



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MATHEUS DE PAULA TENÓRIO

**ANÁLISE DA CINÉTICA, VIABILIDADE E EFICIÊNCIA DE LEVEDURAS DE
CERVEJAS**

Recife
2023

MATHEUS DE PAULA TENÓRIO

**ANÁLISE DA CINÉTICA, VIABILIDADE E EFICIÊNCIA DE LEVEDURAS DE
CERVEJAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
de Engenheiro Químico.

Orientador (a): Prof.^a Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Tenório, Matheus de Paula.

Análise da cinética, viabilidade e eficiência de leveduras de cervejas /
Matheus de Paula Tenório. - Recife, 2023.
48 : il., tab.

Orientador(a): Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química -
Bacharelado, 2023.

1. Fermentação alcoólica. 2. Levedura cervejeira. 3. Produção de Etanol. 4.
Saccharomyces cerevisiae. I. Palha, Maria de Los Angeles Perez Fernandez.
(Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)

MATHEUS DE PAULA TENÓRIO

**ANÁLISE DA CINÉTICA, VIABILIDADE E EFICIÊNCIA DE LEVEDURAS DE
CERVEJAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
de Engenheiro Químico.

Aprovado em: 20/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ
Data: 05/06/2023 11:10:45-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª. Drª. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO CARLOS DUARTE COELHO
Data: 30/05/2023 15:08:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Antônio Carlos Duarte Coelho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 CRESCENCIO ANDRADE SILVA FILHO
Data: 05/06/2023 14:49:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. MSc. Crescênio Andrade da Silva (Examinador Externo)
Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste.

Dedico este trabalho aos meus pais, J. Tenório e F. Cunha que
sobraram esforços e dedicação para a minha educação e
conclusão deste curso.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, que obtive todo conhecimento necessário para me tornar quem eu sou hoje.

Aos meus pais, que na maioria das vezes, mesmo sem condições, nunca deixaram faltar nada nem a mim nem a meus irmãos.

À minha companheira Bárbara, pela amizade, o amor, a compreensão, paciência e apoio.

À minha orientadora, Prof.^a Maria de Los Angeles, por toda paciência, aprendizado, dedicação, acolhimento e disponibilidade.

À equipe de técnicas, especialmente a Gisele e Ceça, por toda paciência e dedicação, foram primordiais para este trabalho.

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de fungo unicelular que é amplamente utilizada em diversas aplicações, sendo uma das mais importantes a produção de alimentos fermentados, como pães, cervejas e vinhos. Além disso, a *Saccharomyces cerevisiae* também é usada em outras aplicações, como na produção de etanol, na biotecnologia, na produção de enzimas e na pesquisa científica. A levedura é um dos principais ingredientes da cerveja e é responsável pela transformação do açúcar em álcool e dióxido de carbono, via processo fermentativo. Este trabalho traz uma comparação da cinética de fermentação utilizando duas leveduras comerciais pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* fabricadas pela Fermentis®, à S-04 e a S-33. Para isso, foram estudados parâmetros como crescimento celular, consumo de substrato, produção de etanol e liberação de CO₂. A levedura S-04 obteve um crescimento celular mais rápido, apesar de menor. Já a levedura S-33 obteve maior crescimento celular e maior velocidade de consumo de substrato, atenuando a fermentação em 24h, 6h a menos que a S-04. No entanto, para produção de etanol, a levedura S-33 foi a que mais se aproximou de 6 ml, ficando com 5,9 ml de etanol para 100ml de solução que evidencia um bom resultado. Por sua vez, à S-04 ficou um pouco abaixo com apenas 3,75 ml de etanol, tornando a levedura S-33 mais atrativa em termos de processo fermentativo.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, Levedura cervejeira, Produção de Etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, S-04, S-33.

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a species of unicellular fungus that is widely used in several applications, one of the most important being the production of fermented foods such as bread, beer and wine. In addition, *Saccharomyces cerevisiae* is also used in other applications such as ethanol production, biotechnology, enzyme production and scientific research. Yeast is one of the main ingredients of beer and is responsible for transforming sugar into alcohol and carbon dioxide via the fermentation process. This work brings a comparison of fermentation kinetics using two commercial yeasts belonging to the species *Saccharomyces cerevisiae* manufactured by Fermentis®, S-04 and S-33. For this, parameters such as cell growth, substrate consumption, ethanol production and CO₂ release were studied. The yeast S-04 obtained a faster cell growth, although smaller. Yeast S-33, on the other hand, obtained greater cell growth and faster substrate consumption, attenuating fermentation in 24h, 6h less than S-04. However, for ethanol production, yeast S-33 was the closest to 6 ml, getting 5.9 ml of ethanol for 100 ml of solution, which shows a good result. On the other hand, the S-04 was a little lower with only 3.75 ml of ethanol, making the S-33 yeast more attractive in terms of the fermentation process.

Key-words: Alcoholic fermentation, Brewing yeast, Ethanol production, *Saccharomyces cerevisiae*, S-04, S-33.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do meio fermentativo	29
Tabela 2	Diferença entre os pesos do balão por perda de CO ₂ durante a fermentação	36
Tabela 3	Resultados para o crescimento celular da S-33	37
Tabela 4	Resultados para o crescimento celular da S-04	38
Tabela 5	Resultados para concentração da glicose de ambas leveduras	40
Tabela 6	Resultados para a produção de etanol	42
Tabela 7	Fatores de conversão	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de adição do fosfato à glicose	19
Figura 2	Isomerização da glicose-6-fosfato	19
Figura 3	Fosforilação da F6P para Frutose-1,6-bisfosfato	20
Figura 4	Processo de clivagem da frutose-1,6-bisfosfato	20
Figura 5	Processo de conversão da diidroxiacetona-fosfato	21
Figura 6	Adição de fosfato ao gliceraldeído-3-fosfato e transferência de elétrons para o NAD ⁺	21
Figura 7	Conversão do 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato	21
Figura 8	Formação do 2-fosfoglicerato	22
Figura 9	Processo de desidratação do 2-fosfoglicerato	22
Figura 10	Formação do piruvato	23
Figura 11	Câmara de Neubauer	25
Figura 12	Células vivas (incolor) e células mortas (azul)	26
Figura 13	Leveduras Fermentis S-04 e S-33	27
Figura 14	Ordem de contagem	28
Figura 15	Fermentação com balão de 3L para leveduras S-33 (esquerda) e S-04 (direita)	30
Figura 16	Fermentação com balão de 0,5L para leveduras S-33 (esquerda) e S-04 (direita)	30
Figura 17	Ebuliômetro e régua, utilizados para medição de etanol	32
Figura 18	Viabilidade da levedura S-04	33
Figura 19	Viabilidade da levedura S-33	34
Figura 20	Viabilidade das leveduras S-33 e S-04	35
Figura 21	Análise gráfica da C _{total} de células x tempo para S-33	38
Figura 22	Análise gráfica da C _{total} de células x tempo para S-04	39
Figura 23	Comparação entre as leveduras S-33 e S-04	39
Figura 24	Comparação entre as leveduras S-33 e S-04 em relação ao consumo de substrato	41
Figura 25	Comparação entre as leveduras S-33 e S-04 em relação a produção de etanol	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVO GERAL	13
1.1.1	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	HISTÓRIA CERVEJEIRA	15
2.2	<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	15
2.3	LEVEDURAS FERMENTIS S-04 E S-33	16
2.3.1	Levedura Fermentis S-04	16
2.3.2	Levedura Fermentis S-33	17
2.4	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	18
2.4.1	Etanol	23
2.5	MÉTODO DE CONTAGEM DE LEVEDURAS	23
2.5.1	Câmara de Neubauer	24
2.6	MÉTODO DNSA	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	MICROORGANISMO	27
3.2	VIABILIDADE CELULAR	28
3.3	CINÉTICA	29
3.3.1	Concentração de Glicose	31
3.3.2	Produção de Etanol	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1	VIABILIDADE CELULAR	33
4.1.1	Viabilidade S-04	33
4.1.2	Viabilidade S-33	34
4.1.3	Comparação S-33 e S-04	34
4.2	ANÁLISE DOS PARAMETROS CINÉTICOS	35
4.2.1	Liberação de CO₂	36
4.2.2	Análise do crescimento celular	37
4.2.2.1	Crescimento Celular da S-33	37
4.2.2.2	Crescimento Celular da S-04	38
4.2.2.3	Comparação entre S-33 e S-04	39
4.2.3	Análise da concentração de glicose	40

4.2.4	Análise da produção de Etanol	41
4.3	CÁLCULO DE PARÂMETROS PARA CADA FERMENTAÇÃO	43
5	CONCLUSÃO	45
6	REFERÊNCIAS DA LITERATURA	46

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o homem começou a utilizar bebidas fermentadas há 30 mil anos, sendo que a produção de cerveja deve ter se iniciado por volta de 8.000 a.C. Essa bebida foi desenvolvida paralelamente aos processos de fermentação de cereais e difundiu-se lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevada nas antigas sociedades estáveis (AQUARONE et al., 2001).

A principal matéria-prima da cerveja é a levedura. Atualmente, devido a sua diversidade de atividades biológicas, as leveduras tornam-se fortes candidatas a uma ampla gama de aplicações, dentre elas, a fermentação para produção de cerveja (HATOUM, 2012). As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Também pertencem a esta espécie, as leveduras alcoólicas outrora classificadas como *S. uvarum* e *S. carlsbenguensis* (AQUARONE et al., 2001).

Nas cervejarias, faz-se uma classificação empírica baseada no comportamento da levedura cervejeira durante a fermentação. Se durante o processo fermentativo, a levedura sobe para a superfície do mosto, ela é denominada “de alta fermentação” e se ao final do processo fermentativo decanta no fundo do fermentador, é chamada de “baixa fermentação” (AQUARONE et al., 2001).

