UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA ESCOLA POLITÉCNICA

THIAGO MACHADO DE ARAUJO

**Fisiologia e Modelagem Matemática de *Saccharomyces* spp. Imobilizadas para
Produção de Cerveja**

São Paulo
2021

THIAGO MACHADO DE ARAUJO

**Fisiologia e Modelagem Matemática de *Saccharomyces* spp. Imobilizadas para
Produção de Cerveja**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Departamento de
Engenharia Química da Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 25 de junho de 2021

Assinatura do autor:

Assinatura do orientador:

Catálogo-na-publicação

Machado de Araujo, Thiago

Fisiologia e Modelagem Matemática de *Saccharomyces* spp.
Imobilizadas para Produção de Cerveja / T. Araujo -- versão corr. -- São Paulo,
2021.

162 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Fisiologia 2.Imobilização de leveduras 3.Modelagem matemática
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de
Engenharia Química II.t.

Nome: ARAUJO, Thiago Machado de

Título: Fisiologia e modelagem matemática de *Saccharomyces* spp. imobilizadas para produção de cerveja

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 26/04/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Olitta Basso (Presidente)

Instituição: Escola Politécnica (EP) - Universidade de São Paulo (USP)

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

A Jesus, por ser forte quando eu sou fraco; fiel quando eu desisto; constante quando eu me desespero. SENHOR, Te agradeço por estar comigo durante estes anos tão desafiadores. Sei que se não fosse por Ti eu não conseguiria.

Ao Prof. Dr. Thiago Olitta Basso, pela orientação e paciência. Obrigado pelos ensinamentos profissionais e pessoais, por todo o incentivo na minha imersão na vida acadêmica e por ser um referencial de professor e orientador para mim.

À Dr^a. Bianca Eli Della Bianca, pela coorientação tão constante e necessária. Obrigado pelas correções e desafios, e também por ser um modelo profissional a ser seguido desde a graduação.

Ao Me. Marcelo Calide Barga (e por extensão à Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda), pelos materiais e análises fornecidos, além das proveitosas discussões. Obrigado por ser uma inspiração profissional desde o curso técnico.

Ao Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que tanto enriqueceram a discussão do trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (BELa) e seus pesquisadores, pelas instalações e por ser um ambiente propício ao desenvolvimento acadêmico.

Ao Laboratório de Pesquisa e Inovação em Processos Catalíticos (LaPCat), por disponibilizar o densímetro digital para realização das análises de densidade do meio de fermentação.

Ao Grupo de Pesquisa em Leveduras (Bruno, Dielle, Gabriel, Kevy, Priscila, Thaís, Thamiris), pelas muitas discussões e dicas recebidas. Pela troca de experiências e aprendizado, obrigado.

Ao apoio financeiro e concessão de bolsa de mestrado por meio do processo nº 2018/08288-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Aos amigos que o mestrado me deu, pelo companheirismo, seja para chorar ou para rir juntos. Margareth e Jorge, Jéssica Rubira, Matheus Neves (tua ajuda na modelagem foi fundamental), Silas Perdigão e Samuel Jardim, obrigado.

À minha família em São Paulo e cidades vizinhas, que me recebeu como um filho: Denis, Gabi, Pedrinho, Jô, Maurício, Mariana, Igor, Tia Luci, Tio Eze, Tia Sio, Tio Adilson, Fábio, Pati, Rafa, Carol, Vi e Domênico. Amo vocês, obrigado!

À minha mãe Celi Mara, meu pai Abilio, minha irmã Juliana e meu cunhado Vinícius. Vocês sabem que essa conquista é nossa e que sem vocês eu nunca teria conseguido. Muitas coisas que eram impossíveis, aconteceram nesses anos, e vencemos juntos. Eu acredito que coisas ainda melhores virão, amo muito vocês!

“Uma vez que os fenômenos de transformação-difusão são tão importantes no projeto e otimização de reatores, parece provável que os cientistas interessados em processos biológicos reconheceram cedo a necessidade de observar estes fenômenos. É revelador examinar algumas das investigações empreendidas por fisiologistas há alguns anos”. – Traduzido pelo autor.

(WEISZ, 1973)

“Pode-se argumentar que, de todas as ciências biológicas, a fisiologia é aquela em que a matemática desempenhou o maior papel. [...] os fisiologistas têm usado repetidamente métodos e modelos matemáticos para ajudar na compreensão dos processos fisiológicos. Seria de se esperar, portanto, que uma estreita conexão entre a matemática aplicada e a fisiologia tivesse se desenvolvido naturalmente, mas infelizmente, até recentemente, este não tem sido o caso. [...], mas os tempos estão mudando, e está rapidamente se tornando evidente que a matemática aplicada e a fisiologia têm muito a oferecer uma à outra”. – Traduzido e adaptado pelo autor.

(KEENER; SNEYD, 2009)

RESUMO

Há uma crescente demanda quanto à redução das operações unitárias empregadas na fermentação alcoólica para produção industrial de bebidas, e um crescente interesse na fisiologia das leveduras atuantes nesse processo. Nesse contexto, a imobilização celular é uma alternativa interessante, uma vez que reduz o número de etapas de separação da biomassa a partir do caldo fermentado. Há a necessidade de estudar os efeitos fisiológicos causados pela imobilização sobre as células empregadas na fermentação alcoólica de cerveja, para que os mecanismos que regem estas alterações possam ser investigados em mais detalhes e, eventualmente, totalmente compreendidos. Assim, este projeto teve como principal objetivo o estudo da fisiologia de três linhagens de leveduras cervejeiras (SY025, SY067 e SY001) imobilizadas em um suporte poroso à base de celulose. Definiu-se a metodologia de imobilização como do tipo aprisionamento, em uma estrutura porosa por meio da colonização da biomassa nas paredes internas do suporte, juntamente com formação *in situ* de um gel de alginato de cálcio em seu interior, seguido por uma segunda etapa de gelificação, externa à matriz. Foram conduzidas fermentações em batelada em xarope de malte 12 °P com as três linhagens na forma livre e imobilizada, para comparação dos parâmetros cinéticos das duas condições de processo. Foi realizada a modelagem matemática das cinéticas de fermentação, utilizando-se os dados experimentais para a estimação dos parâmetros fisiológicos nas condições estudadas. Um modelo matemático de reação-difusão também foi utilizado para estimar o gradiente de concentração de substrato total no interior do suporte de imobilização, de forma a melhorar a compreensão da influência exercida pelo microambiente de imobilização na fisiologia do fermento. Fermentações com variação de concentração inicial de substrato e biomassa foram conduzidas, visando o levantamento de modelos estatísticos para análise da influência destas variáveis na formação de compostos de *flavour*. Comparadas às livres, as células imobilizadas apresentaram maior produção de glicerol (SY025 – 40 %; SY067 – 53 %; e SY001 – 19 %) e biomassa total no sistema (SY025 – 67 %; SY067 – 78 %; e SY001 – 56 %). A conversão de substrato para etanol foi maior nas leveduras livres do que nas imobilizadas (SY025 – 9 %; SY067 – 9 %; e SY001 – 13 %), o que indica que de alguma forma o suporte utilizado estimula o crescimento microbiano. Houve também alterações fisiológicas na formação de compostos de *flavour* nas leveduras imobilizadas. Além disso, a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) foi aumentada nas leveduras SY025 imobilizadas ($0,73 \text{ h}^{-1}$) em comparação às livres ($0,13 \text{ h}^{-1}$). O mesmo ocorreu com a cepa SY001, em que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram de $0,08 \text{ h}^{-1}$ e $0,47 \text{ h}^{-1}$ para as livres e imobilizadas, respectivamente. Houve redução de $\mu_{\text{máx}}$ no caso da imobilização de SY067 ($0,14 \text{ h}^{-1}$ livres e $0,093 \text{ h}^{-1}$ imobilizadas). Estima-se que houve a formação de um gradiente de concentração de substrato no interior do suporte. Ainda assim, os valores estimados do fator de efetividade (η) da matriz de imobilização indicam que o processo não é impactado severamente por limitações na transferência de massa. Isto foi verificado por meio de micrografias do interior do suporte, revelando que as leveduras se desenvolveram em toda a extensão da partícula.

Palavras-chave: fisiologia; imobilização; cerveja; *Saccharomyces*; modelagem matemática; transferência de massa.

ABSTRACT

There is an ever-increasing demand for reduction of unit operations employed in industrial alcohol fermentation for beverage production, and a growing interest in the physiology of yeasts used in the process. In this context, cell immobilisation is an interesting alternative, since it reduces the number of steps to separate biomass from the fermented broth. There is a need to study the physiological effects caused by immobilisation on cells used in beer fermentation, so that the mechanisms that govern such metabolic alterations can be investigated in more detail and, eventually, fully described. Thus, the main objective of this work was to study the physiology of three brewer's yeast strains (SY025, SY067 and SY001) immobilised on a porous cellulose-based support. The immobilisation methodology was defined as entrapment in a porous structure by biomass adsorption on the internal walls of the support, along with *in situ* formation of a calcium alginate gel, followed by a second gelation step, external to the matrix. Batch fermentations in malt extract 12 °P were carried out with the three strains in free and immobilised form, to compare kinetic parameters of both process conditions. Mathematical modelling of fermentation kinetics was performed, using experimental data to estimate physiological parameters under the studied conditions. A mathematical reaction-diffusion model was also used to estimate the total substrate concentration gradient inside the immobilisation support, in order to improve the understanding of how the immobilisation microenvironment influenced the physiology of yeast cells. Fermentations with different initial concentrations of substrate and biomass were conducted, aiming to analyse the influence of these variables on the formation of flavour compounds, using statistical models. Compared to free cells, immobilised yeasts showed higher glycerol production (SY025 – 40 %; SY067 – 53 %; and SY001 – 19 %) and total biomass in the system (SY025 – 67 %; SY067 – 78 %; and SY001 – 56 %). Free cells produced more ethanol than immobilised ones (SY025 – 9 %; SY067 – 9 %; and SY001 – 13 %), which indicates that somehow the support stimulated microbial growth. There were also physiological changes in the formation of flavour compounds in immobilised yeasts. In addition, the maximum specific rate of cell growth ($\mu_{\max}$) was increased in immobilised SY025 yeasts (0.73 h^{-1}) compared to free yeasts (0.13 h^{-1}). The same occurred with the SY001 strain; $\mu_{\max}$ values were 0.08 h^{-1} and 0.47 h^{-1} for free and immobilised ones, respectively. There was a reduction of $\mu_{\max}$ in the case of SY067: 0.14 h^{-1} for free and 0.093 h^{-1} for immobilised cells. It was estimated that a gradient of substrate concentration occurred inside the support. Even so, the estimated values of the effectiveness factor (η) of the immobilisation matrix indicate that the process was not severely impacted by limitations in mass transfer. This was verified by micrographs of the interior of the support, which revealed that yeast cells were able to grow throughout the entire length of the particle.

Keywords: physiology; immobilisation; beer; *Saccharomyces*; mathematical modelling; mass transfer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 SISTEMAS HETEROGÊNEOS EM BIOPROCESSOS	15
3.2 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS	16
3.2.1 Métodos de imobilização	18
3.2.2 Configurações de biorreator para células imobilizadas	19
3.3 PRODUÇÃO DE CERVEJA COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS	20
3.3.1 Processo tradicional de produção de cerveja	20
3.3.2 Histórico da produção de cerveja com leveduras imobilizadas	22
3.3.2.1 Biorreator <i>Bio Brew</i>	23
3.3.2.2 <i>Baker e Kirsop</i>	23
3.3.2.3 <i>Cervejaria Kirin</i>	24
3.3.2.4 <i>Cervejaria Labatt</i>	25
3.3.2.5 <i>Meura Delta</i>	26
3.3.2.6 <i>Sistema VTT</i>	27
3.3.2.7 <i>Cervejaria Sinebrychoff</i>	27
3.3.2.8 <i>Cervejaria Sapporo</i>	27
3.3.2.9 <i>Bavaria</i>	28
3.3.3 Ascensão do mercado de cervejas artesanais	28
3.4 BIOQUÍMICA E FISILOGIA DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS	29
3.4.1 Metabolismo de leveduras	29
3.4.1.1 <i>Etanol</i>	31
3.4.1.2 <i>Álcoois superiores</i>	32
3.4.1.3 <i>Ésteres</i>	36
3.4.1.4 <i>Compostos carbonílicos</i>	37
3.4.2 Alterações fisiológicas em leveduras imobilizadas	38
3.4.2.1 <i>Crescimento em um microambiente</i>	39
3.4.2.2 <i>Alterações metabólicas gerais em leveduras imobilizadas</i>	41

3.4.2.3 Impacto da imobilização na formação de compostos de flavour	42
3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	43
3.5.1 Cinética de fermentação.....	43
3.5.2 Reação-difusão	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 OBTENÇÃO, CRIOPRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	47
4.2 IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS	47
4.2.1 Teste 1 – Imobilização direta.....	48
4.2.1.1 Porcentagem de massa seca nas esferas.....	49
4.2.1.2 Quantificação de biomassa	49
4.2.1.3 Eficiência de imobilização	50
4.2.2 Teste 2 – Imobilização combinada	51
4.3 CINÉTICAS DE FERMENTAÇÃO	53
4.3.1 Condições experimentais	53
4.3.2 Quantificação de biomassa, substrato, produtos e densidade e cálculo de parâmetros fisiológicos.....	54
4.3.3 Perfis sensoriais	55
4.3.4 Microscopia eletrônica.....	56
4.4 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	57
4.4.1 Estimação de parâmetros cinéticos.....	57
4.4.1.1 Leveduras livres	58
4.4.1.2 Leveduras imobilizadas.....	60
4.4.2 Concentração de substrato no interior da partícula.....	64
4.4.2.1 Modelo de reação-difusão.....	64
4.4.2.2 Solução numérica pelo método de diferenças finitas	70
4.5 VARIAÇÃO DE X_0 E S_0	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 DEFINIÇÃO DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO	75
5.1.1 Teste 1 – Imobilização direta e determinação da massa seca	75
5.1.2 Teste 2 – Imobilização combinada e eficiência de imobilização.....	76
5.2 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO	78
5.2.1 Cinética de produção de biomassa e de produtos e cinética de consumo de substratos.....	79
5.2.2 Perfis sensoriais	87

5.3 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	92
5.3.1 Cinética de fermentação – estimação de parâmetros	92
5.3.1.1 Linhagem SY025.....	94
5.3.1.2 Linhagem SY067.....	100
5.3.1.3 Linhagem SY001.....	105
5.3.2 Concentração de substrato no interior da partícula – reação-difusão ...	110
5.4 VARIAÇÃO DE X_0 E S_0	12519
6 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	132
APÊNDICE A – Análise estatística da eficiência de imobilização (EI).....	138
APÊNDICE B – Correlações experimentais entre contagem em câmara de Neubauer (número de células) e concentração de biomassa (g/L).....	141
APÊNDICE C – Modelagem da cinética de fermentação (estimação de parâmetros)	142
C1. Cinética de Monod – Livres (exemplo linhagem SY025)	142
C2. Cinética de Hinshelwood – Livres (exemplo linhagem SY025).....	145
C3. Cinética de Monod – Imobilizadas (exemplo linhagem SY025)	148
C4. Cinética de Hinshelwood – Imobilizadas (exemplo linhagem SY025)	152
APÊNDICE D – Cálculos de ϕ e β (exemplo linhagem SY025)	156
APÊNDICE E – Modelo de reação-difusão	159

1 INTRODUÇÃO

Denomina-se imobilização celular a atividade de confinar células em uma região delimitada do espaço, por meio de algum mecanismo físico e/ou químico, em geral com o auxílio de um suporte sólido (PILKINGTON et al., 1998; KOURKOUTAS et al., 2004). O desenvolvimento dessa tecnologia foi iniciado na década de 1960 com a adaptação, para células vivas, de técnicas já estabelecidas de imobilização de enzimas (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985; NEDOVIĆ et al., 2015).

Uma das possíveis aplicações das células imobilizadas é a produção de bebidas alcoólicas, que tem sido estudada há anos por causa dos benefícios que confere ao processo, como facilidade na separação da biomassa celular do produto final e sua reutilização e possibilidade de implementação de processos contínuos (BOULTON; QUAIN, 2001; KOURKOUTAS et al., 2004). Todavia, o uso desta tecnologia também apresenta algumas desvantagens: entupimento de tubulações, destruição de suportes de imobilização mecanicamente frágeis e alterações fisiológicas diversas que, dependendo das condições de processo, podem acarretar na formação exacerbada de ésteres, afetando o perfil sensorial do produto final (BOULTON; QUAIN, 2001).

No caso da produção de cerveja, a imobilização de leveduras inicialmente teve o objetivo de implementar um processo contínuo de fermentação cervejeira, na década de 1970. Este interesse surgiu porque, durante as décadas de 1950 e 1960, diversas tentativas de implementação de processos contínuos com leveduras em suspensão para produção de cerveja falharam. A ideia era que a produção de cerveja de forma contínua com leveduras imobilizadas fosse revolucionar a indústria cervejeira, aumentando significativamente a produtividade (VIRKAJÄRVI, 2001).

Todavia, após décadas de pesquisa, verificou-se que as alterações fisiológicas e metabólicas das leveduras imobilizadas, causadas pelos procedimentos de imobilização e pelas condições de processo nos biorreatores, impactavam negativamente na qualidade das cervejas produzidas. Isto é, raramente os perfis sensoriais (compostos de *flavour*) obtidos nas fermentações com leveduras imobilizadas eram equivalentes aos produzidos pelo processo tradicional em batelada estática (WILLAERT; NEDOVIĆ, 2006). Contudo, os estudos eram geralmente focados na produção em escala industrial de cervejas do tipo Lager (YAMAUCHI et al., 1994; VIRKAJARVI; POHJALA, 2000; NEDOVIĆ et al., 2015), cujas variações no

padrão de qualidade do perfil sensorial eram indesejadas. Neste contexto, quaisquer alterações fisiológicas das leveduras imobilizadas comparadas às livres não eram consideradas comercialmente atrativas.

As últimas décadas, no entanto, testemunharam uma expansão importante no mercado cervejeiro, principalmente quanto ao interesse dos consumidores de vivenciar experiências únicas por meio de variações nos estilos de cerveja e novos perfis sensoriais. De fato, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2020), o número de cervejarias registradas no Brasil cresceu 36,4% nos últimos cinco anos. E, neste contexto, estima-se que até 2025 o mercado das chamadas cervejas artesanais experimente um crescimento importante (Grand View Research, 2017). Muitas companhias que operam em escala industrial têm incorporado ao seu escopo as cervejas artesanais, com o objetivo de atender às demandas desse mercado emergente (MORGAN; LANE; STYLES, 2020). Dessa maneira, considera-se que este mercado em ascensão possa ser um dos fatores a despertar novamente o interesse na imobilização de leveduras para a produção de cerveja, desta vez buscando compreender e empregar as modificações fisiológicas oriundas da imobilização e não necessariamente evitá-las.

Mesmo que muito se tenha estudado sobre a tecnologia de imobilização de células, dois aspectos ainda carecem de investigação mais aprofundada: o escalonamento para um processo industrial eficiente; e a total compreensão dos mecanismos que causam as alterações fisiológicas em células imobilizadas (NORTON; D'AMORE, 1994; VIRKAJÄRVI, 2001; KOURKOUTAS et al., 2004). Assim, o objetivo deste trabalho visa contribuir para o segundo aspecto, ou seja, avaliar as alterações fisiológicas de leveduras cervejeiras, imobilizadas no suporte ImoYeast (um sólido poroso à base de celulose, desenvolvido pela empresa Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda), por meio de cinéticas de fermentação e modelagem matemática do processo fermentativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações fisiológicas de leveduras cervejeiras, causadas pela imobilização destas em um suporte à base de celulose denominado ImoYeast (desenvolvido pela empresa Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda) durante a fermentação alcoólica de xarope de malte, em condições próximas às da produção de cerveja dos tipos Ale, Weiss e Lager.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o protocolo de imobilização de leveduras no suporte ImoYeast, por meio do estudo de diferentes métodos e tempos de imobilização, utilizando-se alginato de sódio e cloreto de cálcio;
- Determinar os parâmetros fisiológicos e os perfis sensoriais resultantes de três linhagens de leveduras de cerveja, nas formas imobilizada e livre, na fermentação alcoólica de xarope de malte realizada em batelada;
- Comparar os crescimentos de biomassa no interior e na superfície do suporte ImoYeast ao longo da fermentação em xarope de malte;
- Realizar a modelagem matemática da cinética de fermentação com leveduras livres e imobilizadas, por meio da estimação de parâmetros;
- Estimar o gradiente de concentração de substrato no interior do suporte de imobilização, por meio do modelo matemático de reação-difusão.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMAS HETEROGÊNEOS EM BIOPROCESSOS

Reações bioquímicas heterogêneas são aquelas que ocorrem na presença de gradientes de temperatura e/ou de concentração de reagentes e produtos ou células. Uma vez que variações drásticas de temperatura não são comuns (por causa das limitações biológicas das células), os sistemas heterogêneos mais encontrados em bioprocessos são aqueles nos quais as restrições à transferência de massa são significativas (DORAN, 2013). Alguns exemplos desses sistemas são a floculação natural de bactérias e leveduras; a formação de *pellets* celulares durante o crescimento de fungos filamentosos; a criação de estruturas de biofilme; a biorremediação em solo; o cultivo de células animais em suportes; e os processos utilizando enzimas e/ou microrganismos artificialmente imobilizados (DORAN, 2013).

Um sistema com células imobilizadas, de modo geral, é formado por três componentes: o suporte sólido (ou matriz de imobilização), a biomassa imobilizada e a solução que preenche os espaços entre o suporte e as células. A interação entre esses fatores comumente resulta na formação de um novo microambiente no interior do suporte, ao qual as células imobilizadas estão expostas (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985) (Figura 1).

Figura 1 – Principais aspectos de sistemas com células imobilizadas

Fonte: Laca, García e Díaz (2000). (Traduzido e adaptado pelo autor). Representação do microambiente de imobilização, considerando alterações fisiológicas e morfológicas.

Nesse contexto, um exemplo de transferência de massa é a difusão de substrato pela matriz de imobilização até atingir as células (NORTON; D'AMORE, 1994). Como apontado por Nedović e Willaert (2004), a análise deste fenômeno é importante, visto que pode causar redução na eficiência de biorreatores. A compreensão da influência da transferência de massa no processo é considerada fundamental para a condução de sistemas com células imobilizadas (RADOVICH, 1985; NEDOVIĆ; WILLAERT, 2004).

3.2 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

A imobilização celular é definida como a restrição física das células em determinada região do espaço, por meio de mecanismos físicos e/ou químicos. É uma tecnologia relevante em diversas áreas, desde processos químicos e bioquímicos (como por exemplo, na produção de biocombustíveis, bebidas, produtos químicos finos e farmacêuticos e no tratamento de efluentes), até aplicações médicas (biossensores e diagnóstico) (GURAZI et al., 2017; POLAKOVIČ et al., 2017; MAINARDI; REZWAN; MAAS, 2019).

O confinamento das células para imobilização é feito pela sua fixação em um suporte físico, chamado matriz de imobilização (MORENO-GARCÍA et al., 2018). Como apresentado por Kourkoutas et al. (2004), existem três principais classes de matrizes utilizadas para a imobilização de células, a saber: suportes naturais (pedaços de madeira, frutas, serragem); suportes orgânicos (hidrogéis poliméricos); e suportes inorgânicos (cerâmicas e vidros porosos, espuma de poliuretano).

