimáticas é a equação de Michaelis-Menten (equação 4). Este modelo é baseado em dados experimentais de ensaios em descontínuo, para fermentadores com volume de fluido constante em que a concentração de enzima (E_0) e substrato (S_0) são conhecidas, e pressupõe que a reação enzimática utiliza um único substrato, a concentração de enzima se mantém constante ao longo do tempo, o complexo enzima-substrato é rapidamente estabelecido, a reação de formação dos produtos é irreversível e não há inibição da atividade catalítica da enzima impostas pelo substrato ou pelo produto (Voet *et al.*, 1999a; Shuler and Kargi, 2002b)

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x}S}{K_M + S} \quad (4)$$

A velocidade máxima da reação, $v_{m\acute{a}x}$, verifica-se apenas para concentrações de substrato elevadas, quando o biocatalisador se encontra saturado. Neste caso, o valor da constante de Michaelis-Menten, K_M , é significativamente inferior à concentração de substrato do meio e a equação aproxima-se de uma cinética de ordem zero, independente da concentração de substrato (equação 5).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}S}{K_M + S} \xrightarrow{K_M \ll S} v = v_{m\acute{a}x} \quad (5)$$

Por sua vez, se K_M é significativamente superior a S , a velocidade da reação depende linearmente da concentração de substrato e a equação de Michaelis-Mente aproxima-se de uma reação de primeira ordem (equação 6).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}S}{K_M + S} \xrightarrow{K_M \gg S} v = \frac{v_{m\acute{a}x}}{K_M} S \quad (6)$$

A determinação dos valores de K_M e $v_{m\acute{a}x}$ com precisão poderá ser difícil. Tipicamente, estes parâmetros são calculados pelo método das velocidades iniciais, onde se realizam vários ensaios para diferentes concentrações conhecidas de substrato. Os parâmetros cinéticos são determinados a partir dos dados obtidos experimentalmente,

recorrendo-se a vários métodos de análise de dados, como os métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee ou Hanes-Woolf (Voet *et al.*, 1999a; Shuler and Kargi, 2002b).

Na prática a determinação dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten pelo método das velocidades iniciais nem sempre é acessível e executável. Uma das alternativas é recorrer à forma integrada da equação de Michaelis-Menten (equação 7) (Bezerra and Dias, 2007)

$$v_{max}t = [S_0] - [S] + K_M \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (7)$$

Onde $[S_0]$ é a concentração inicial de substrato.

A forma integrada da equação de Michaelis-Menten permite estimar o intervalo de tempo para o qual se verifica uma determinada variação da concentração de substrato do meio.

2.5. Estabilização tartárica do vinho base

A maior instabilidade física que se verifica nos vinhos está na precipitação de sais de tartarato. Este fenómeno é inócuo para a saúde (Santos *et al.*, 2000), mas censurável pelos consumidores e visto como um indicador do mau controlo de qualidade. A estabilização tartárica torna-se assim numa fase crítica do processo de vinificação e adquire especial importância na produção de vinho espumante.

Devido aos baixos valores de pH característicos do vinho, ocorre a dissociação do ácido tartárico (H_2T), um ácido orgânico forte presente em maior concentração nos vinhos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006c), nas suas formas iónicas e na presença obrigatória dos catiões K^+ e Ca^{2+} dá origem às suas formas salinas predominantes de hidrogenotartarato de potássio ou bitartarato de potássio (KTH) e tartarato de cálcio (CaT). O aumento da concentração de etanol durante a fermentação e as baixas temperaturas aplicadas durante o armazenamento do vinho conduz a uma diminuição acentuada da solubilidade dos sais e sua precipitação (Marchal and Jeandet, 2009). A Figura 7 ilustra os equilíbrios de dissociação do ácido tartárico e respetivos valores de pKa.

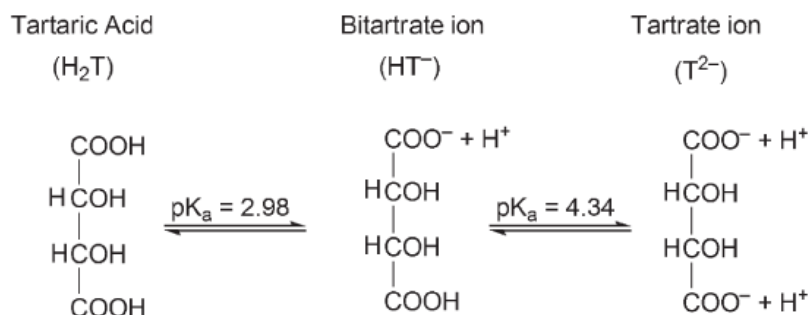


Figura 7 - Dissociação do ácido tartárico e respectivos valores de pKa (Ronald S, 2008)

Para além de a instabilidade tartárica ser um fenómeno fortemente relacionado com a qualidade dos vinhos, no processo de produção de espumante o controlo da instabilidade tartárica é fundamental e indispensável. As microcavidades na superfície do vidro ou das partículas em suspensão, especialmente dos microcristais dos sais de tartarato, podem levar à formação excessiva de bolhas de dióxido de carbono à sua superfície e à sua libertação causando uma efervescência excessiva quando a garrafa é aberta (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006c). Este fenómeno poderá ser responsável pela perda de grandes quantidades de vinho quando se abrem as garrafas durante o *dégorgement* ou no momento do consumo.

Hoje em dia os produtores utilizam duas tecnologias de prevenção da instabilidade tartárica que se baseiam na cristalização dos sais: estabilização lenta por frio sem adição de KTH e estabilização rápida por frio com adição de KTH. Embora não partilhem o mesmo mecanismo de cristalização, ambas as tecnologias se baseiam na nucleação e cristalização dos sais de tartarato a baixas temperaturas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006c).

No primeiro caso submete-se o vinho a uma temperatura de cerca de -4°C, próxima do seu ponto de fusão, durante aproximadamente duas semanas (Ronald S, 2008a). Este processo relativamente longo inicia-se com a nucleação primária dos sais, seu crescimento e conseqüente precipitação, e finalmente a sua remoção por filtração do vinho.

No segundo caso, estabilização rápida por frio com adição de KTH, o vinho é submetido a uma temperatura de 0°C e a primeira fase da nucleação primária é substituída por uma rápida e homogénea nucleação secundária. A nucleação secundária é induzida pela adição de grandes quantidades de microcristais de KTH ao vinho, e o aumento da concentração leva ao aumento da saturação do meio, conduzindo à formação de cristais de dimensões superiores que precipitam.

Apesar de estes serem os mais utilizados na estabilização tartárica, têm-se procurado desenvolver nos últimos anos novos métodos mais práticos e economicamente mais vantajosos relativamente à estabilização por frio, e que se baseiam na prevenção da precipitação desses sais pela adição de inibidores de cristalização. Tem-se usado o ácido metatartárico, manoproteínas de levedura e carboximetilcelulose (CMC) como potenciais inibidores de cristalização, impedindo a nucleação dos sais de tartarato em solução e consequentemente a formação de cristais de maiores dimensões.

O ácido metatartárico é atualmente o inibidor mais utilizado na estabilização de vinhos, no entanto a sua eficácia é baixa, tendo em conta que o produto não se mantém estável ao longo do tempo. As manoproteínas de levedura possuem propriedades estabilizantes ótimas que resultam no aumento da estabilidade quer dos sais de tartarato, quer das proteínas, mas o tratamento com CMC é seguramente o processo mais vantajoso em termos de custos.

A aplicação de CMC é a mais recentemente tecnologia, e tem sido utilizada nos últimos anos em processos de vinificação para se avaliar a sua capacidade de estabilização dos vinhos no que diz respeito à precipitação de sais de tartarato. Recentemente aprovada para aplicação em práticas enológicas como estabilizante tartárico em países da Comunidade Europeia (2009), a CMC já é utilizada na indústria alimentar como aditivo alimentar, essencialmente como agente emulsionante na preparação de muitos alimentos, incluindo gelados, iogurtes e molhos, entre outros, tal como na indústria cosmética e farmacêutica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006c). Apesar de tudo, em enologia esta é uma área em desenvolvimento e a sua aplicação encontra-se ainda sob forte investigação. Será objeto de estudo neste trabalho, pelo que é apresentada uma descrição mais detalhada dos seus fundamentos neste capítulo.

2.5.1. Carboximetilcelulose para estabilização tartárica de espumantes

A carboximetilcelulose (CMC) ou goma de celulose é um polissacarídeo formado por monómeros de β -D-glucose cujos grupos álcool primário ou secundário são esterificados por grupos de acetato de sódio ($-\text{CH}_2-\text{COONa}$).

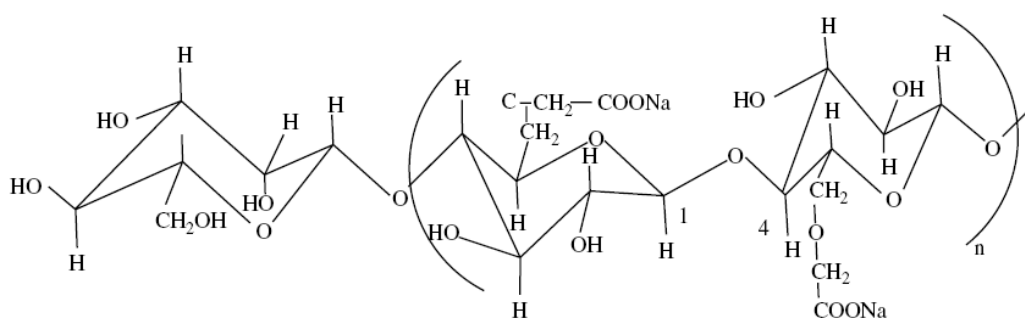


Figura 8 - Estrutura molecular da CMC (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006)

Tal como o ácido metatartárico e as manoproteínas de levedura, a estrutura polimérica da CMC induz uma proteção coloidal contra a precipitação dos sais de tartarato do vinho, evitando quer a nucleação dos cristais, quer o potencial crescimento de microcristais já presentes no vinho.

Este polímero é caracterizado pelo seu grau de polimerização, número de monómeros da cadeia polimérica, e grau de substituição, número de grupos álcool primário ou secundário esterificados. Este último parâmetro está normalmente compreendido entre 0,60-0,95 esterificações por monómero. O grau de polimerização determina a viscosidade da CMC e aumenta com o peso molecular, que deverá variar entre 17000 e 300000 Daltons (Resolution OIV/OENO 366/2009). Para um determinado grau de polimerização, quanto maior o grau de substituição maior o poder efetivo de proteção coloidal.

Na base da aprovação da CMC para estabilização tartárica estão estudos realizados em França (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006d) que mostraram que a aplicação de CMC com baixo grau de substituição (entre 0,65 e 0,90), baixo grau de polimerização, elevado grau de pureza (99.5%) e com doses a variar entre 2 g/hL e 4 g/hL conseguiu a estabilização de vários vinhos tintos e brancos. O efeito de estabilização manteve-se mesmo após tratamento por calor dos vinhos a temperaturas entre 55 e 60 °C durante um período de tempo de 5 a 30 dias, seguido de um período a -4 °C durante um mês, mostrando a elevada termoestabilidade da CMC comparada com a do ácido metatartárico (Marchal and Jeandet, 2009). Para além destes resultados, uma propriedade importante deste polímero quando aplicado nessa gama de concentrações é não afetar as propriedades organolépticas dos vinhos (Crachereau *et al.*, 2001). Note-se que as concentrações referidas são cerca de 12 a 250 vezes inferior aquelas utilizadas em outras aplicações na indústria alimentar.

Os resultados positivos apresentados por este método para estabilização tartárica do vinho, associado à sua fácil aplicação, baixo custo, e não exigência de investimento de capital elevado para aplicação do mesmo, conferem-lhe um enorme potencial de aplicabilidade nesta área.

A União Europeia autoriza a aplicação de CMC para assegurar a estabilização tartárica “do vinho e em todas as categorias de vinhos espumantes e de vinhos frisantes” (Regulamento (CE) N° 606/2009), com uma dose máxima legal autorizada de 100 mg/L.

2.6.O bioreator

O bioreator é a unidade processual fundamental em qualquer processo biotecnológico, onde culturas de microrganismos, células animais ou vegetais são utilizados para obtenção de produtos ou serviços que resultem da fermentação e/ou crescimento celular dos mesmos (Raj and Karanth, 2006; Teixeira *et al.*, 2007).

Abrangendo um largo espectro de dimensões e aplicações, que vão desde a indústria farmacêutica até ao tratamento biológico de efluentes, passando pela indústria alimentar, os bioreatores deverão ser projetados de forma a proporcionar as condições ótimas de crescimento e atividade metabólica dos biocatalisadores, tendo em conta os objetivos do bioprocessamento. A sua eficiência e desempenho são dependentes de inúmeras variáveis que necessitam ser controladas e integradas nas condições específicas do bioprocessamento, para que a produtividade seja maximizada. A integração das características fisiológicas do biocatalisador com o design do bioreator e definição do seu modo de operação constitui um fator importante para que todo o desempenho do processo seja ótimo.

Industrialmente, os bioreatores são classificados de acordo com as suas geometrias e modos de operação (Raj and Karanth, 2006). As configurações são variadas, mas são largamente mais utilizadas as de tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado, coluna de bolhas e circulação por arejamento (Teixeira *et al.*, 2007). Quando estão envolvidos sistemas de células imobilizadas, à semelhança deste trabalho, leito fixo e leito fluidizado são sem dúvida os tipos de reatores mais utilizados, que se caracterizam por um movimento constante do substrato através do leito que contém o biocatalisador imobilizado, permitindo obter velocidades de fermentação elevadas.

O reator de leito fixo é funcionalmente o mais simples, mas as baixas velocidades de circulação do fluido podem induzir elevadas limitações à transferência de massa e de calor entre os suportes de imobilização e o meio fermentativo, para além de existir o risco de compactação do leito, e em último caso problemas associados à oclusão dos metabolitos gasosos (i.e., dióxido de carbono) (Teixeira *et al.*, 2007). Na tentativa de eliminar ou atenuar os problemas associados ao leito fixo, aumenta-se a velocidade superficial do fluido para se promover a expansão do leito e conseqüentemente trabalhar em regime de fluidização. Os efeitos hidrodinâmicos que se conseguem num fermentador de leito fluidizado promovem uma boa mistura entre fases (gás-líquido-sólido). As principais vantagens são o aumento dos coeficientes de transferência de massa e calor e da área interfacial (Moser, 1988).

Na operação com biocatalisadores imobilizados, os reatores de leito fluidizado estão dependentes de vários fatores físicos que determinam o correto funcionamento do mesmo, com a fluidização do leito a ser diretamente dependente das propriedades das partículas do leito e da fase móvel, no caso particular deste trabalho, das esferas de alginato e do meio de fermentação.

Quando se projeta um reator de leito fluidizado para operar com biocatalisadores imobilizados, dois dos principais parâmetros a ter em conta são a velocidade mínima superficial (velocidade mínima de fluidização), representada por U_{mf} (cm s^{-1}), e velocidade máxima superficial do líquido (velocidade máxima de fluidização), $U_{max,f}$ (cm s^{-1}). U_{mf} e $U_{max,f}$ determinam os caudais máximos e mínimos de recirculação do meio fermentativo impostos pela bomba de recirculação. Na prática, $U_{max,f}$ deverá coincidir com a velocidade terminal da partícula (U_t) e o fluxo no interior do reator deverá estar compreendido entre U_{mf} e U_t . No caso de $U_{max,f}$ ser superior a U_t ocorrerá transporte hidráulico das células imobilizadas do reator; por sua vez, U_{mf} é a velocidade mínima necessária para manter o leito fluidizado, pelo que velocidades inferiores levam à formação de um leito fixo (Fouad Sarrouh *et al.*, 2008).