Um bom cervejeiro deve ter conhecimento das propriedades essenciais e suplementares de um fermento, a fim de fazer a melhor escolha do tipo de levedura que irá utilizar no processo fermentativo. Dentro desse contexto, três características têm fundamental importância em qualquer processo de seleção de leveduras cervejeiras: a levedura deve produzir aroma e sabor agradáveis; há a necessidade de que a levedura cresça adequadamente e, por fim, se há habilidade ou não de flocular e se os flocos formados sobem ao topo ou decantam na base do fermentador (AQUARONE et al., 2001). A fermentação é o processo no qual a levedura trabalha, neste caso, transformando os açúcares (glicose e frutose) principalmente em etanol e CO₂. Portanto, procura-se, então, administrar a fermentação de modo a favorecer seu crescimento e a manutenção e produção dos aromas e sabores desejáveis no produto final, a cerveja. Neste sentido, torna-se essencial o controle sobre algumas variáveis importantes desse processo como, por exemplo, a temperatura de fermentação, a duração, a contrapressão, o pH, a escolha adequada da levedura e a quantidade dela a ser empregada (AQUARONE et al., 2001).

Portanto, o estudo das características fermentativas das leveduras é fundamental para compreender o perfil da bebida que se deseja obter e aprimorar a escolha do microrganismo a ser utilizado (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Além disso, a disponibilidade de linhagens de leveduras é variada e os parâmetros fisiológicos que as diferenciam são muitos, entre eles: taxa de crescimento, velocidade fermentativa, capacidade de atenuação e floculação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Estas diferenças irão resultar no produto final quanto ao seu teor alcoólico, corpo, textura, carbonatação, turvação, formação de espuma, aroma, sabor, *off-flavors* (diferente do padrão), etc. Com isto, conclui-se que o mosto fermentado com a linhagem adequada resultará em características típicas e altamente desejadas (HUGHES, 2013).

Diante deste cenário de dependência dos insumos importados, e a fim de atender demandas mercadológicas atuais, faz-se necessário vencer o desafio científico e tecnológico de seleção e produção de leveduras cervejeiras com qualidade em território nacional.

O uso de leveduras comerciais na produção de bebidas alcoólicas é uma prática comum em todo o mundo. As leveduras são responsáveis pela fermentação do açúcar em álcool, produzindo o sabor e o aroma característicos de cada bebida. Entre as diversas marcas de leveduras comerciais disponíveis no mercado, a Fermentis é uma das mais conhecidas e utilizadas pelos produtores.

Dentre as diferentes cepas de leveduras comerciais produzidas pela Fermentis, as cepas S-04 e S-33 são frequentemente utilizadas na produção de cervejas. A cepa S-04 é uma levedura comercial inglesa do tipo Ale. Selecionada por sua característica de rápida fermentação e habilidade de formar um sedimento bem compacto ao final da fermentação, ajudando a melhorar a clarificação das cervejas artesanais. Já a cepa S-33 é uma levedura popular de múltiplas funções, que apresenta fortes propriedades de conservação e um desempenho consistente, além de produzir um perfil esplêndido. É usado para uma ampla variedade de cervejas especiais de alta fermentação (cervejas de trigo, tipo belgas, trapistas, entre outras) (LAMAS BREW SHOP, 2023).

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma comparação cinética utilizando duas leveduras comerciais pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* fabricadas pela Fermentis, a S-04

e a S-33 em relação a produção de etanol e consumo do substrato dessas duas leveduras.

1.1.1 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade e a eficiência das leveduras estudadas.
- Acompanhar as corridas fermentativas das leveduras estudadas;
- Calcular os parâmetros cinéticos dos processos fermentativos;
- Comparar as leveduras cervejeiras comerciais;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRIA CERVEJEIRA

Dentre os povos bárbaros que ocupavam a Europa durante o império romano, os de origem germânica destacavam-se na arte de fabricar cervejas. Na idade média, século XIII, os cervejeiros germânicos foram os primeiros a empregar lúpulo na cerveja, conferindo-lhe as características básicas da bebida atual (AQUARONE et al., 2001).

Segundo Hornsey (2016), essa bebida chegou à Europa por meio dos romanos, que espalharam a cultura da cerveja pela região. Durante a Idade Média, os mosteiros assumiram um papel importante na produção de cerveja, com monges como São Bento e São Bernardo desenvolvendo receitas e técnicas de fabricação. A cerveja era uma bebida popular na Europa, mas também era considerada uma alternativa mais segura à água, que muitas vezes estava contaminada.

No século XIX, com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, a fabricação de cerveja tornou-se mais eficiente e higiênica. A invenção do termômetro e a descoberta das leveduras, por Louis Pasteur, foram dois avanços fundamentais na produção de cerveja. As grandes fábricas de cerveja começaram a surgir na Europa e na América do Norte, e novos estilos de cerveja foram criados.

De acordo com Bruwer (2016), no final do século XX, a cerveja artesanal começou a ganhar popularidade em todo o mundo. Cervejeiros caseiros e pequenas cervejarias independentes começaram a experimentar novos ingredientes e técnicas de fabricação, produzindo cervejas com sabores mais complexos e distintos. Hoje em dia, a cerveja artesanal é um movimento global, com festivais, associações e lojas especializadas em todo o mundo.

Em resumo, a história da cerveja é longa e rica em tradição e inovação. Desde os sumérios até os cervejeiros artesanais de hoje, a cerveja tem sido uma parte importante da cultura e da economia em todo o mundo.

2.2. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada em processos de fermentação alcoólica para a produção de bebidas alcoólicas, como cerveja, vinho

e destilados. Durante a fermentação alcoólica, a levedura converte os açúcares presentes (glicose e frutose) no mosto, principalmente, em etanol e dióxido de carbono, gerando assim a bebida alcoólica (DELFINI et al., 2020).

Outro fator importante na fermentação alcoólica, é a disponibilidade de nutrientes para a levedura. A levedura requer uma variedade de nutrientes, incluindo nitrogênio, vitaminas e minerais, para um crescimento e produção de etanol adequados. A falta de nutrientes adequados pode resultar em uma fermentação incompleta ou em uma produção de etanol de baixa qualidade (GOBBI et al., 2020).

Além disso, o controle da temperatura e do pH durante a fermentação alcoólica pode ter um impacto significativo na eficiência da fermentação e na qualidade da bebida produzida. A temperatura ideal para a fermentação varia dependendo da cepa de levedura utilizada e da bebida produzida, mas geralmente varia de 15 a 25 °C. O controle adequado do pH é importante para evitar a formação de compostos tóxicos e melhorar a eficiência da fermentação (BASSO et al., 2016).

Também é importante mencionar que a fermentação alcoólica pode ser afetada por fatores externos, como a presença de contaminantes microbianos e o uso de antibióticos durante o processo de fermentação. Esses fatores podem ter um impacto negativo na qualidade da bebida produzida e podem levar a problemas de saúde pública (BAI et al., 2019).

Em resumo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* desempenha um papel fundamental na fermentação alcoólica e é amplamente utilizada na produção de bebidas alcoólicas.

2.3 LEVEDURAS FERMENTIS S-04 E S-33

A Fermentis é uma empresa especializada em leveduras e outros produtos para fermentação de bebidas alcoólicas, e suas leveduras S-04 e S-33 são amplamente utilizadas na produção de cervejas e outras bebidas fermentadas.

2.3.1 Levedura Fermentis S-04

A levedura S-04 é uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* selecionada pela Fermentis para produção de cervejas ale de alta qualidade. Segundo a empresa, a S-04 é capaz de produzir cervejas com perfil sensorial equilibrado, com notas de malte

e lúpulo bem definido. Alguns estudos têm avaliado o desempenho da S-04 em diferentes condições de fermentação e com diferentes matérias-primas.

Um estudo de Zdaniewicz et al. (2016) avaliou o efeito de diferentes concentrações de glicose, extrato de malte e extrato de malte seco sobre a fermentação da S-04. Os autores observaram que a levedura teve um bom desempenho em todas as condições testadas, com alta eficiência de fermentação e produção de etanol. No entanto, a concentração de extrato de malte seco afetou o perfil sensorial da cerveja, com notas de caramelo mais pronunciadas em concentrações mais altas.

Outro estudo de Oliveira et al. (2017) avaliou o desempenho da S-04 em cervejas produzidas com diferentes tipos de malte, incluindo malte de cevada, trigo, centeio e aveia. Os autores observaram que a levedura teve um bom desempenho em todas as cervejas, com produção de etanol e dióxido de carbono dentro dos valores esperados. No entanto, as cervejas produzidas com malte apresentaram menor eficiência de fermentação e menor produção de compostos voláteis.

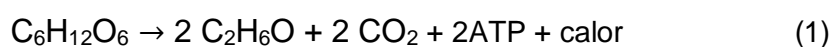
2.3.2 Levedura Fermentis S-33

Analogamente à S-04, a levedura S-33 é uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* selecionada pela Fermentis para produção de cervejas Ale de alta fermentação. De acordo com a empresa, a S-33 é capaz de produzir cervejas com perfil sensorial equilibrado, com notas de malte e ésteres frutados bem definidos. Alguns estudos têm avaliado o desempenho da S-33 em diferentes condições de fermentação e com diferentes matérias-primas.

As leveduras são microrganismos unicelulares responsáveis pela fermentação alcoólica de açúcares em bebidas alcoólicas. Elas desempenham um papel crucial na produção de cervejas, vinhos e outras bebidas fermentadas, influenciando diretamente a qualidade sensorial do produto final.

2.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica ocorre através da atividade enzimática da levedura sobre açúcares fermentescíveis presentes na solução. Nesse processo biológico, a energia fornecida pelas reações de oxidação parcial possibilita o crescimento dos micro-organismos, enquanto a oxidação anaeróbia dos açúcares é utilizada para a formação de etanol e dióxido de carbono, podendo ser demonstrada pela reação global 1 (BASTOS 2010; CINELLI, 2012).



