

Priscilla dos Santos de Oliveira

**ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE LEVEDURAS
CERVEJEIRAS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Título de Mestre em Engenharia de
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Coorientador: Prof. Dr. Márcio José
Rossi

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Priscilla dos Santos de
Estratégias para produção de leveduras
cervejeiras / Priscilla dos Santos de Oliveira ;
orientador, Jorge Luiz Ninow, coorientador, Márcio
José Rossi, 2019.
125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

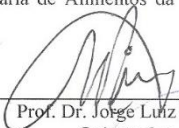
1. Engenharia de Alimentos. 2. *Saccharomyces
cerevisiae*. 3. Batelada Alimentada. 4. Processo
Contínuo. I. Ninow, Jorge Luiz. II. Rossi, Márcio
José. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

“ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS”

Por

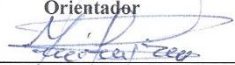
Priscilla dos Santos de Oliveira

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.




Prof. Dr. Jorge Lutz Ninow

Orientador



Prof. Dr. Márcio José Rossi

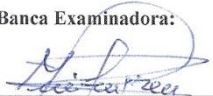
Coorientador



Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coordenadora

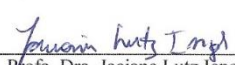
Banca Examinadora:



Prof. Márcio José Rossi



Prof. Dr. Diogo Robl



Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

Florianópolis, 08 de março de 2019.

RESUMO

O crescimento do número de cervejarias no mercado mundial tem alavancado a abertura de indústrias focadas na produção de leveduras cervejeiras. As dificuldades encontradas ao longo do processo de produção destes microrganismos estão, em grande parte, conectadas às complexidades envolvidas em controlar as concentrações de açúcares no biorreator. As oscilações nas concentrações de substrato estimulam o metabolismo respiro-fermentativo pela ação do efeito *Crabtree* e reduzem a produtividade final do processo. Etanol e glicerol são substratos empregados na produção de proteína microbiana e metabolizados exclusivamente de forma oxidativa por leveduras *Saccharomyces*, garantindo maiores conversões de substrato em biomassa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar estratégias de produção distintas que maximizem a produtividade de leveduras cervejeiras a partir de substratos alternativos. Primeiramente, etanol e glicerol foram avaliados como potenciais substratos a serem utilizados pelas cepas *American lager* (TB81) e *English ale* (TB07) durante cultivos em frascos agitados. Os resultados indicaram que ambas as cepas foram capazes de metabolizar o etanol no meio de cultura, porém quantidades pequenas – menores que 20% do valor de substrato inicial – de glicerol. Na segunda fase do trabalho, a cepa TB81 foi utilizada durante os experimentos em biorreator utilizando etanol como substrato. A melhor estratégia de produção foi definida a partir de um processo evolutivo comparado. O Sistema I caracterizou-se por uma batelada alimentada por pulsos e a produtividade final obtida foi de $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. No Sistema II foi realizado um estágio inicial em batelada seguido de uma batelada alimentada por pulsos. A produtividade final obtida foi $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, alcançando um aumento de 25% frente ao Sistema I. No Sistema III uma mistura de etanol e glicose foi utilizada, alcançando uma produtividade de $0,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, relativo a um aumento de 300% da produtividade quando comparado aos Sistemas I e II. A última fase avaliou a capacidade fermentativa das leveduras produzidas e a necessidade de um estágio de adaptação ao mosto de malte após a produção em biorreator. Os resultados indicaram perfis similares de sólidos solúveis totais e pH para os fermentados obtidos usando leveduras previamente adaptadas ao mosto de malte, não adaptadas e aquelas produzidas comercialmente, indicando que o passo de adaptação final é dispensável. Este é o primeiro trabalho a avaliar e desenvolver estratégias de propagação de leveduras cervejeiras em fontes de carbono alternativas. Estudos futuros serão necessários para identificar as melhores composições para os meios de cultura, assim como estudar a

implementação do processo contínuo durante cultivos em alta densidade celular.

Palavras-chave: *Saccharomyces* sp. Produção de biomassa industrial. Batelada alimentada. Processo contínuo.

ABSTRACT

The growth of breweries worldwide has boosted the emergence of companies focused on the production of brewing yeasts. The difficulties found along the production process of these microorganisms are mostly due to the complexity involved to control the sugar concentrations in the bioreactor. The oscillations in the substrate concentrations stimulate the respiro-fermentative metabolism by the *Crabtree* effect and diminish the final productivity of the process. Ethanol and glycerol are substrates used on the production of single cell protein and are metabolized only oxidatively by *Saccharomyces*, which would guarantee greater biomass yields. The goal of this research is to evaluate distinct production strategies that maximize the productivity of brewer's yeasts. Firstly, ethanol and glycerol were evaluated as potential substrates by the *American lager* (TB81) and *English ale* (TB07) strains during cultures in shaken flasks. The results indicated that both strains were able to metabolize the ethanol in the culture medium, but insufficient amounts - less than 20% of the initial substrate value - of glycerol. Throughout the second stage, the strain TB81 was propagated on bioreactor experiments applying ethanol as substrate. The best production strategy was defined by an evolutionary and comparative process. System I was defined as an intermittent fed-batch and its final productivity was $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. During System II, an initial batch stage was applied followed by an intermittent fed-batch. Its final productivity was $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, an increase of 25% compared to System I. A mixture of glucose and ethanol was applied on System III, achieving a productivity of $0,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, an increase of 300% of productivity compared to System I and II. The last stage evaluated the fermentative capacity of the yeasts produced and the necessity to apply an adaptation step to malt extract after the propagation in bioreactor. The results indicated similar profiles of total soluble solids and pH for the beers fermented with yeasts previously adapted to malt, unadapted and commercial yeast, indicating that the final adaptation is a dispensable step. This is the first research to evaluate and develop brewing yeasts production strategies on alternative carbon sources. Future studies will be needed to identify the best compositions for the culture media used as well as to study the implementation of the continuous process during high density cultures.

Keywords: *Saccharomyces* sp. Industrial biomass production. Fed-batch. Continuous culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Reprodução assexuada em leveduras fragmentada em suas quatro fases: mitose (M), <i>gap</i> 1 (G_1), síntese (S) e <i>gap</i> 2 (G_2). Os fatores externos são determinantes para que a célula dê início (<i>START</i>) ou não ao ciclo reprodutivo	26
Figura 2.2 – Metabolismo dos principais carboidratos presentes no mosto cervejeiro e as enzimas envolvidas: INV, invertase; GL, α -glicosidase, HXK, hexocinase; PGI, fosfoglicoisomerase; PFK, fosfofrutocinase; FBA, aldolase; ISO, isomerase; TPI, triose-fosfato-desidrogenase; PGK, fosfoglicerocinase; GPM, fosfogliceromutase; ENO, enolase; PYK, piruvato cinase. Hx_t: transportadores de hexoses; Malt_t: transportador de maltose; Mtr_t: transportador de maltotriose; ATPase: ATP-sintase	33
Figura 2.3 – Degradação do etanol em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Em cinza as enzimas envolvidas nas diferentes vias, sendo: ADH: álcool desidrogenases	34
Figura 2.4 – Rotas propostas para catabolismo de glicerol em leveduras via (a) L-glicerol 3-fosfato e (b) dihidroxiacetona	37
Figura 2.5 – Diagrama dos diferentes estágios do processo de produção industrial de biomassa de leveduras	43
Figura 2.6 – Processo de produção de leveduras em cervejaria	48
Figura 2.7 – Fluxograma de produção das leveduras cervejeiras pela Lallemand. FRV: Filtro Rotativo a vácuo; SLF: Secador de leite fluidizado; CQ: Controle de qualidade	50
Figura 2.8 – Fluxograma dos processos utilizados pela White Labs para produção de leveduras cervejeiras. (a) Primeiro processo desenvolvido e (b) FlexCell. CQ: Controle de qualidade.....	52
Figura 2.9 – Processo de produção de leveduras pela empresa Bio4. CQ: Controle de qualidade	54
Figura 3.1 – Aparato experimental para o cultivo em frascos. ①: pedra difusora; ②: filtro de ar 0,2 μ m; ③: válvula para controle da aeração; ④: bomba de ar	56
Figura 3.2 – Exemplificação do uso do aparato de deslocamento de bolha de sabão para determinação da vazão de ar no cultivo em frascos aerados	58
Figura 3.3 – Vaso do biorreator RALF+ com a tampa e portas de acesso. ①: sensor de nível de espuma; ②: sensor de pH, ③: sensor de oxigênio dissolvido; ④: sensor de temperatura. ⑤: entrada de alimentação; ⑥: saída de meio	61

Figura 3.4 – Aparato experimental envolvido nos cultivos de produção de leveduras cervejeiras a partir de processos em batelada alimentada e contínuo	62
Figura 4.1 – Determinação das velocidades específicas máximas de crescimento em etanol para as cepas TB81 à (a) 2 e (b) 6 g·L ⁻¹ e TB07 a (c) 2 e (d) 6 g·L ⁻¹	73
Figura 4.2 – Velocidades específicas máximas de crescimento em glicerol para as cepas TB81 à (a) 5 e (b) 20 g·L ⁻¹ e TB07 a (c) 5 e (d) 20 g·L ⁻¹	75
Figura 4.3 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB81 (---) em meio contendo etanol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato (▲). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) C _{S,i} = 2 g·L ⁻¹ e (b) 6 g·L ⁻¹ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) C _{S,i} = 2 g·L ⁻¹ e (d) 6 g·L ⁻¹	78
Figura 4.4 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB07 (---) em meio contendo etanol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato TB07 (●). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) C _{S,i} = 2 g·L ⁻¹ e (b) 6 g·L ⁻¹ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) C _{S,i} = 2 g·L ⁻¹ e (d) 6 g·L ⁻¹	79
Figura 4.5 – Correlação entre os dados preditos pelo modelo de (a) Monod (1941) e (b) Andrews (1968) <i>versus</i> os dados observados assim como os resíduos correspondentes ao modelo de (c) Monod (1941) e (d) Andrews (1968) para a cepa TB81 durante o crescimento em etanol à C _{S,i} = 6 g·L ⁻¹	82
Figura 4.6 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB81 (---) em meio contendo glicerol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato (▲). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) C _{S,i} = 2 g·L ⁻¹ e (b) 6 g·L ⁻¹ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) C _{S,i} = 2 g·L ⁻¹ e (d) 6 g·L ⁻¹	84
Figura 4.7 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB07 (---) em meio contendo glicerol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato TB07 (●). Crescimento descrito pelo modelo	

- de Monod (1941) à (a) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (b) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (d) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$85
- Figura 4.8 – Concentração de biomassa (■) e etanol (▲) durante o cultivo da cepa TB81 a partir do processo em batelada alimentada por pulsos (Sistema I). Curvas de tendência polinomial para a concentração de biomassa (—) e etanol (—) no biorreator.....88
- Figura 4.9 – Concentração de biomassa (■) e etanol (▲) durante o cultivo da cepa TB81 a partir do processo em batelada alimentada por pulsos (Sistema I) após o ajuste das alimentações de acordo com o Programa 2. Ajustes aos dados experimentais de biomassa (—) e etanol (—) a partir do programa para simulação de um cultivo em batelada alimentada por pulsos. A seta indica o início da desaceleração do crescimento celular89
- Figura 4.10 – Concentração de biomassa (■), etanol (▲) e glicose (◆) durante o cultivo da cepa TB81 durante o cultivo em batelada alimentada por pulsos com uma fase em batelada preliminar (sistema II). Curvas dos ajustes para biomassa (—), etanol (—) e glicose (—) a partir do programa para simulação de cultivo em batelada alimentada por pulsos. A linha tracejada distingue a etapa em batelada inicial da fase em batelada alimentada. A seta indica o início da desaceleração do crescimento celular91
- Figura 4.11 – Concentração de biomassa (■), etanol (▲) e glicose (◆) em função da vazão específica de alimentação durante cinco dias do cultivo permanente da cepa TB81 (sistema III) com alimentação de 500 C-mM de uma mistura de glicose (60%) e etanol (40%). A linha tracejada indica a diluição crítica e os valores de concentração associados92
- Figura 4.12 – Estudos de fermentação das leveduras em extrato de malte. (a): leveduras submetidas a uma etapa prévia de adaptação em extrato de malte (AD+) ①, e leveduras não submetidas a adaptação (AD-) ②. (b) leveduras AD+ e AD- sendo testadas quanto ao desempenho fermentativo em comparação com levedura controle (C). A cor mais escura em ① ocorre devido a adição do extrato de malte no estágio de adaptação95
- Figura 4.13 – Concentração de sólidos solúveis totais (SST) e pH durante a fermentação de mosto de malte pela cepa TB81 controle (■) e advindas do cultivo em batelada alimentada utilizando apenas etanol como substrato (Sistema II) com a adição de uma etapa de adaptação (▲) e sem etapa de adaptação (●)96
- Figura 4.14 – Concentração de sólidos solúveis totais (SST) e pH durante a fermentação de mosto de malte pela cepa TB81 controle (■) e

advindas do cultivo contínuo em substrato contendo a mistura de glicose (60%) e etanol (40%) (Sistema III) com (▲) e sem etapa de adaptação (●)	98
Figura A.1 – Curva padrão para determinação da evaporação do etanol de acordo com sua concentração no meio de cultura	112
Figura B.1 – Curva padrão para determinação da concentração de glicerol.....	113
Figura D.1 – Fluxograma da rotina aplicada ao Programa 1	118
Figura D.2 – Exemplo de formatação da planilha a ser inserida pelo usuário com dados do cultivo na rotina computacional	119
Figura D.3 – Janela para seleção do modelo cinético a ser utilizado	119
Figura D.4 – Exemplo da inserção de dados pelo usuário durante a execução do programa	120
Figura E.1 – Fluxograma da rotina aplicada ao Programa 2	122
Figura E.2 – Exemplo de formatação da planilha a ser inserida pelo usuário com dados do cultivo na rotina computacional	123
Figura E.3 – Finalização do Programa 2	123
Figura A.1 – Valores de $\chi^2_{v,P}$, onde $P = P(\chi^2 \geq \chi^2_{v,P})$	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Produção SCP usando etanol como substrato durante cultivos em batelada alimentada.....	42
Tabela 3.1 – Fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos experimentos em frascos	56
Tabela 3.2 – Variação na vazão de alimentação de substrato (F_E), volume inicial de cultivo (V_i), volume final de cultivo (V_F) e tempo de processo (t_f) de acordo com os Sistemas definidos	60
Tabela 4.1 – Dados alimentados no Programa 1 para estimativa dos parâmetros cinéticos durante os cultivos das cepas TB81 e TB07 em etanol e glicerol	76
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos através das simulações do crescimento das cepas TB81 e TB07 em etanol.....	77
Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos através das simulações do crescimento das cepas TB81 e TB07 em glicerol.....	83
Tabela C.1 – Quantidades e características dos maltes utilizados durante a produção do mosto cervejeiro.....	114
Tabela C.2 – Valores de sais adicionados para ajuste da água de mosturação.....	115
Tabela C.3 – Teor de α – ácidos.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Coefficiente angular
AD-	Adaptação negativa
AD+	Adaptação positiva
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	ATP-sintase
ADH1	Álcool desidrogenase 1
ADH5	Álcool desidrogenase 5
Adh1p	Etanol desidrogenase 1
Adh3	Etanol desidrogenase 3
Adh4p	Etanol desidrogenase 4
Adh5p	Etanol desidrogenase 5
AGT1	α -glicosídeos permease 1
ENO	Enolase
EQM	Erro quadrático médio
evap	Evaporação
c	Controle
CoA	Coenzima A
CQ	Controle de qualidade
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo na forma oxidada
FBA	Aldolase
FBP1	Frutose-bifosfatase 1
FRV	Filtro Rotativo a vácuo
Fd	Fator de diluição
G ₁	Do inglês, <i>gap 1</i> – intervalo 1
G ₂	Do inglês, <i>gap 2</i> – intervalo 2
GK	Glicerol quinase
GL	α -glicosidase
GPM	Fosfogliceromutase
GPO	Glicerol-3-fosfato oxidase
gL	Graus de liberdade
H ⁺	Cátion hidrogênio
H ₂ O	Água
HXK	Hexocinase
INV	Invertase
ISO	Isomerase
t_HX	Transportador de hexose
t_MALT	Transportador de maltose

t_MTR	Transportador de maltotriose
M	Mitose
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
PFK	Fosfofrutocinase
PGI	Fosfoglicoisomerase
PGK	Fosfoglicerocinase
PPi	Ânion pirofosfato
PYK	Piruvato cinase
S	Síntese
SCP	Do inglês, <i>Single Cell Protein</i> . Referência à indústria de proteínas microbianas.
SCO	Do inglês, <i>Single Cell Oils</i> . Referência à indústria de óleos microbianos.
Sfa1p	Álcool e aldeído desidrogenase
SLF	Secador de leite fluidizado
STR	Do inglês, <i>Stirred Tank Reactor</i> – reator de tanque agitado.
SUC	Gene da invertase
T_HX	Transportador de hexoses
T_MAL	Transportador de maltose
T_MTR	Transportador de maltotriose
TCA	Ciclo do ácido cítrico
TB81	Teckbrew <i>American lager</i>
TB07	Teckbrew <i>English Ale</i>
TPI	Triose-fosfato-desidrogenase

LISTA DE SÍMBOLOS

$Abs_{\text{padrão}}$	Absorbância da solução padrão (nm)
Abs_{teste}	Absorbância da solução teste (nm)
C_{ETOH}	Concentração de etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{\text{ETOH},\%}$	Concentração de etanol (% v/v)
C_{GLICEROL}	Concentração de glicerol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{GLICOSE}	Concentração de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_S	Concentração de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{S,E}$	Concentração de substrato na alimentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{S,I}$	Concentração de substrato inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{S,F}$	Concentração de substrato final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_X	Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{X,E}$	Concentração de substrato final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{X,I}$	Concentração de biomassa inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_{X,F}$	Concentração de biomassa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
d	Fator de conversão
D	Diluição (h^{-1})
D_{CRIT}	Diluição crítica (h^{-1})
d_{ETOH}	Densidade do etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$evap$	Constante de evaporação
f	Fator de diluição
F	Vazão ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
F_E	Vazão de entrada ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
F_S	Vazão de saída ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
K_i	Constante de inibição ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_S	Constante de saturação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
ms	Coefficiente de manutenção celular ($\text{g}_X\cdot\text{g}_S^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
P_X	Produtividade em biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
q	Vazão específica de ar (min^{-1})
SST	Sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$)
t	Tempo (h)
t_{del}	Tempo de deslocamento (min^{-1})
t_r	Tempo de total de produção (h)
t_G	Tempo de geração (h)

V	Volume (L)
V_{MEIO}	Volume do meio de cultura (L)
V_{MOSTO}	Volume do mosto (L)
V_{PERC}	Volume percorrido (L)
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em biomassa ($\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$)
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS	23
1.1.1	Objetivo Geral	23
1.1.2	Objetivos Específicos	24
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	LEVEDURAS	25
2.1.1	Fisiologia	25
2.1.2	Leveduras <i>ale</i> e <i>lager</i>	27
2.1.3	Metabolismo de carbono	28
2.1.3.1	Carboidratos	30
2.1.3.2	Etanol	34
2.1.3.3	Glicerol	36
2.1.3.4	Metabolismo de múltiplos substratos em condições limitante... ..	38
2.2	BIORREATORES	39
2.2.1	Modos de operação	41
2.3	PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE LEVEDURAS	42
2.3.1	Panificação	43
2.3.2	Proteínas microbianas	45
2.3.3	Leveduras para cerveja	46
2.3.3.1	Cenário mundial	46
2.3.3.2	Brasil	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1	MICROORGANISMOS	55
3.2	MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	55
3.3	FRASCOS AGITADOS	55
3.3.1	Meios de cultura	55
3.3.2	Inóculo	56
3.3.3	Sistemas de cultivo	56
3.4	BIORREATOR	58
3.4.1	Meios de cultura	58
3.4.2	Inóculo	59
3.4.3	Estratégias utilizadas	60
3.4.4	Sistemas de cultivo	60
3.5	ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO	62
3.5.1	Meios de cultura	62
3.5.2	Inóculo	63
3.5.3	Sistema de cultivo	63
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	63
3.6.1	Determinação da concentração de biomassa seca	63

3.6.2	Determinação da concentração de etanol.....	64
3.6.3	Determinação da concentração de glicerol.....	65
3.6.4	Determinação da concentração de glicose.....	66
3.6.5	Determinação da vazão específica de aeração.....	67
3.7	TRATAMENTO DE DADOS	67
3.7.1	Frascos agitados	67
3.7.1.1	Balanço de massa	67
3.7.2	Biorreator.....	69
3.7.2.1	Balanço de massa	69
3.7.3	Ajuste de dados	70
3.7.4	Análise estatística	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS.....	73
4.2	EXPERIMENTOS EM BIORREATOR.....	88
4.3	ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO.....	94
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	102
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE A – DETERMINAÇÃO DA EVAPORAÇÃO DO ETANOL NO MEIO DE CULTURA	112
	APÊNDICE B – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL	113
	APÊNDICE C – PRODUÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO	114
C.1.	MOSTURA	114
C.2.	CLARIFICAÇÃO	115
C.3.	FERVURA.....	115
C.4.	TRATAMENTO DO MOSTO	116
	APÊNDICE D – PROGRAMA PARA ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E SIMULAÇÃO DE CULTIVOS EM BATELADA	117
D.1.	VISÃO GERAL	117
D.2.	ESTRUTURA E EXECUÇÃO	118
	APÊNDICE E – PROGRAMA PARA SIMULAÇÃO DE CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS	121
E.1.	VISÃO GERAL	121
E.2.	ESTRUTURA E EXECUÇÃO	123
	ANEXO A – DISTRIBUIÇÕES DE χ^2	124

1 INTRODUÇÃO

Em 1972, Ken Grossman mudou-se do Sul para o Norte da Califórnia com objetivo de iniciar seus estudos na cidade de Chico. Desde aquela época, fazer cerveja em casa era um hobby o qual Ken vinha cultivando. Quatro anos mais tarde esse mesmo hobby fomentaria a criação de sua loja de insumos para cervejeiros caseiros na mesma cidade. O objetivo de Ken, no entanto, nunca foi a loja; ele almejava em determinado momento criar sua própria cervejaria. Com a ajuda indireta de Jimmy Carter, então presidente dos Estados Unidos que em 1978 oficializou um decreto que liberava a produção artesanal de cerveja em todo território americano – a qual era instituída como ilegal desde o período da Lei Seca. Através de equipamentos derivados da indústria de laticínios e refrigerantes, Ken foi finalmente capaz de fundar sua cervejaria. A Sierra Nevada é hoje uma das mais proeminentes cervejarias americanas e Ken Grossman um dos exemplos mais explícitos do que foi o avanço do mercado de cervejeiros artesanais na década de 80 nos Estados Unidos (BAMFORTH, 2009). Esse mesmo movimento não seria apenas local e viria a impulsionar uma mudança global no consumo de cervejas.

No Brasil, observa-se que nos últimos 30 anos há uma tendência crescente associada a produção de cerveja. Em 2016, o país alcançou o patamar de 140 milhões de hectolitros produzidos, colocando-se em terceiro lugar no ranking mundial, atrás apenas da China (460 milhões de hectolitros) e EUA (221 milhões de hectolitros) (BARTH-HASS, 2016; CERVBRASIL, 2016). O número de estabelecimentos classificados como “microcervejarias” ou cervejarias “artesanais” teve um aumento igualmente notável, cerca de seis vezes desde 2007, segundo Marcusso e Muller (2017). Essa evolução não ocorre individualmente; além das microcervejarias, outras empresas relacionadas a esse mercado também vêm adquirindo cada vez mais espaço no mercado nacional, destacando-se dentre elas empresas responsáveis pela produção de uma ampla gama de leveduras cervejeiras, tanto para atender as microcervejarias quanto os cervejeiros caseiros.

Através da história, leveduras tem atuado como protagonistas na panificação e produção de bebidas alcoólicas, sendo ambas as áreas frações significativas da indústria biotecnológica. As leveduras cervejeiras foram selecionadas ao longo dos anos durante fermentações consecutivas. Elas apresentam, portanto, características fundamentais para produzir as cervejas hoje consumidas. Essas leveduras são usualmente classificadas como *ale* ou *lager* – *Saccharomyces cerevisiae*

ou *Saccharomyces pastorianus* – apresentando pequenas divergências entre si quanto a temperatura ótima de fermentação, floculação, capacidade de atenuação do mosto, perfil de aromas produzidos, entre outros (BOULTON; QUAIN, 2001, BAMFORTH, 2006).

A produção de leveduras cervejeiras é um processo que ocorre tradicionalmente na própria cervejaria. A partir de uma cultura matriz, o escalonamento é realizado no próprio mosto cervejeiro lupulado. Este mosto contém uma mistura de açúcares incluindo maltose (45%), maltotriose (15%), glicose (10%), sacarose (5%), frutose (2%) e dextrina (23%) (BAMFORTH, 2006). Essa produção baseada em um processo contendo bateladas sequenciais acaba por ter baixos valores de conversão de substrato em biomassa, uma vez que ocorre apenas fermentação nestas condições. Devido à baixa concentração de células obtidas, é comum a reutilização de leveduras como inóculo para uma nova batelada. Essa metodologia também apresenta desvantagens associadas geralmente a possíveis mutações ou ainda contaminações, sejam por bactérias ou outras leveduras (BAMFORTH, 2006; OSULLIVAN; SINDEREN; VAUGHAN, 2005).

Empresas especializadas na produção de leveduras para panificação prezam altas concentrações celulares e adotam processos em batelada alimentada. Este modo de operação previne, no caso das leveduras, o efeito *Crabtree*, o qual se caracteriza pela repressão do metabolismo oxidativo devido a concentração de glicose no meio. As concentrações nas quais a repressão ocorre varia de acordo com cada cepa, geralmente em torno de $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. (BAMFORTH, 2006; MORLEY; PFEIFFER, 2014). Outra característica recorrente nesse modo de operação é a presença do perfil respiro-fermentativo, onde tanto o metabolismo oxidativo quanto fermentativo são verificados e a concentração final de leveduras acaba tornando-se menor do que a almejada (GÓMEZ-PASTOR et al., 2011)

Além do processo desenvolvido para produção de leveduras para panificação, a indústria de proteínas microbianas (*Single Cell Protein* – SCP) também tem como objetivo maximizar a concentração final de biomassa (CASTRILLO; UGALDE, 2002). A utilização de meios contendo substratos que sejam metabolizados de maneira estritamente oxidativa é usualmente aplicada nesta indústria para que elevados valores de fatores de conversão de substrato em biomassa (maiores que $0,40 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) sejam alcançados. No caso de leveduras, destacam-se o etanol e o glicerol como dois desses substratos. Entre os benefícios da utilização do etanol estão sua aceitação como ingrediente alimentício, fácil manejo, estocagem, transporte e solubilidade em água. A oscilação do preço no

mercado seria a mais considerável de suas desvantagens. O glicerol, por outro lado, é o principal coproduto gerado na produção do biodiesel, cuja alta nos últimos anos proporcionou o aumento do glicerol bruto (55 – 90% puro) no mercado. Diferentemente do etanol, apresenta um preço reduzido e grande disponibilidade (PEITER et al., 2016).

Apesar de existirem estudos avaliando diferentes parâmetros cinéticos de crescimento de leveduras laboratoriais, industriais ou de isolados naturais em meios contendo etanol ou glicerol (KLEIN et al., 2017; TACCARI et al., 2012), poucos tratam de cepas cervejeiras.

Uma empresa especializada na produção de leveduras para cerveja ainda apresenta o desafio de propagar não apenas uma, mas dezenas de cepas distintas morfológica e fisiologicamente. Essa diferenciação entre as cepas é observada na maior dificuldade em obter números elevados de células em cepas como *American Lager* e *English Ale* frente a outras leveduras cervejeiras, por exemplo. Estudos são necessários não apenas para diferenciar as cepas entre si, mas principalmente para utilizar estas diferenças como ferramentas que maximizem a produtividade final de cada levedura.

Por fim, as pesquisas que focam no melhoramento da propagação de leveduras cervejeiras avaliando novas estratégias de produção são escassas, sendo de fundamental importância num cenário tão crescente de *start-ups* na área os estudos no tema.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver estratégias para o cultivo das leveduras cervejeiras *American Lager* (TB81) e *English Ale* (TB07) de forma exclusivamente oxidativa a partir de substratos alternativos – etanol e glicerol – em biorreator com alto rendimento e produtividade.

1.1.2 Objetivos específicos

- I) Avaliar o etanol e o glicerol como substratos para produção de leveduras cervejeiras;
- II) Estudar estratégias de cultivo de leveduras cervejeiras a partir de substratos alternativos em biorreator;
- III) Desenvolver um processo de adaptação ao mosto cervejeiro para as leveduras produzidas em biorreator.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LEVEDURAS

2.1.1. Fisiologia

O gênero *Saccharomyces* (Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales. Família Saccharomycetaceae) constitui majoritariamente as leveduras utilizadas comercialmente. Seu habitat natural consiste em superfícies de folhas, flores e frutos, onde são capazes de absorver nutrientes exsudados ou abundantes advindos de períodos de senescência de partes da planta (LITI, 2015; ROGERSON; WEBSTER, 2007).