No contexto de processos biotecnológicos industriais, Kosseva (2011) indica que a tecnologia de imobilização celular apresenta vantagens em relação ao uso de células livres, considerando a obtenção de maiores densidades celulares nos reatores e, portanto, maiores produtividades volumétricas. Uma vez estabelecida, a imobilização também conduz à redução de custos de operação dos bioprocessos, além de aumentar a resistência das células às tensões de cisalhamento (ROUF; KANOJIA; NAIK, 2017). Outras vantagens referentes à economia são a redução do volume necessário de biorreatores e a diminuição das chances de contaminação do processo (considerando condições estéreis no processo de imobilização da linhagem desejada), devido às altas densidades celulares utilizadas (NEDOVIĆ et al., 2011). Há também a possibilidade de operar sistemas contínuos com taxa de diluição superior à

velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$), sem o risco de lavagem do reator (SCHMIDELL et al., 2001). Com a imobilização, a separação da biomassa do meio reacional é facilitada, promovendo a sua reutilização sem a necessidade de operações unitárias complexas. Além disso, células imobilizadas em geral são mais tolerantes a efeitos inibitórios e tóxicos decorrentes de altas concentrações de substrato e produtos (GURAZI et al., 2017). Todavia, também há desvantagens na utilização desta tecnologia, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da imobilização de células

Vantagens	Desvantagens
Proteção contra estresses como temperatura e pressão osmótica	Limitações de transferência de massa
Redução do risco de contaminação devido às altas densidades celulares no interior dos biorreatores	Alterações na morfologia, fisiologia e metabolismo das células
Produtividades volumétricas elevadas	Dificuldade de predição dos resultados
Fermentações mais rápidas	Mecanismos de interação célula-suporte ainda não totalmente desvendados
Facilidade na recuperação de produtos e separação de biomassa	Dificuldade na determinação do comportamento cinético
Reciclo de células e utilização de biorreatores menores	Dificuldades no escalonamento da produção do suporte devido aos custos e complexidade operacional
Possibilidade de operação em sistemas contínuos com taxas de diluição acima da velocidade específica máxima de crescimento	Influência de erros de amostragem devidos à distribuição heterogênea pela partícula na determinação de biomassa durante a fermentação

Fonte: O autor.

As principais desvantagens desta tecnologia são: as barreiras na transferência de massa, oriundas da presença do suporte sólido (RADOVICH, 1985; NORTON; D'AMORE, 1994); o escalonamento e a padronização, tanto da produção do suporte de imobilização, quanto do bioprocessamento com as células imobilizadas (MORENO-GARCÍA et al., 2018); e a dificuldade na compreensão e na predição das complexas modificações metabólicas e fisiológicas causadas pela imobilização (NORTON; D'AMORE, 1994; KOURKOUTAS et al., 2004).

3.2.1 Métodos de imobilização

Quatro métodos para imobilização celular são reconhecidos, como apresentado na Figura 2. Suas diferenças consistem na variação dos tipos de suporte utilizados e do mecanismo físico que sustenta a interação entre a matriz e as células (KOURKOUTAS et al., 2004; MORENO-GARCÍA et al., 2018).

Figura 2 – Métodos de imobilização

Fonte: Verbelen et al. (2006). a) adsorção em uma superfície; b) aprisionamento em uma estrutura porosa; c) contenção entre barreiras; e d) floculação.

A adsorção de células em uma superfície ocorre por conta de interações eletrostáticas e ligações covalentes entre a biomassa celular e o sólido. Portanto, as células não colonizam o interior do suporte, mas permanecem fixas em sua superfície. Este mecanismo está associado com a formação de biofilme microbiano e é um dos mais facilmente reproduzíveis. Entretanto, a taxa de desprendimento de células é alta, o que é indesejável para muitos processos (BOULTON; QUAIN, 2001). Algumas aplicações na produção de cerveja foram propostas com este método, que é o mais reportado na literatura para escalas industriais (NORTON; D'AMORE, 1994; YAMAUCHI et al., 1995a, 1995b) (ver item 3.3.2).

No caso do aprisionamento em estrutura porosa, duas variações são consideradas. A primeira é a colonização microbiana de um material poroso pré-formado, em que as células preenchem os espaços vazios enquanto aderem às superfícies internas do sólido. A segunda se trata da criação *in situ* de um sólido poroso a partir de uma suspensão contendo células (VERBELEN et al., 2006; NEDOVIĆ et al., 2015). Neste método surgem significativas limitações de

transferência de massa internas, uma vez que as células se encontram espacialmente distribuídas no interior do suporte (PILKINGTON et al., 1998). Ou seja, o substrato deve difundir pelo suporte de imobilização até encontrar as células imobilizadas em seu interior, para que só então as reações bioquímicas desejadas para o processo ocorram.

Um dos métodos menos utilizados é a contenção entre barreiras, uma vez que em geral são necessárias membranas com porosidade seletiva, o que encarece o processo. Além disso, é comum a formação de biofilme sobre as membranas, o que pode resultar no entupimento do sistema (KOURKOUTAS et al., 2004).

Por fim, a floculação de células, embora seja um fenômeno importante na produção de cerveja tradicional, é um método com aplicação reduzida na fermentação de cerveja com leveduras imobilizadas. Isso se deve às condições do ambiente ao qual as células estão expostas, já que a estabilidade dos flocos é muito sensível a variações de temperatura, pH, pressão e turbulência no sistema (PILKINGTON et al., 1998).

3.2.2 Configurações de biorreator para células imobilizadas

O projeto de reatores é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de um bioprocessos, uma vez que influencia diretamente na fisiologia e metabolismo das células (SHULER; KARGI, 2002; DORAN, 2013). A produção de cerveja, por exemplo, é tradicionalmente um processo em batelada, em que todos os nutrientes no meio de cultivo (mosto cervejeiro) estão disponíveis para as leveduras desde o início da fermentação (BOULTON; QUAIN, 2001). Por outro lado, em sistemas contínuos com leveduras imobilizadas há a adição de meio fresco ao longo do processo (ver seção 3.3.2). Neste caso, as concentrações de oxigênio e aminoácidos durante a fermentação de cerveja devem ser controladas de modo a obter um produto com perfil sensorial com a qualidade desejada, ou seja, que esteja adequado aos padrões de comercialização (BRÁNYIK et al., 2005).

Um projeto de biorreatores deve levar em consideração parâmetros geométricos, eficiência de transferência de massa e cinética do microrganismo. Todavia, o escalonamento é normalmente baseado apenas em relações geométricas entre tanques. No caso de sistemas imobilizados, o escalonamento é uma questão

ainda mais importante, por causa das modificações fisiológicas oriundas da imobilização (SHULER; KARGI, 2002; KOURKOUTAS et al., 2004; DORAN, 2013).

Como apresentado pela Figura 3, diversas configurações de biorreatores para células imobilizadas foram propostas, como reatores do tipo tanque agitado, reatores do tipo *air-lift* e reatores de membranas. Entretanto, os reatores dos tipos leito fixo e leito fluidizado são os mais comumente propostos na literatura (NEDOVIĆ et al., 2015).

Figura 3 – Biorreatores para células imobilizadas

Fonte: Nedović et al. (2015). (Traduzido pelo autor). a) tanque agitado; b) leito fixo; c) leito fluidizado; d) *air-lift*; e) reator de membranas.

3.3 PRODUÇÃO DE CERVEJA COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS

3.3.1 Processo tradicional de produção de cerveja

Segundo Olaniran et al. (2017), cerveja é definida como a mistura resultante da fermentação do malte, devidamente processado com adição de água e lúpulo, por meio da atuação de leveduras. O resultado desse processo é um conjunto de compostos químicos oriundos do metabolismo microbiano (YIN et al., 2017). Para a legislação brasileira, é válida a seguinte definição, encontrada no decreto n° 9902, de 8 de julho de 2019 (BRASIL, 2019):

Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro.

A produção de cerveja acompanha a civilização desde os seus primórdios e se tornou um fator cultural e de desenvolvimento para a humanidade (KARABÍN et al., 2018). Ao longo da história, as técnicas de produção foram aprimoradas e o que era um processo puramente empírico tornou-se uma das biotecnologias industriais mais bem estabelecidas (DE ANDRÉS-TORO et al., 1998; BAMFORTH, 2017).

À medida que a compreensão sobre os fenômenos essenciais da fermentação foram sendo melhor compreendidos, o processo foi aperfeiçoado em direção a diferentes objetivos, como elevação de rendimentos de álcool e de subprodutos de interesse que exercem influência nos perfis sensoriais da cerveja; otimização de cepas de leveduras cervejeiras; e aumento da produtividade em larga escala (GEE; RAMIREZ, 1994; RODMAN; GEROGIORGIS, 2016; ROUF; KANOJIA; NAIK, 2017; KARABÍN et al., 2018).

Segundo Parcunev et al. (2012), as principais etapas que caracterizam o processo de produção de cerveja são malteação, fermentação (fermentação primária) e maturação (fermentação secundária). São etapas gerais que, a despeito das especificidades de cada tipo de cerveja, definem o processo de produção desta bebida por serem comuns em todas as variações (BRÁNYIK et al., 2005).

Inicialmente, ocorre a malteação do grão de cevada, uma etapa de germinação parcial dos grãos, com o intuito de formar e liberar amilases. Segue-se, então, com a moagem do malte para aumentar a área superficial e, conseqüentemente, a velocidade da hidrólise do amido. A etapa seguinte é denominada mosturação, na qual o mosto é produzido, através da adição de água ao malte moído e do aquecimento controlado desta mistura, para sacarificação por meio da atividade enzimática. É então conduzida uma filtração para a remoção de partículas grosseiras e o líquido remanescente é fervido, além de receber a quantidade correta de lúpulo. Posteriormente o mosto é resfriado e, ao atingir a temperatura ideal, a levedura é inoculada para que se desenvolvam os processos de fermentação e maturação, conjuntos de reações bioquímicas catalisadas pelo fermento, cujos resultados

consistem em complexos perfis de composição, aromas e sabores (KARABÍN et al., 2018).

Na fermentação primária, as condições do processo (composição do mosto, temperatura de fermentação, concentração de oxigênio dissolvido, qualidade do inóculo) influenciam diretamente no metabolismo das leveduras, que consomem os nutrientes do meio e produzem etanol, álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais (entre outros, além de biomassa). Esta etapa dura de seis a sete dias. A fermentação secundária, por sua vez, é responsável pela estabilização coloidal, assim como do perfil sensorial da cerveja, sendo caracterizada principalmente pela redução de diacetil a acetoína, durando algumas semanas (BAMFORTH, 2017).

3.3.2 Histórico da produção de cerveja com leveduras imobilizadas

A aplicação da tecnologia de imobilização de leveduras na produção de cerveja teve seu início em 1970 pelo emprego de um biorreator do tipo leito fixo, onde as leveduras eram misturadas com terra diatomácea para a formação de estruturas porosas. Mesmo com o insucesso desta configuração, a partir de então foram apresentadas diversas outras propostas para a produção de cerveja com leveduras imobilizadas. Como se acreditava que a imobilização iria transformar o mercado, resultando em maiores produtividades e economia significativa, insistiu-se em desenvolver um sistema de imobilização eficiente para a produção de cerveja (VIRKAJÄRVI, 2001; KOURKOUTAS et al., 2004).

Os estudos foram essencialmente sobre: modelagem matemática considerando os efeitos de transferência de massa no metabolismo microbiano (PILKINGTON et al., 1998; BRÁNYIK et al., 2004; NAYDENOVA et al., 2013); configurações de biorreator para processos contínuos utilizando leveduras imobilizadas, como leito fixo, leito fluidizado e *air-lift* (MENSOUR et al., 1997; BRÁNYIK et al., 2006; VERBELEN et al., 2006); e levantamento de dados fisiológicos durante fermentação com leveduras imobilizadas (GALAZZO; BAILEY, 1990; NORTON; D'AMORE, 1994; ŠMOGROVIČOVÁ; DÖMÉNY, 1999; VAN IERSEL et al., 2000; ALMONACID et al., 2012).

Todavia, os perfis sensoriais obtidos por sistemas com leveduras imobilizadas raramente são equivalentes aos resultantes daqueles com células livres (POLAKOVIČ et al., 2017), conforme se desejava até recentemente. Além disso, outros desafios

ainda precisam ser superados, como: a produção em larga escala de suportes de imobilização mecanicamente estáveis; e as alterações fisiológicas causadas pela imobilização das leveduras. A seguir são citadas as principais propostas encontradas na literatura para escalonamento da produção de cerveja com leveduras imobilizadas.

3.3.2.1 *Biorreator Bio Brew*

O Bio Brew foi a primeira tentativa de fermentação de cerveja com leveduras imobilizadas reportada na literatura, proposta por Narziss e Hellich em 1971. Mesmo sendo considerado um fracasso quanto à qualidade final da cerveja produzida, foi um trabalho pioneiro que possibilitou o desenvolvimento de outras propostas. Consistia em um reator de leito fixo operado de forma contínua, contendo terra diatomácea misturada com leveduras, resultando em leitos porosos carregados com biomassa (MASSCHELEIN; RYDER; SIMON, 1994).

Muitos problemas operacionais e de qualidade ocorreram, como entupimento (a vida útil do reator era de apenas 7-10 dias antes de entupir) e alterações fisiológicas nas leveduras (redução no consumo de nitrogênio, provavelmente devido à limitação de crescimento, resultando em concentrações menores de álcoois superiores e ésteres, em comparação com as leveduras livres), além de elevadas concentrações de α -acetolactato e dicetonas vicinais. Portanto, um período muito longo de maturação se fazia necessário (VIRKAJÄRVI, 2001).

A utilização de terra diatomácea foi substituída por géis de alginato e, embora algumas melhorias tenham sido observadas (diminuição no custo do processo e facilidade na recuperação da biomassa), o suporte se mostrou mecanicamente instável e as alterações fisiológicas novamente surgiram, afetando negativamente os perfis sensoriais resultantes (MASSCHELEIN; RYDER; SIMON, 1994).

3.3.2.2 *Baker e Kirsop*

Baker e Kirsop (1973) otimizaram o reator Bio Brew, como apresentado na Figura 4. Novamente a concentração de α -acetolactato esteve acima do aceitável pelo padrão do produto e, portanto, foi proposto um tratamento térmico da cerveja filtrada com o objetivo de converter este composto em diacetil.

Figura 4 – Sistema de fermentação Baker e Kirsop

Fonte: Baker e Kirsop (1973). (Traduzido pelo autor). Fermentação com leveduras imobilizadas, seguido de tratamento térmico e maturação com leveduras imobilizadas.

O sistema consistia em um reator tubular contendo leveduras, imobilizadas em terra diatomácea, através do qual era alimentado o mosto. Após a fermentação primária, era conduzido o tratamento térmico e, então, a fermentação secundária era realizada por leveduras imobilizadas em outro biorreator. Todavia, a concentração de compostos aromáticos ainda resultava em perfis desbalanceados, uma vez que o consumo de nitrogênio foi reduzido. O crescimento celular foi dificultado, resultando em menor formação de álcoois superiores e ésteres (BAKER; KIRSOP, 1973).

3.3.2.3 Cervejaria Kirin

A primeira aplicação industrial reportada de fermentação de cerveja com leveduras imobilizadas foi apresentada por Yamauchi et al. (1994), na Cervejaria Kirin. Consistia em um sistema de fermentação em três estágios, com um tempo de residência total de 72-96 h (Figura 5).

Figura 5 – Sistema de fermentação Cervejaria Kirin

Fonte: Nedović et al. (2015). (Traduzido pelo autor). Primeiro estágio: aeração do mosto para crescimento das leveduras, seguido da exaustão de oxigênio e início da fermentação; segundo estágio: finalização da fermentação primária com leveduras imobilizadas; e terceiro estágio: maturação da cerveja com leveduras imobilizadas.

No primeiro reator, um tanque agitado, a fermentação primária era iniciada com leveduras em suspensão e elevada aeração, para crescimento celular. Então as células eram centrifugadas e o mosto transferido para o segundo estágio do sistema, um reator do tipo leito fixo, onde a fermentação primária era concluída por leveduras imobilizadas.

Novamente altas concentrações de α -acetolactato foram obtidas e, assim, o tratamento térmico era realizado. O último estágio do processo era outro reator de leito fixo contendo leveduras imobilizadas, para maturação da cerveja.

3.3.2.4 Cervejaria Labatt

Na Cervejaria Labatt, Mensour et al. (1996) introduziram um reator do tipo leito fluidizado (Figura 6), em que as limitações de transferência de massa foram reduzidas por causa de otimizações no tamanho do suporte de imobilização (redução do diâmetro), nas condições hidrodinâmicas do biorreator (existência de convecção) e nas estratégias de alimentação de oxigênio e gás carbônico.

Figura 6 – Leito fluidizado Cervejaria Labatt

Fonte: Mensour et al. (1996). (Traduzido pelo autor). Fermentação contínua com leveduras imobilizadas em um leito fluidizado.

3.3.2.5 Meura Delta

O sistema Meura Delta consistia em um cartucho de carboneto de silicone como suporte de imobilização, associado a um reator de reciclo de células, como mostrado na Figura 7 (NEDOVIĆ et al., 2015).

Figura 7 – Sistema Meura Delta

Fonte: Nedović et al. (2015). (Traduzido pelo autor). Processo contínuo de fermentação com leveduras imobilizadas seguida de fermentação com leveduras em suspensão.

No primeiro estágio, as leveduras imobilizadas no interior do cartucho de carboneto de silicone conduziam a fermentação do mosto. A leveduras desprendidas para o meio eram carregadas com a corrente para um tanque agitado, onde a

fermentação era finalizada. Esta proposta obteve perfis de compostos aromáticos semelhantes aos obtidos pelo método tradicional de produção de cerveja (com células livres, em batelada sem agitação) (NEDOVIĆ et al., 2015).

3.3.2.6 Sistema VTT

Inicialmente, o VTT (Centro de Pesquisa Técnica da Finlândia) desenvolveu um sistema de fermentação em dois estágios. O mosto era fermentado em um reator com leveduras em suspensão e, após a fermentação primária, a cerveja era maturada em um reator de leito fixo com leveduras imobilizadas. Os resultados desta pesquisa serviram como base para a aplicação industrial nas cervejarias Sinebrychoff's Helsinki e Sinebrychoff's Kerava, sendo que na última desenvolveu-se um sistema de maturação de cerveja com leveduras imobilizadas. Os perfis sensoriais eram adequados aos padrões de qualidade e comparáveis aos obtidos pela fermentação tradicional (NEDOVIĆ et al., 2015).

Posteriormente, a proposta foi aperfeiçoada para um sistema contendo dois reatores de leito fixo com leveduras imobilizadas. O processo foi aplicado na cervejaria Hartwall e os resultados mostram que a composição da cerveja e os perfis sensoriais eram similares aos da fermentação em batelada com leveduras livres (NEDOVIĆ et al., 2015).

3.3.2.7 Cervejaria Sinebrychoff

A cervejaria Sinebrychoff desenvolveu um sistema de fermentação secundária de cerveja, que consistia em um reator de leito fixo de leveduras imobilizadas acoplado a uma unidade de tratamento térmico. Inicialmente, as células eram imobilizadas em DEAE-celulose, mas com o passar do tempo, o suporte foi substituído por pedaços de madeira, visando redução de custos (NEDOVIĆ et al., 2015; VIRKAJÄRVI et al., 2002).

3.3.2.8 Cervejaria Sapporo

Esta cervejaria desenvolveu um reator de leito fluidizado para condução das fermentações primária e secundária. O mosto era tratado com enzimas para aumentar

a concentração de glicose, o que implicava no aumento da formação de ésteres. Os perfis sensoriais da cerveja produzida foram equivalentes aos obtidos pela fermentação tradicional em batelada (NEDOVIĆ et al., 2015; VIRKAJÄRVI, 2001).

3.3.2.9 Bavaria

O reator de leito fixo desenvolvido pela Bavaria era operado a baixas temperaturas, o que dificultava o crescimento de células. Assim, foram evitados problemas operacionais oriundos de entupimento (NEDOVIĆ et al., 2015). Esta foi uma aplicação industrial para a produção de cerveja sem álcool com leveduras imobilizadas.

3.3.3 Ascensão do mercado de cervejas artesanais

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o número de cervejarias registradas no Brasil cresceu 36,4 % entre 2014 e 2019, atingindo a marca de 1209 estabelecimentos, como mostra a Figura 8 (MAPA, 2020).

Figura 8 – Número de cervejarias registradas no MAPA

Fonte: (MAPA, 2020). Aumento do número de cervejarias registradas no Brasil nos últimos 20 anos.

Este cenário positivo no mercado cervejeiro brasileiro está de acordo com as projeções do mercado internacional, especificamente no campo das cervejas artesanais. A agência de pesquisa de mercado e estatísticas Grand View Research (2017) avaliou o mercado global de cerveja artesanal em 2015 sendo de US\$ 85,02 bilhões, estimando um período de crescimento significativo até 2025, por ocasião da

expansão deste mercado em países como África do Sul, Austrália, Nova Zelândia e Brasil.

A expansão deste setor está diretamente relacionada ao interesse dos consumidores em vivenciar experiências únicas com diferentes estilos de cerveja, principalmente no que se refere aos perfis de aroma e sabor (*flavour*). Essa demanda valoriza as cervejarias que investem em produtos personalizados, que não necessariamente estão restritos aos padrões sensoriais estabelecidos pela produção massificada das cervejas Lager (MORGAN; LANE; STYLES, 2020).

Neste cenário, a empresa Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda iniciou o projeto ImoYeast, visando a comercialização de leveduras imobilizadas para produção de cerveja. Nos anos de 2016 e 2017, durante o TCC da graduação do autor (em coautoria com sua colega Heluara Junca), foi desenvolvido o suporte de imobilização ImoYeast, do qual tanto a composição quanto a produção estão em processo de patenteamento.

O projeto ImoYeast se destaca de duas formas: (i) o objetivo principal não é obrigatoriamente o estabelecimento de um processo contínuo e, por isso, como será apresentado nos itens 4.2 e 4.3, os experimentos foram realizados em batelada sem agitação (cultivo estático); e (ii) o intuito é avaliar e descrever as alterações fisiológicas causadas pelo processo de imobilização das leveduras, e não necessariamente evitá-las, uma vez que essas podem resultar em perfis sensoriais que satisfaçam as expectativas do novo mercado descrito anteriormente.

3.4 BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA DE LEVEDURAS CERVEJEIRAS

3.4.1 Metabolismo de leveduras

A conversão industrial de açúcares a etanol se dá principalmente pelo emprego de leveduras, cujo metabolismo anaeróbico facultativo possibilita a obtenção de energia química também pela via fermentativa (BOULTON; QUAIN, 2001; NELSON; COX, 2008). As leveduras cervejeiras geralmente são classificadas em dois grupos: leveduras de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*) e de baixa fermentação (*Saccharomyces pastorianus*). De acordo com Bamforth (2017), a espécie *S. pastorianus* é o resultado da hibridização das espécies *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*.

A princípio, essa classificação foi adotada devido ao que é visível nos tanques de fermentação, já que durante o processo as leveduras de alta fermentação (tipo Ale) se concentram na parte superior do tanque, enquanto as de baixa fermentação (tipo Lager), na parte inferior. Com o desenvolvimento de técnicas bioquímicas e de biologia molecular, as diferenças entre as duas classes puderam ser ainda mais evidenciadas.

Para a produção de cerveja, a temperatura ótima de fermentação da espécie *S. cerevisiae* está na faixa de 14-25 °C, enquanto que para *S. pastorianus* é de 4-12 °C (KARABÍN et al., 2018). Outras diferenças entre leveduras do tipo Ale e Lager podem ser evidenciadas, a saber: para o primeiro grupo, a temperatura máxima de crescimento é de 37 °C, enquanto que para o segundo o valor é 34 °C; leveduras de baixa fermentação são capazes de hidrolisar melibiose, enquanto as de alta fermentação não; e comumente, leveduras do tipo Lager tendem a utilizar maltotriose de forma mais eficiente que as do tipo Ale (BAMFORTH, 2006).

Todavia, Bamforth (2017) pontua que, em geral, as substâncias produzidas pelo metabolismo de diferentes leveduras tendem a ser muito similares, sendo a principal diferença a concentração em que são formadas. Segundo Nedović et al. (2015), é possível investigar as leveduras cervejeiras a partir da compreensão de uma rede metabólica padrão.

Na fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces* spp., os açúcares são consumidos principalmente por meio da via Embden-Meyerhof-Parnas (glicólise) seguida da formação majoritária de dióxido de carbono (CO₂) e etanol (PARCUNEV et al., 2012). Entretanto, embora esses sejam os dois produtos estequiometricamente mais relevantes, simultaneamente há a formação de diversos subprodutos oriundos de outras vias metabólicas das leveduras, como glicerol, ésteres, álcoois superiores e compostos carbonílicos (OLANIRAN et al., 2017; STEWART, 2017), como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Rede metabólica padrão de *Saccharomyces* spp.