Na produção do etanol a partir de fermentação alcoólica são destacadas 3 fases, são elas: preparo do substrato, fermentação e destilação. O preparo do substrato consiste na obtenção dos açúcares. A fermentação é a etapa onde os açúcares são convertidos em etanol e dióxido de carbono. A destilação é a etapa onde o etanol é separado. Para isso, primeiro é separado do substrato fermentado e depois o etanol é purificado e concentrado (CORREA, 2015).

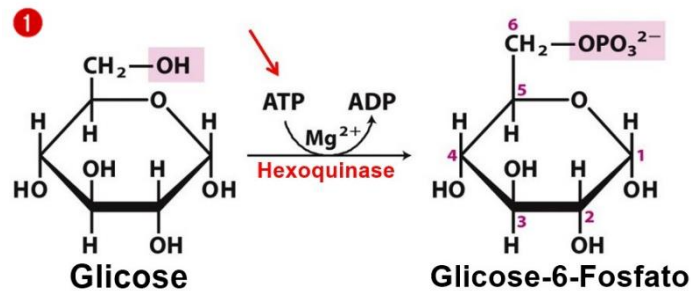
A via glicolítica é uma via central, quase universal de catabolismo de carboidratos. É o primeiro estágio do metabolismo, e consiste em um processo anaeróbico (processo de fermentação), com saldo positivo de 2 ATP (adenosina trifosfato) e 2 piruvatos (que podem ser convertidos a lactato ou a Acetil-CoA, e entrar no Ciclo de Krebs).

Depois de todo processo para a glicose entrar dentro da célula, inicia-se a glicólise, que possui 10 reações para a conversão da glicose.

- 1ª etapa (primeiro gasto de energia e reação irreversível)

Pode-se definir a glicose como uma molécula bastante “inquieta”, caso ela não for presa por alguma ação, acaba escapando para fora da célula. Por isso, ocorre um processo de fosforilação da glicose, pela enzima Hexoquinase, para que a glicose permaneça na célula. O ATP doa um fosfato ao carbono 6 (C-6) da molécula de glicose e, portanto, o produto desta reação será glicose-6-fosfato como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Processo de adição do fosfato à glicose



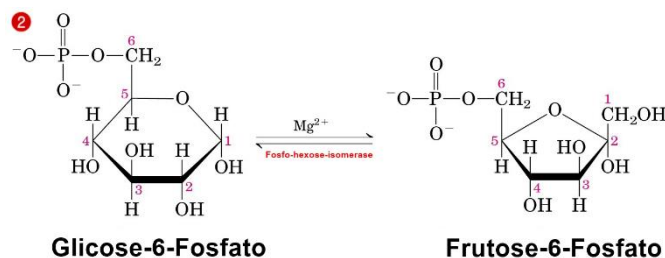
Fonte: (TEODORO, 2012)

Para a adição do fosfato (fosforilação) à glicose, há o primeiro gasto de energia. Note que para que a reação ocorra, a hexoquinase requer o cofator Mg^{2+} , porque ele protege as cargas negativas do grupo fosforil do ATP. O complexo $MgATP^{2-}$ promove maior facilidade para a ligação do grupo - OH da glicose ao fosfato, ativando a glicose e mantendo-a dentro da célula.

- 2ª etapa (reação reversível)

Nesta etapa ocorre a isomerização reversível da glicose-6-fosfato, formando frutose-6-fosfato como mostrado na Figura 2. A enzima que catalisa esta reação é a fosfo-hexose-isomerase.

Figura 2: Isomerização da glicose-6-fosfato



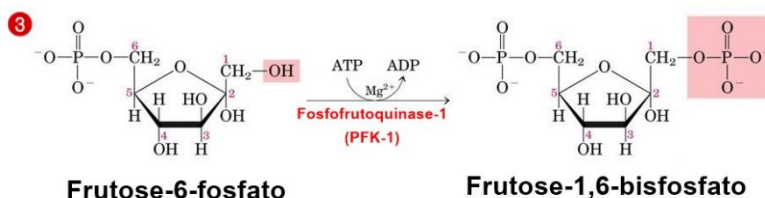
Fonte: (TEODORO, 2012)

- 3ª etapa (segundo gasto de energia e reação irreversível)

De acordo com a Figura 3, a frutose-6-fosfato é fosforilada, produzindo frutose-1,6-bisfosfato. Esta reação é acoplada à hidrólise de ATP, constituindo então o

segundo gasto de energia. A enzima que catalisa esta reação é a fosfofrutoquinase-1 (principal enzima reguladora da glicose).

Figura 3: fosforilação da F6P para Frutose-1,6-bisfosfato.

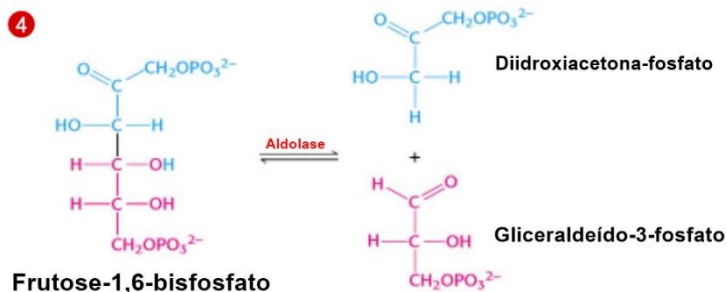


Fonte: (TEODORO, 2012)

- 4ª etapa (reação reversível)

Ocorre a divisão (clivagem) da frutose-1,6-bisfosfato em dois fragmentos de 3 carbonos, formando diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato mostrado na Figura 4. A enzima que catalisa esta reação é a aldolase.

Figura 4: Processo de clivagem da frutose-1,6-bisfosfato.

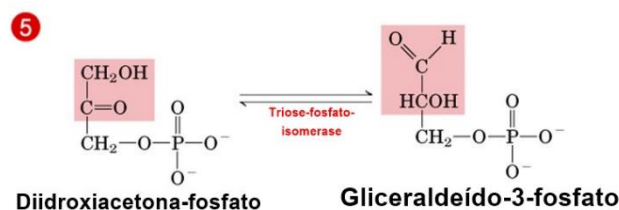


Fonte: (TEODORO, 2012)

- 5ª etapa (reação reversível)

Apenas o gliceraldeído-3-fosfato pode ser diretamente degradado nos passos subsequentes da glicólise. Entretanto, a diidroxiacetona-fosfato é convertida reversivelmente em gliceraldeído-3-fosfato, pela enzima triose-fosfato-isomerase. A Figura 5 ilustra essa conversão.

Figura 5: Processo de conversão da diidroxiacetona-fosfato

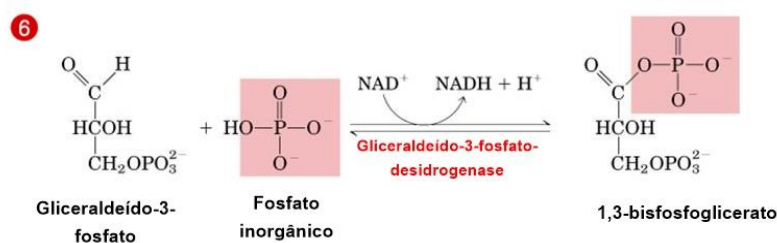


Fonte: (TEODORO, 2012)

Antes de entrar na etapa 6, tem-se que uma molécula de glicose foi convertida em duas de gliceraldeído-3-fosfato e o saldo energético final é negativo, pois foi usado 2 ATPs.

- 6ª etapa (redução do NAD^+ a NADH e reação reversível)

De acordo com a Figura 6, ocorre a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, pela enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.

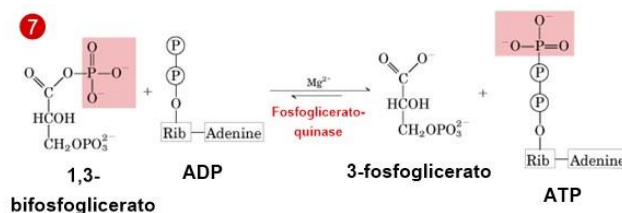
Figura 6: Adição de fosfato ao gliceraldeído-3-fosfato e transferência de elétrons para o NAD^+ 

Fonte: (TEODORO, 2012)

- 7ª etapa (pagamento dos 2 ATPs gastos e reação reversível)

Há a produção de ATP pela fosforilação do ADP. A enzima que catalisa a reação de conversão do 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato é a fosfoglicerato-quinase mostrado na Figura 7.

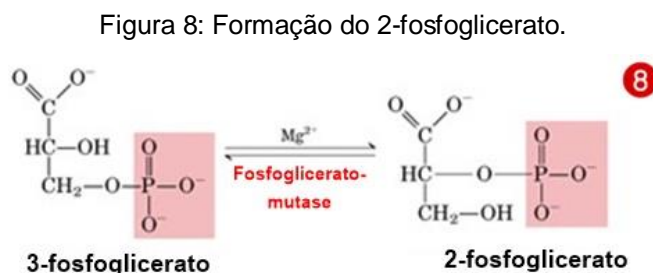
Figura 7: conversão do 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato.



Fonte: (TEODORO, 2012)

- 8ª etapa (reação reversível)

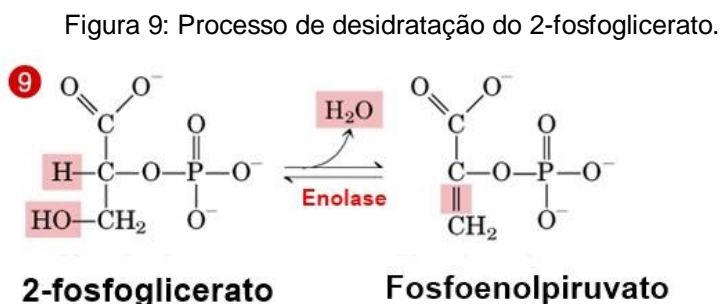
Há um rearranjo do 3-fosfoglicerato, e o fosfato passa do carbono 3 (C-3) para o carbono 2 (C-2) como mostra a Figura 8. Isso acontece pela enzima fosfogliceromutase (ou fosfoglicerato-mutase). Forma-se então o 2-fosfoglicerato.