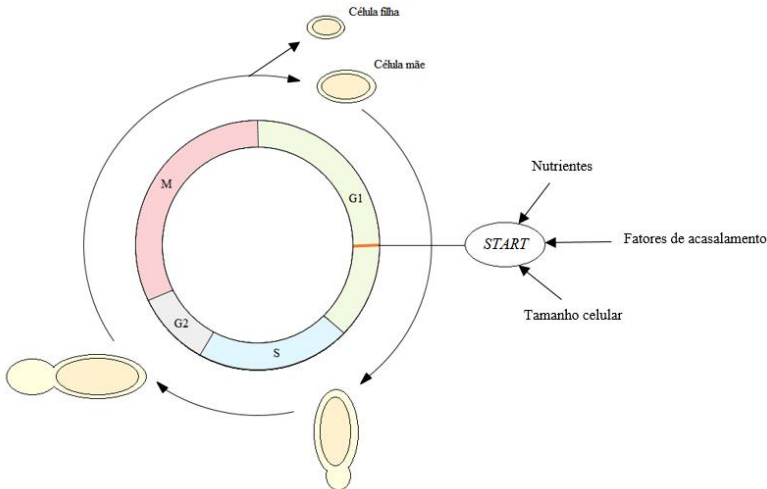
As suas células podem ser esféricas, ovóides, elipsoides ou cilíndricas ocorrendo isoladamente ou em pares, ocasionalmente aparecendo em cadeias curtas ou aglomeradas. Baseado em seu tamanho, as células podem ser classificadas como grandes ($4,5 - 10,5 \times 7 - 21 \mu\text{m}$), medianas ($3,5 - 8 \times 5 - 11 \mu\text{m}$) ou pequenas ($2,5 - 7 \times 4,5 - 11 \mu\text{m}$) (BOULTON; QUAIN, 2001; ROGERSON; WEBSTER, 2007).

As leveduras podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente. A reprodução sexuada ocorre através da formação de ascósporos quando as células estão expostas a restrições de nutrientes. A reprodução assexuada, por outro lado, acontece por meio da divisão celular assimétrica – ou brotamento. A reprodução assexuada permite um crescimento mais acelerado no número de indivíduos da população, sendo de importância central para o triunfo das leveduras frente a outros microrganismos, seja dentro de tanques industriais ou na superfície de frutos (ROGERSON; WEBSTER, 2007).

Durante a reprodução assexuada uma célula dá origem a uma célula “filha” – ou broto – geneticamente idêntica à célula-mãe. Ao se separar do broto, a célula-mãe carregará consigo uma cicatriz, um indicativo indireto da idade da célula em questão (COOPER; HAUSMAN, 2007). Quatro fases distintas são visualizadas durante este processo: a mitose (M), onde ocorre a separação dos cromossomos da célula filha levando subsequentemente a citocinese; *gap 1* (G_1) que corresponde ao intervalo entre mitose e replicação do DNA; Síntese (S), caracterizada pela replicação do DNA; e *gap 2* (G_2), no qual o crescimento celular se perpetua juntamente a sintetização de proteínas visando à preparação para mitose (Figura 2.1).

Os processos realizados durante a reprodução assexuada são altamente regulados por sinais extra e intracelulares. Um ponto de destaque no ciclo localiza-se ao final da fase G_1 e denomina-se *START*. Brotos são formados imediatamente após este ponto, com a célula subsequentemente dando continuidade ao ciclo. É dessa forma também que, indiretamente, pode-se estimar através do tamanho do broto a posição da nova célula no ciclo celular (COOPER; HAUSMAN, 2007; PRIEST; CAMPBELL, 1996).

Figura 2.1 – Reprodução assexuada em leveduras fragmentada em suas quatro fases: mitose (M), *gap 1* (G_1), síntese (S) e *gap 2* (G_2). Os fatores externos são determinantes para que a célula dê início (*START*) ou não ao ciclo reprodutivo.



Fonte: Adaptado de Cooper e Hausman (2007).

Assim como a disponibilidade de nutrientes e fatores de acasalamento, o tamanho da célula constitui um regulador importante durante o ciclo celular. Como a divisão celular produz uma progênie de tamanhos muito distintos (célula mãe grande e célula filha pequena), é necessário que as células filhas adquiram um tamanho similar ao das células mães antes que possam dividir novamente; em outras palavras, a fase G_1 da célula filha tende a ser mais extensa quando comparada a da célula mãe, cujo tamanho crítico já foi alcançado. O tamanho celular, portanto, apresenta a necessidade de ser monitorado para que possa coordenar o crescimento celular. Esse mecanismo de controle opera de

forma que cada célula atinja um tamanho mínimo antes que possa passar ao *START* (COOPER; HAUSMAN, 2007).

2.1.2. Leveduras *ale* e *lager*

Na indústria cervejeira, *ale* e *lager* são descrições comuns adotadas para a identificação das leveduras. As leveduras *ale* são cepas de *S. cerevisiae* e correspondem ao grupo mais diverso dentre as leveduras cervejeiras.

As leveduras *ale* são normalmente denominadas leveduras de “alta fermentação”, devido a tendência observada de migrar para o topo de fermentadores tradicionais, facilitando a recuperação para utilização em fermentações posteriores (BAMFORTH, 2006). A pressão hidrostática em fermentadores cilindros cônicos, muitos contendo mais de 10.000 hectolitros de mosto a ser fermentado, acabam por superar essa tendência a migração, sendo feita a coleta da levedura na parte cônica do tanque (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

As leveduras *lager* são identificadas como de “baixa fermentação” uma vez que sua tendência é depositar-se na base do tanque independentemente das condições de fermentações estabelecidas. Sua nomenclatura tem mudado ao longo dos anos, passando de *S. carlsbergensis* a “*S. cerevisiae* do tipo *lager*” até o atual nome aceito, *S. pastorianus*. Sabe-se hoje que sua diferença comparada a *S. cerevisiae* é tanto taxonômica quanto genética. Vaughan-Martini e Kurtzman (1985) demonstraram que *S. pastorianus* exibe alta similaridade com *S. cerevisiae* (53%) e *S. bayanus* (72%). No entanto, *S. cerevisiae* e *S. bayanus* tem pouca similaridade entre si. Tal fato tornou-se uma evidência de que *S. pastorianus* seria um híbrido entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* (BOULTON; QUAIN, 2001).

Apesar do debate taxonômico que envolve a classificação das leveduras *ale* e *lager*, existem evidências suficientes demonstrando diferenças entre ambas. Leveduras *lager* utilizam o dissacarídeo melibiose, de forma a crescerem nos produtos da hidrólise do mesmo (galactose e glicose) via α -D-galactosidase. Desta forma, este dissacarídeo é aplicado para a diferenciação de cepas *ale* e *lager*. Outra diferença é a utilização de maltotriose no qual as leveduras *lager* usam mais rapidamente do que as leveduras *ale* (BAMFORTH, 2006; BOULTON; QUAIN, 2001; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A temperatura ideal de crescimento também é distinta para leveduras *ale* e *lager*. *Ales* tendem a fermentar melhor a temperaturas

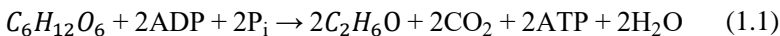
próximas a 20 °C enquanto *lagers* a temperaturas mais baixas, entre 8 a 15 °C. Esse melhor crescimento em temperatura mais baixas seria um reflexo da contribuição da *S. bayanus* no genoma das leveduras *lagers* (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

2.1.3. Metabolismo de carbono

Em habitats naturais, as leveduras podem metabolizar diferentes fontes de carbono (polióis, álcoois, ácidos orgânicos e amino ácidos) para viabilizar seu crescimento. Carboidratos, no entanto, são suas fontes preferenciais.

As leveduras são predominantemente identificadas como anaeróbios facultativos. A habilidade de crescer em diferentes concentrações de oxigênio e de produzir etanol até mesmo na presença de oxigênio fez de *Saccharomyces* um importante grupo de microrganismos industriais (BOULTON; QUAIN, 2001). Dependendo das condições de crescimento, concentração e tipos de carboidratos no meio assim como disponibilidade de oxigênio, tais microrganismos podem apresentar um metabolismo completamente oxidativo (respiratório), completamente fermentativo, ou ainda uma mistura de ambos (comumente denominado como respiro-fermentativo). O primeiro ocorre apenas em fontes de carbono passíveis de oxidação como etanol, glicerol, acetato e ácidos graxos, ou em fontes de carbono fermentativas – glicose, frutose, galactose – a baixas concentrações. O segundo ocorre em circunstâncias de completa abstenção de oxigênio ou quando sob influência de um efeito repressivo (ver seção 2.1.3.1). O terceiro é caracterizado pela presença de oxigênio e concentrações de substrato oscilantes. À medida que os carboidratos são metabolizados a levedura tende a passar por uma transição diáuxica, onde o metabolismo respiro-fermentativo passa a ser integralmente oxidativo (GÓMEZ-PASTOR et al., 2011)

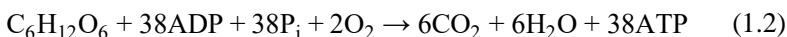
No metabolismo fermentativo, álcool e dióxido de carbono são produzidos pela levedura a partir de carboidratos. A Equação (1.1) indica a equação geral da fermentação alcoólica.



O crescimento anaeróbio ocorre rapidamente, com um tempo de duplicação celular de cerca de 90 min. No entanto, como o rendimento energético é reduzido, o fator de conversão de substrato em célula iguala-se aproximadamente a $0,10 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$ (PRIEST; CAMPBELL, 1996; VERDUYN et al., 1991). A estratégia de produzir, acumular e consumir

um determinado produto é fundamental para a levedura em seu habitat natural; o etanol produzido é tóxico para determinados microrganismos que competem pelos mesmos substratos nesses ambientes (BOULTON; QUAIN, 2001).

No metabolismo oxidativo, o piruvato, produto da glicólise, sofre descarboxilação oxidativa, catalisada pelo complexo multienzímico da piruvato desidrogenase, e é então capaz de adentrar ao ciclo do ácido cítrico. Os elétrons liberados nesse processo oxidativo são transferidos para três NAD^+ e para a ubiquinona. A reoxidação dos co-fatores reduzidos gera ATP pela fosforilação oxidativa, sendo um processo mais energético do que a fermentação: cerca de 10% ao invés de 2% da glicose suprida passa a ser convertida em material celular (BOULTON; QUAIN, 2001; PRATT; CORNELLY, 2017; PRIEST; CAMPBELL, 1996). A Equação (1.2) indica a equação geral da respiração celular.



As consequências de operar em um determinado metabolismo durante a produção de biomassa industrial foram estudadas por Barford (1987) através das análises de um cultivo de levedura em modo contínuo, aerado e com limitação de glicose. Em velocidades de crescimento reduzidas (em baixas vazões específicas de alimentação), o metabolismo é caracterizado por completa utilização do substrato, sem produção de etanol e alto fator de conversão de substrato em biomassa (valor superior a $0,50 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$). Velocidades de crescimento maiores (que ocorrem acima de uma vazão específica crítica), no entanto, implicam o consumo incompleto de glicose, excreção de etanol e baixo fator de conversão de substrato em biomassa. Em termos de produção de biomassa industrial, baixas velocidades específicas de crescimento gerarão mais biomassa, mas implicarão numa baixa capacidade fermentativa. Por outro lado, a velocidades maiores, menores concentrações de biomassa serão alcançadas possivelmente com uma maior capacidade fermentativa. Dado que a levedura é comprada por sua atividade fermentativa (seja na produção de dióxido de carbono na massa no caso da panificação ou atenuação do mosto na indústria cervejeira), a escolha de um processo em específico não circunda a obriedade.

2.1.3.1 Carboidratos

O metabolismo de carboidratos em leveduras pode ocorrer tanto de forma oxidativa quanto fermentativa. Essa troca entre metabolismos ocorre como consequência da variação de dois fatores externos aos quais os microrganismos podem se encontrar sujeitos: a disponibilidade de oxigênio e a concentração de carboidratos no meio.

Ao analisar a influência da presença de oxigênio durante o metabolismo de carboidratos, torna-se fundamental discorrer sobre três efeitos observados frequentemente em cultivos de leveduras: *Pasteur*, *Custer* e *Crabtree*.

O efeito *Pasteur* ocorre quando a necessidade de ATP celular não é saciada através da fermentação. Em decorrência, há a inativação do metabolismo anaeróbico de maneira que o microrganismo seja capaz de moldar-se às demandas de energia impostas (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006).

O efeito *Custer*, por outro lado, é conhecido como a inibição transitória da fermentação alcoólica em condições anaeróbias. Esse efeito é observado em leveduras do gênero *Brettanomyces* e *Dekkera*, que metabolizam glicose a etanol e ácido acético dependendo da disponibilidade de oxigênio no meio (KULP; LORENZ, 2003; RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006).

O último e mais significativo dos efeitos, considerando a produção de biomassa industrial, é designado *Crabtree*, o qual se caracteriza pela repressão do metabolismo oxidativo devido a concentração de glicose no meio. Frutose, galactose e maltose também podem apresentar efeitos semelhantes, porém com ação menos inibitória que a realizada pela glicose (KRUCKEBERG; DICKINSON, 2004).

A razão por trás desse mecanismo demonstra que a glicose é considerada como a fonte de carbono preposta de leveduras. Genes *SUC*, necessários para a codificação de invertases, são inibidos; genes *MAL*, para utilização de maltose, e *FBPI*, que codificam frutose bifosfatase, também cessarão suas transcrições. O metabolismo de fontes não-fermentescíveis também estará ameaçado, uma vez que os genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, respiração e ciclo do ácido cítrico estarão reprimidos (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011; KRUCKEBERG; DICKINSON, 2004; PFEIFFER; MORLEY, 2014).

A consequência a longo prazo deste efeito implicará o metabolismo respiro-fermentativo, o qual pode ser observado em cultivos

em batelada alimentada ou cultivos contínuos operados em vazões específicas acima da diluição crítica.

Halász e Lásztity (1991) relataram que não há uma concentração exata na qual a glicose acarretará o efeito repressivo na *S. cerevisiae*, com este valor variando de acordo com o estado nutricional no qual a célula se encontra. No entanto, a faixa de concentração de glicose na qual este efeito repressivo é observado é relativamente baixa, encontrando-se entre 0,03 – 0,10 g·L⁻¹. Rai (2012) indicou que durante a produção de leveduras para panificação a alimentação é programada de forma a manter a concentração de glicose abaixo de 0,20 g·L⁻¹ no biorreator.

O mosto de malte utilizado nas cervejarias é uma mistura de diversas fontes de carbono, incluindo maltose, maltotriose, glicose, sacarose e frutose. Dextrina também está presente, porém contribui apenas com o aroma e o corpo do produto final, visto que não são fermentadas por leveduras cervejeiras. O consumo de cada um dos carboidratos presentes no mosto de malte apresenta peculiaridades, principalmente quando presentes ao mesmo tempo (BAMFORTH, 2006).

Glicose e frutose são transportadas por difusão facilitada para dentro da célula e metabolizadas rapidamente nos estágios iniciais da fermentação. Como os transportadores de glicose são mais eficientes que os de frutose, o primeiro acaba por ser consumido mais rapidamente mesmo que o segundo esteja presente em concentrações mais elevadas (BAMFORTH, 2006; BOULTON; QUAIN, 2001; VIDGREN, 2010).

A sacarose é o próximo carboidrato no consumo sequencial. A inversão da sacarose em glicose e frutose juntamente do consumo retardado da frutose frente a glicose pode até gerar um aumento inicial na concentração de frutose do meio (WHITE; ZAINASHEFF, 2010; VIDGREN, 2010).

Sendo glicose o substrato com maior afinidade e levando em consideração os demais efeitos inibitórios citados, ocorre um atraso no consumo de maltose e maltotriose. A maltose começa a ser degradada quando aproximadamente 60% da glicose presente já foi consumida (VIDGREN, 2010).

Leveduras cervejeiras variam consideravelmente na habilidade de metabolizar maltose e maltotriose. A importância desses carboidratos, no entanto, impulsionou a seleção de cepas que apresentassem esse genótipo (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Maltose e maltotriose tendem a ser os carboidratos em maior proporção (45 e 15%, respectivamente) considerando um mosto de malte tipicamente utilizado em cervejarias (BAMFORTH, 2006). Seu metabolismo inicia através do transporte intracelular por um mecanismo de simporte no qual um próton é co-

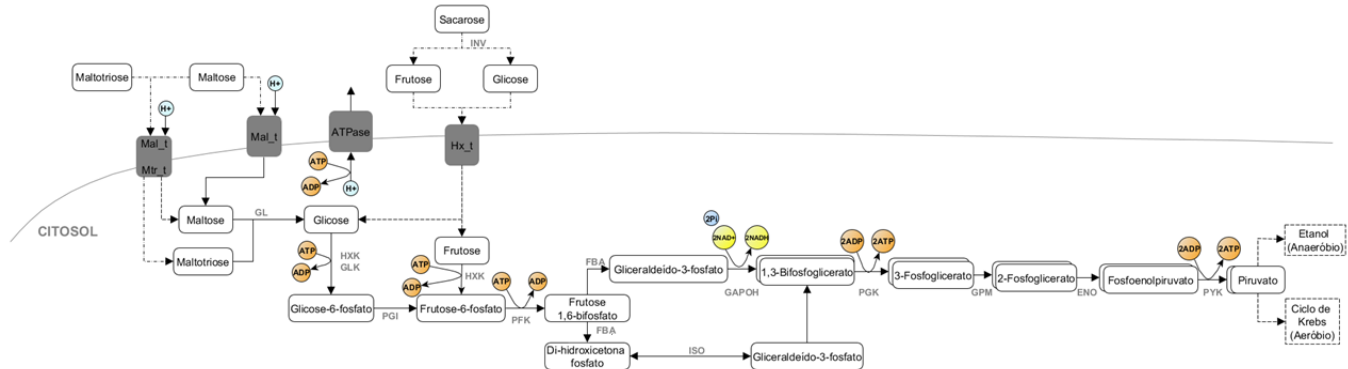
transportado com uma molécula de maltose ou maltotriose. Dentro da célula, essas moléculas serão hidrolisadas a glicose por α -glicosidases (KRUCKEBERG; DICKINSON, 2004; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A velocidade de transporte desses açúcares diminui consideravelmente na presença de etanol em elevadas (próximas a $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) concentrações ou escassez de nutrientes. Assim, necessita-se que o consumo de maltose e maltotriose seja elevado nos estágios iniciais da fermentação do mosto de malte (DICKINSON; KRUCKEBERG, 2004). Boulton e Quain (2001) indicam que o aumento de temperatura promove um consumo mais rápido em cepas de levedura cervejeiras, com pH ideal de 5. Os autores também ressaltam que a pressão osmótica formada em mostos cervejeiros com alta concentração de açúcares ($14 - 17$ °Brix) tende a prejudicar o consumo de maltotriose, especificadamente por cepas *lager*.

Os genótipos característicos das leveduras cervejeiras são aqueles que corresponderam ao longo dos anos as necessidades da indústria. Assim, as cepas de *S. cerevisiae* comumente utilizadas em laboratórios de pesquisa diferenciam-se substancialmente das cepas cervejeiras, tanto na robustez e complexidade do material genético como por serem incapazes de produzir os produtos finais almejados (BOULTON; QUAIN, 2001; VIDGREN, 2010). O consumo de carboidratos apresenta diferenças significativas: cepas laboratoriais não utilizam maltose, e a inversão da sacarose é atrasada pela repressão gerada pela glicose, enquanto que em muitas cepas cervejeiras ocorre a rápida hidrólise periplasmática na presença de glicose. (BOULTON; QUAIN, 2001; HAMMOND, 2003).

Estudos variados já avaliaram o crescimento de leveduras em diferentes fontes de carbono. Tendo como propósito a produção de biomassa industrial, meios contendo carboidratos são geralmente os empregados. Há na literatura registros de cultivos realizados em fontes metabolizadas pelas leveduras apenas de forma oxidativa, relacionados à utilização de etanol e glicerol.

Figura 2.2 – Metabolismo dos principais carboidratos presentes no mosto cervejeiro e as enzimas envolvidas: INV, invertase; GL, α -glicosidase, HXK, hexocinase; PGI, fosfoglicoisomerase; PFK, fosfofrutocinase; FBA, aldolase; ISO, isomerase; TPI, triose-fosfato-desidrogenase; PGK, fosfoglicerocinase; GPM, fosfogliceromutase; ENO, enolase; PYK, piruvato cinase. Hx_t: transportadores de hexoses; Malt_t: transportador de maltose; Mtr_t: transportador de maltotriose; ATPase: ATP-sintase.

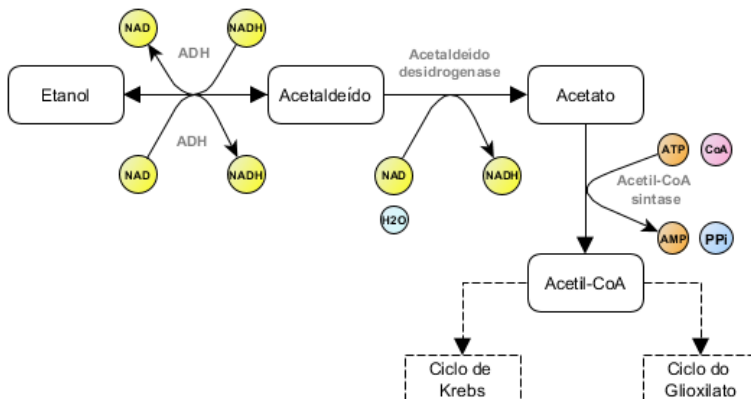


Fonte: Adaptado de Yeast Pathways (2018), Pratt e Cornely (2017), SDG (2018), Vidgren (2010).

2.1.3.2. Etanol

Em leveduras, o etanol é metabolizado através da oxidação a acetaldeído e subsequentemente a acetato pela ação de enzimas citosólicas, etanol e acetaldeído desidrogenases, ambas NAD-dependentes (Figura 2.3). O acetato formado dará origem ao acetil-CoA por intermédio da acil-CoA sintase, estando pronto para adentrar ao ciclo do ácido cítrico ou glicoxilato nos passos seguintes (PRATT; CORNELLY, 2017).

Figura 2.3 – Degradação do etanol em *Saccharomyces cerevisiae*. Em cinza as enzimas envolvidas nas diferentes vias, sendo: ADH: álcool desidrogenases.



Fonte: Adaptado de Yeast Pathways (2018).

Em *S. cerevisiae* existem 20 álcoois desidrogenases com cinco genes principais envolvidos no metabolismo do etanol, *ADH1* à *ADH5*. Quatro dessas enzimas codificadas (*Adh1p*, *Adh3*, *Adh4p* e *Adh5p*) reduzem acetaldeído a etanol durante a fermentação da glicose, enquanto *Adh2p* é responsável por catalisar a reação reversa de oxidação do etanol a acetaldeído. Essas cinco desidrogenases, assim como a enzima bifuncional *Sfa1p*, são também envolvidas na produção de álcoois superiores durante a fermentação, produtos finais da quebra de aminoácidos via rota de Ehrlich, contribuindo para o sabor e aroma de alimentos e bebidas fermentadas (SGD, 2018).

A descrição da aplicação de etanol na propagação de leveduras está presente desde a década de 70 na literatura. Paalme et al. (1997) indicaram que, em determinadas circunstâncias, etanol costumava ser adicionado ao meio de cultivo usado na produção de leveduras para panificação com intuito de melhorar a eficiência e economia do processo. Paalme et al. (1997) obtiveram uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,12 \text{ h}^{-1}$ ($t_G = 5,75 \text{ h}$) para um cultivo contendo $9,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol. Wasungu e Simard (1982), por outro lado, utilizaram apenas o etanol como substrato para a produção de leveduras para panificação (*S. cerevisiae*). Os resultados do estudo do efeito da concentração de etanol ($0,79 - 7,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) em cultivos em frascos agitados demonstrou que em até $7,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ havia uma relação proporcional entre o crescimento da levedura e aumento da concentração do substrato. A cepa atingiu concentrações máximas de biomassa entre $0,79 - 31,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol, sendo que concentrações superiores a estas provocaram inibição. A velocidade específica de crescimento máxima obtida foi de $0,28 \text{ h}^{-1}$ ($t_G = 2,46 \text{ h}$) entre $1,97$ a $7,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol.

A aplicação de etanol como substrato no crescimento de leveduras apresenta vantagens e desvantagens que necessitam ser ressaltadas. Entre os benefícios salientam-se sua não toxicidade para as pessoas, sendo aceito como ingrediente alimentício; é de fácil manejo, estocagem e transporte; solubilidade em água e passível de ser obtido com alta pureza (WASUNGU; SIMARD, 1982; WATTEEUW et al., 1979). Quanto às desvantagens, o preço no mercado seria a mais considerável, uma vez que o mesmo é exposto a considerável flutuação. Outro fator limitante seria a toxicidade durante o crescimento do microrganismo. Diversas formas nas quais o etanol pode acarretar toxicidade são descritas na literatura, sendo classificadas em não específicas e específicas. A ação não específica é exemplificada pelo aumento da pressão osmótica intracelular. A ação específica, por outro lado, considera a ação do etanol em regiões específicas da célula como nas membranas celulares e mitocôndria (BOULTON; QUAIN, 2001; STANLEY et al., 2010). Seja a circunstância pela qual o efeito inibitório do etanol irá agir, Boulton e Quain (2001) ressaltam que a tolerância ao mesmo é uma particularidade de cada cepa a ser estudada, sendo a concentração na qual o efeito inibitório é comumente visualizado em leveduras cervejeiras próxima a $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ademais, muitas espécies de leveduras podem utilizá-lo prontamente como fonte de carbono e energia.

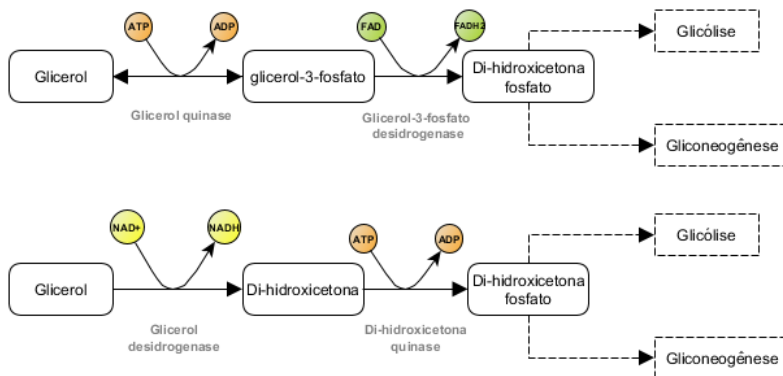
2.1.3.3. Glicerol

O glicerol é o principal coproduto gerado na produção de biodiesel (DASARI et al., 2005). Esse coproduto, também chamado de glicerina na forma pura, possui inúmeras aplicações industriais. A produção de biodiesel nos últimos anos proporcionou o aumento do glicerol bruto (55 – 90% puro) no mercado que, diferentemente do etanol, apresenta um preço reduzido e grande disponibilidade.

Existem quatro tipos de glicerina que podem ser obtidas: a bruta, que contém alta concentração do catalisador da transesterificação, etanol, água, ácido graxo e sabões); a loira, que recebe tratamento ácido, seguido de remoção dos ácidos graxos, possuindo de 75 a 85% de glicerol, sendo o restante composto de sais, água e traços de etanol; grau farmacêutico, sendo o mesmo que a glicerina loira após ser bidestilada a vácuo e tratada com absorventes, apresentando 99% de pureza; e grau alimentício, o qual é completamente isento de etanol, e pode ser obtida pela hidrólise de óleos e gorduras (BIODIESELBR, 2008).

O glicerol está envolvido no metabolismo de carbonos na *S. cerevisiae* de duas formas distintas: pode ser catabolizado como única fonte de carbono em condições aeróbias, ou pode ser produzido como coproduto no metabolismo de glicose ou outro açúcar fermentescível (KLEIN et al., 2017). Duas vias metabólicas são propostas para o catabolismo: na primeira há a rota fosforilativa, onde L-glicerol-3-fosfato é formado como intermediário. Essa rota envolve a ação da glicerol quinase e uma glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de FAD localizada na superfície exterior da membrana mitocondrial. Na segunda rota há primeiramente a oxidação do glicerol a di-hidroxicetona via glicerol desidrogenase NAD⁺ dependente. A di-hidroxiacetona é subsequentemente fosforilada a di-hidroxicetona fosfato via di-hidroxicetona quinase (KLEIN et al., 2017) (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Rotas propostas para catabolismo de glicerol em leveduras via (a) L-glicerol 3-fosfato e (b) dihidroxiacetona.



