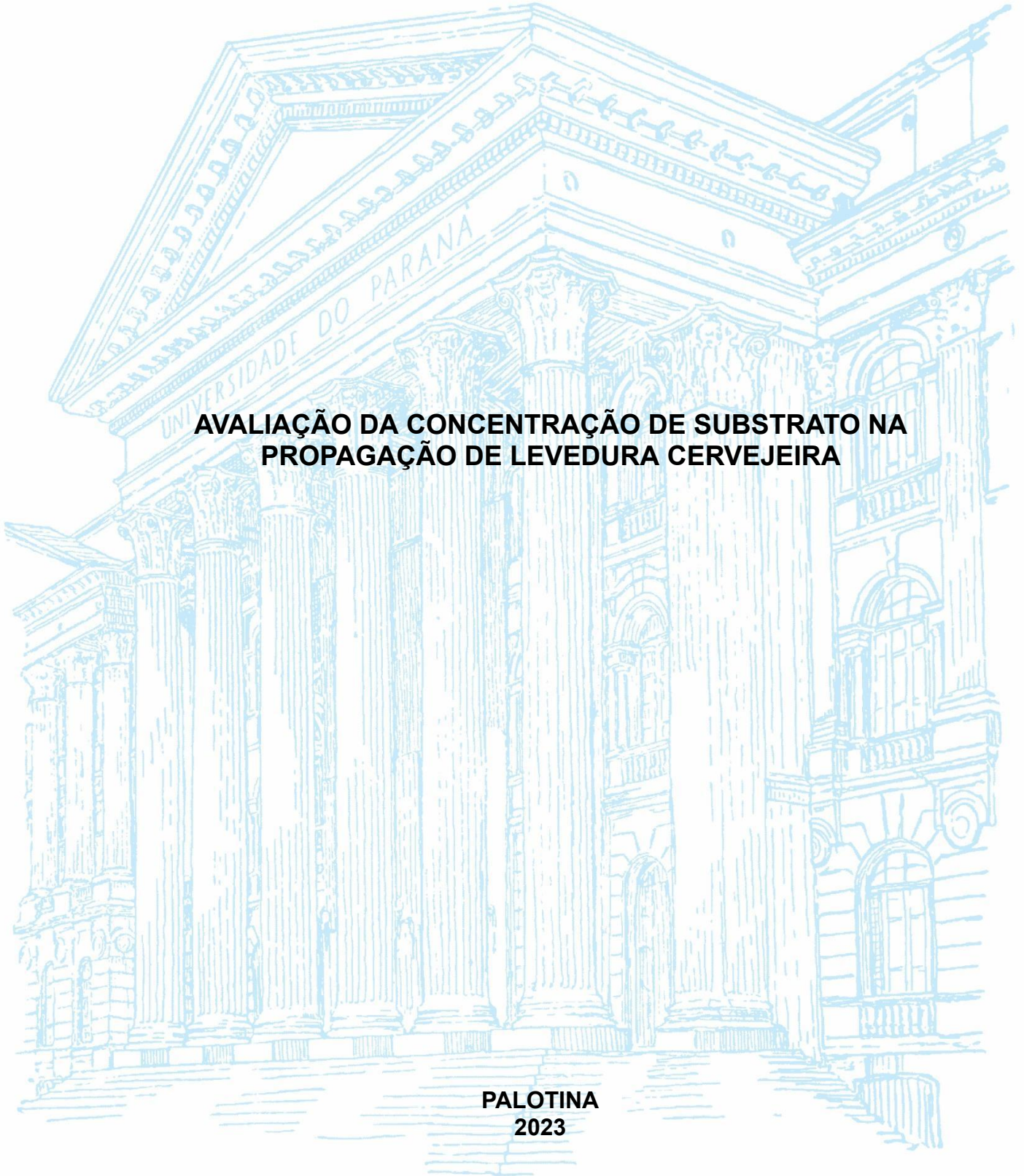


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STÉFANI ALEIXO MORETTO

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA
PROPAGAÇÃO DE LEVEDURA CERVEJEIRA**

**PALOTINA
2023**



STÉFANI ALEIXO MORETTO

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA
PROPAGAÇÃO DE LEVEDURA CERVEJEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jamal Abd Awadallak

**PALOTINA
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

Aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e três, às catorze horas, na Sala Virtual https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3ameeting_ZWRhZDg1NWUtYjhhNy00NzE5LTgxNzctNDQ2ODU1OGZjOGFk%40thread.v2/0?context=%7b%22id%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22oid%22%3a%22aa5327fc-4673-4a26-b5bf-739645297519%22%7d,

Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Avaliação da Concentração de Substrato na Propagação de Levedura Cervejeira" apresentado pela discente Stéfani Aleixo Moretto, orientada pelo Prof. Dr. Jamal Abd Awadallak, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 96 (noventa e seis), Prof. Dr. Alessandro Jefferson Sato, nota: 96 (noventa e seis), e Prof. Dr. Jamal Abd Awadallak, nota: 96 (noventa e seis). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 96 (noventa e seis). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **JAMAL ABD AWADALLAK, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/06/2023, às 15:01, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ALESSANDRO JEFFERSON SATO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/06/2023, às 15:02, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/06/2023, às 15:02, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5695403** e o código CRC **50990512**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e irmã pelo apoio infinito que sempre me foi concedido e por sempre terem acreditado no meu potencial, me apoiando em todas as minhas decisões, sendo sempre meu suporte.

Agradeço ao meu pai, que mesmo não estando mais presente em minha vida, me ensinou a valorizar os estudos e nunca desistir.

Agradeço ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado durante esse período e meu deus para conseguir finalizar mais essa etapa.

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Jamal Abd Awadallak, por todo apoio e ensinamentos obtidos.

Agradeço aos meus professores da graduação por todos os ensinamentos que obtive durante a faculdade.

Agradeço aos amigos que fiz durante essa jornada, vocês fizeram com que a faculdade fosse mais leve e mais alegre.

*“O sucesso não consiste em não errar, mas
em não cometer os mesmos equívocos
mais de uma vez”*

George Bernard Shaw

RESUMO

As leveduras são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, e são reconhecidas historicamente por sua capacidade fermentativa, e o gênero mais utilizado para produção de cerveja é a *Saccharomyces*. Embora a levedura seja geralmente reutilizada após cada fermentação nas cervejarias, é indicado propagar novas culturas de levedura (geração zero) para garantir a pureza da cultura, evitar mutações metabólicas, morfológicas e genéticas causadas pelo envelhecimento da cultura e estresse alcoólico, e prevenir problemas de desempenho fermentativo. O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de substrato e a concentração inicial de levedura sob três diferentes leveduras comerciais. Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e 100 mL, contendo 100 mL de meio, e agitação a 200 rpm, mantidos sob temperatura de 25°C. Como forma de acompanhar a cinética fermentativa coletou-se uma amostra do fermentado no início dos experimentos, durante e ao final de 48 horas. Realizando um estudo experimental acerca do crescimento celular de leveduras comerciais utilizadas em cervejarias sob condições anaeróbicas, e elaborando um modelo matemático usando a equação de Monod para prever o crescimento celular das leveduras.

Palavras-chave: Levedura. Propagação. Substrato.

ABSTRACT

Yeasts are microorganisms belonging to the Fungi Kingdom, and are historically recognized for their fermentative capacity, and the genus most used for beer production is *Saccharomyces*. Although yeast is usually reused after each fermentation in breweries, it is advisable to propagate new yeast cultures (zero generation) to ensure culture purity, avoid metabolic, morphological and genetic mutations caused by culture aging and alcoholic stress, and prevent fermentation performance. The present work aimed to study the influence of substrate concentration and initial yeast concentration on three different commercial yeasts. The tests were carried out in Erlenmeyer flasks of 250 mL and 100 mL, containing 100 mL of medium, and stirring at 200 rpm, maintained at a temperature of 25°C. As a way of monitoring the fermentative kinetics, a sample of the fermented product was collected at the beginning of the experiments, during and at the end of 48 hours. Carrying out an experimental study on the cell growth of commercial yeasts used in breweries under anaerobic conditions, and elaborating a mathematical model using Monod's equation to predict the cell growth of yeasts.