Fonte: (TEODORO, 2012)

- 9ª etapa (reação reversível)

De acordo com a Figura 9, nesta etapa ocorre a desidratação do 2-fosfoglicerato, formando fosfoenolpiruvato, pela enzima enolase.

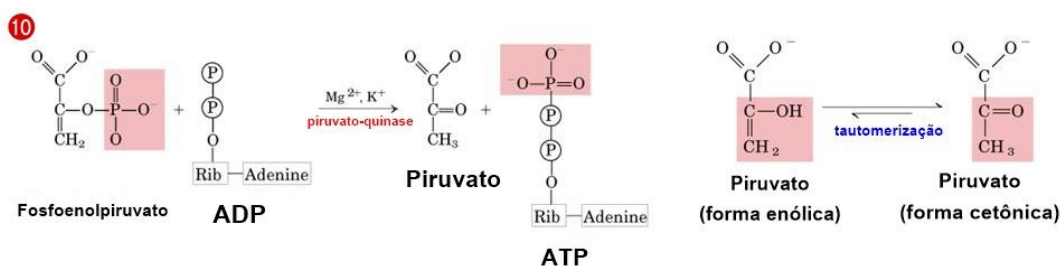


Fonte: (TEODORO, 2012)

- 10ª etapa

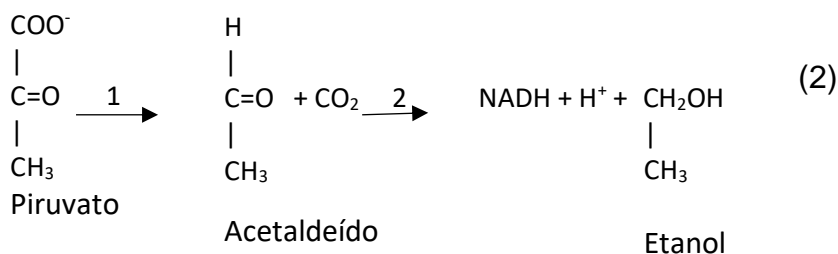
No último passo da via glicolítica, há a transferência de fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP, pela enzima piruvato-quinase, formando o piruvato e ATP. Depois, há uma tautomerização, e o piruvato alcança a forma cetônica como ilustra a Figura 10, que predomina em pH 7,0. Como tudo acontece em dobro, forma-se duas moléculas de piruvato e 2 ATP.

Figura 10: Formação do piruvato.



Fonte: (TEODORO, 2012)

E por fim, para obter a molécula de etanol, ficou-se com:



- 1- Piruvato descarboxilase
- 2- Álcool desidrogenase

2.4.1 Etanol

O etanol é um composto orgânico pertencente à função química álcool e é popularmente conhecido como álcool etílico. Apresenta-se como um líquido incolor e é altamente inflamável. A principal via de obtenção do etanol é pela fermentação de açúcares presentes na cana-de-açúcar (LIMA, 2012).

A origem do nome etanol vem da junção de "etil", que é um radical orgânico, com o sufixo "-ol", que indica a presença de um grupo hidroxila (-OH) em sua estrutura. Essa nomenclatura foi proposta pelo químico alemão Justus Von Liebig em 1834.

2.5 MÉTODO DE CONTAGEM DE LEVEDURAS

A contagem de células fermentativas refere-se à contagem de células de micro-organismos responsáveis pelo processo de fermentação. Essa técnica é comumente utilizada na indústria de alimentos e bebidas, bem como na produção de bioenergia e

biocombustíveis. É bastante importante, pois garante a qualidade e a segurança dos produtos fermentados. Por exemplo, na produção de cerveja, a contagem de células de levedura é um fator crítico que afeta a qualidade da cerveja e o rendimento da produção. Da mesma forma, na produção de iogurte, a contagem de células de bactérias lácticas é um indicador importante da qualidade do produto final (MONGELO, 2012).

A contagem de micro-organismos pode ser realizada por plaqueamento, que é um método clássico que consiste no inóculo de 1 ml em meio de cultura em placa de Petri, podendo levar até 72 horas para ser realizado. Esse tempo de resposta faz com que esse método seja inviável na utilização em empresas como destilarias e cervejarias. Devido a esta limitação, o método adotado pela maioria das empresas é a contagem em câmara de Neubauer, utilizando como indicador de células mortas o azul de metileno preparado em citrato, cujo resultado é imediato e direto (MONGELO, 2012).

2.5.1 Câmara de Neubauer

O método de contagem em câmara de Neubauer é uma técnica utilizada na biologia celular e molecular para determinar o número de células presentes em uma amostra biológica. Este método é amplamente utilizado em diversas áreas da biologia, como na hematologia, na imunologia, na microbiologia e na biotecnologia.

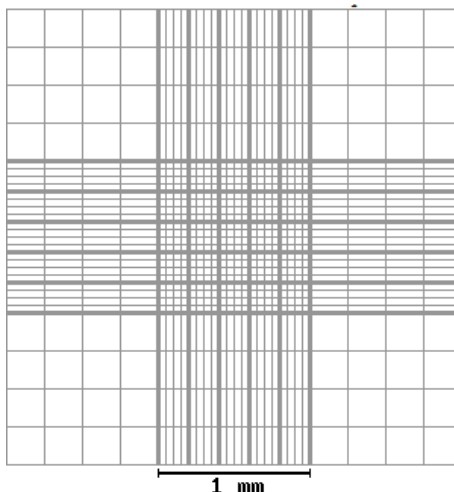
A câmara de Neubauer é uma placa de vidro fina com uma grade de linhas finas que divide a área em pequenos quadrados. Cada quadrado possui uma área conhecida e é numerada. A amostra biológica é colocada na câmara de contagem e a contagem de células é realizada através da observação dos quadrados sob um microscópio. Para realizar a contagem em câmara de Neubauer, é necessário diluir a amostra biológica até uma concentração que permita a contagem das células em uma área específica da câmara. A diluição da amostra é importante para garantir que o número de células em cada quadrado ou retângulo seja adequado para a contagem. As células são contadas manualmente utilizando uma grade de linhas finas como referência. A contagem deve ser realizada em vários quadrados ou retângulos diferentes para garantir a precisão do resultado (MONGELO, 2012).

O número total de células presentes na amostra é calculado multiplicando-se o número médio de células contadas por um fator de diluição. O fator de diluição é

calculado a partir da razão entre o volume total da amostra e o volume da solução de diluição utilizada (MONGELO, 2012).

A Figura 11 ilustra uma representação da imagem da Câmara de Neubauer no microscópio.

Figura 11: Câmara de Neubauer

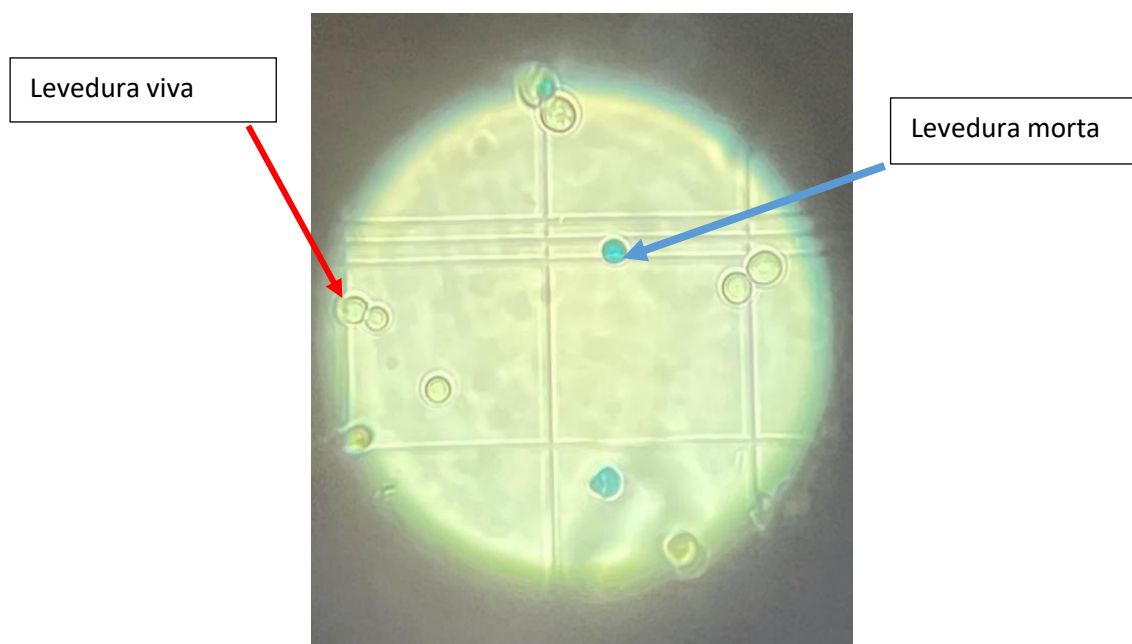


Fonte: http://insilico.ehu.eus/camara_recuento/

Para diferenciar as células vivas das mortas, utilizou-se como corante indicador o azul de metileno, onde misturou-se quantidades iguais de amostra + corante. As células vivas contêm enzimas capazes de reduzir o azul-de-metileno a compostos incolores. Quando as células estão imersas no azul-de-metileno, que penetra no seu interior, as enzimas das células vivas descolorem a matéria corante enquanto as células mortas, nas quais a enzima está inativa, não reagem, ficando com a cor azul.

Na Figura 12, foi possível diferenciar visualmente as células vivas das mortas.

Figura 12: Células vivas (incolor) e células mortas (azul)



Fonte: Auto

2.6 MÉTODO DNSA

O método DNSA (ácido 3,5-dinitrosalicílico) é amplamente utilizado na determinação do teor de glicose em fermentação. Esse método é baseado na reação entre a glicose e o DNSA, resultando na formação de um complexo corado que pode ser quantificado por espectrofotometria (LIMA, 2013). Este complexo obedece à lei de Lambert-Beer, onde a transmitância é proporcional à concentração da substância dissolvida.