Fonte: Adaptado de Klein et al. (2017).

A razão fisiológica para a produção de glicerol em leveduras está associada osmoregulação e ao desbalanço redox. A exposição de células de levedura a meios hipertônicos leva a um fluxo massivo de líquido intracelular para o meio exterior. Esse processo deriva das atividades distintas da água dentro e fora da célula. A osmoregulação, portanto, é entendida como a resposta celular direcionada a restaurar e manter volume, turgor, pressão e atividade biológica normais na célula. O mecanismo que microrganismos usam como resposta para esse fluxo de moléculas de água durante o crescimento em baixas atividades de água externas é o acúmulo de um ou mais solutos específicos. Glicerol é o soluto mais utilizado em *S. cerevisiae*, assim como em outras espécies (NEIVOGT, 1997).

O glicerol tem também papel fundamental no balanço redox da célula. Ao ser produzido como coproduto no metabolismo de glicose ou outro açúcar fermentescível, o glicerol recicla cofatores, balanceando os níveis de NADH na célula.

Existe uma grande variabilidade nas espécies de leveduras em relação a capacidade de metabolizar glicerol como única fonte de carbono. Algumas espécies apresentam crescimento comparado com aqueles em glicose enquanto outras são incapazes de utilizá-lo, especialmente em meio sintético. O conhecimento é nos últimos anos tem baseado-se nos estudos utilizando cepas laboratoriais de *S. cerevisiae* (KLEIN et al., 2017). Em pesquisa desenvolvida por Swinnen et al. (2013), *S. cerevisiae* CBS 6412 apresentou os melhores resultados quanto

ao crescimento em glicerol dentre o grupo de cepas selecionadas, alcançando uma velocidade específica máxima de crescimento e período de fase *lag* de 0,10 h⁻¹ e 27 h, respectivamente. Nos estudos de Taccari et al. (2012) 11 cepas de *S. cerevisiae* e duas de *S. pastorianus* foram avaliadas crescendo em etanol puro com velocidades específicas máximas variando de 0,09 – 0,12 h⁻¹ e 0,08 – 0,13 h⁻¹, respectivamente. Durante o crescimento em glicerol bruto em cultivo aerado, a cepa *S. pastorianus* DBVPG 6258 apresentou um fator de conversão de substrato em biomassa em glicerol de 0,73 g_x · g_s⁻¹, valor alto comparado ao crescimento em glicose nas mesmas condições (0,47 g_x · g_s⁻¹).

A conversão de glicerol em produtos de valor agregado através de metodologias químicas e biológicas é altamente empregada. Tabah et al. (2016) utilizaram *S. cerevisiae* (cepa não especificada) na biotransformação em 1,3 propanodiol, um intermediário para a síntese de polímeros usados em cosméticos, alimentos e medicina. Glicerol também tem sido empregado como substrato para obter ácidos orgânicos (KAMZOLOVA et al., 2011), carotenoides (SAENGE et al., 2011), lipídios microbianos (QIN et al., 2017) e biomassa microbiana (PETRIK et al., 2013) a partir do cultivo de leveduras.

2.1.3.4. Metabolismo de múltiplos substratos em condições limitantes

Durante a seção 2.1.3.1, é descrito o mecanismo no qual as leveduras, na presença de diferentes fontes de carboidratos, tendem a metaboliza-los de forma sequencial. Essa característica, no entanto, não é uma verdade absoluta, visto que está condicionada a concentração destes compostos no meio. Na presença de múltiplos substratos que atendam as mesmas funções fisiológicas (como fonte de carbono ou fonte de nitrogênio, por exemplo) e que estejam em concentrações limitantes de crescimento no meio de cultura, o que se observa é a utilização simultânea dos mesmos (DIJKHUIZEN; HARDER; POSTGATE, 1982; KIM et al., 2012). Apesar das estratégias atuais para utilização simultânea de substratos serem comumente direcionadas para a modificação genética das cepas, como nos melhoramentos de leveduras para produção de etanol de segunda geração (SONG et al., 2018), existem extensos estudos sobre a utilização de misturas de substratos por microrganismos distintos em condições limitantes (EGLI; LENDENMANN; SNOZZI, 1993; HARDER; DIJKHUIZEN; POSTGATE, 1982; LENDENMANN; SNOZZI; EGLI, 1996).

Existem registros na literatura da co-utilização de glicerol com outras fontes de carbono, principalmente monossacarídeos, em bactérias e fungos filamentosos com objetivo de produzir compostos biotecnológicos (KOWALCZYK et al., 2018; LIU et al., 2011; MARTÍNEZ et al., 2008), porém não foram encontradas pesquisas que abordem a assimilação de misturas semelhantes em leveduras. Por outro lado, a utilização simultânea de carboidratos e etanol a partir de leveduras apresentam estudos aprofundados, os quais descrevem as alterações metabólicas advindas do consumo de ambos os substratos. Jong-Gubbels et al. (1995), por exemplo, estudaram o uso simultâneo de glicose e etanol em culturas contínuas de *S. cerevisiae* T23D avaliando as modificações envolvidas no metabolismo de carbonos com a variação da proporção de etanol na alimentação. Para razões de etanol/glicose baixas, há a ausência do ciclo do glioxilato para metabolização do etanol. Enquanto a glicólise ocorre normalmente estimulando a produção de compostos pelos seus intermediários (como glicose-6-fosfato e fosfoenolpiruvato, por exemplo), etanol é utilizado para substituir a formação de acetil-CoA, sintetizar ácidos graxos, aminoácidos e fomentar o ciclo do ácido cítrico. Por outro lado, quando as razões entre etanol/glicose são elevadas, a síntese de intermediários do ciclo do ácido cítrico a partir do ciclo do glioxilato é iniciada até a eventual substituição completa do etanol como fonte de carbono a partir do estabelecimento da gliconeogênese. O etanol não só fica responsável pelo fomento do ciclo do ácido cítrico como também pela formação de intermediários que anteriormente eram obtidos pela degradação da glicose. De acordo com Paalme et al. (1997) que testou a aplicação de razões distintas da mistura contendo etanol e glicose em culturas contínuas de *S. cerevisiae* ALKO743, a concentração de etanol não deve ser superior a 50%, de forma a não estimular os efeitos descritos por Jong-Gubbels et al. (1995) e diminuir a produtividade em biomassa final.

2.2. BIORREADORES

Biorreatores são classificados como reatores em que uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores” tomam forma. Esses biocatalisadores podem ser enzimas, células microbianas, animais ou vegetais. Sua classificação pode logo ser realizada a partir desses dois grandes grupos em reatores enzimáticos ou aqueles que atuam na presença de células vivas (SCHMIDELL et al., 2001). Dentre os biorreatores, percebe-se o uso de dois modelos na produção de leveduras

para panificação, cervejarias ou SCP: reatores agitados mecanicamente (SRT) e coluna de bolhas.

Reatores agitados mecanicamente ou (STR: “stirred tank reactor”) são mais amplamente reconhecidos como reatores de mistura, constituindo a maioria do total de reatores utilizados industrialmente. Eles consistem em tanques cilíndricos, no qual são comuns relações entre a altura e o diâmetro de 2:1 ou 3:1. O reator é normalmente equipado com chicanas cuja função é evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido. O agitador é posicionado num eixo central ao biorreator, podendo apresentar, ao longo de sua altura, uma série de turbinas. As turbinas são usualmente classificadas de acordo com o escoamento que proferem: axial ou radial. Das diversas geometrias disponíveis, a turbina com seis pás (Turbina Rushton) é a mais utilizada em configurações padrões. Suas vantagens incluem fácil controle sob o gás disperso e mistura do meio através da velocidade de rotação da turbina e eficiente dispersão do gás (REUSS, 1994; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Biorreatores não agitados mecanicamente dependem do movimento das bolhas para que a mistura ocorra no meio de cultivo; em outras palavras, sua agitação ocorre de forma pneumática. Suas menores tensão de cisalhamento quando comparados a configuração STR torna-os atraentes para o cultivo de células animais e vegetais (SCHUGERL; LUBBERT, 1995). Os biorreatores coluna de bolhas são caracterizados por um movimento aleatório do líquido no reator. O regime de escoamento dependerá essencialmente da velocidade do gás e diâmetro do biorreator. Em velocidades superficiais baixas do gás, e diâmetros de coluna mais amplos, um escoamento homogêneo, com bolhas uniformemente distribuídas na seção transversal do duto, tendem a prevalecer. Em velocidades superficiais acima do limite superior para vazão de gás na alimentação ($> 5\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) – velocidade de inundação – e diâmetros menores que 10 cm, grandes bolhas serão formadas por coalescência, estabilizando-se próximo às paredes da coluna, mudando o escoamento homogêneo para o escoamento em golfadas. Quando a coalescência de bolhas se forma em colunas com diâmetros maiores, elas tendem a localizarem-se próximas a linha central da coluna. O tamanho das bolhas e velocidades de distribuição são variados e o escoamento é classificado como caótico-turbulento. Algumas das vantagens da coluna de bolhas estão associadas às excelentes transferências de calor e massa associadas a essa configuração, menor manutenção e custos operacionais devido a menor quantidade de partes móveis, e compacidades (SCHMIDELL *et al.*, 2001; SCHUGERL; LUBBERT, 1995).

Além dos biorreatores descritos, a produção de leveduras pode ocorrer utilizando um ou mais modos de operação, o quais são descritos a seguir.

2.2.1. Modos de operação

As operações em batelada, batelada alimentada e contínuas são as principais envolvidas na produção industrial de leveduras.

Durante um processo em batelada, o meio de cultura e inóculo são adicionados no início do processo, de forma que suas concentrações variam de acordo com a evolução do cultivo. Os produtos finais são captados apenas no final da operação. Controles básicos como pH, temperatura e oxigênio dissolvido são utilizados durante o curso do cultivo. Como estes parâmetros são normalmente mantidos constantes, o único parâmetro passível de otimização torna-se a composição do meio de cultivo (SCHMIDELL et al., 2001; YAMANE, 1994).

O cultivo em batelada alimentada pode ser definido como uma operação onde as fontes de carbono, nitrogênio, sais ou precursores necessários para o crescimento celular e formação de produtos são adicionados em pulso ou continuamente através de uma ou mais alimentações durante a operação. A cultura é drenada apenas no final da operação, seja de forma parcial, onde parte fica retida no biorreator como inóculo para o próximo cultivo, ou completamente. Dessa forma, o volume do cultivo aumenta durante o período de operação, caracterizando um processo dinâmico (DORAN, 2012; YAMANE, 1994). Além disso, a alimentação A mais antiga aplicação desse processo é justamente datada na produção de leveduras, em que glicose era adicionada intermitentemente com objetivo de manter as concentrações da mesma reduzidas no biorreator (BERRY; RUSSELL; STEWART, 1987).

No processo contínuo, um ou mais substratos contendo os nutrientes necessários para o crescimento são alimentados constantemente, enquanto que o efluente contendo as células e produtos são retirados na mesma vazão. O estado estacionário pode se estabelecer através da manutenção de uma vazão constante. Assim, o volume do cultivo, as concentrações de nutrientes e células dentro do biorreator são também mantidas constantes. Alguns exemplos da aplicação deste sistema são na produção de SCP, fabrico de algumas cervejas e tratamento de resíduos municipais (DORAN, 2012; SCHMIDELL et al., 2001; YAMANE, 1994).

Um mesmo composto pode ser obtido a partir de modos de operação distintos, assim como da combinação entre eles. A Tabela 2.1 indica a produção de SCP a partir de etanol para diferentes microrganismos usando etanol como substrato.

Tabela 1.1 – Produção SCP usando etanol como substrato durante cultivos em batelada alimentada.

Microrganismo	Parâmetro utilizado para alimentação	Modo de alimentação
<i>Candida utilis</i>	1. Sem controle 2. Com controle	Em passo de acordo com planejamento
<i>Candida brassicae</i>	[Etanol]	Pulso, manual
<i>Candida brassicae</i>	[OD*]	Pulso, manual
<i>Candida utilis</i>	Presença de etanol na saída de gás	On-off
<i>Pichia farinosa</i>	[Etanol]	Contínuo
<i>Candida brassicae</i>	[Etanol]	Contínuo

*OD: oxigênio dissolvido.

Fonte: Adaptado de Fiechter (1984).

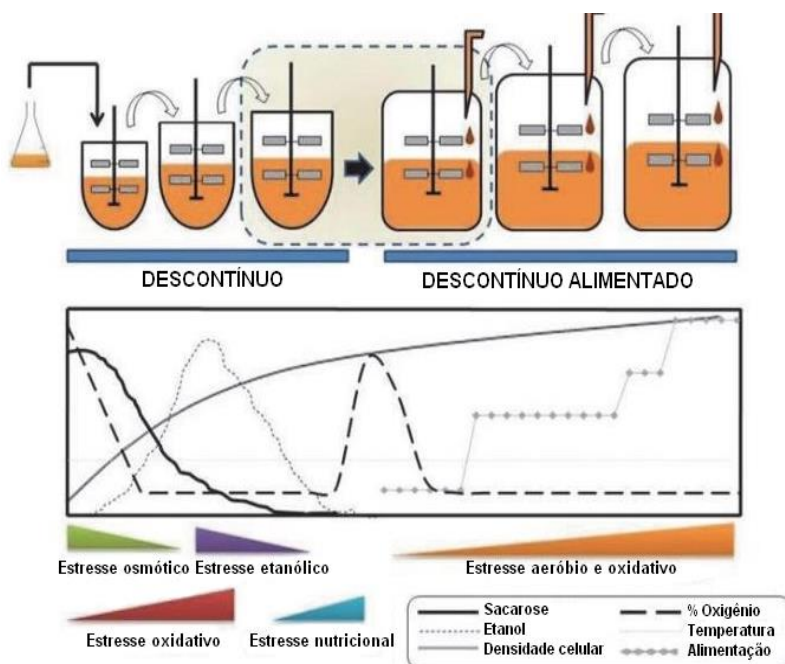
2.3. PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE LEVEDURAS

Leveduras são utilizadas desde os primórdios da humanidade de maneira espontânea para produção dos mais diferenciados produtos alimentícios. Apenas em 1845 que Louis Pasteur identificou as leveduras como microrganismos capazes de fermentar açúcares transformando-os em álcool e dióxido de carbono. Com o decorrente desenvolvimento da industrialização, a demanda por produtos fermentados aumentou e a partir do Século XIX a produção de leveduras para a panificação e cerveja passa a ser uma prática comum. Gómez-Pastor et al. (2011) indicam que cerca de 400 mil toneladas de leveduras sejam produzidas anualmente. A demanda exige não apenas grandes quantidades a serem produzidas, mas também diversidade de microrganismos, os quais devem gerar fermentações completas com produtos de alta qualidade e de forma rápida.

2.3.1. Panificação

A produção de leveduras para a panificação é baseada numa fermentação em multiestágios e inicia a partir de um meio de cultura contendo normalmente melaço suplementado com nutrientes (Figura 2.5). A cepa de levedura selecionada é inoculada no meio e incubada por meio de metodologia conveniente. No segundo estágio a cultura inicial é usada para inocular o primeiro fermentador e, a partir de então, as células irão crescer em estágios subsequentes e transientes durante a fase em batelada (ou descontínua) e em batelada alimentada (ou descontínua alimentada) do processo (BARFORD, 1987; GÓMEZ-PASTOR et al., 2011).

Figura 2.5 – Diagrama dos diferentes estágios do processo de produção industrial de biomassa de leveduras.



Fonte: Adaptado de Gómez-Pastor et al. (2010).

Durante fase em batelada, as células são expostas a altas concentrações de carboidratos presentes no melaço. Outros nutrientes

também estarão presentes no meio e o pH é ajustado entre 4,5 e 5,0 após a esterilização para então ser monitorado ao longo do processo. Uma vez dado o início, os únicos parâmetros a serem controlados serão temperatura e aeração. A produção de leveduras envolve aeração contínua de forma a permitir a síntese de lipídios, revitalização da população celular deficiente em ergosterol e garantir que o cultivo seja conduzido de forma eficiente. Quando a concentração de glicose atinge seu valor crítico, geralmente em torno de $0,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (RAI, 2012) o metabolismo respiro-fermentativo ocorre (GÓMEZ-PASTOR et al., 2011).

A fermentação alcoólica gera uma concentração de biomassa reduzida quando comparada ao metabolismo oxidativo, uma vez que o rendimento de ATP é consideravelmente menor: durante a respiração, 38 moléculas de ATP são produzidas por molécula de glicose, enquanto que na fermentação obtêm-se 2 moléculas de ATP.

Uma vez esgotada as fontes de carboidratos fermentescíveis no melaço, a presença do oxigênio permite que a levedura oxide o etanol advindo da fermentação alcoólica, desencadeando uma mudança no metabolismo fermentativo para oxidativo e levando a eliminação do etanol no meio. Esgotado o etanol, a fase em batelada alimentada pode ser iniciada (GÓMEZ-PASTOR et al., 2011).

A otimização da produtividade de biomassa requer um aumento no rendimento de biomassa para os maiores valores possíveis durante o cultivo com alimentação de substrato em condições limitantes. A cinética de crescimento é usualmente controlada pela alimentação e o controle do oxigênio dissolvido fundamental para altos rendimentos em biomassa. (BARFORD, 1987; GÓMEZ-PASTOR et al., 2011).

A extensão de um processo aeróbio depende fundamentalmente da capacidade de se transferir oxigênio para a fase líquida. O oxigênio é muito pouco solúvel em água ($7 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$), sendo necessário alimentá-lo continuamente ao longo do processo. Cultivos em densidades superiores a $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando células em altas velocidades específicas de crescimento (maiores que $0,2 \text{ h}^{-1}$) irão demandar velocidades igualmente elevadas de respiração celular. O escalonamento de tais cenários torna-se complexo devido as altas capacidades de transferência de oxigênio exigidas (SCHMIDELL et al., 2001).

Diversas variáveis que tem efeito nas atividades metabólicas das leveduras devem ser controladas durante o processo em batelada alimentada, tal como pH e temperatura. Além disso, estes cultivos devem permitir a maturação das células. A alimentação, dessa forma, é normalmente interrompida no final da fermentação permitindo que a aeração continue por mais uma hora. Durante esse período, o substrato é

completamente assimilado, permitindo com que células se tornem maduras e mais estáveis, evitando a autólise (BARFORD, 1987; GÓMEZ-PASTOR et al., 2011).

O processo de produção das leveduras destinadas a panificação não é um processo completamente estéril. Kulp e Lorenz (2003) indicam que o fermento comercial não está livre de contaminantes e que tais microrganismos não são designados como perigo eminente numa aplicação futura da levedura, estando muitos deles presentes em ingredientes naturais (farinhas e cereais) que entrarão em contato com a mesma durante a manufatura do produto a ser desenvolvido. Todos os contaminantes, no entanto, devem ser controlados e o nível de alguns deles é limitado até mesmo por especificações governamentais. Alguns dos microrganismos comumente encontrados apontados por Kulp e Lorenz (2003) em plantas de produção de fermento para panificação são bactérias ácido lácticas não esporulantes (*Leuconostoc* sp. e *Lactobacillus* sp.) e esporulantes (*Bacillus subtilis*), fungos (*Oideum lactis*) e outras leveduras (*Candida* sp. e *Torulopsis* sp.).

2.3.2. Proteínas microbianas

Além do processo desenvolvido para produção de fermentos para panificação, a indústria de proteínas microbianas (SCP, *Single Cell Protein*) apresenta processos com o mesmo objetivo final: maximizar a concentração final em biomassa. Essa biomassa, no entanto, destina-se tanto a alimentação humana como animal (RITALA et al., 2017).

Os excedentes de leveduras obtidos após a fermentação da cerveja foram as primeiras SCP utilizadas. Foi durante a I Guerra Mundial, no entanto, que o processo de produção se ampliou, principalmente na Alemanha, onde até 60% dos alimentos foram substituídos pelas leveduras cervejeiras. A produção de leveduras a partir do etanol apresenta poucos registros atualmente, mas é datada desde a década de 70, quando o primeiro processo de produção de proteína microbiana a partir desse substrato foi patenteado. Em 1976, a Amoco (associada desde 1998 a *British Petroleum* – Reino Unido) construiu uma planta contínua totalmente automatizada para a produção de 7.000 toneladas anuais de SCP a partir de *Candida utilis*. O produto denominava-se “Torutein” e era utilizado como suplemento nutricional e aditivo flavorizante em produtos como massas, pizzas congeladas e molhos. (BARFORD, 1987)

Além da Amoco, outras companhias investiram na produção de SCP. A linha de petroquímicos da Mitsubishi (Japão) utilizava *Candida*

ethanothermophilum, enquanto a Chemopetrol (Tchecoslováquia), parte da UNIPETROL RPA – Refinaria, Petroquímica e Agroquímica – desde 2007, visionava gerar 1.000 toneladas de SCP por ano com uso de *S. cerevisiae*.

SCP é frequentemente avaliado como um co-produto em potencial, com a oportunidade de alavancar a economia de uma biorefinaria que opere um processo pouco lucrativo. O custo estimado na produção de SCP dependerá de fatores como custo de produção, capital de investimento e lucratividade. A matéria prima, que pode contabilizar 35 – 62% do custo total do produto final (AGGELLOPOULOS et al., 2014; UGALDE; CASTRILLO, 2002), o custo energético envolvido na transferência de oxigênio e remoção de calor dos biorreatores, tem geralmente custo significativo no produto final. No entanto, é importante realçar que a escala em que o material é produzido se torna igualmente importante para a viabilidade econômica da produção. Operações contínuas são mais lucrativas e a maioria dos processos de SCP implementados em escala industrial foram pensados a partir de um modo de operação contínuo (BARFORD, 1987; UGALDE; CASTRILLO, 2002).

2.3.3. Leveduras cervejeiras

2.3.3.1. Cenário mundial

A produção de leveduras *ale* e *lager* ocorria tradicionalmente nas próprias cervejarias. Com o desenvolvimento do mercado cervejeiro e a necessidade de diferentes cepas, novas empresas de enfoque biotecnológico, especializadas na produção das leveduras cervejeiras, vêm tornando-se cada vez mais representativas tanto no mercado internacional como nacional.

As fermentações em cervejarias costumavam utilizar como inóculo parte da biomassa de leveduras produzida durante a fermentação anterior. Existem ainda hoje cervejarias que seguem essa prática, porém existem implicações negativas como a deriva genética, seleção de variantes e envelhecimento (DIACETIS; POWELL, 2007). Grande parte das cervejarias propagam as leveduras a partir de culturas matrizes para cada novo tanque a ser fermentado. Além disso, grandes plantas industriais têm implantado uma linha para produção de biomassa padronizada dentro da cervejaria, evitando assim gastos com transporte e manejo.

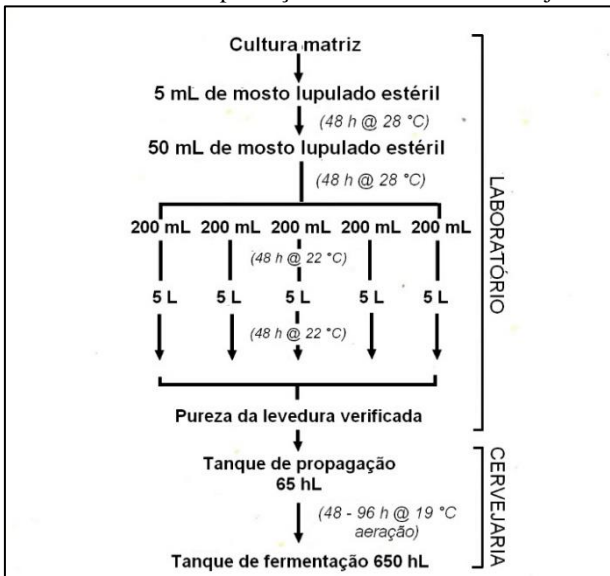
Diferentemente da produção de leveduras para panificação, as leveduras cervejeiras tendem a ser propagadas no mesmo mosto usado

para a fermentação da cerveja; ou seja, o mosto advindo do cozimento do malte de cevada. A distribuição precisa dos carboidratos do mosto, dessa forma, depende do grão e das condições de brassagem (BAMFORTH, 2006).

O sistema de produção segue a mesma metodologia de escalonamento sucessivo reproduzido comumente em ambiente laboratorial. A partir de uma cultura matriz, a propagação inicia com 5 mL do mosto lupulado estéril o qual será inserido em incubador orbital por 48 h a 28 °C. A mesma metodologia será utilizada para inocular sucessivamente volumes maiores de mosto com crescimento por 48 h a temperaturas progressivamente menores (BAMFORTH, 2006). Todas as cepas utilizadas na produção de cerveja têm temperatura ótima de crescimento em torno de 30 °C. No entanto, durante a fermentação do mosto cervejeiro, temperaturas relativamente baixas são empregadas (20 °C para leveduras *ale* e 18 – 10 °C para leveduras *lager*) e portanto a temperatura durante a propagação tende a diminuir gradualmente, chegando a temperatura ótima para a fermentação no último estágio (BOULTON; QUAIN, 2001).

A pureza da levedura é verificada antes de entrar na fase industrial pelo uso de meios seletivos. No estágio industrial a levedura será usada para inocular elevados volumes de mosto estéril em um tanque aerado. Essa fase leva de dois a três dias e gerará leveduras suficientes para inocular um fermentador de 500 hL (BAMFORTH, 2006). A Figura 2.6 demonstra o passo a passo do processo de produção de leveduras dentro da cervejaria, detalhando volumes e temperaturas comumente utilizadas.

Figura 2.6 – Processo de produção de leveduras em cervejaria



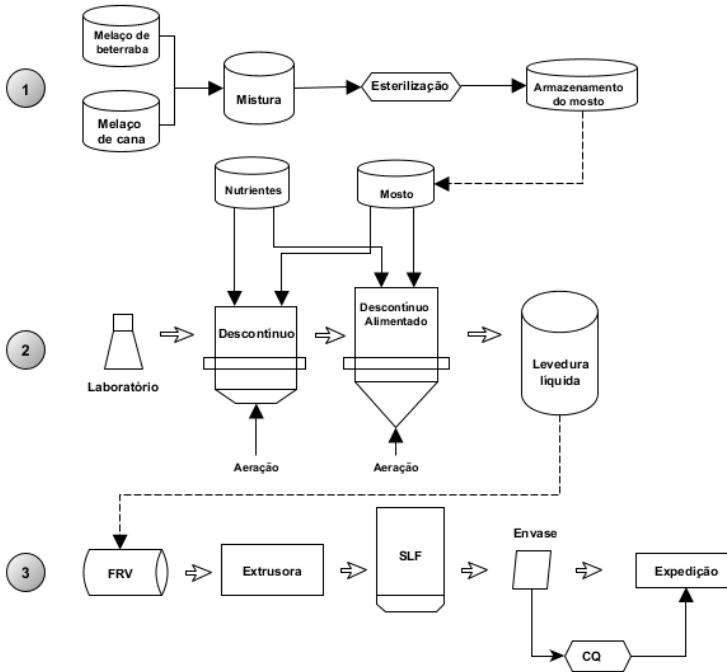
Fonte: Adaptado de Bamforth (2006).

Uma forma de compreender o porquê de empresas independentes especializadas na produção de leveduras estarem surgindo nos últimos anos é analisar a conjuntura da revolução das cervejarias artesanais nas últimas duas décadas. Observa-se, primeiramente, que o papel do consumidor tem mudado substancialmente dentro da economia: um perfil que antes designava-se por isolado e passivo torna-se dinâmico, com pessoas conectadas, informadas e ativas, de acordo com Prahalad e Ramaswamy (2004). Essa troca de perfil gerou não apenas uma procura por estilos de cervejas diferentes, mas também na organização desses consumidores em associações focadas em compartilhar experiências e disseminar informações sobre o tema. Houve também um aumento na renda de países industrializados, responsável pela geração de uma demanda de produtos mais sofisticados e variados, trazendo a exemplo as próprias cervejas artesanais, cujo valor pode oscilar substancialmente acima daquelas de cervejas tradicionais padrões (GARAVAGLIA; SWINNEN, 2018). Dados publicados por Estados Unidos (2017) mostram que entre 2010 e 2016, o número de cervejarias nos Estados Unidos não só aumentou mais de cinco vezes como a mão de obra associada a esse ramo cresceu 135%. Com o escalonamento desse mercado, setores associados também começam a seguir na mesma

direção, dando origem a produtores artesanais de lúpulo, malte e leveduras.