Keywords: Yeast. Propagation. Substrate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - RENDIMENTO DE NOVAS CÉLULAS LEVEDURA US-05	15
FIGURA 2 - RENDIMENTO DE NOVAS CÉLULAS LEVEDURA US-04	15
FIGURA 3 - RENDIMENTO DE NOVAS CÉLULAS LEVEDURA W-34/70	16
FIGURA 4 - S-04 0.1 Bi/ml, 20 °P	19
FIGURA 5 - S-04 0.1 Bi/ml, 10 °P	19
FIGURA 6 - S-04 0.1 Bi/ml, 5 °P	19
FIGURA 7 - S-04 0.1 Bi/ml, 15 °P	19
FIGURA 8 - S-04 0.025 Bi/ml, 10 °P	19
FIGURA 9 - S-04 0.025 Bi/ml, 20 °P	19
FIGURA 10 - S-04 0.025 Bi/ml, 15 °P	20
FIGURA 11 - S-04 0.025 Bi/ml, 5 °P	20
FIGURA 12 - US-05 0.1 Bi/ml, 10 °P	20
FIGURA 13 - US-05 0.1 Bi/ml, 20 °P	20
FIGURA 14 - US-05 0.1 Bi/ml, 15 °P	20
FIGURA 15 - US-05 0.1 Bi/ml, 5 °P	20
FIGURA 16 - US-05 0.025 Bi/ml, 10 °P	21
FIGURA 17 - US-05 0.025 Bi/ml, 20 °P	21
FIGURA 18 - US-05 0.025 Bi/ml, 15 °P	21
FIGURA 19 - US-05 0.025 Bi/ml, 5 °P	21
FIGURA 20 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 10 °P	22
FIGURA 21 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 20 °P	22
FIGURA 22 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 15 °P	22
FIGURA 23 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 5 °P	22
FIGURA 24 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 10 °P	22

FIGURA 25 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 20 °P	22
FIGURA 26 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 15 °P	23
FIGURA 27 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 5 °P	23

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - DADOS EXPERIMENTAIS US-05	13
QUADRO 2 - DADOS EXPERIMENTAIS S-04	13
QUADRO 3 - DADOS EXPERIMENTAIS W-34/70	14
QUADRO 4 - PARÂMETROS DO MODELO PARA A LEVEDURA US-05	17
QUADRO 5 - PARÂMETROS DO MODELO PARA A LEVEDURA S-04	17
QUADRO 6 - PARÂMETROS DO MODELO PARA A LEVEDURA W-34/70	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo geral	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 LEVEDURA	4
2.1.1 ALE E LAGER	5
2.2 PROPAGAÇÃO	6
2.3 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER	6
2.4 MODELAGEM E SIMULAÇÃO	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 HIDRATAÇÃO DA LEVEDURA E CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER	9
3.2 PREPARO DO INÓCULO	10
3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 MODELO MATEMÁTICO	16
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, e são reconhecidas historicamente por sua capacidade fermentativa, sendo utilizadas há milhares de anos para a fermentação de frutas e cereais (SANTOS, 2022).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* foram as mais utilizadas para fermentação alcoólica ao longo da história, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a principal delas. Estas são encontradas comercialmente de diferentes formas, e as que são destinadas à produção de cerveja possuem neutralidade com relação ao sabor característico do fermento. Essas leveduras passam por um processo de liofilização para serem comercializadas, onde ocorre a remoção da água através da sublimação (SANTOS, 2022). Segundo Santos (2022, p.13-14) "Nesse processo físico, o material é congelado e levado a uma câmara hermética e, em seguida, o ar interno é removido. Assim, gera-se um ambiente de baixíssima pressão, fornecendo condições para ocorrer a sublimação. "

O processo de fermentação é onde os microrganismos utilizam do substrato presente no meio, como o açúcar, para produção de energia, e a levedura tem a habilidade de metabolizar de modo eficiente os constituintes do mosto cervejeiro, que é rico em açúcares fermentáveis. Existem alguns fatores que podem influenciar no rendimento do processo fermentativo, porém a fermentação ainda consegue ocorrer sem que haja a presença de oxigênio disponível no meio (OLIVEIRA, 2011).

Quando possui oxigênio disponível, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono, levando à formação de dióxido de carbono e água. Por outro lado, na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono. Vale destacar também que o pH ideal para as leveduras encontra-se entre 4,0 e 4,5. Já os limites de tolerância 2,2 e 8,0. (SANTOS, 2022, p. 16-17).

Uma prática comum em cervejarias é a reutilização de leveduras utilizadas em uma fermentação anterior, adotada para a redução de custos de produção, porém esta prática apresenta desvantagens como mutações ou contaminações. Por isso, o mais indicado é a propagação de leveduras a partir de uma cultura matriz (OLIVEIRA, 2019).

1.1 JUSTIFICATIVA

Existem alguns fatores que influenciam no rendimento do processo fermentativo, sendo estes: temperatura, concentração de inóculo, modo de alimentação da dorna, concentração do substrato e a ocorrência de sub-produtos da fermentação. Todos estes fatores podem causar a diminuição da eficiência da fermentação (UCHOA JUNIOR, 1995).

A propagação de leveduras cervejeiras proporciona continuamente a possibilidade de culturas puras das leveduras em fase exponencial de seu crescimento, com alta porcentagem de viabilidade e vitalidade apropriadas, prevenindo problemas de performance fermentativa e evitando mutações genéticas. As células propagadas possibilitam um início de fermentação mais acelerado ao reduzir a fase lag no decorrer da fermentação e reduzindo a produção de *off-flavors* (OLIVEIRA, 2019).

A quantidade inicial de levedura introduzida é um componente crítico no processo de fabricação da cerveja. Este parâmetro não só define a taxa de fermentação, mas também influencia diretamente a manifestação de componentes aromáticos, como ésteres e álcoois superiores (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Neste contexto, pequenas cervejarias e cervejeiros amadores geralmente conduzem a propagação da levedura cervejeira em ambientes anaeróbicos.

Os modelos de crescimento celular presentes na literatura foram testados sob condições específicas, como ausência de agitação ou utilizando uma única espécie de microrganismo. Essas condições limitadas não representam a complexidade do ambiente de uma cervejaria, o que enfatiza a necessidade de um modelo mais sofisticado e preciso, capaz de melhor prever o crescimento celular em condições reais de produção de cerveja (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Desta forma considera-se relevante analisar a concentração de substrato e levedura para a propagação, pois estes são um dos fatores importantes para a propagação.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a influência da concentração de substrato, proveniente do mosto à base de malte, na propagação de três diferentes leveduras comerciais, analisando a propagação das leveduras em diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de levedura. Além disso, busca-se desenvolver um modelo matemático que descreva a relação entre a concentração de açúcar e a geração de biomassa nas diversas linhagens, permitindo a otimização do processo produtivo.

1.2.2 Objetivos específicos

- Selecionar e caracterizar diversas linhagens comerciais de levedura utilizadas na produção de cerveja, com base em suas propriedades fermentativas e de geração de biomassa.
- Preparar mostos com diferentes concentrações de açúcar a partir de malte, mantendo condições controladas.
- Monitorar o crescimento e a propagação das linhagens de levedura em diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de levedura, através de análises microbiológicas.
- Analisar a relação entre a concentração de açúcar e a geração de biomassa nas diversas linhagens de levedura, identificando possíveis padrões e diferenças entre as linhagens.
- Realizar um estudo experimental acerca do crescimento celular de leveduras comerciais utilizadas em cervejarias, em condições anaeróbicas.
- Desenvolver um modelo matemático robusto que permita prever o crescimento celular das leveduras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEVEDURA

As leveduras são organismos eucarióticos predominantemente unicelulares, pertencentes ao Reino Fungi com o seu tamanho variando de 1 a 5 µm em largura e 5 a 30 µm ou mais em comprimento, não apresentando meios de locomoção. Pode apresentar-se com formato esférico a ovóide, de elipsóide a filamentosa, possuindo uma parede celular rígida formada por manana, beta glucana e quitina. (CORADELLO, 2012).