Fonte: Nedović et al. (2015). (Traduzido pelo autor). Principais vias metabólicas presentes em leveduras durante a fermentação alcoólica.

3.4.1.1 Etanol

A Figura 10 apresenta as vias bioquímicas envolvidas na fermentação alcoólica.

Figura 10 – Vias metabólicas para produção de etanol e glicerol

Fonte: Boulton e Quain (2001). (Traduzido pelo autor). Principais rotas metabólicas para fermentação alcoólica, considerando glicólise (via de Embden-Meyerhof-Parnas) e via das pentoses.

Por meio da via Embden-Meyerhof-Parnas, os açúcares são consumidos e convertidos majoritariamente em piruvato. Na fermentação alcoólica, ao invés de prosseguir para o ciclo do ácido cítrico, o piruvato é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído e liberando CO₂. Então, por meio de uma reação acoplada com uso de NADH + H⁺, a enzima álcool desidrogenase reduz acetaldeído a etanol, regenerando a coenzima NAD⁺ (NELSON; COX, 2008) e tornando a fermentação alcoólica um conjunto redox-neutro de reações.

Na Figura 10 está também representada a formação de um dos principais subprodutos da fermentação alcoólica, o glicerol, que é formado a partir de uma ramificação da glicólise. As reações bioquímicas para formação de biomassa reduzem o NAD⁺ a NADH + H⁺, o que acarreta na necessidade de balanceamento redox. Isso ocorre via formação de glicerol, reação esta que está acoplada com a oxidação de NADH + H⁺ novamente em NAD⁺ (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

Em algumas espécies de leveduras, como *S. cerevisiae*, é possível observar o chamado efeito Crabtree. Este efeito leva ao deslocamento do metabolismo para a via fermentativa, mesmo em condições aeróbicas, em cultivos com concentrações de açúcares fermentescíveis a partir de 150 mg/L (PFEIFFER; MORLEY, 2014). Assim, é muito comum encontrar leveduras cervejeiras em metabolismo respiro-fermentativo (WALKER, 1998; NELSON; COX, 2008).

3.4.1.2 Álcoois superiores

De acordo com Olaniran et al. (2017) e Stewart (2017), as substâncias de fato responsáveis pela composição aromática e de sabor da cerveja são essencialmente os álcoois superiores e os ésteres.

Como apresentado na Tabela 2, estes são metabólitos secundários que, mesmo produzidos em baixas concentrações, exercem grande impacto na qualidade final da bebida.

Tabela 2 – Principais compostos aromáticos na cerveja

Classificação	Composto	Característica sensorial	Limite sensorial (mg/L)
Álcool superior	1-Propanol	Álcool	800
	2-Metil propanol (isobutanol)	Álcool	200
	2-Metil butanol (álcool amílico ativo)	Álcool, banana, solvente	65
	3-Metil butanol (álcool isoamílico)	Álcool	70
	2-Fenil etanol	Rosas, adocicado	125
Éster	Acetato de etila	Solvente, frutado, adocicado	30
	Acetato de isoamila	Banana, maçã, solvente	1,2
	2-Acetato de fenil etila	Rosas, mel, maçã, adocicado	3,8
	Caproato de etila	Maçã ácida	0,21
	Caprilato de etila	Maçã ácida	0,9
Composto carbonílico	Acetaldeído	Folhas verdes, frutado	25
	2,3-Butanodiona (diacetil)	Amanteigado	0,15

Fonte: Olaniran et al. (2017). (Traduzido pelo autor). Apresentação dos principais compostos de *flavour* (aroma e sabor) além de etanol e glicerol. O limite sensorial é definido como a concentração mínima de um composto presente na cerveja a partir da qual seu aroma e sabor são alterados de maneira significativa (ENGAN, 1971).

A Figura 11 apresenta a rede metabólica de formação de álcoois superiores e ésteres.

Figura 11 – Vias bioquímicas de formação de compostos *flavour*

Fonte: Kobayashi; Shimizu; Shioya (2008). (Traduzido pelo autor).

Nedović et al. (2015) definem álcoois superiores como sendo compostos contendo mais de dois átomos de carbono e com massa molar e ponto de ebulição maiores que do etanol. Há duas principais classes de álcoois superiores produzidas: os álcoois alifáticos e os aromáticos. Da primeira classe se destacam 1-propanol, 2-metil propanol (isobutanol), 2-metil butanol (álcool amílico ativo) e 3-metil butanol (álcool isoamílico); os representantes mais importantes da segunda classe são 2-fenil etanol, tirosol e triptofol (DJORDJEVIĆ et al., 2016). De todos, o álcool isoamílico é o que mais se destaca ao se considerar a influência quantitativa no sabor e aroma da cerveja (OLANIRAN et al., 2017).

Conforme Djordjević et al. (2016), os álcoois alifáticos geralmente apresentam qualidades sensoriais mais desejáveis do que os álcoois aromáticos, uma vez que contribuem para os aromas característicos da cerveja (BRÁNYIK et al., 2008). Dos aromáticos, apenas o 2-fenil etanol se destaca nesse sentido (PROCOPIO; QIAN; BECKER, 2011).

Durante a fermentação, estas substâncias são produzidas pelas rotas anabólica de Genevois, em que a síntese ocorre por meio de piruvato, e catabólica de Erlich, na qual são subprodutos do metabolismo de aminoácidos (PROCOPIO; QIAN;

BECKER, 2011; STEWART, 2017). Embora essas duas rotas ocorram durante a fermentação de cerveja, como o mosto cervejeiro comumente fornece todos os aminoácidos necessários para síntese de proteínas (proteínogênicos), a via mais comum é a de Erlich (PIRES et al., 2014), apresentada na Figura 12.

Figura 12 – Via de Erlich

Fonte: Pires et al. (2014). (Traduzido pelo autor). Via de Erlich: formação de álcoois superiores a partir de aminoácidos.

A primeira etapa da via de Erlich é uma reação reversível de transaminação de um aminoácido, catalisada por transaminases que são codificadas pelos genes *BAT1*, *BAT2*, *ARO8* e *ARO9*. O papel dessas enzimas é de realizar a transferência do grupo amino dos aminoácidos para o α -cetoglutarato, produzindo o α -cetoácido correspondente e um glutamato (HAZELWOOD et al., 2008; PIRES et al., 2014). Tal reação ocorre dependente da assimilação de aminoácidos pela levedura, o que ocorre gradualmente ao longo da fermentação (OLANIRAN et al., 2017). Portanto, a concentração final média de álcoois superiores está diretamente relacionada com a eficiência do consumo de aminoácidos, e também de açúcares, pela levedura (BRÁNYIK et al., 2008).

Então, os α -cetoácidos gerados são irreversivelmente descarboxilados, formando seus aldeídos correspondentes (STEWART, 2017). Isso ocorre por meio da atuação de enzimas descarboxilases, codificadas pelos genes *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* e *THI3*, com liberação de dióxido de carbono (HAZELWOOD et al., 2008; PIRES et al., 2014).

Por fim, os aldeídos são reduzidos a álcoois superiores pela ação de álcool desidrogenases codificadas pelos genes *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4* e *ADH5* (HAZELWOOD et al., 2008; PIRES et al., 2014).

3.4.1.3 Ésteres

Loviso e Libkind (2018) indicam que, durante a produção de cerveja, são formados mais de 100 ésteres, que podem ser classificados em dois grandes grupos: ésteres de acetato e ésteres de etila.

A primeira classe é caracterizada por seu grupo ácido ser acetato e o grupo álcool ser etanol ou algum álcool superior (DJORDJEVIĆ et al., 2016) e dela se destacam o acetato de etila, o acetato de isoamila e o acetato de fenil etila.

A segunda se caracteriza por seu grupo ácido ser um ácido graxo de cadeia média e o grupo álcool ser etanol. Aqui os destaques são o hexanoato de etila (caproato de etila) e octanoato de etila (caprilato de etila) (DJORDJEVIĆ et al., 2016; LOVISO; LIBKIND, 2018).

Willaert e Nedović (2006) apontam que, mesmo em concentrações baixas (são considerados elementos-traço por Pires et al. (2014)), os ésteres exercem influência significativa sobre a qualidade da cerveja, uma vez que proporcionam perfis sensoriais importantes, como aromas frutados e florais (BRÁNYIK et al., 2008; NEDOVIĆ et al., 2015).

De acordo com Brányik et al. (2008), a formação de ésteres no metabolismo de leveduras cervejeiras se dá pela atividade de enzimas aciltransferases, especialmente álcool aciltransferases, as quais promovem a condensação de acil-CoA e etanol (ou um álcool superior). Isto ocorre em maior escala durante a fermentação primária (STEWART, 2017).

A Figura 13 apresenta as principais vias bioquímicas para a formação de ésteres durante a fermentação de cerveja.

Figura 13 – Formação de ésteres

Fonte: Pires et al. (2014). (Traduzido pelo autor). Vias de formação de ésteres, em que: A = ésteres acetato; e B = ésteres de etila.

As reações entre acetil-CoA e um álcool (etanol ou álcoois superiores) resultam na formação de ésteres de acetato, enquanto que as reações entre etanol e moléculas de acil-CoA produzem os ésteres de etila (PIRES et al., 2014). As moléculas de acetil-CoA são oriundas do piruvato formado na glicólise, enquanto as moléculas de acil-CoA são desviadas da biossíntese de ácidos graxos para a esterificação, em ambientes com baixas concentrações de oxigênio.

3.4.1.4 Compostos carbonílicos

São compostos nos quais há uma dupla ligação entre um átomo de carbono e um de oxigênio. Há duas classes principais: as dicetonas vicinais, das quais se destaca o diacetil; e os aldeídos, sendo o acetaldeído um dos mais importantes. Os compostos carbonílicos são importantes para a qualidade da cerveja devido aos seus baixos limites sensoriais quando comparados a outros compostos, como os álcoois superiores e ésteres (Tabela 2). Assim, é importante que sejam produzidos em concentrações adequadas a cada estilo de cerveja (NEDOVIĆ et al., 2015; DJORDJEVIĆ et al., 2016).

A formação de dicetonas vicinais está ligada às vias metabólicas de valina e isoleucina, sendo resultado da descarboxilação não-enzimática de intermediários destas vias durante a fermentação. Conforme apresenta a Figura 14, o piruvato pode

ser convertido em α -acetolactato, que está diretamente ligado à síntese de valina.

Figura 14 – Formação de diacetil

Fonte: Yamauchi et al. (1995b). (Traduzido pelo autor). Reabsorção e redução de diacetil pelas leveduras durante a maturação de cerveja.

No caso de a velocidade de formação de valina ser menor que a de produção de acetolactato, o acúmulo deste resulta na sua excreção para o meio de fermentação. Então, principalmente durante a fermentação secundária (maturação), ocorre a descarboxilação química de acetolactato formando diacetil. Este, por sua vez, pode ser reabsorvido pelas leveduras e então convertido em acetoina (YAMAUCHI et al., 1995b; DZIALO et al., 2017).

Já o acetaldeído, como descrito no item 3.4.1.1 (Figura 10), é o principal intermediário entre o piruvato e o etanol. Além de ser importante na regulação da concentração de etanol na cerveja, influencia de forma significativa no aroma da bebida, sendo o aldeído encontrado em maior abundância em cervejas. Em baixas concentrações, contribui de forma positiva no perfil sensorial com aromas frutados e de folhas verdes. Todavia, em concentrações elevadas resulta em forte e indesejado aroma de maçã verde (NEDOVIĆ et al., 2015; DJORDJEVIĆ et al., 2016; DZIALO et al., 2017).

3.4.2 Alterações fisiológicas em leveduras imobilizadas

O impacto da imobilização no metabolismo e na fisiologia das leveduras é de grande importância no desenvolvimento de um processo de fermentação de cerveja.

A investigação do estado fisiológico das células é essencial para a qualidade do produto final, ainda que a predição do processo e a descrição dos fenômenos envolvidos sejam desafiadores.

Por exemplo, leveduras imobilizadas são mais resistentes a concentrações de etanol normalmente inibitórias às células livres, uma vez que a imobilização (contato com o suporte sólido) estimula a reestruturação da membrana celular por meio do aumento da concentração de ácidos graxos, o que aumenta a resistência ao etanol. Outra explicação é que os géis poliméricos utilizados na imobilização podem atuar como uma camada protetora ao redor das células. Assim, células imobilizadas são capazes de lidar com condições de estresse de forma mais eficiente do que células em suspensão – exemplos disso são inclusive observados na natureza, como a formação de biofilme e de comunidades microbianas (NORTON; D'AMORE, 1994; KOURKOUTAS et al., 2004).

3.4.2.1 Crescimento em um microambiente

Na natureza, as leveduras apresentam diversas habilidades sociais, o que lhes permite sobreviver sob condições estressantes. Mesmo sendo organismos unicelulares, as leveduras podem interagir umas com as outras, por meio da formação de biofilme, floculação e/ou adesão a superfícies (NEDOVIĆ et al., 2015).

Em geral, as células imobilizadas apresentam ativação do metabolismo energético, assim como diferentes padrões de crescimento. Quando comparadas com células livres, a literatura reporta velocidades de crescimento das células imobilizadas tanto maiores, quanto menores (BOULTON; QUAIN, 2001). A velocidade de consumo de substrato e o rendimento de etanol são, em geral, maiores, enquanto a formação de produtos secundários é menor. Células imobilizadas também apresentam tolerância a estresse osmótico e tendem a acumular polissacarídeos de reserva (DORAN; BAILEY, 1986).

Descrever completamente os mecanismos que regem as alterações observadas no metabolismo e na morfologia das células imobilizadas é desafiador. Todavia, existem algumas hipóteses, como: limitações na transferência de massa de substratos e produtos; heterogeneidade no carregamento de biomassa, que pode acarretar em diferentes velocidades de crescimento celular na partícula; diminuição

da atividade de água no microambiente de imobilização; interação entre células; e *quorum-sensing*.

Quorum-sensing é um mecanismo no qual as células respondem à altas densidades celulares no meio, alterando suas respostas metabólicas. Portanto, como um comportamento social, o *quorum-sensing* é um meio de regulação da expressão de moléculas e de comunicação entre as células.

No caso da imobilização de células, natural ou artificialmente, o *quorum-sensing* está relacionado com a formação de compostos voláteis e de álcoois. Os álcoois aromáticos atuam como moléculas de comunicação, estimulando a expressão de proteínas de adesão envolvidas na formação de estruturas de biofilme (NEDOVIĆ et al., 2015). Além disso, as moléculas de álcoois superiores podem induzir a expressão de genes envolvidos na via de Erlich, resultando no aumento da concentração de aldeídos (DJORDJEVIĆ et al., 2016).

Os diferentes padrões de crescimento de células imobilizadas estão relacionados à carga de biomassa no suporte, uma vez que as células reagem de maneiras distintas em ambientes repletos de outras células. Quanto maior a concentração de biomassa em um suporte de imobilização, maior a pressão exercida por uma célula sobre outras e vice-versa.

Portanto, considera-se que a velocidade de crescimento diminui à medida que a carga de biomassa em um suporte aumenta, e que diferentes tipos de suporte vão resultar em uma configuração e um microambiente específico aos quais as células estão expostas. Assim, a morfologia e a atividade das células são um resultado do carregamento de biomassa e sua interação com o ambiente de imobilização (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985; GALAZZO; BAILEY, 1990; NEDOVIĆ et al., 2015).

É difícil concluir se as alterações fisiológicas observadas em células imobilizadas são unicamente devidas às interações da biomassa com o suporte ou à formação de um microambiente tão distinto do obtido com células livres. O mais provável é que ocorra uma interação entre ambos (NORTON; D'AMORE, 1994; NEDOVIĆ et al., 2015).

Algumas proposições são apresentadas na literatura com relação ao crescimento celular de biomassa imobilizada. Com o tempo, células aderidas a superfícies tendem a desprender para o meio, dando espaço para novas células crescerem no suporte. Por outro lado, células aprisionadas no interior do suporte não

são liberadas para o meio, dificultando a formação de novas gerações (NORTON; D'AMORE, 1994).

3.4.2.2 Alterações metabólicas gerais em leveduras imobilizadas

Células imobilizadas tendem a consumir glicose e produzir etanol e glicerol em velocidades maiores do que células livres (GALAZZO; BAILEY, 1990). Leveduras imobilizadas comumente apresentam maiores concentrações de polissacarídeos internos (como glicogênio e trealose) e de parede celular (manana e glucana). Esta alteração metabólica pode ser entendida como uma resposta das células a condições de limitação de nutrientes, encontradas no interior dos suportes de imobilização.

Assim, surgem duas hipóteses: a primeira é que as células se encontram em um ambiente com alta densidade celular, inibindo a formação de novas células, mas estimulando a produção de polímeros internos; e a segunda está relacionada com a regulação da via de Embden-Meyerhof-Parnas. Considera-se que o ponto de regulação desta via em leveduras imobilizadas seja a atuação da enzima fosfofrutoquinase (PFK). Em sistemas com células livres, as reações catalisadas pelas enzimas hexoquinase, PFK e piruvato quinase são os pontos de regulação, além do consumo de glicose pela célula (transporte para o interior da levedura). No caso das imobilizadas, a velocidade de consumo de glicose é maior do que a capacidade de a PFK converter seu substrato para a continuidade da glicólise e subsequente fermentação alcoólica (GALAZZO; BAILEY, 1990).

Células imobilizadas também apresentam aumento na permeabilidade da membrana celular, provavelmente devido a interações entre as células e/ou com o suporte. Este aumento na permeabilidade resulta na elevação da concentração de prótons no interior das células, o que estimula o consumo de ATP e, portanto, o consumo de glicose. Independentemente do tipo de suporte (por exemplo, cerâmica ou gel polimérico), as células tendem a lidar com o aumento na velocidade de consumo de substrato canalizando-o na formação de produtos finais, polissacarídeos de reserva, DNA e RNA (NORTON; D'AMORE, 1994; DORAN; BAILEY, 1986).

Adicionalmente, as células imobilizadas (especialmente em suportes formados por géis) geralmente se encontram em um ambiente com baixa atividade de água, ou seja, com alta pressão osmótica. Portanto, para manter um estado fisiológico

saudável, o metabolismo deve se adaptar gerando compostos osmoprotetores, como o glicerol (NORTON; D'AMORE, 1994).

3.4.2.3 Impacto da imobilização na formação de compostos de flavour

Todos os compostos de *flavour* (álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais) estão relacionados ao metabolismo das leveduras. Portanto, uma vez que ocorram alterações fisiológicas, as concentrações finais destes compostos também serão afetadas (NEDOVIĆ et al., 2015; DJORDJEVIĆ et al., 2016).

Em geral, leveduras aprisionadas em géis apresentam menor formação de diacetil, álcoois superiores e ésteres, em comparação com leveduras em suspensão, em temperaturas na faixa de 5-20 °C. Isto está relacionado ao fato de que, neste método, o consumo de aminoácidos é dificultado. Já no caso de leveduras aderidas a DEAE-celulose, a formação de diacetil, álcoois superiores e ésteres é diretamente proporcional ao aumento de temperatura (WILLAERT; NEDOVIĆ, 2006).

Em alguns sistemas, a imobilização de leveduras resulta em redução na atividade metabólica, o que, por sua vez, causa a diminuição na formação de produtos secundários do metabolismo, como os ésteres. Todavia, devido a limitações na transferência de massa, a difusão de oxigênio para o interior de aglomerados microbianos pode ser mínima. Neste caso, a formação de ésteres é estimulada devido à redução no crescimento microbiano, ocorrendo a canalização de acetil-CoA para a geração de ésteres ao invés de síntese de ácidos graxos. Assim, dependendo das condições operacionais, pode ocorrer de sistemas com leveduras imobilizadas apresentarem concentrações maiores de ésteres em comparação às em suspensão (WILLAERT; NEDOVIĆ, 2006).

Considera-se então que, dependendo da configuração de biorreator utilizada, a formação de ésteres e álcoois superiores pode ser aumentada ou diminuída em decorrência da imobilização celular. Em sistemas que garantem oxigenação suficiente para as leveduras, a tendência é o crescimento celular e, portanto, o metabolismo de aminoácidos (que está diretamente relacionado com a formação de compostos de *flavour*) é ativado. Nestes casos, a formação de álcoois superiores é estimulada (KOURKOUTAS et al., 2004; BRÁNYIK et al., 2005; WILLAERT; NEDOVIĆ, 2006; BRÁNYIK et al., 2008; DJORDJEVIĆ et al., 2016). Por outro lado, sistemas muito aerados resultam em ambientes pouco favoráveis à formação de ésteres. Este é um

fator que deve ser considerado no desenvolvimento e controle do processo (DJORDJEVIĆ et al., 2016).

Considerando a formação de dicetonas vicinais, sistemas de células imobilizadas frequentemente resultam em maior geração de diacetil, comparados com processos com células livres. Existem duas possíveis explicações: a primeira é que as elevadas velocidades de fermentação existentes em sistemas com leveduras imobilizadas resultam em maiores concentrações de diacetil. Ou seja, devido a limitações na transferência de massa, o diacetil produzido difunde lentamente do meio líquido de volta para o agregado microbiano, o que limita sua conversão a acetoína durante a maturação; a segunda hipótese é o aumento da formação anabólica de precursores de aminoácidos (BRÁNYIK et al., 2005).

3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA

3.5.1 Cinética de fermentação

Uma das abordagens mais promissoras para a compreensão de processos químicos e bioquímicos é a modelagem matemática, que possibilita identificar os fenômenos mais significativos presentes no sistema, assim como a interação entre eles (SCHMIDELL et al., 2001).

Em processos fermentativos, a modelagem fenomenológica tem sido utilizada para a sistematização do conhecimento referente à cinética de consumo de substratos, formação de produtos e crescimento de biomassa. Uma vez definido um modelo fenomenologicamente coerente, torna-se possível a predição de cinéticas de fermentação por meio da simulação computacional. Esta possibilidade garante a redução de custos experimentais, sendo possível a avaliação de diferentes condições *in silico* (SCHMIDELL et al., 2001; DUNN et al., 2003).

Outra característica da modelagem matemática de fermentações industriais é a possibilidade da obtenção de parâmetros fisiológicos (velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), constante de saturação (K_{sx}) e fator de conversão de células a partir de substrato (Y_{xs})), por meio de técnicas matemáticas de estimação de parâmetros de funções. Assim, mesmo que estes dados não estejam disponíveis para determinado cultivo, utilizando-se o modelo e a ferramenta de estimação de

parâmetros apropriados, torna-se possível sua obtenção (KOSTOV et al., 2012; PARCUNEV et al., 2012).

Com o uso destas ferramentas, a comparação entre os estados fisiológicos de leveduras livres e imobilizadas pode ser quantificada, ainda que com base em valores estimados. Ou seja, o ajuste de modelos a valores experimentais faz com que os parâmetros fisiológicos possam ser comparados (PARCUNEV et al., 2012). Este ajuste do modelo aos dados experimentais é feito de tal forma que resulte na menor diferença possível entre os valores do modelo e os obtidos experimentalmente (SCHMIDELL et al., 2001).

Dentre as ferramentas matemáticas para estimação de parâmetros, as mais utilizadas em processos fermentativos são as de integração numérica e ajuste por regressão não-linear. Isto porque, em geral, os bioprocessos tendem a apresentar um comportamento cinético não-linear (por exemplo, cinética de Monod). Ainda, deste grupo de técnicas matemáticas, destaca-se o método de Nelder-Mead, por apresentar maior robustez em sistemas com alto número de parâmetros a serem estimados, o que comumente é o caso em engenharia de bioprocessos (SCHMIDELL et al., 2001).

O algoritmo de Nelder-Mead é um método iterativo de estimação de parâmetros, sem restrições. Ou seja, durante o cálculo dos parâmetros, não há limites inferior e/ou superior que delimitem as possibilidades de estimação. Esta técnica é classificada como de busca direta, uma vez que não utiliza derivadas das funções analisadas mas os valores das próprias funções para estimação dos seus parâmetros (BARATI, 2011).

O método é iniciado gerando um simplex (uma generalização de um triângulo em outras dimensões), utilizando as estimações iniciais propostas pelo usuário, os palpites iniciais dos valores dos parâmetros que, em geral, vêm da prática do pesquisador.