Na questão de produção de leveduras para cervejarias, empresas como Wyeast Laboratories e White Labs são companhias que iniciaram de forma pequena e detém hoje destaque no mercado internacional. Grandes multinacionais no ramo de leveduras também vêm se adaptando ao novo mercado, como é o caso da Lallemand, uma empresa canadense especializada na pesquisa, desenvolvimento, produção, comercialização e distribuição de leveduras e bactérias. Sua divisão responsável pelo ramo cervejeiro é denominada *Lallemand Brewing* cujo objetivo é fornecer leveduras secas para cervejas e produtos de nutrição à base de leveduras para melhoramento da fermentação. O processo de produção das leveduras na Lallemand (Figura 2.7) é semelhante àqueles da produção de leveduras para panificação, uma vez que a empresa se especializou primeiramente na produção do último. Nele, melaço de cana ou beterraba podem ser empregados no mosto, os quais passarão na fase *upstream* por processos em batelada e bateladas alimentadas, havendo variações nos mesmos para cada estirpe de levedura propagada. Durante a fase *downstream*, a extrusora e secador de leito fluidizado são responsáveis por gerar um produto final com menos de 7% de umidade, resultando em menos de uma bactéria ou levedura selvagem detectada por milhão de células de levedura, de acordo com o fornecedor.

Figura 2.7 – Fluxograma de produção das leveduras cervejeiras pela Lallemand. FRV: Filtro Rotativo a vácuo; SLF: Secador de leite fluidizado; CQ: Controle de qualidade.



Fonte: Lallemand (2018).

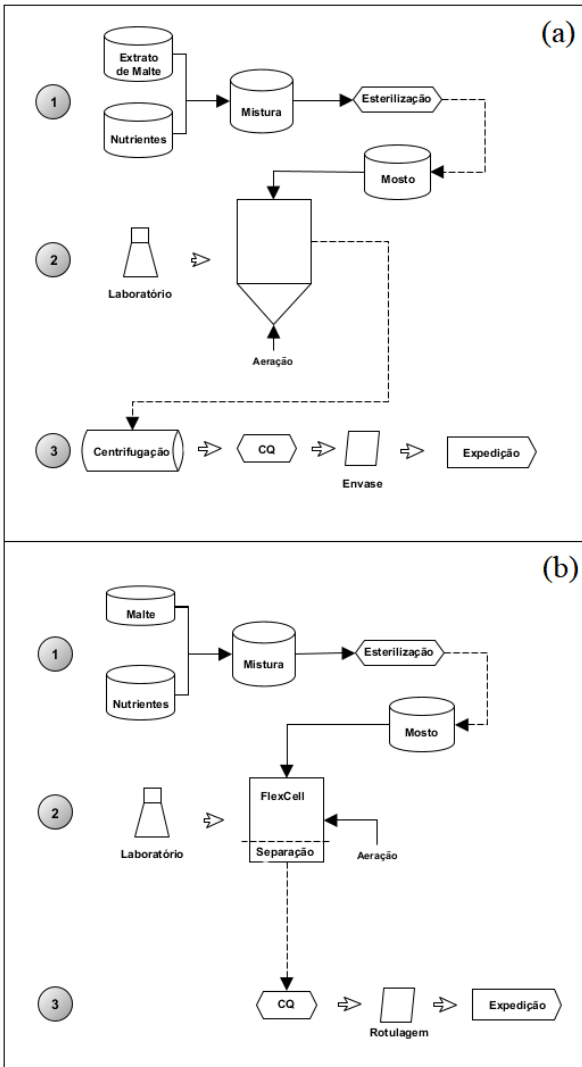
Um contratempo da utilização de leveduras secas é a necessidade de uma fase de reidratação antes de fermentar o meio desejado. Sem a reidratação, efeitos como longo tempo de fermentação e má utilização de maltotriose podem ser observados. Tanto a temperatura, tipo de agente de reidratação (devidamente esterilizado independente do qual a ser empregado) e período de reidratação são critérios essenciais para inserção da levedura nas melhores condições possíveis ao mosto cervejeiro (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Outra companhia de destaque é Wyeast, fundada 1986 em Oregon. A empresa foca na produção de leveduras líquidas para cervejarias, vinícolas e sidrerias. Pouco se sabe sobre o processo de produção das leveduras na companhia, porém a mesma conta com um sistema de ativação na embalagem (Smack-Pack Activator System™) que exemplifica a importância dada a adaptação da levedura ao mosto cervejeiro. O sistema, através de uma solução estéril líquida de nutriente

(não especificados) contida em recipiente dentro da própria embalagem, propõe reduzir o período *lag* de fermentação “ativando” o metabolismo da levedura e gerando dióxido de carbono na embalagem. O período de ativação pode ser de três horas ou mais, mantendo o pacote entre 21 – 24 °C. A expansão do pacote também funciona como um indicador da viabilidade das leveduras. Outros possíveis microrganismos podem estar presentes no produto: leveduras selvagens – não *Saccharomyces* sp. e não *Brettanomyces* sp. – e bactérias anaeróbias e aeróbias contabilizando valores até 1 UFC por produto final. Dessa forma, conclui-se que por mais que as cepas estejam efetivamente “ativadas” e adaptadas ao meio ao qual serão inseridas, o produto final não pode ser descrito como puro.

Prezando adaptação e pureza, a White Labs patenteou em 2014 o processo FlexCell™ (WHITE, 2014). Anteriormente, a produção utilizava biorreatores aerados contendo extrato de malte e outros nutrientes, tal como mostra a Figura 2.8a. A cultura final passaria subsequentemente por uma separação do meio de cultivo e concentração, para então serem expedidas em diferentes embalagens. O novo processo descrito por White (2014), visa a produção pela inoculação de um recipiente de plástico, propagando as leveduras no mesmo. Posteriormente, as leveduras são concentradas em uma das seções da sacola a qual será selada com chapa quente e separada em diversos fragmentos menores (Figura 2.8b). Assim, a levedura propagada teria o mínimo contato possível com o ambiente externo, evitando contaminações. A metodologia foi inspirada nos trabalhos de Singh (1999), criador do biorreator de onda (*Wave Bioreactor*), e Mikola, Seto e Amanullah (2007), que estudaram a adição de um aerador no modelo de Singh (1999) para o cultivo de leveduras. Por mais que a produção tenha níveis de pureza mais elevados, as sacolas de leveduras propagadas contem baixas concentrações celulares, exigindo, portanto, a necessidade da etapa de concentração.

Figura 2.8 – Fluxograma dos processos utilizados pela White Labs para produção de leveduras cervejeiras. (a) Primeiro processo desenvolvido e (b) FlexCell. CQ: Controle de qualidade.



Fonte: Adaptado de White Labs¹ (2018); White Labs² (2018).

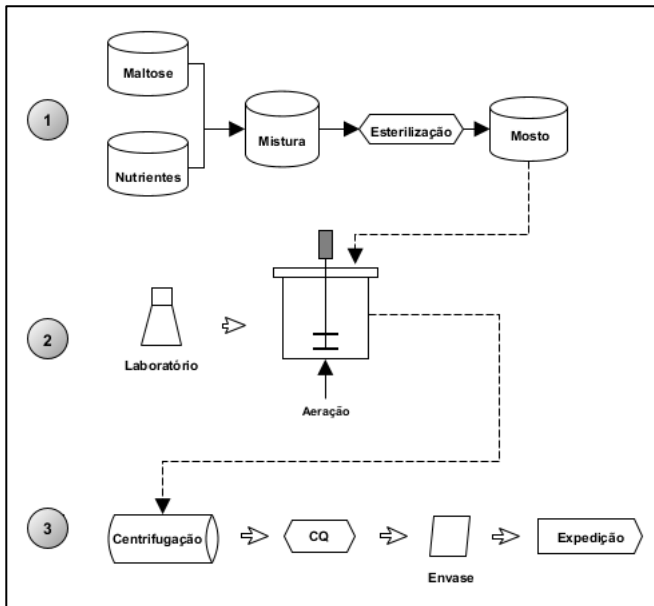
2.3.3.2. Brasil

A crescente demanda por cervejas artesanais fez crescer desde 2015 para 91% o número de cervejarias registradas no Brasil. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ainda indica 8.903 cervejas e chopes registrados no mesmo ano com aproximadamente 80% das cervejarias concentradas nas regiões Sul e Sudeste (BRASIL, 2017).

O crescimento acelerado de pequenas cervejarias ainda não é uma ameaça eminente as grandes companhias que lideram o mercado nacional. A Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil), que reúne as quatro gigantes do mercado brasileiro – Ambev, Brasil Kirin, Grupo Petrópolis e HEINEKEN Brasil – estima que as marcas dos três grupos sejam responsáveis por 96% da produção nacional (CERVBRASIL, 2018). Contudo, o crescimento das cervejarias artesanais não passa despercebido. As empresas vêm apostando constantemente em novos produtos (Linhas como Brahma Extra e Skol Hops) como na aquisição de cervejarias artesanais (a exemplo, a Colorado comprada em 2015 pela Ambev).

Além das microcervejarias, empresas nacionais especializadas na produção de leveduras também estão ocupando espaço no mercado como a Levteck Tecnologia Viva (Florianópolis, SC), a Bio4 – Soluções Tecnológicas (Curitiba, PR), a Artisan Leveduras (Brasília, DF) e a Yeastlabs Biotecnologia (Franca, SP). O processo de produção utilizado por essas empresas segue, de certa forma, as mesmas metodologias aplicadas das empresas descritas anteriormente. A Bio4 (Figura 2.9), por exemplo, emprega maltose e biorreatores agitados mecanicamente durante a propagação em um processo em batelada (BIO4, 2017).

Figura 2.9 – Processo de produção de leveduras pela empresa Bio4. CQ: Controle de qualidade.



Fonte: Adaptado de Bio4 (2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS

Foram utilizadas leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. A empresa Levteck Tecnologia Viva disponibilizou duas cepas da espécie *S. cerevisiae* para os estudos: TB81 (*American Lager*) e TB07 (*English Ale*). Os cultivos em frascos aerados foram realizados com as duas cepas enquanto que nos experimentos em biorreator e de fermentação utilizou-se apenas a cepa TB81.

3.2. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As culturas estoque foram mantidas em meio YPD ágar contendo (em g·L⁻¹): extrato de levedura, 10; glicose, 20; peptona, 20; ágar, 20. Utilizou-se água deionizada e a esterilização foi feita em autoclave a 121 °C por 15 min. A incubação foi realizada por cerca de quatro dias a 28 °C, tempo suficiente para verificar a formação de uma camada densa de células na superfície do *slant*. As culturas foram conservadas a 4 °C em refrigerador, e repicadas a cada dois meses.

3.3. FRASCOS AGITADOS

3.3.1. Meios de cultura

Foi utilizado um meio de cultura base que continha (em g·L⁻¹): extrato de levedura, 1; KH₂PO₄, 1,5; MgSO₄·7H₂O, 0,4; CaCl₂ 0,6; NaCl 0,5. O pH foi ajustado para 5,20 com soluções de NaOH (1 M) e H₃PO₄ (0,2 N). As fontes de carbono (etanol e glicerol) variaram de acordo com cada experimento (Tabela 3.1).

A concentração da fonte de nitrogênio (NH₄H₂PO₄) foi calculada com base na maior concentração da fonte de carbono utilizada, considerando uma razão entre carbono e nitrogênio de 13. Essa razão provém da consideração de uma conversão da fonte de C em biomassa da ordem de até 40% ($Y_{X/S} \approx 0,40$). Isso equivale a uma razão C/N de cerca de 5:1 para o crescimento, razão essa relacionada com a razão C/N média determinada para células de leveduras (STAMBURY et al., 1995). A observação de altas conversões e consumo total da fonte de carbono pode

sugerir correções no sentido de diminuir essa razão, aumentando-se o teor de N.

A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C por 15 min. Como o etanol não necessita de esterilização, sua adição ao meio de cultura foi realizada a partir de solução absoluta (PA 99,8%) após a esterilização prévia dos outros nutrientes. Para os meios contendo glicerol (PA 99,5%), sua adição foi realizada antes da esterilização.

Tabela 3.1 – Fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nos experimentos em frascos.

Experimento	Fonte de Carbono	Concentração da fonte de C (g·L ⁻¹)	Concentração da fonte de N (g·L ⁻¹)
E81	Etanol	2 – 6	0,61
G81	Glicerol	5 – 20	1,54
E07	Etanol	2 – 6	0,61
G07	Glicerol	5 – 20	1,54

E: etanol; G: glicerol; 81: Cepa *American Lager*; 07 = Cepa *British Ale*.

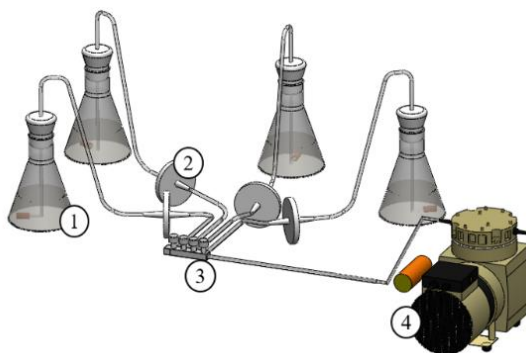
3.3.2. Inóculo

Os inóculos foram preparados a partir do repique da cultura estoque em 10 mL de meio YPD líquido, o qual foi incubado (Incubadora, da marca Dist) por 48 horas a 28 °C.

3.3.3. Sistema de Cultivo

Para o cultivo em frascos foi utilizado um sistema de aeração conforme demonstrado na Figura 3.1.

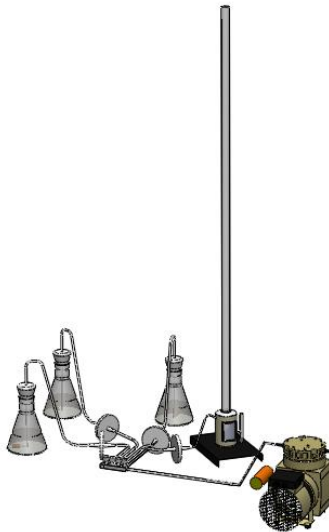
Figura 3.1 – Aparato experimental para o cultivo em frascos. ①: pedra difusora; ②: filtro de ar 0,2 μm ; ③: válvula para controle da aeração; ④: bomba de ar.



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Os cultivos foram realizados em duplicatas e mantidos a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A aeração foi realizada com pedras difusoras e a vazão de ar controlada através de válvulas. Cada saída de ar teve a vazão ajustada para 0,5 vvm utilizando um aparato com marcador de volume baseado no deslocamento de uma bolha de sabão (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Exemplificação do uso do aparato de deslocamento de bolha de sabão para determinação da vazão de ar no cultivo em frascos aerados.



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

3.4. BIORREATOR

3.4.1. Meios de cultura

Houveram três sistemas estudados ao longo do trabalho, cada qual com suas peculiaridades relacionadas ao meio de cultura utilizados.

No Sistema I foi usado o meio de cultura base concentrado (para um volume final de 3 L). O meio foi adicionado ao biorreator e esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. Uma solução de 1 L de etanol 50% (v/v) foi preparada visando o volume final de 3 L e utilizada na alimentação. Para o preparo da solução de etanol, água deionizada foi esterilizada junto ao recipiente que, após ser resfriado, foi completo com etanol (Álcool Etilico 92,8° INPM, marca ITAJÁ) sem previa esterilização.

No Sistema II, o meio de cultura base contendo como fonte de carbono glicose (20 g · L⁻¹) foi utilizado durante a fase inicial em batelada, tendo como referência um volume de 2 L. A fase em batelada alimentada só foi iniciada quando os valores de glicose no meio de cultivo foram inferiores a 0,1 g · L⁻¹, identificado a partir da amostragem. A segunda

fase do processo foi iniciada pela alimentação da solução de 1 L de etanol a 50% (v/v), visando o volume final de 3 L.

No Sistema III o meio de cultura base contendo como fonte de carbono glicose ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) foi utilizado na fase em batelada inicial. A fase contínua só foi iniciada quando os valores de glicose no meio de cultivo foram inferiores a $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, identificado a partir da amostragem. A solução de alimentação foi estabelecida com base nos trabalhos de Jong-Gubbels et al. (1995) e Paalme et al. (1997), o qual indicaram uma mistura de 500 C-mM de glicose (60%) e etanol (40%). A mistura foi adicionada ao meio de cultura base.

3.4.2. Inóculo

Os pré-inóculos foram preparados a partir do repique da cultura estoque em 10 mL de meio YPD líquido, o qual foi incubado por 48 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ (Incubadora, da marca Dist). O inóculo consistiu no meio de cultura base com adição (em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): glicose, 20, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1,54. O pH foi ajustado para 5,2 com soluções de NaOH 1M e H_3PO_4 0,2 M. Os 10 mL do pré-inóculo foram usados para inocular 270 mL de meio, o qual foi incubado por 48 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.3. Estratégias utilizadas

Três modos de produção distintos foram empregados durante os cultivos: batelada, batelada alimentada por pulsos e contínuo. Esses modos combinados entre si puderem definiram os sistemas de produção.

O Sistema I consiste em uma operação em batelada alimentada por pulsos. Durante a alimentação, o tempo de operação é dividido em ciclos que podem conter períodos iguais ou variáveis. Um ciclo é caracterizado por duas fases distintas: a primeira com alimentação constante e a segunda sem alimentação.

O Sistema II consistiu em uma operação em batelada seguida de uma batelada alimentada por pulsos, similar a descrita no Sistema I. A adição da etapa em batelada surgiu da necessidade de elevar o número de células dentro do biorreator previamente ao início da alimentação.

O Sistema III consistiu no modo de operação contínuo. Para estabelecer o sistema contínuo, fez-se necessário obter uma concentração inicial de células no biorreator maior que as obtidas nos sistemas anteriores. A aplicação de uma etapa em batelada para elevar o número de células como no Sistema II não seria aplicável, uma vez que a ideia é iniciar com baixas concentrações de glicose para prevenir possíveis acúmulos de etanol no meio (PAALME et al., 1997). Dessa forma,

concentraram-se as células obtidas no Sistema II para que fossem utilizadas como o inóculo para o Sistema III.

Durante o Sistema III, houve primeiramente uma batelada inicial a baixa concentração de glicose. A fase contínua inicia com o quase esgotamento da glicose ($<0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). O cultivo perdurou por cinco dias, com as vazões sendo incrementadas de forma a obter um aumento na diluição de $0,02 \text{ h}^{-1}$ durante os três primeiros dias e posteriormente um aumento de $0,05 \text{ h}^{-1}$.

A Tabela 3.2 apresenta as principais diferenças entre os Sistemas trabalhados.

Tabela 3.2 – Variação na vazão de alimentação de substrato (F_E), volume inicial de cultivo (V_i), volume final de cultivo (V_F) e tempo de processo (t_f) de acordo com os Sistemas definidos.

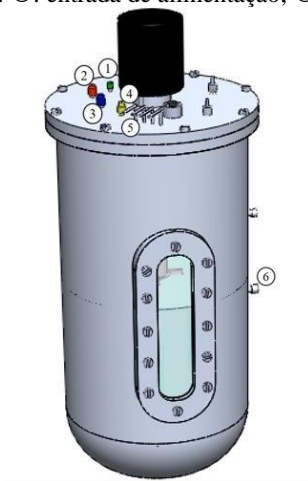
Variáveis	Sistema I	Sistema II	Sistema III
$F_E (\text{L}\cdot\text{h}^{-1})$	0,11	0,11	0,06 – 1,05
$V_i (\text{L})$	2	2	3
$V_F (\text{L})$	3	3	3
$t_f (\text{h})$	72	96	120

3.4.4. Sistema de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em biorreator mecanicamente agitado (modelo RALF+, da marca BIOENGINEERING), com capacidade de 5 L.

O equipamento conta com controles de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e nível de espuma, além de uma adaptação ao vaso do tanque que viabiliza a saída por transbordamento do meio reacional durante culturas contínuas (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Vaso do biorreator RALF+ com a tampa e portas de acesso. ①: sensor de nível de espuma; ②: sensor de pH, ③: sensor de oxigênio dissolvido; ④: sensor de temperatura. ⑤: entrada de alimentação; ⑥: saída de meio.

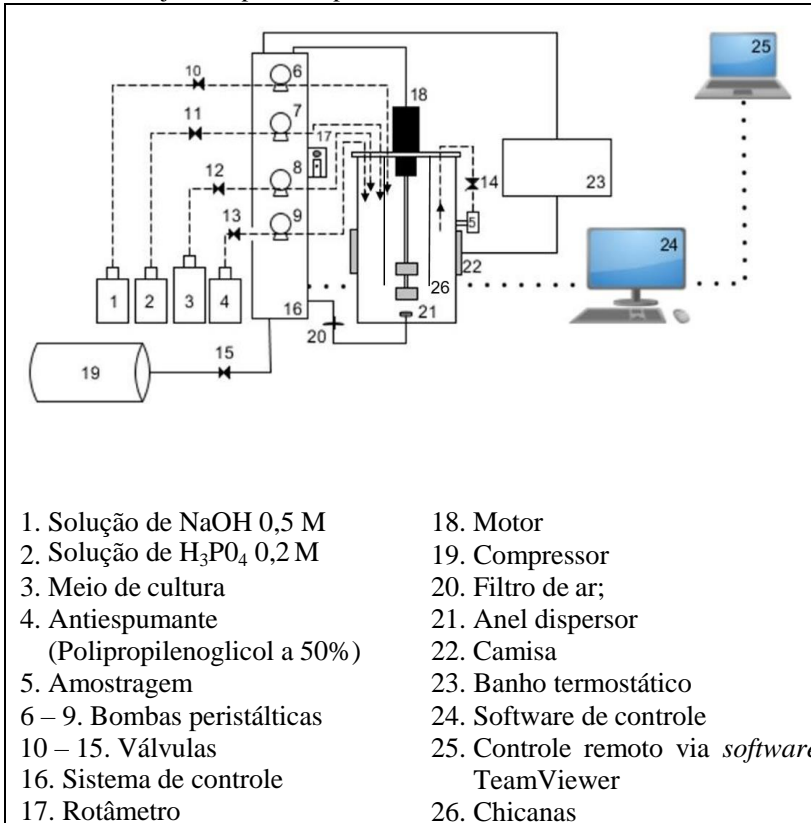


Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A aeração do sistema foi mantida através de um compressor de ar cuja vazão foi mantida a 0,5 vvm. O ar inserido ao sistema foi distribuído a partir de um anel dispersor submerso ao meio de cultivo enquanto que a agitação foi realizada através de duas turbinas Rushton localizadas ao longo do eixo central. A temperatura durante o cultivo foi mantida em 28 °C, o pH em 5,2 com adição de NaOH 0,5 M ou H₃PO₄ 0,2 M. A agitação inicial foi de 300 rpm chegando a um máximo de 600 rpm. Essa agitação foi estabelecida como limite pois acima desse valor é possível verificar danos as células de leveduras. Tanto as condições de agitação como aeração foram elevadas gradualmente ao longo do cultivo, respeitando suas limitações, de forma a manter o oxigênio dissolvido superior a 20% (m/v) em relação à saturação com ar atmosférico. O acompanhamento dos cultivos foi realizado tanto presencialmente quanto remotamente através do *software* TeamViewer.

A Figura 3.4 mostra um esquema do aparato experimental envolvido nos cultivos desenvolvidos.

Figura 3.4 – Aparato experimental envolvido nos cultivos de produção de leveduras cervejeiras a partir de processos em batelada alimentada e contínuo.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.5. ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO

3.5.1. Meios de cultura

O mosto de malte foi utilizado como meio de cultura nos estudos de fermentação. A preparação do mosto assim como os cálculos envolvidos são descritos no Apêndice C.

3.5.2. Inóculo

As leveduras utilizadas como inóculo foram classificadas em três grupos distintos durante os estudos de fermentação: leveduras adaptadas (AD+) e não adaptadas (AD-), produzidas durante os experimentos em biorreator, e as leveduras do controle (C), obtidas comercialmente.

As leveduras AD+ passaram por um estágio denominado de adaptação após sua retirada do biorreator. Este estágio consistiu na adição de uma solução de extrato de malte concentrado previamente esterilizado (121 °C por 15 min) até uma concentração final de 2 °Brix nas bombonas. As bombonas foram posteriormente armazenadas a temperatura ambiente (25±2 °C) entre 12 – 18 h.

Leveduras AD- não passaram por um estágio de adaptação após a retirada do biorreator, seguindo diretamente para o armazenamento a temperatura ambiente (25±2 °C) entre 12 – 18 h.

As leveduras comerciais em sachê líquido foram conservadas a 4 °C em refrigerador, não havendo uma diferença maior que 10 dias entre a data de fabricação e do início dos estudos de fermentação.

A concentração do inóculo de cada um dos grupos a ser adicionado ao mosto cervejeiro foi determinada com base na Equação (3.1) descrita por White e Zainasheff (2010):

$$\text{Número de células} = TI_{\text{LAGER}} \times V_{\text{mosto}} \times \text{SST} \quad (3.1)$$

Onde:

TI_{LAGER} : para uma cepa *lager* corresponde a $1,5 \cdot 10^6$ células.

V_{mosto} : volume de mosto, em mL

SST: Sólidos solúveis totais em °Brix

3.5.3. Sistema de Cultivo

As fermentações foram realizadas durante 14 dias à 16 °C (Incubadora, da marca Dist), com avaliação diária do pH (pHmetro PHS3BW, marca BEL) e sólidos solúveis totais (Refratômetro X090, marca Vodex) do fermentado.

3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1. Amostragem

Durante os experimentos em frascos, amostras de 2 mL foram retiradas ao longo de 48 horas para determinação da biomassa seca. Fazia-

se necessário um volume de 10 mL de amostra para a leitura de etanol. Para que a amostragem não reduzisse drasticamente o volume da cultura (não fosse maior que 1/3 do volume total), de seis a sete amostras foram retiradas para fazer a determinação do etanol produzido. As amostras foram filtradas em membrana de celulose (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade). O mesmo procedimento foi empregado nos experimentos utilizando glicerol como substrato.

Nos experimentos em biorreator, amostras de 10 mL foram retiradas para determinação da concentração de biomassa seca e substrato.

Nos estudos de fermentação, amostras diárias contendo 10 mL do mosto fermentado foram retiradas ao longo de 14 dias para determinação do pH e sólidos solúveis totais.

3.6.2. Determinação da concentração de biomassa seca

A concentração de biomassa foi determinada mediante gravimetria. Para os cultivos em frascos, as amostras foram armazenadas em tubos de Eppendorf previamente pesados em balança analítica (modelo AR2140, da marca OHAUS), centrifugadas (modelo 5452 Minispin, da marca EPPENDORF) a 12000×g por 10 min e lavadas duas vezes com água deionizada. Os tubos foram secos a 80 °C até massa constante. A concentração de biomassa seca em gramas por litro correspondeu à diferença entre a massa do material e do tubo dividido pelo volume de meio amostrado.

Para os cultivos em biorreator, a biomassa foi determinada mediante gravimetria adaptando a metodologia apresentada por Rice, Sullivan e Helbert (1980). A amostra retirada do biorreator foi filtrada em membrana de celulose (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade) cuja massa foi previamente pesada (modelo AR2140, da marca OHAUS). O primeiro filtrado obtido foi coletado e congelado, sendo posteriormente utilizado para análise do consumo de substrato. O material retido junto à membrana foi lavado com água deionizada (10 mL), e submetido à secagem por 10 minutos em forno micro-ondas (Modelo Giropratic, da marca PANASONIC) em potência média (600 W). Por fim, o material foi transferido para um dessecador por 15 min antes de ter sua massa mensurada. A concentração de biomassa seca em gramas por litro corresponde à diferença entre a massa do material e da membrana dividido pelo volume de meio amostrado.

3.6.3. Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada por um medidor de álcool e extrato (Modelo Alex 500, da marca Anton Paar). O método assim como o equipamento utilizados para determinação do conteúdo alcóolico em soluções líquidas são descritos por BENES (2012). A amostra pré-filtrada é bombeada para o equipamento alojando-se numa célula no interior que será irradiada por um diodo emissor de luz infravermelha (Epitex multi Wavelength LED). O LED emite três comprimentos de onda distintos com radiação entre 1000 – 1500 nm que são lidos por um detector de germânio (EG&G, diâmetro 3 mm). A fotocorrência detectada é traduzida em valores demodulados e os dados coletados processados eletronicamente. Os dados são transformados % (v/v). A conversão para $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ é feita a partir da Equação (3.2).

$$C_{\text{ETOH}} = C_{\text{ETOH},\%} \times f \times d_{\text{ETOH}} \quad (3.2)$$

Onde:

C_{ETOH} : concentração de etanol em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

$C_{\text{ETOH},\%}$: concentração de etanol em % (v/v)

d: fator de conversão igual a 10.

d_{ETOH} : densidade do etanol absoluto em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

3.6.4. Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada utilizando o *kit* TRIGLICÉRIDES Liquiform (Labtest), o qual se baseia no método enzimático-colorimétrico da lipoproteína lipase. A lipoproteína lipase (LPL) é responsável pela hidrólise dos triglicérides em glicerol, o qual é convertido, pela ação da glicerolquinase (GK), em glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerol-3-fosfato oxidase (GPO). Em seguida, uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase (POD), produz uma quinoneimina de cor avermelhada cuja intensidade será proporcional à concentração dos triglicérides na amostra.