Quanto ao modo de operação, uma particularidade de todos os métodos de produção de espumante, com exceção do Método Contínuo, é o funcionamento em descontínuo (*batch*). Em fermentadores a operar em modo descontínuo, há uma variação típica da concentração de substrato e produto em função do tempo, com a concentração de produto a aumentar enquanto há consumo de substrato. Neste processo todos os nutrientes

são adicionados ao meio fermentativo no início e o produto da fermentação (espumante) é extraído apenas no final da mesma.

A complexidade do metabolismo dos organismos e os objetivos específicos de cada bioprocessos implica o uso de técnicas de monitorização e controlo dos vários parâmetros que garantem as condições ótimas da operação. As variáveis a controlar no processo fermentativo são classificadas em físicas, químicas e biológicas (Raj and Karanth, 2006). Algumas das mais importantes em processos biológicos, particularmente em fermentação de espumante, são a temperatura, o caudal de recirculação do fluido (vinho), a pressão, o pH, o dióxido de carbono dissolvido e etanol.

3. Materiais e Métodos

3.1. Microorganismo

As leveduras utilizadas nos ensaios são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*, leveduras secas ativas adaptadas às condições de fermentação de espumantes, imobilizadas em alginato de cálcio. A imobilização foi realizada por protocolo desenvolvido e industrializado pela Proenol (V. N. de Gaia). As esferas desidratadas, conhecidas comercialmente por ProElif[®], foram conservadas a 4 °C até à sua utilização.

O produto ProElif[®] foi inoculado sem necessidade de reidratação prévia, garantindo-se apenas que a diferença de temperatura entre as esferas e o vinho a espumantizar não era superior a 10 °C, de forma a evitar um choque térmico das leveduras.

3.2. Vinho base

O vinho base foi produzido a partir de uvas brancas e conservado em cisternas nas instalações da Proenol até à sua utilização. No início de cada ensaio foram realizados os ajustes necessários ao vinho base, adicionando-se tiamina (0,3 mg/L), fosfato de diamónio (DAP) para se assegurar uma concentração de azoto facilmente assimilável de 100 mg/L e Adjuvante 40 para se obter a concentração de glucose/frutose inicial de cerca de 21 g/L. O Adjuvante 40 é um xarope de açúcar invertido (glucose+frutose) comercializado pela Proenol, adequado para aplicações na indústria alimentar, em particular na produção de vinho espumante.

Todos os ensaios foram realizados utilizando o mesmo vinho base (lote 1), com exceção dos ensaios de estabilização tartárica, onde foi utilizado um lote de vinho não estabilizado (lote 2). A composição dos dois vinhos base é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização dos dois lotes de vinho base utilizados nos ensaios

	pH	Etanol (g/L)	SO ₂ (mg/L)		Glucose/Frutose (g/L)	NFA (mg/L)	Ác. Málico (g/L)	Densidade (g/dm ³)	Acidez total (g/L)	T ^a saturação (°C)
			Livre	Total						
Lote 1	2,98	78,2	14	87	0,51	75,6	1,03	991	6,2	6,75
Lote 2	2,97	85,5	18	91	0,46	112	2,19	993	8,0	15,75

3.3.Fermentação

A fermentação do vinho base ocorreu num fermentador de cuba fechada de inox, provido de um manómetro para monitorização da pressão e sistema de monitorização e controlo da temperatura. Os ensaios realizaram-se em descontínuo (*batch*), promovendo-se a recirculação de 100 L de vinho base pelo fermentador com auxílio de uma bomba magnética ligada ao sistema. Iniciava-se a fermentação com a inoculação das leveduras imobilizadas desidratadas, tal como são fornecidas aos produtores.

Realizaram-se ensaios para avaliar o efeito de diferentes cargas de ProElif[®] aplicadas, 1,6 g/L, 4,0 g/L e 6,4 g/L, e diferentes caudais de recirculação do vinho base, 38 L/h e 207 L/h.

A fermentação ocorreu a temperatura controlada de 20 ± 1 °C, registando-se diariamente a pressão e temperatura do sistema, tal como se recolheram amostras para análise de açúcares redutores.

3.4.Montagem experimental

O fermentador de cuba fechada, representado na Figura 9, consiste num sistema projetado à escala piloto para fermentação de espumante. Construído totalmente em aço inox, o sistema é formado por três componentes principais: fermentador com capacidade volúmetrica de 5,88 L, depósito de 110 L e uma bomba magnética Tuthill Serie D. A bomba, com capacidade para operar a caudais na gama de 38 a 207 L/h, trabalha em contínuo e promove a recirculação do vinho do depósito pelo fermentador. Entre a bomba e o fermentador encontra-se instalado um rotâmetro que permite monitorizar o caudal de recirculação a que a bomba opera.

O sistema possui um conjunto de válvulas essenciais durante o processo de limpeza e desinfeção, mas que o mantêm fechado durante o processo fermentativo. Na parte superior do fermentador encontra-se instalada uma válvula para recolha de amostras ao longo do tempo.

No topo do depósito foi instalado um manómetro para monitorização da pressão e na base a sonda de temperatura. No interior instalou-se uma serpentina para controlo da temperatura.

Na tubagem que liga o depósito à bomba de recirculação colocou-se um filtro de 200 μm que evita que eventuais partículas de dimensões superiores entrem em contacto com a bomba e a danifiquem.

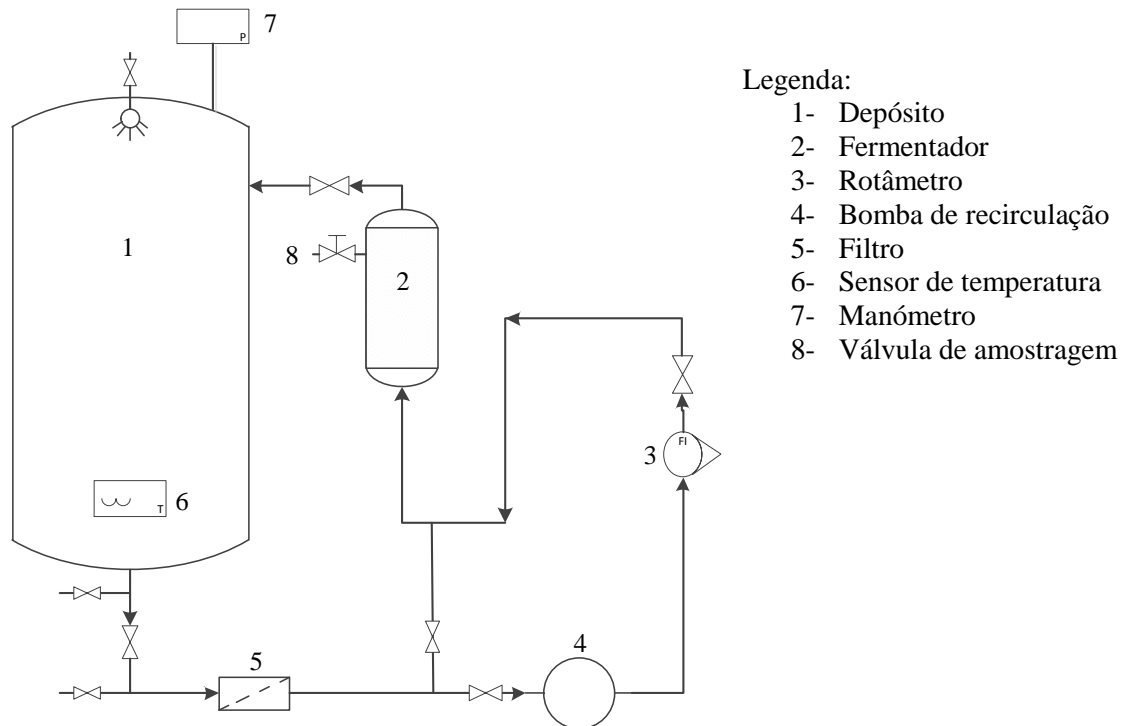


Figura 9 - Representação esquemática da montagem experimental do fermentador de cuba fechada

3.5. Desinfecção do sistema e esterilização do vinho base

A limpeza e desinfecção do sistema visam garantir a segurança microbiológica e níveis de higienização adequados, conseguida por aplicação de produtos de limpeza e desinfecção indicados para utilização em indústria alimentar.

Antes de cada ensaio fez-se passar pelo sistema durante 15 minutos uma solução de Deogen (VS7) a 2% (v/v), um detergente desinfetante alcalino clorado, seguindo-se o seu enxaguamento com água quente à medida que se realizava o teste do pH para verificar a presença do produto no sistema.

Após esta etapa procedeu-se à desinfecção do sistema durante 15 minutos com uma solução 1% (v/v) de Divosan Activ (VT5), um desinfetante à base de ácido paracético altamente eficaz contra todos os tipos de microrganismos. Para remoção do produto

passou-se água fria pelo sistema, à medida que se realizava o teste colorimétrico sensível ao ácido paracético.

Para além da desinfeção do sistema, que era realizada entre cada ensaio, efetuava-se ainda a esterilização húmida ocasionalmente, com passagem de vapor de água a temperatura superior a 100 °C durante 20-30 minutos.

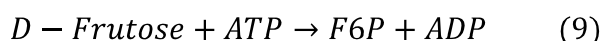
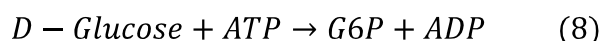
O vinho base foi filtrado por um sistema de filtração de 0,45 µm, que garantia a sua esterilidade, enquanto era transferido para o depósito do fermentador de cuba fechada, depois de serem realizados os necessários ajustes referidos anteriormente.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Açúcares redutores

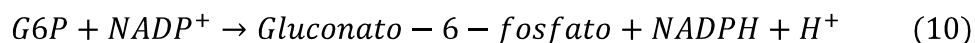
A concentração dos açúcares redutores D-Glucose/D-Fructose foi determinada por método enzimático com o Kit K-FRUGL da Megazyme (Wicklow, Ireland) num analisador enzimático sequencial (ABX Pentra 400; Horiba, Kyoto, Japan). A gama de linearidade deste método é até 5 g/L, pelo que foi necessário diluir as amostras com concentrações superiores, recorrendo a material com rigor volumétrico.

O método consiste na fosforilação da D-Glucose e D-Fructose pelo ATP em glucose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), respetivamente, numa reação catalisada pela hexocinase.



A F6P é convertida em G6P pela fosfoglucose isomerase (PGI).

Na presença da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), a G6P é oxidada pelo nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP⁺) a gluconato-6-fosfato, com formação de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido (NADPH) (equação 3):



A quantidade de NADPH formada durante a reação é proporcional à quantidade de glucose. O NADPH é determinado por espectrofotometria a 340nm.

3.6.2. Etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento, modelo Hitachi L-2000 Series, é composto por um detector de índice de refração Hitachi L-2490, uma bomba Hitachi L-2130, um injetor automático Hitachi L-2290 (20 µL), um forno G ECKO 2000 a 40°C e uma coluna Eurokat H (300x8) com partículas de dimensão 10 µm. Foi utilizada uma solução de H₂SO₄ (0,01N) como eluente, alimentada a um caudal de 0,4 mL/min.

3.6.3. Viabilidade celular

A viabilidade celular das leveduras imobilizadas em esferas de alginato foi determinada dissolvendo 20 esferas em solução de citrato de sódio a 1%, procedendo-se posteriormente à contagem ao microscópio utilizando azul de metileno como técnica de coloração para diferenciar células vivas e células mortas (Lee *et al.*, 1981).

3.7. Observação das esferas de alginato ao microscópio ótico

A preparação das esferas de alginato para observação ao microscópio seguiu o protocolo proposto por Vives e seus colaboradores (Vives *et al.*, 1993), com pequenas alterações.

As esferas foram fixadas numa solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato durante 2 horas, seguindo-se a sua lavagem em solução tampão cacodilato durante 20 minutos. Após a etapa de fixação seguiu-se a desidratação, com passagem das esferas progressivamente por soluções de etanol de concentração crescente (30, 50, 70, 96 e 100%) e óxido de propileno durante 20 minutos cada. Finalmente, as esferas foram embebidas em resina Spurr e os blocos que se obtiveram cortados transversalmente em

secções de 1,5 μm de espessura num ultramicrotomo Leica EM UC6, que foram coradas com o corante azul de toluidina e observadas ao microscópio ótico Zeiss Axioskop equipado com uma câmara digital Zeiss Axicam HRc.

3.8.Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten foi realizada com auxílio da ferramenta de análise de dados SOLVER do programa Microsoft Office Excel 2007. Trata-se de uma ferramenta de análise de hipóteses que localiza um valor ideal de uma célula de destino alterando valores em células utilizadas para calcular a célula destino.

No caso específico deste trabalho, a célula de destino foi o somatório do erro entre os valores determinados pelo modelo e os valores reais, e as células utilizadas para calcular a célula destino as células correspondentes aos parâmetros velocidade máxima de consumo de substrato e constante de Michaelis-Menten, $v_{m\acute{a}x}$ e K_M respetivamente.

Inicialmente, para aplicação do modelo de Michaelis-Menten, atribuíram-se valores aleatórios aos parâmetros cinéticos, $v_{m\acute{a}x} = 1$ e $K_M = 1$. A partir do modelo, e pelo método das diferenças finitas, estimou-se o intervalo de tempo para o qual se verificavam as variações de substrato experimentais, embora com um erro associado bastante elevado. O passo seguinte passou pela minimização desse erro.

Assim, calculou-se o somatório do erro do universo de dados experimentais analisados e aplicou-se a ferramenta SOLVER, que permitiu minimizar o erro (célula de destino) fazendo variar os parâmetros $v_{m\acute{a}x}$ e K_M (células utilizadas para calcular a célula destino). Após minimização do erro, os valores de velocidade máxima e constante de Michaelis-Menten determinados por ajuste correspondiam aos parâmetros cinéticos que caracterizavam o bioprocessos.

4. Resultados e Discussão

Este trabalho consistiu no estudo da cinética fermentativa da produção de espumante em descontínuo, num fermentador de cuba fechada com recirculação, utilizando leveduras imobilizadas em alginato de cálcio (ProElif[®]). Iniciou-se com a caracterização das esferas de ProElif[®] e determinação de alguns parâmetros operacionais do sistema, partindo-se posteriormente para os ensaios fermentativos. Neste âmbito fez-se a avaliação do efeito do caudal de recirculação do vinho base e da dose de ProElif[®] aplicada na cinética fermentativa de produção de espumante. Realizaram-se ainda ensaios com vinho não estabilizado para avaliar o efeito da aplicação de carboximetilcelulose na estabilização tartárica, e finalmente ensaios de reutilização das esferas de ProElif[®] em ciclos fermentativos consecutivos.