O palpite inicial é utilizado como um dos vértices do simplex, enquanto os n vértices restantes são estimados por meio das operações de reflexão, expansão, contração e encolhimento, para redimensionar o simplex de forma a reduzir a diferença entre os valores calculados e verdadeiros (experimentais) (BARATI, 2011). A Figura 15 apresenta um esquema do algoritmo de Nelder-Mead.

Figura 15 – Estimação de parâmetros pelo método de Nelder-Mead

Fonte: Barati (2011). (Traduzido pelo autor). Algoritmo de Nelder-Mead para estimação de parâmetros.

Desta forma, a técnica também é chamada de método dos poliedros flexíveis, uma vez que, como apresentado na Figura 16, ela consiste no redimensionamento de uma forma geométrica em um espaço de valores. Esta forma pode ser ampliada ou reduzida, sempre com o objetivo de obter o menor erro residual da diferença entre os valores experimentais e estimados (SCHMIDELL et al., 2001).

Figura 16 – Flexibilização dos poliedros no espaço

Fonte: Barati (2011). (Traduzido pelo autor). Em que: X_1 , X_2 e X_3 = vértices do poliedro; $\bar{X}$ = centroide do poliedro; X_r = ponto de reflexão; X_e = ponto de expansão; e X_c = ponto de contração; e X_{cc} = ponto de contração interno.

3.5.2 Reação-difusão

Uma abordagem matemática particularmente interessante para sistemas com células imobilizadas é a avaliação da transferência de massa (principalmente de substrato) do meio líquido para as leveduras contidas no interior do suporte. Em outras palavras, considerando uma lógica semelhante à usada em sistemas com enzimas imobilizadas, torna-se possível um raciocínio dedutivo para modelagem matemática do gradiente de concentração de substrato ao qual as leveduras estão expostas quando imobilizadas (ENGASSER; HORVATH, 1973; DORAN, 2013). Neste caso, à cinética de crescimento deve-se adicionar o efeito físico decorrente da transferência de massa (SHULER; KARGI, 2002).

A dedução das equações que regem esse sistema é apresentada na seção 4.4.2 (ENGASSER; HORVATH, 1973; SHULER; KARGI, 2002; DORAN, 2013; GOLMAN, 2016).

Espera-se deste tipo de modelo a avaliação da eficiência de suportes de imobilização para utilização industrial, por meio de parâmetros adimensionais, como o módulo de Thiele (ϕ) e fator de efetividade (η), também apresentados no item 4.4.2 (THIELE, 1939; DORAN, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO, CRIOPRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS

As linhagens de leveduras utilizadas neste projeto foram fornecidas pela empresa Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda, sendo das seguintes classificações: tipo Ale (American Ale - SY025, *Saccharomyces cerevisiae*), tipo Weiss (Belgian Wit - SY067, *Saccharomyces cerevisiae*) e tipo Lager (Pilsner Lager - SY001, *Saccharomyces pastorianus*).

Para a criação de um banco de linhagens, cada levedura foi submetida ao tratamento de criopreservação. Uma cultura-estoque de cada linhagem foi obtida através do cultivo em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio YPD 2 % (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹ e glicose 20 g.L⁻¹), sendo os frascos submetidos à incubação rotativa a 30 °C e 200 rpm por 24 h. Após este período, foi adicionado glicerol estéril ao cultivo como agente crioprotetor, à concentração final de 20 % (v/v). Então, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em criotubos estéreis, os quais foram estocados a -80 °C. Todos os experimentos do projeto partiram desses estoques de células.

Para reativação das células e preparação dos inóculos, utilizou-se uma alça de platina estéril para transferir uma porção do material em criopreservação, pela técnica do esgotamento, para uma placa de Petri com meio YPD 2 % (m/v) com adição de ágar (16 g.L⁻¹). As placas foram então incubadas em estufa a 30 °C por 24 h. Uma colônia da placa foi transferida para um frasco contendo 20 mL de meio YPD 1 % (extrato de levedura 5 g.L⁻¹, peptona 10 g.L⁻¹ e glicose 10 g.L⁻¹) que permaneceu *overnight* em incubação rotativa a 30 °C e 200 rpm.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS

Neste trabalho, utilizou-se a matriz de imobilização ImoYeast, que é um sólido poroso capaz de absorver suspensões celulares. O suporte é produzido no formato de partículas aproximadamente esféricas, com diâmetro médio de 7,5 mm. Tanto sua composição quanto o processo de produção foram desenvolvidos pelo autor e pela pesquisadora Heluara Junca na empresa Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda, durante seu trabalho de conclusão de curso de graduação (JUNCA; DE ARAUJO, 2017). O

suporte foi desenvolvido de tal forma a se atingir o equilíbrio entre porosidade e resistência mecânica e, dentre os componentes que formam a matriz, o principal é a celulose. A Figura 17 apresenta uma foto de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da matriz ImoYeast.

Figura 17 – Partícula de imobilização ImoYeast

Fonte: micrografia (aumento de 28x) realizada pelo professor Dr. Marcel Lyra, do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.2.1 Teste 1 – Imobilização direta

As esferas ImoYeast foram secas por 48 h em estufa a 80 °C e, ao fim deste período, em condições estéreis, o suporte foi adicionado a uma suspensão celular à proporção de 18 g de matriz seca para 20 mL de suspensão de leveduras (linhagem SY025 à concentração de $9 \cdot 10^6$ células/mL).

O sistema foi agitado manualmente até que não houvesse mais líquido livre (até que todas as leveduras antes em suspensão tivessem sido absorvidas para o interior da matriz). Para avaliar a eficiência deste método de imobilização, foi feita uma fermentação em meio YPM modificado (extrato de levedura 5 g.L⁻¹, peptona 10 g.L⁻¹ adicionado de maltose a 12 graus Plato (°P; equivalente a g/100 g meio)).

As condições de fermentação foram 18 °C, cultivo sem agitação em frascos Erlenmeyer vedados de 250 mL contendo 100 mL de meio, em triplicata, durante 146 h. Em cada frasco foram adicionados 18 g de suporte com leveduras adsorvidas, pelo método descrito.

4.2.1.1 Porcentagem de massa seca nas esferas

Amostras das partículas ImoYeast foram retiradas periodicamente, para determinação de umidade. Imediatamente após a coleta, as esferas aliquoteadas foram pesadas em balança analítica para determinação de massa úmida, definida como o sistema contendo o suporte ImoYeast, leveduras imobilizadas e líquido absorvido do meio de cultivo. Então, as esferas foram submetidas à temperatura de 80 °C em estufa por 24 h para secagem e, ao fim deste período, pesadas novamente para determinação de massa seca (massa de suporte mais leveduras). Para a obtenção da porcentagem equivalente à massa seca no sistema de fermentação, utilizou-se a Equação 1.

$$\% \text{ massa seca} = \left(\frac{\text{massa seca (g)}}{\text{massa úmida ou total (g)}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

4.2.1.2 Quantificação de biomassa

Amostras foram retiradas periodicamente para quantificação da concentração celular, por contagem de células em câmara de Neubauer com azul de metileno 0,2 %, tanto das células fixas no suporte quanto das desprendidas para o meio líquido.

Utilizou-se a proporção de 1 mL de amostra diluída em água de osmose reversa para 1 mL de corante, homogeneizando a mistura durante um minuto em agitador de tubos do tipo vórtex. As diluições da amostra para contagem variaram de 2x a 100x, de forma que em cada quadrante da câmara de Neubauer houvesse no máximo 30 células.

Nos experimentos realizados no Teste 1, as formas de quantificação de biomassa para células em suspensão e imobilizadas foram padronizadas para o restante do trabalho. Para comparação quantitativa de biomassa entre experimentos com células livres e imobilizadas, optou-se por utilizar o número total de células contido em cada frasco.

Para a quantificação de leveduras livres, foram retiradas amostras do meio líquido para contagem. Uma vez que o resultado da contagem se dá em células/mL de meio, esse valor foi multiplicado pelo volume de meio no frasco V_{ferm} (Equação 2).

Assumiu-se que o volume das amostras colhidas pode ser negligenciado, ou seja, um processo em batelada com volume constante.

$$\text{número total de células}_{\text{livres}} = X \cdot V_{\text{ferm}} \quad (2)$$

Em que: X = concentração de biomassa (células/mL); V_{ferm} = volume de cultivo (mL).

Para a quantificação de células imobilizadas, primeiramente foi coletada uma amostra do suporte (uma ou duas esferas). A amostra foi pesada em balança analítica e a massa úmida obtida foi multiplicada pela porcentagem de massa seca, calculada anteriormente pela Equação 1. A amostra foi então ressuspensa em 2 mL de fosfato de sódio 5 % para liberação das leveduras e contagem em câmara de Neubauer (PILKINGTON et al., 1998).

O resultado da contagem (dado em células/mL de suspensão) foi multiplicado pelo volume da suspensão ($V_{\text{cont}} = 2$ mL) e dividido pela massa seca da amostra $m_{\text{seca, amostra}}$, originando a quantidade de células/g de matriz seca. Ao multiplicar este valor pela massa seca total de matriz presente no frasco ($m_{\text{seca, frasco}} = 18$ g), foi obtido o número total de células imobilizadas (Equações 3 e 4).

$$\text{número total de células}_{\text{imobilizadas}} = \left(\frac{X \cdot V_{\text{cont}}}{m_{\text{seca, amostra}}} \right) \cdot m_{\text{seca, frasco}} \quad (3)$$

$$m_{\text{seca, amostra}} = (\text{massa úmida de amostra}) * (\% \text{ massa seca}) \quad (4)$$

Em que: V_{cont} = volume em que se dissolveu a matriz de imobilização para contagem celular (mL); $m_{\text{seca, amostra}}$ = massa seca da amostra de esferas (g); $m_{\text{seca, frasco}}$ = massa seca total das esferas no frasco de fermentação (g).

4.2.1.3 Eficiência de imobilização

Foi calculada a eficiência de imobilização (EI) pela Equação 5, sendo este o parâmetro indicador da retenção de biomassa no suporte ImoYeast.

$$EI (\%) = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de células imobilizadas}}{n^{\circ} \text{ de células imobilizadas} + n^{\circ} \text{ de células livres}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

4.2.2 Teste 2 – Imobilização combinada

Outros quatro métodos de imobilização para o suporte ImoYeast foram testados, baseados em revestimento e infiltração por alginato de cálcio, como apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Revestimento e infiltração por alginato de cálcio

Fonte: O autor. a) método de imobilização de leveduras por colonização e revestimento com alginato de cálcio (A - Revestimento). b) método de imobilização por colonização e aprisionamento em alginato de cálcio (B - Infiltrado).

- A – Revestimento: Este método foi dividido em duas etapas. A primeira, consistiu em secar as esferas da matriz a 80 °C por 48 h e, após este período, transferi-las para uma suspensão de leveduras, em meio YPM 12 °P, à concentração adequada (9.10^6 células/mL), na proporção de 18 g de suporte seco para 20 mL de suspensão. Na segunda etapa, as esferas contendo a biomassa foram revestidas, com o auxílio de espátulas, por submersão em ao menos 50 mL de solução de alginato de sódio 3 % por no máximo 10 segundos.

E por fim, as esferas foram submersas em ao menos 250 mL de solução de cloreto de cálcio 2 % por 30 minutos, para que ocorresse a gelificação, ou seja, reação de polimerização entre os sais, formando alginato de cálcio ao redor da superfície externa do suporte ImoYeast.

- B – Infiltrado: Primeiramente, centrifugou-se 20 mL de uma suspensão de leveduras (9.10^6 células/mL), em meio YPM 12 °P, por 15 min a 10000 g em centrífuga refrigerada CR 21GIII (Hitachi, Japão). Após o descarte do sobrenadante, a biomassa foi homogeneizada em 50 mL de solução de alginato de sódio 3 %. Esta nova suspensão foi absorvida pela matriz seca, à proporção de 18 g de suporte para 20 mL de suspensão, sendo este sistema submerso em 250 mL de solução de cloreto de cálcio 2 % durante 30 minutos, para que houvesse gelificação também por dentro do suporte e não apenas em seu exterior.
- C – Infiltrado + revestimento (30 min): Inicialmente, realizou-se a variação B. Após os 30 min de gelificação no interior do suporte, realizou-se a segunda etapa do método A.
- D – Infiltrado + revestimento (*overnight*): emprego dos mesmos procedimentos que na metodologia C, mas com tempo de gelificação igual a 12 h (*overnight*).

Em todas as variações do método de imobilização, as células foram imobilizadas sem terem sido lavadas. Foram conduzidas fermentações em triplicata para cada variação da metodologia de imobilização, com o objetivo de avaliar a eficiência de imobilização (EI) de cada método.

O cultivo foi realizado de modo estático em batelada em frascos Erlenmeyer de 500 mL fechados com tampões de algodão, contendo 200 mL de uma solução de xarope de malte a 12 °P, diluída a partir de um extrato de malte comercial (xarope de malte pilsen Grano Mestre, Iomerê, lote 0119 – fornecido pela Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda), em estufa a 18 °C durante 8 dias.

Com o intuito de validar qual o melhor método de imobilização, conduziu-se uma análise estatística pela tabela ANOVA (análise de variância) dos resultados em triplicata de EI. Para comparação entre os diferentes resultados, utilizou-se o Teste de Tukey com um nível de significância $\alpha = 0,05$ (ver Apêndice A).

4.3 CINÉTICAS DE FERMENTAÇÃO

4.3.1 Condições experimentais

Após a definição do método de imobilização, foram realizadas cinéticas de fermentação em triplicata com 3 linhagens de leveduras cervejeiras, nas configurações livres e imobilizadas, totalizando 18 experimentos. Nos experimentos com células imobilizadas, foi utilizado o procedimento C de imobilização (infiltrado + revestimento (30 min)), conforme descrito no item 4.2.2.

Todas as cinéticas foram conduzidas em regime de batelada (descontínuo) e sem agitação (estática) em 200 mL de xarope de malte 12 °P (extrato de malte pilsen Grano Mestre, Iomerê, lote 0119), em frascos Erlenmeyer de 500 mL vedados com rolhas de silicone contendo filtros *one-way* para a saída de gases, por 4-5 dias. Amostras foram retiradas a cada 24 h para quantificação de biomassa, substrato, produtos e densidade do meio de fermentação.

Foram utilizadas diferentes temperaturas e concentrações iniciais de biomassa para cada cepa, de acordo com os valores utilizados industrialmente para cada estilo de cerveja, apresentados na Tabela 3 (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). A Figura 19 apresenta os sistemas de fermentação utilizados.

Tabela 3 – Condições de fermentação para as diferentes linhagens

Linhagem	Concentração inicial (células/mL)	Temperatura (°C)	Tempo de fermentação (h)
SY025	$9,0 \cdot 10^6$	18	116
SY067	$1,2 \cdot 10^7$	20	117,5
SY001	$1,8 \cdot 10^7$	11	118

Fonte: O autor. Concentração inicial e temperatura ótimas para cada linhagem (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Figura 19 – Sistemas de fermentação com leveduras livres e imobilizadas

Fonte: O autor. a) linhagem SY025; b) linhagem SY067; e c) linhagem SY001.

4.3.2 Quantificação de biomassa, substrato, produtos e densidade e cálculo de parâmetros fisiológicos

A quantificação de biomassa foi realizada conforme descrito no item 4.2.1.2, mas para facilitar a visualização dos dados, as unidades foram transformadas de “número de células” para “concentração de biomassa (g/L)”, por meio de correlações obtidas em laboratório para cada linhagem, como apresentado no Apêndice B.

A quantificação de substratos e produtos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance, LC-20A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando: coluna de troca iônica Aminex HPX-87H a 60 °C, solução de ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel e vazão de 0,6 mL/min; e detectores IR e UV a 50 °C. Estas análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Biotecnologia, no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP).

A densidade do meio de fermentação foi determinada utilizando-se um densímetro digital DMA4500 (Anton Paar, Graz, Áustria) localizado no LaPCat (Laboratório de Pesquisa e Inovação em Processos Catalíticos), no Departamento de Engenharia Química da EPUSP, com o objetivo de monitorar o andamento da fermentação.

Os parâmetros fisiológicos das três linhagens nos sistemas livres e imobilizados foram calculados de acordo com Schmidell et al. (2001). São eles: fator de conversão de substrato em células, Y_{XS} (Equação 6); fator de conversão de substrato em etanol, Y_{PSet} (Equação 7); fator de conversão de substrato em glicerol, Y_{PSgly} (Equação 8); produtividade mássica global de biomassa, P_X (Equação 9); produtividade mássica global de etanol, P_{Pet} (Equação 10); e produtividade mássica global de glicerol, P_{Pgly} (Equação 11).

$$Y_{XS} = \frac{m_X - m_{X0}}{m_{S0} - m_S} \quad (6)$$

$$Y_{PSet} = \frac{m_{Et} - m_{Et0}}{m_{S0} - m_S} \quad (7)$$

$$Y_{PSgly} = \frac{m_{Gly} - m_{Gly0}}{m_{S0} - m_S} \quad (8)$$

$$P_X = \frac{m_X - m_{X0}}{t - t_0} \quad (9)$$

$$P_{Pet} = \frac{m_{Et} - m_{Et0}}{t - t_0} \quad (10)$$

$$P_{Pgly} = \frac{m_{Gly} - m_{Gly0}}{t - t_0} \quad (11)$$

Onde: m_X = massa de biomassa (g); m_{X0} = massa inicial de biomassa (g); m_S = massa de substrato (g); m_{S0} = massa inicial de substrato (g); m_{Et} = massa de etanol (g); m_{Et0} = massa inicial de etanol; m_{Gly} = massa de glicerol (g); m_{Gly0} = massa inicial de glicerol (g); t = tempo final de fermentação (h); e t_0 = tempo inicial de fermentação (h).

4.3.3 Perfis sensoriais

Ao término das cinéticas de fermentação, 100 mL de meio de cada frasco foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada CR 21GIII (Hitachi, Japão). O sobrenadante foi congelado e, então, enviado para a quantificação de

compostos aromáticos pela empresa Bio4. Utilizou-se um cromatógrafo de fase gasosa Perkin Elmer Clarus 580 (Shelton, Estados Unidos), equipado com detector de ionização de chama (GC-FID); coluna Elite WAX Polietilenoglicol, cujo comprimento, diâmetro interno e espessura de filme são, respectivamente, 60 m, 0,25 mm e 0,25 μm .

Os parâmetros de operação do sistema consistiram em: injeção automática via *autosampler* com volume de 1 μL ; temperatura do injetor de 220 °C; temperatura do detector de 250 °C; e temperatura do forno inicial a 40 °C, com rampa de 5 °C/min até 70 °C, isoterma durante 7,4 min e rampa de 25 °C/min até 90 °C, e isoterma durante 5,80 min.

Curvas de calibração foram confeccionadas para os seguintes compostos: 1-propanol, 2-metil propanol (isobutanol), 3-metil butanol (álcool isoamílico), acetato de etila e acetaldeído; utilizando padrões de grau GC Merck, com padrão interno de 1-butanol a 50 mg/L.

4.3.4 Microscopia eletrônica

Para a visualização da condição das esferas ao longo da fermentação por meio de microscopia eletrônica, foram retiradas amostras nos tempos de fermentação 0 h, 69 h e 117 h, aproximadamente. As amostras foram suspensas em 2 mL de água de osmose reversa e enviadas ao Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), conduzida pelo professor Dr. Marcel Lyra.

As partículas ImoYeast foram fixadas em aldeídos e então desidratadas em etanol e secas por ponto crítico de CO_2 . Seguiu-se o seu congelamento em nitrogênio líquido e, após congeladas, as amostras foram fraturadas na seção transversal, separando-as em duas frações. Por fim, realizou-se a secagem em dessecador com bomba de vácuo.

A fratura das partículas teve como propósito a análise da região central do suporte, para observação do crescimento microbiano tanto nas regiões internas quanto superficiais do suporte de imobilização.

4.4 MODELAGEM MATEMÁTICA

4.4.1 Estimação de parâmetros cinéticos

A Equação 12 foi utilizada como fórmula geral para os balanços de massa de biomassa (tanto livre quanto imobilizada), substrato e produtos.

$$acúmulo = entra - sai + gerado - consumido \quad (12)$$

A partir da equação geral, os modelos de cinética de fermentação para leveduras livres e imobilizadas foram desenvolvidos, com seus volumes de controle indicados na Figura 20.

Figura 20 – Volumes de controle para modelagem da cinética de fermentação

Fonte: O autor. a) volume de controle para fermentação com leveduras livres; e b) volume de controle para fermentação com leveduras imobilizadas. Onde: VC = volume de controle para modelagem; V = volume do meio de fermentação (mL); m_X = massa de levedura em suspensão (g); m_S = massa de substrato (g); m_P = massa de produtos (g); m_{Xim} = massa de leveduras fixas ao suporte de imobilização (g); e m_{Xdesp} = massa de leveduras desprendidas do suporte para o meio de fermentação (g).

4.4.1.1 Leveduras livres

As relações de balanço de massa para as fermentações conduzidas com leveduras livres são dadas pelas Equações 13 a 16 e a Tabela 4 apresenta a relação das variáveis envolvidas.

$$\frac{dm_X}{dt} = \mu m_X \quad (13)$$

$$\frac{dm_S}{dt} = -q_S m_X \quad (14)$$

$$\frac{dm_{Et}}{dt} = q_{Pet} m_X \quad (15)$$

$$\frac{dm_{Gly}}{dt} = q_{Pgly} m_X \quad (16)$$

Tabela 4 – Variáveis dos balanços de massa para sistema com leveduras livres

Grandeza	Descrição	Unidade
dm_X/dt	Variação de massa de células em relação ao tempo	g biomassa/h
μ	Velocidade específica de crescimento celular	h^{-1}
m_X	Massa de células	g biomassa
dm_S/dt	Variação de massa de substrato em relação ao tempo	g substrato/h
q_S	Velocidade específica de consumo de substrato	g substrato/(g biomassa.h)
dm_{Et}/dt	Variação de massa de etanol em relação ao tempo	g etanol/h
q_{Pet}	Velocidade específica de formação de etanol	g etanol/(g biomassa.h)
dm_{Gly}/dt	Variação de massa de glicerol em relação ao tempo	g glicerol/h
q_{Pgly}	Velocidade específica de formação de glicerol	g glicerol/(g biomassa.h)

Fonte: O autor. Variáveis envolvidas nas equações de balanço de massa para o sistema com leveduras livres (Equações 13 a 16).

Os modelos cinéticos investigados consideraram limitação por substrato (cinética de Monod, Equação 17) ou inibição por etanol (cinética de Hinshelwood,

Equação 18), conforme apresentado pelas Equações 17 a 22. A Tabela 5 apresenta a relação das variáveis envolvidas.

$$\mu_{Monod} = \frac{\mu_{m\acute{a}x}m_S}{K_{Sx}+m_S} \quad (17)$$

$$\mu_{Hins} = \left(\frac{\mu_{m\acute{a}x}m_S}{K_{Sx}+m_S} \right) (1 - K_{px}m_{Et}) \quad (18)$$

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{XS}} \quad (19)$$

$$q_{Pet\ Monod} = \mu Y_{PXet} \quad (20)$$

$$q_{Pet\ Hins} = \left(\frac{q_{Pm\acute{a}x}m_S}{K_{sp}+m_S} \right) (1 - K_{pp}m_{Et}) \quad (21)$$

$$q_{Pgly} = \mu Y_{PXgly} \quad (22)$$

Tabela 5 – Variáveis dos modelos cinéticos para sistema com leveduras livres

Grandeza	Descrição	Unidade
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular	h^{-1}
m_S	Massa de substrato	g substrato
K_{Sx}	Constante de saturação de Monod	g substrato
K_{Px}	Constante de inibição devido ao crescimento	g etanol
m_{Et}	Massa de etanol	g etanol
Y_{XS}	Fator de conversão de substrato em células	g biomassa/ g substrato
Y_{PXet}	Rendimento de etanol a partir de biomassa	g etanol/ g biomassa
$q_{Pm\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de formação de etanol	g etanol/(g biomassa. h)
K_{SP}	Constante de saturação de Hinshelwood	g substrato
K_{PP}	Constante de inibição devido à formação de produto	g etanol
Y_{PXgly}	Rendimento de glicerol a partir de biomassa	g glicerol/ g biomassa

Fonte: O autor. Variáveis envolvidas nos modelos cinéticos usados para o sistema com leveduras livres (Equações 17 a 22).