Uma curva padrão correlacionando absorvância a 505 nm e concentração de glicerol foi desenvolvida visando os limites de detecção ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) do teste e as concentrações de glicerol trabalhadas durante os ensaios. Um exemplo de curva produzida para a determinação encontra-se na Figura B.1 do Apêndice B. Para a determinação da concentração de

glicerol nas amostras as mesmas foram previamente diluídas e incubadas a 37 °C (incubadora modelo B52 043/7, da marca B. BRAUN) por 10 minutos. As absorbâncias foram determinadas a 505 nm em espectrofotômetro (modelo SP1105, da marca BEL PHOTONICS) e as concentrações determinadas utilizando-se a Equação (3.3).

$$C_{\text{glicerol}} = (\alpha \times \text{Abs}_{\text{teste}}) \times f \quad (3.3)$$

Onde:

C_{glicerol} : concentração de glicerol em g.L^{-1}

$\text{Abs}_{\text{teste}}$: fator de conversão

α : coeficiente angular da curva padrão em $\text{g.L}^{-1}\text{nm}^{-1}$

f: fator de diluição

3.6.5. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada utilizando o *kit* GLICOSE Liquiform (Labtest), o qual se baseia no método enzimático-colorimétrico da glicose oxidase. A glicose oxidase (GOD) é responsável pela catalisação da reação de oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação da peroxidase (POD). Essa reação forma uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

As amostras analisadas foram previamente diluídas de acordo com os limites de detecção do teste (5 g.L^{-1}) e incubadas a 37 °C (incubadora modelo B52 043/7, da marca B. BRAUN) por 10 minutos. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (modelo SP1105, da marca BEL PHOTONICS) a 505 nm. A concentração de glicose, em gramas por litro, foi obtida a partir da Equação (3.4).

$$C_{\text{glicose}} = \frac{\text{Abs}_{\text{teste}}}{\text{Abs}_{\text{padrão}}} \times C_{\text{padrão}} \times f \quad (3.4)$$

Onde:

C_{glicose} : Concentração de glicose (g.L^{-1})

$\text{Abs}_{\text{teste}}$: Absorbância do teste

$\text{Abs}_{\text{padrão}}$: Absorbância da solução padrão

$C_{\text{padrão}}$: Concentração da solução padrão (g.L^{-1})

f: Fator de diluição

3.6.6. Determinação da vazão específica de aeração

Para determinação da vazão específica de aeração utilizou-se um dispositivo que consistia de um tubo de vidro (1200 x 16 mm) com uma de suas extremidades cortada a 45°. A extremidade cortada é acoplada a um recipiente com uma solução de detergente 1:1. Ar proveniente da saída do sistema de cultivo é canalizado para dentro do recipiente de maneira a gerar bolhas que ascendem no tubo. O tempo necessário para que uma bolha percorra um intervalo de volume do tubo foi utilizado para o cálculo da vazão de ar de acordo com a Equação (3.5).

$$q = \frac{V_{\text{perc}}}{V_{\text{meio}} \times t_{\text{desl}}} \quad (3.5)$$

Onde:

q: vazão específica de ar em min^{-1}

V_{perc} : volume do intervalo do tubo percorrido por uma bolha em L

V_{meio} : volume do meio de cultura submetido à aeração em L

t_{desl} : tempo necessário para a bolha percorrer o intervalo do tubo em min

3.7. TRATAMENTO DE DADOS

3.7.1. Frascos agitados

3.7.1.1 Balanço de massa

O sistema em análise consiste no frasco aerado contendo um volume constante de meio de cultivo, células e substrato a ser consumido. Considerando um processo em batelada, as seguintes hipóteses são assumidas:

- (a) Sistema isotérmico;
- (b) Vazão de ar constante;
- (c) Massa específica (ρ) constante;
- (d) Mistura completa.

- (e) Velocidade específica de morte celular desprezível quando comparada a velocidade específica de crescimento;
- (f) Não há entrada ou saída de componentes no volume de controle para o caso do glicerol como substrato. Para o etanol, no entanto, torna-se necessário considerar a perda decorrente da evaporação ao longo do processo. A evaporação é majoritariamente afetada pela concentração de etanol no meio, dadas as hipóteses (a) e (b).

A partir dessas hipóteses, as equações para o balanço de massa global, balanço de massa para a célula e balanço de massa para o substrato podem ser descritas pelas Equações (3.6), (3.7) e (3.8), respectivamente, com o termo de evaporação (evap) sendo adicionado apenas aos modelos utilizando etanol como substrato.

$$\frac{dV}{dt} = -evap \quad (3.6)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_X C_X \quad (3.7)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\left(\frac{\mu_X}{Y_{X/S}} + m_S\right) C_X - evap \quad (3.8)$$

A velocidade específica de crescimento celular é comumente descrita pelo modelo cinético de Monod (1941) descrito na Equação (3.9). No entanto, esse modelo não leva em consideração possíveis efeitos inibitórios, sejam eles causados pelo substrato ou por algum produto formado. Sabendo do potencial inibitório que substratos como etanol e glicerol possam vir a ter em leveduras, considerou-se também o modelo de Andrews (1968), como descrito na Equação (3.10).

$$\mu_X = \frac{\mu_{m\acute{a}x} C_S}{K_S + C_S} \quad (3.9)$$

$$\mu_X = \frac{\mu_{m\acute{a}x} C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_i}} \quad (3.10)$$

3.7.2. Biorreator

3.7.2.1 Balanço de massa

O sistema em análise, independentemente do modo de operação, consiste no biorreator aerado, agitado mecanicamente e contendo o meio de cultura e células no instante inicial. Três configurações principais foram adotadas para descrição dos processos escolhidos: operação em batelada, batelada alimentada a vazão constante e contínuo. Durante a operação em batelada, as mesmas hipóteses assumidas na seção 3.7.1.1 foram consideradas. Assim, para descrição dessa operação as Equações (3.6), (3.7) e (3.8) foram utilizadas. Na operação em batelada alimentada a vazão constante, não ocorre saída do meio de cultura do volume. As seguintes hipóteses são assumidas:

- (a) Sistema isotérmico;
- (b) Massa específica (ρ) constante;
- (c) Vazão volumétrica de alimentação constante. A saída de substrato é apenas considerada para o caso da evaporação de etanol como descrito na seção 3.7.1.1.;
- (d) Mistura completa.

A partir dessas hipóteses, as equações para o balanço de massa global, balanço de massa para a célula e balanço de massa para o substrato podem ser descritas pelas Equações (3.11), (3.12) e (3.13), respectivamente.

$$\frac{dV}{dt} = F_E - \text{evap} \quad (3.11)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = C_X(\mu_X - D) \quad (3.12)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = D(C_{S,E} - C_S) - \left(\frac{\mu_X}{Y_{X/S}} + m_S \right) C_X - \text{evap} \quad (3.13)$$

Onde D é o fator de diluição, em h^{-1} , definido pela Equação (3.14).

$$D = \frac{F}{V} \quad (3.14)$$

A produtividade em biomassa, para todos os sistemas, foi determinada a partir da Equação (3.15).

$$P_X = \frac{C_{X,F} - C_{X,i}}{t_f} \quad (3.15)$$

Onde:

P_X : produtividade em biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

$C_{X,F}$: concentração de biomassa final ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$C_{X,i}$: concentração de biomassa inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

t_f : tempo final de fermentação (h)

3.7.3. Ajuste de dados

A determinação das velocidades específicas máximas de crescimento foi realizada a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo Neperiano da biomassa em relação ao tempo de cultivo, de acordo com a Equação (3.16):

$$\ln(C_X) = \mu_{\text{máx}}t + \ln(C_{X,i}) \quad (3.16)$$

Onde:

C_X : Concentração de biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$C_{X,i}$: Concentração de biomassa inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$\mu_{\text{máx}}$: Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

t: tempo (h)

Para a determinação da constante de saturação (K_S), Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), coeficiente de manutenção (m_S) e constante de inibição (K_i), o ajuste dos dados foi realizado a partir de regressão não-linear tendo como base as equações de balanço de massa dos sistemas descritos (ver Apêndice D). A função objetivo a ser minimizada durante o processo de estimativa de parâmetros teve como base o cálculo do erro quadrático médio (EQM) descrito pela Equação (3.17).

$$EQM = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y_i)^2}{n} \quad (3.17)$$

Onde:

n: número de pontos ajustados

\tilde{y}_i : valor da variável calculada pelo modelo

y: valor experimental da variável

3.7.4. Análise estatística

A análise estatística permitiu avaliar os resultados gerados a partir do ajuste do modelo aos dados experimentais. Os testes utilizados para a análise estatística foram o teste do χ^2 de Bartlett, coeficiente de determinação (R^2) e análise dos resíduos (COSTA NETO, 2002). O teste do χ^2 , que verifica a presença de modelos não adequados entre um conjunto de modelos ajustados, avaliando a homogeneidade das estimativas do erro experimental, foi calculado a partir da fórmula de Bartlett:

$$\chi^2 = \frac{\ln(\bar{s}^2) \sum_{i=1}^m (G.L.)_i - \sum_{i=1}^m (G.L.)_i (s_i^2)}{1 + \frac{1}{3(m-1)} \left[\sum_{i=1}^m \frac{1}{(G.L.)_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^m (G.L.)_i} \right]} \quad (3.18)$$

Onde:

s_i^2 : estimativa da variância do modelo “i”

$$s_i^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(y^k - \tilde{y}_i^k)^2}{n - p_i} \quad (3.19)$$

y^k : valor experimental da variável

\tilde{y}_i^k : valor da variável calculada pelo modelo “i”

\bar{s}^2 : estimativa combinada da variância

$$\bar{s}^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (G.L.)_i s_i^2}{\sum_{i=1}^m (G.L.)_i} \quad (3.20)$$

$(G.L.)_i = n - p_i$: graus de liberdade do modelo “i”

n: número de pontos experimentais

p_i : número de parâmetros do modelo “i”

m: número de modelos ajustados

Se $\chi_{\text{calc}}^2 > \chi_{\text{tab}}^2(\alpha, m-1)$, o modelo ao qual corresponde o maior valor de s_i^2 é descartado, até a determinação do modelo mais adequado. O valor de $\chi_{\text{tab}}^2(\alpha, m-1)$ é obtido através de uma tabela estatística (ANEXO A.1). O nível de significância escolhido como referência foi de 5%.

A análise estatística do teste do χ^2 não garante que os modelos aprovados representem satisfatoriamente o conjunto de ensaios ajustados. Desta forma a qualidade do ajuste foi verificada pela análise de resíduos e o valor de R^2 . A análise de resíduos permite avaliar se o modelo gerado é apropriado e identifica violações possíveis da premissa. O valor do resíduo é calculado a partir da Equação (3.21).

$$y_{\text{res}} = y - \tilde{y}_i \quad (3.21)$$

Onde:

y_{res} : valor do resíduo

\tilde{y}_i : valor da variável calculada pelo modelo

y: valor experimental da variável

O coeficiente de determinação (R^2) varia de 0 – 1, sendo que, quanto mais próximo ao valor de 1, mais o modelo se aproxima de explicar corretamente a variação dos dados experimentais. A equação para obtenção de R^2 é dada pela Equação (3.22).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2} \quad (3.22)$$

Onde:

\tilde{y}_i : valor da variável calculada pelo modelo

y: valor experimental da variável

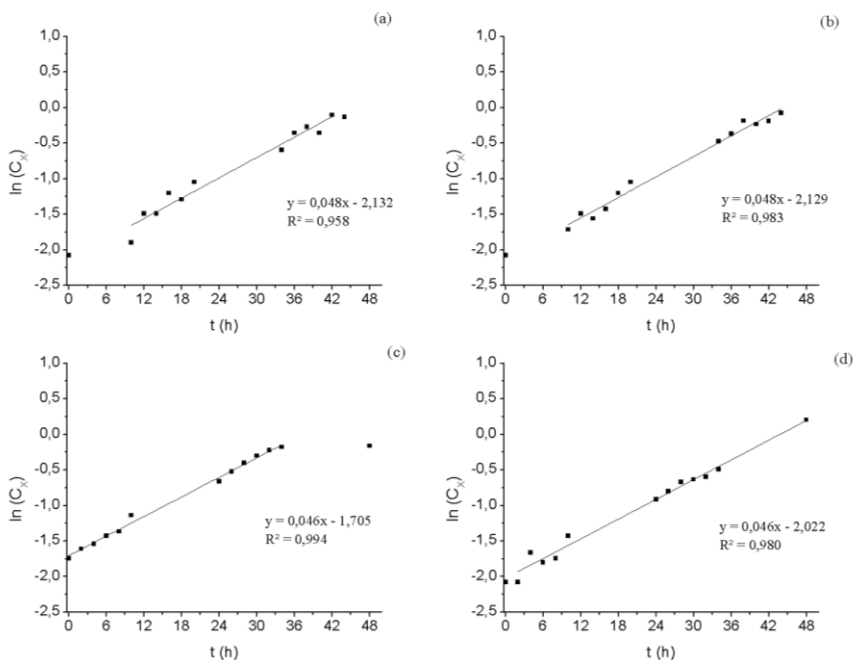
\bar{y} : valor da média aritmética

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS

A Figura 4.1 apresenta o logaritmo Neperiano da concentração de biomassa em relação ao tempo de cultivo para determinação da velocidade específica de crescimento, representada pelo coeficiente angular.

Figura 4.1 – Determinação das velocidades específicas máximas de crescimento em etanol para as cepas TB81 à (a) 2 e (b) 6 g·L⁻¹ e TB07 a (c) 2 e (d) 6 g·L⁻¹

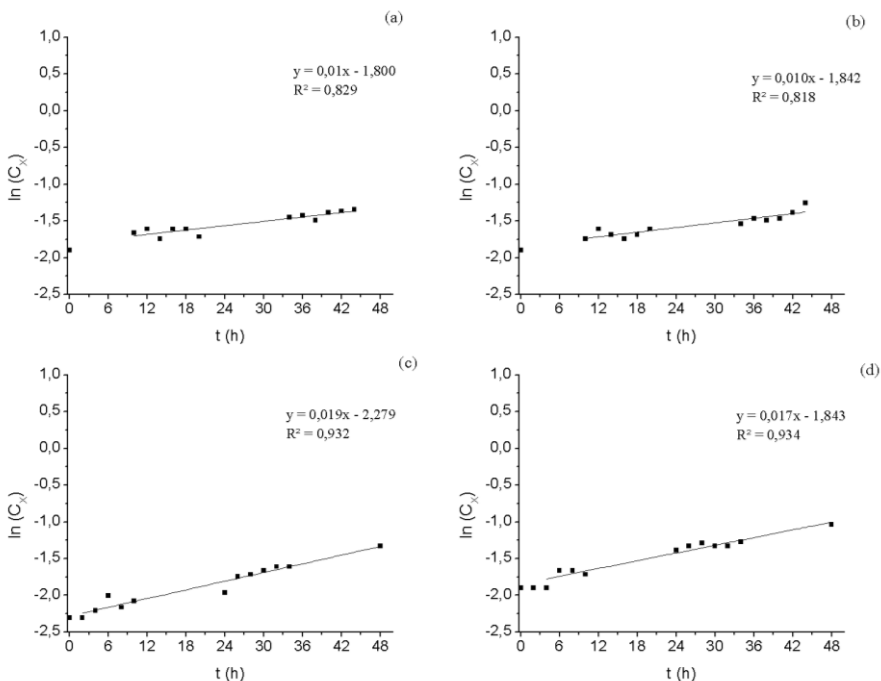


As velocidades obtidas para ambas as cepas apresentaram valores similares, em torno de $0,047 \text{ h}^{-1}$ ($t_G=14,7 \text{ h}$). Annemüller, Lietz e Manger (2018) descreveram a dependência da velocidade específica de crescimento com base na concentração de glicose em um cultivo aeróbio de leveduras cervejeiras a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Quando a concentração de glicose se encontra à $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, velocidades específicas de crescimento de $0,049 \text{ h}^{-1}$ ($t_G = 14,2 \text{ h}$) são observadas, valor este que vem de encontro ao obtidos

na Figura 4.1 e comprovando o metabolismo respiratório. Salienta-se que a respiração nas leveduras sempre implicará em uma velocidade de crescimento reduzida quando comparada à fermentação, independente do substrato utilizado. A respiração envolverá um caminho mais longo a ser percorrido, onde o piruvato formado necessita ser enviado para a mitocôndria para ser oxidado no ciclo do ácido cítrico. Além disso, mais mitocôndrias necessitarão ser sintetizadas, assim como enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico e na fosforilação oxidativa (SIMEONIDIS et al., 2010).

Avaliando as velocidades específicas máximas de crescimento para uma mesma cepa a concentrações diferentes de etanol pode-se observar que não houveram variações significativas entre as mesmas. Esse resultado é condizente já que as concentrações utilizadas estão acima de valores considerados críticos – assim como os valores de concentração do substrato sempre estiveram acima dos valores da constante de saturação – além das condições de temperatura e aeração constantes entre os tratamentos. Essa mesma observação é igualmente válida para os cultivos em glicerol presentes na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Velocidades específicas máximas de crescimento em glicerol para as cepas TB81 à (a) 5 e (b) 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e TB07 a (c) 5 e (d) 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.



A partir da Figura 4.2, nota-se que a velocidade específica máxima obtida para a cepa TB81 foi de $0,010 \text{ h}^{-1}$ ($t_G = 69,3 \text{ h}$) enquanto que para a cepa TB07 $0,019 \text{ h}^{-1}$ ($t_G = 36,4 \text{ h}$). Estes valores indicam uma queda aproximada de 80% para a cepa TB81 e 60% para a cepa TB07 quando comparadas aos valores obtidos durante os ensaios utilizando etanol como substrato. Uma análise mais detalhada das velocidades específicas máximas de crescimento foi obtida a partir da estimativa dos outros parâmetros cinéticos envolvidos a partir do Programa I, cuja descrição do funcionamento assim como o passo-a-passo para uso do mesmo encontra-se no APÊNDICE D. Dentre os parâmetros estimados encontram-se a constante de saturação (K_S); fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$); coeficiente de manutenção (m_s); e constante de inibição (K_i), quando utilizada a equação de Andrews (1968) para descrever a cinética de crescimento. Os dados inseridos no Programa 1 para a estimação dos parâmetros estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Dados alimentados no Programa 1 para estimativa dos parâmetros cinéticos durante os cultivos das cepas TB81 e TB07 em etanol e glicerol.

Parâmetros estimados	Intervalo de estimativa
K_s (g.L ⁻¹)	$0,001 \leq K_s \leq 1$
$Y_{X/S}$ (g _X .g _S ⁻¹)	$0,001 \leq Y_{X/S} \leq 1$
m (g _X .g _S ⁻¹ .h ⁻¹)	$0,001 \leq m \leq 1$
K_i (g.L ⁻¹)	$0,001 \leq K_i \leq 100$
Condições de simulação	Valor
Passo no tempo (h)	0,001
Número de repetições do algoritmo de otimização	5

A Figura 4.3 e 4.4 apresenta as simulações referentes as cinéticas em etanol para a cepa TB81 e TB07, cujos valores dos parâmetros estimados e índices estatísticos estão na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos através das simulações do crescimento das cepas TB81 e TB07 em etanol.

ETANOL	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	K_s ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$Y_{X/S}$ ($\text{g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}$)	K_i ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	m_s ($\text{g}_s\cdot\text{g}_x^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	EQM*	χ^2	R²
E81M*	0,048	0,056	0,59	-	0,034	0,031	0,037	0,981
E81A*	0,048	0,053	0,42	99,92	0,010	0,030		0,980
E07M*	0,046	0,049	0,48	-	0,034	0,029	0,188	0,989
E07A*	0,046	0,035	0,35	61,50	0,019	0,025		0,991

*E: Substrato etanol; 81: Cepa TB81; 07: Cepa TB07; M: Modelo de Monod (1941); A: Modelo de Andrews (1968). EQM: Erro quadrático médio.

Figura 4.3 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB81 (---) em meio contendo etanol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato (▲). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (b) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (d) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

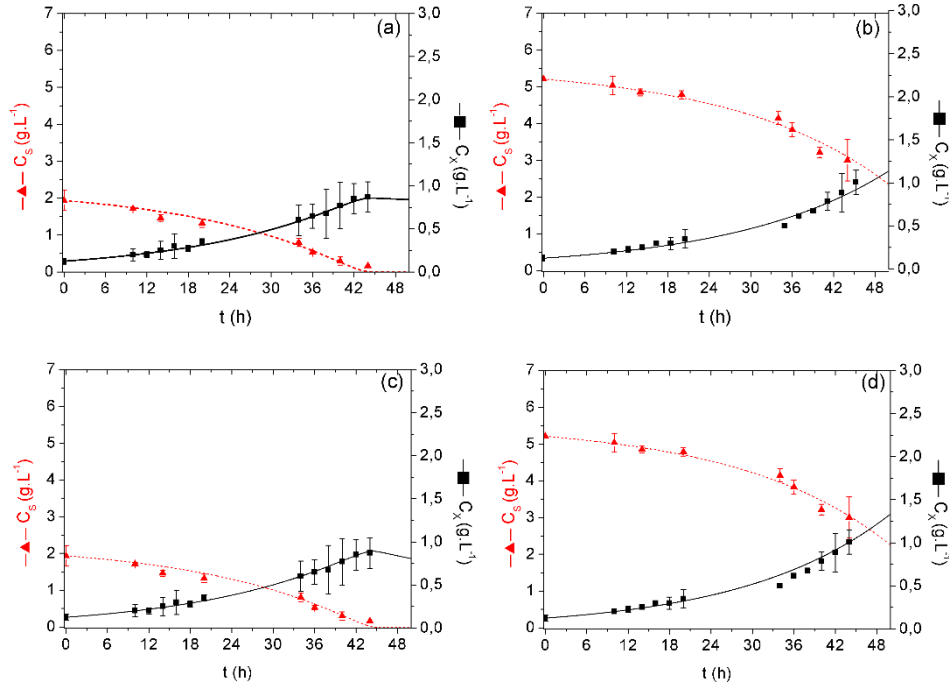
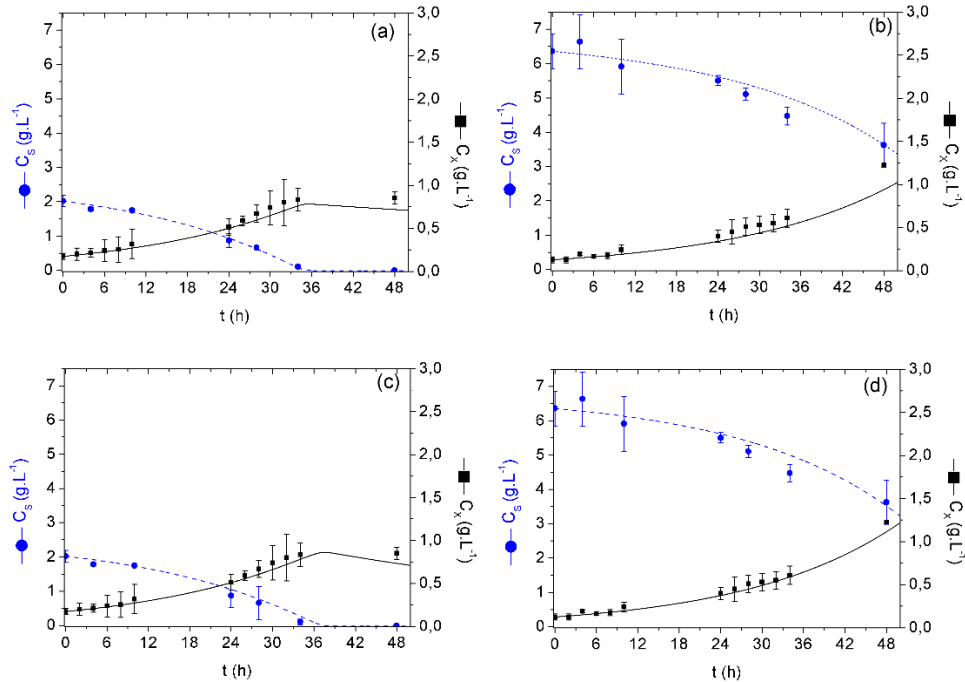


Figura 4.4 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB07 (---) em meio contendo etanol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato TB07 (●). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (b) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (d) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.



Além da pouca variação observada de $\mu_{\text{máx}}$ entre as cepas testadas, observa-se pela análise da Tabela 4.2 que o valor de K_S é da mesma ordem (10^{-2}) para ambas as cepas, cujo valores diminutos indicam uma boa afinidade entre o substrato e os micro-organismos em questão. Os fatores de conversão de substrato em células apresentaram pouca variação na aplicação de modelos distintos para a cepa TB81. Por outro lado, para a cepa TB07, o modelo de Andrews acabou gerando um valor menor, o que pode estar vinculado a adição do novo parâmetro estimado (K_i).

Existem poucos registros de parâmetros cinéticos envolvendo o crescimento de cepas do gênero *Saccharomyces* em etanol, visto que maior atenção é dada a sua capacidade em produzir o mesmo. O estudo mais completo referente a capacidade de crescimento neste substrato seria o de Wasungu e Simard (1982) que estudou a influência da temperatura e pH no crescimento de *S. cerevisiae* CB5-47 23-57, cepa utilizada na panificação, em etanol. Os valores obtidos para $\mu_{\text{máx}}$ e K_S ($C_S = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram de $0,28 \text{ h}^{-1}$ e $0,611 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Paalme et al. (1997) obteve um valor para $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$ durante uma cultura contínua da cepa *S. cerevisiae* ALK0743 em etanol ($C_S = 9,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) de $0,125 \text{ h}^{-1}$ e $0,68 \text{ g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}$. Jong-Gubbels et al. (1995) alcançou valores de $Y_{X/S}$, também durante culturas contínuas em etanol, próximos a $0,61 \text{ g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}$ a cepa *S. cerevisiae* T23D. A parte dos valores obtidos para $Y_{X/S}$ que encontram-se próximos àqueles esperados para culturas aeróbias, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e K_S variaram consideravelmente. É possível que a divergência de resultados esteja relacionada a complexidade envolvida nos meios de culturas utilizados durante as pesquisas citadas, os quais complexos vitamínicos foram adicionados em todos os experimentos realizados, estimulando positivamente o crescimento no meio de cultura em questão.

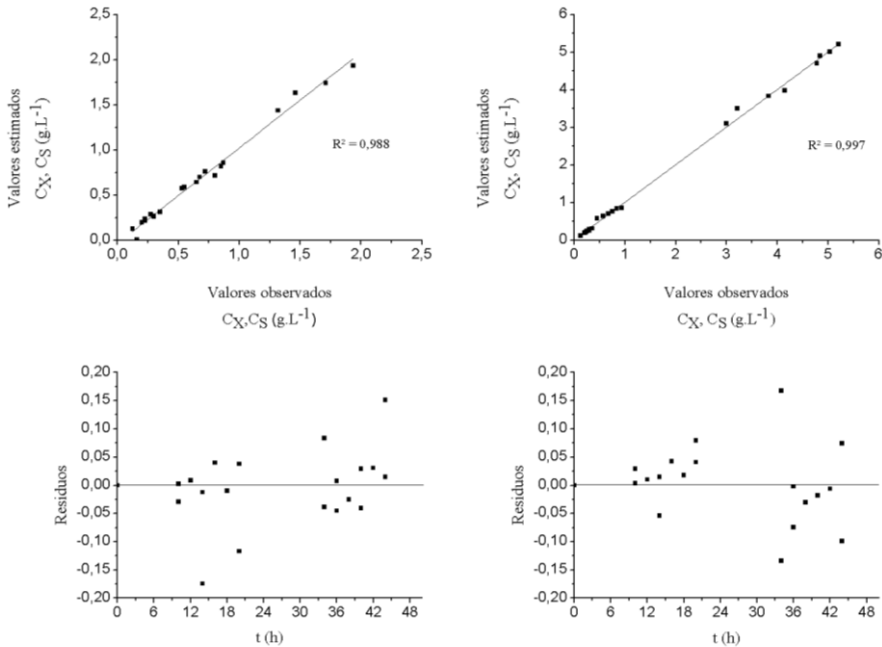
Para os valores obtidos para o coeficiente de manutenção, assim como para os outros parâmetros estimados anteriormente mencionados, existem poucos valores disponíveis na literatura. Sabe-se no entanto, que culturas em glicose de *S. cerevisiae* (cepa não especificada) os valores podem variar de $0,3 - 0,03 \text{ g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, por exemplo (DORAN, 2012). O fato de ter-se assumido a influência do coeficiente de manutenção durante este trabalho vem da concepção que, com diferentes cepas trabalhadas, uma forma de distingui-las seria avaliando a energia necessária que cada uma necessitaria apenas para manter seu sistema metabólico funcionando, sem reprodução envolvida. Este coeficiente, introduzido por Pirt (1965), contabiliza a energia necessária para modificações de componentes celulares, preservação dos gradientes iônicos e osmóticos através da membrana celular, assim como mobilidade do microrganismo em questão (SCHMIDELL et al., 2001). Sabe-se que dentre as cepas utilizadas na

produção de cerveja existe uma variedade extensa de microrganismos que apresentam características cinéticas distintas. As cepas estudadas neste trabalho, mais especificadamente, são identificadas como células que apresentam maior dificuldade de crescimento frente as outras, demandando mais energia durante os cultivos. A adição do coeficiente de manutenção pode ser, portanto, uma forma de diferenciar as cepas trabalhadas. Vale destacar que apesar de ter sido considerado constante, sabe-se que o valor do coeficiente de manutenção é variável não apenas entre microrganismos distintos, mas também a partir da influência de fatores como temperatura do cultivo e força iônica do meio de cultura utilizado (DORAN, 2012). Além disso, para obter melhores estimativas de seus valores, seria necessário obter mais pontos na curva, principalmente durante a fase estacionária e de decaimento.