A levedura é umas das matérias-primas para o processo de fabricação de cerveja, pois estas possuem a habilidade de metabolizar eficientemente os constituintes do mosto, sendo este obtido após o processo de brassagem, onde temos uma mistura fervida de malte de cereal moído em água, rico em açúcares fermentáveis. A levedura é parte fundamental para a formação do aroma na cerveja, por isso é importante que esteja isenta de microorganismos contaminantes. (OLIVEIRA, 2011).

A linhagem de levedura mais usada tradicionalmente usada nas indústrias de cervejas, vinhos e panificação são as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. As *Saccharomyces cerevisiae* se reproduzem assexuadamente por brotamento ou gemulação, possuindo formato elíptico. Alguns compostos tóxicos são produzidos durante o processo de fermentação, e estes se acumulam no inóculo, desse modo podem abaixar a taxa de eficiência, diminuir a produtividade da amostra e inviabilizar o processo, por isso é de grande relevância o estudo de revitalização do fermento.(CORADELLO, 2012).

Na produção de cerveja a glicose, maltose e maltotriose são correspondentes por 70-80% do açúcares presentes no mosto cervejeiro, 2-5% é correspondente a frutose, 3-6% por sacarose e 20-30% de açúcares não fermentáveis.

(...) a glicose é consumida mais rapidamente e, normalmente, após metade deste açúcar ser consumido é que ocorre a metabolização da maltose e maltotriose, sendo o metabolismo de maltotriose ainda mais lento do que o de maltose

em *Saccharomyces*. Essa dificuldade de fermentar eficientemente a maltotriose tem impacto principalmente no setor cervejeiro, onde, muitas vezes, quantidades significativas desse açúcar deixam de ser fermentadas. (GODOY, 2015, p. 26)

2.1.1 ALE E LAGER

Ale e Lager são descrições que foram adotadas pela indústria cervejeira para a identificação de leveduras, sendo a Ale cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, correspondendo a um grupo mais diverso dentre as leveduras cervejeiras. Já as leveduras do tipo Lager teve sua nomenclatura mudada ao longo dos anos, passando de *Saccharomyces carlsbergensis* a “*Saccharomyces cerevisiae* do tipo lager” até o atual nome aceito, *Saccharomyces pastorianus*.(OLIVEIRA, 2019).

Segundo Oliveira (2019), 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. 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 fermentação estabelecidas.

Há diferenças bioquímicas entre as leveduras tipo ale e lager que justificam a diferenciação entre ambas, tais como:

As cepas de *S. uvarum* (*carlsbergensis*) tipo lager possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular α -galactosidase (melibiase), permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). Porém, as cepas de *S. cerevisiae* tipo ale carecem desses genes MEL, o que impossibilita a utilização da melibiose. Além disso, às cepas ale podem crescer a 37°C, enquanto que as cepas lager não apresentam crescimento a temperaturas superiores a 34°C. (CARVALHO *et al.*, 2006, p. 37).

2.2 PROPAGAÇÃO

O processo de propagação de leveduras se inicia na etapa de seleção da estirpe de levedura e, posteriormente, acondicionada em condições adequadas e favoráveis para seu crescimento e multiplicação. Esse processo ocorre até atingir um número de células em quantidade considerável para fermentar um determinado volume de mosto. A parcela inicial de levedura, como inóculo do fermentador, refere-se à geração zero das leveduras e deve estar isenta de contaminantes e em condições fisiológicas adequadas (CORADELLO, 2012).

Como forma de manter a produção constante, cervejarias utilizam como prática comum o reuso de leveduras inoculadas em uma fermentação anterior, contudo essa prática implica em alguns problemas latentes, como a deriva genética, seleção de variantes e o envelhecimento precoce da amostra. Dessa forma o indicado seria a propagação de leveduras a partir de uma cultura matriz, sendo feito uma nova leva a cada tanque produzido, essa forma de produção garante maior padronização da linha de produção e também o menor custo e melhor logística da produção.(OLIVEIRA, 2019).

O processo de propagação de leveduras consiste na seleção de uma estirpe de levedura que é retirada do armazenamento e colocada em condições ideais de crescimento até que atinja um número suficiente de células para a fermentação de um determinado volume de mosto. O inóculo do fermentador, também conhecido como geração zero, deve estar livre de contaminantes e em boas condições fisiológicas. O mosto cervejeiro é utilizado como substrato para a fermentação e possui nutrientes que são de grande importância para o crescimento da levedura (OLIVEIRA, 2017). Porém o substrato em altas concentrações pode gerar um efeito de inibição nas leveduras, desativando enzimas importantes ou até mesmo modificando a rota metabólica da levedura, sendo esta vital para a sua sobrevivência. (PORTO, 2005).

2.3 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem de leveduras consegue indicar o crescimento celular e formação de produto, sendo de grande relevância para os processos fermentativos. O método

mais clássico para realizar a contagem de leveduras é pelo método de plaqueamento, onde o inóculo é inserido em meio de cultura em placa de Petri, porém existe outro método mais adotado, que é a contagem em câmara de Neubauer utilizando azul de metileno para a determinação da viabilidade celular. Que diferente do método de plaqueamento onde pode levar até 72 horas para ser realizado, o resultado por meio deste é direto e imediato. Além de exigir menos equipamentos, é possível analisar a morfologia celular da levedura.

Realizando a contagem utilizando a Câmara de Neubauer, é necessário utilizar o corante azul de metileno para a distinção das células vivas das células mortas, dessa forma é misturado uma quantidade da amostra de levedura com a de corante. As células mortas serão tingidas de azul, já as células vivas não irão se colorir, pois suas enzimas quando são ativadas conseguem reduzir o grupo cromofórico do corante.(SANTOS, 2022).

É utilizado um microscópio óptico comum para a contagem de leveduras, onde é possível visualizar nos quadrantes centrais da câmara de Neubauer 25 quadrantes, e cada um é constituído por 16 retículos, são nesses quadrantes onde é realizado a contagem, determinando a concentração de células na amostra analisada.(SANTOS, 2022).

2.4 MODELAGEM E SIMULAÇÃO

É possível definir a modelagem matemática como a representação física de um problema por meio de um conjunto de equações, o modelo pode ser definido como uma estrutura que tenta descrever processos reais através de equações.(MORAIS,2019). É possível com a modelagem prever o comportamento de um processo que não foi testado empiricamente, o que possibilita determinar as condições operacionais ótimas do sistema, auxiliando economicamente no desenvolvimento do projeto.(BONOMI; SCHMIDEL, 2001)

Os modelos cinéticos são amplamente utilizados para analisar a formação de produto e o consumo do substrato em fermentação, sendo considerada uma das etapas mais relevantes ao realizar o estudo de um processo fermentativo, visto que pode definir parâmetros importantes como a taxa de produção e o consumo.(MORAIS, 2019).

Uma equação que descreve a taxa de crescimento de um microorganismo é a equação de Monod.

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{K_m + S} \quad (1)$$

Onde μ_x é a taxa de crescimento específico, μ_m é a velocidade máxima de crescimento, K_m é a constante de Monod e S é o substrato utilizado para o crescimento. (GALVÃO *et al*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada utilizando três tipos diferentes de leveduras comerciais, para avaliar como cada uma se comportaria durante a propagação com diferentes parâmetros de substrato e em diferentes concentrações de leveduras. As leveduras que foram utilizadas são: US-05, S-04, W-34/70. Sendo a US-05 e a S-04 leveduras do tipo Ale, e a W-34/70 levedura do tipo Lager.

3.1 HIDRATAÇÃO DA LEVEDURA E CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

Para a hidratação da levedura, a quantidade de água limpa adicionada foi de 10 vezes o peso da levedura, sendo a água esterilizada e na temperatura de 30-35°C. Dessa forma foi usado 1g de levedura e 10 ml de água esterilizada, mexido suavemente e deixado em repouso por 15 minutos, depois mexer para suspender a levedura completamente, deixando descansar por mais 5 minutos a 30-35°C.