4.4.1.2 Leveduras imobilizadas

As Equações 23 a 27 constituem o modelo para o sistema de fermentação com leveduras imobilizadas, considerando tanto aquelas efetivamente presas no suporte de imobilização ImoYeast (variáveis e parâmetros indicados pelo subscrito *im*), quanto as desprendidas para o meio líquido ao longo da cinética de fermentação (subscrito *desp*). Na Tabela 6, estão listados os termos envolvidos.

$$\frac{dm_{Xim}}{dt} = \mu_{im} m_{Xim} - k m_{Xim} \quad (23)$$

$$\frac{dm_{Xdesp}}{dt} = \mu_{desp} m_{Xdesp} + k m_{Xim} \quad (24)$$

$$\frac{dm_S}{dt} = -(q_{S,im} m_{Xim}) - (q_{S,desp} m_{Xdesp}) \quad (25)$$

$$\frac{dm_{Et}}{dt} = q_{Pet,im} m_{Xim} + q_{Pet,desp} m_{Xdesp} \quad (26)$$

$$\frac{dm_{Gly}}{dt} = q_{Pgly,im} m_{Xim} + q_{Pgly,desp} m_{Xdesp} \quad (27)$$

Tabela 6 – Variáveis dos balanços de massa para sistema com leveduras imobilizadas

Grandeza	Descrição	Unidade
dm_{Xim}/dt	Varição de massa de células presas no suporte ImoYeast em relação ao tempo	g biomassa imobilizada/h
μ_{im}	Velocidade específica de crescimento celular das leveduras imobilizadas	h^{-1}
m_{Xim}	Massa de células imobilizadas	g biomassa imobilizada
k	Velocidade específica de desprendimento celular	h^{-1}
dm_{Xdesp}/dt	Varição de massa de células desprendidas do suporte para o meio em relação ao tempo	g biomassa desprendida/h
μ_{desp}	Velocidade específica de crescimento celular das leveduras desprendidas para o meio	h^{-1}
m_{Xdesp}	Massa de células desprendidas	g biomassa desprendida
$q_{S, im}$	Velocidade específica de consumo de substrato pelas leveduras imobilizadas	g substrato/(g biomassa imobilizada.h)

$q_{S, \text{ desp}}$	Velocidade específica de consumo de substrato pelas leveduras desprendidas	$g \text{ substrato}/(g \text{ biomassa desprendida.h})$
$q_{\text{Pet}, \text{ im}}$	Velocidade específica de formação de etanol pelas leveduras imobilizadas	$g \text{ etanol}/(g \text{ biomassa imobilizada.h})$
$q_{\text{Pet}, \text{ desp}}$	Velocidade específica de formação de etanol pelas leveduras desprendidas	$g \text{ etanol}/(g \text{ biomassa desprendida.h})$
$q_{\text{Pgly}, \text{ im}}$	Velocidade específica de formação de glicerol pelas leveduras imobilizadas	$g \text{ glicerol}/(g \text{ biomassa imobilizada.h})$
$q_{\text{Pgly}, \text{ desp}}$	Velocidade específica de formação de glicerol pelas leveduras desprendidas	$g \text{ glicerol}/(g \text{ biomassa desprendida.h})$

Fonte: O autor. Variáveis envolvidas nas equações de balanço de massa para o sistema com leveduras imobilizadas (Equações 23 a 27).

Semelhantemente às livres, os modelos cinéticos utilizados para as leveduras imobilizadas consistiram nas cinéticas de Monod (Equação 28) e Hinshelwood (Equação 29). As equações cinéticas estão dispostas nas Equações 28 a 33. Na Tabela 7, encontra-se a descrição das variáveis utilizadas.

$$\mu_{im \text{ Monod}} = \frac{\mu_{\text{máx}, im} m_S}{K_{sx, im} + m_S} \quad (28)$$

$$\mu_{im \text{ Hins}} = \left(\frac{\mu_{\text{máx}, im} m_S}{K_{sx, im} + m_S} \right) (1 - K_{px, im} m_{Et}) \quad (29)$$

$$q_{S, im} = \frac{\mu_{im}}{Y_{XS, im}} \quad (30)$$

$$q_{\text{Pet}, im \text{ Monod}} = \mu_{im} Y_{PXet, im} \quad (31)$$

$$q_{\text{Pet}, im \text{ Hins}} = \left(\frac{q_{P\text{máx}, im} m_S}{K_{sp, im} + m_S} \right) (1 - K_{pp, im} m_{Et}) \quad (32)$$

$$q_{\text{Pgly}, im} = \mu_{im} Y_{PXgly, im} \quad (33)$$

Tabela 7 – Variáveis dos modelos cinéticos para sistema com leveduras imobilizadas (considerando as fixas no suporte)

Grandeza	Descrição	Unidade
$\mu_{\text{máx}, im}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular das leveduras imobilizadas	h^{-1}

$K_{SX, im}$	Constante de saturação de Monod das leveduras imobilizadas	g substrato
$K_{PX, im}$	Constante de inibição devido ao crescimento de leveduras imobilizadas	g etanol
$Y_{XS, im}$	Fator de conversão de substrato em células imobilizadas	g biomassa imobilizada/g substrato
$Y_{PXet, im}$	Rendimento de etanol a partir de biomassa imobilizada	g etanol/g biomassa imobilizada
$q_{Pmáx, im}$	Velocidade específica máxima de formação de etanol pelas leveduras imobilizadas	g etanol/(g biomassa imobilizada.h)
$K_{PP, im}$	Constante de inibição devido à formação de produto das leveduras imobilizadas	g etanol
$Y_{PXgly, im}$	Rendimento de glicerol a partir de biomassa imobilizada	g glicerol/g biomassa imobilizada

Fonte: O autor. Variáveis envolvidas nos modelos cinéticos usados para o sistema com leveduras imobilizadas, considerando as efetivamente imobilizadas (Equações 28 a 33).

Seguindo o mesmo raciocínio, os modelos cinéticos para as leveduras desprendidas do suporte de ImoYeast são apresentados nas Equações 34 a 39, e a Tabela 8 apresenta as variáveis utilizadas.

$$\mu_{desp} = \frac{\mu_{máx,desp} m_S}{K_{S,desp} + m_S} \quad (34)$$

$$\mu_{desp} = \left(\frac{\mu_{máx,desp} m_S}{K_{SX,desp} + m_S} \right) (1 - K_{px,desp} m_{Et}) \quad (35)$$

$$q_{S,desp} = \frac{\mu_{desp}}{Y_{XS,desp}} \quad (36)$$

$$q_{Pet,desp} = \mu_{desp} Y_{PXet,desp} \quad (37)$$

$$q_{Pet,desp} = \left(\frac{q_{Pmáx,desp} m_S}{K_{Sp,desp} + m_S} \right) (1 - K_{pp,desp} m_{Et}) \quad (38)$$

$$q_{Pgly,desp} = \mu_{desp} Y_{PXgly,desp} \quad (39)$$

Tabela 8 – Variáveis dos modelos cinéticos para sistema com leveduras imobilizadas (considerando as desprendidas para o meio líquido)

Grandeza	Descrição	Unidade
$\mu_{\text{máx, desp}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular das leveduras desprendidas	h^{-1}
$K_{\text{SX, desp}}$	Constante de saturação de Monod das leveduras desprendidas	$\text{g}_{\text{substrato}}$
$K_{\text{PX, desp}}$	Constante de inibição devido ao crescimento de leveduras desprendidas	g_{etanol}
$Y_{\text{XS, desp}}$	Fator de conversão de substrato em células desprendidas	$\frac{\text{g}_{\text{biomassa desprendida}}}{\text{g}_{\text{substrato}}}$
$Y_{\text{PXet, desp}}$	Rendimento de etanol a partir de biomassa desprendida	$\frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{\text{g}_{\text{biomassa desprendida}}}$
$q_{\text{Pmáx, desp}}$	Velocidade específica máxima de formação de etanol pelas leveduras desprendidas	$\frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{(\text{g}_{\text{biomassa desprendida}} \cdot \text{h})}$
$K_{\text{SP, desp}}$	Constante de saturação de Hinshelwood das leveduras desprendidas	$\text{g}_{\text{substrato}}$
$K_{\text{PP, desp}}$	Constante de inibição devido à formação de produto das leveduras desprendidas	g_{etanol}
$Y_{\text{PXgly, desp}}$	Rendimento de glicerol a partir de biomassa desprendida	$\frac{\text{g}_{\text{glicerol}}}{\text{g}_{\text{biomassa desprendida}}}$

Fonte: O autor. Variáveis envolvidas nos modelos cinéticos usados para o sistema com leveduras imobilizadas, considerando as desprendidas para o meio (Equações 34 a 39).

O modelo cinético de desprendimento de células do suporte de imobilização foi aproximado por uma cinética do tipo Michaelis-Menten/Monod, dada pela Equação 40.

$$k = \frac{k_{\text{máx}} m_{\text{Xim}}}{k_m + m_{\text{Xim}}} \quad (40)$$

Em que: k = velocidade específica de desprendimento celular (h^{-1}); $k_{\text{máx}}$ = velocidade específica máxima de desprendimento de células do suporte (h^{-1}); m_{Xim} = massa de células imobilizadas (g); e k_m = massa de leveduras imobilizadas (g), na qual a velocidade de desprendimento é metade da máxima ($k = k_{\text{máx}}/2$).

Esse modelo foi baseado no modelo proposto por Brányik et al. (2004), em que a velocidade específica de desprendimento celular (k) foi descrita como função da concentração de substrato, que influencia na velocidade de crescimento de células

que se desprendem, e de uma constante de desprendimento em determinadas condições padrão.

Os modelos foram implementados em linguagem de programação Python, no ambiente de desenvolvimento Spyder versão 3.8 (ver Apêndice C). Utilizou-se a técnica de Nelder-Mead para estimação dos parâmetros cinéticos usados nas equações do modelo (ver seção 3.5.1).

As condições iniciais utilizadas na modelagem da cinética de fermentação conduzida por cada cepa foram baseadas nas quantificações de biomassa, substrato e produtos obtidas no tempo inicial (t_0) de cada ensaio.

4.4.2 Concentração de substrato no interior da partícula

4.4.2.1 Modelo de reação-difusão

Foram adotadas as seguintes hipóteses simplificadoras para o modelo, como descrito por Doran (2013):

- O suporte é considerado uma esfera;
- A partícula é homogênea, isotérmica e isotrópica;
- A transferência de massa ocorre apenas por difusão (lei de Fick);
- A variação de substrato ocorre apenas na variável espacial r (raio da partícula);
- A velocidade de consumo de substrato é dada pela cinética de Monod;
- O volume de controle opera em estado estacionário.

O balanço de massa de substrato em uma partícula esférica pode ser deduzido a partir do método de concha, conforme o raciocínio descrito pelas Equações 41 a 48 (ENGASSER; HORVATH, 1973; SHULER; KARGI, 2002; DORAN, 2013; GOLMAN, 2016) e representado na Figura 21. Este modelo descreve a variação da concentração de substrato em relação ao raio de uma partícula, considerando uma concha esférica de espessura Δr .

Figura 21 – Volume de controle para modelagem do gradiente de concentração de substrato

Fonte: O autor. Volume de controle para fermentação com leveduras imobilizadas. Onde: VC = volume de controle para modelagem; V = volume do meio de fermentação (L); X_{im} = concentração de leveduras fixas ao suporte de imobilização (g); X_{desp} = concentração de leveduras desprendidas do suporte para o meio de fermentação (g); S = concentração de substrato (g); P = concentração de produtos (g); r = extensão radial da partícula (mm); R = raio total da partícula (mm); e Δr = espessura da concha (mm).

$$Acúmulo = entra - sai + gerado - consumido \quad (12)$$

$$0 = \left(D_{eff} \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right) |_{r+\Delta r} - \left(D_{eff} \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right) |_r + 0 - r_S 4\pi r^2 \Delta r \quad (41)$$

Organizando, obtém-se a equação de balanço de massa de substrato em estado estacionário:

$$\left(D_{eff} \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right) |_{r+\Delta r} - \left(D_{eff} \frac{dS}{dr} 4\pi r^2 \right) |_r - r_S 4\pi r^2 \Delta r = 0 \quad (42)$$

Dividindo cada termo por $4\pi\Delta r$, tem-se:

$$\frac{\left(D_{eff} \frac{dS}{dr} r^2 \right) |_{r+\Delta r} - \left(D_{eff} \frac{dS}{dr} r^2 \right) |_r}{\Delta r} - r_S r^2 = 0 \quad (43)$$

Reescrevendo:

$$\frac{\Delta \left(D_{eff} \frac{dS}{dr} r^2 \right)}{\Delta r} - r_S r^2 = 0 \quad (44)$$

Para que o modelo seja válido em qualquer ponto da esfera, deve-se aplicar o limite de Δr tendendo a zero:

$$\lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{\Delta(D_{eff} \frac{dS}{dr} r^2)}{\Delta r} - r_S r^2 = 0 \quad (45)$$

Pela definição matemática de derivada, tem-se:

$$\frac{d}{dr} \left(D_{eff} \frac{dS}{dr} r^2 \right) - r_S r^2 = 0 \quad (46)$$

Considerando a difusividade efetiva de substrato na partícula (a velocidade na qual o substrato é difundido pelo suporte até as células) constante e independente do raio:

$$D_{eff} \frac{d}{dr} \left(\frac{dS}{dr} r^2 \right) - r_S r^2 = 0 \quad (47)$$

E aplicando a regra do produto:

$$D_{eff} \left(\frac{d^2 S}{dr^2} r^2 + 2r \frac{dS}{dr} \right) - r_S r^2 = 0 \quad (48)$$

A Equação 48 relaciona a velocidade de reação com a difusão de substrato na partícula, os principais fenômenos que regem um sistema com células imobilizadas. Trata-se de uma equação diferencial ordinária (EDO) de segunda ordem e, portanto, são necessárias duas condições de contorno para que o modelo seja definido.

Assim, as condições de contorno para este sistema são expressas pelas Equações 49 e 50.

$$\frac{dS}{dr} = 0 \quad \text{no centro da partícula } (r = 0) \quad (49)$$

$$S = S_{SUP} \quad \text{na superfície da partícula } (r = R) \quad (50)$$

A Tabela 9 apresenta uma lista dos termos envolvidos no modelo de reação-difusão.

Tabela 9 – Variáveis utilizadas no modelo de reação-difusão

Grandeza	Descrição	Unidade
D_{eff}	Coeficiente de difusividade efetiva de substrato no suporte de imobilização	m^2/h
dS/dr	Varição da concentração de substrato em relação ao raio da partícula	$g/(L.m)$
r	Variável espacial (raio)	m
R	Raio da partícula	m
r_s	Velocidade volumétrica de consumo de substrato	$g/(L.h)$
Δr	Espessura da concha	m
S	Concentração de substrato	g/L
S_{SUP}	Concentração de substrato na superfície da partícula	g/L

Fonte: O autor. Variáveis envolvidas no modelo de reação-difusão (Equações 40 a 49).

Substituindo a velocidade volumétrica de consumo de substrato (r_s) pela equação cinética de Monod e pelo fator de conversão substrato a células, tem-se que:

$$D_{eff} \left(\frac{d^2 S}{dr^2} r^2 + 2r \frac{dS}{dr} \right) - \left(\frac{1}{Y_{XS}} \frac{\mu_{max} S}{K_{SX} + S} X \right) r^2 = 0 \quad (51)$$

E dividindo todos os termos por r^2 e por D_{eff} :

$$\left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) - \left(\frac{1}{D_{eff} Y_{XS}} \frac{\mu_{max} S}{K_{SX} + S} X \right) = 0 \quad (52)$$

Visando facilitar o desenvolvimento matemático, o modelo é reescrito em forma adimensional por meio da adição de variáveis adimensionais. Multiplica-se, então, a Equação 52 por R^2/S_{SUP} :

$$\frac{R^2}{S_{SUP}} \frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{R^2}{S_{SUP}} \frac{dS}{dr} - \frac{R^2}{S_{SUP} D_{eff} Y_{XS}} \frac{\mu_{max} S}{K_{SX} + S} X = 0 \quad (53)$$

E modificando o termo de reação:

$$\frac{R^2}{S_{SUP}} \frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{R^2}{S_{SUP}} \frac{dS}{dr} - \frac{R^2/K_{SX}}{(S_{SUP} D_{eff} Y_{XS})/K_{SX}} \frac{\mu_{max} S}{K_{SX} + S} X = 0 \quad (54)$$

$$\frac{R^2}{S_{SUP}} \frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{R^2}{S_{SUP}} \frac{dS}{dr} - \frac{R^2 \frac{\mu_{max} X}{K_{SX}} \frac{S}{S_{SUP}}}{1 + \frac{S_{SUP}}{K_{SX}} \frac{S}{S_{SUP}}} = 0 \quad (55)$$

Assim, são introduzidas a concentração adimensional de substrato ($\bar{S}$) (Equação 56) e raio adimensional da partícula (ρ) (Equação 57).

$$\bar{S} = \frac{S}{S_{SUP}} \quad (56)$$

$$\rho = \frac{r}{R} \quad (57)$$

Também são introduzidos os parâmetros adimensionais: módulo de Thiele (φ) (Equação 58), que leva em consideração o tamanho da partícula, a constante cinética da reação e o coeficiente de difusão efetiva de substrato (THIELE, 1939); e parâmetro de saturação (β) (Equação 59).

$$\varphi = R \sqrt{\frac{\mu_{max} X}{Y_{XS} D_{eff} K_{SX}}} \quad (58)$$

$$\beta = \frac{S_{SUP}}{K_{SX}} \quad (59)$$

Dessa forma, é possível escrever o balanço de massa adimensional para um processo fermentativo em uma partícula esférica, como mostra a Equação 60.

$$\frac{d^2 \bar{S}}{d\rho^2} + \frac{2}{\rho} \frac{d\bar{S}}{d\rho} - \varphi^2 \frac{\bar{S}}{1 + \beta \bar{S}} = 0 \quad (60)$$

Cujas condições de contorno são expressas pelas Equações 61 e 62.

$$\frac{d\bar{S}}{d\rho} = 0 \quad \text{no centro da partícula } (\rho = 0) \quad (61)$$

$$\bar{S} = 1 \quad \text{na superfície da partícula } (\rho = 1) \quad (62)$$

Por meio da estimação do módulo de Thiele é possível calcular outro parâmetro de engenharia, o fator de efetividade (η). Este é definido como a razão entre a velocidade de reação observada (r_{obs}) e a velocidade que deveria ser observada na ausência de quaisquer limitações por transferência de massa, também chamada de velocidade intrínseca (r_{int}). As Equações 63 e 64 apresentam a fórmula de η , nas formas tradicional e adimensional, respectivamente.

$$\eta = \frac{r_{obs}}{r_{int}} = \frac{4\pi R^2 D_{eff} \left. \frac{dS}{dr} \right|_{r=R}}{\frac{4}{3}\pi R^3 \frac{\mu_{max} X_{SUP}}{Y_{XS} K_{SX} + S_{SUP}}} \quad (63)$$

$$\eta = 3(1 + \beta) \int_0^1 \frac{\bar{S}}{1 + \beta \bar{S}} \rho^2 d\rho \quad (64)$$

A difusividade efetiva (D_{eff}) de substrato nas partículas foi calculada de acordo com a relação empírica dada pela Equação 65 (AXELSSON; PERSSON, 1988).

$$D_{eff} = \frac{(D_{SAC}(1-y_c))}{(1+(y_c/2))} \quad (65)$$

Onde: D_{SAC} = difusividade padrão de sacarose em alginato de cálcio 2 % (m/v) a 25 °C, cujo valor é $1,73 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{h}$ (DORAN, 2013). Este valor foi utilizado como aproximação do valor verdadeiro da difusividade padrão de maltose, uma vez que sacarose e maltose possuem a mesma massa molar (342,3 g/mol). A fração de biomassa no sólido (y_c) é dada pela Equação 66.

$$y_c = \frac{\text{massa de células}}{(\text{massa de células} + \text{massa do suporte})} \quad (66)$$

Os parâmetros fisiológicos utilizados no modelo de reação-difusão ($\mu_{\text{máx}}$, K_{sx} e Y_{xs}), foram obtidos pela estimação de parâmetros na modelagem da cinética de fermentação (ver item 4.4.1).

4.4.2.2 Solução numérica pelo método de diferenças finitas

A solução do modelo se deu com base em Golman (2016), utilizando-se o método numérico de diferenças finitas. As simulações foram realizadas na linguagem de programação Python, utilizando-se o Jupyter Notebook (ver Apêndices D e E).

Inicialmente, uma malha igualmente espaçada foi introduzida, como apresentado na Equação 67.

$$\rho_0 = 0 < \rho_1 < \dots < \rho_N < \rho_{N+1} = 1 \quad (67)$$

Considerando pontos internos localizados da forma descrita pela Equação 68, tem-se:

$$\rho_k = k \cdot (\Delta\rho), \quad k = 1, \dots, N, \quad \Delta\rho = \frac{1}{N+1} \quad (68)$$

As aproximações de diferenças centrais são usadas para as derivadas de primeira e segunda ordem em ρ_k (Equações 69 e 70, respectivamente), assim:

$$\frac{d\bar{S}}{d\rho} \Big|_{\rho_k} = \frac{\bar{S}(\rho_{k+1}) - \bar{S}(\rho_{k-1})}{2\Delta\rho} \quad (69)$$

$$\frac{d^2\bar{S}}{d\rho^2} \Big|_{\rho_k} = \frac{\bar{S}(\rho_{k+1}) - 2\bar{S}(\rho_k) + \bar{S}(\rho_{k-1}))}{(\Delta\rho)^2} \quad (70)$$

Substituindo as Equações 69 e 70 na Equação 60, tem-se:

$$\frac{\bar{S}(\rho_{k+1}) - 2\bar{S}(\rho_k) + \bar{S}(\rho_{k-1}))}{(\Delta\rho)^2} + \frac{2}{\rho_k} \frac{\bar{S}(\rho_{k+1}) - \bar{S}(\rho_{k-1}))}{2\Delta\rho} - \varphi^2 \frac{\bar{S}\rho_k}{1 + \beta\bar{S}\rho_k} = 0 \quad (71)$$

Rearranjando:

$$\left(\frac{1}{(\Delta\rho)^2} - \frac{1}{\rho_k\Delta\rho}\right)\bar{S}(\rho_{k-1}) + \left(-\frac{2}{(\Delta\rho)^2}\right)\bar{S}(\rho_k) + \left(\frac{1}{(\Delta\rho)^2} + \frac{1}{\rho_k\Delta\rho}\right)\bar{S}(\rho_{k+1}) - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_k)}{1+\beta\bar{S}(\rho_k)} = 0 \quad (72)$$

E simplificando:

$$A_k\bar{S}(\rho_{k-1}) + B\bar{S}(\rho_k) + C_k\bar{S}(\rho_{k+1}) - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_k)}{1+\beta\bar{S}(\rho_k)} = 0 \quad (73)$$

Onde:

$$A_k = \frac{1}{(\Delta\rho)^2} - \frac{1}{\rho_k\Delta\rho} \quad (74)$$

$$B = -\frac{2}{(\Delta\rho)^2} \quad (75)$$

$$C_k = \frac{1}{(\Delta\rho)^2} + \frac{1}{\rho_k\Delta\rho} \quad (76)$$

A equação discretizada para a condição de contorno $\rho_0 = 0$, é dada pela Equação 77.

$$\frac{-3\bar{S}(\rho_0) + 4\bar{S}(\rho_1) - \bar{S}(\rho_2)}{2\Delta\rho} = 0 \quad (77)$$

Então, a concentração de S em ρ_0 é dada por:

$$\bar{S}(\rho_0) = -\frac{1}{3}\bar{S}(\rho_2) + \frac{4}{3}\bar{S}(\rho_1) \quad (78)$$

Introduzindo no modelo discretizado (para $k=1$), tem-se:

$$A_1 \left[-\frac{1}{3}\bar{S}(\rho_2) + \frac{4}{3}\bar{S}(\rho_1) \right] + B\bar{S}(\rho_1) + C_1\bar{S}(\rho_2) - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_1)}{1+\beta\bar{S}(\rho_1)} = 0 \quad (79)$$

E, por fim, rearranjando obtém-se a Equação 80:

$$\left[\frac{2}{3}B + A_1 - \frac{1}{3}C_1 \right] \bar{S}(\rho_1) + \left[C_1 - \frac{1}{3}A_1 \right] \bar{S}(\rho_2) - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_1)}{1+\beta\bar{S}(\rho_1)} = 0 \quad (80)$$

A condição de contorno em ρ_{N+1} é expressa na Equação 81:

$$\bar{S}(\rho_{N+1}) = 1 \quad (81)$$

Introduzindo no modelo discretizado (para $k=N$):

$$A_N \bar{S}(\rho_{N-1}) + B \bar{S}(\rho_N) + C_N - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_N)}{1 + \beta \bar{S}(\rho_N)} = 0 \quad (82)$$

Dessa forma, obtém-se o seguinte sistema de equações algébricas não-lineares (Equações 80, 73 e 82):

$$f(1) = \left[\frac{2}{3}B + A_1 - \frac{1}{3}C_1 \right] \bar{S}(\rho_1) + \left[C_1 - \frac{1}{3}A_1 \right] \bar{S}(\rho_2) - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_1)}{1 + \beta \bar{S}(\rho_1)} = 0 \quad (80)$$

$$f(k) = A_k \bar{S}(\rho_{k-1}) + B \bar{S}(\rho_k) + C_k \bar{S}(\rho_{k+1}) - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_k)}{1 + \beta \bar{S}(\rho_k)} = 0$$

$$k = 2, \dots, N - 1 \quad (73)$$

$$f(N) = A_N \bar{S}(\rho_{N-1}) + B \bar{S}(\rho_N) + C_N - \varphi^2 \frac{\bar{S}(\rho_N)}{1 + \beta \bar{S}(\rho_N)} = 0 \quad (82)$$

4.5 VARIAÇÃO DE X_0 E S_0

Para avaliação da influência das concentrações iniciais de biomassa (X_0) e substrato (S_0) na produção de compostos de *flavour*, utilizou-se um planejamento experimental do tipo composto central, como apresentado na Tabela 10 (níveis codificados) e na Tabela 11 (níveis calculados).