Além do valor do erro quadrático médio para avaliar a qualidade dos ajustes, foram realizados gráficos de resíduos e de correlação (valores preditos pelo modelo *versus* observados experimentalmente) para cada um dos ensaios descritos na Tabela 4.2. Um exemplo de um dos gráficos realizados encontram-se na Figura 4.5 referente aos ensaios em etanol para a cepa TB81 utilizando o modelo de Monod (1941) e Andrews (1968).

O valor de χ^2 em ambos os ensaios se mostrou menor que aquele tabelado ($\chi^2_{\text{TABELADO}} = 5,991$), indicando que não há uma variação significativa entre os modelos utilizados. A tendência à similaridade dos modelos é melhor compreendida ao se observar os valores de K_i , os quais para a cepa TB81 e TB07 foram de $99,92 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $61,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Sabe-se que a diferença entre a descrição do modelo cinético de crescimento de Andrews para com o de Monod baseia-se na adição do termo C_S^2/K_i no denominador. Quanto maior o valor de K_i , maior a tendência de o termo apresentar um valor reduzido e conseqüentemente a aproximar-se do modelo de Monod. Nessa predisposição a descrição pelo modelo de Monod faz-se mais evidente no ensaio da cepa TB81, cujo valor de K_i foi praticamente equivalente ao limite superior da faixa imposta para determinação do parâmetro. Apesar dessa tendência ser constatada, os valores de K_i encontraram-se dentro dos descritos pela White Labs (2018) para cepas similares: a cepa *American Lager* WLP840 (cepa especificada), semelhante a TB81, apresenta coeficiente de inibição em etanol numa faixa de $63 - 95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ enquanto que uma cepa semelhante v0063a TB07, a *English Ale*, apresenta a $39 - 79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por essa razão, optou-se por implementar os valores de K_i estimados nos cultivos subsequentes.

Figura 4.5 – Correlação entre os dados preditos pelo modelo de (a) Monod (1941) e (b) Andrews (1968) *versus* os dados observados assim como os resíduos correspondentes ao modelo de (c) Monod (1941) e (d) Andrews (1968) para a cepa TB81 durante o crescimento em etanol à $C_{S,i} = 6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$



Diferentemente das cinéticas em etanol cujo crescimento celular e consumo de substrato puderam ser verificados plenamente através das curvas, o crescimento em glicerol apresentou-se muito lento, com baixo consumo de substrato, como pode ser observado na Figura 4.6 e 4.7. A Tabela 4.3 apresenta os valores dos parâmetros e índices estatísticos obtidos.

Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos e índices estatísticos obtidos através das simulações do crescimento das cepas TB81 e TB07 em glicerol.

GLICEROL	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	K_s (g·L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g _x ·g _s ⁻¹)	K_i (g·L ⁻¹)	m_s (g _s ·g _x ⁻¹ ·h ⁻¹)	EQM*	χ^2	R²
G81M*	0,010	0,999	0,09	-	0,001	0,068	0,74	0,978
G81A*	0,010	0,991	0,08	99,99	0,001	0,075		0,981
G07M*	0,019	0,999	0,16	-	0,001	0,160	0,15	0,975
G07A*	0,017	0,990	0,13	99,94	0,001	0,162		0,978

*G: Substrato glicerol; 81: Cepa TB81; 07: Cepa TB07; M: Modelo de Monod (1941); A: Modelo de Andrews (1968).
EQM: Erro quadrático médio

Figura 4.6 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB81 (---) em meio contendo glicerol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato (▲). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (b) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (d) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

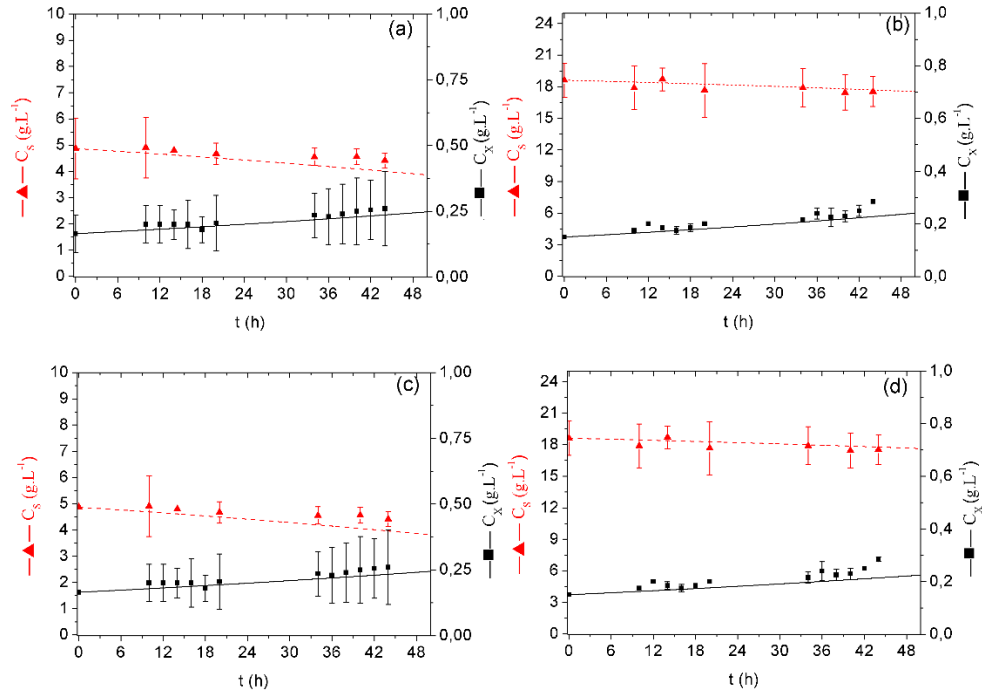
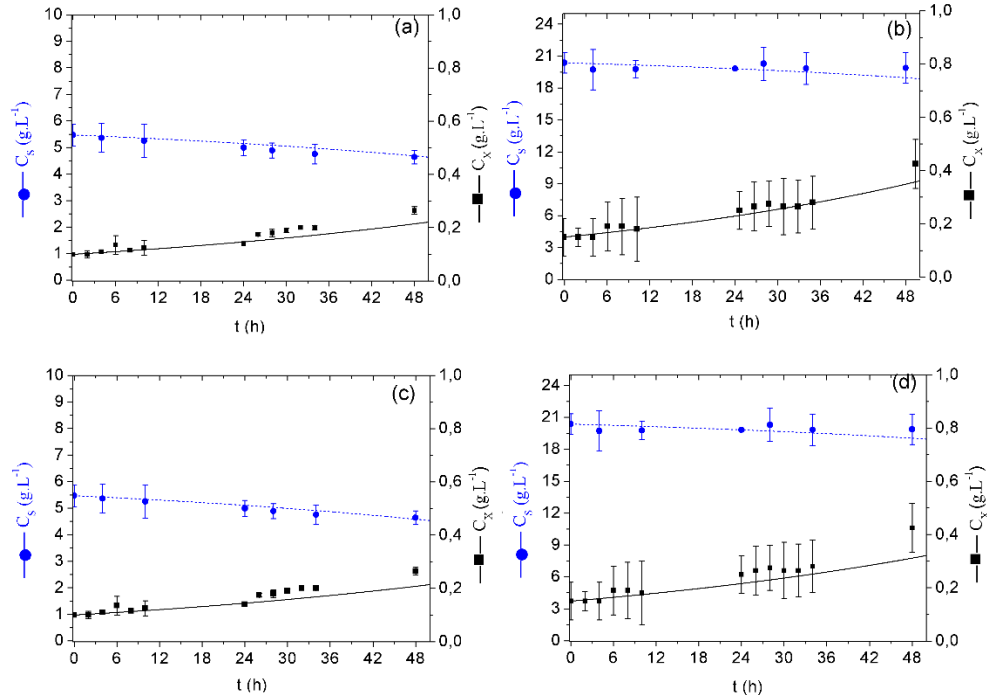


Figura 4.7 – Simulação das curvas de crescimento celular (—) e consumo de substrato para a cepa TB07 (---) em meio contendo glicerol como fonte de carbono utilizando os modelos de Monod (1941) e Andrews (1968) sobre pontos experimentais de concentração de biomassa (■) e consumo de substrato TB07 (●). Crescimento descrito pelo modelo de Monod (1941) à (a) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (b) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pelo modelo de Andrews (1968) à (c) $C_{S,i} = 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e (d) $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.



A decorrência do crescimento e consumo de substrato estagnados são melhores visualizados a partir da análise da Tabela 4.3, onde pode-se visualizar a tendência dos parâmetros ajustados como K_S , K_i e m a terem valores similares aos limites superiores e inferiores impostos durante a execução do programa. Os valores de χ^2 apresentam-se ainda menores dos que os obtidos na Tabela 4.2, indicando que não há diferenciação entre os modelos propostos; neste caso, no entanto, presume-se que o resultado esteja sendo influenciado justamente pela ausência de crescimento e consumo pelas cepas.

O crescimento em meio contendo glicerol como fonte de carbono por cepas de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* é descrito como variável na literatura (BOULTON; QUAIN, 2001; VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011). Klein et al. (2017) aponta que para a *S. cerevisiae* as variações encontradas referentes ao potencial de consumo de glicerol são afetadas mais significativamente pela composição do meio de cultura do que pela variação interespecie, demonstrando que a adição de suplementos como peptona e extrato de levedura beneficiam positivamente o crescimento. O estudo de Swinnen et al. (2013) avaliou a capacidade de crescimento de 52 espécies distintas de levedura em substrato contendo glicerol como fonte de carbono, porém sem a adição de suplementos. Das 52 espécies avaliadas, quatro estão envolvidas na produção de bebidas alcóolicas: Eau de Vie (Wyeast Laboratories), Lalvin V1116 (Lallemand), Thermosacc (Lallemand) e Alcotec 24 (Hambleton Bard). Enquanto que para as cepas Thermosacc e Alcotec 24 não houve crescimento aparente, mais de 60 h foram necessárias para início da multiplicação celular das cepas Eau de Vie e Lalvin V1116. A partir disso, pode-se inferir que um longo período de adaptação (ou *lag*) possa estar envolvido no crescimento em glicerol pelas cepas estudadas e/ou haja a necessidade de adicionar outros suplementos como aminoácidos e vitaminas para estimular o crescimento.

Para superar tais dificuldades encontradas durante o crescimento em glicerol, Ochoa-Estopier et al. (2011) realizaram a pré-adaptação das leveduras ao meio de cultura, apresentando resultados positivos para a produção de *S. cerevisiae* CBS 8066, durante cultivos em batelada contendo 60 g·L⁻¹ de glicerol. Outra estratégia inclui a seleção de células melhoradas durante o crescimento por gerações consecutivas (MERICCO et al., 2011). No entanto, para o caso das cepas estudadas, almeja-se não gerar modificações genéticas no microrganismo em questão. A indústria cervejeira apresenta diversas regras baseadas em tradições antigas como por exemplo a Lei de Pureza alemã (*Reinheitsgebot*) do século XVI (TONGEREN, 2011) e indicadores de proteção geográfica para

determinados produtos (CAFIA, 2015; DEFRA, 2014; DPMA, 2019). De acordo com Karabín et al. (2018), sabe-se até o momento que nenhum pedido de autorização de uso de leveduras cervejeiras geneticamente modificadas ou a aplicação industrial das mesmas foi registrado até 2016.

Enfatiza-se que os valores de concentração utilizados nos experimentos em frascos agitados, tanto para etanol quanto glicerol, foram determinados com base na literatura a partir de trabalhos com cepas similares (SWINNEN *et al.*, 2013; WASUNGU; SIMARD, 1982). Apesar dos valores de concentração inicial dos substratos terem sido reduzidos frente aos valores de inibição encontrados, eles permitiram atingir o objetivo de avaliar o crescimento em etanol e glicerol e estimar os principais parâmetros cinéticos durante os cultivos.

Algumas das vantagens relativas à aplicação do etanol foram citadas na seção 2.1.3.2, mas a partir dos resultados em frascos agitados, foi possível visualizar de forma mais concreta o que essa substituição acarretaria. Annemuller, Manger e Lietz (2018) apontam um valor de concentração de glicose crítico igual a $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o limite do metabolismo oxidativo para a levedura cervejeira durante um cultivo aeróbio. Ou seja, para se obter uma levedura respirando durante toda a cultura de forma a otimizar a produção de biomassa seria necessário um controle preciso da concentração de açúcares no biorreator abaixo de $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, o etanol é metabolizado exclusivamente de forma oxidativa e até $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ – o valor máximo testado durante os experimentos em frascos agitados – não houveram registros de inibições nos cultivos realizados neste trabalho. Outra vantagem do etanol frente a açúcares como fonte de carbono estaria associada ao fato de se obter altas concentrações sem modificar a viscosidade da solução, visto que muitas vezes há a necessidade de concentrar o substrato para alimentá-lo no biorreator. A viscosidade para o extrato de malte e o melaço à 83 °Brix, ambos à 20 °C, é de 9,5 e 50 Pa·s, respectivamente (BÜRKLE GMBH, 2016). Tendo como referência a viscosidade da água que estaria aproximadamente na mesma ordem que a do etanol, obtém-se um valor de 10^{-3} Pa·s (BÜRKLE GMBH, 2016). Assim, uma embalagem de etanol a 92,8% apresenta uma concentração de aproximadamente $732 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ do mesmo. Este fato ainda implica que pouco etanol é necessário para alcançar as concentrações a serem trabalhadas: nos experimentos em frascos agitados, incluindo duplicatas para as duas concentrações distintas e duas cepas trabalhadas, foi utilizado um total de 16 mL de etanol.

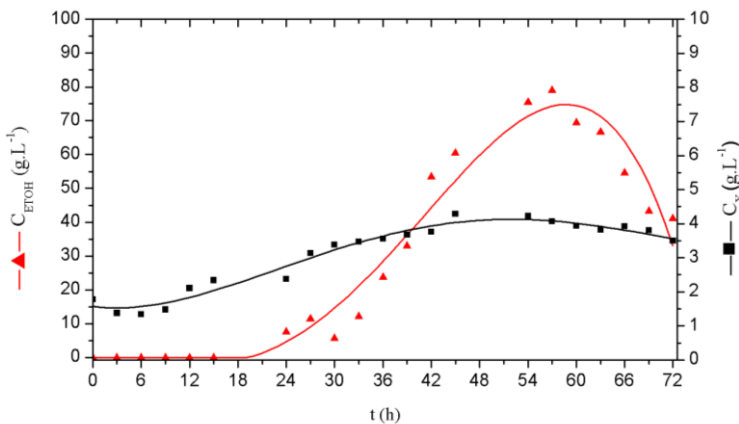
Os resultados em frascos agitados permitiram avaliar o crescimento em etanol e glicerol das cepas trabalhadas e estimar as grandezas cinéticas durante os cultivos. O etanol foi a fonte de carbono

que proporcionou melhor desempenho e foi definida para ser utilizada nos experimentos em biorreator, considerando os resultados dos testes em frascos agitados. Na seção seguinte, objetiva-se a partir desses resultados, simular e identificar a melhor estratégia de cultivo para a cepa TB81.

4.2. EXPERIMENTOS EM BIORREATOR

Durante os ensaios em biorreator, três sistemas de produção distintos tiveram a performance avaliada levando em consideração a produtividade final em células. A Figura 4.8 apresenta os resultados preliminares obtidos para o Sistema I no crescimento da cepa TB81 em etanol.

Figura 4.8 – Concentração de biomassa (■) e etanol (▲) durante o cultivo da cepa TB81 a partir do processo em batelada alimentada por pulsos (Sistema I). Curvas de tendência polinomial para a concentração de biomassa (—) e etanol (—) no biorreator.

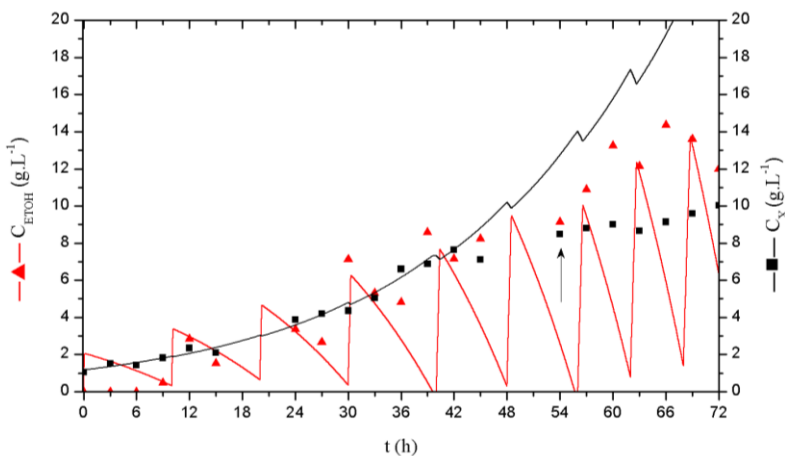


No período de 0 a 24 h as alimentações foram realizadas aproximadamente a cada hora, com vazões variando de 0,02 a 0,05 L·h⁻¹ (Figura 4.8), e observa-se que todo etanol alimentado no período de 14 h foi totalmente consumido. Dessa forma, foi percebido que volumes maiores de etanol poderiam ser alimentados nos períodos iniciais, garantindo que a concentração de substrato não seja um fator limitante para o crescimento celular. A partir das 24 h, quando vazões entre 0,11 a 0,23 L·h⁻¹ são aplicadas, ocorre um aumento gradual da concentração de etanol no biorreator. Quando a concentração do substrato alcança

aproximadamente $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o crescimento celular cessa e inicia-se o decaimento da concentração celular. Esse valor está abaixo do $K_i = 99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ encontrado para a cepa TB81, porem vem de encontro com a faixa de inibição pelo etanol descrita para uma cepa similar a TB81 citada por White (2018) na seção 4.1.

A Figura 4.9 apresenta os dados de um cultivo em batelada alimentada a uma vazão de $F = 0,11 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (Sistema I), cujo planejamento da alimentação teve como base as simulações realizadas a partir do Programa 2 que prevê o crescimento celular e a variação de etanol no meio durante um cultivo em batelada alimentada por pulsos (ver APÊNDICE E).

Figura 4.9 – Concentração de biomassa (■) e etanol (▲) durante o cultivo da cepa TB81 a partir do processo em batelada alimentada por pulsos (Sistema I) após o ajuste das alimentações de acordo com o Programa 2. Ajustes aos dados experimentais de biomassa (—) e etanol (—) a partir do programa para simulação de um cultivo em batelada alimentada por pulsos. A seta indica o início da desaceleração do crescimento celular.



A partir da Figura 4.9 é possível observar que até as 42 h do processo, o crescimento celular foi razoavelmente descrito pelo modelo proposto e seguiu o perfil de uma curva exponencial. No entanto, a partir das 54 h, observou-se uma desaceleração no crescimento até o final do período de cultivo. A concentração final de biomassa foi de $10,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($4,06 \times 10^8 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$) com a produtividade média em biomassa de $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

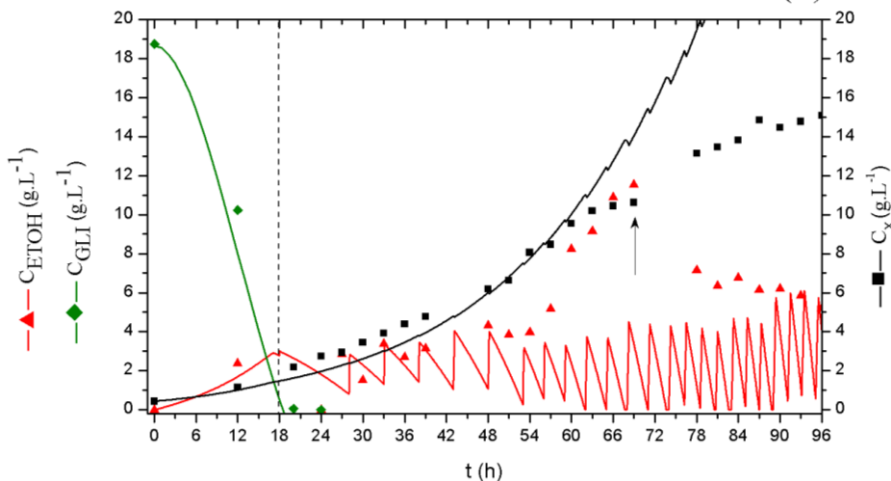
Uma hipótese para a redução da velocidade de crescimento a partir das 54 h seria a formação de acetato. Watteeuw *et al.* (1979) citam o acúmulo de acetato extracelularmente durante cultivos de *Candida utilis* ATCC 26387 cultivadas em etanol como um dos principais fatores envolvidos na redução da produtividade em biomassa. Indicam também que concentrações de etanol superiores a $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para *C. utilis* são suficientes para iniciar o acúmulo de acetato no meio de cultura. Quando as concentrações de etanol caem, o acetato passa a ser assimilado pela célula, porém com taxas de conversão de substrato em biomassa menores. De fato, Smolke (2009) demonstra que em cultivos contínuos de *S. cerevisiae* (cepa não especificada) com velocidade específica de alimentação de $0,10 \text{ h}^{-1}$, a conversão de etanol em biomassa atinge $0,60 \text{ g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}$, enquanto que para o acetato é de $0,30 \text{ g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}$. Dessa forma, presume-se que para otimizar o processo, torna-se necessário prevenir a formação de acetato mantendo as concentrações de etanol reduzidas. Assumindo que os valores que induzam essa formação variem entre espécies diferentes e que a desaceleração do crescimento ocorreu por volta de $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o cultivo representado na Figura 4.6, procurou-se manter as concentrações de etanol abaixo desse valor através do ajuste da alimentação. Outra observação importante é de que o modelo proposto por Watteeuw *et al.* (1979) adiciona um termo relativo a concentração de acetato nos balanços de massa, tanto para contabilizar o crescimento nesse substrato quanto sua formação a partir do etanol. Não foram feitas alterações no Programa 2 para considerar a formação de acetato no meio, apesar de ser um aspecto relevante para melhoramento da descrição do fenômeno.

A Figura 4.10 apresenta os dados do cultivo baseado no Sistema II, com uma fase inicial em batelada e alimentação definida a partir da simulação dos cultivos no Programa 2 de forma a manter a concentração de etanol inferior a $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A figura apresenta-se dividida em duas fases, referentes aos dois modos de produção que caracterizam o Sistema II. Até 18 h não havia alimentação de etanol, de modo que o etanol detectado é decorrente da fermentação da glicose pela levedura. No momento em que se verificou uma concentração baixa o suficiente de glicose (valor estabelecido como $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), iniciou-se a aeração de forma a dar início a fase alimentada subsequente.

A segunda fase do processo inicia com as alimentações. Até 57 h do processo há concordância entre o crescimento proposto pelo modelo e os dados experimentais. A partir desse momento, no entanto, percebe-se um acúmulo mais rápido do etanol no meio de cultura acompanhado de uma desaceleração no crescimento celular. Considerando que a

alimentação de etanol era mantida reduzida de forma a prevenir o acúmulo de acetato ao longo do processo, assumiu-se que algum componente essencial para o crescimento celular poderia estar causando a limitação ao crescimento, provocando o conseqüente acúmulo de etanol no meio de cultura. Assim, às 69 h (posição da seta no gráfico) foi adicionado uma solução de extrato de levedura e durante as horas subseqüentes se observou a queda da concentração de etanol no meio de cultura. A concentração final de biomassa obtida foi de $15,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($5,73\cdot 10^8 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$), atingindo uma produtividade final de $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Este valor de produtividade final indica um aumento de $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 25% a mais do que observado no Sistema I.

Figura 4.10 – Concentração de biomassa (■), etanol (▲) e glicose (◆) durante o cultivo da cepa TB81 durante o cultivo em batelada alimentada por pulsos com uma fase em batelada preliminar (Sistema II). Curvas dos ajustes para biomassa (—), etanol (—) e glicose (—) a partir do programa para simulação de cultivo em batelada alimentada por pulsos. A linha tracejada distingue a etapa em batelada inicial da fase em batelada alimentada. A seta indica o início da desaceleração do crescimento celular.



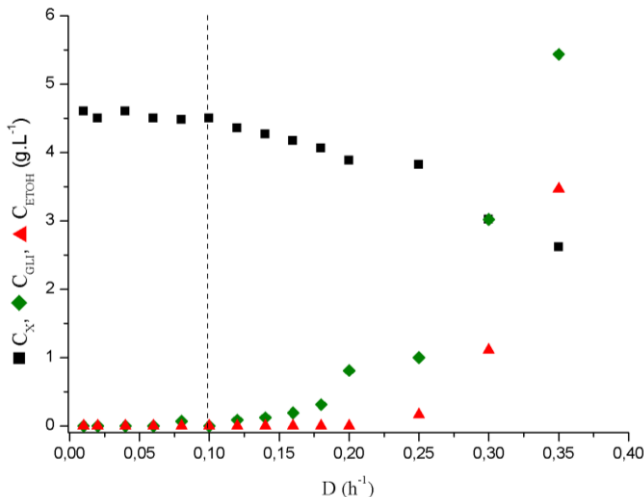
Os nutrientes disponíveis em meios de cultura não são apenas destinados a garantir energia para o crescimento celular, mas operam como sinais para a inicialização de transcrições e rotas metabólicas nos micro-organismos (CONRAD et al., 2014). A adição de nutrientes a base de extrato de leveduras pode cobrir uma gama de necessidades, uma vez que sua composição inclui proteínas (45 – 65 %), minerais (4 – 7 %),

lipídeos (6 -7 %), esteróis (< 1 %), entre outros (TAYLOR; HORT, 2007). Nota-se que uma fração considerável dos estudos revisados ao longo deste trabalho apresentaram a adição de soluções vitamínicas no meio de cultura. Além disso, as necessidades nutricionais podem variar de acordo com o processo de cultivo, visto que a dependendo a via a ser estimulada a célula poderá ser mais autônoma ou não em relação a produção de vitaminas e aminoácidos; a espécie (*S. cerevisiae* ou *S. pastorianus*) e ainda entre as cepas de uma mesma espécie, de acordo com White e Zainasheff (2010). Deduz-se, por conseguinte, que a formulação de um meio de cultura específico para cepas distintas seja um estudo relevante.

É importante frisar que durante os cálculos aplicados ao Programa 2 não foi considerado o volume de amostragem retirado. Este fator contabilizou no desvio abrupto final da curva de biomassa.

De forma geral, os Sistemas I e II operando em batelada alimentada por pulsos resultaram valores não muito diferentes para a produtividade média em biomassa. A Figura 4.11 apresenta os resultados obtidos a partir do Sistema III no cultivo da levedura TB81 a partir do meio de cultura base contendo como fonte de carbono glicose e etanol.

Figura 4.11 – Concentração de biomassa (■), etanol (▲) e glicose (◆) em função da vazão específica de alimentação durante cinco dias do cultivo permanente da cepa TB81 (Sistema III) com alimentação de 500 C-mM de uma mistura de glicose (60%) e etanol (40%). A linha tracejada indica a diluição crítica e os valores de concentração associados.



A partir da Figura 4.11 pode-se observar que aproximadamente até $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$, não há presença de etanol ou glicose no meio de cultura. Essa taxa de diluição seria considerada como crítica, onde valores superiores indicariam uma velocidade específica de alimentação superior a velocidade específica máxima de crescimento celular. A partir de $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$ é possível observar a lavagem da biomassa a partir da redução de sua concentração no biorreator, juntamente do início do acúmulo de glicose, contabilizando cerca de $0,11 \text{ g.L}^{-1}$ no biorreator nesse momento. O acúmulo de etanol é detectado a partir de vazões específicas de alimentação próximas a $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$, quando contabiliza $0,16 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração de glicose se encontra próxima a 1 g.L^{-1} . Operando a $D = 0,09 \text{ h}^{-1}$, uma vazão abaixo da diluição crítica, a produtividade seria cerca de $0,41 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, um aumento de 300% em produtividade comparado aos Sistemas I e II.