Segundo Miller (em 1959), para realizar a reação de DNSA, uma amostra contendo glicose é aquecida em presença do reagente DNSA em meio ácido. A glicose reage com o DNSA, formando um complexo corado que pode ser medido em um espectrofotômetro a 540 nm. Este método apresenta alta sensibilidade e precisão, sendo capaz de detectar glicose em concentrações tão baixas quanto $1 \mu\text{g. ml}^{-1}$. Por essa razão, é amplamente utilizado na indústria alimentícia e de biotecnologia para monitorar a produção de etanol, ácido láctico e outros produtos fermentativos (LIMA, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo em questão foi realizado durante 8 semanas no Laboratório de Microbiologia situado no DEQ/UFPE, onde inicialmente analisou a viabilidade das leveduras cervejeiras S-04 e S-33 (Figura 13) e em seguida a capacidade fermentativa de ambas, especificamente a liberação de CO₂, crescimento celular, consumo de substrato (glicose) e formação de produto (etanol).

Os equipamentos utilizados na elaboração deste trabalho foram: erlenmeyers de 50 ml e 125 ml; balão volumétrico de 50 ml; tubos de ensaio; pipetas graduadas, volumétricas e de Pasteur; câmaras de Neubauer; balança analítica; centrífuga; banho-maria; microscópio óptico; ebuliômetro; espectrofotômetro; béqueres e provetas de diversos tamanhos; espátulas.

Os materiais utilizados foram: corante azul de metileno (0,02% de azul de metileno e 2% de citrato de sódio); Leveduras cervejeiras S-04 e S-33 (Figura 13); meio fermentativo (Tabela 1); reagente DNSA (C₇H₄N₂O₇ em meio alcalino – NaOH e KNaC₄H₄O₆).

3.1 MICRORGANISMO

A S-04 e S-33 foram as duas leveduras comerciais do gênero *Saccharomyces Cerevisiae* escolhidas para o estudo deste trabalho. Na Figura 13 tem a ilustração das embalagens das leveduras estudadas.

Figura 13: Leveduras Fermentis S-04 e S-33



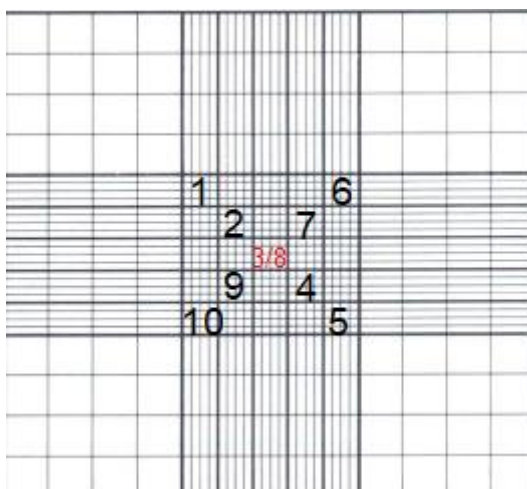
Fonte: <https://www.lamasbrewshop.com.br/>

3.2 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular é feita através da contagem em câmara de Neubauer. Prepara-se uma suspensão de leveduras em água destilada estéril. Para cada suspensão, foi pesado 0,025g de levedura comercial, adicionada a um balão aferido em 50 ml, completado com água destilada até a marca dos 50 ml, obtendo-se uma concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Em seguida, homogeneizou-se a mistura. Em um tubo de ensaio adicionou-se, com auxílio de uma pipeta graduada, 1 ml da suspensão e 1 ml do corante azul de metileno, sendo deixado por 15 minutos. Após esse tempo, com a suspensão homogeneizada e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi adicionada uma alíquota desta mistura a uma câmara de Neubauer para poder iniciar a contagem das leveduras vivas (transparentes) e mortas (azul) no microscópio óptico.

A contagem foi realizada nos quadrantes centrais, seguindo a ordem do 1 até o quadrante 10 como mostrado na Figura 14.

Figura 14: Ordem de contagem



Fonte: <https://www.qconcursos.com/questoes-militares/questoes/f4ea503a-03> (Adaptado pelo autor)

A metodologia adotada foi contar as células que estavam no limite superior e no limite lateral esquerdo do quadrante, desprezando as dos limites inferior e lateral direito. Foi anotado o número de células (vivas e mortas) e a viabilidade celular em cada semana.

Para o cálculo da viabilidade celular de leveduras, foi utilizado a equação 2.

$$viabilidade (\%) = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ de células vivas} + n^{\circ} \text{ de células mortas}} \right) \times 100 \quad (3)$$

3.3. CINÉTICA

As matérias-primas utilizadas para a preparação do meio para as fermentações na análise da cinética estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do meio fermentativo

Ingrediente	Quantidade
Glicose	720 g
Extrato de levedura	14 g
Ureia	7,2 g
KH ₂ PO ₄	7,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,6 g
Água destilada	7L
Leveduras (S-04 e S-33)	3,5 g

Fonte: Autor

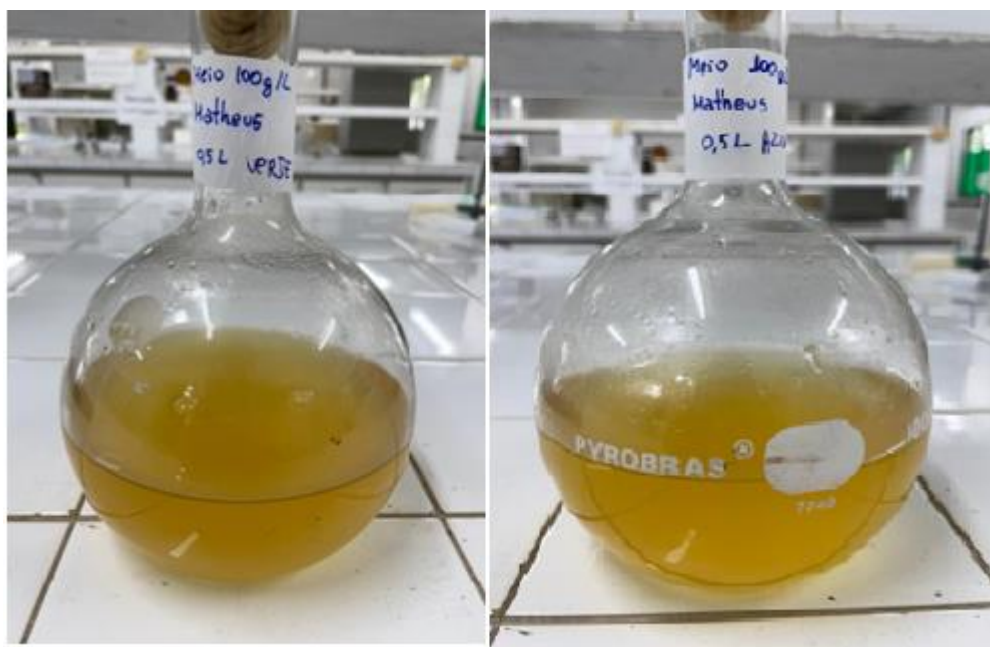
Para a fermentação alcoólica, foi separada cada levedura em dois balões volumétricos diferentes com 3L (Figura 15) e 0,5L (Figura 16), ambas possuindo a concentração 100 g.L⁻¹ de glicose. Onde o balão de 0,5L foi utilizado para o estudo de perda por CO₂ e o balão de 3L para obtenção do teor de glicose, etanol e células. A fermentação durou cerca de 72 h. Durante o processo, foram retiradas amostras de cerca de 40 ml, com intervalos de 6 em 6h. Paralelamente, também foi analisado o decaimento do peso devido do balão de 0,5L para verificar a liberação de CO₂.

Figura 15: Fermentação com balão de 3L para leveduras S-33 (esquerda) e S-04 (direita)



Fonte: Autor

Figura 16: Fermentação com balão de 0,5L para leveduras S-33 (esquerda) e S-04 (direita)



Fonte: Autor

3.3.1 Concentração de glicose

A fim de determinar a concentração de glicose, foi utilizado o método DNSA. Para cada amostra tirada durante o período fermentativo, foi necessário retirar uma alíquota de 0,5 ml utilizando uma pipeta volumétrica, transferindo para um tubo Folin Wu juntamente com 1 ml do reagente DNSA. Sendo a mistura agitada e o tubo colocado em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Paralelamente, preparou-se um tubo em condições análogas, porém sem glicose, o branco da análise. Em seguida, o tubo foi transferido para um banho de gelo. Por fim, o tubo foi completado com água destilada até a marca de 12,5 ml e a mistura homogeneizada.

Para efetuar a leitura da concentração glicose, utilizou-se o espectrômetro marca Spectrum, modelo SP-1105. Em seguida, a amostra foi colocada em uma cubeta de quartzo e levada a leitura no espectrofotômetro regulado para o comprimento de onda de 540 nm, onde se realizou a leitura da intensidade da cor que mede a absorbância em função da concentração de glicose.

3.3.2 Produção de etanol

Para determinação do teor alcoólico, foi utilizado o método do ebuliômetro. Primeiramente foi necessário efetuar a calibração do equipamento com água destilada, adicionando 50 ml na caldeira do equipamento. Logo após, foi adicionado água fria no condensador, onde foi inserido o termômetro. Por último, para iniciar o processo, foi posicionada a chama no local certo e foi observado o aumento da temperatura até a estabilização. A régua do equipamento foi ajustada para a temperatura de ebulição da água finalizando a parte de calibração e iniciando-se a análise do teor de álcool.

Dando início à análise, o processo acima foi repetido substituindo a água destilada por 50 ml da amostra e foi observado os valores da temperatura de ebulição. Por fim, utilizando-se a régua, foi determinada a concentração alcoólica a partir da temperatura de ebulição encontrada. A Figura 17 ilustra o equipamento utilizado juntamente com a régua para determinar o teor de etanol.

Figura 17: Ebuliômetro e régua, utilizados para medição de etanol.



Fonte: (SANTOS, 2022)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão explicados os resultados de cada análise deste trabalho.