Foi realizada a diluição dessa levedura hidratada, em uma proporção de 1ml de levedura para 10ml de água esterilizada, utilizando azul de metileno para determinação de células viáveis. O azul de metileno torna-se incolor na presença de enzimas ativas, então indicando células viáveis. E se permanecer azul significa que a célula não está viável. Após isso é determinado a quantidade de levedura presente realizando a contagem destas em câmara de Neubauer.

Para a utilização da câmara de Neubauer, foi necessário lavar a câmara com água destilada e passar álcool 70%, fazendo o mesmo processo para a lamínula. Secando ambos com papel macio, verificando se não há nenhum resquício de papel na câmara. Com a utilização de uma micropipeta de 100 µL, foi coletado a amostra e com cuidado depositar entre a câmara e a lamínula, aproximando a pipeta da câmara com uma gota na ponta o suficiente para que a amostra seja arrastada por capilaridade, preenchendo a câmara sem deixar vazar e cair amostra na lamínula.

Foi realizada a contagem das leveduras em nove quadrantes da câmara de

Neubauer, realizando uma média com os quadrantes contados. Com a média realizada das leveduras, estes foram aplicados na equação 2.

$$\frac{\bar{x} \cdot 250000 \cdot D}{1 \times 10^9} \quad (2)$$

Onde \bar{x} é a média das leveduras dos quadrantes contabilizados na câmara de Neubauer, D é o fator de diluição, 250000 é o volume da área da câmara de Neubauer, e 1×10^9 é para definição do valor para bilhões de células. Com esses dados obtidos, será ajustada a quantidade de leveduras até atingir 0,025 e 0,1 bilhões de células/ml.

3.2 PREPARO DO INÓCULO

Para a propagação, foram preparadas soluções de extrato de malte seco (DME) em água nas seguintes quantidades: 0,05 g/ml, 0,1 g/ml, 0,15 g/ml, 0,2 g/ml. Após a adição do substrato, foi adicionado 100 ml de água esterilizada em um Erlenmeyer de 125ml ou 250ml, junto com as leveduras preparadas anteriormente. Todos os Erlenmeyer foram tampados para que haja ausência de oxigênio circulando, e levados ao shaker de piso a 200 rpm, deixando este na temperatura de 25°C. O experimento foi realizado para cada levedura seguindo as concentrações de DME determinadas anteriormente.

Foi realizada a contagem das leveduras no começo do experimento, após 16 horas, 24 horas e ao final, quando este atingiu 48 horas. Utilizando os dados obtidos das contagens, estes foram aplicados na equação 2 da seção 3.1.

3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA

Para o desenvolvimento da modelagem e simulação, foi utilizada a plataforma Google Colaboratory para a construção do código. No início do código são indicadas as bibliotecas necessárias, as condições iniciais e os parâmetros do nosso modelo. Alguns parâmetros considerados para o desenvolvimento foram determinados utilizando o método minimize disponível na biblioteca scipy, sendo estes parâmetros:

μ_{max} , K_m , Y_s , S_{max} , n_i e k .

Após os parâmetros definidos é possível resolver o modelo matemático, mas algumas considerações devem ser feitas sobre o experimento, tais como: temperatura constante, agitação perfeita, sem variação de concentração e consumo de substrato associado ao crescimento celular. Deste modo, foi elaborado um modelo matemático para a levedura (X) e o substrato (S) usando a equação de Monod para o crescimento celular, esta que foi apresentada na seção 2.4, equação 1, onde através da modelagem matemática é possível representar o sistema graficamente. Como citado anteriormente, pode haver a inibição provocada pelas altas concentrações de substrato, desse modo foi adicionado à equação um termo de inibição pelo substrato no modelo, para assim obtermos um gráfico que consiga simular um resultado mais próximo dos obtidos em laboratório.

$$\left(\frac{1-S}{S_{max}}\right) \cdot n \quad (3)$$

Onde S_{max} é a concentração máxima onde há inibição total e n determina quanto essa inibição afeta a velocidade de crescimento em concentrações menores que S_{max}

Para modelar o efeito da concentração inicial de substrato no rendimento, assumiu-se que o substrato metabolizável é afetado pela concentração de substrato inicial. O substrato foi dividido em substrato metabolizável e substrato total, pois foi levado em consideração o efeito de atenuação da levedura, sendo essa a porcentagem que a levedura consegue metabolizar o substrato presente. Deste modo, o substrato metabolizável máximo foi definido como substrato total vezes a atenuação máxima, sendo a atenuação um parâmetro fornecido pelo fabricante da levedura. A atenuação máxima real foi definida como:

$$Arm = Am \cdot ((1 - k) \cdot n^{\circ}cel \text{ inicial por substrato inicial}) \quad (4)$$

Onde temos que Arm é a máxima atenuação real, Am é a máxima atenuação e k define o efeito da concentração de substrato na atenuação máxima. O modelo consiste em 3 equações diferenciais, uma para o crescimento celular (X), outra

equação para o substrato metabolizável (S_m) e por último uma equação para o substrato total (S), mostradas nas equações 5, 6 e 7 abaixo.

$$X[i + 1] = X[i] + u \cdot h \quad (5)$$

$$S_m[i + 1] = S_m[i] - (1/(y_s)) \cdot u \cdot h \quad (6)$$

$$S[i + 1] = S[i] - (1/(y_s)) \cdot u \cdot h \quad (7)$$

As equações foram discretizadas pelo método das diferenças finitas e resolvido com passo temporal $h=0.01h$.

O modelo com as constantes determinadas permite a previsão da concentração celular em diferentes condições experimentais. As concentrações de substrato e de levedura utilizadas nos experimentos em laboratório foram inseridas no código para a criação dos gráficos, porém os dados de concentração de substratos foram convertidos de g/ml para Plato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Leveduras diferentes geram concentrações celulares diferentes, mesmo estando nas mesmas condições, desta forma ao avaliar diferentes leveduras é obtido uma maior confiabilidade dos resultados obtidos. Nas tabelas abaixo temos as concentrações iniciais de levedura (X_0), as concentrações de substrato (S_0), as concentrações das leveduras com o tempo, a relação de célula inicial por substrato inicial (X_0/S_0), e quantidade de células produzidas por substrato inicial ($(X-X_0)/S_0$). Com esses dados podemos observar o crescimento celular conforme o tempo, e correlacionar com a quantidade de substrato presente.

QUADRO 1 - DADOS EXPERIMENTAIS US-05

X_0 (bi/ml)	S_0 (g/ml)	X_0 / S_0	$(X-X_0)/S_0$	X t=16h	X t =24h	X t=48h
0,025	0,05	0,5	1,164	0,054	0,072	0,083
0,025	0,1	0,25	1,158	0,078	0,104	0,141
0,025	0,15	0,167	1,434	0,071	0,107	0,240
0,025	0,2	0,125	1,185	0,062	0,095	0,262
0,1	0,05	2	0,993	0,151	0,140	0,150
0,1	0,1	1	1,104	0,186	0,225	0,210
0,1	0,15	0,667	1,301	0,235	0,298	0,295
0,1	0,2	0,5	1,336	0,260	0,327	0,367

Fonte: O autor (2023).

QUADRO 2 - DADOS EXPERIMENTAIS S-04

X_0 (bi/ml)	S_0 (g/ml)	X_0 / S_0	$(X-X_0)/S_0$	X t=16h	X t =24h	X t=48h
0,025	0,05	0,5	1,529	0,070	0,087	0,101
0,025	0,1	0,25	1,404	0,087	0,155	0,165
0,025	0,15	0,167	1,304	0,083	0,167	0,221
0,025	0,2	0,125	1,400	0,067	0,128	0,305
0,1	0,05	2	1,358	0,139	0,141	0,168
0,1	0,1	1	1,447	0,227	0,234	0,245
0,1	0,15	0,667	1,436	0,316	0,302	0,315
0,1	0,2	0,5	1,273	0,334	0,346	0,355

Fonte: O autor (2023).