Tabela 10 – Estrutura do planejamento composto central

Experimento	Variável 1	Variável 2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	1,41	0
6	-1,41	0
7	0	1,41
8	0	-1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Fonte: O autor. Codificação do planejamento composto central.

Tabela 11 – Valores calculados para os níveis em cada experimento

	Experimento	Concentração inicial de biomassa (cél/mL. °P)	Concentração inicial de substrato (°P)
8 experimentos distintos	1	$4,50 \cdot 10^5$	8,00
	2	$1,05 \cdot 10^6$	8,00
	3	$4,50 \cdot 10^5$	16,00
	4	$1,05 \cdot 10^6$	16,00
	5	$1,17 \cdot 10^6$	12,00
	6	$3,26 \cdot 10^5$	12,00
	7	$7,50 \cdot 10^5$	17,66
	8	$7,50 \cdot 10^5$	6,34
3 repetições do ponto central	9	$7,50 \cdot 10^5$	12,00
	10	$7,50 \cdot 10^5$	12,00
	11	$7,50 \cdot 10^5$	12,00

Fonte: O autor.

A linhagem estudada nesses experimentos foi a SY025, totalizando 11 fermentações simultâneas à temperatura de 18 °C, cada uma com diferentes concentrações iniciais de biomassa imobilizada e substrato disponível para fermentação, como mostra a Figura 22.

Figura 22 – Frascos de fermentação

Fonte: O autor. Frascos de fermentação utilizados no planejamento composto central.

Os valores das variáveis no planejamento estatístico foram obtidos a partir do ponto central: concentração inicial de biomassa de 9.10^6 células/mL e concentração inicial de substrato igual a 12 °P (ver item 4.3.1).

Todas as fermentações foram conduzidas em regime batelada (descontínuo) e sem agitação (estática) em 200 mL de xarope de malte (extrato de malte pilsen Grano Mestre, Iomerê, lote 0320), em frascos Erlenmeyer de 500 mL vedados com tampões de algodão, por 8 dias. Amostras foram retiradas ao final da fermentação para quantificação de compostos de *flavour*, conduzida como descrito no tópico 4.3.3.

Tanto as fermentações como as análises foram conduzidas nas dependências da Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda, em Fazenda Rio Grande/PR.

Utilizando-se o *software* Statistica, foram geradas superfícies de resposta e análises das influências das variáveis (X_0 e S_0) na produção dos compostos de *flavour* quantificados (1-propanol, 2-metil propanol (isobutanol), 3-metil butanol (álcool isoamílico), acetato de etila e acetaldeído).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DEFINIÇÃO DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO

5.1.1 Teste 1 – Imobilização direta e determinação da massa seca

A Figura 23 apresenta a variação de umidade nas partículas ImoYeast, imobilizadas pelo método direto (item 4.2.1), ao longo de uma fermentação padrão com xarope de maltose. A média da umidade durante as 146 h esteve em $73,0 \% \pm 1,6$. A massa seca (suporte e biomassa), portanto, esteve em $27,0 \% \pm 1,6$. Como descrito no item 4.2.2, esta porcentagem foi utilizada para correções na quantificação de biomassa imobilizada ao longo deste trabalho.

Figura 23 – Variação de umidade e massa seca do suporte ImoYeast

Fonte: O autor. Variação de umidade e massa seca no suporte ImoYeast durante 146 h de fermentação com a linhagem SY0025. As barras de variação expressam o erro padrão.

A atividade de água (água disponível) exerce um papel importante em sistemas com leveduras imobilizadas, uma vez que está relacionada com a disponibilidade de água no ambiente ao qual as células estão expostas. A umidade (água total) em sistemas com células imobilizadas tende a ser menor, quando comparados com as células livres. Então, há menor atividade de água e consequentemente maior formação de compostos osmoprotetores, como o glicerol e a trealose (ver seção 5.2.1). Assim, as leveduras imobilizadas costumam ser mais resistentes a estresses

osmóticos do que as leveduras livres (NORTON; D'AMORE, 1994; KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006; NEDOVIĆ et al., 2015).

Considerando o sistema com leveduras livres como sendo saturado de água (100 % de umidade), os resultados obtidos indicam uma umidade de aproximadamente 70 % no suporte ImoYeast. Este valor mostra que as leveduras imobilizadas estão expostas a um ambiente diferente daquele encontrado pelas células livres. Assim, as mudanças fisiológicas observadas nas leveduras imobilizadas podem ser resultado, também, desse microambiente (NORTON; D'AMORE, 1994).

Os experimentos do Teste 1 apresentaram, durante a fermentação, uma eficiência de imobilização (EI) igual a $2,06 \% \pm 0,28$. Uma vez que o processo estudado requer uma EI mínima de 70 % (critério estabelecido pela Bio4 para comercialização do suporte ImoYeast), o método de imobilização teve que ser reavaliado.

Como explanado no item 5.1.2, o método de imobilização escolhido para a continuação dos experimentos implicou no fortalecimento da matriz sólida interna do suporte ImoYeast com alginato de cálcio. Assim, mesmo que a umidade não tenha sido determinada, assumiu-se que a massa seca do sistema (suporte mais biomassa) continuaria em pelo menos 27 %.

5.1.2 Teste 2 – Imobilização combinada e eficiência de imobilização

Na Figura 24 são apresentadas as médias do parâmetro eficiência de imobilização (EI) durante fermentações padrão realizadas com as leveduras imobilizadas pelos métodos A, B, C e D (item 4.2.2).

Figura 24 – Eficiências de imobilização obtidas por diferentes métodos

Fonte: O autor. Eficiências de imobilização obtidas por diferentes métodos de imobilização, em que: A – revestimento; B – infiltrado; C – infiltrado + revestimento (30 min); e D – infiltrado + revestimento (*overnight*). As barras de variação exprimem o erro padrão de triplicatas.

Os valores de EI obtidos com os métodos C (infiltrado + revestimento 30 min) e D (infiltrado + revestimento *overnight*) foram maiores que nos métodos A (revestimento) e B (infiltrado). No início da fermentação, a EI dos métodos B, C e D era de 95 %, enquanto a do método A era de 85 %. Ao final da fermentação, os valores de EI foram reduzidos para 50 % (A), 65 % (B) e 85 % (C e D). Esta redução era esperada devido ao crescimento celular nas regiões mais externas da partícula, o que facilita o desprendimento de biomassa do suporte (TANAKA; IRIE; OCHI, 1989).

Por meio da análise estatística (tabela ANOVA e teste de Tukey), concluiu-se que não há diferença estatisticamente significativa entre manter as reações de gelificação por 30 min (método C) ou 12 h (*overnight*, método D) (ver Apêndice A).

Embora seja o menos complexo, o método de imobilização realizado no Teste 1 tende a reter menos leveduras ao suporte de imobilização (VERBELEN et al., 2006). Ao se utilizar o aprisionamento de leveduras, como nos métodos do Teste 2, a densidade celular (y_c) no interior da partícula ImoYeast foi aumentada, porém se estima que as limitações de transferência de massa sejam mais significativas (PILKINGTON et al., 1998).

Optou-se, portanto, em escolher o método de imobilização C considerando a necessidade de um método com eficiência de imobilização acima de 70 % e do mínimo

de tempo possível para o processo de imobilização. Na prática, o método consistiu em aprisionar leveduras em uma matriz formada por gelificação no interior de um sólido poroso, semelhante ao método de dupla camada, citado por Nedović et al. (2015). O protocolo de imobilização desenvolvido é apresentado a seguir.

- 1) Secar matriz à base de celulose em estufa a 80 °C por pelo menos 24 h;
- 2) Propagar as leveduras para atingir a concentração de fermento (CF) adequada;
- 3) Centrifugar a suspensão de fermento e então descartar o sobrenadante;
- 4) Adicionar 20 mL de solução de alginato de sódio 3 % ao pellet que sobrou (biomassa) e então homogeneizar;
- 5) Para colonização das leveduras no interior do suporte, utilizar a proporção 15 g de matriz seca para 20 mL de leveduras em suspensão;
- 6) Agitar constantemente até que todo o líquido seja absorvido pelo suporte;
- 7) Transferir as esferas com leveduras adsorvidas para um recipiente contendo ao menos 250 mL de cloreto de cálcio 2 %;
- 8) Aguardar 30 minutos;
- 9) Separar as esferas da fração líquida por peneiramento;
- 10) Adicionar pelo menos 50 mL de solução de alginato de sódio 3 % em um recipiente;
- 11) Pouco a pouco, imergir as esferas de matriz na solução de alginato de sódio 3 % (por no máximo 10 segundos) e transferi-las para um recipiente contendo ao menos 250 mL de solução de cloreto de cálcio 2 %;
- 12) Aguardar 30 minutos;
- 13) Separar as esferas da fração líquida por peneiramento;
- 14) Inocular as leveduras imobilizadas para fermentação.

5.2 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

A discussão a seguir se concentra em avaliar as diferenças observadas entre os parâmetros fisiológicos das leveduras em suspensão e imobilizadas, por meio do estudo das cinéticas de fermentação nas condições apresentadas no item 4.3. Deve-se observar, todavia, que embora os resultados das três linhagens sejam apresentados juntos, o objetivo é fazer a comparação entre condições de processo de uma mesma levedura (livres ou imobilizadas) e não entre linhagens. Isto porque cada

cepa apresenta suas próprias particularidades na produção de diferentes estilos de cerveja. As diferenças nos valores de biomassa inicial estão diretamente relacionadas com as características de cada linhagem, para a condução da fermentação de forma a se obter o estilo de cerveja esperado. Assim, são reduzidos os riscos de um produto desbalanceado em termos de aroma e sabor, por causa de quantidade incorreta de leveduras (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

5.2.1 Cinética de produção de biomassa e de produtos e cinética de consumo de substratos

Um dos fatores mais importantes a serem estudados em qualquer processo fermentativo é a concentração de células no sistema, porque em muitos casos os produtos de interesse (podendo incluir a própria biomassa) são formados durante o crescimento microbiano (SCHMIDELL et al., 2001; DORAN, 2013). Este é o caso da fermentação alcoólica na produção de cerveja, em que inclusive os subprodutos de fermentação (álcoois superiores, ésteres e compostos carbonílicos) estão relacionados à concentração de leveduras (GEE; RAMIREZ, 1994; VASSILEV et al., 2014).

Na Figura 25, são mostradas as curvas de crescimento de biomassa nas fermentações com leveduras SY025, SY067 e SY001 livres e imobilizadas. A Figura 26 apresenta os valores de eficiência de imobilização (EI) obtidos durante as fermentações.

Figura 25 – Crescimento de biomassa

Fonte: O autor. Cinéticas de crescimento celular durante as fermentações em extrato de malte a 12 °P com as linhagens SY025, SY067 e SY001. As barras de variação exprimem o erro padrão.

Figura 26 – Eficiências de imobilização (EI) obtidas durante as fermentações

Fonte: O autor. Variação da eficiência de imobilização (EI) durante as fermentações em extrato de malte 12 °P com as linhagens SY025, SY067 e SY001. As barras de variação exprimem o erro padrão.

Comparando os sistemas em termos de concentração de biomassa total, o crescimento de leveduras no sistema de imobilização foi maior que no sistema com células livres, o que indica que o suporte ImoYeast estimula o crescimento microbiano durante a fermentação de cerveja. Esta observação é válida para todas as linhagens estudadas, considerando o parâmetro Y_{xs} (item 4.3.2). No caso da linhagem SY025 imobilizada, o rendimento de biomassa total (fixas no suporte mais desprendidas para o meio) foi 67 % maior que o rendimento de células em suspensão. De forma semelhante, os valores de Y_{xs} dos sistemas imobilizados (considerando a biomassa total no sistema) foram maiores em comparação com as leveduras livres, para as linhagens SY067 e SY001, sendo 78 % e 56 %, respectivamente (ver Tabela 12). Os resultados estão de acordo com os experimentos descritos por Bezbradica et al. (2007), em que se utilizou o suporte LentiKat®, cuja composição é álcool polivinílico (PVA). Os autores descrevem que o suporte também estimula o crescimento celular.

Entretanto, diferentes perfis de crescimento de leveduras imobilizadas foram reportados pela literatura, apresentando concentrações de biomassa maiores, menores ou equivalentes a sistemas com células livres (BOULTON; QUAIN, 2001). A principal hipótese que explica essas diferenças é a formação de diferentes microambientes de imobilização, dependendo dos suportes de imobilização e condições de processo utilizados (NORTON; D'AMORE, 1994). Em geral, quanto mais presentes os efeitos de limitação de transferência de massa, menores são as velocidades de crescimento de células (BRÁNYIK et al., 2005).

Doran e Bailey (1986), apresentam resultados de imobilização de leveduras em fermentação alcoólica em que, embora a velocidade de consumo de substrato tenha se mostrado maior que na fermentação com leveduras livres, as velocidades de

crescimento celular e formação de produtos (etanol e glicerol) foram menores. Assim, considerou-se que a imobilização afetou o crescimento microbiano devido às interações entre o suporte sólido e as células e entre as próprias células. Os autores indicam que, ainda que o microambiente encontrado pelas leveduras imobilizadas (gradientes de concentração, pressão osmótica) exerça influência sobre o metabolismo, o fator determinante para a redução no crescimento celular é o contato físico com o sólido e/ou gel, o que causa mudanças morfológicas e de expressão de proteínas de parede celular, afetando todo o metabolismo.

A adesão das leveduras em um sólido é mediada principalmente por floculinas, expressas de acordo com as condições físico-químicas do ambiente ao qual as células estão expostas (HONIGBERG, 2011). Estas proteínas são responsáveis por formar as estruturas de comunidades tridimensionais de leveduras, mediando suas interações entre si e com o suporte sólido. No caso de suportes porosos, a área superficial é adequada para o crescimento microbiano, uma vez que há espaço para as interações entre o sólido e as células (KREGIEL; BERLOWSKA; AMBROZIAK, 2012). Esta pode ser uma das razões pelas quais o crescimento microbiano foi estimulado no suporte ImoYeast, já que este é um sólido poroso.

Um aspecto importante levantado por Brányik et al. (2004) é a formação de uma camada de células mais ativas na superfície do suporte de imobilização, o que favorece o desprendimento para o meio líquido. Possivelmente este também é o caso no suporte ImoYeast, no qual sugere-se que as leveduras sejam estimuladas ao crescimento, por ocasião da imobilização, e as mais próximas à superfície do sólido acabem se desprendendo. Com o metabolismo ativado, continuam crescendo no meio líquido, fazendo com que os sistemas com leveduras imobilizadas apresentem maiores concentrações totais de biomassa.

Essas considerações, somadas aos dados experimentais levantados, corroboram a interpretação de que cada suporte de imobilização, em conjunto às condições de fermentação, propicia/afeta de maneira diferente o crescimento de leveduras imobilizadas (NORTON; D'AMORE, 1994).

Já os valores de eficiência de imobilização (EI) estão diretamente relacionados ao método de imobilização selecionado. Neste trabalho, por se tratar de aprisionamento de células em um sólido poroso, seguido de revestimento com agente polimerizante, esperava-se o mínimo de desprendimento celular (KOURKOUTAS et al., 2004; NEDOVIĆ et al., 2015).

Entretanto, os resultados parecem ser linhagem dependentes; ou seja, a cinética de desprendimento de células está relacionada também com o tipo de levedura empregado no processo, dependendo de sua velocidade de crescimento e concentração no sistema (ver item 4.4.1.2). As eficiências de imobilização obtidas nas fermentações realizadas com as linhagens SY025, SY067 e SY001 foram de 70 %, 60 % e 90 %, respectivamente. Comparando estes dados com os valores de Y_{xs} , percebe-se que o desprendimento de biomassa do suporte é diretamente proporcional ao rendimento. Assim, a hipótese proposta por Brányik et al. (2004), de uma camada mais ativa de leveduras na superfície do sólido que se desprende ao meio com mais facilidade é corroborada. Dessa forma, a linhagem SY067 imobilizada apresentou formação de biomassa total (fixas no suporte mais desprendidas para o meio) 1,78x o valor das leveduras livres, a maior proporção observada nos experimentos realizados. E, assim sendo, das três linhagens estudadas, foi a que apresentou menor eficiência de imobilização.

O suporte ImoYeast é um sólido poroso, cujas reentrâncias são passíveis de colonização pelas leveduras em suas superfícies internas. Assim, considera-se este método essencialmente como aprisionamento em um sólido poroso, contando com as interações entre as leveduras e o suporte sólido, assim como com a porosidade da partícula, para a retenção das células. O sistema de fermentação de cerveja Meura Delta (ver item 3.3.2.5), cujo método de imobilização era por adsorção, ilustra como é comum que neste tipo de método haja o desprendimento de células para o meio líquido (PILKINGTON et al., 1998; KOURKOUTAS et al., 2004; NEDOVIĆ et al., 2015).

Já Johansen e Flink (1986) realizaram fermentações alcoólicas com *S. cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato em concentrações de 1-5 %. Foi observado pelos autores que, em concentrações de alginato de 2-4 %, a concentração de células desprendidas para o meio esteve entre $2 \cdot 10^5$ - $4 \cdot 10^5$ células/mL. Utilizando-se concentração de alginato de 1 %, a liberação aumentou 100 %, enquanto que para 5 %, diminuiu 80 %.

Dessa forma, faz sentido esperar o desprendimento celular do suporte ImoYeast, mesmo com a utilização dos métodos de colonização no interior de um sólido poroso e aprisionamento em alginato de cálcio, cuja concentração utilizada neste trabalho foi de 2 %.

Além do crescimento celular, também foram avaliadas as variações de concentração de substrato e produtos ao longo do tempo para as linhagens SY025,

SY067 e SY001, como apresentado na Figura 27. Os parâmetros fisiológicos das leveduras SY025, SY067 e SY001 (calculados como descrito no item 4.3.1), são relacionados na Tabela 12.

Figura 27 – Cinéticas de fermentação com leveduras livres e imobilizadas

Fonte: O autor. Variação de substrato e produtos durante as fermentações em extrato de malte 12 °P com as linhagens SY025, SY067 e SY001.

Tabela 12 – Parâmetros fisiológicos globais

Parâmetros Fisiológicos Globais	SY025		SY067		SY001	
	Livres	Imobilizadas	Livres	Imobilizadas	Livres	Imobilizadas
$Y_{XS, im}$ (g biomassa imobilizada/g substrato)	-	0,016±0,001	-	0,007±0,001	-	0,033±0,003
$Y_{XS, TOTAL}$ (g biomassa/g substrato)	0,015±0,001	0,025±0,001	0,009±0,001	0,016±0,001	0,025±0,000	0,039±0,003
Y_{PSet} (g etanol/g substrato)	0,509±0,000	0,464±0,004	0,516±0,000	0,471±0,004	0,553±0,000	0,489±0,008
Y_{PSgly} (g glicerol/g substrato)	0,015±0,000	0,021±0,000	0,017±0,001	0,026±0,000	0,021±0,000	0,025±0,000
$P_{X, im}$ (g biomassa imobilizada/h)	-	0,021±0,002	-	0,005±0,002	-	0,014±0,001
P_X (g biomassa/h)	0,019±0,000	0,031±0,002	0,011±0,000 _{ns}	0,012±0,002 _{ns}	0,013±0,000	0,017±0,001
P_{Pet} (g etanol/h)	0,486±0,005	0,393±0,002	0,470±0,001	0,366±0,004	0,254±0,003	0,233±0,003
P_{Pgly} (g glicerol/h)	0,015±0,000	0,018±0,000	0,016±0,000	0,021±0,000	0,010±0,000	0,012±0,000

Fonte: O autor. $Y_{XS, im}$ = fator de conversão de substrato em células imobilizadas; $Y_{XS, TOTAL}$ = fator de conversão de substrato em células (biomassa total no sistema); Y_{PSet} = fator de conversão de substrato em etanol; Y_{PSgly} = fator de conversão de substrato em glicerol; $P_{X, im}$ = produtividade mássica de biomassa imobilizada; P_X = produtividade mássica de biomassa total no sistema; P_{Pet} = produtividade mássica de etanol; e P_{Pgly} = produtividade mássica de glicerol.

Dados de triplicatas ± erro padrão amostral. ns - não há diferença estatisticamente significativa entre livres e imobilizadas.

Para a linhagem SY025, observa-se a exaustão total dos substratos (maltose, glicose e maltotriose) em 120 h de fermentação, nos sistemas com leveduras livres e imobilizadas. No caso da linhagem SY067 imobilizada, os substratos foram completamente consumidos em 70 h, enquanto que para SY067 livre, somente em 120 h. Por sua vez, as leveduras SY001, tanto livres como imobilizadas, não consumiram completamente os substratos em 120 h de fermentação.

A respeito da formação de produtos, nos três casos estudados a imobilização resultou na diminuição da geração de etanol e no aumento da formação de glicerol. Isto pode ser observado comparando-se os valores dos fatores de conversão de substrato a etanol (Y_{PSet}) e glicerol (Y_{PSgly}). Para a linhagem SY025, as leveduras em suspensão apresentaram rendimento de etanol 9 % maior que o valor obtido pelas imobilizadas. Para as linhagens SY067 e SY001 livres, os valores de rendimento de etanol foram superiores aos sistemas imobilizados, na ordem de 9 % e 13 %, respectivamente.

Com relação à formação de glicerol, as leveduras SY025 imobilizadas apresentaram fator de conversão 40 % maior que o valor na fermentação com células livres. Semelhantemente, as linhagens SY067 e SY001 imobilizadas apresentaram valores 53 % e 19 % maiores que os rendimentos de glicerol obtidos pelas leveduras em suspensão, respectivamente.

Como apresentado anteriormente, nos casos estudados foi observado maior rendimento de biomassa no sistema de leveduras imobilizadas. Portanto, é coerente assumir que houve maior formação de glicerol nos sistemas com leveduras imobilizadas, devido ao crescimento microbiano.