4.1. Caracterização física das esferas ProElif[®] e determinação de alguns parâmetros operacionais do sistema

O desempenho de fermentadores de leito fluidizado, principalmente direcionado para operação com biocatalisadores imobilizados, depende de vários fatores físicos, com a fluidização do leito a ser condicionada pelas propriedades das partículas do leito, neste caso pelas esferas de alginato, e pelas características da fase móvel (meio de fermentação).

Este estudo, que precedeu os estudos cinéticos da fermentação de espumante, consistiu na caracterização física das esferas de alginato com células imobilizadas (ProElif[®]) e do leito para determinação da velocidade mínima de fluidização (U_{mf}) a que o fermentador deverá operar. A U_{mf} é um dos parâmetros mais importantes quando se opera com fermentadores de leito fluidizado e poderá sofrer alterações significativas dependendo das particularidades do bioprocessamento.

4.1.1. Caracterização das esferas de alginato ProElif[®]

4.1.1.1. Diâmetro

O diâmetro médio das esferas de alginato ProElif[®] desidratadas e hidratadas foi calculado por análise computacional de fotografias das mesmas obtidas à lupa (Fig. 10 e 11), com o software *ImageJ*. Como se observa nas imagens, as esferas, quer desidratadas

quer hidratadas, apresentam uma superfície irregular e uma forma não totalmente esférica, pelo que o seu diâmetro médio foi determinado a partir da sua área projetada sobre um fundo de referência (papel milimétrico), partindo de uma amostra aleatória.

Para aproximar as condições de hidratação às condições reais de fermentação, as esferas foram hidratadas à temperatura ambiente num volume de vinho branco cerca de cinco vezes superior à sua massa, durante um período de aproximadamente 15 horas. Durante o período de hidratação verificou-se a libertação de dióxido de carbono, indicando que as leveduras iniciaram o processo de fermentação dos açúcares presentes na matriz de imobilização e dos açúcares residuais do vinho.

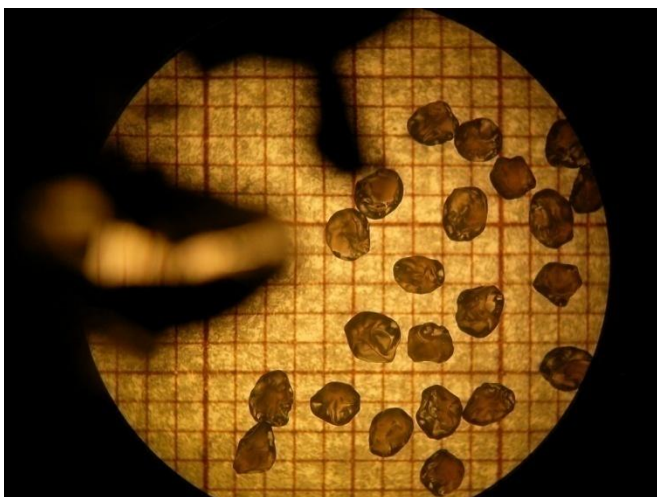


Figura 10 - Fotografia à lupa de esferas desidratadas

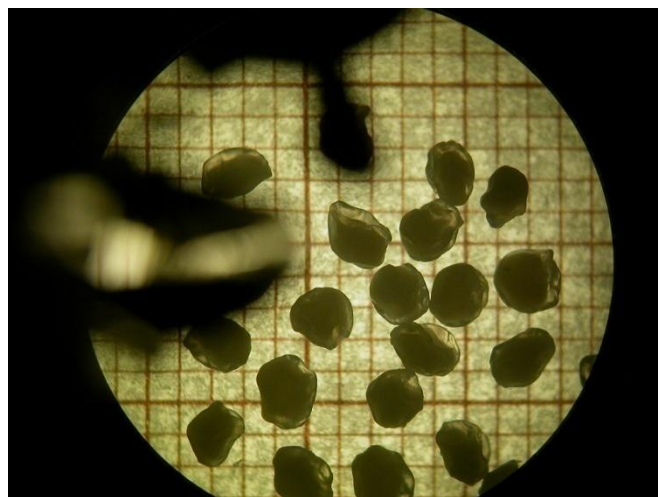


Figura 11 - Fotografia à lupa de esferas hidratadas

Esferas desidratadas e hidratadas possuem um diâmetro médio de 1,573 mm e 1,928 mm, respetivamente, como se pode observar pelos valores registados nas Tabelas 3 e 4. A hidratação é um fenómeno espontâneo que ocorre gradualmente assim que as esferas entram em contacto com uma solução aquosa, e que conduz a um aumento do seu tamanho de cerca de 36%.

Tabela 3 - Área e diâmetro das esferas desidratadas

	Área (mm ²)	Diâmetro (mm)
1	1,843	
2	2,126	
3	1,773	
4	2,466	
5	1,672	
6	2,183	
7	1,842	
8	1,637	
9	2,071	
10	1,829	-
11	1,724	
12	2,259	
13	2,091	
14	2,066	
15	1,658	
16	2,316	
17	1,629	
18	1,853	
19	1,903	
Média	1,944±0,250	1,573

Tabela 4 - Área e diâmetro das esferas hidratadas

	Área (mm ²)	Diâmetro (mm)
1	2,601	
2	3,609	
3	2,874	
4	3,018	
5	2,754	
6	2,739	
7	2,961	
8	2,887	
9	3,6	
10	3,025	
11	2,951	
12	3,217	
13	2,979	
14	2,213	
15	2,556	
16	2,798	
Média	2,919±0,353	1,928

Os resultados obtidos serão necessários para o cálculo da velocidade mínima de fluidização do leito.

4.1.1.2. Volume e densidade das esferas e porosidade do leito

O cálculo da densidade das esferas de alginato hidratadas foi precedido da determinação do volume das mesmas. Para isso, numa proveta graduada, a uma quantidade conhecida de esferas hidratadas foi adicionado um volume de água também conhecido, sendo o volume ocupado pelas esferas dado pela diferença entre o volume final e o volume de água adicionado.

$$V_{esferas} = V_{final} - V_{água} \quad (11)$$

A densidade é determinada pela razão entre massa e volume (equação 12).

$$\rho_{esferas\ hidratadas} = \frac{m_{esferas}}{V_{esferas}} \quad (12)$$

O volume de água adicionado às esferas hidratadas, volume conhecido, foi o estritamente necessário para cobrir o leito, permitindo desta forma calcular a porosidade do leito (ε), valor também necessário para o cálculo da U_{mf} . Este parâmetro representa a fração de vazio do leito.

$$\varepsilon = \frac{V_{leito} - V_{esferas}}{V_{leito}} \quad (13)$$

Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos encontram-se registados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados obtidos na determinação da densidade das esferas e porosidade do leito

		Massa (g)	V_{leito} (cm^3)	$V_{\acute{a}gua}$ (cm^3)	$V_{esferas}$ (cm^3)	$\rho_{esferas}$ (g/cm^3)	ρ_{leito} (g/cm^3)	ε (-)
Desid. ^a	m ₁	56,4	-	-	-	-	-	-
	m ₂	56,6	-	-	-	-	-	-
	m ₃	56,8	-	-	-	-	-	-
Hid. ^b	m ₁	77,9	117	42	75	1,039	0,666	0,359
	m ₂	77,4	117	43	74	1,046	0,662	0,368
	m ₃	79,0	117	41	76	1,039	0,675	0,350
	Média	-	-	-	-	1,041±0,004	0,668±0,007	0,359±0,009
	Razão Hid/Desid ^c	1,38	-	-	-	-	-	-

^a Esferas desidratadas

^b Esferas hidratadas

^c Razão m/m esferas hidratadas/esferas desidratadas

Não se determinou a densidade das esferas desidratadas uma vez que no processo fermentativo a partir de certa altura existem unicamente esferas hidratadas no sistema, não havendo qualquer interesse nas desidratadas para efeitos hidrodinâmicos do leito. No entanto, conhecendo o valor da massa das esferas desidratadas pode-se calcular a razão $massa_{hidratada}/massa_{desidratada}$ para prever volumes ocupados pelas esferas quando se pretende dimensionar os fermentadores, sendo esta de 1,38.

4.1.2. Determinação da velocidade terminal das partículas

A velocidade terminal de uma partícula (U_t) representa a velocidade uniforme a que esta se desloca num fluido estático unicamente sob ação da força da gravidade, e depende das propriedades do fluido, como densidade e viscosidade. Neste trabalho o valor de U_t foi calculado cronometrando o tempo que cada esfera levava a percorrer diferentes alturas dentro de uma proveta graduada de vidro de 500 cm³. De forma a se obterem valores relativos às condições reais em que o reator irá operar foi utilizado vinho branco como fluido para a realização destes ensaios. Para cada um deles foram realizadas seis réplicas na parte central da proveta de forma a minimizar possíveis interferências pelas paredes da mesma (van Zessen *et al.*, 2005).

O valor de U_t é dado pela regressão linear entre altura percorrida pelas esferas no interior da coluna em função do tempo (Figura 12), sendo 2,85 cm s⁻¹.

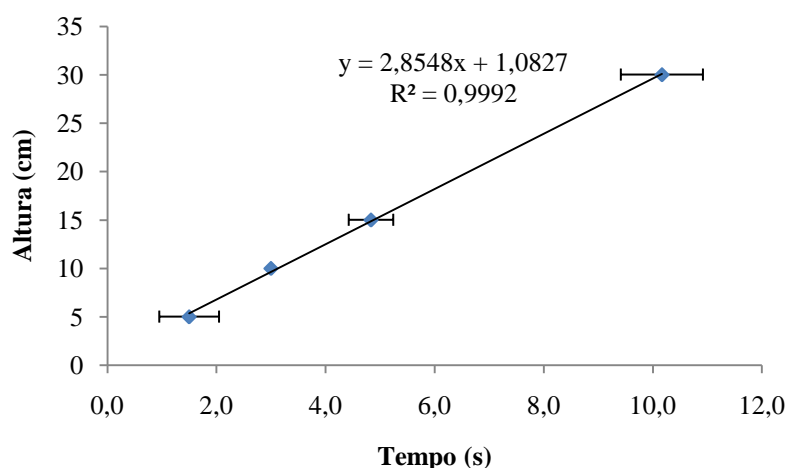


Figura 12 - Regressão linear para U_t de esferas de alginato hidratadas

A velocidade terminal é um parâmetro importante em processos de fluidização uma vez que representa a velocidade superficial máxima do fluido a que um fermentador pode operar sem que ocorra *washout* das células imobilizadas. Velocidades superficiais do fluido superiores à velocidade terminal conduzem ao transporte hidráulico das esferas e consequente perda do biocatalisador do sistema.

Do ponto de vista prático, se a cinética fermentativa estiver fortemente condicionada por limitações à transferência de massa entre o meio fermentativo e o suporte

de imobilização, e se uma solução, após integração das várias variáveis do processo, for o aumento da velocidade superficial do fluido no interior do fermentador para valores superiores à velocidade terminal, o design do fermentador deverá ser reajustado. Num fermentador cilíndrico, o aumento do diâmetro da secção superior do fermentador reduz a velocidade superficial do fluido nessa zona para valores inferiores à velocidade terminal. Consequentemente, o biocatalisador imobilizado sedimenta na zona expandida e volta à secção inferior do fermentador sem que ocorra o seu transporte hidráulico (Chisti, 2006).

4.1.3. Determinação do número de Reynolds

O número de Reynolds (Re) é um valor adimensional que nos dá informação acerca do tipo de regime hidráulico a operar dentro do fermentador e é baseado na velocidade relativa entre um fluido Newtoniano e a partícula (Fouad Sarrouh *et al.*, 2008). Este valor é obtido pela expressão matemática:

$$Re_p = \frac{\rho_f U_t d_p}{\mu_f} \quad (14)$$

onde ρ_f representa a densidade do fluido (g cm^{-3}), U_t a velocidade terminal da partícula (cm s^{-1}), d_p o diâmetro da partícula (cm) e μ_f viscosidade do fluido ($\text{g cm}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Admitiu-se que os parâmetros ρ_f e μ_f do vinho branco são próximos dos da água a 20 °C, sendo respetivamente $1,000 \text{ g cm}^{-3}$ e $0,01003 \text{ g cm}^{-1}\text{s}^{-1}$. Desta forma, o valor do número de Reynolds obtido foi de 54,88.

4.1.4. Velocidade mínima de fluidização

Como referido anteriormente, a velocidade mínima de fluidização (U_{mf}) representa a velocidade superficial mínima do fluido necessária para manter um leito fluidizado. Velocidades superficiais do fluido inferiores a U_{mf} levam à formação de um fermentador de leito fixo. A U_{mf} foi determinada de acordo com o estudo apresentado por Sarrouh (2008) (Fouad Sarrouh *et al.*, 2008).

A U_{mf} pode ser determinada matematicamente segundo a expressão:

$$U_{mf} = \varepsilon^n U_t \quad (15)$$

sendo o valor de n obtido pela seguinte relação empírica quando o alginato é utilizado como suporte para imobilização de células e válido para número de Reynolds compreendidos entre 35 e 190:

$$n = 3,84 Re_p^{-0,033} \quad (16)$$

O valor de U_{mf} obtido foi de $0,09 \text{ cm s}^{-1}$.

De forma a se conseguir uma fluidização efetiva do leito de esferas de alginato, a velocidade superficial do fluido no interior do fermentador deverá estar teoricamente compreendida entre a velocidade mínima de fluidização e velocidade terminal das partículas, ou seja, neste caso entre $0,09 \text{ cm s}^{-1} \leq U \leq 2,85 \text{ cm s}^{-1}$.

4.1.5. Fluidização do leito

Para se verificar a validade dos resultados teóricos obtidos realizaram-se ensaios hidráulicos de fluidização num fermentador construído em acrílico transparente com um diâmetro de 5 cm e uma altura de 50 cm, com caudais crescentes do fluido (água). Na base do fermentador, sob uma grelha metálica, foram colocadas esferas de vidro com uma altura total de cerca de 1,5 cm para possibilitar uma melhor distribuição do caudal no interior do fermentador. Para mimetizar as condições a que o fermentador de cuba fechada irá operar, a quantidade de esferas de alginato adicionadas ao fermentador de acrílico neste ensaio foi calculada mantendo a relação altura/diâmetro do leito no fermentador de cuba fechada, na sua carga máxima (6,4 g/L). A recirculação do meio foi realizada por uma bomba peristáltica de caudal regulável Watson Marlow 320U/D.

Corretamente, nos ensaios de fluidização deveria ter sido utilizado vinho branco como fase móvel (fluido) em vez de água. Apesar de os fluidos terem propriedades semelhantes, aproximavam-se as condições reais a que o fermentador de cuba fechada irá operar e minimizavam-se os erros associados. No entanto, na altura da realização dos

ensaios ainda não tinha sido adquirido o vinho base que foi posteriormente utilizado nas fermentações.

O comportamento do leito de esferas a diferentes caudais foi avaliado visualmente e encontra-se registado na Tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação visual da fluidização do leito a diferentes velocidades superficiais do fluido

Velocidade superficial do fluido (cm s^{-1})	Observações
0,19	Leito totalmente compactado
0,21	Expansão do leito. Não há fluidização.
0,24	Expansão do leito. Não há fluidização.
0,26	Expansão do leito. Movimento das esferas crescente, mas não há fluidização.
0,29	Expansão do leito. Começa-se a observar fluidização.
0,32	Expansão do leito. Leito fluidizado.
0,34	Expansão do leito. Leito fluidizado.
0,34-0,67	Nesta gama de caudais o leito encontra-se totalmente fluidizado, continuando-se a observar expansão do mesmo.