QUADRO 3 - DADOS EXPERIMENTAIS W-34/70

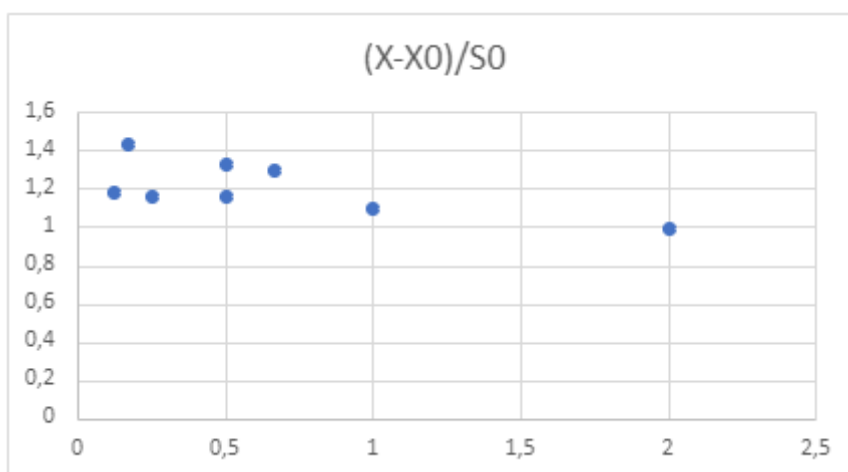
X0 (bi /ml)	S0 (g/ml)	X0 / S0	(X-X0)/S0	X t=16h	X t =24h	X t=48h
0,025	0,05	0,5	1,310	0,061	0,078	0,090
0,025	0,1	0,25	1,208	0,093	0,148	0,146
0,025	0,15	0,167	1,240	0,095	0,151	0,211
0,025	0,2	0,125	1,421	0,070	0,142	0,309
0,1	0,05	2	0,892	0,139	0,148	0,145
0,1	0,1	1	1,188	0,213	0,228	0,219
0,1	0,15	0,667	1,075	0,300	0,294	0,261
0,1	0,2	0,5	1,384	0,332	0,318	0,377

Fonte: O autor (2023).

Ao agruparmos os dados como crescimento celular por grama de substrato, conseguimos visualizar em qual quantidade de substrato ou levedura, houve maior crescimento celular, mesmo estes dois parâmetros possuindo concentrações diferentes. Portanto, observando os quadros 1, 2 e 3, notou-se com os dados obtidos das três leveduras que apesar do crescimento celular ser maior conforme ocorre o aumento de levedura inicial, esse aumento não é tão significativo para que seja viável o uso de uma maior concentração de leveduras iniciais, pois o crescimento de leveduras é semelhante em ambas as concentrações, o que sugere uma taxa de saturação de crescimento limitando uma inoculação inicial maior. E a partir dos quadros podemos observar que a crescimento de levedura por grama de substrato é maior na S-04, e isso pode ser dado pelo tamanho dessa levedura, pois essa em comparação com as outras é menor, e devido a isso é produzido mais células por grama de substrato metabolizado.

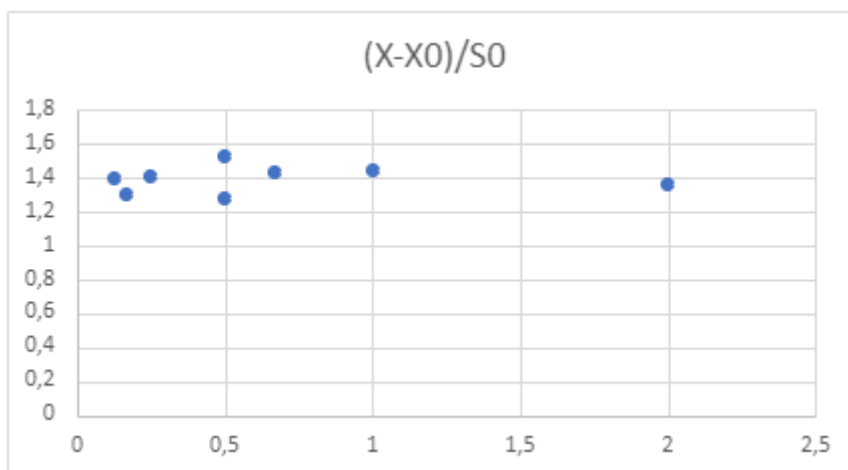
Os gráficos a seguir foram feitos utilizando os dados de rendimento de novas células por substrato inicial no eixo y e no eixo x temos a relação de célula inicial por substrato inicial. Os três gráficos apresentaram resultados semelhantes, onde é possível observar uma tendência de que o rendimento de novas células por substrato cai conforme os valores da relação de célula inicial por substrato inicial aumentam.

FIGURA 1 - RENDIMENTO DE NOVAS CÉLULAS LEVEDURA US-05



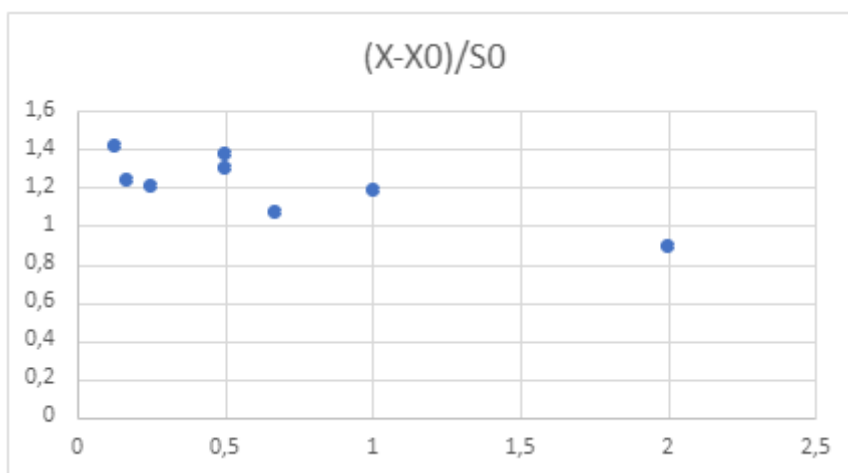
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 2 - RENDIMENTO DE NOVAS CÉLULAS LEVEDURA S-04



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 3 - RENDIMENTO DE NOVAS CÉLULAS LEVEDURA W 34/70



Fonte: O autor (2023).

Em todas as leveduras comerciais estudadas exibidas podemos perceber que existe efeito de inibição pelo substrato, e isso ocorre tanto na taxa velocidade de crescimento como na conversão de substrato em biomassa, porém esse efeito é menor na levedura S-04, podemos estar associando esse efeito ao metabolismo da maltotriose, que é um açúcar relativamente difícil para a levedura cervejeira metabolizar. A S-04 já naturalmente possui maior dificuldade em metabolizar a maltotriose, então esse efeito pode ser menor nela. A atenuação máxima da levedura influencia a concentração final, uma vez que esse parâmetro dita quanto do substrato será consumido. Dentre as leveduras estudadas, a atenuação da S-04 é a menor, com apenas 75%, onde 25% dos açúcares não são metabolizados devido a sua baixa capacidade de metabolizar a maltotriose.

4.1 MODELO MATEMÁTICO

Para o desenvolvimento do modelo é importante definir os parâmetros de cada levedura, e estas estão apresentadas nos quadros abaixo.

QUADRO 4 - PARÂMETROS DO MODELO PARA A LEVEDURA US-05

Parâmetros	Definição	Valores
máxima atenuação	Porcentagem do substrato consumido	82%
μ_{max}	Velocidade específica de crescimento máximo	0.16
Km	Constante de Monod	0.05 g/ml
Ys	Constante de proporcionalidade substrato	1.62 bi cell / g sub
Smax	Concentração de inibição do crescimento	0.45
ni	Constante de inibição	1.5
k	Concentração de substrato na atenuação máxima	0.18

Fonte: O autor (2023).

QUADRO 5 - PARÂMETROS DA LEVEDURA S-04

Parâmetros	Definição	Valores
máxima atenuação	Porcentagem do substrato consumido	75%
μ_{max}	Velocidade específica de crescimento máximo	0.21
Km	Constante de Monod	0.05 g/ml
Ys	Constante de proporcionalidade substrato	1.96 bi cell / g sub
Smax	Concentração de inibição do crescimento	0.45
ni	Constante de inibição	1.5
k	Concentração de substrato na atenuação máxima	0.14

Fonte: O autor (2023).