Cultivos aeróbios contínuos utilizando glicose como substrato para cepas de *S. cerevisiae* direcionadas a indústria de panificação geralmente diluições críticas similares a $0,25 \text{ h}^{-1}$ (HOEK; DIJKEN; PRONK, 1998; PAALME *et al.*, 1997). Por outro lado, estudos com leveduras relacionadas a produção de vinhos apresentaram valores similares aos obtidos neste trabalho. Serra, Strehaiano e Taillandier (2003), durante o cultivo aeróbio contínuo em glicose de *S. bayanus* var. *uvarum* P3 CBS 395, obtiveram uma diluição crítica de $0,15 \text{ h}^{-1}$ e Petrik, Kappeli e Fiechter (1983), para condições de cultivo similares porém utilizando a *S. uvarum* H2055, obtiveram uma diluição crítica de $0,16 \text{ h}^{-1}$. Fleet (2002) ao descrever a produção industrial de leveduras para vinicultura (incluindo cepas *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. uvarum*) indica que a produtividade em biomassa das mesmas é, de fato, menor do que as obtidas para leveduras de panificação, com velocidades específicas máximas de crescimento próximas a $0,10 - 0,12 \text{ h}^{-1}$ em condições aeróbias usando melaço como substrato.

Como visto na seção 2.1.2, sabe-se que a origem de cepas *S. pastorianus* advém da hibridização das espécies *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Evidências indicam que o DNA mitocondrial (PISKUR *et al.*, 1998) e ribossômico (MONTROCHER *et al.*, 1998) de leveduras *lager* tenham sido derivado da *S. bayanus*, ao invés da *S. cerevisiae*. Tal característica foi também observada por Dunn e Sherlock (2008) em todas as leveduras *lager* (17 ao todo) utilizadas, todas obtidas de locais geográficos distintos. É provável, portanto, que o valor baixo da velocidade específica máxima de crescimento durante condições aeróbias, estejam conectadas a uma limitação na capacidade respiratória da cepa TB81, assim como observado nas cepas de *S. uvarum*.

Boulton e Quain (2001), ao examinarem a bioquímica de fermentações de leveduras cervejeiras, afirma que todas as cepas apresentarão capacidade respiratória limitante, o que viria de encontro aos obstáculos encontrados na produção de cepas que não necessariamente sejam *S. pastorianus* e realçando a importância do desenvolvimento de metodologias de produção distintas para o melhoramento da produtividade final do processo. Ademais, fica evidente a necessidade de, em estudos futuros, agregar informações relacionadas a capacidade respiratória das cepas para obtenção de melhores resultados, seja para uma diferenciação entre as leveduras do ponto de vista de produção industrial ou nas simulações dos modelos matemáticos.

A adição de etanol como suplemento de carbono e energia para cultivo de leveduras é documentada por Berry, Russell e Stewart (1987) como uma prática adotada desde a década de 40, quando na ausência de matérias primas devido a II Guerra Mundial. A adição de etanol nos meios de cultura, porém, ainda é algo atual e em uso. Edupuganti e Lipke (2018) patentearam um método com objetivo de estimular maiores conversões em biomassa do que aquelas obtidas por carboidratos, cujo princípio aborda justamente a adição de etanol durante o início da fase exponencial, de forma a estimular uma regulação ascendente de rotas anabólicas envolvidas no metabolismo desse composto. Uma vez aperfeiçoada a capacidade em consumir o etanol, a célula poderia diminuir o estresse relacionado sua formação, desenvolvendo a habilidade de consumi-lo simultaneamente junto aos carboidratos do meio de cultura quando em condições limitantes de ambos os substratos. Os resultados obtidos indicam que a formulação do meio contendo um carboidrato como base e sendo suplementado como etanol podem gerar resultados positivos, principalmente quando comparados às produtividades obtidas durante o processo batelada alimentada.

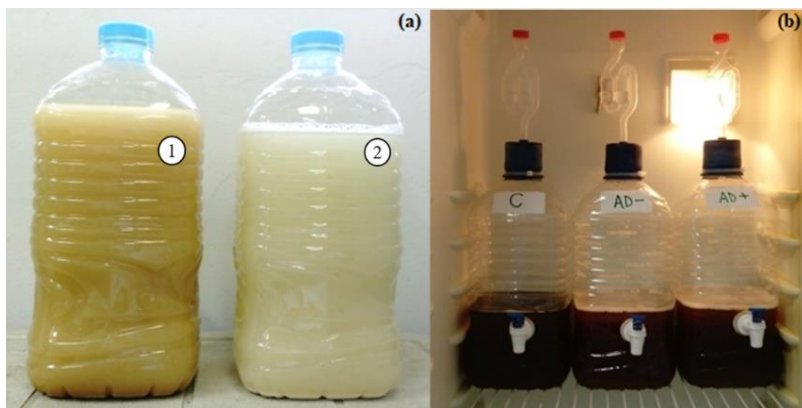
4.3. ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO

A avaliação do desempenho fermentativo de leveduras cervejeiras é comumente realizada a partir de ensaios de atenuação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Em tais ensaios, a capacidade da cepa em questão em fermentar os carboidratos presentes no mosto de malte estará diretamente relacionada a diminuição na densidade relativa do mosto, visto que o etanol apresenta uma densidade relativa consideravelmente menor que àquela de soluções contendo carboidratos (BAMFORTH, 2006). O monitoramento de uma fermentação de cerveja é normalmente acompanhado pelo decaimento dos sólidos solúveis totais (SST, em

°Brix) da solução. Outros parâmetros variáveis como pH, número de células e concentração de etanol no meio, por exemplo, também podem ser avaliados de forma a fornecerem informações adicionais sobre as alterações envolvidas no processo. Durante os ensaios de avaliação do desempenho das leveduras produzidas neste trabalho, os sólidos solúveis e pH foram escolhidos para avaliação por serem parâmetros de rápida medição e permitirem uma análise coerente dos eventos metabólicos presentes.

O desempenho das leveduras propagadas (cepa TB81) em substrato contendo etanol puro e a mistura de etanol e glicose foi avaliado a partir de ensaios fermentativos em mosto de malte (Figura 4.12).

Figura 4.12 – Estudos de fermentação das leveduras em extrato de malte. (a): leveduras submetidas a uma etapa prévia de adaptação em extrato de malte (AD+) ①, e leveduras não submetidas a adaptação (AD-) ②. (b) leveduras AD+ e AD- sendo testadas quanto ao desempenho fermentativo em comparação com levedura controle (C). A cor mais escura em ① ocorre devido a adição do extrato de malte no estágio de adaptação.

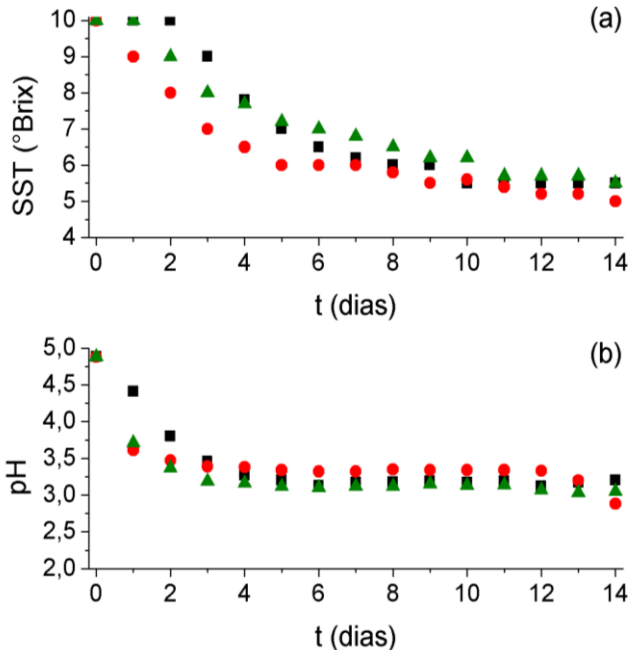


Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A adição de uma fase de adaptação surge da necessidade em preparar as células fisiologicamente para a fermentação dos carboidratos presentes no mosto de malte. O processo de propagação aeróbio permite o alto rendimento em células durante os cultivos em biorreator, onde o principal objetivo é a formação de biomassa celular. No entanto, ao saírem dos biorreatores e serem deslocadas aos fermentadores industriais para a produção de cerveja, sua função muda e com isso seu metabolismo requer uma nova estratégia para consumir o substrato.

A Figura 4.13 mostra a evolução dos sólidos solúveis totais e pH durante a fermentação por leveduras produzidas a partir de etanol puro.

Figura 4.13 – Concentração de sólidos solúveis totais (SST) e pH durante a fermentação de mosto de malte pela cepa TB81 controle (■) e advindas do cultivo em batelada alimentada utilizando apenas etanol como substrato (Sistema II) com a adição de uma etapa de adaptação (▲) e sem etapa de adaptação (●).



A partir da Figura 4.13(a) pode-se perceber que há um período de estagnação nos sólidos solúveis totais observados no controle e em leveduras AD+ durante os dois primeiros dias de fermentação. De acordo com Fix (1999), o processo de fermentação por leveduras pode ser separado em duas fases distintas: um período inicial caracterizado por uma fase de preparação – ou fase *lag* – e o segundo caracterizado pela via de Embden-Meyerhof, até a formação final de etanol. Durante a fase inicial, as leveduras estariam se preparando para a segunda fase do processo, o que envolve principalmente modificações na parede celular, cuja permeabilidade apresentará uma importância intrínseca na utilização das fontes de nitrogênio e carboidratos presentes no mosto. Oxigênio também é essencial durante essa etapa, pois permite a síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados, componentes essenciais das membranas.

Tanto as fases de adaptação como de consumo dos açúcares do mosto são perceptíveis na Figura 4.13a). A fase de adaptação varia entre os experimentos, perdurando por até dois dias para as leveduras do controle. Passado o período de adaptação há uma queda contínua até o 11º dia de fermentação. A partir desse ponto, há pouca variação nos sólidos solúveis totais do meio, terminando em um valor próximo a 5.

É interessante analisar os acontecimentos que possam estar envolvidos no atraso das fermentações da Figura 4.13(a), visto que a temperatura, aeração, número de células inoculadas, mosto utilizado e data de produção das células foram similares para os experimentos.

Os diferentes substratos utilizados no processo anterior a fermentação da bebida alcoólica poderiam ser uma justificativa para o atraso observado. No entanto, Holzer e Lenz (1980) demonstraram que as leveduras se adaptam muito rapidamente em fontes de carbono que apresentam maior afinidade. Foram necessários apenas 3 min para que a atividade da frutose-1,6-bifosfatase (responsável pela hidrólise inversa da frutose 1,6-bifosfato em frutose 6-fosfato) fosse reduzida a 50% com a adição de glicose em um meio contendo leveduras que cresceram em um substrato não fermentescível.

Sabe-se que o processo em batelada alimentada foi adotado na produção das leveduras AD+, AD- e C. Neste modo de operação, é possível que determinados produtos acumulem a níveis indesejáveis durante a alimentação dos pulsos. O etanol é o exemplo mais recorrente deste cenário. Como observado na seção 4.1, concentrações próximas a $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ são necessárias para inibirem o crescimento da cepa TB81.

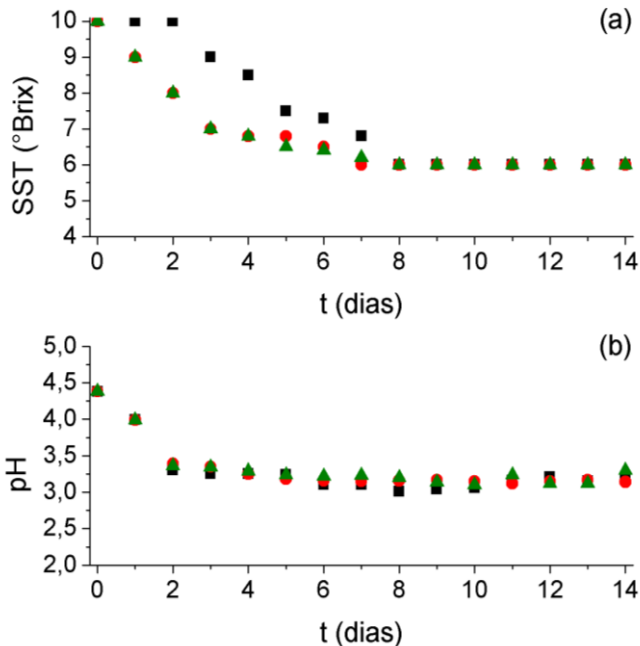
Durante as fases iniciais de fermentação, o pH diminui rapidamente nos primeiros três dias, como constatado na Figura 4.11b, atingindo um valor próximo a 3,3. A partir desse ponto, observam-se baixas oscilações do pH, variando em torno da faixa de 3,5 a 3,0 até o final do processo.

Alguns dos fatores envolvidos na queda do pH durante a fermentação são o consumo de íons de amônio para síntese de proteínas e a presença de ácidos orgânicos e prótons excretados pelas leveduras (FERREIRA; GUIDO, 2018; FIX, 1999). Essa queda nas fases iniciais da fermentação é, portanto, um indicativo direto da atividade celular, principalmente quando não se visualiza o decaimento dos sólidos solúveis totais nos dias iniciais do processo.

Nos três experimentos realizados, o mesmo perfil de variação de pH é constatado, porém destaca-se que as leveduras AD- apresentam valores ligeiramente elevados quando comparados às leveduras do controle e AD+.

Os perfis obtidos para as leveduras produzidas com a mistura de etanol e glicose como substrato podem ser observados na Figura 4.14.

Figura 4.14 – Concentração de sólidos solúveis totais (SST) e pH durante a fermentação de mosto de malte pela cepa TB81 controle (■) e advindas do cultivo contínuo em substrato contendo a mistura de glicose (60%) e etanol (40%) (Sistema III) com (▲) e sem etapa de adaptação (●)



Na Figura 4.14(a) nota-se novamente um período *lag* presente no controle. Porém, tanto para as leveduras AD+ quanto AD-, esse período *lag* foi suprimido. Os perfis apresentam decaimento até o 8º dia de fermentação, onde ambos os experimentos estabilizaram em 6 °Brix.

Durante o processo contínuo, as células são caracterizadas por apresentarem um estado fisiológico constante. A adição da etapa de adaptação não interferiu na similaridade das curvas para as leveduras AD- e AD+.

O pH, como visualizado na Figura 4.14(b), apresentou uma queda similar a visualizada na Figura 4.13(b), porém com menores oscilações. Apesar do pH inicial ter sido menor frente ao do ensaio anterior, os

valores finais alcançados ficaram próximos daqueles descritos na Figura 4.13(b).

A partir desses dados, verifica-se que não há uma diferenciação significativa entre leveduras AD+ e AD-, não havendo a necessidade de realizar o passo de adaptação final.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de leveduras é um processo complexo. Altas velocidades de crescimento são obtidas em vias fermentativas que são mais simples e rápidas. Essas vias proporcionam baixos rendimentos energéticos impactando negativamente no rendimento celular. O baixo rendimento celular impacta nos custos de produção, além de que o estresse pelo álcool produzido pode afetar o desempenho das leveduras no processo de produção de cervejas. Pode-se aumentar em muitas vezes o rendimento do substrato em células através do metabolismo respiratório, mas em leveduras as vias respiratórias são reprimidas pelos açúcares a partir de concentrações baixas (próximas a $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), além das velocidades de crescimento serem muito mais baixas (menores que $0,1 \text{ h}^{-1}$) devido à complexidade das vias respiratórias.

O processo de cultivo em batelada alimentada permite limitar a concentração dos açúcares e liberar as vias respiratórias das leveduras. Mas, infelizmente, os níveis dos açúcares a controlar são muito baixos e de difícil implementação tecnológica, principalmente em pequenas empresas. Nesse contexto, a utilização de substratos exclusivamente metabolizados de forma aeróbia surge como uma alternativa interessante. Entretanto, tais substratos além de serem opções menos diversas em comparação aos substratos fermentáveis, implicam em vários estudos para viabilizar sua aplicação. Neste trabalho estudou-se o glicerol e o etanol, dois subprodutos relativamente baratos, e produzidos também pelas próprias leveduras. Neste estudo apenas o etanol revelou-se apropriado para as cepas testadas. Assim, velocidades específicas de crescimento, concentrações máximas de etanol no meio, habilidade fermentativa em mosto (posterior ao crescimento em etanol), entre outras, são qualidades que precisam ser avaliadas.

Os resultados deste estudo indicam que o etanol é um substrato extremamente interessante. Por ser de natureza química mais reduzida que a glicose, pode fornecer um rendimento maior em células e sua implementação num processo é mais factível para uma pequena empresa que o complexo processo de controle da glicose. Adicionalmente pode-se conseguir velocidades de crescimento em etanol equivalentes ou até superiores que em glicose em aerobiose, e rendimentos obviamente maiores que em anaerobiose. Isso pode ser alcançado utilizando certas misturas de etanol e glicose, que em parte é explicado pelo fato de que compostos celulares com mais de dois carbonos (como é o caso da maioria dos aminoácidos) são sintetizados preferencialmente a partir de

glicose. A presença de glicose na mistura pode evitar ciclos como a neoglicogênese e até possível ciclo fútil. Mas o mais interessante no aspecto tecnológico, é que toda perda de produtividade decorrente das menores velocidades específicas em vias aeróbias pode ser suplantada pela implantação de um sistema de cultivo contínuo. Nesse sentido, a dificuldade maior na implementação dessa estratégia volta-se para a manutenção da pureza das culturas e, nesse quesito, o etanol torna-se um substrato extremamente vantajoso. O etanol não contamina, não precisa de esterilização e a alimentação e suas manobras no processo são muito seguras quanto ao problema de contaminação. Para laurear ainda mais as vantagens do etanol, as leveduras produzidas com essa fonte de carbono e em condições aeróbias mantém ou até melhoram seu desempenho fermentativo em mosto cervejeiro.

A partir do cultivo contínuo, foi possível alavancar a produtividade final do processo em 300% comparado aos Sistemas I e II. Estudos futuros devem, além de considerar as particularidades das diferentes cepas cervejeiras, explorar a manutenção do cultivo contínuo visando o estabelecimento do estado estacionário, o que poderá entre muitas vantagens, permitir a produção de leveduras fisiologicamente padronizadas. Um produto padronizado (leveduras cervejeiras) seria altamente apreciado como ferramenta para a padronização das cervejas, principalmente as denominadas especiais.

6 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar as exigências nutricionais de cada cepa de levedura para melhorar a produtividade do processo, independentemente da fonte de carbono.
- Estudar o período no qual o processo contínuo possa ser aplicado e estudá-lo com maiores concentrações celulares.
- Fazer uma avaliação sensorial das cervejas produzidas com leveduras propagadas pelos diferentes sistemas de produção.
- Os programas gerados foram ferramentas essenciais para estimação e simulação dos processos. A melhoria do seu desempenho poderá ser realizada a partir da adição de termos que não só permitam a diferenciação entre diversas cepas trabalhadas, mas também venham a considerar variáveis importantes na produção, como por exemplo a transferência de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- AGGELOPOULOS, T.; KATSIERIS, K.; BEKATOROU, A.; PANDEY, A.; BANAT, IM.; KOUTINAS, A.A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chemistry**, v. 145, p. 710–716, 2014.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, 1 nov. 1968.
- ANNEMÜLLER, G.; MANGER, H. J.; LIETZ, P. **The Yeast in the Brewery**. 2.ed. Berlin: VLB Berlin, 2018.
- BAMFORTH, C. W. **Scientific principles of malting and brewing**. 1.ed. St Paul: American Society of Brewing Chemists, 2006.
- BARFORD, J. P. The technology of aerobic yeast growth. In: BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. **Yeast biotechnology**. 1.ed. Winchester: Allen & Unwin, 1987. p. 200–230.
- BARTH-HASS. **The Barth Report. HOPS 2016/2017**. Germain Hansmaennel. 2016. Disponível em: <<http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/412/barthbericht20162017en.pdf>>. Acesso em: 19/08/2017.
- BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. **Yeast biotechnology**. Winchester: Allen & Unwin, 1987.
- BIO4. **Entenda como a Bio4 produz o fermento SuperYeast**. 2017. Disponível em: <<http://novo.bio4.com.br/entenda-como-a-bio4-produz-o-fermento-superyeast/>>. Acesso em: 2018.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. 1.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A cerveja no Brasil: o ministério da agricultura informando e esclarecendo**. Brasília, DF, 2017.
- CERVBRASIL (São Paulo) (Org.). **CervBrasil: Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. 2018. Disponível em: <<http://www.cervbrasil.org.br>>. Acesso em: 2018.
- CONRAD, M.; SCHOTHORST, J.; KANKIPATI, H.N.; VAN ZEEBROECK, G.; RUBIO-TEXEIRA, M.; THEVELEIN, J.M. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 2, p. 254–299, 2014.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The Cell: A Molecular Approach**. 4.ed. Washington: ASM Press, 2007.
- COSTA NETO, P. L. DE O. **Estatística**. 2.ed. São Paulo: Edgar Blücher

LTDA, 2002.

- DARAN-LAPUJADE, P.; JANSEN, M.L.; DARAN, J.M.; VAN GULIK, W.; WINDE, J.H.; PRONK, J.T. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9125–38, 2004.
- DIAZ-RUIZ, R.; RIGOLET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 568–576, 2011.
- DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. 2. ed. UK: Academic Press, 2012.
- DUNN, B.; SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **Genome research**, v. 18, n. 10, p. 1610–23, 2008.
- EGLI, T.; LENDENMANN, U.; SNOZZI, M. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 3–4, p. 289–298, 1993.
- ERNANDES, J. R.; WILLIAMS, J.W.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Effect of yeast adaptation to maltose utilization during the fermentation of brewer's wort. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, n. 1, p. 67–71, 1993.
- FERREIRA, I. M.; GUIDO, L.F. Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 23, 28 mar. 2018.
- FIECHTER, A. **Bioprocess Parameter Control**. 1.ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1984.
- FIX, G. J. **Principles of brewing science: A study of serious brewing issues**. 2.ed. Boulder: Brewers Publications, 1999.
- FLEET, G. H.; GRAHAM, H. **Wine microbiology and biotechnology**. 1.ed. New York: CRC Press, 2002.
- GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. Economics of the Craft Beer Revolution: A Comparative International Perspective. **Economic Perspectives on Craft Beer**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 3–51.
- GÓMEZ-PASTOR, R.; PÉREZ-TORRADO, R.; GARRE, E.; MATA LLANA, E. Recent Advances in Yeast Biomass Production. In: MATOVIC, D. **Biomass: Detection, production and usage**, p. 201–222, 2011.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. 1.ed. New York: CRC Press, 1991.
- HAMMOND, J. R. M. Yeast genetics. In: PRIEST, F.; CAMPBELL, I.

- Brewing Microbiology**. 3.ed. Boston: Springer US, 2003. p. 67–112.
- HARDER, W.; DIJKHUIZEN, L.; POSTGATE, J. R. Strategies of Mixed Substrate Utilization in Microorganisms [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 297, n. 1088, p. 459–480, 1982.
- HELENA DA CRUZ, S.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J. R. Effect of Sugar Catabolite Repression in Correlation with the Structural Complexity of the Nitrogen Source on Yeast Growth and Fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 4, p. 349–355, 2003.
- HOEK, P. I. M. V. A N.; DIJKEN, J. P. V. A N.; PRONK, J. T. Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4226–4233, 1998.
- JONG-GUBBELS, P. D. E.; VANROLLEGHEM, P.; HEIJNEN, S.; DIJKEN, J.P.V.; PRONK, J.T. Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol. **Yeast**, v. 11, p. 407–418, 1995.
- JUNIOR, A. F. **Estudos do processo de obtenção de proteínas celulares a partir de gás natural**. 1995. 155 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.
- KAMZOLOVA, S. V.; ALINA, R.; DEDYUKHINA, E.G.; ANASTASSIADIS, S.G.; GOLOVCHENKO, N.P.; MORGUNOV, I.G. Citric acid production by yeast grown on glycerol-containing waste from biodiesel industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 65–66, 2011.
- KARABÍN, M.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P. Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 691706, 2018.
- KIM, S. R.; HA, S.J.; WEI, N.; OH, E.J.; JIN, Y.S. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 274–282, 2012.
- KLEIN, M.; SWINNEN, S.; THEVELEIN, J.M.; NEVOIGT, E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.
- KOWALCZYK, S.; KOMON-JANCZARA, E.; GLIBOWSKA, A.; KUZDRALINSKI.; CZERNECKI, T.; TARGONSKI, Z. A co-utilization strategy to consume glycerol and monosaccharides by

- Rhizopus* strains for fumaric acid production. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 69, 2018.
- KRUCKEBERG, A. L.; DICKINSON, J. R. Carbon metabolism. In: DICKINSON, J. R.; SCHWEIZER, M. **Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae***. New York: CRC Press, 2004. p. 58–119.
- KULP, K.; LORENZ, K. J. **Handbook of dough fermentations**. 1.ed. New York: CRC Press. 2003.
- LALLEMAND. **Catálogo de produtos**. 2018. Disponível em: <http://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/lallemand_catalog_portuguese.pdf>. Acesso em: 2018
- LENDENMANN, U.; SNOZZI, M.; EGLI, T. Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1493–9, 1996.
- LENZ, A.G.; HOLZER, H. Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. **FEBS Letters**, v. 109, n. 2, p. 271–274, 14 jan. 1980.
- LIPKE, P.; EDUPUGANTI, U. **Process for increased yeast biomass**. US Pat. 20180119090A1 mar. 2018.
- LITI, G. **The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae***. *eLife*, v. 4, 2015.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.G.; ZHANG, R.B.; ZHANG, F.; ZHU, J. Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium acidipropionici*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 152–158, 11 jan. 2011.
- MARTÍNEZ, K.; ANDA, R.; HERNÁNDEZ, G.; ESCALANTE, A.; GOSSET, G.; RAMÍREZ, O.T.; BOLÍVAR, F.G. Co-utilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 1, 2008.
- MIKOLA, M.; SETO, J.; AMANULLAH, A. Evaluation of a novel Wave Bioreactor® cellbag for aerobic yeast cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 4, p. 231–241, 2007.
- MONOD, J. **Recherches sur la croissance des cultures bactériennes**. 1941. 210 f. Hermann. Paris, 1941.
- MONTROCHER, R.; VERNER, M.C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.