Pela análise visual realizada, o leito de esferas começa a fluidizar a uma velocidade superficial do fluido de $0,29 \text{ cm s}^{-1}$, estando totalmente fluidizado a $0,32 \text{ cm s}^{-1}$. A diferença entre a U_{mf} determinada analiticamente e visualmente nos ensaios de fluidização é justificada pelo facto de os cálculos terem sido realizados tendo em conta as propriedades do vinho branco e o ensaio de fluidização ter sido realizado com água, para além dos erros sistemáticos que estão associados à determinação dos diversos parâmetros, como volumes, densidade ou diâmetro. A velocidade de fluidização de um leito depende, entre outros parâmetros, da diferença de densidades entre partículas e fluido. Quanto menor a diferença de densidades menor será a velocidade mínima de fluidização e maior será o risco de ocorrer transporte hidráulico do biocatalisador. Por outro lado, se a densidade das partículas do leito for muito superior à densidade do fluido, há um aumento da velocidade mínima de fluidização e, conseqüentemente, dos custos associados à recirculação do meio fermentativo pelo fermentador, uma vez que a bomba de recirculação terá de operar a caudais superiores. Assim, uma vez que a densidade da água é superior à do vinho branco e, portanto, mais próxima da densidade das esferas de alginato, a velocidade mínima de fluidização é inferior.

Para além disto, deve-se considerar que a determinação da velocidade mínima de fluidização por observação é qualitativa e não quantitativa. Quer isto dizer que tratando-se

de uma avaliação unicamente por observação, poderá ter um erro associado consideravelmente grande, uma vez que os critérios seguidos para considerar um leito como fixo ou fluidizado são bastante flexíveis e dependem da análise que cada operador realiza.

A forma correta de determinar a U_{mf} seria pela curva característica de fluidização do leito, isto é, a variação da queda de pressão (ΔP) em função da velocidade superficial do fluido (U), Figura 13. No entanto, as condições existentes na Proenol não permitiram testar esta abordagem.

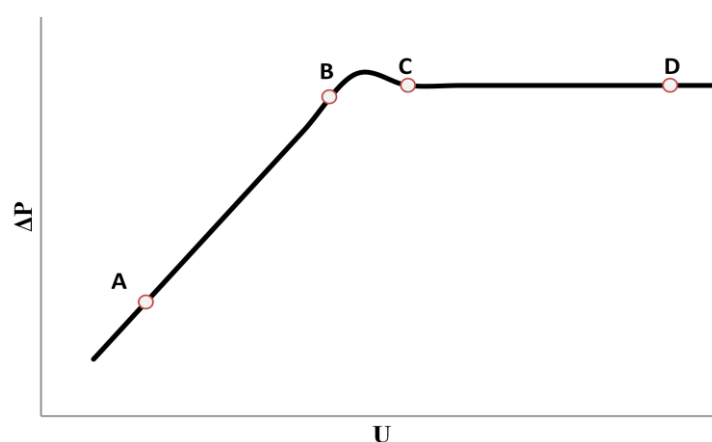


Figura 13 - Queda de pressão em função da velocidade superficial do fluido (Moser, 1988)

Entre A a B há um aumento da queda de pressão com o aumento da velocidade superficial do fluido, mantendo-se no entanto o leito fixo. Quando a velocidade superficial do fluido atinge um valor tal que a sua força de arrasto iguala o peso aparente das partículas, estas movem-se e ficam em suspensão no fluido. Este valor da velocidade designa-se de U_{mf} . A partir deste ponto, um aumento da velocidade superficial do fluido conduz a um aumento da porosidade do leito (expansão do leito), mas ΔP mantém-se constante (Moser, 1988).

4.2. Efeito do caudal de recirculação e dose de ProElif[®] aplicada

Esta primeira parte do estudo de cinéticas fermentativas consistiu na avaliação do efeito do caudal de recirculação do vinho base e da dose de ProElif[®] aplicada em cada

ensaio. Depois da caracterização do sistema, definiu-se para o caudal de recirculação dois níveis, 38 e 207 L/h, e para a dose de ProElif[®] três níveis, 1,6 g/L, 4,0 g/L e 6,4 g/L, resultando num total de seis ensaios.

Tabela 7 - Planeamento experimental para avaliação do caudal de recirculação e dose de ProElif[®] aplicada

Ensaio	Caudal (L/h)	Dose ProElif (g/L)
1	207	6,4
2	207	4,0
3	207	1,6
4	38	6,4
5	38	4,0
6	38	1,6

O caudal de recirculação foi definido tendo em conta os limites operacionais impostos pela bomba de recirculação instalada no sistema. A bomba opera a um caudal máximo de 207 L/h, que corresponde a uma velocidade superficial do vinho no interior do fermentador de 0,44 cm/s, superior à velocidade mínima de fluidização calculada anteriormente, $U_{mf} = 0,09$ cm/s, e a um caudal mínimo de 38 L/h, com uma velocidade superficial correspondente de 0,08 cm/s. Analiticamente, a velocidade superficial do fluido no interior do fermentador, relativa ao caudal mínimo de recirculação da bomba, mantém o leito fixo, uma vez que é inferior à U_{mf} calculada. Por outro lado, atendendo aos estudos de fluidização por análise visual (seção 4.1.5.), a fluidização ocorre apenas a partir de uma velocidade aproximada de 0,30 cm/s. Deste modo, considera-se que ao operar ao caudal mínimo da bomba se está claramente perante um regime de leito fixo, um modo de operação que tem associados problemas de limitação à transferência de massa externa, comparativamente ao regime de leito fluidizado.

Testou-se também o caudal máximo permitido pela bomba, 207 L/h, para se operar em regime de leito fluidizado e, conseqüentemente, avaliar e minimizar as limitações à transferência de massa externa, caso existam.

Por sua vez, os três níveis da dose de ProElif[®] aplicada foram definidos tendo por base a dose que é normalmente inoculada em fermentação em garrafa (1,6 g/L). Considerando-se esta a dose mínima, realizaram-se também ensaios para doses duas vezes e meia superiores (4,0 g/L) e quatro vezes superior (6,4 g/L). O aumento da concentração de biocatalisador é particularmente importante na intensificação de bioprocessos, quando o

aumento da produtividade é fundamental, e vantajoso se a reutilização da biomassa for viável.

As Figuras 14 e 15 são a representação gráfica do consumo de açúcares obtidos nas fermentações com diferentes doses de ProElif[®], para caudal de recirculação máximo e mínimo, 207 L/h e 38 L/h, respetivamente. A fermentação iniciou-se com a inoculação das leveduras no vinho base com uma concentração de açúcares de cerca de 21 g/L e foi interrompida quando se verificava um valor de pressão constante, com exceção do ensaio 3 em que foi necessário interromper a fermentação antes de esta estar concluída por necessidade de fazer uma intervenção no sistema (colocação de uma válvula).

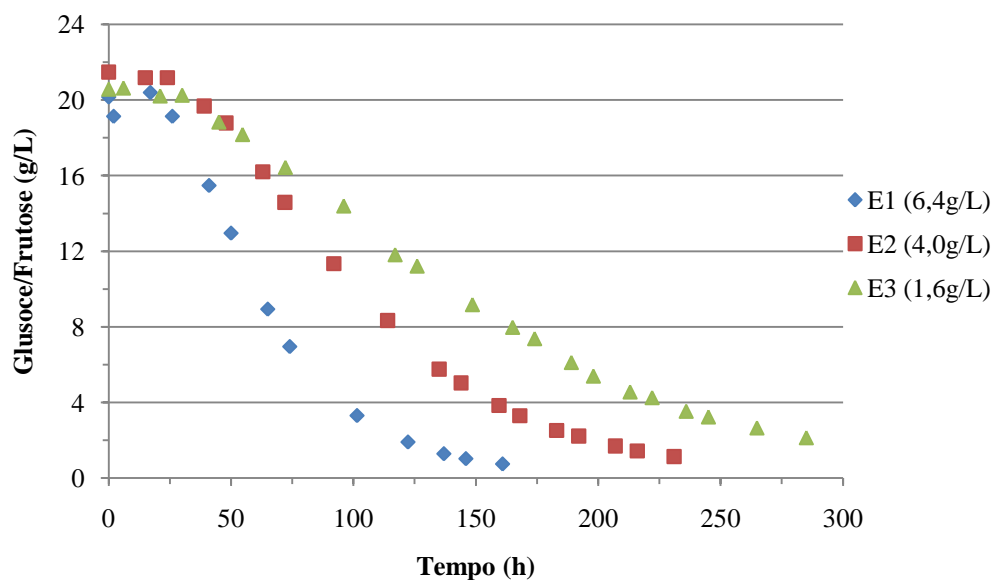


Figura 14 - Concentração de açúcares reductores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif[®], com caudal máximo de recirculação (207 L/h)

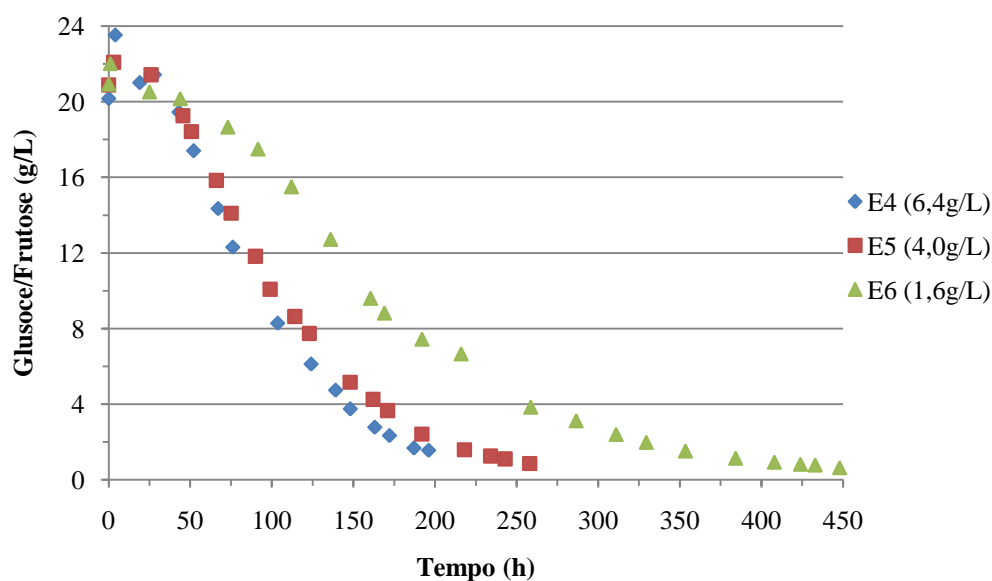


Figura 15 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif[®], com caudal mínimo de recirculação (38 L/h)

Uma primeira análise dos gráficos permite perceber que existe uma relação entre a dose de ProElif[®] usada e a taxa de consumo de substrato (açúcares). Como era espectável, aumentado a dose de biocatalisador do sistema leva a um aumento da taxa global de consumo de substrato, razão pela qual as curvas cinéticas são distintas e o tempo de fermentação aumenta com a diminuição da dose de ProElif[®], fenómeno característico de ambos os caudais de recirculação.

Comparando os tempos de fermentação, poder-se-á admitir que a agitação do meio influencia a cinética do processo. No entanto, só a análise matemática, com ajuste de modelos e determinação de parâmetros cinéticos, permite uma melhor caracterização dos sistemas e evidenciar as diferenças características das diferentes condições de fermentação.

Quando as leveduras imobilizadas são inoculadas pela primeira vez, as curvas de consumo de substrato apresentam em todos os ensaios um comportamento sigmóide. Para aplicação do modelo de Michaelis-Menten foi necessário caracterizar o comportamento cinético observado e estabelecer o momento a partir do qual se verifica uma atividade fermentativa efetiva.

Nos primeiros instantes da fermentação as taxas de consumo de substrato são nulas ou muito reduzidas, justificadas pelo facto de as leveduras necessitarem de um tempo de adaptação ao meio fermentativo, enquanto ocorrer a reidratação das esferas. As esferas estão inicialmente desidratadas, porque do seu processo de produção faz parte a

desidratação, onde se baixa o nível de humidade das esferas para reduzir a atividade metabólica das leveduras e permitir a sua conservação por períodos de tempo superiores. Uma das propriedades do produto ProElif[®] é não requerer reidratação prévia antes da inoculação. Deste modo, depois da inoculação do fermentador, ocorre a fase inicial de hidratação das esferas e de adaptação das leveduras ao meio fermentativo e só após esse período se pode considerar que as leveduras se encontram metabolicamente ativas.

Já na segunda fase, as leveduras caracterizam-se por se encontrarem metabolicamente ativas, o que se traduz em elevadas taxas de consumo de substrato. O início desta fase varia de ensaio para ensaio e foi determinado pelos dados experimentais a partir do momento que se verificavam taxas de consumo de substrato elevadas.

O metabolismo da fermentação alcoólica pode ser considerado como um conjunto de reações enzimáticas sequenciais que permitem a conversão de açúcares em etanol. Partindo deste pressuposto, os parâmetros cinéticos foram determinados por aplicação da equação de Michaelis-Menten, na sua forma integrada (equação 17).

A utilização de sistemas de células imobilizadas pressupõe que tenhamos os microrganismos imobilizados numa matriz que limita a sua libertação e propagação no meio fermentativo. Para além disto, admite-se que o crescimento no interior da matriz de imobilização deverá ser restrito ou nulo, mantendo-se, portanto, a concentração de biocatalisador no sistema constante ao longo do processo.

$$v_{m\acute{a}x}t = [S_0] - [S] + K_M \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (17)$$

A forma integrada da equação de Michaelis-Menten permite obter uma estimativa dos parâmetros K_M e $v_{m\acute{a}x}$ (constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima da reação, respetivamente) por ajuste dos dados experimentais, minimizando o quadrado dos erros entre tempo determinado experimentalmente e tempo determinado pelo modelo.

Na primeira fase do processo ainda não há catálise enzimática e considerá-la na modelação matemática dos resultados experimentais, com o modelo de Michaelis-Menten, introduz um elevado erro associado aos parâmetros cinéticos, que conduz a um mau ajuste.

Nas Figuras 16 e 17 apresentam-se as curvas do modelo cinético e os resultados experimentais para as diferentes concentrações de biocatalisador dos dois caudais de

recirculação. Pela análise dos resultados pode-se concluir que o modelo de Michaelis-Menten se ajusta aos dados experimentais, sendo válido para descrever a cinética de fermentação de espumante nas condições utilizadas.