Os experimentos de Doran e Bailey (1986) com fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* (em um meio definido contendo como fonte principal de carbono glicose a 20 g/L), imobilizada em esferas de vidro revestidas com gelatina e posicionadas no interior de um reator leito fixo com recirculação, resultaram em maiores velocidades específicas de consumo de substrato (2x) e de formação de etanol (45 %) e glicerol no sistema com células imobilizadas do que no com células livres. Todavia, foram obtidos menores fatores de conversão de etanol (livres = $1,8 \pm 5$ % e imobilizadas = $1,4 \pm 17$ %) e glicerol (livres = $0,11 \pm 3$ % e imobilizadas = $0,06 \pm 2$ %) a partir de substrato. Os autores sugeriram que isso ocorreu devido ao desvio do metabolismo fermentativo para o armazenamento de polissacarídeos de reserva (como glicogênio e trealose), além de DNA e RNA. No caso das fermentações com o suporte ImoYeast, embora a produtividade de etanol também tenha sido menor por leveduras imobilizadas, houve maior produtividade de glicerol. Acredita-se que esta diferença seja principalmente devido ao crescimento celular.

A Figura 28 apresenta a evolução da densidade do mosto observada nas fermentações realizadas com leveduras em suspensão e imobilizadas.

Figura 28 – Densidade do mosto nas fermentações

Fonte: O autor. Variação de densidade do meio durante as fermentações em extrato de malte 12 °P com as linhagens SY025, SY067 e SY001.

Em todos os casos, houve a redução na densidade do mosto, o que indica o consumo de açúcares e a formação de etanol.

Em uma fermentação de cerveja padrão com densidade inicial de 1,06 g/mL, espera-se que a densidade final alcance um valor de 1,01 g/mL (BOULTON; QUAIN, 2001). Todas as fermentações realizadas neste trabalho apresentaram redução na densidade do mosto, seguindo esta tendência.

Nas fermentações com as linhagens SY025 e SY067, houve semelhança nos perfis de densidade dos sistemas com leveduras livres e imobilizadas. A linhagem SY001 apresentou constante diferença entre as densidades das fermentações com leveduras livres e imobilizadas (o último ponto desta sendo provavelmente um erro experimental).

5.2.2 Perfis sensoriais

A qualidade sensorial de uma cerveja está diretamente relacionada com as concentrações de compostos de *flavour*, que devem estar balanceadas de forma adequada. O metabolismo das leveduras exerce um papel significativo neste sentido, pois os álcoois superiores, ésteres e compostos carbonílicos afetam diretamente os perfis sensoriais das cervejas. Assim, a fisiologia e o metabolismo de leveduras imobilizadas são de grande importância para a qualidade final do produto (NORTON; D'AMORE, 1994).

As fermentações tradicionais de cerveja utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* SY025 resultam em baixa produção de aromas frutados e média de

ésteres. Portanto, é muito utilizada em cervejas com aromas predominantes de malte e lúpulo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* SY067, por sua vez, é muito utilizada em cervejas com moderada concentração de ésteres e compostos fenólicos (por exemplo, Witbier). Por fim, a produção de aromas florais e frutados pela levedura *Saccharomyces pastorianus* SY001 resulta em cervejas com sensação limpa e seca, além de um sabor característico de malte (Bio4, 2020).

A Tabela 13 apresenta as concentrações de compostos de *flavour* obtidos nas fermentações realizadas, e a Figura 29 apresenta estes dados em forma de gráficos.

Tabela 13 – Concentrações de compostos de *flavour* ao fim das fermentações

Classificação	Composto	SY025		Limite sensorial (mg/L)
		Livres	Imobilizadas	
Álcool superior	1-Propanol	32,87 ± 2,27	43,85 ± 1,41	800
	2-Metil propanol (isobutanol)	34,67 ± 2,35	32,67 ± 1,32	200
	3-Metil butanol (álcool isoamílico)	93,28 ± 6,45	77,92 ± 2,46	70
Éster	Acetato de etila	11,75 ± 1,21	21,86 ± 1,51	30
Composto carbonílico	Acetaldeído	65,74 ± 9,86	71,20 ± 20,36	25

Classificação	Composto	SY067		Limite sensorial (mg/L)
		Livres	Imobilizadas	
Álcool superior	1-Propanol	28,45 ± 0,72	22,97 ± 2,15	800
	2-Metil propanol (isobutanol)	17,47 ± 0,92	21,57 ± 1,96	200
	3-Metil butanol (álcool isoamílico)	86,96 ± 5,10	104,78 ± 10,36	70
Éster	Acetato de etila	19,75 ± 1,88	23,87 ± 2,79	30
Composto carbonílico	Acetaldeído	478,52 ± 53,97	57,90 ± 18,11	25

Classificação	Composto	SY001		Limite sensorial (mg/L)
		Livres	Imobilizadas	
Álcool superior	1-Propanol	16,83 ± 1,33	22,69 ± 1,57	800
	2-Metil propanol (isobutanol)	18,54 ± 1,72	21,01 ± 1,88	200
	3-Metil butanol (álcool isoamílico)	41,75 ± 5,05	50,59 ± 5,08	70
Éster	Acetato de etila	3,37 ± 0,57	5,92 ± 0,38	30
Composto carbonílico	Acetaldeído	77,89 ± 8,78	22,28 ± 3,04	25

Fonte: O autor. Todas as concentrações são dadas em mg/L. Variação é refletida pelo erro padrão amostral. O limite sensorial é definido como a concentração mínima de um composto presente na cerveja a partir da qual seu aroma e sabor são alterados de maneira significativa (ENGAN, 1971).

Figura 29 – Perfis de compostos de *flavour* nas fermentações

Fonte: O autor. Concentrações de compostos aromáticos (*flavour*) ao fim das fermentações em extrato de malte 12 °P com as linhagens SY025, SY067 e SY001.

As leveduras imobilizadas da linhagem SY025 apresentaram diferenças importantes na produção de compostos de *flavour*, quando comparadas às livres. Os resultados da Figura 29 e da Tabela 13 sugerem que o metabolismo das leveduras SY025 imobilizadas é deslocado para a formação de 1-propanol, acetato de etila e acetaldeído.

Uma hipótese para o aumento da concentração de acetaldeído é o aumento na velocidade de consumo de substrato, reportado por Doran e Bailey (1986). Ou seja, a formação de piruvato acaba sendo um ponto de controle do metabolismo (ponto de “gargalo”) e, uma vez que o consumo de glicose é estimulado, a concentração de piruvato intracelular aumenta. Consequentemente, a concentração de acetaldeído também aumenta e uma parte é excretada pelas células. A outra parte continua na fermentação alcoólica e resulta na geração de etanol. Todavia, mesmo com o estímulo de crescimento microbiano, o etanol é utilizado como precursor para a formação de acetato de etila, utilizando as coenzimas acetil-CoA e acil-CoA.

Para a redução na formação de 2-metil propanol e 3-metil butanol nas SY025 imobilizadas em comparação com as SY025 livres, levanta-se a hipótese de que limitações de transferência de massa de valina e leucina foram significativas nesse sistema (KOBAYASHI; SHIMIZU; SHIOYA, 2008). Outra possibilidade é a excreção excessiva de α -acetolactato pelas leveduras imobilizadas, um precursor importante para ambos os álcoois superiores.

No caso da cepa SY067, as imobilizadas apresentaram redução na formação de 1-propanol e acetaldeído e aumento na geração de 2-metil propanol, 3-metil butanol e acetato de etila, quando comparadas às em suspensão. Sugere-se que o aumento na concentração de acetato de etila nas leveduras SY067 imobilizadas foi causado devido às limitações de transferência de oxigênio no suporte ImoYeast, o que resultou na formação deste éster.

Simultaneamente, entretanto, este foi o sistema com menor eficiência de imobilização dos três estudados ($EI = 61,88 \pm 1,12$). Isso sugere que, embora limitações na transferência de massa possam ter sido significativas (ver item 5.3.2), muitas das leveduras antes imobilizadas acabaram por realizar a fermentação em suspensão. Ou seja, mesmo que o suporte de imobilização tenha estimulado o crescimento celular, e em particular o de leveduras que se desprenderam da superfície para o meio (BRÁNYIK et al., 2004), a velocidade de consumo de substrato foi menor, fazendo com que o piruvato não fosse o principal ponto regulador do

metabolismo. Assim, o acetaldeído não foi produzido em excesso, o que explica sua redução nesse sistema. Semelhantemente, a hipótese é que a formação de 1-propanol foi menos pronunciada do que nas leveduras livres, devido à liberação de células para o meio. Esta afirmação é suportada pelos dados fornecidos por Boulton e Quain (2001), de consumo sequencial de aminoácidos. A treonina, precursor do 1-propanol, é consumida antes da valina e leucina, precursores de 2-metil propanol e 3-metil butanol, respectivamente. Sugere-se então, que no início da fermentação, em que a EI é maior, as limitações de transferência de massa de treonina não são significativas (uma vez que seu consumo seria realizado principalmente pelas leveduras na camada mais externa do suporte), resultando na formação observada de 1-propanol. Entretanto, enquanto a fermentação prossegue e a EI diminui, as leveduras que já consumiram treonina quando estavam imobilizadas se encontram no meio de fermentação e utilizam a valina e a leucina para seu metabolismo.

Por fim, para a linhagem SY001, as leveduras imobilizadas apresentaram redução na concentração de acetaldeído e aumento na concentração de todos os demais compostos estudados. A hipótese neste caso é de que as limitações na transferência de massa foram mínimas (ver seção 5.3.2), fazendo com que o consumo sequencial de aminoácidos não fosse perturbado.

Além disso, sugere-se que, por ocasião da imobilização, a velocidade de consumo de substrato foi aumentada, tornando o piruvato um ponto de controle do metabolismo, deslocando-o para a formação de 1-propanol, 2-metil propanol e 3-metil butanol. O aumento na concentração de acetato de etila é entendida como resultado da ativação metabólica das células imobilizadas, além da exaustão da concentração de oxigênio no interior das partículas ImoYeast, tornando disponíveis o acetil-CoA e acil-CoA para sua síntese.

A formação de álcoois superiores em sistemas com leveduras imobilizadas tem sido reportada como menor, equivalente ou maior que em sistemas com leveduras em suspensão. (DJORDJEVIĆ et al., 2016).

Todavia, uma comparação direta entre os resultados obtidos neste estudo com os apresentados na literatura é complicado (o que é o caso em todos os trabalhos nesta área, como apontado por Virkajarvi e Pohjala (2000) e Willaert e Nedović (2006)). Isso ocorre porque há variações no metabolismo difíceis de prever e sistematizar, que dependem do tipo de processo (batelada ou contínuo), método de

imobilização (adsorção ou aprisionamento), linhagem de levedura (Ale ou Lager), tipo de suporte (alginato de cálcio ou vidro poroso), entre outros.

Willaert e Nedović (2006) discutem que leveduras imobilizadas, cujo crescimento celular é estimulado pelo sistema de imobilização, tendem a produzir mais álcoois superiores, particularmente o 1-propanol, devido à ativação da via de α -cetobutirato. Os resultados das linhagens SY025 e SY001 estão de acordo com essa afirmação, enquanto que para a cepa SY067, ocorreu o contrário. A hipótese para explicar este fenômeno é que, tanto as limitações de transferência de massa de treonina, o aminoácido necessário para a síntese de 1-propanol, quanto características intrínsecas desta linhagem, tenham exercido influência significativa no sistema com a linhagem SY067 imobilizada.

O trabalho de Brányik et al. (2008) apresenta comparações das produções de compostos aromáticos em cerveja no processo tradicional de cerveja com leveduras livres e em processos contínuos com leveduras imobilizadas. Em geral, estes sistemas de imobilização resultaram em concentrações de acetaldeído 4 vezes maiores, concentrações de acetato de etila 4 vezes menores, concentrações de propanol 3 vezes menores e concentrações de 3-metil butanol 2 vezes menores.

5.3 MODELAGEM MATEMÁTICA

5.3.1 Cinética de fermentação – estimativa de parâmetros

Poucas informações são encontradas na literatura quanto à cinética de desprendimento das células do suporte de imobilização. Isto ocorre por causa da variedade de suportes e métodos de imobilização, além das diferentes condições de processo (por exemplo, agitação, pH e temperatura do meio). O mais comum é assumir que este fenômeno seja desprezível no sistema estudado (KOSTOV et al., 2012). Nos casos investigados aqui, entretanto, o parâmetro eficiência de imobilização (EI) deixou evidente que este fenômeno não poderia ser desconsiderado.

Neste trabalho, a cinética do tipo Michaelis-Menten/Monod foi proposta para representar o desprendimento das leveduras do suporte ImoYeast. A razão desta escolha está na tendência de o valor de EI diminuir ao longo do tempo de fermentação, ou seja, à medida em que há o crescimento celular. Assim, considerou-se que a

velocidade específica de desprendimento celular, k (h^{-1}), depende da massa de leveduras imobilizadas (m_{Xim}), como apresenta a Figura 30.

Figura 30 – Cinética de desprendimento de leveduras da matriz ImoYeast

Fonte: Doran (2013) (adaptado pelo autor). Cinética de desprendimento de leveduras do suporte de imobilização. Onde: k = velocidade específica de desprendimento de células da matriz (h^{-1}); $k_{máx}$ = velocidade específica máxima de desprendimento de células da matriz (h^{-1}); m_{Xim} = massa de leveduras imobilizadas (g); e k_m = massa de biomassa imobilizada (g), na qual a velocidade de desprendimento da matriz é a metade da velocidade máxima ($k_{máx}/2$).

A velocidade específica de desprendimento celular (k) aumenta à medida que m_{Xim} também aumenta, mas apenas até um ponto crítico $k_{máx}$ (velocidade específica máxima de desprendimento de células do suporte). Neste modelo cinético, k_m representa a massa de leveduras imobilizadas (m_{Xim}) na qual a velocidade específica de desprendimento é metade da máxima ($k = k_{máx}/2$).

A Tabela 14 apresenta os valores experimentais de biomassa, substrato e produtos, determinados no início das fermentações. Estes valores foram utilizados como os valores iniciais para a modelagem das cinéticas de fermentação.

Tabela 14 – Condições iniciais para modelagem matemática

		SY025	SY067	SY001
Livres	m_{X0}	0,09	0,08	0,12
	m_{S0}	22,27	21,39	21,85
	m_{Et0}	0,07	0,08	0,06
	m_{Gly0}	0,08	0,08	0,08

	$m_{X0, im}$	0,05	0,18	0,10
	$m_{X0, desp}$	0,00	0,02	0,00
Imobilizadas	m_{S0}	19,88	18,40	18,76
	m_{Et0}	0,03	0,04	0,03
	m_{Gly0}	0,07	0,07	0,07

Fonte: O autor. Condições iniciais para a modelagem de todos os experimentos realizados, em que: m_{X0} = massa inicial de biomassa (g); $m_{X0, im}$ = massa inicial de biomassa imobilizada (g); $m_{X0, desp}$ = massa inicial de biomassa despreendida (g); m_{S0} = massa inicial de substrato (g); m_{Et0} = massa inicial de etanol (g); e m_{Gly0} = massa inicial de glicerol (g).

5.3.1.1 Linhagem SY025

Ambos os modelos cinéticos testados (Monod e Hinshelwood) ajustaram bem aos dados experimentais de substrato, etanol e glicerol nas fermentações com as leveduras da linhagem SY025 em suspensão (Figura 31). Os dois modelos, embora tenham seguido a tendência apresentada pelos dados experimentais, subestimaram os valores iniciais e superestimaram os valores finais para a massa de biomassa. Portanto, considerou-se que esta linhagem não foi inibida significativamente pela formação de etanol, nas condições estudadas.

Figura 31 – Leveduras SY025 livres: dados experimentais x modelagem

Fonte: O autor. Valores experimentais comparados aos simulados, onde: — = valores calculados pelo modelo; ■ = valores experimentais de biomassa (g); ● = valores experimentais de substrato (g); ▲ = valores experimentais de etanol (g); e ▼ = valores experimentais de glicerol (g).

No caso das leveduras SY025 imobilizadas, embora os modelos tenham se ajustado bem aos dados de substrato e etanol, a biomassa predita pela modelagem foi subestimada ao longo de toda a fermentação, conforme apresentado na Figura 32. Pode-se observar também que, no caso da cinética de Monod, em que as massas máximas simuladas de m_{Xim} e m_{Xdesp} são menores que na de Hinshelwood, a formação de glicerol também é subestimada.

Figura 32 – Leveduras SY025 imobilizadas: dados experimentais x modelagem

Fonte: O autor. Valores experimentais comparados aos simulados, onde: — = valores calculados pelo modelo; X = valores experimentais de biomassa fixa no suporte ImoYeast (g); ■ = valores experimentais de biomassa desprendida (g); ● = valores experimentais de substrato (g); ▲ = valores experimentais de etanol (g); e ▼ = valores experimentais de glicerol (g).

Os resultados estão de acordo com a afirmação de Schmidell et al. (2001), que diz que o método de Nelder-Mead para a estimação de parâmetros tende a se concentrar nos maiores valores numéricos envolvidos nos cálculos, garantindo que as curvas se ajustem corretamente. À medida que as grandezas diminuem, o mesmo ocorre ao peso nos critérios do algoritmo para aceitação da diferença entre os valores experimental e simulado (resíduo do modelo). Dessa forma, na modelagem conduzida neste trabalho, o algoritmo priorizou o ajuste dos valores de substrato e etanol.

Ainda assim, pode-se dizer que os modelos implementados obtiveram resíduos satisfatórios, quando comparados com trabalhos semelhantes. Kostov et al. (2012), por exemplo, obtiveram resíduos na faixa de 0,419-14,8, na modelagem de fermentação alcoólica com *S. cerevisiae*. Parcunev et al. (2012), apresentam resíduos entre 0,07 e 0,81 na modelagem de fermentação de cerveja com *S. cerevisiae*. Os valores dos resíduos, assim como dos parâmetros cinéticos estimados pela modelagem são apresentados na Tabela 15.

Ao comparar os resultados obtidos com a cinética de Monod com os da cinética de Hinshelwood, percebe-se que o segundo modelo apresenta valores maiores para a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das leveduras livres, e menores para o sistema imobilizado, tanto das células fixas no suporte quanto das desprendidas para o meio.

Tabela 15 – Parâmetros fisiológicos da linhagem SY025 (estimados no modelo)

Modelo cinético	Condição	Parâmetro cinético estimado											Resíduo do modelo
		$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	K _{SX} (g)	Y _{XS} (gx/gs)	Y _{PXet} (gPet/gx)	Y _{PXgly} (gPgly/gx)	K _{PX} (g)	q _{Pmáx} (h ⁻¹)	K _{SP} (g)	K _{PP} (g)	k _{máx}	k _m	
Monod	Livres	0,13	56,82	0,029	17,85	0,57	-	-	-	-	-	-	0,43
	Imobilizadas	<i>fixas na matriz (im)</i>											
		0,73	234,07	0,023	16,47	0,85	-	-	-	-	0,005	0,003	0,89
		<i>desprendidas para o meio (desp)</i>											
		0,38	693,38	0,078	181,47	0,08	-	-	-	-			
Hinshelwood	Livres	0,46	263,90	0,028	-	0,58	-0,029	0,8	2,02	0,07	-	-	0,40
	Imobilizadas	<i>fixas na matriz (im)</i>											
		0,58	167,80	0,026	-	0,81	0,0013	1,16	0,43	0,038	0,008	0,04	0,92
		<i>desprendidas para o meio (desp)</i>											
		0,17	489,49	0,008	-	0,70	0,075	-3,73	1,81	0,031			

Fonte: O autor.

Ao realizarem a modelagem de leveduras imobilizadas para a produção de cerveja, Parcunев et al. (2012) utilizaram o modelo de Aiba para a avaliação da existência de inibição pelo produto. Os autores argumentam que não há evidências para afirmar a presença de inibição de maneira significativa e os resultados apresentados na Tabela 15 (valores das constantes de inibição K_{PX} e K_{PP}) estão de acordo com esta afirmação. Assim como no trabalho citado, afirma-se que uma vez que tanto a cinética de Monod quanto a de Hinshelwood retratam bem o processo fermentativo (as curvas simuladas descrevem os perfis dos pontos experimentais), é sugerido que em estudos futuros os termos K_{PX} (constante de inibição devido ao crescimento) e K_{PP} (constante de inibição devido à formação de produto) sejam eliminados do modelo cinético, resultando na tradicional equação de Monod (PARCUNEV et al., 2012).

Esta sugestão faz sentido, visto que os valores de K_{PX} e K_{PP} são alguns dos menores valores de parâmetros fisiológicos estimados, quando comparados a outros parâmetros de mesma unidade (g); ou seja, seu impacto na fisiologia das leveduras estudadas é mínimo.

Os parâmetros estimados para a linhagem SY025 estão de acordo com os parâmetros fisiológicos calculados a partir dos dados experimentais (considerando a velocidade específica de crescimento celular, $\mu_{m\acute{a}x}$), no sentido de indicarem que a imobilização no suporte ImoYeast resultou no estímulo ao crescimento celular. Esta observação, embora seja distinta dos resultados de Doran e Bailey (1986), que apontam redução na formação de biomassa, está de acordo com a afirmação de Norton e D'amore (1994) de que, dependendo do suporte de imobilização, a velocidade de crescimento celular pode sim ser aumentada (ver seção 5.2.1).

Uma forte evidência de que o microambiente de imobilização influencia o metabolismo microbiano é a redução de $\mu_{m\acute{a}x}$ das leveduras desprendidas para o meio, em comparação com as células que continuam fixas ao suporte. As principais hipóteses são de que as limitações de transferência de massa e o contato da parede celular com o sólido provoquem respostas fisiológicas no sentido da ativação do metabolismo (BRÁNYIK et al., 2005), no sentido de um maior direcionamento do carbono para células e glicerol ao invés de etanol.

Por fim, avaliando os parâmetros Y_{PXet} e Y_{PXgly} da linhagem SY025, é interessante notar que os valores corroboram a discussão realizada no tópico 5.2.1. As leveduras livres e as fixas no suporte possuem valores muito próximos de Y_{PXet}

(17,85 g etanol/g biomassa livre e 16,47 g etanol/g biomassa imobilizada, respectivamente). Mesmo assim, percebe-se a tendência de as imobilizadas produzirem menos etanol do que as em suspensão. Quando observado, todavia, o valor estimado de Y_{PXet} das leveduras desprendidas para o meio, percebe-se que este aumenta drasticamente (181,47 g etanol/g biomassa desprendida). De forma semelhante ocorre com a formação de glicerol: as leveduras livres ($Y_{PXgly} = 0,57$ g glicerol/g biomassa livre), produzem menos glicerol que as imobilizadas ($Y_{PXgly} = 0,85$ g glicerol/g biomassa imobilizada). Todavia, quando se desprendem para o meio de fermentação, sugere-se que seu metabolismo é deslocado para formação de etanol e para menor produção de biomassa, pois para estas tem-se $Y_{PXgly} = 0,08$ g glicerol/g biomassa desprendida.

Com estes resultados, é possível sugerir que leveduras da linhagem SY025 em contato direto com o suporte ImoYeast tendem a ter seu metabolismo deslocado para a formação de biomassa, glicerol e compostos aromáticos (NORTON; D'AMORE, 1994; BRÁNYIK et al., 2004; KOURKOUTAS et al., 2004).

5.3.1.2 Linhagem SY067

As Figuras 33 e 34 apresentam as curvas experimentais e simuladas de biomassa, substrato, etanol e glicerol, obtidas com a linhagem SY067 livre e imobilizada. É perceptível que ambos os modelos cinéticos (Monod e Hinshelwood) se adequam de forma satisfatória aos conjuntos de dados experimentais, com exceção da biomassa imobilizada (X_{im}) no caso do modelo de Hinshelwood. Assim, o fenômeno de inibição de crescimento de biomassa pelo produto (etanol) parece não exercer influência significativa no sistema estudado.

Figura 33 – Leveduras SY067 livres: dados experimentais x modelagem

Fonte: O autor. Valores experimentais comparados aos simulados, onde: — = valores calculados pelo modelo; ■ = valores experimentais de biomassa (g); ● = valores experimentais de substrato (g); ▲ = valores experimentais de etanol (g); e ▼ = valores experimentais de glicerol (g).

Figura 34 – Leveduras SY067 imobilizadas: dados experimentais x modelagem

Fonte: O autor. Valores experimentais comparados aos simulados, onde: — = valores calculados pelo modelo; X = valores experimentais de biomassa fixa no suporte ImoYeast (g); ■ = valores experimentais de biomassa desprendida (g); ● = valores experimentais de substrato (g); ▲ = valores experimentais de etanol (g); e ▼ = valores experimentais de glicerol (g).