QUADRO 6 - PARÂMETROS PARA A LEVEDURA W-34/70

Parâmetros	Definição	Valores
máxima atenuação	Porcentagem do substrato consumido	82%
μ_{max}	Velocidade específica de crescimento máximo	0.16
Km	Constante de Monod	0.05 g/ml
Ys	Constante de proporcionalidade substrato	1.62 bi cell / g sub
Smax	Concentração de inibição do crescimento	0.45
ni	Constante de inibição	1.5
k	Concentração de substrato na atenuação máxima	0.18

Fonte: O autor (2023)

Os gráficos a seguir foram obtidos através do modelo, variando a concentração de substrato e de levedura para as três leveduras comerciais estudadas. Com estes gráficos adquiridos a partir do nosso modelo matemático, foi possível observar o efeito de inibição pelo substrato, pois a curva de crescimento fica constante mais rapidamente quando ocorre o aumento de substrato inicial.

FIGURA 4 - S-04 0.1 Bi/ml, 20 °P

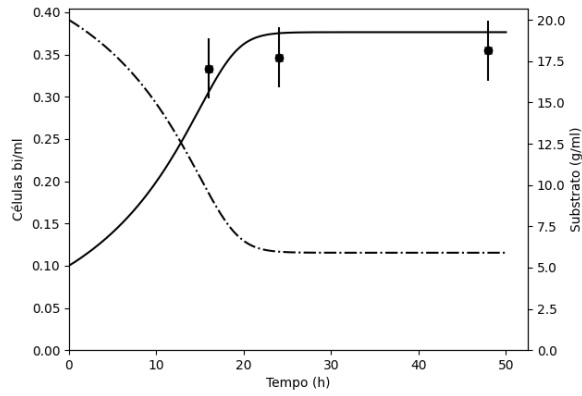


FIGURA 5 - S-04 0.1 Bi/ml, 10.°P

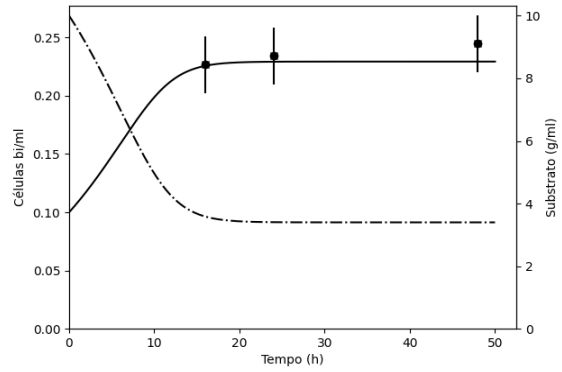


FIGURA 6 - S-04 0.1 Bi/ml, 5 °P

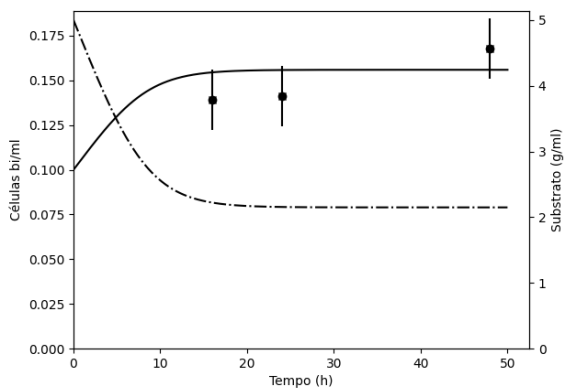
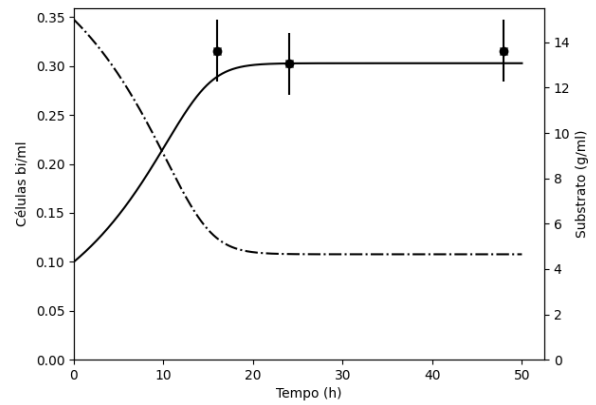


FIGURA 7 - S-04 0.1 Bi/ml, 15 °P



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: Curva de crescimento da levedura S-04 em concentração inicial de 0,1 bilhões de células por ml, variando as concentrações de substrato inicial, sendo este consumido pela levedura. Pontos no gráfico obtidos por meio dos dados laboratoriais.

FIGURA 8 - S-04 0.025 Bi/ml, 10 °P

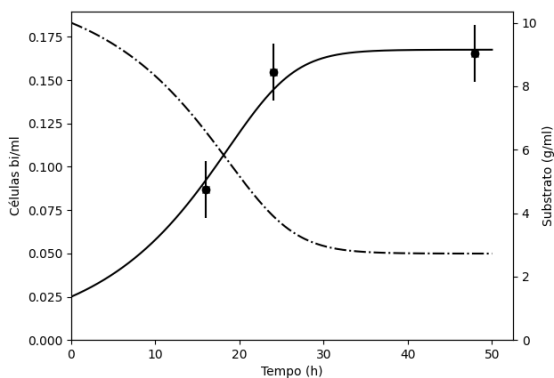


FIGURA 9 - S-04 0.025 Bi/ml, 20 °P

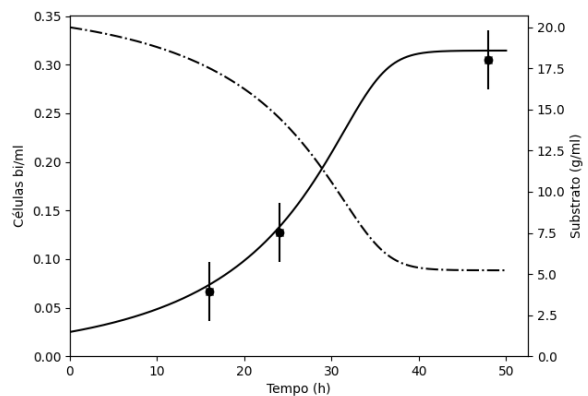


FIGURA 10 - S-04 0.025 Bi/ml, 15 °P

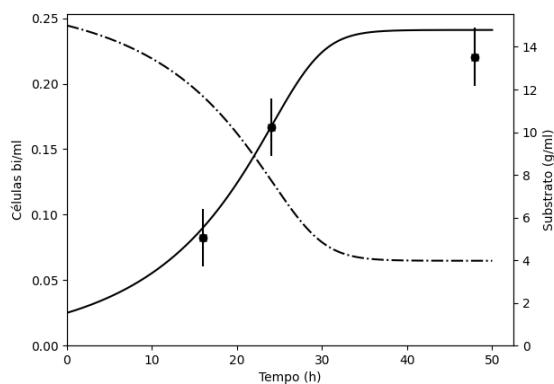
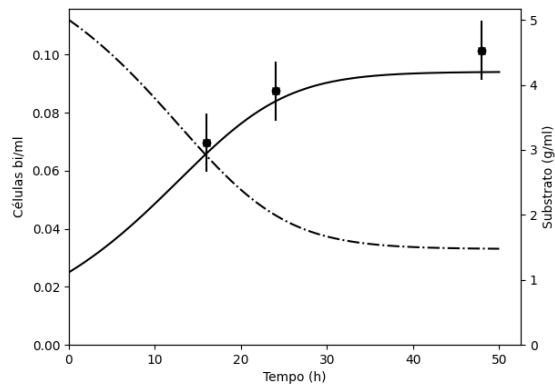


FIGURA 11 - S-04 0.025 Bi/ml, 5 °P



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: Curva de crescimento da levedura S-04 em concentração inicial de 0,025 bilhões de células por ml, variando as concentrações de substrato inicial, sendo este consumido pela levedura. Pontos no gráfico obtidos por meio dos dados laboratoriais.