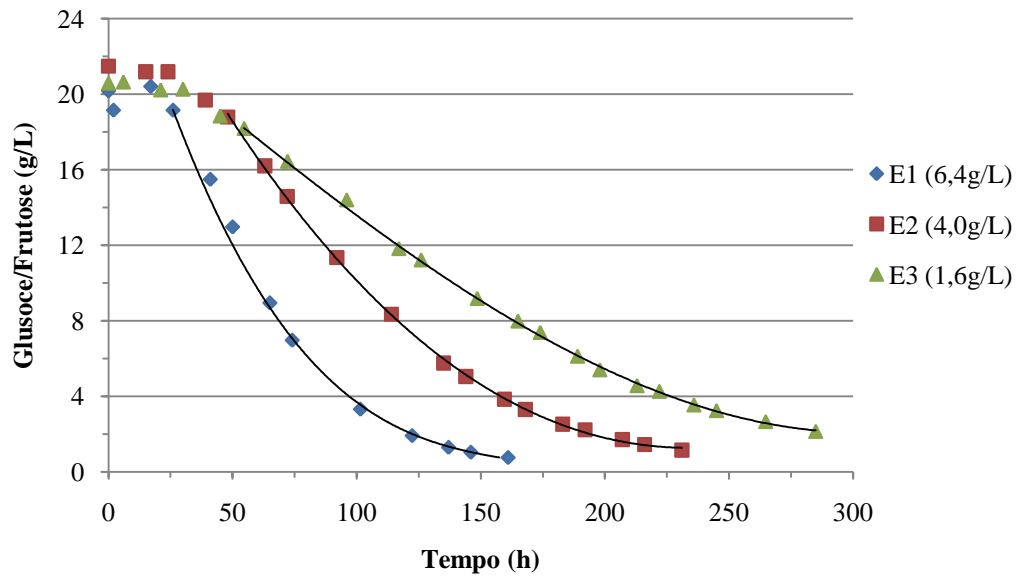


Figura 16 - Concentração de açúcares reductores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif[®], com caudal máximo de recirculação (207 L/h) e ajuste do modelo de Michaelis-Menten

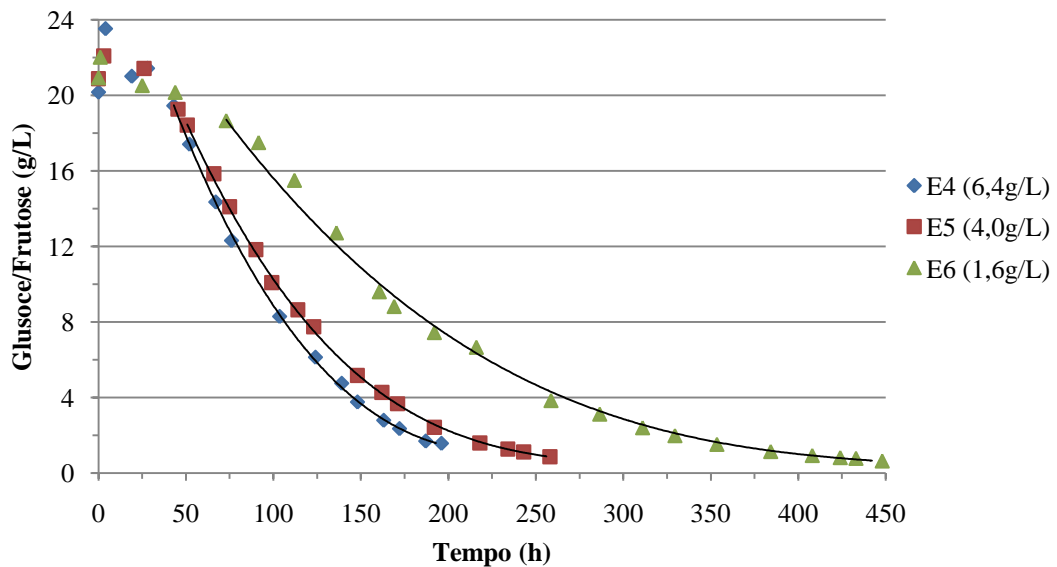


Figura 17 - Concentração de açúcares reductores ao longo da fermentação para as diferentes doses de ProElif[®], com caudal mínimo de recirculação (38 L/h) e ajuste do modelo de Michaelis-Menten

Os valores de K_M e $v_{máx}$ apresentados na Tabela 8 representam os parâmetros cinéticos para os vários ensaios. Como esperado, independentemente do caudal de

recirculação do vinho base, observa-se uma variação do valor da velocidade máxima com a dose de ProElif[®] inoculada. Um aumento da concentração de levedura no sistema leva a um aumento do valor de velocidade máxima.

Tabela 8 - Parâmetros K_M e $v_{máx}$ determinados pela equação de Michaelis-Menten para os ensaios 1-6

Ensaio	Caudal (L/h)	Dose ProElif [®] (g/L)	K_M (g/L)	$v_{máx}$ (g/L.h)
1	207	6,4	29,4	0,864
2	207	4,0	23,7	0,465
3	207	1,6	13,4	0,198
4	38	6,4	22,3	0,494
5	38	4,0	26,3	0,478
6	38	1,6	24,3	0,271

A velocidade máxima de um processo é um parâmetro dependente das concentrações de biocatalisador e de substrato. Este valor indica a taxa máxima de consumo de substrato que é possível obter quando se opera com concentrações de substrato elevadas. Deste modo, as limitações à transferência de massa são desprezáveis e o biocatalisador encontra-se saturado, de forma a que todos os centros catalíticos tenham rápido acesso ao substrato e se encontrem metabolicamente ativos. Quando se atinge a velocidade máxima, um aumento da concentração de substrato não tem influência neste parâmetro. Por outro lado, há uma variação positiva quando se aumenta a concentração do biocatalisador.

O K_M é um parâmetro que define a afinidade do biocatalisador para o substrato. Ao contrário de $v_{máx}$, K_M é um parâmetro intrínseco e específico de cada biocatalisador para determinado substrato. Com exceção para o ensaio 3, obtiveram-se valores de K_M muito próximos e concordantes entre si. Os valores de K_M superiores à concentração inicial de substrato (ca. 21 g/L) indicam que a velocidade da reação é dependente da concentração de substrato no meio. No entanto, apesar de superior a diferença não é significativa, e aplicando a equação de Michaelis-Menten o peso relativo dos dois parâmetros será semelhante. Partindo deste pressuposto, conclui-se que as taxas de consumo de substrato reais atingidas nos vários ensaios são cerca de metade das velocidades máximas determinadas (equação 18).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}S}{K_M + S} \xrightarrow{K_M \approx S} v = \frac{v_{m\acute{a}x}}{2} \quad (18)$$

Na prática é difícil atingir verdadeiramente o valor de velocidade máxima, mesmo para elevadas concentrações de substrato. As limitações à transferência de massa internas e/ou externas em sistemas de células imobilizadas são um fenómeno que dificulta que se atinja esse patamar. Como referido anteriormente, uma forma de reduzir as limitações à transferência de massa externa é promover a agitação da fase líquida. A agitação aumenta o contacto superficial entre as fases sólida e líquida, diminui os gradientes de concentração do sistema e reduz as limitações difusionais externas. Para perceber a dependência da $v_{m\acute{a}x}$ da dose de ProElif[®] aplicada e caudal de recirculação, representaram-se graficamente os valores de $v_{m\acute{a}x}$ em função da dose de ProElif[®] inoculada para cada caudal de recirculação (Figura 18).

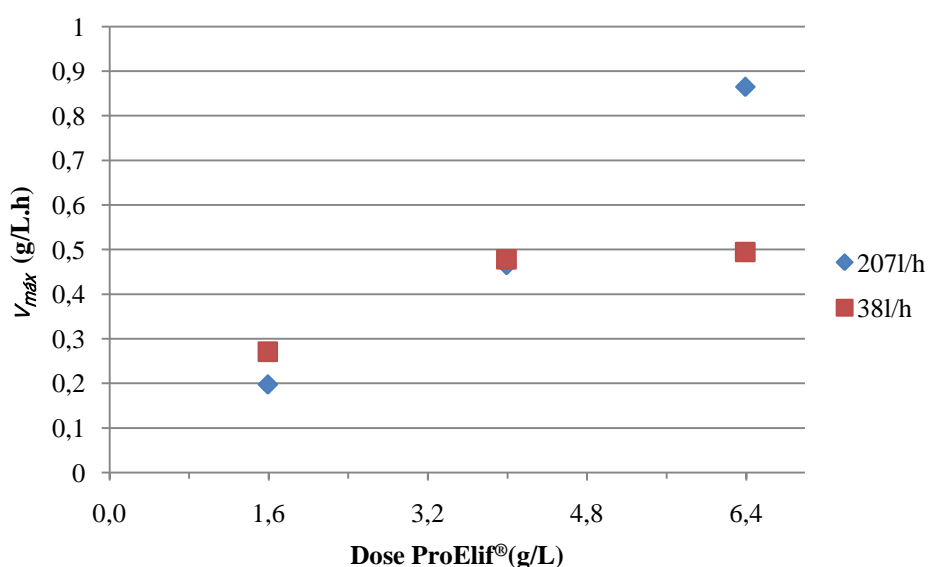


Figura 18 - Representação gráfica de $v_{m\acute{a}x}$ em função da dose de ProElif[®] e caudal de recirculação

A análise gráfica evidencia que ao contrário do que era esperado, as velocidades máximas de consumo de substrato não sofreram uma influência acentuada com o aumento do caudal de recirculação do vinho base. Pelo contrário, para as concentrações de ProElif[®] mais baixas as velocidades máximas são ligeiramente inferiores para o caudal máximo.

A exceção está na dose de biocatalisador de 6,4 g/L. Neste caso, poder-se-á pressupor que a diferença nas velocidades indica que o aumento do caudal de recirculação do vinho base diminui as limitações à transferência de massa externa e permite obter taxas de consumo de substrato superiores. Partindo do princípio que as limitações difusionais internas são semelhantes em todos os ensaios, uma vez que são impostas pela matriz de imobilização, o aumento significativo da $v_{máx}$ entre os dois ensaios é justificável pelas limitações à transferência de massa externa. No entanto, não colocando de parte esta hipótese, a diferença obtida poderá ser apenas aparente, uma vez que durante o decorrer do ensaio 4 (Caudal 38 L/h, Dose 6,4 g/L) houve problemas associados ao correto funcionamento do sistema. Durante um período consideravelmente longo (entre as 80 e 140 horas de fermentação, aproximadamente), o sistema de controlo de temperatura não funcionou corretamente e o fermentador de cuba fechada passou de uma temperatura controlada de 20 °C para a temperatura ambiente, inferior a 17 °C. A temperatura é um dos principais fatores que condiciona o metabolismo microbiano, e apesar da diferença de temperatura ser de cerca de 3 °C, houve diminuição da atividade metabólica das leveduras e conseqüentemente redução das taxas de consumo de substrato.

Apesar do problema que ocorreu durante o ensaio 4 impor um desvio ao resultado final, os restantes pontos sugerem que aparentemente o aumento do caudal de recirculação do vinho base não influencia a cinética fermentativa. O caudal mínimo de recirculação estudado será suficiente para conseguir uma boa eficiência da mistura da fase líquida, ao ponto de tornar desprezáveis as limitações à transferência de massa externa em relação às limitações de transferência de massa interna.

As limitações difusionais internas são impostas pela matriz de imobilização e são independentes da mistura do sistema. O aumento do caudal de recirculação poderá efetivamente reduzir as limitações à transferência de massa externa, no entanto não tem influência nas limitações à transferência de massa interna. Em sistemas de células imobilizadas as taxas de bioconversão podem ser limitadas pelas taxas de difusão de substratos e produtos entre biocatalisador e meio fermentativo. Para leveduras imobilizadas em dupla camada de alginato este fenómeno é agravado uma vez que, para além do núcleo interno de leveduras e alginato, as esferas são revestidas com uma camada externa unicamente de alginato, que evita a libertação e crescimento de leveduras no meio fermentativo, mas que dificulta a acessibilidade das células ao substrato.

Para comprovar o referido anteriormente seria necessário realizar estudos de difusão a diferentes caudais de recirculação e ensaios com caudais de recirculação do vinho base inferiores.

Para além do registo diário da concentração de açúcares, foram monitorizados outros parâmetros no início e fim das fermentações, ou em alguns casos durante o decorrer dos ensaios. Alguns dos parâmetros apresentados são muitas vezes apresentados em estudos de fermentação de espumante, e o resumo das análises encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Resumo das análises realizadas para os diferentes ensaios

Parâmetro	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Ensaio 6	
	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim
Dose ProElif (g)	640		400		160		640		400		160	
Caudal (L/h)	207		207		207		38		38		38	
Velocidade superficial (cm/s)	0,44		0,44		0,44		0,08		0,08		0,08	
Viabilidade celular (%)	95,3	77,2	91,6	67,2	93,6	80,5	90,2	67,5	86,2	65,4	88,2	58
Substrato (g/L)	20,16	0,75	21,48	1,14	20,58	2,14	20,16	1,56	20,88	0,86	20,93	0,64
Pressão (bar)	-	4,90	-	4,90	-	3,90	-	5,00	-	5,00	-	4,95
Substrato/Pressão^a	3,96		4,15		4,73		3,72		4,00		4,10	
Etanol (g/L)	65,2	83,5	78,9	87,7	79,2	87,2	72,7	88,4	78,5	90,5	79,8	89,4
pH	2,98	3	3,05	2,86	2,98	3,04	2,98	3,00	3,01	3,04	3,02	3,03
Acidez total (g ác. Tartárico/L)	6,2	6,3	5,9	6,5	6,2	6,6	5,9	6,8	6,1	7,1	6,1	6,7
Tempo (h)	161		231		285		196		258		448	
Tempo (dias)	6,71		9,63		11,88		8,17		10,75		18,67	
Tempo estimado até se atingir 1,00 g/L (h)	150		240		360		225		250		400	
Tempo estimado até se atingir 1,00 g/L (dias)	6,25		10,00		15,00		9,38		10,42		16,67	

^a Razão substrato consumido/pressão final

A viabilidade celular é um parâmetro que quantifica o número de células vivas em percentagem, neste caso leveduras. As esferas de ProElif[®] utilizadas nestes primeiros ensaios são todas pertencentes ao mesmo lote de produção, conservadas a 4 °C até ao momento da sua utilização. O decréscimo da viabilidade inicial é um fenómeno que ocorre naturalmente devido à morte celular que se dá durante o período de conservação, mas mesmo assim é possível garantir uma viabilidade celular inicial elevada. O que se verifica é que na maioria dos casos a viabilidade celular é inferior após a fermentação, com um decréscimo superior a 20%.

A razão entre substrato consumido e pressão final obtida é um parâmetro que poderá indicar se a fermentação decorreu com normalidade, mas que acima de tudo permite estimar a concentração de açúcar inicial necessário para obter uma determinada pressão final. Estima-se que sejam necessárias 4,00-4,30 g/L de açúcar para se obter um bar de pressão (Torresi *et al.*, 2011). Os valores obtidos nos diferentes ensaios realizados situam-se quase todos muito próximos ou dentro dessa gama de valores.

Para além destes parâmetros, são ainda apresentados na Tabela 9 os tempos de fermentação e os tempos de fermentação estimados em dias e horas até se atingir a concentração de açúcares de 1,00 g/L.

O tempo de fermentação é o intervalo de tempo que vai desde a inoculação das leveduras até ao momento em que o ensaio é interrompido, independentemente da concentração final de açúcares. Na impossibilidade de terminar todos os ensaios com uma concentração de açúcar final igual, foi necessário estabelecer uma concentração para a qual se estima o tempo necessário até ser atingida, permitindo assim que os vários ensaios sejam passíveis de ser comparados entre si.

Estabeleceu-se a concentração de 1,00 g/L como concentração de referência, e o tempo necessário para se obter essa concentração foi determinado por estimativa, através do ajuste do modelo matemático e os dados experimentais.