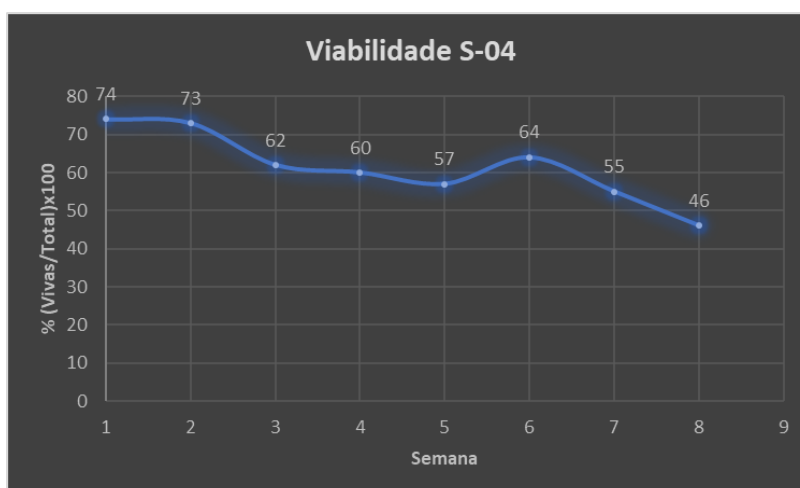
4.1. VIABILIDADE CELULAR

Utilizando o método de contagem em câmara de Neubauer, foi possível calcular a viabilidade celular, a partir da equação 2, de cada levedura comercial estudada durante as 8 semanas

4.1.1 Viabilidade S-04

Foram obtidos os valores descritos no gráfico da Figura 18.

Figura 18: Viabilidade da levedura S-04



Fonte: Autor

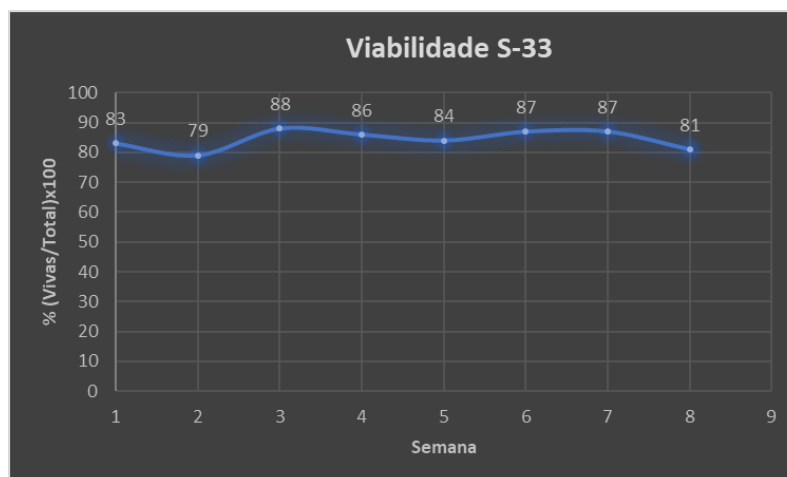
De acordo com o gráfico, a média ficou em torno de 62,77% e o desvio padrão 9,62%. Pode-se perceber que houve uma grande variação no número de células vivas durante o período de tempo, resultando em um desvio padrão relativamente alto. Uma explicação para essa oscilação pode ser devido a situação da levedura S-04 na armazenagem do laboratório bem como o “envelhecimento” natural das células ao longo do tempo de uso do pacote aberto. Outra ideia, são possíveis erros experimentais durante o processo.

Vale ressaltar que o pacote de leveduras esteve parcialmente fechado e mantido sob refrigeração durante as 8 semanas.

4.1.2 Viabilidade S-33

Foram obtidos os valores descritos no gráfico da Figura 19 para a viabilidade da levedura S-33 durante as 8 semanas.

Figura 19: Viabilidade da levedura S-33



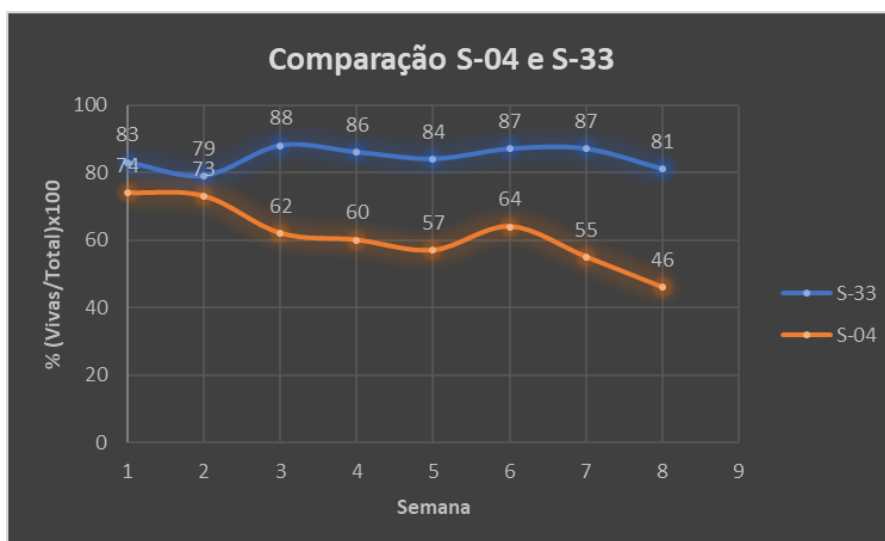
Fonte: Autor

Para o gráfico da Figura 19, notou-se que a oscilação foi menor em relação à levedura S-04, com média de 84,37% e desvio padrão de 2,65% resultando em valores melhores. Neste caso, a viabilidade celular manteve-se, praticamente, constante ao longo do período estudado.

4.1.3 Comparação S-33 e S-04

Diante dos resultados obtidos vistos na Figura 20, a levedura S-33 mostrou-se mais duradoura, com valores de percentual de células vivas semelhantes durante as semanas de estudo. Por sua vez, a S-04 apresentou resultados i de percentual de células vivas em constante decaimento no mesmo período. Vale ressaltar que as duas cepas de leveduras foram estudadas nas mesmas condições experimentais. Neste caso, levando-se em conta o lote de produção da levedura comercial, a S-33 é a mais indicada para utilização, caso o uso aconteça durante determinado período de tempo elevado. Além disso, a mesma mostrou maior viabilidade desde a primeira semana com 83% contra 74% da S-04.

Figura 20: Viabilidade das leveduras S-33 e S-04.



Fonte: Autor

No trabalho de Santos (2022), foi analisado três marcas diferentes proveniente de fermento biológico comercial para levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* onde se obteve uma viabilidade para a marca (A) de 71,97%, marca (B) com 80,37% e marca (C) com 65,55% resultando-se em valores próximos aos das leveduras S-04 e S-33.

4.2. ANÁLISES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Semelhante ao estudo da viabilidade celular, foi utilizado o método de contagem em câmara de Neubauer para determinar a concentração de células no intervalo de tempo de 6 em 6h durante 72h totais de fermentação para as duas leveduras estudadas e assim poder comparar a eficiência de ambas e qual apresenta melhores resultados em relação a consumo do substrato, liberação de CO₂ e produção alcoólica.

4.2.1 Liberação de CO₂

Para análise da liberação de CO₂ das duas leveduras estudadas, o método utilizado consiste apenas em efetuar a leitura do peso durante os intervalos de 6h para os balões contendo 0,5L de meio fermentativo. Para o cálculo de liberação de CO₂, foi subtraído o primeiro ponto do último ponto obtendo-se uma massa equivalente a liberação de gases durante a fermentação.

Tabela 2: Diferença entre os pesos do balão por perda de CO₂ durante a fermentação

Tempo (h)	Peso S-33 (g)	Peso S-04 (g)
0	800,0	746,2
6	799,8	746,0
12	799,1	745,5
24	794,6	743,2
30	791,1	740,5
48	782,4	734,5
54	780,3	733,4
60	778,8	732,6
72	777,6	731,7
78	776,7	730,8

Fonte: Autor

Tendo em vista que este estudo foi feito em laboratório, alguns pontos não foram considerados, pois não teve como efetuar a retirada das amostras às 2h da manhã. Devido também a um erro na logística, o ponto 36h não foi obtido.

Para a levedura S-33, obteve-se uma liberação de 23,3g de gases, destacando-se o CO₂. No entanto, para a S-04 foi de 15,4g. São valores interessantes, tendo em vista que a quantidade de CO₂ liberada pode variar dependendo de vários fatores, como o tipo de levedura utilizada, a temperatura, o teor de açúcar e a quantidade de oxigênio disponível. Logo, não é a quantidade de CO₂ liberada que

determina a qualidade da fermentação alcoólica, mas sim a eficiência da transformação dos açúcares em álcool e a qualidade do produto final.

4.2.2 Análise do crescimento celular

Para determinar a concentração de células vivas em N° células. mm^{-3} , deve-se considerar o volume da câmara de Neubauer. O volume é calculado multiplicando a área da seção transversal da câmara (área de contagem) pela profundidade da câmara de contagem, então ficou-se com $0,0025\text{ mm}^2 \times 0,1\text{ mm} = 0,00025\text{ mm}^3$ de volume. Considerando que cada quadrante tem 16 quadrículos menores, como foram contados 10 quadrados, tem-se 160 quadrículos. Com isso, calcula-se o volume total de $0,04\text{ mm}^3$. Além disso, o fator de diluição da suspensão de leveduras deverá ser multiplicado pelo número de células contadas.