FIGURA 12 - US-05 0.1 Bi/ml, 10°P

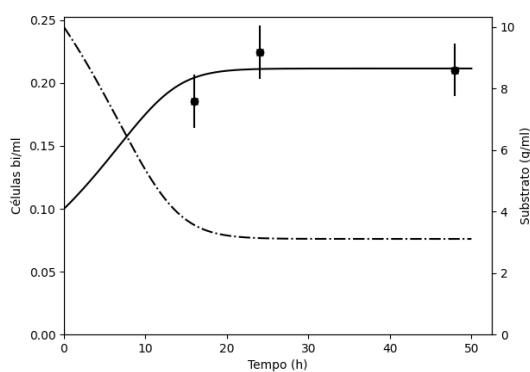


FIGURA 13 - US-05 0.1 Bi/ml, 20 °P

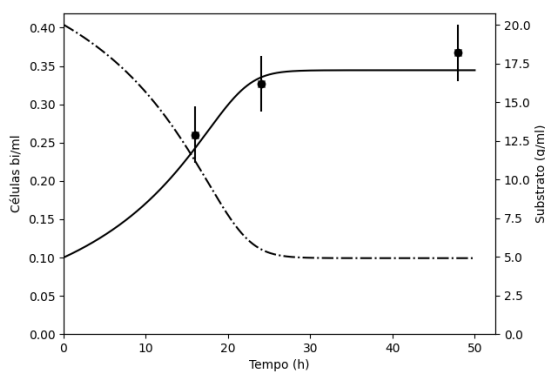


FIGURA 14 - US-05 0.1 Bi/ml, 15°P

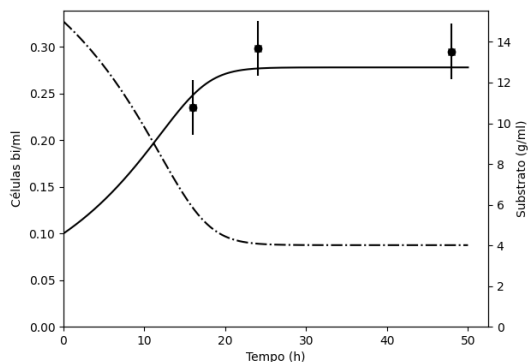
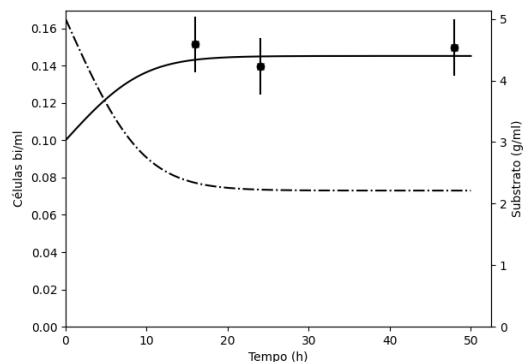


FIGURA 15 - US-05 0.1 Bi/ml, 5 °P



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: Curva de crescimento da levedura US-05 em concentração inicial de 0,1 bilhões de

células por ml, variando as concentrações de substrato inicial, sendo este consumido pela levedura. Pontos no gráfico obtidos por meio dos dados laboratoriais.

FIGURA 16 - US-05 0.025 Bi/ml, 10 °P

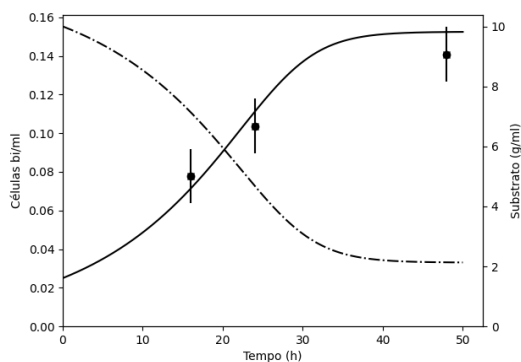


FIGURA 17 - US-05 0.025 Bi/ml, 20 °P

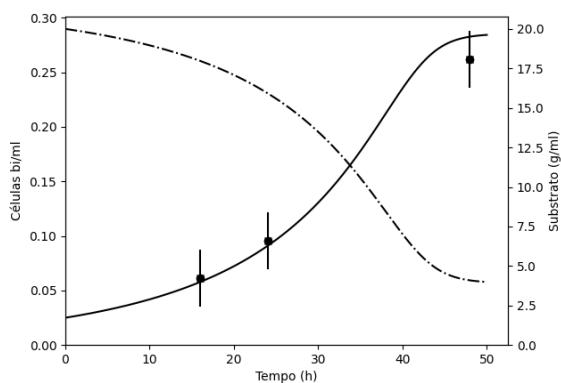


FIGURA 18 - US-05 0.025 Bi/ml, 15 °P

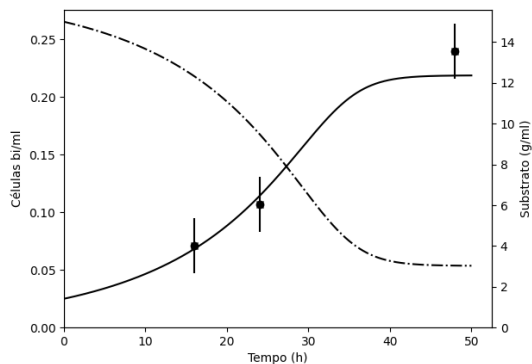
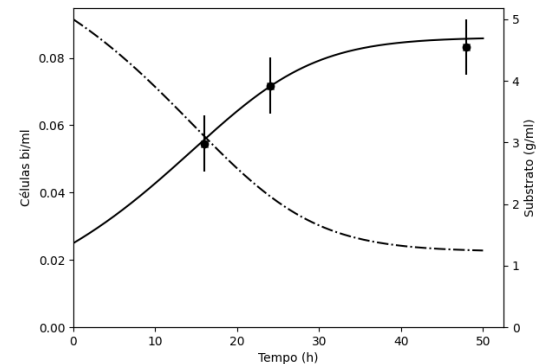


FIGURA 19 - US-05 0.025 Bi/ml, 5 °P



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: Curva de crescimento da levedura US-05 em concentração inicial de 0,025 bilhões de células por ml, variando as concentrações de substrato inicial, sendo este consumido pela levedura. Pontos no gráfico obtidos por meio dos dados laboratoriais.

FIGURA 20 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 10 °P

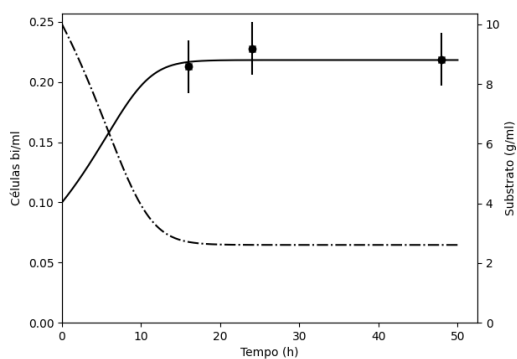


FIGURA 21 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 20 °P

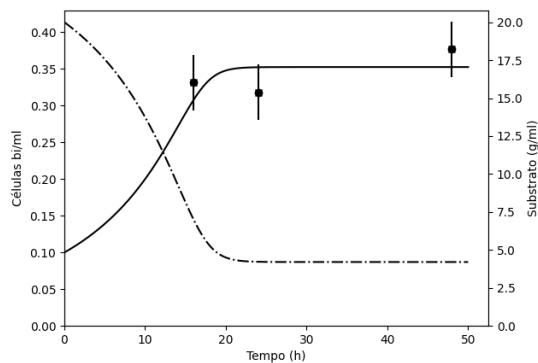


FIGURA 22 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 15 °P

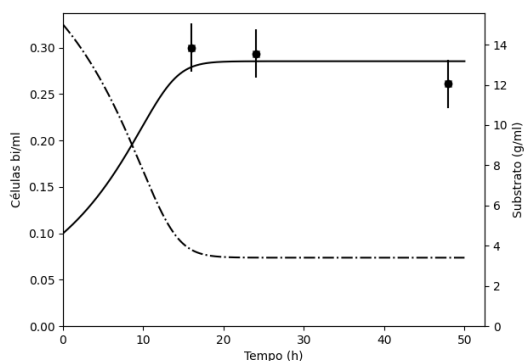
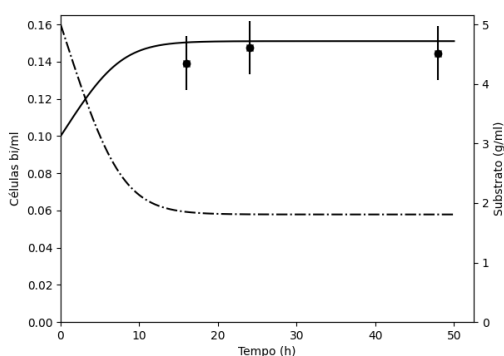