O tempo de fermentação estimado vem comprovar o que foi referido anteriormente relativamente às velocidades máximas de fermentação e limitações à transferência de massa a que o sistema está sujeito. Teoricamente o aumento da velocidade de recirculação do vinho base reduz as limitações à transferência de massa externa e conseqüentemente conduz a um aumento das taxas de consumo de substrato e formação de produto e redução

do tempo de fermentação. No entanto, comparando os tempos de fermentação estimados não é isso que se verifica. Para os ensaios com as mesmas concentrações de biocatalisador os tempos de fermentação estimados são semelhantes, com exceção para a diferença entre os ensaios 1 e 4, justificada pelos problemas anteriormente referidos que ocorreram durante o ensaio 4.

4.3. Fermentação de vinho não estabilizado para aplicação de CMC

Como referido na revisão bibliográfica, a maior instabilidade física dos vinhos está associada à precipitação de sais de tartarato, um fenómeno que é tido como parâmetro de controlo da qualidade do produto (Santos *et al.*, 2000). A mais recente tecnologia de prevenção da precipitação dos sais de tartarato é a adição de carboximetilcelulose (CMC), um polímero derivado da celulose que previne a nucleação e crescimento dos cristais, impedindo que tomem proporções macroscópicas.

Com o objetivo de testar a eficácia da aplicação de CMC na estabilização tartárica de vinho não estabilizado que fermenta com ProElif[®], foram realizados dois ensaios com vinho base não estabilizado, adicionando-se CMC num dos ensaios.

Apesar de ser uma tecnologia recente, alguns estudos mostram que a aplicação de CMC é eficaz a partir de uma concentração de 4 g/hL. A dose de CMC selecionada para estes ensaios teve por base a regulamentação europeia, sendo testada a dose de 10 g/hL, correspondente ao limite máximo autorizado. Para minimizar o tempo necessário de cada ensaio, a dose de ProElif[®] aplicada foi a máxima testada nos ensaios anteriores (6,4 g/L) e o caudal de recirculação máximo (207 L/h).

Seguindo a metodologia aplicada anteriormente, determinaram-se os parâmetros cinéticos a partir da equação de Michaelis-Menten.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos determinados pela equação de Michaelis-Menten para os ensaios com e sem adição de CMC

Ensaio	K_M (g/L)	$v_{máx}$ (g/L.h)
7 – s/CMC	30,1	0,589
8 – c/CMC	23,5	0,404

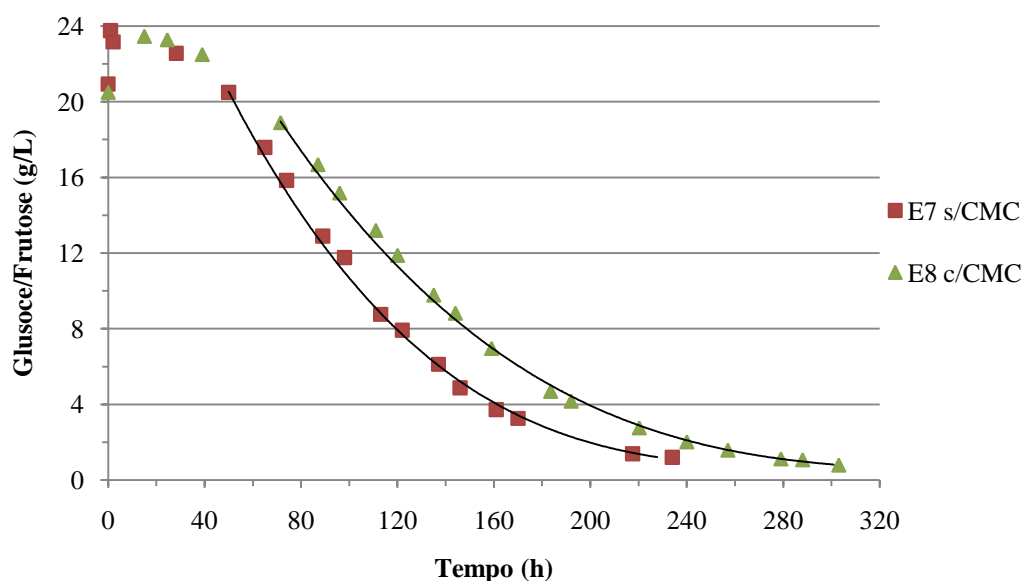


Figura 19 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação e ajuste do modelo de Michaelis-Menten para os ensaios com e sem adição de CMC

O vinho base nestes ensaios tinha de ser necessariamente instável do ponto de vista tartárico pelo que houve necessidade de utilizar um vinho diferente do utilizado em ensaios anteriores. A matriz do vinho tem variações da concentração de diversos compostos, como é o exemplo do etanol, com uma concentração superior cerca de 7 g/L. Por este motivo não é possível realizar uma comparação direta com ensaios anteriores.

É possível observar pela Tabela 10 e Figura 19 que a adição de CMC induz alterações na cinética da fermentação. O valor do parâmetro K_M mantém-se coerente com os obtidos anteriormente, uma vez que se trata de um parâmetro intrínseco que caracteriza a afinidade de um biocatalisador para determinado substrato. Apesar das alterações da composição do vinho base, o microrganismo inoculado (*Saccharomyces*) utiliza a mesma fonte de carbono (glucose/frutose) como principal fonte de energia. Por sua vez, a velocidade máxima de consumo de substrato é diferente entre os dois ensaios.

Tal como outros produtos utilizados para estabilização tartárica de vinhos (ácido metatartárico e manoproteínas), o mecanismo de ação da CMC é ao nível da prevenção da precipitação de sais de tartarato. A CMC atua como um protetor coloidal, adere à superfície dos cristais impedindo que ocorram os fenómenos de nucleação, crescimento e precipitação. Não havendo quaisquer alterações das condições operacionais entre ensaios, a

redução da velocidade máxima de consumo de substrato está associada ao efeito da CMC nas esferas de ProElif[®].

A CMC é um polissacarídeo derivado da celulose e para a qual não se conhecem efeitos inibitórios no metabolismo das leveduras. Desta forma, a redução da velocidade máxima da reação no ensaio em que se adicionou CMC estará relacionada com o aumento da limitação à transferência de massa externa.

A difusão de substratos e produtos do meio fermentativo para o interior das esferas de alginato com o biocatalisador imobilizado, e vice-versa, é agravada pela colmatagem dos poros da matriz de imobilização pela CMC. O polímero adsorve à superfície das esferas ou infiltra-se nos poros da matriz de alginato de cálcio e reduz a eficiência da transferência de massa. Esta hipótese é impossível de provar macroscopicamente, mas poderão ser realizados estudos de difusão de substrato em esferas de ProElif[®] utilizando meios com concentrações crescentes de CMC.

O tempo estimado de fermentação do ensaio 8 foi quase dois dias superior ao do ensaio 7, mas as amostras recolhidas e guardadas durante cerca de cinco meses a uma temperatura de 4 °C comprovam a eficácia da CMC como agente de estabilização tartárica, para a concentração aplicada (10 g/hL). Após esse período não foi registada qualquer formação de cristais, mantendo-se o vinho límpido.

Industrialmente, o custo associado ao aumento do tempo de fermentação poderá ser um fator que inviabilize a utilização desta tecnologia na estabilização de vinhos. Por este motivo, e uma vez que não se observou a formação de cristais no final do ensaio sem adição de CMC, poder-se-á eventualmente considerar a aplicação da CMC apenas após a fermentação do vinho base, por exemplo, como constituinte do licor de expedição.

Não foi possível incluir no planeamento experimental ensaios de estabilização tartárica com CMC para caudais de recirculação ou doses de ProElif[®] diferentes. Mas a cinética fermentativa é dependente da concentração de levedura inoculada, como se abordou anteriormente, e é de esperar que o efeito da CMC na cinética fermentativa seja mais acentuado com a diminuição da concentração de ProElif[®], relativamente à concentração estudada.

4.4. Operação em reator batch sequencial (SBR)

O último capítulo deste trabalho teve por objetivo o estudo da cinética da fermentação de espumante com reutilização da biomassa, operando com o reator batch sequencial (SBR). Uma das grandes vantagens dos sistemas de células imobilizadas é a facilidade de recuperação das células e sua reutilização em ciclos fermentativos consecutivos. Para além disso, permite a intensificação de bioprocessos com reatores de elevada densidade celular, se as condições de fermentação e os produtos resultantes da mesma não comprometerem a atividade microbiana.

Promoveram-se fermentações consecutivas com reutilização das esferas de ProElif[®], tendo sido utilizada a dose máxima estudada em ensaios anteriores, 6,4 g/L. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 20.

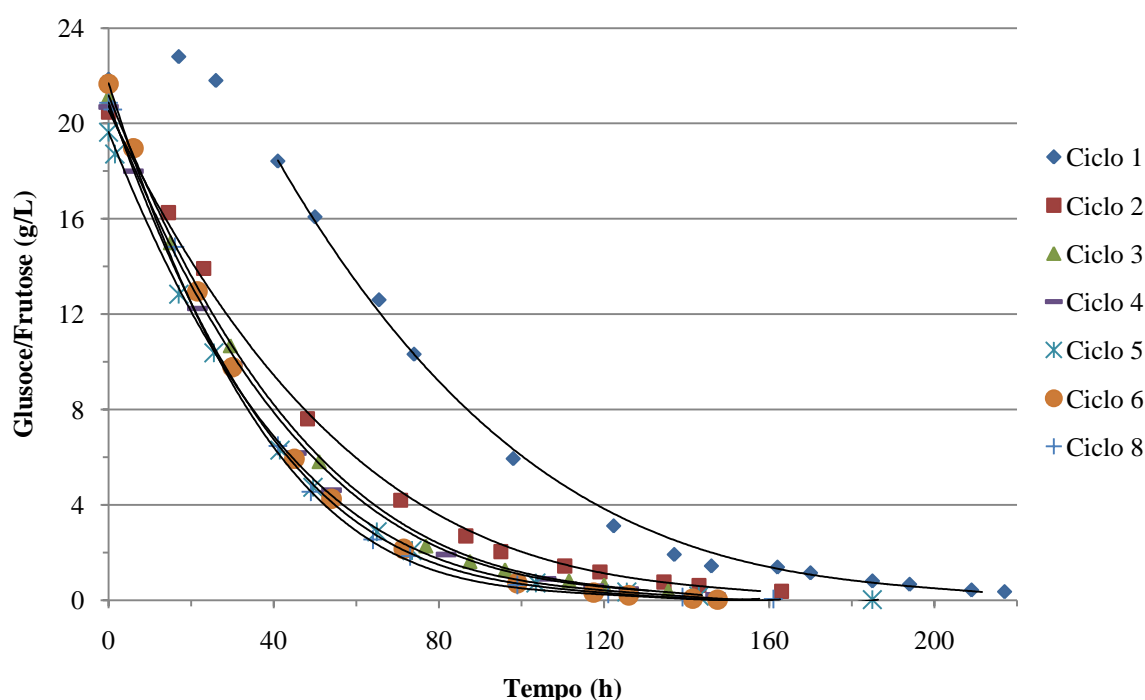


Figura 20 - Concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação para os diferentes ciclos de reutilização e ajuste do modelo de Michaelis-Menten

Para a análise dos resultados foi aplicada a mesma abordagem anteriormente utilizada, com ajuste do modelo de Michaelis-Menten para determinação dos parâmetros cinéticos de cada ciclo.

Os valores de K_M obtidos para os vários ciclos fermentativos de reutilização da biomassa não foram coerentes com os obtidos anteriormente. Apesar de $v_{máx}$ ser dependente das condições operacionais, como temperatura, limitações à transferência de massa ou composição do meio, e variar entre ensaios, o K_M é um parâmetro intrínseco que caracteriza a afinidade do biocatalisador para determinado substrato, independentemente das condições operacionais. No entanto, nos ensaios de reutilização os valores de K_M obtidos possuíam uma variação compreendida numa gama de valores de 11 a 80. Uma vez que o vinho base e o microrganismo inoculado foram os mesmos que nos ensaios iniciais de avaliação do efeito do caudal de recirculação e dose de ProElif[®] aplicada, os valores de K_M deveriam ser semelhantes entre si.

O erro associado ao parâmetro K_M obtido está relacionado com o baixo número de dados experimentais que foram recolhidos ao longo do tempo. Como se observa na Figura 20, o primeiro ciclo possui uma curva de consumo de substrato semelhante aos ensaios realizados anteriormente, a qual já foi descrita. No entanto, a partir do segundo ciclo, deixa-se de observar a fase *lag* inicial, de adaptação ao meio fermentativo, e o consumo de substrato inicia-se rapidamente assim que as leveduras são inoculadas, com taxas de consumo de substrato elevadas. Apesar de haver uma redução do tempo de fermentação, a regularidade diária de recolha de amostras do fermentador manteve-se.

Para solucionar o problema testaram-se duas abordagens. Na primeira, desprezaram-se os primeiros pontos de cada ensaio, tal como se fez nos ensaios anteriores, uma vez que se sabe que as elevadas taxas de consumo de substrato que se verificam logo após a inoculação não se devem unicamente à metabolização dos açúcares pelas leveduras, mas também à difusão do substrato do meio fermentativo para o interior das esferas, por gradiente de concentração, tendo em conta que as esferas foram reutilizadas de ensaios anteriores cuja concentração final de açúcares era próxima de zero. No entanto, esta metodologia conduziu a parâmetros cinéticos ainda mais incoerentes, visto que implicava que se reduzisse ainda mais o número de dados experimentais.

A segunda abordagem consistiu em determinar apenas o valor de velocidade máxima, admitindo que o valor de K_M é igual ao obtido em ensaios anteriores. Desta forma, calculou-se a média do K_M dos ensaios 1 a 6 e realizou-se o ajuste do modelo de Michaelis-Menten para determinação de $v_{máx}$. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos, tempo de fermentação estimado e viabilidades para os ensaios de reutilização da biomassa

Ciclo	K_M (g/L)	$v_{máx}$ (g/L.h)	Tempo fermentação estimado (dias)	Viabilidade inicial (%)	Viabilidade final (%)
1	25,2	0,687	7,38	93,5	63,8
2	25,2	0,764	5,25	63,8	61,9
3	25,2	0,923	4,38	61,9	54,8
4	25,2	0,931	3,92	54,8	52,1
5	25,2	0,981	3,92	52,1	40,2
6	25,2	1,15	3,71	40,2	40,2
7	- ^a	- ^a	- ^a	40,2	42,7
8	25,2	1,06	3,58	42,7	42,5

^a Parâmetros não determinados devido ao reduzido número de dados experimentais disponível

A análise dos resultados mostra que a velocidade máxima de consumo de substrato aumenta gradualmente até ao ciclo 6, ao mesmo tempo que há uma redução do tempo de fermentação estimado. Ao longo das reutilizações há uma maior adaptação das leveduras às condições do meio fermentativo, o que conduz a um aumento de produtividade do sistema. Ao oitavo ciclo de reutilização, o tempo estimado de fermentação reduziu-se para menos de metade em relação ao tempo do primeiro ciclo. A redução do tempo de fermentação ao longo das reutilizações permite uma intensificação do bioprocessamento e é do ponto de vista económico um fator de grande importância. Para além disso, a dose de ProElif[®] inoculada foi quatro vezes superior à dose normalmente aplicada na produção de espumante pelo Método Tradicional, mas permitiu realizar mais ensaios, reduzindo o custo específico por ensaio associado às esferas de ProElif[®].