- 48, n. 1, p. 295–303, 1998.
- OCHOA-ESTOPIER, A.; LESAGE, J.; GORRET, N.; GUILLOUET, S.E. Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1521–1527, 2011.
- PAALME, T.; ELKEN, R.; VILU, R.; KORHOLA, M. Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 174–181, 1997.
- PEITER, G. C. *et al.* Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p. 519–537, 2016.
- PETRIK, M.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. An Expanded Concept for the Glucose Effect in the Yeast *Saccharomyces uvarum*: Involvement of Short- and Long-term Regulation. **Microbiology**, v. 129, n. 1983, p. 43–49, 1983.
- PETRIK, S. *et al.* Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1537–1551, 2013.
- PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 1, n. 17, 1–17, 2014.
- PIRT, S. J. The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 163, n. 991, p. 224–231, 1965.
- PISKUR, J.; SMOLE, S.; GROTH, C.; PETERSEN, R.F.; PEDERSEN, M.B. Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. **International journal of systematic bacteriology**, v. 48, n. 3, p. 1015–24, 1998.
- POWELL, C. D.; DIACETIS, A. N. Long Term Serial Repitching and the Genetic and Phenotypic Stability of Brewer's Yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 1, p. 67–74, 1 2007.
- PRAHALAD, C. K.; RAMASWAMY, V. Co-creating unique value with customers. **Strategy & Leadership**, v. 32, n. 3, p. 4–9, 2004.
- PRATT, C. W.; CORNELLY, K. **Essential Biochemistry**. 3.ed. Hoboken: Wiley, 2017.
- PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. **Brewing microbiology**. 2.ed. Londres: Chapman & Hall, 1996.
- QIN, L.; LIU, L.; ZENG, A.P.; WEI, D. From low-cost substrates to

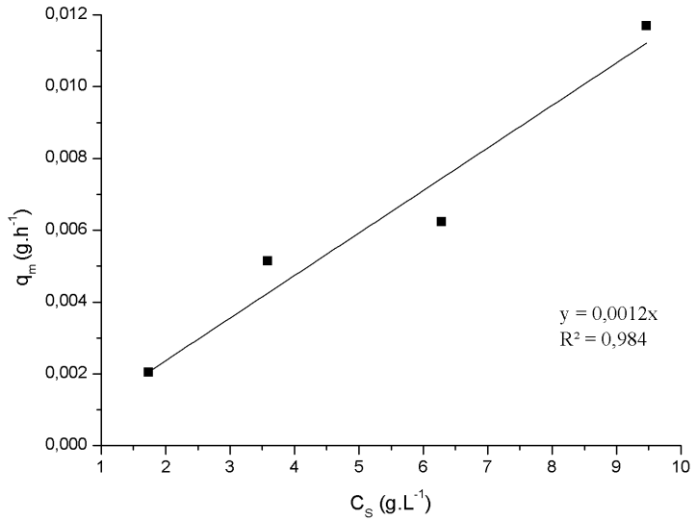
- Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1507–1519, 2017.
- RAI, B. **Essentials of Industrial Microbiology**. 4.ed. Morrisville: Lulu, 2012.
- REUSS, M. Stirred Tank Bioreactors. In: ASENJO, J.C.; MERCHUK, J.C. **Bioreactor System Design**. 1.ed. New York: CRC Press, 1994. p. 207–256.
- RITALA, A.; HAKKINEN, S.T.; TOIVARI, M.; WIEBE, M.G. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 3–18, 2017.
- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, p. 101–121, 2006.
- ROGERSON, C. T.; WEBSTER, J. **Introduction to Fungi**. 3.ed. New York: Cambridge University Press, 2007. v. 33.
- SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGÉ, T.T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210–218, 2011.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. v. 2. 1.ed. São Paulo: Edgar Blücher LTDA, 2001.
- SCHUGERL, K.; LUBBERT, A. Pneumatically agitated bioreactors. In: ASENJO, J.C.; MERCHUK, J.C. **Bioreactor System Design**. 1.ed. New York: CRC Press, 1994. p. 257–304.
- SERRA, A.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Characterization of the metabolic shift of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* by continuous aerobic culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5–6, p. 564–568, 2003.
- SIMEONIDIS, E.; MURABITO, E.; SMALLBONE, K.; WESTERHOFF, H.V. Why does yeast ferment? A flux balance analysis study. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 5, p. 1225–1229, 2010.
- SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **Cytotechnology**, v. 30, n. 1–3, p. 149–58, jul. 1999.
- SMOLKE, C. D. **The metabolic pathway engineering handbook: Fundamentals**. 1.ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2009.
- SONG, X.; LI, Y.; CAI, M.; LIU, Q.; GAO, K.; ZHANG, X.; BAI, Y.; XU, H.; QIAO, M. Metabolic engineering strategies for

- improvement of ethanol production in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 8, 1 dez. 2018.
- STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A.. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13–24, jan. 2010.
- SWINNEN, S.; KLEIN, M.; CARRILLO, M.; MCINNES, J.; NGUYEN, H.T.T.; NEVOIGT, E. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 157, 2013.
- TABAH, B.; VARVAK, A.; PULIDINDI, I.N.; FORAN, E.; BANIN, E.; GEDANKEN, A. Production of 1,3-propanediol from glycerol via fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Green Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 4657–4666, 2016.
- TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 488–495, 2012.
- TAYLOR, A. J.; ANDREW J.; HORT, J. **Modifying flavour in food**. 1.ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007.
- UGALDE, U. O.; CASTRILLO, J. I. Single cell proteins from fungi and yeasts. **Applied Mycology and Biotechnology**, v. 2, p. 123–149, 1 jan. 2002.
- VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces Meyen ex Reess (1870)*. In: KURTZMAN, C.P.; BOEKOUT, T.; FELL, J.W. **The Yeasts**. 5.ed. Elsevier B.V., 2011. cap. 61, p. 733-746.
- VERDUYN, C.; STOUTHAMER, A.H.; SCHEFFERS, A.; DIJKEN, J.P.V. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 59, n. 1, p. 49–63, 1991.
- VIDGREN, V. **Maltose and maltotriose transport into ale and lager brewer's yeast strains**. 2010. 1-158 f. 2010.
- WASUNGU, K. M.; SIMARD, R. E. Growth characteristics of bakers' yeast in ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 5, p. 1125–1134, 1982.
- WATTEEUW, C. M.; ARMIGER, W.B.; RISTROPH, D.L.; HUMPHREY, A.E. Production of single cell protein from ethanol by fed-batch process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, n. 7, p. 1221–1237, 1979.
- WHITE, C. **Method of Propagating and Delivering Yeast**. US Pat. 8802421B2, 12 ago. 2014.

- WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. 1ª edição ed. Colorado: Brewers Publications, 2010.
- WHITE LABS. **White Labs product catalog**. 2018. Disponível em: <https://www.whitelabs.com/sites/default/files/White%20Labs%20Digital%20Catalog%202018_0.pdf>. Acesso em: 2018.
- WHITE LABS. **How we make yeast**. Disponível em: <<https://www.whitelabs.com/howwemakeyeast>>. Acesso em: 2018.
- WILLS, C. Regulation of Sugar and Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 245–280, 26 jan. 1990.
- WU, Y. C.; HAO, O.J.; OU, K.C.; SCHOLZE, R.J. Treatment of leachate from a solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 3, p. 257–266, 20 fev. 1988.
- YAMANE, T. Bioreactor Operation Modes. ASENJO, J.A.; MERCHUK, J.C. In: **Bioreactor System Design**. 1.ed. New York: CRC Press, 1994. p. 479–510.
- YEAST PATHWAYS. *Saccharomyces cerevisiae* **Class: Degradation/Utilization/Assimilation**. Disponível em: <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?object=Degradation>. Acesso em: 2018.

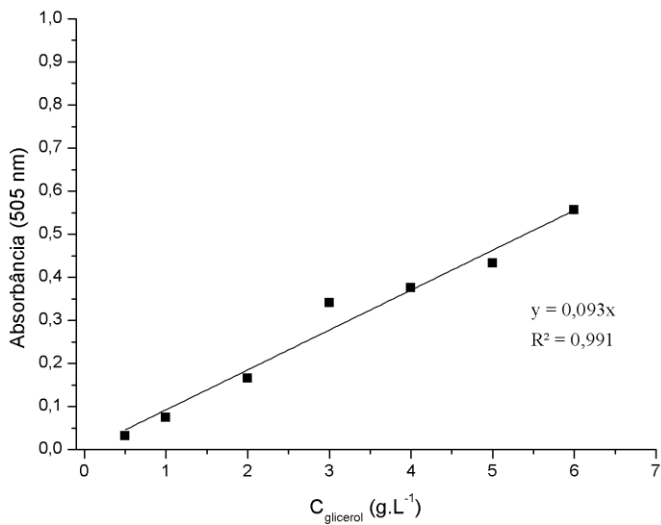
APÊNDICE A – DETERMINAÇÃO DA EVAPORAÇÃO DO ETANOL NO MEIO DE CULTURA

Figura A.1 – Curva padrão para determinação da evaporação do etanol de acordo com sua concentração no meio de cultura.



APÊNDICE B – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL

Figura B.1 – Curva padrão para determinação da concentração de glicerol.



APÊNDICE C – PRODUÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

C.1. MOSTURA

Para produção do malte cervejeiro, utilizou-se como base uma receita de *amber lager*, escolhida de acordo com a levedura que iria fermentar o mosto (TB81). Três maltes distintos foram utilizados na produção do mosto cervejeiro em questão. Suas principais características e quantidades utilizadas são descritas na Tabela C.1.

Tabela C.1 – Quantidades e características dos maltes utilizados durante a produção do mosto cervejeiro.

Malte	EBC*	Massa utilizada (kg)
Pilsen Agrária	4	12
Crystal Crisp	170	1
Carared	50	0,5

*EBC: *European Brewing Convention*, referente a escala de cor do malte.

Ao malte foi adicionado 50 litros de água pré-aquecida a 40 °C, na panela de mostura. A concentração de sal para correção do pH (em g·L⁻¹) foi realizada a partir da Equação (C.1).

$$C_{\text{sal}} = \frac{(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}) \times PM_{\text{sal}}}{PM_{\text{ion}} \times 1000} \quad (\text{C.1})$$

Onde:

C_{final} : concentração final de sal em mg·L⁻¹

C_{inicial} : concentração inicial de sal em mg·L⁻¹

PM_{sal} : peso molar do sal em g·mol⁻¹

PM_{ion} : peso molar do íon em g·mol⁻¹

A Tabela C.2 aponta as quantidades de sais adicionados durante para correção do pH (pH final 5,60). Após a correção, a mistura foi submetida a aumento de temperatura de um grau por minuto até atingir 65 °C e assim conduzida a mosturação por infusão do tipo *single mash* por 60 minutos, prosseguindo-se ao *mash-out* durante 5 minutos, a uma temperatura de 76 °C.

Tabela C.2 – Valores de sais adicionados para ajuste da água de mosturação.

Sal	Massa (g)
CaCl ₂ .2H ₂ O	24
CaSO ₄ .2H ₂ O	8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05

C.2. CLARIFICAÇÃO

O mosto foi clarificado por meio da recirculação do líquido, utilizando o bagaço do malte como meio filtrante, até obtenção da aparência límpida. Após este passo, procedeu-se com a lavagem do bagaço. Aproximadamente 50 L de mosto foram obtidos nesta etapa.

C.3. FERVURA

O mosto clarificado foi aquecido gradualmente em fogareiro até a ebulição, que foi mantida por uma hora. A quantidade de iso- α -ácidos na cerveja (em mg·L⁻¹) é obtida a partir da Equação (C.2).

$$\text{iso-}\alpha_{\text{cerveja}} = \frac{\text{Dosagem}_{\text{lúpulo}} \times \text{Taxa de Conversão} \times \alpha_{\text{lúpulo}} \times 100}{V_{\text{mosto}}} \quad (\text{C.2})$$

Onde:

Dosagem_{lúpulo}: dosagem de lúpulo adicionado em kg

Taxa de conversão: taxa de conversão do lúpulo adicionado em %

$\alpha_{\text{lúpulo}}$: quantidade de α -ácidos presentes no lúpulo em %

V_{mosto} : Volume do mosto em L

A primeira adição de lúpulo (Hallertau) ocorreu aos 15 minutos da fervura e a segunda (Cascade) aos 45 minutos (Tabela C.3). A dosagem final de iso- α -ácidos foi de 20 mg·L⁻¹. Ao final da fervura, realizou-se o *whirlpool* e adição de clarificante (Whirfloc T, marca Ponto do Malte).

Tabela C.3 – Teor de α – ácidos.

Lúpulo	Alfa ácidos (%)	Tempo de fervura (min)	Conversão (%)
Cascade	6,50	45	27,50
Hallertau (Mittelfruet)	3,90	15	5,20

C.4. TRATAMENTO DO MOSTO

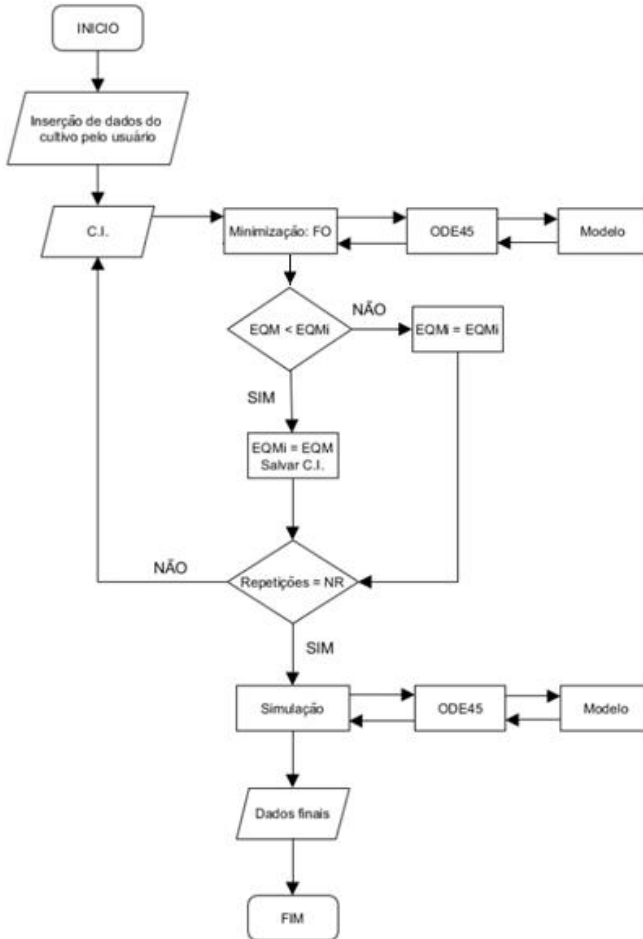
O mosto foi resfriado até aproximadamente 15 °C mediante aplicação de trocador de calor. O mosto final apresentou 15 °Brix e pH 5,14. O mesmo foi armazenado em congelador a -6 °C.

APÊNDICE D – PROGRAMA PARA ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E SIMULAÇÃO DE CULTIVOS EM BATELADA

D.1. VISÃO GERAL

A fim de estimar os parâmetros cinéticos e simular as cinéticas de crescimento celular e consumo de substratos a partir dos dados experimentais, foi desenvolvido um programa computacional escrito no software *Matlab*. O programa, de forma geral, apresenta duas fases distintas: a estimação de parâmetros (K_i , K_s , m_s , $Y_{X/S}$) e a simulação final das curvas de crescimento e consumo de substrato. Durante a primeira fase, a estimação é realizada a partir da minimização da Função Objetivo (FO), o qual determina o erro quadrático médio (EQM) entre os valores experimentais e os gerados pelo modelo. O algoritmo envolvido na minimização utiliza programação sequencial quadrática (SQP) na busca de um valor mínimo para uma função não-linear multivariável a partir de estimativas iniciais. Uma vez determinado o mínimo, a simulação do modelo com os parâmetros estimados é realizada e comparada junto aos dados experimentais durante a exibição de gráficos finais. A Figura D.1 mostra um fluxograma simplificado da rotina aplicada ao programa.

Figura D.1 – Fluxograma da rotina aplicada ao Programa 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

D.2. ESTRUTURA E EXECUÇÃO

Assim como proposto por JUNIOR (1995) durante o estudo de produção de SCP a partir de gás natural, a integração do conjunto das variáveis dinâmicas é realizada para os diversos conjuntos de

experimentos fornecidos pelo usuário. Os dados obtidos nos experimentos são inicialmente inseridos pelo usuário através de uma planilha do *Excel* elaborada de acordo com a Figura D.2.

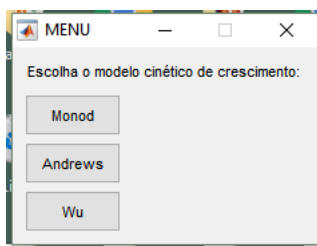
Figura D.2 – Exemplo de formatação da planilha a ser inserida pelo usuário com dados do cultivo na rotina computacional

J	A	B	C	D	E	F	G
1	umax	Cx(1)	Cx(2)				
2	0,07	0,15	1,90				
3		0,20	2,14				
4		0,10	6,00				
5		0,15	6,72				
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

J	A	B	C	D	E	F	G
1	tc	Cx(1)	Cx(2)	Cx(3)	Cx(4)	Cx(5)	Cx(6)
2	0	1,90	2,14	6,00	6,72		
3	4	1,82	1,75	6,08	7,19		
4	10	1,74	1,75	5,35	6,48		
5	24	1,11	0,69	5,40	5,61		
6	28	1,00	0,32	5,23	4,98		
7	34	0,05	0,16	4,29	4,66		
8	48	0,00	0,00	3,79	3,90		
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

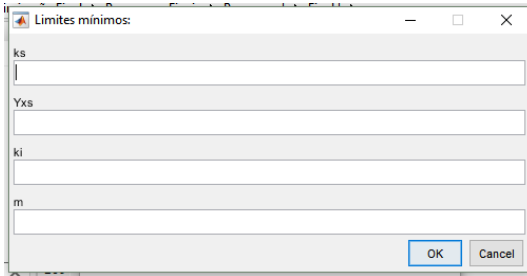
O programa foi desenvolvido com três modelos cinéticos possíveis de serem avaliados: o modelo de Monod para o caso de um único substrato limitante e os modelos de Andrews (1968) e Wu et al. (1988) para o caso de crescimento num único substrato limitante e inibidor. Cabe ao usuário, durante a operação do programa, selecionar a cinética a qual deseja utilizar para descrever o processo em questão.

Figura D.3 – Janela para seleção do modelo cinético a ser utilizado.



Informações referentes ao passo no tempo, período do cultivo a ser avaliado, limites mínimos e máximos para a busca dos parâmetros e pontos iniciais dos mesmos também serão inseridos pelo usuário (Figura D.4).

Figura D.4 – Exemplo da inserção de dados pelo usuário durante a execução do programa.



The image shows a Windows-style dialog box titled "Limites mínimos:". It contains four text input fields stacked vertically, labeled "ks", "Yxs", "ki", and "m" on the left side. The "ks" field has a small cursor at the beginning. At the bottom right of the dialog, there are two buttons: "OK" and "Cancel". The dialog box has a standard title bar with a close button (X) and a maximize button (square).

A inserção de pontos iniciais distintos durante o processo de estimação garante que o mínimo verdadeiro seja encontrado ao longo do processo. Assim, a repetição (NR) ao qual a FO é avaliada para um determinado vetor de pontos iniciais ficou estabelecida em 5. Para cada repetição, um valor de EQM é registrado e comparado ao anterior de forma a garantir que o menor valor prevaleça. Quando o número de repetições se iguala a NR, o menor valor de EQM encontrado juntamente ao seu vetor de parâmetros obtidos é salvo e utilizado nas simulações posteriores. O programa finaliza com a plotagem dos gráficos com os dados experimentais e os desenvolvidos pelo modelo em questão.

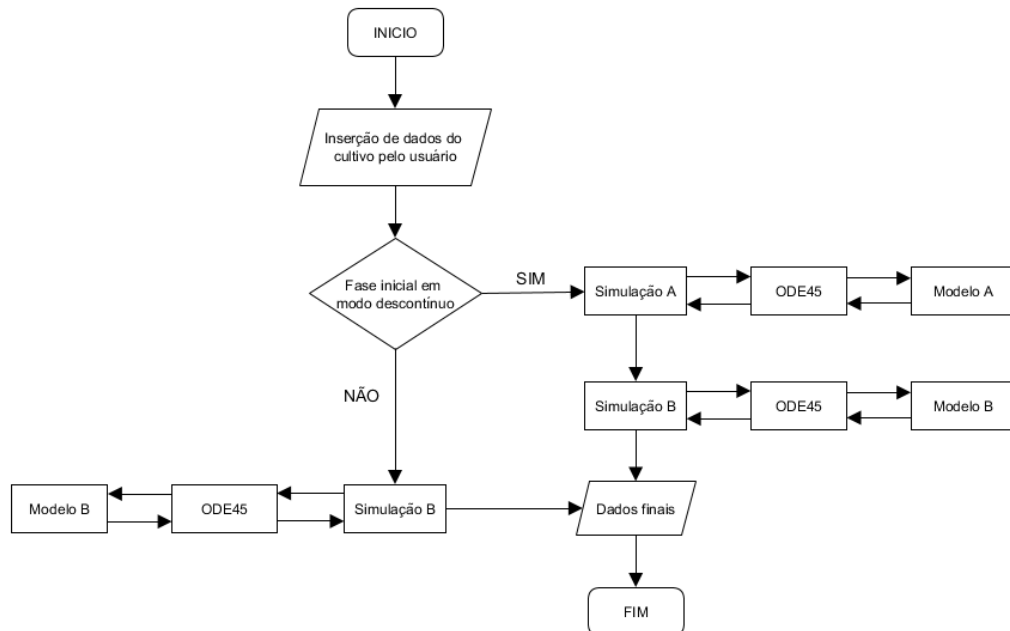
APÊNDICE E – PROGRAMA PARA SIMULAÇÃO DE CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS

E.1. VISÃO GERAL

O programa tem como objetivo simular um processo em batelada alimentada por pulsos. Esse modo de produção é caracterizado por um intervalo no qual há alimentação constante seguido de um período sem alimentação. Assim, o processo em questão pode ser descrito como a junção de uma operação em batelada alimentada e uma operação em batelada.

Alguns dos processos empregados ao longo deste trabalho apresentaram uma fase em batelada prévia a fase de batelada alimentada por pulsos. O programa em questão pode considerar ou não essa fase. Caso a mesma seja levada em consideração, os dados finais da primeira operação serão utilizados como dados iniciais da segunda operação. A rotina aplicada ao programa é exemplificada na Figura E.1.

Figura E.1 – Fluxograma da rotina aplicada ao Programa 2.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

E.2. ESTRUTURA E EXECUÇÃO

Os dados experimentais são inicialmente inseridos pelo usuário através de uma planilha do *Excel* elaborada de acordo com a Figura E2. A primeira aba (a) indica informações referentes a condições iniciais do cultivo. A adição de informações na aba condizente aos dados experimentais (b) é opcional. A aba de alimentação (c) apresenta duas colunas na qual a primeira indica o tempo de alimentação e a segunda o tempo sem alimentação, ambas em horas.

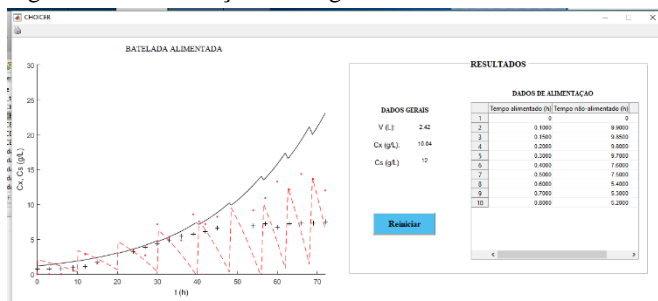
Figura E.2 – Exemplo de formatação da planilha a ser inserida pelo usuário com dados do cultivo na rotina computacional

A							B							C						
1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
BATELADA							BATELADA							BATELADA ALIMENTADA						
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0,71	0	0	0	1	0	0,71	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0,71	0	0	0	2	0	0,71	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	3	0	0,71	0	0	0	3	0	0,71	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0,78	0	0	0	4	0	0,15	9,85	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	5	0	0,94	0,47	0	0	5	0	0,20	9,8	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	6	0	1,05	2,88	0	0	6	0	0,30	9,7	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	7	0	1,25	1,53	0	0	7	0	0,40	7,6	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	8	0	1,38	3,37	0	0	8	0	0,50	7,5	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	9	0	1,82	2,68	0	0	9	0	0,60	5,4	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	10	0	4,41	7,84	0	0	10	0	0,70	5,3	0	0	0	
11	0	0	0	0	0	0	11	0	4,91	5,33	0	0	11	0	0,80	5,2	0	0	0	
12	0	0	0	0	0	0	12	0	5,41	4,85	0	0	12	0	0	0	0	0	0	
13	0	0	0	0	0	0	13	0	5,72	8,50	0	0	13	0	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	14	0	6,09	7,17	0	0	14	0	0	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	0	0	15	0	6,62	8,23	0	0	15	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	0	16	0	6,95	9,16	0	0	16	0	0	0	0	0	0	
17	0	0	0	0	0	0	17	0	7,23	10,9	0	0	17	0	0	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	0	18	0	6,69	13,27	0	0	18	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	0	19	0	7,28	12,38	0	0	19	0	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	0	20	0	7,28	14,37	0	0	20	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	0	0	0	0	21	0	7,31	13,61	0	0	21	0	0	0	0	0	0	
22	0	0	0	0	0	0	22	0	7,52	12	0	0	22	0	0	0	0	0	0	

Assim como descrito no Programa 1 do Apêndice D, informações referentes ao período do cultivo e cinética de crescimento celular serão requeridas pelo usuário as quais deverão ser preenchidas em tela nas janelas abertas.

O programa finaliza com a plotagem dos gráficos juntamente com os dados da planilha de alimentação (Figura E.3).

Figura E.3 – Finalização do Programa 2.



ANEXO A – DISTRIBUIÇÕES DE χ^2 Figura A.1 – Valores de $\chi^2_{v,p}$, onde $P = P(\chi^2 \geq \chi^2_{v,p})$

Tabela A6.2 – Distribuições χ^2 – valores de $\chi^2_{v,p}$ onde $P = P(\chi^2 \geq \chi^2_{v,p})$																
$\chi^2_{v,p}$	P	0,995	0,99	0,975	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	v
1	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	0,0157	1
2	0,0100	0,0201	0,0506	0,103	0,211	0,575	1,386	2,773	4,605	5,991	7,378	9,210	10,597	13,816	16,266	2
3	0,0717	0,115	0,216	0,352	0,584	1,213	2,366	4,108	6,251	7,815	9,348	11,345	12,838	16,266	16,266	3
4	0,207	0,297	0,484	0,711	1,064	1,923	3,357	5,385	7,779	9,488	11,143	13,277	14,860	18,467	20,515	4
5	0,412	0,554	0,831	1,145	1,610	2,675	4,351	6,626	9,236	11,070	12,832	15,086	16,750	20,515	20,515	5
6	0,676	0,872	1,237	1,635	2,204	3,455	5,348	7,841	10,645	12,592	14,449	16,812	18,548	22,458	24,996	6
7	0,989	1,239	1,690	2,167	2,833	4,255	6,346	9,037	12,017	14,067	16,013	18,475	20,278	24,322	27,154	7
8	1,344	1,646	2,180	2,733	3,490	5,071	7,344	10,219	13,362	15,507	17,535	20,090	21,955	26,125	28,777	8
9	1,735	2,088	2,700	3,325	4,168	5,899	8,343	11,389	14,684	16,919	19,023	21,666	23,589	27,877	30,578	9
10	2,156	2,558	3,247	3,940	4,865	6,737	9,342	12,549	15,987	18,307	20,483	23,209	25,188	29,588	32,909	10
11	2,603	3,053	3,816	4,575	5,578	7,584	10,341	13,701	17,275	19,675	21,920	24,725	26,757	31,264	34,164	11
12	3,074	3,571	4,404	5,226	6,304	8,438	11,340	14,845	18,549	21,026	23,337	26,217	28,300	32,909	35,172	12
13	3,565	4,107	5,009	5,892	7,042	9,299	12,340	15,984	19,812	22,362	24,736	27,688	29,819	34,528	36,151	13
14	4,075	4,660	5,629	6,571	7,790	10,165	13,339	17,117	21,064	23,685	26,119	29,141	31,319	36,123	37,151	14
15	4,601	5,229	6,262	7,261	8,547	11,036	14,339	18,245	22,307	24,996	27,488	30,578	32,801	37,697	38,161	15
16	5,142	5,812	6,908	7,962	9,312	11,912	15,338	19,369	23,542	26,296	28,845	32,000	34,267	39,252	39,171	16
17	5,697	6,408	7,564	8,672	10,085	12,792	16,338	20,489	24,769	27,587	30,191	33,409	35,718	40,790	40,171	17
18	6,265	7,015	8,231	9,390	10,865	13,675	17,338	21,605	25,989	28,869	31,526	34,805	37,156	43,312	41,171	18
19	6,844	7,633	8,907	10,117	11,651	14,562	18,338	22,718	27,204	30,144	32,852	36,191	38,582	43,820	42,171	19
20	7,434	8,260	9,591	10,851	12,443	15,452	19,337	23,828	28,412	31,410	34,170	37,566	39,997	45,315	43,171	20
21	8,034	8,897	10,283	11,591	13,240	16,344	20,337	24,935	29,615	32,671	35,479	38,932	41,401	46,797	44,171	21
22	8,643	9,542	10,982	12,338	14,041	17,240	21,337	26,039	30,813	33,924	36,781	40,289	42,796	48,268	45,171	22
23	9,260	10,196	11,688	13,091	14,848	18,137	22,337	27,141	32,007	35,172	38,076	41,638	44,181	49,728	46,171	23
24	9,886	10,856	12,401	13,848	15,659	19,037	23,337	28,241	33,196	36,415	39,364	42,980	45,558	51,179	47,171	24
25	10,520	11,524	13,120	14,611	16,473	19,939	24,337	29,339	34,382	37,652	40,646	44,314	46,928	52,620	48,171	25
26	11,160	12,198	13,844	15,379	17,292	20,843	25,336	30,434	35,563	38,885	41,923	45,642	48,290	54,052	49,171	26
27	11,808	12,879	14,573	16,151	18,114	21,749	26,336	31,528	36,741	40,113	43,194	46,963	49,645	55,476	50,171	27
28	12,461	13,565	15,308	16,928	18,939	22,657	27,336	32,620	37,916	41,337	44,461	48,278	50,993	56,892	51,171	28
29	13,121	14,256	16,047	17,708	19,768	23,567	28,336	33,711	39,087	42,557	45,722	49,588	52,336	58,302	52,171	29
30	13,787	14,953	16,791	18,493	20,599	24,478	29,336	34,800	40,256	43,773	46,979	50,892	53,672	59,703	53,171	30
40	20,707	22,164	24,433	26,509	29,051	33,660	39,335	45,616	51,805	55,758	59,342	63,691	66,766	73,402	75,000	40
50	27,991	29,707	32,357	34,764	37,689	42,942	49,335	56,334	63,167	67,505	71,420	76,154	79,490	86,661	88,154	50
60	35,535	37,485	40,482	43,188	46,459	52,294	59,335	66,981	74,397	79,082	83,298	88,379	91,952	99,607	101,879	60

Fonte: COSTA NETO (2002)