FIGURA 23 - W-34/70 0.1 Bi/ml, 5 °P



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: Curva de crescimento da levedura W-34/70 em concentração inicial de 0,1 bilhões de células por ml, variando as concentrações de substrato inicial, sendo este consumido pela levedura. Pontos no gráfico obtidos por meio dos dados laboratoriais.

FIGURA 24 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 10 °P

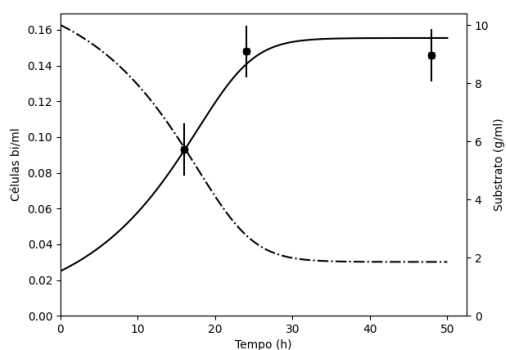


FIGURA 25 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 20 °P

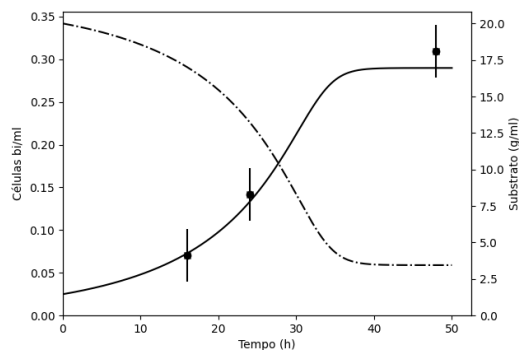


FIGURA 26 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 15 °P

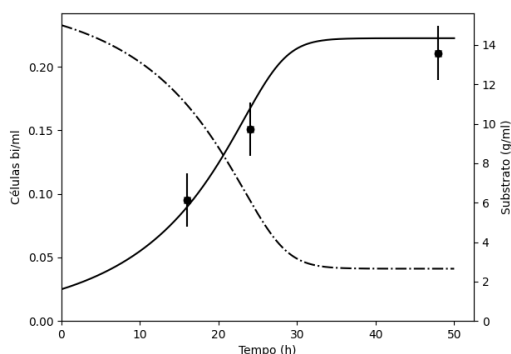
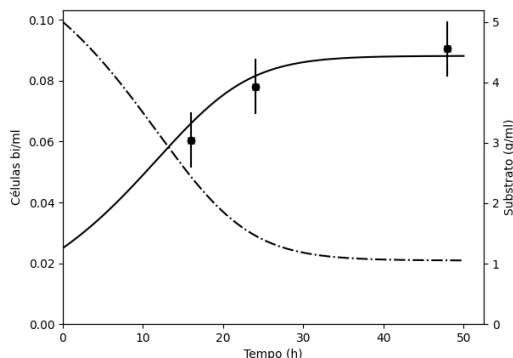


FIGURA 27 - W-34/70 0.025 Bi/ml, 5 °P



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: Curva de crescimento da levedura W-34/70 em concentração inicial de 0,025 bilhões de células por ml, variando as concentrações de substrato inicial, sendo este consumido pela levedura. Pontos no gráfico obtidos por meio dos dados laboratoriais.

A variabilidade experimental foi obtida por meio do cálculo do desvio padrão dos ensaios, que foi posteriormente expresso como uma porcentagem do valor médio, resultando numa estimativa de erro experimental de 10,5%, e este valor representa uma medida de dispersão dos dados experimentais, oferecendo uma indicação de precisão ao protocolo experimental sob as condições testadas. Desta forma, nos gráficos são apresentados os valores obtidos por meio dos experimentos realizados em laboratório, como uma margem de variação de 10,5%, onde podemos observar que a curva de crescimento celular e consumo de substrato condiz com os dados obtidos, validando o modelo matemático.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou a avaliação detalhada de leveduras comerciais, indicando a ocorrência de inibição pelo substrato em todas as espécies analisadas. Tal efeito é observável tanto na taxa de velocidade de crescimento celular quanto na conversão de substrato em biomassa. No entanto, a levedura S-04 demonstrou uma menor susceptibilidade a este efeito inibitório. Foi ainda notado que, embora haja um aumento na taxa de crescimento celular proporcional à quantidade inicial de levedura, este incremento não é suficientemente expressivo para justificar o uso de uma concentração mais elevada de leveduras. Essa observação sugere um ponto de saturação na taxa de crescimento que limita a eficiência de uma maior inoculação inicial. O modelo matemático proposto foi capaz de prever os dados experimentais dentro da faixa de erro estimada. Este modelo tem o potencial de auxiliar na otimização das condições de propagação e oferece um recurso útil tanto para cervejeiros caseiros quanto profissionais na previsão de suas propagações de levedura.

REFERÊNCIAS

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. *In*: BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. 2. ed. São Paulo: Edgar Blutcher, 2001. p. 123-178. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521215189/>. Acesso em: 26 jun. 2023.

CARVALHO, Giovani Brandão Mafrá de *et al.* ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO: 1º PARTE – AS LEVEDURAS. **Analytica**, [s. l], v. 25, n. 1, p. 36-42, out. 2006.

CORADELLO, Luiz Fernando C.. **Condições de propagação e revitalização para a produção de etanol pela linhagem IQAr/45-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações sucessivas**. 2012. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

GALVÃO, R *et al.* **Estudo da Taxa de Crescimento de Microorganismos e Proposta de Modelo para Produção de Biomassa de *Haematococcus pluvialis***. *In*: INTERNACIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 3., 2011. São Paulo.

GODOY, Victor Ribeiro de. **FERMENTAÇÃO DE MALTOTRIOSE POR LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RECOMBINANTES**. 2015. 79 f. Dissertação (Pós Graduação) - Curso de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MORAIS, Maria Suenia Nunes de. **MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE UM PROCESSO FERMENTATIVO COM SISTEMA DE MONITORAMENTO VIA SUPERVISÓRIO**. 2019. 62 f. TCC (Doutorado) - Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2019.

OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz de. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. 2011. 45 f. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia Ambiental e Industrial, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA, Priscilla dos Santos de. **Estratégias para produção de leveduras cervejeiras**. 2019. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

OLIVEIRA, Samuel Filipe Gonçalves. **Instalação de um reator de propagação de leveduras em microcerveja**. 2017. 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Industrial e Ambiental, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2017.

PORTO, Lia de Mendonça. **MODELAGEM DE PROCESSO INDUSTRIAL DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA COM REATORES DE MISTURA LIGADOS EM SÉRIE**. 2005. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SANTOS, Andrews Messias Barbosa. **AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CAPACIDADE PRODUTIVA DE ETANOL DA ESPÉCIE SACCHAROMYCES CEREVISIAE PROVENIENTE DE MARCAS COMERCIAIS**. 2022. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

UCHOA JUNIOR, Plínio Pinto de Mendonça. **Influência da temperatura, concentração de inóculo e concentração do substrato no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. 1995. 218 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

WHITE, Chris; ZAINASHEFF, Jamil. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. 5.ed. United States: Brewers Publications, 2010. 304 f.