No início e final de cada ciclo determinou-se a turbidez do vinho, para saber se houve ou não libertação e crescimento de células das esferas de alginato para o meio fermentativo. Os valores constantes de turbidez mostraram que a imobilização de leveduras em dupla camada de alginato é um sistema eficaz que impede a libertação das células da matriz para o meio. No entanto, no fim de cada ciclo as esferas foram observadas à lupa e submetidas a uma força de tensão, verificando-se que a resistência das mesmas diminuiu a partir do sexto ciclo. Isto indica-nos que a fricção a que as esferas estão sujeitas quando se opera em regime de leito fluidizado poderá conduzir à rutura das mesmas e libertação das células de levedura para o meio em ciclos de reutilização superiores. Apesar de não terem sido realizados mais ensaios, o número máximo de ciclos de reutilização das esferas de ProElif[®] será de 8, nas condições operacionais testadas, podendo a viabilidade do processo estar comprometida pela resistência das esferas em ciclos de reutilização superiores.

Quanto à viabilidade celular no final de cada ciclo, é possível concluir que a sua redução é gradual, mas menos significativa entre cada ciclo. É no final do primeiro ensaio que a perda de viabilidade é superior, por motivos anteriormente referidos. As leveduras imobilizadas nas esferas desidratadas sofrem um processo de hidratação muito rápido ao entrarem em contacto com o meio fermentativo, com um pH baixo e uma concentração de etanol elevada, que inibe o seu metabolismo e que poderá levar à morte celular, reduzindo a viabilidade.

4.4.1. Observação ao microscópio das esferas de alginato

Com o objetivo de observar a distribuição das leveduras no interior das esferas de alginato antes e após os vários ciclos fermentativos, as esferas foram cortadas em seções transversais de 1,5µm e observadas ao microscópio ótico, recorrendo ao corante azul de toluidina como agente de contraste. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 21 e 22.

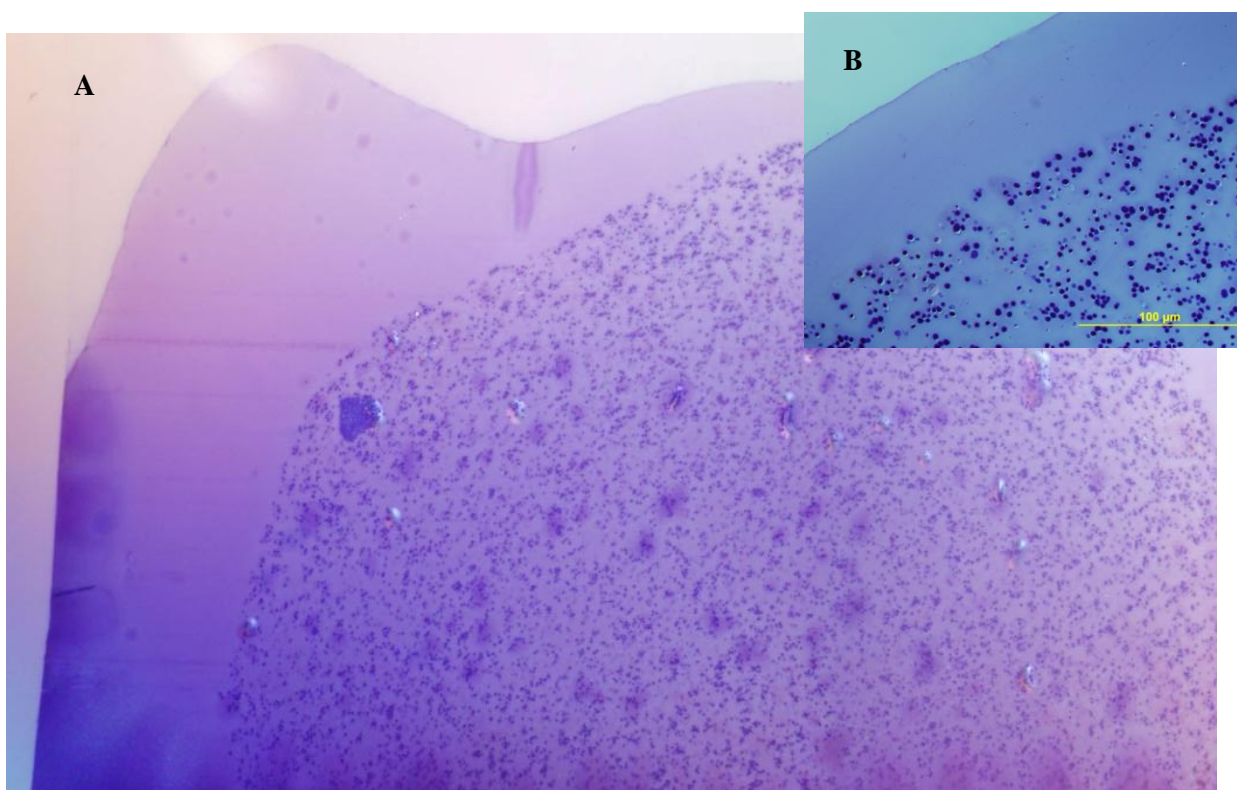


Figura 21 - Secção transversal da esfera de alginato antes da fermentação em aplicação 100x (A) e 400x (B)

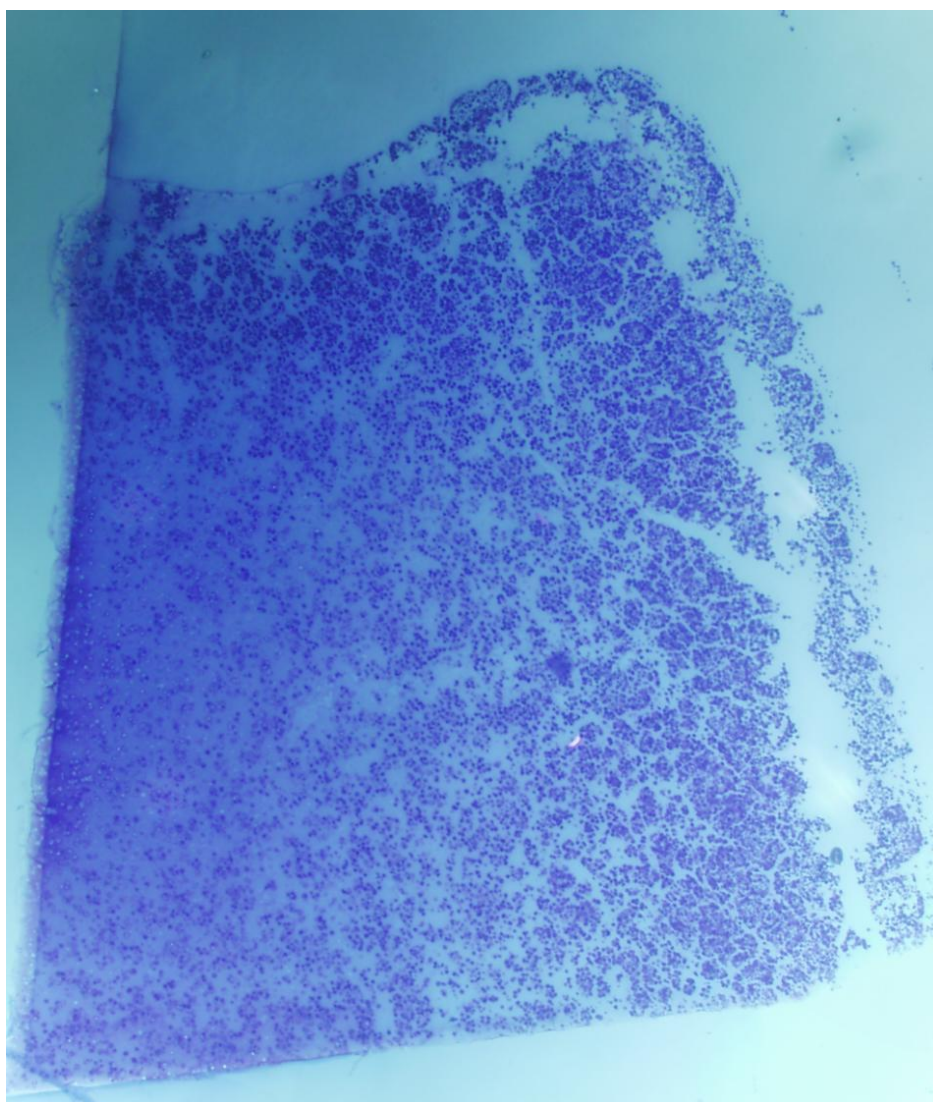


Figura 22 - Secção transversal da esfera de alginato após o oitavo ciclo de fermentação em aplicação 100x

Como é possível observar na Figura 21, a distribuição celular no interior da matriz de imobilização é homogénea antes da inoculação das esferas de ProElif[®] no vinho base. Embora o método utilizado não permita determinar a viabilidade celular ao longo da secção interna das esferas, pode-se garantir que a distribuição das leveduras no interior das esferas de alginato é uniforme, não ocorrendo preferencialmente numa zona específica, como à periferia.

A análise realizada comprova ainda o que era já evidente nas observações à lupa, que a camada externa, unicamente composta por alginato, possui uma espessura irregular ao longo da superfície da esfera. No entanto, apesar de existirem zonas com uma espessura

da camada externa reduzida, não foi observada qualquer secção desprovida da dupla camada de alginato.

Por sua vez, a Figura 22 representa a secção transversal de uma esfera recolhida do fermentador após os vários ciclos fermentativos que se promoveram. As esferas recolhidas logo após os ciclos de fermentação, juntamente com um pequeno volume de vinho, foram congeladas até ao momento da sua fixação em glutaraldeído, etapa que inicia o processo de preparação para observação ao microscópio. Posteriormente verificou-se que a congelação não é a melhor técnica de conservação das esferas, uma vez que durante a solidificação há um aumento do volume molar da água presente no seu interior, o que compromete a integridade da matriz de alginato. Nesta imagem observa-se uma faixa na zona mais periférica da esfera desprovida de leveduras que na realidade corresponde a uma zona de rutura do alginato.

O registo obtido evidencia que a densidade celular é superior na zona periférica, fenómeno que está de acordo com o esperado. No entanto, a baixa qualidade da amostra, como resultado do problema acima referido, não possibilita tirar conclusões fidedignas. Apesar de se admitir que em sistemas de células imobilizadas a multiplicação e crescimento celular é restrito, a verdade é que se trata de um fenómeno natural cíclico que não pode ser totalmente controlado nas condições de fermentação utilizadas, e ao ocorrer deverá ser preferencialmente na zona periférica das esferas. Nesta zona as limitações à transferência de massa interna são menores, em relação ao interior das esferas, e a acessibilidade das leveduras aos substratos é maior, permitindo suprimir de forma mais eficiente as suas necessidades metabólicas.

5. Conclusões e Proposta de Trabalho Futuro

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho são bastante promissores numa área tão particular da enologia e que se encontra em constante progresso. O desenvolvimento de um processo que une as duas mais recentes tecnologias na produção de espumante, o processamento em cubas de grande capacidade volumétrica (Método Charmat) e a utilização de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio (ProElif[®]), mostrou-se eficaz e viável do ponto de vista operacional.

A fermentação de espumante num fermentador de cuba fechada com leveduras imobilizadas comprovou ser um sistema que permite a produção de grandes quantidades de vinho espumante com uma redução significativa do tempo de fermentação em relação ao Método Tradicional. As principais vantagens associadas a este novo método estão na facilidade de aumento da capacidade de produção, da redução do tempo e mão-de-obra normalmente requeridas no Método Tradicional e, conseqüentemente, na possibilidade de redução do capital de investimento por unidade de produto final.

Os primeiros ensaios mostraram que as taxas de consumo de substrato são dependentes da concentração de biocatalisador no sistema. Como se esperava, o aumento da concentração de ProElif[®], de 1,6 g/L para 4,0 g/L e 6,4 g/L, promoveu a diminuição do tempo global de fermentação. Por sua vez, o aumento do caudal de recirculação de 38 L/h para 207 L/h aparentemente não tem influência sobre a cinética fermentativa, uma vez que a difusão de substratos e produtos do meio fermentativo para o interior das esferas, e vice-versa, está fortemente condicionada por limitações à transferência de massa interna e não externas. O ensaio que levou mais tempo, em que se inoculou a dose mais baixa de levedura e o caudal de recirculação foi mínimo, a estimativa do tempo total de fermentação não ultrapassou os 17 dias.

Os ensaios de estabilização tartárica comprovaram que a CMC é um produto eficaz na prevenção da precipitação dos sais de tartarato, sendo uma boa solução para a estabilização tartárica dos vinhos na concentração máxima admitida por lei (10 g/hL). No entanto, o aumento das limitações à transferência de massa externa, imposto pela CMC, tem impacto na cinética fermentativa, verificando-se um aumento do tempo de fermentação.

Por último, os ensaios de reutilização comprovaram a possibilidade de se promoverem ciclos de fermentação consecutivos reutilizando a biomassa. Nas condições

estudadas, caudal de recirculação de 207 L/h e dose de ProElif[®] de 6,4 g/L, houve um aumento das taxas máximas de consumo de substrato e consequente redução do tempo de fermentação entre cada ensaio. Entre o primeiro e o oitavo ciclo conseguiu-se uma redução do tempo de fermentação superior a 50%.

Numa altura em que há uma crescente preocupação por parte da indústria em desenvolver tecnologias inovadoras para intensificação de processos e/ou redução de custos associados aos atuais, os resultados obtidos neste estudo pioneiro são já bastante otimistas e promissores. Dever-se-á no entanto considerar alguns aspetos que não foram avaliados neste trabalho em projetos futuros, como é o caso da influência deste método e das condições de fermentação nas propriedades organolépticas do produto final. Por inexistência de uma linha isobárica não foi possível engarrafar em condições adequadas o espumante produzido, e consequentemente não foi realizada qualquer avaliação sensorial do espumante. Sabe-se no entanto que a eliminação da fase de maturação característica do Método Tradicional poderá influenciar as propriedades sensoriais do espumante, uma vez que o contacto entre as leveduras e o vinho é muito reduzido. Para além disso, os reduzidos tempos de fermentação poderão minimizar a expressão e influência dos produtos do metabolismo secundário no produto final.

Futuramente, deverão ainda ser testadas outras condições de fermentação que se aproximem à realidade das indústrias e dos atuais métodos de produção, que permitam avaliar a influencia de outros parâmetros ou de outros níveis, nomeadamente a fermentação a temperaturas mais baixas. A fermentação de espumante ocorre normalmente a temperaturas inferiores a 15 °C em locais com capacidade de controlo da temperatura com baixas oscilações, reduzindo os custos energéticos necessários para aquecimentos ou arrefecimento do sistema.

Finalmente, apesar das diversas vantagens deste método referidas anteriormente, será importante realizar um estudo de viabilidade económico detalhado e rigoroso que estabeleça o capital de investimento necessário para implementar um fermentador de cuba fechada a operar à escala industrial.