4.2.2.1 Crescimento Celular da S-33

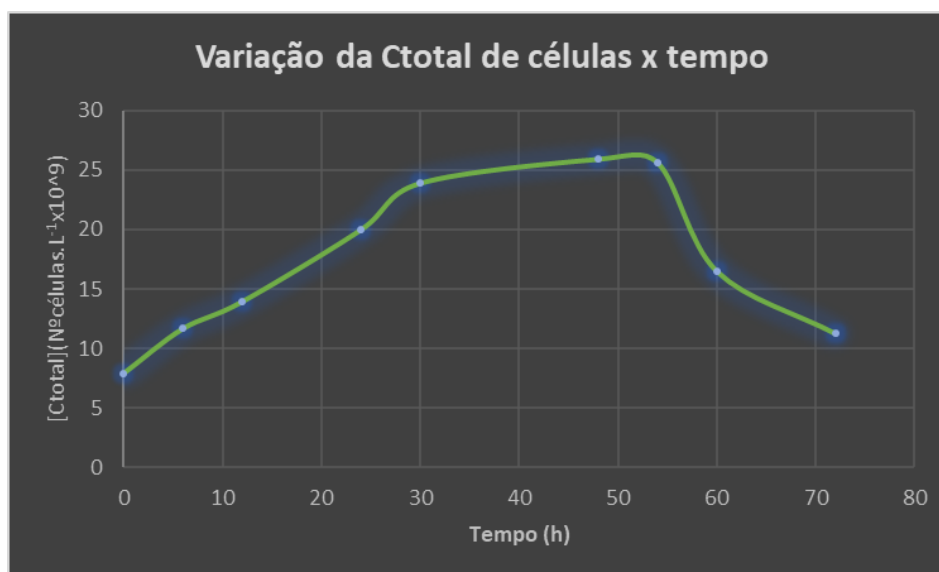
A Tabela 3 indica os valores para a levedura S-33.

Tabela3: Resultados para o crescimento celular da S-33

Tempo (h)	Células Vivas	Células Mortas	Total (Vivas + Mortas)	$[C_{TOTAL}](N^{\circ}\text{células.L}^{-1})10^9$
0	242	74	316	7,9
6	396	71	467	11,675
12	428	130	558	13,95
24	632	168	800	20
30	687	270	957	23,925
48	891	147	1038	25,95
54	876	150	1026	25,65
60	534	126	660	16,5
72	390	60	450	11,25

Fonte: Autor

De posse dos resultados, foi plotado um gráfico da $[C_{TOTAL}](N^{\circ}\text{células.L}^{-1}10^9) \times \text{tempo}$.

Figura 21: Análise gráfica da C_{total} de células x tempo para S-33

Fonte: Autor

De acordo com a Figura 21, a levedura S-33 apresenta um bom resultado, porém não foi possível visualizar a fase lag graficamente. No entanto, a fase exponencial, fase estacionária e morte celular foi possível identificar.

4.2.2.2 Crescimento Celular da S-04

A Tabela 4 o indica os valores para a levedura S-04.

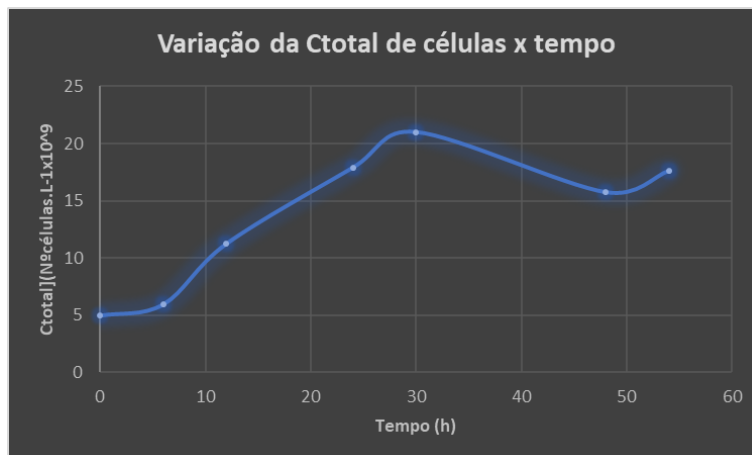
Tabela 4: Resultados para o crescimento celular da S-04

Tempo (h)	Células Vivas	Células Mortas	Total (Vivas + Mortas)	[CTOTAL](Nº células.L ⁻¹)10 ⁹
0	142	57	199	4,975
6	178	60	238	5,95
12	346	104	450	11,25
24	386	330	716	17,9
30	324	516	840	21
48	108	522	630	15,75
54	90	612	705	17,625

Fonte: Autor

Para a levedura S-04, em 60h de fermentação só havia células mortas. De posse dos resultados, foi plotado um gráfico da $[CTOTAL](Nº células.L^{-1}10^9)$ x tempo.

Figura 22: Análise gráfica da C_{total} de células x tempo para S-04



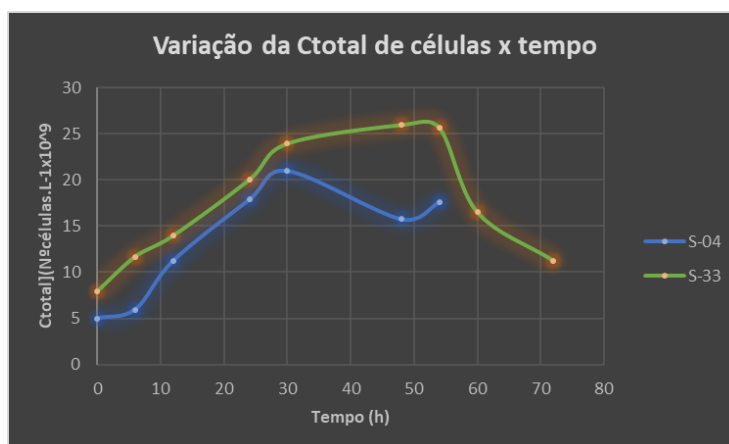
Fonte: Autor

De acordo com a Figura 22, foi observado que a fermentação encerrou antes das 60h, onde as células se encontravam mortas. O último ponto do gráfico não condiz com a fermentação em si, visto que já compreendia o período de morte celular. Uma possível explicação para esse erro seria o modo de como foi retirada a amostra ou até mesmo um erro na contagem. Por fim, foi possível visualizar a fase lag, exponencial e morte celular graficamente. Apenas a fase estacionária não foi possível determinar.

4.2.2.3 Comparação entre S-33 e S-04

A partir da Figura 23, pode-se comparar as fermentações das duas leveduras.

Figura 23: Comparação entre as leveduras S-33 e S-04



Fonte: Autor

Observa-se pela Figura 23 que as leveduras cresceram inicialmente de forma semelhante até às 24 horas de fermentação. Porém, a levedura S-33 obteve uma fase

linear de crescimento mais extensa, atingindo valores maiores de concentração de células do que a S-04.

4.2.3 Análise da concentração de glicose

Para a determinação da concentração de glicose, foi utilizado o método DNSA. Tem-se a relação entre a absorbância obtida pelo equipamento espectrofotômetro e a concentração de glicose em g.L^{-1} através da equação abaixo:

$$y = 0,2983x - 0,027 \quad (4)$$

Onde:

Y: Absorbância; X: Concentração da glicose (g.L^{-1});

De posse dos resultados obtidos de absorbância, foi calculada a concentração da glicose de ambas leveduras como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Resultados para concentração da glicose de ambas leveduras

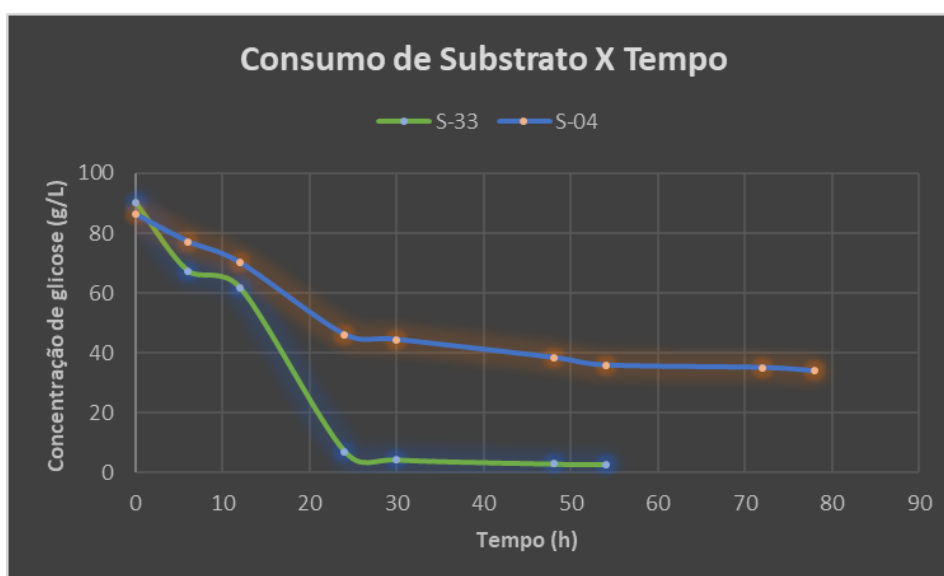
Tempo (h)	Concentração da glicose para S-33 (g.L^{-1})	Concentração da glicose para S-04 (g.L^{-1})
0	90,1	86,15
6	67,38	77,1
12	61,68	70
24	7	46,09
30	4,2	44,41
48	2,78	38,38
54	2,6	35,86
60	-	-
72	-	35,03
78	-	33,94

Fonte: Autor

De acordo com a Tabela 5, alguns valores não foram informados devido ao açúcar ter sido consumido por completo.

Diante do exposto, foi possível plotar o gráfico do consumo de substrato. A Figura 24 mostra que a levedura S-33 obteve uma atenuação mais rápida do que a S-04. Por volta de 24h de fermentação, as medições da S-33 estabilizaram, sendo a última medição feita com 54h de fermentação marcando $2,6 \text{ g.L}^{-1}$. A fermentação com levedura S-04, porém, só atenuou com aproximadamente 30h de fermentação, 6h a mais do que com a outra levedura, mas mantendo a mesma oscilação. Porém, os números da concentração para S-33 caíram drasticamente, diferente da S-04 que manteve um padrão em torno de 34 g.L^{-1} de glicose residual. Em termos de tempo, a levedura S-33 foi mais eficiente do que a S-04, apresentando um tempo de atenuação consideravelmente reduzido.