6. Referências Bibliográficas

- Bailey, J. E. and D. F. Ollis (1986). Applied Enzyme Catalysis. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: 157-227.
- Bezerra, R. M. F. and A. A. Dias (2007). "Utilization of integrated Michaelis-Menten equation to determine kinetic constants." Biochemistry and Molecular Biology Education **35**(2): 145-150.
- Carrascosa, A. V., A. Martinez-Rodriguez, E. Cebollero and R. González (2011). *Saccharomyces* Yeasts II: Secondary Fermentation. Molecular Wine Microbiology. A. V. Carrascosa, R. Muñoz and R. González, Academic Press: 33-49.
- Chisti, Y. (2006). Bioreactor design. Basic Biotechnology. C. Ratledge and B. Kristiansen. New York, Cambridge University Press: 181-200.
- Crachereau, J. C., N. Gabas, J. Blouin, B. Hébrard and A. Maujean (2001). "Stabilisation tartrique des vins par la Carboxyméthylcellulose (C.M.C.)." Bulletin de L'O.I.V. **74**(841-842): 151-159.
- Divies, C. and R. Cachon (2005). Wine Production by Immobilised Cell Systems. Applications of Cell Immobilisation Biotechnology. V. Nedović and R. Willaert, Springer Netherlands. **8B**: 285-293.
- Ferreira, E. C. and J. A. Teixeira (2003). Biorreactores. Biotecnologia - Fundamentos e Aplicações. N. Lima and M. Mota, Lidel: 165-194.
- Fouad Sarrouh, B., A. Converti and S. S. da Silva (2008). "Evaluation of hydrodynamic parameters of a fluidized-bed reactor with immobilized yeast." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **83**(4): 576-580.
- Godia, F., C. Casas and C. Sola (1991). "Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation." Biotechnology Progress **7**(5): 468-470.
- Hornsey, I. S. (2007). The Chemistry and Biology of Winemaking, RSC Publishing.
- Kosseva, M. (2011). "Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes." Food and Bioprocess Technology **4**(6): 1089-1118.
- Lee, S. S., F. M. Robinson and H. Y. Wang (1981). Rapid determination of yeast viability, John Wiley & Sons.
- Lepe, J. A. S. and B. I. Leal (2004). Los Vinos Espumosos. Microbiología Enológica - Fundamentos de vinificación, Mundi-Prensa: 631-672.
- Marchal, R. and P. Jeandet (2009). Use of Enological Additives for Colloid and Tartrate Salt Stabilization in White Wines and for Improvement of Sparkling Wines Foaming

Properties. Wine Chemistry and Biochemistry. M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, Springer: 127-158.

Martinez-Rodriguez, A. and E. Pueyou (2009). Sparkling Wines and Yeasts Autolysis. Wine Chemistry and Biochemistry. M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, Springer: 61-80.

Martynenko, N. N. and I. M. Gracheva (2003). "Physiological and Biochemical Characteristics of Immobilized Champagne Yeasts and Their Participation in Champagnizing Processes: A Review." Applied Biochemistry and Microbiology **39**(5): 439-445.

Moser, A. (1988). Bioreactors. Bioprocess Technology - Kinetics and Reactors, Springer-Verlag: 66-137.

Nielsen, J. (2006). Microbial process kinetics. Basic Biotechnology. C. Ratledge and B. Kristiansen. New York, Cambridge University Press: 155-180.

Nogueira, A. R. d. S. (2009). Fermentação Contínua de Mosto com Leveduras Imobilizadas em Alginato. Departamento de Química. Aveiro, Universidade de Aveiro. **Mestrado**: 97.

Nussinovitch, A. (1997). Immobilization and encapsulation. Hydrocolloid Applications: Gum Technology in the Food and Other Industries, Chapman & Hall.

Nussinovitch, A. (2010). Bead Formation, Strengthening, and Modification Polymer Macro- and Micro-Gel Beads: Fundamentals and Applications, Springer New York: 27-52.

Portugal, I., S. C. Ribeiro, A. M. R. B. Xavier, F. Centeno and P. Strehaiano (2011). "Immobilised yeast grape must deacidification in a recycle fixed bed reactor." International Journal of Food Science & Technology **46**(2): 284-289.

Quintas, A. and C. Ascenso (2008). Glicólise. Bioquímica - Organização Molecular da Vida. A. Quintas, A. P. Freire and M. J. Halpern, Lidel: 333-352.

Raj, A. E. and N. G. Karanth (2006). Fermentation Technology and Bioreactor Design. Food Biotechnology. K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto and R. E. Levin, Taylor & Francis Group.

Rankine, B. C. (1989). Making good wine: a manual of winemaking practice for Australia and New Zealand, Sun Books.

Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud (2006a). Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Wine Yeasts. Handbook of Enology, John Wiley & Sons, Ltd: 53-77.

Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud (2006b). Other Winemaking Methods. Handbook of Enology, John Wiley & Sons, Ltd: 445-480.

Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean and D. Dubourdieu (2006c). Organic Acids in Wine. Handbook of Enology, John Wiley & Sons, Ltd: 1-49.

Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean and D. Dubourdieu (2006d). Stabilizing Wine by Physical and Physico-chemical Processes. Handbook of Enology, John Wiley & Sons, Ltd: 369-386.

Ronald S, J. (2008a). Postfermentation Treatments and Related Topics. Wine Science (Third Edition). San Diego, Academic Press: 418-XIX.

Ronald S, J. (2008b). Specific and Distinctive Wine Styles. Wine Science (Third Edition). San Diego, Academic Press: 520-XXII.

Santos, P. C., O. M. Pereira, F. Gonçalves, J. Tomás Simões and M. N. d. Pinho (2000). "Ensaio de Estabilização Tartárica em Vinhos Portugueses: Estudo Comparativo da Electrodiálise e de um Método Tradicional." Ciência e Técnica Vitivinícola **15**(2): 95-108.

Shuler, M. L. and F. Kargi (2002a). How Cells Grow. Bioprocess Engineering - Basic Concepts, Prentice Hall PTR: 155-206.

Shuler, M. L. and F. Kargi (2002b). Operating considerations for bioreactors for suspension and immobilized cultures. Bioprocess Engineering - Basic Concepts, Prentice Hall PTR: 245-284.

Silva, S., F. Ramón-Portugal, P. Andrade, S. Abreu, M. d. F. Teixeira and P. Strehaiano (2003). "Malic Acid Consumption by Dry Immobilized Cells of *Schizosaccharomyces pombe*." American Journal of Enology and Viticulture **54**(1): 50-55.

Silva, S., F. Ramon Portugal, P. Silva, A. Susana, M. d. F. Teixeira and P. Strehaiano (2002a). "Démalication de moûts blancs et rouges par des levures *Schizosaccharomyces pombe* incluses dans des billes d'alginate sèches." Revue Française d'Oenologie **196**: 18-21.

Silva, S., F. Ramon Portugal, P. Silva, M. d. F. Teixeira and P. Strehaiano (2002b). "Utilisation de levures incluses pour le traitement des arrêts de fermentations." Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **36**(3): 161-168.

Stevenson, T. (2005). The New Sotheby's Wine Encyclopedia, Dorling Kindersley.

Strehaiano, P., F. Ramon-Portugal and P. Taillandier (2006). Yeasts as Biocatalysts Yeasts in Food and Beverages. A. Querol and G. Fleet, Springer Berlin Heidelberg: 243-283.

Teixeira, J. A., M. M. d. Fonseca and A. A. Vicente (2007). Geometrias e Modos de Operação. Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações. M. M. d. Fonseca and J. A. Teixeira, Lidel: 2768.

Torresi, S., M. T. Frangipane and G. Anelli (2011). "Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review." Food Chemistry **129**(3): 1232-1241.

van Zessen, E., J. Tramper, A. Rinzema and H. H. Beftink (2005). "Fluidized-bed and packed-bed characteristics of gel beads." Chemical Engineering Journal **115**(1-2): 103-111.

Vives, C., C. Casas, F. Gòdia and C. Solà (1993). "Determination of intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in Ca-alginate beads and observations on their growth." Applied Microbiology and Biotechnology **38**: 467-472.

Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (1999a). Enzyme Kinetics, Inhibition, and Regulation. Fundamentals of Biochemistry, Wiley: 322-349.

Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (1999b). Glucose Catabolism. Fundamentals of Biochemistry, Wiley: 382-425.

Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2006). Glucose Catabolism. Fundamentals of Biochemistry - Life at Molecular Level, John Wiley & Sons Inc: 427-471.

Wang, L., R. M. Shelton, P. R. Cooper, M. Lawson, J. T. Triffitt and J. E. Barralet (2003). "Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering." Biomaterials **24**(20): 3475-3481.

Zamora, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. Wine Chemistry and Biochemistry. M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, Springer: 3-26.

7. Anexos

ANEXO A: Caracterização das esferas de ProElif®

Tabela 12 - Dados referentes à determinação da velocidade terminal das esferas de alginato ProElif® hidratadas

Distância (cm)	Tempo (s)						Média	Desvio
	E1	E2	E3	E4	E5	E6		
5	1	1	2	2	2	1	1,50	0,548
10	3	3	3	3	3	3	3,00	0,000
15	5	5	5	4	5	5	4,83	0,408
30	11	9	10	11	10	10	10,17	0,753

ANEXO B: Efeito do caudal de recirculação e dose de ProElif® aplicada

Tabela 13 - Dados referentes aos ensaios de variação da concentração de ProElif®, para o caudal máximo de 207 L/h

Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)
0,0	20,16	0,0	21,48	0,0	20,58
2,0	19,14	15,0	21,18	6,0	20,64
17,0	20,40	24,0	21,18	21,0	20,22
26,0	19,14	39,0	19,68	30,0	20,26
41,0	15,48	48,0	18,78	45,0	18,84
50,0	12,96	63,0	16,20	54,7	18,18
65,0	8,94	72,0	14,58	72,2	16,44
74,0	6,96	92,0	11,34	96,0	14,40
101,5	3,31	114,0	8,34	117,0	11,82
122,3	1,91	135,0	5,76	126,0	11,22
137,0	1,29	144,0	5,04	148,6	9,18
146,0	1,03	159,5	3,84	165,0	7,98
161,0	0,75	168,0	3,30	174,0	7,38
-	-	183,0	2,52	189,0	6,12
-	-	192,0	2,22	198,0	5,40
-	-	207,0	1,70	213,0	4,56
-	-	216,0	1,44	222,0	4,26
-	-	231,0	1,14	235,9	3,54
-	-	-	-	245,0	3,24
-	-	-	-	264,8	2,66
-	-	-	-	285,0	2,14

Tabela 14 - Dados referentes aos ensaios de variação da concentração de ProElif[®], para o caudal mínimo de 38 L/h

Ensaio 4		Ensaio 2		Ensaio 3	
Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)
0,0	20,16	0,0	20,88	0,0	20,93
4,0	23,52	3,0	22,08	1,0	22,02
19,0	21,00	26,0	21,42	25,0	20,52
28,0	21,42	45,5	19,26	43,8	20,16
43,0	19,44	50,8	18,42	73,0	18,66
52,0	17,40	66,0	15,84	91,5	17,50
67,0	14,34	75,0	14,10	112,0	15,50
76,0	12,30	90,0	11,82	136,0	12,72
103,5	8,28	99,0	10,08	160,5	9,60
124,0	6,12	114,0	8,64	169,0	8,82
139,0	4,74	123,0	7,74	192,0	7,44
148,0	3,75	148,0	5,16	216,0	6,66
163,0	2,78	162,0	4,26	258,7	3,84
172,0	2,34	171,0	3,66	286,5	3,12
187,0	1,68	192,0	2,42	311,0	2,40
196,0	1,56	218,0	1,59	329,5	1,98
-	-	234,0	1,26	353,5	1,52
-	-	243,0	1,11	384,2	1,14
-	-	258,0	0,86	408,0	0,93
-	-	-	-	424,0	0,82
-	-	-	-	433,0	0,78
-	-	-	-	448,0	0,64

ANEXO C: Fermentação de vinho não estabilizado para aplicação de CMC

Tabela 15 - Dados referentes aos ensaios de avaliação do efeito da CMC na cinética fermentativa

Ensaio 7 - s/CMC		Ensaio 8 - c/CMC	
Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)
0,0	20,94	0,0	20,50
1,0	23,76	15,0	23,46
2,0	23,16	24,5	23,28
28,3	22,56	39,0	22,50
50,0	20,50	71,5	18,90
65,0	17,58	87,0	16,68
74,0	15,84	96,0	15,18
89,0	12,90	111,0	13,20
98,0	11,76	120,0	11,88
113,0	8,76	135,0	9,78
122,0	7,92	144,0	8,82
137,0	6,12	159,0	6,96
146,0	4,88	183,5	4,69
161,0	3,72	192	4,17
170,0	3,26	220,25	2,76
217,5	1,39	240	2,02
234,0	1,20	257	1,58
-	-	279	1,12
-	-	288	1,07
-	-	303	0,79

ANEXO D: Operação em reator batch sequencial (SBR)

Tabela 16 - Dados referentes aos quatro primeiros ciclos de reutilização da biomassa

Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4	
Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)
0,0	21,85	0,0	20,48	0,0	21,14	0,0	20,69
2,0	25,44	14,5	16,26	15,0	15,00	6,0	18,00
17,0	22,80	23,0	13,92	29,5	10,68	21,5	12,24
26,0	21,80	48,2	7,62	51,0	5,82	30,0	9,90
41,0	18,42	70,8	4,20	76,8	2,28	45,5	6,18
50,0	16,08	86,5	2,70	87,5	1,63	54,0	4,62
65,5	12,60	95,0	2,04	96,0	1,28	81,8	1,92
74,0	10,32	110,5	1,44	111,5	0,82	106,0	0,90
98,0	5,94	119,0	1,19	120,0	0,64	117,5	0,60
122,3	3,12	134,5	0,77	135,5	0,40	126,0	0,47
137,0	1,92	143,0	0,63	-	-	147,0	0,23
146,0	1,44	163,0	0,38	-	-	-	-
162,0	1,39	-	-	-	-	-	-
170,0	1,15	-	-	-	-	-	-
185,0	0,81	-	-	-	-	-	-
194,0	0,67	-	-	-	-	-	-
209,0	0,43	-	-	-	-	-	-
217,0	0,36	-	-	-	-	-	-

Tabela 17 - Dados referentes aos quatro últimos ciclos de reutilização da biomassa

Ciclo 5		Ciclo 6		Ciclo 7		Ciclo 8	
Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)	Tempo (h)	Glucose/Frutose (g/L)
0,0	19,63	0,0	21,66	0,0	20,97	0,0	20,87
1,5	18,72	6,0	18,96	1,2	20,52	1,0	20,58
17,0	12,84	21,5	12,96	17,0	14,82	16,0	14,82
25,5	10,38	30,0	9,78	25,0	11,16	41,0	6,48
41,5	6,30	45,0	5,94	40,5	6,66	49,0	4,56
49,5	4,74	54,0	4,26	49,0	4,68	64,0	2,55
65,0	2,88	71,5	2,16	77,0	1,52	73,0	1,85
73,5	2,09	99,0	0,72	161,0	0,01	99,0	0,65
103,5	0,73	117,5	0,33	166,0	0,01	121,0	0,27
125,5	0,35	126,0	0,21	-	-	139,0	0,14
143,0	0,18	141,5	0,07	-	-	161,0	0,06
185,0	0,03	147,5	0,03	-	-	-	-