Figura 24: Comparação entre as leveduras S-33 e S-04 em relação ao consumo de substrato



Fonte: Autor

4.2.4 Análise da produção de etanol

Para esta análise, foi utilizado o método de ebulliometria. Onde os valores foram dados em ° GL. O grau GL é a fração em volume, ou seja, °Gay Lussac (°GL= %V:/V-Volume dado em ml). Na Tabela 6, estão os valores experimentais das duas leveduras estudadas.

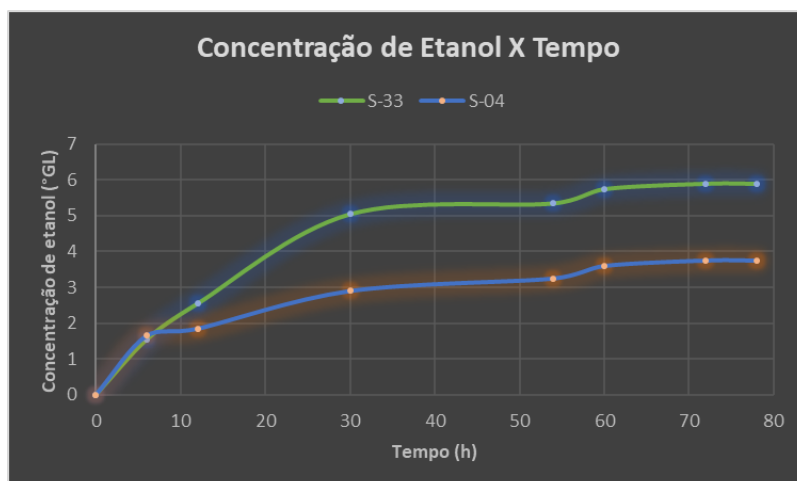
De acordo com Antônio (2000), uma cerveja contém 60 ml de álcool para 1 litro, ou seja, para 100 ml tem-se 6 ml de álcool. A levedura que mais se aproximou deste valor foi a S-33 chegando em 5.9 ml.100ml⁻¹ de solução. Alguns valores não foram informados pois está incoerente com o experimento. A Tabela 6 e a Figura 28 apresentam os resultados da variação de etanol durante a fermentação.

Tabela 6: Resultados para produção de etanol

Tempo (h)	[S-33] (°GL)	[S-04] (°GL)
0	0	0
6	1,55	1,65
12	2,55	1,85
24	-	1,95
30	5,05	2,9
48	-	-
54	5,35	3,25
60	5,75	3,6
72	5,9	3,75
78	5,9	3,75

Fonte: Autor

Figura 25: Comparação entre as leveduras S-33 e S-04 em relação a produção de etanol



Fonte: Autor

De posse dos valores obtidos, foi possível calcular a eficiência do processo para cada uma das duas leveduras estudadas.

De acordo com a reação teórica, 180,15 g.L⁻¹ de glicose formam 92,14 g.L⁻¹ de etanol. Com eficiência teórica de 51,14 %. Como a concentração de glicose foi de 100 g.L⁻¹, tem-se que a maior concentração de etanol possível será de 51,14 g.L⁻¹. A partir daí, para transformar de volume para massa, multiplicou-se a densidade do etanol (0,789 g.L⁻¹) com o volume.

Logo, para a levedura S-33, teve-se um máximo de 5,9 °GL que equivale a 5,9 ml.100ml⁻¹ de solução. Transformando para concentração mássica, ficou-se com 46,551 g.L⁻¹. Com isso, obteve-se uma eficiência de 91,02 % para S-33. Analogamente para S-04, teve-se um máximo de 3,75 °GL que equivale a 3,75 ml.100ml⁻¹ de solução com concentração mássica de 29,58 g.L⁻¹ e eficiência de 57,85 %.

É de se esperar que a levedura S-33 obtivesse melhores resultados de produção de etanol, pois teve um melhor crescimento celular e um consumo de substrato mais rápido e eficiente, deixando pouco açúcar residual.

4.3 CÁLCULO DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA CADA FERMENTAÇÃO

Com base nos valores encontrados para concentração total de células das duas fermentações, foi possível encontrar a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_x) e o tempo de geração (t_g) que é o tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular. A seguir, tem-se as equações para encontrar os valores em questão.

$$\mu_x = \left(\frac{1}{x}\right)\left(\frac{dx}{dt}\right) \quad (5)$$

Desenvolvendo por integração, ficou-se com:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_x(t - t_i) \quad (6)$$

Para encontrar o valor de μ_x , é necessário calcular ponto a ponto no intuito de achar o maior valor.

Para a levedura S-33, foi obtido um $\mu_{x,S-33} = 0,0829 \text{ h}^{-1}$.

Analogamente para S-04, foi obtido um $\mu_{x,S-04} = 0,066 \text{ h}^{-1}$. A partir da equação 6 tem-se que o tempo de geração (t_g).

$$t_g = \frac{0,693}{\mu_x} \quad (7)$$

Substituindo os valores da velocidade específica máxima:

$$t_{g,S-33} = 8,35 \text{ h}$$

$$t_{g,S-04} = 10,5 \text{ h}$$

Os fatores de conversão $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$ também foram calculados. $Y_{X/S}$: conversão do substrato em biomassa, $Y_{P/S}$: conversão do substrato em produto, $Y_{P/X}$: conversão de biomassa em produto. A seguir, tem-se as expressões utilizadas para determinar esses fatores (AQUARONE et al., 2001).

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (8)$$

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P_f}{S_i - S_f} \quad (9)$$

$$Y_{\frac{P}{X}} = \frac{P_f}{X_f - X_i} \quad (10)$$

Tabela7: Fatores de conversão

Levedura	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$
S-33	0,0101	0,0674	6,6478
S-04	0,0121	0,0714	5,9288

Fonte: Autor

5 CONCLUSÃO

Durante o período de 8 semanas, apenas a levedura S-33 mostrou-se com boa viabilidade celular, tendo em vista que a quantidade de células vivas variou muito pouco, o que não foi o caso da S-04, onde na última semana apenas 46% das células estavam vivas. Uma possível explicação para o fato seria a baixa qualidade possivelmente do lote dessa levedura.

Na análise cinética, as duas leveduras mostraram-se eficientes para fins fermentativos à medida que mostraram bom crescimento celular e rápido consumo de substrato. Porém, em termos de processo, a levedura S-33 se mostrou mais eficiente do que a S-04, pois apresentou um elevado crescimento celular e um consumo de substrato mais rápido. Para produção de etanol, a levedura S-33 foi a que mais se aproximou da porcentagem padrão de álcool na cerveja com 5,9 ml de etanol/100ml de solução.

Logo, a levedura S-33 se mostrou completa em todos os parâmetros analisados, tornando-se a mais eficaz em termos de produção de etanol e maior velocidade de consumo de substrato, o que conclui que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é excelente para fermentação alcoólica.

6 REFERÊNCIAS

Aquarone E, Borzani W, Schmidell W, Lima U. A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. Volume 4, 1ª Edição. São Paulo: Blucher, 2001.

Antonio P. B. Portal de Saúde Pública, 2000. Disponível em: <http://portal.anm.sp.gov.br/05-PromocaoSaude/051-Educacao/alcool.nota.htm> . Acesso em: 2 abril 2023.

Basso, L. C., Alves, D. M. G., Amorim, H. V., Lopes, M. L.. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, 2016.

Bastos, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos: EdUFSCar, 2010.

Bruwer, J. **"O mundo da cerveja artesanal"**. São Paulo: Blucher, 2016.

Correa, F. F. B. **Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae***. 2015, 79f. Dissertação (Mestrado em ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

Cuantificación de levaduras en cámara de recuento Neubauer improved o Thoma, Disponível em: http://insilico.ehu.es/camara_recuento/ . Acesso em: 4 abril 2023.

Delfini, C.; Cachaldora, A.; Otero, P. ; Pereira, S.. *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential for use in the wine industry. **A review: Microorganisms**, 2020.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L. Fermentation nutrients: Focus on nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2020.

Hughes, G. **Home brew beer**. 2 ed. United Kingdom: DK ADULT, p 224, 2013.

Hornsey, I. H. **"A história da cerveja"**. São Paulo: Blucher, 2016.

Hatoum R, Labries, Fliss I. **Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications**. In: Bortoli DAS, Santos F, Stocco NM, Nascimento DD, Leveduras e produção de cervejas – Revisão. Bioenergia em revista: diálogos. 2012.

Lima, L. L. A. Etanol. Mundo Educação. 2012 Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/quimica/etanol.htm> . Acesso em: 3 abril 2023.

Lima L. S. Lei de Lambert–Beer. **Rev. Ciência Elem**, v. 1, p.1, 2013.

Lamas Brew Shop. Campinas, 2023. Disponível em: <https://www.lamasbrewshop.com.br/>. Acesso em: 4 abril 2023.

Mongelo, A. I. **Validação de método baseado em visão computacional para automação da contagem de viabilidade de leveduras em indústrias alcooleiras.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande. 2012.

Miller, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

Questão de Concursos. Disponível em: <https://www.qconcursos.com/questoes-militares/questoes/f4ea503a-03> . Acesso em: 4 abril de 2023.

Santos, B. M. A. **Avaliação da viabilidade e capacidade produtiva de etanol da espécie *saccharomyces cerevisiae* proveniente de marcas comerciais.** Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal De Pernambuco, Recife. 2022.

Teodoro, T. **Biomedicina em ação: O poder da criação é divino, mas o da transformação é nosso.** Graduação em Biomedicina da Universidade Paulista, Campinas. 2012. Disponível em: <http://www.biomedicinaemacao.com.br/2012/04/via-glicolitica-ou-glicolise.html#:~:text=%C3%89%20o%20primeiro%20est%C3%A1gio%20do,entrar%20no%20Ciclo%20de%20Krebs>). Acesso em: 4 abril 2023.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation.** 5 ed. United States: Brewers Publications, p 304, 2010.