A Tabela 16 apresenta os valores estimados dos parâmetros fisiológicos das leveduras SY067 livres e imobilizadas. Observando os valores de K_{PX} e K_{PP} (constantes de inibição devido ao crescimento celular e à formação de produto, respectivamente), comprova-se que a inibição por etanol não exerce influência significativa nas leveduras nas condições estudadas, uma vez que seus valores são muito menores do que os de K_{SX} (constante de saturação). Portanto, sua influência na fisiologia microbiana é mínima nas condições estudadas (PARCUNEV et al., 2012).

Tabela 16 – Parâmetros fisiológicos da linhagem SY067 (estimados no modelo)

Modelo cinético	Condição	Parâmetro cinético estimado											Resíduo do modelo
		$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	K _{SX} (g)	Y _{XS} (g _X /g _S)	Y _{PXet} (g _{Pet} /g _X)	Y _{PXgly} (g _{Pgly} /g _X)	K _{PX} (g)	q _{Pmáx} (h ⁻¹)	K _{SP} (g)	K _{PP} (g)	k _{máx}	k _m	
Monod	Livres	0,14	68,84	0,012	44,01	1,56	-	-	-	-	-	-	0,09
	Imobilizadas	<i>fixas na matriz (im)</i>											
		0,093	35,13	0,015	30,63	1,87	-	-	-	-			
		<i>desprendidas para o meio (desp)</i>											
		0,016	2766,44	0,003	47,57	-1,12	-	-	-	-			
Hinshelwood	Livres	0,82	533,90	0,012	-	1,58	-0,029	1,74	1,37	0,081	-	-	0,04
	Imobilizadas	<i>fixas na matriz (im)</i>											
		0,87	893,44	0,011	-	2,61	0,020	1,22	0,89	0,033			
		<i>desprendidas para o meio (desp)</i>											
		0,72	235,68	0,009	-	2,71	0,007	-1,10	0,71	0,014			

Fonte: O autor.

A cinética de Monod indica que a imobilização desta cepa no suporte ImoYeast resulta na redução da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$), sendo ainda mais reduzida por ocasião do desprendimento das células no meio de cultivo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Parcunev et al. (2012), em que as leveduras de alta fermentação imobilizadas apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ menor do que as em suspensão.

A primeira hipótese para estes dados é que as limitações de transferência de massa foram significativas, causando a diminuição da velocidade de crescimento (DORAN; BAILEY, 1986; BRÁNYIK et al., 2005). Mas este provavelmente não é o caso, pois mesmo que o tradicional gradiente de concentração de substrato no interior das esferas (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985; DORAN, 2013) do suporte ImoYeast tenha sido formado, estimou-se que o substrato estava disponível em todo o raio da partícula (ver item 5.3.2).

A hipótese alternativa, portanto, é que esta linhagem seja mais sensível aos efeitos de altas densidades celulares e do contato de sua parede celular com sólidos. Inclusive, efeitos de *quorum sensing* podem estar envolvidos nessa redução da velocidade de crescimento. Ou seja, devido ao contato direto com o suporte ImoYeast e com a parede celular de outras leveduras, o metabolismo das células SY067 teria sido deslocado para o armazenamento de polissacarídeos estruturais e de reserva energética, em vez de acelerar o crescimento celular no interior do suporte (DORAN; BAILEY, 1986; NEDOVIĆ et al., 2015).

Entretanto, mesmo que a velocidade de crescimento tenha sido menor, o suporte ImoYeast propiciou o aumento do rendimento celular, como discutido na seção 5.2.1. Entende-se, desta forma, que as leveduras no interior do suporte foram estimuladas ao crescimento, ainda que em menor velocidade, mas as que estavam na camada mais próxima à superfície acabaram desprendendo para o meio. Este fenômeno é explicado por Karel, Libicki e Robertson (1985), cujo argumento é que há casos de crescimento de células adsorvidas em um sólido, em que as células filhas não permanecem imobilizadas, mas são liberadas para ao meio líquido. Este é, possivelmente, o motivo da eficiência de imobilização (EI) de 60 %.

Com relação aos fatores de conversão de etanol e glicerol a partir de biomassa (Y_{PXet} e Y_{PXgly} , respectivamente), percebe-se o mesmo efeito descrito para a linhagem SY025. Ou seja, os parâmetros fisiológicos estimados corroboram as informações da cinética de fermentação, em que as leveduras imobilizadas produziram menos etanol

e mais glicerol do que as livres. Quando desprendidas para o meio, todavia, Y_{PXet} aumentou para 47,57 g etanol/g desprendida e Y_{PXgly} , embora tenha sido estimado como um valor negativo, é útil para identificar a tendência de reduzir.

5.3.1.3 Linhagem SY001

Os modelos cinéticos de Monod e Hinshelwood foram implementados com sucesso para esta cepa. A Figura 35 apresenta as curvas experimentais e simuladas para a fermentação com as leveduras livres. É possível observar que as curvas preditas de substrato e etanol ajustaram bem aos dados experimentais, como esperado pelo algoritmo de Nelder-Mead (SCHMIDELL et al., 2001). Entretanto, embora as predições das curvas de biomassa e glicerol sigam a tendência dos valores experimentais, o resíduo do modelo foi maior nesses casos.

Figura 35 – Leveduras SY001 livres: dados experimentais x modelagem

Fonte: O autor. Valores experimentais comparados aos simulados, onde: — = valores calculados pelo modelo; ■ = valores experimentais de biomassa (g); ● = valores experimentais de substrato (g); ▲ = valores experimentais de etanol (g); e ▼ = valores experimentais de glicerol (g).

A Figura 36, por sua vez, apresenta as curvas do modelo obtido para as leveduras SY001 imobilizadas, em comparação com os valores obtidos experimentalmente.

Figura 36 – Leveduras SY001 imobilizadas: dados experimentais x modelagem

Fonte: O autor. Valores experimentais comparados aos simulados, onde: — = valores calculados pelo modelo; X = valores experimentais de biomassa fixa no suporte ImoYeast (g); ■ = valores experimentais de biomassa desprendida (g); ● = valores experimentais de substrato (g); ▲ = valores experimentais de etanol (g); e ▼ = valores experimentais de glicerol (g).

Percebe-se que, novamente, a técnica de Nelder-Mead prioriza os valores numéricos mais elevados (substrato e etanol), deslocando o erro para os valores menos expressivos numericamente. No caso da cinética de Monod, as células imobilizadas (m_{Xim}) e desprendidas para o meio (m_{Xdesp}) foram subestimadas pelo modelo, resultando na consequente subestimação da massa de glicerol.

Por outro lado, a cinética de Hinshelwood ajustou de forma satisfatória ao perfil de biomassa desprendida (m_{Xdesp}) durante toda a fermentação, e ao perfil de biomassa

fixa no suporte (m_{Xim}) até 69,5 h, superestimando seus valores após este tempo. As massas de glicerol foram superestimadas pelo modelo, uma vez que a formação deste produto está atrelada ao crescimento microbiano.

A Tabela 18 apresenta os valores estimados para os parâmetros fisiológicos das leveduras livres e imobilizadas da linhagem SY001, nas condições estudadas, utilizando-se os modelos cinéticos de Monod e Hinshelwood.

Embora o perfil de crescimento microbiano simulado (livres e imobilizadas) pelo modelo cinético de Hinshelwood tenha se ajustado melhor aos dados experimentais do que ao se utilizar a equação de Monod, percebe-se que seu resíduo geral do modelo é maior. Assim como no caso das linhagens SY025 e SY067, é possível afirmar que os efeitos de inibição por etanol, embora presentes, são mínimos para os experimentos realizados com a linhagem SY001. Avaliando K_{PX} e K_{PP} , estes parâmetros são muito menores do que K_{SX} (com exceção das fixas na matriz, cujo $K_{SX} = -6,81$). Por estes motivos, optou-se por conduzir a análise e as discussões seguintes (item 5.3.2) utilizando-se apenas a cinética de Monod (PARCUNEV et al., 2012).

Tabela 18 – Parâmetros fisiológicos da linhagem SY001 (estimados no modelo)

Modelo cinético	Condição	Parâmetro cinético estimado											Resíduo do modelo
		$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	K_{SX} (g)	Y_{XS} (g $_X$ /g $_S$)	Y_{PXet} (g $_{\text{Pet}}$ /g $_X$)	Y_{PXgly} (g $_{\text{Pgly}}$ /g $_X$)	K_{PX} (g)	$q_{\text{Pmáx}}$ (h^{-1})	K_{SP} (g)	K_{PP} (g)	$k_{\text{máx}}$	k_{m}	
Monod	Livres	0,08	101,79	0,03	17,53	0,82	-	-	-	-	-	-	0,26
	Imobilizadas	<i>fixas na matriz (im)</i>											
		0,47	481,88	0,035	17,04	0,88	-	-	-	-	0,001	0,0001	0,70
		<i>desprendidas para o meio (desp)</i>											
		0,087	779,63	0,013	22,86	-1,90	-	-	-	-			
Hinshelwood	Livres	0,22	235,85	0,044	-	0,54	0,033	0,26	2,93	0,088	-	-	0,21
	Imobilizadas	<i>fixas na matriz (im)</i>											
		0,017	-6,81	0,057	-	0,92	0,19	0,18	2,83	0,017	0,001	0,0005	0,95
		<i>desprendidas para o meio (desp)</i>											
		0,056	594,34	0,008	-	3,34	0,26	2,19	1,06	0,34			

Fonte: O autor.

Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) sugerem que a imobilização da linhagem SY001 no suporte ImoYeast implicou no estímulo ao crescimento celular. Assim, mesmo Y_{XS} sendo muito parecido para as leveduras livres (0,03 g biomassa livre/g substrato) e para as fixas na matriz (0,035 g biomassa imobilizada/g substrato), o metabolismo das leveduras SY001 tende a apresentar velocidades de crescimento maiores, quando imobilizadas.

Este resultado está de acordo com Parcunev et al. (2012), cujas fermentações com leveduras de baixa fermentação resultaram também no aumento de $\mu_{\text{máx}}$. A explicação neste caso, segundo os autores, é a elevada concentração de células no volume de controle, que foi responsável pela aceleração das velocidades de reação.

A formação de etanol e glicerol apresentaram os mesmos efeitos presentes nas leveduras SY025 e SY067. Ou seja, as imobilizadas ($Y_{\text{PXet}} = 17,04$ g etanol/g biomassa imobilizada) produziram menos etanol do que as livres ($Y_{\text{PXet}} = 17,53$ g etanol/g biomassa livre) e mais glicerol (imobilizadas: $Y_{\text{PXgly}} = 0,88$ g glicerol/g biomassa imobilizada e livres: $Y_{\text{PXgly}} = 0,82$ g glicerol/g biomassa livre). Estas sutis alterações nos valores dos fatores de conversão simulados estão de acordo com os apresentados na seção 5.2.1.

Uma vez que as limitações estimadas na transferência de massa foram mínimas (ver item 5.3.2), considera-se que as alterações fisiológicas observadas nesta linhagem são principalmente devido às interações das leveduras umas com as outras e com o suporte de imobilização ImoYeast.

5.3.2 Concentração de substrato no interior da partícula – reação-difusão

Como o modelo de reação-difusão utilizado assumiu estado estacionário, ou seja, desconsiderou a variação de substrato em relação ao tempo e avaliou apenas sua variação no espaço, foi necessário aplicá-lo a cada tempo em que se realizou amostragem (DORAN, 2013). Assim, para os seis pontos experimentais das cinéticas de fermentação, os respectivos dados alimentaram o modelo. As Figuras 37 a 39 apresentam os perfis de substrato ao longo do raio adimensional da partícula em todos os tempos de fermentação estudados, para as linhagens SY025, SY067 e SY001, respectivamente.

Figura 37 – Concentração estimada de substrato no interior do suporte ImoYeast, fator de efetividade (η) e módulo de Thiele (ϕ) calculados em diferentes tempos de fermentação conduzida com a linhagem SY025

Fonte: O autor. Simulações da concentração de substrato no interior da partícula ImoYeast nos tempos de fermentação: $t_0 = 0$ h; $t_1 = 20$ h; $t_2 = 44$ h; $t_3 = 68$ h; $t_4 = 92$ h; e $t_5 = 116$ h.

Figura 38 – Concentração estimada de substrato no interior do suporte ImoYeast, fator de efetividade (η) e módulo de Thiele (ϕ) calculados em diferentes tempos de fermentação conduzida com a linhagem SY067

Fonte: O autor. Simulações da concentração de substrato no interior da partícula ImoYeast nos tempos de fermentação: $t_0 = 0$ h; $t_1 = 21,5$ h; $t_2 = 46,5$ h; $t_3 = 69,5$ h; $t_4 = 93,5$ h; e $t_5 = 117,5$ h.

Figura 39 – Concentração estimada de substrato no interior do suporte ImoYeast, fator de efetividade (η) e módulo de Thiele (ϕ) calculados em diferentes tempos de fermentação conduzida com a linhagem SY001

Fonte: O autor. Simulações da concentração de substrato no interior da partícula ImoYeast nos tempos de fermentação: $t_0 = 0$ h; $t_1 = 21$ h; $t_2 = 45$ h; $t_3 = 69$ h; $t_4 = 93$ h; e $t_5 = 118$ h.

É possível perceber que, embora presentes, as limitações na transferência de massa de substrato não são o fator mais significativo nos sistemas com as três linhagens de leveduras imobilizadas estudadas. Esta afirmação está baseada no critério descrito por Doran (2013):

- Se $\phi < 0,3$ então $\eta \approx 1$: limitações por transferência de massa insignificantes;

- Se $\phi > 3$ então $\eta \ll 1$: limitações por transferência de massa significativas.

O módulo de Thiele (ϕ) e o fator de efetividade (η) foram considerados as melhores opções para a avaliação quantitativa da performance do suporte de imobilização ImoYeast, pois são parâmetros de engenharia comumente utilizados para a verificação da eficiência de sistemas reacionais com catalisadores heterogêneos, ou seja, nos quais há a presença de fenômenos de transporte que não podem ser negligenciados (WEISZ, 1973).

Contudo, a literatura raramente reporta estas análises para células imobilizadas (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985), sendo que os modelos propostos geralmente assumem os efeitos difusionais como desprezíveis (KOSTOV et al., 2012; PARCUNEV et al., 2012). Brányik et al. (2005), entretanto, discutem que a existência de limitações de transferência de massa é a hipótese mais evidente para explicar as alterações fisiológicas observadas em fermentações. Além disso, é muito difícil determinar, principalmente em sistemas de imobilização por aprisionamento, se as alterações observadas no metabolismo celular se devem exclusivamente ao contato com o suporte sólido, ao microambiente de imobilização ou ao gradiente de concentração, ou uma junção de todos estes fatores (NORTON; D'AMORE, 1994).

Os resultados da linhagem SY025 apontam que há um gradiente de concentração de substrato no interior do suporte ImoYeast durante o processo, uma vez que ao final da fermentação (116 h), há a disponibilidade de 60 % de concentração de substrato no centro da partícula, em comparação ao total encontrado na interface da superfície e do meio líquido.

Assim, as modificações fisiológicas observadas podem, em parte, estar relacionadas com esta diferença na disponibilização de substrato. À medida que a fermentação evoluiu, os valores de η diminuíram, de 0,991 em 0 h até 0,834 em 116 h, indicando que a eficiência de difusão de substrato para o interior do suporte foi reduzida durante o processo. Além disso, apesar de os valores de η estarem próximos a 1, os valores de ϕ também indicam a tendência do aumento das limitações de difusão, uma vez que aumentaram de 0,52 em 0 h para 1,8 em 116 h.

A mesma tendência é observada nas cepas SY067 e SY001; ou seja, à medida que a fermentação acontece, a eficiência do suporte diminui de forma a agravar o gradiente de concentração de substrato. Assim, as leveduras localizadas no centro da

partícula estariam em contato com concentrações menores de substrato do que as na superfície (PILKINGTON et al., 1998).

Para a linhagem SY067, os valores em 0 h (inicial) e em 117,5 h (final) de η foram de 0,993 e 0,880, respectivamente. Os valores de ϕ variaram de 1,17 (0 h) para 1,5 (117,5 h). Neste caso, a concentração de substrato no centro da partícula ao final da fermentação foi de 70 % do total encontrado na superfície do suporte.

A linhagem SY001 imobilizada apresentou valores de η de 0,995 em 0 h e 0,969 em 118 h. Os valores de ϕ variaram de 0,34 a 0,74 ao longo da fermentação, e o gradiente de concentração de substrato, embora existente, foi o menos impactante quando comparadas as três linhagens. Neste caso, 95 % da concentração de substrato total esteve disponível no centro da partícula.

É interessante notar nas linhagens SY025 e SY067 que, na passagem de t_3 para t_4 (aproximadamente entre 69 e 93 h), há uma redução em ϕ . Isto é um indicador de que, neste intervalo, as limitações de difusão foram menos pronunciadas, e isto por causa da liberação de biomassa para o meio líquido. Ou seja, por causa do desprendimento de células para o meio, o suporte teria ficado menos carregado, facilitando a difusão de substrato para as leveduras que permaneceram fixas (BRÁNYIK et al., 2004). O mesmo é observado na linhagem SY001 entre t_4 e t_5 (93 h e 118 h).

Estes resultados estão de acordo com as eficiências de imobilização (EI) obtidas para as diferentes fermentações, em que as linhagens SY025 e SY067 apresentaram valores menores do que a SY001, liberando células em maior quantidade para o meio desde a metade do tempo total de fermentação.

Uma forma de verificar experimentalmente os valores estimados no modelo de reação-difusão foi a microscopia eletrônica de varredura (MEV) de duas regiões distintas do suporte de imobilização, como mostram as Figuras 40 e 41.

A partir das micrografias, é possível afirmar que o crescimento microbiano se deu em toda a extensão do suporte, e não apenas nas camadas mais superficiais. Dessa forma, considera-se que mesmo que haja o surgimento de uma camada de leveduras mais ativas nesta camada em contato com o líquido, como proposto por Brányik et al. (2004), o gradiente de substrato formado no interior do suporte ImoYeast não foi severo o suficiente para impedir o crescimento das leveduras localizadas ao centro da partícula.

Figura 40 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do suporte ImoYeast ao longo de fermentações realizadas com a linhagem SY025

Fonte: micrografias realizadas pelo professor Dr. Marcel Lyra, do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Amostras de diferentes tempos de fermentação, em que $t_0 = 0$ h; $t_3 = 68$ h; e $t_5 = 116$ h.

Figura 41 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do suporte ImoYeast ao longo de fermentações realizadas com a linhagem SY067

Fonte: micrografias realizadas pelo professor Dr. Marcel Lyra, do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Amostras de diferentes tempos de fermentação, em que $t_0 = 0$ h; $t_3 = 69,5$ h; e $t_5 = 117,5$ h.

As micrografias retratam a interação das células umas com as outras e com os poros internos do sólido, indicando um crescimento em formato de colônias adsorvidas às paredes do suporte. Estes resultados corroboram a afirmação de Honigberg (2011), com relação à formação de estruturas tridimensionais de comunidades microbianas por meio da expressão de floculinas.

Observou-se, entretanto, que não existe um padrão facilmente reconhecível de crescimento da biomassa no interior do sólido, ou seja, mesmo tendo colonizado toda a extensão do suporte, as células se desenvolveram de maneira heterogênea em seu interior, tópico que requer estudos mais complexos, pois necessita de uma abordagem diferente da utilizada neste trabalho (WALSH; MALONE, 1995).

De maneira geral, as micrografias evidenciam que a produção do suporte ImoYeast é um processo devidamente padronizado, uma vez que de fato é um suporte poroso e mecanicamente estável. Sua aplicação na produção de cerveja é promissora, uma vez que embora haja o desprendimento de leveduras durante a fermentação, é possível evidenciar a presença de uma fração de biomassa metabolicamente ativa no interior do suporte. Assim, cervejarias artesanais podem se beneficiar da redução de custos nos processos de separação de células do produto final, pois o fato de uma parcela permanecer retida no sólido facilita a condução desta operação unitária.

5.4 VARIAÇÃO DE X_0 E S_0

As Figuras 42 a 46, apresentam as análises de quantificação realizadas para os compostos 1-propanol, 2-metil propanol, 3-metil butanol, acetato de etila e acetaldeído, respectivamente, nas fermentações com a linhagem SY025 em que se variaram as concentrações iniciais de biomassa e substrato, conforme planejamento experimental composto central.

A variável significativa no modelo estatístico gerado para 1-propanol é o termo linear da concentração inicial de substrato (S_0), com um efeito padronizado de 8,34. Os dados experimentais ajustaram ao modelo com um resíduo de 38,22. No caso do 2-metil propanol, houve três variáveis com efeitos significativos: os termos linear e quadrático de S_0 (9,67 e 3,1, respectivamente) e o termo quadrático da concentração inicial de biomassa (X_0) (5,21). O resíduo do modelo estatístico foi de 2,79.

Para o 3-metil butanol, a variável com efeito significativo foi o termo linear de S_0 (10,42), com resíduo de 109,33. No caso do acetato de etila, destacaram-se os termos linear e quadrático de S_0 (16,22 e 6,23, respectivamente) e o termo quadrático de X_0 (2,93), com resíduo igual a 2,41. Por fim, no caso do acetaldeído, as variáveis significativas foram os termos linear de S_0 (6,64) e quadrático de X_0 (2,71), com o resíduo do modelo estatístico sendo 77,84.

Figura 42 – Análise estatística para 1-propanol

Fonte: O autor.

Figura 43 – Análise estatística para isobutanol (2-metil propanol)

Fonte: O autor.

Figura 44 – Análise estatística para álcool isoamílico (3-metil butanol)

Fonte: O autor.

Figura 45 – Análise estatística para acetato de etila

Fonte: O autor.

Figura 46 – Análise estatística para acetaldeído

Fonte: O autor.

A Figura 47 apresenta as concentrações de compostos de *flavour* obtidas nas fermentações realizadas com variação de S_0 e X_0 , em comparação com os valores de limite sensorial para cada composto, segundo Olaniran et al. (2017).

Figura 47 – Concentrações de compostos *flavour* comparadas aos limites sensoriais

Fonte: O autor. Concentrações de compostos de *flavour* nas fermentações realizadas com variação de S_0 e X_0 . O limite sensorial é definido como a concentração mínima de um composto presente na cerveja a partir da qual seu aroma e sabor são alterados de maneira significativa (ENGAN, 1971).

Nos casos da formação de 1-propanol e 2-metil propanol (isobutanol), nenhuma das alterações experimentais resultou em concentrações acima do limite sensorial

(800 mg/L e 200 mg/L, respectivamente). Estes resultados indicam que a imobilização das leveduras estudadas, embora resulte em alterações fisiológicas quando comparadas às células livres (item 5.2.2), não extrapolam os limites de qualidade do produto final, considerando estes compostos.

Por outro lado, todas as condições experimentais apresentaram concentrações acima do limite sensorial de 25 mg/L para acetaldeído. Este ainda é um desafio para o sistema imobilizado, e futuros estudos devem ser conduzidos para investigar estratégias de redução da formação excessiva deste composto.

No caso do 3-metil butanol (álcool isoamílico), apenas as condições experimentais E1, E2 e E8 apresentaram concentrações abaixo do limite sensorial (70 mg/L). Isto é representado no modelo estatístico, uma vez que estas condições possuem os menores valores de S_0 avaliados. Ou seja, uma vez que a formação de álcool isoamílico é diretamente proporcional à concentração inicial de substrato, nos casos em que esta concentração foi menor, a produção deste álcool superior também foi reduzida e, portanto, não ultrapassou o limite sensorial. Estes resultados são uma base para futuras aplicações, possibilitando o direcionamento para maior ou menor formação de álcool isoamílico.

Por fim, apenas os experimentos E3 e E7 apresentaram concentrações de acetato de etila maiores que o limite sensorial de 30 mg/L. Como descrito pelo modelo estatístico, os resultados indicam que as condições experimentais com maiores concentrações de substrato e biomassa iniciais resultam na maior formação de acetato de etila com a linhagem SY025 imobilizada.

Assim, estes dados podem ser usados para aplicação na produção de cervejas com leveduras imobilizadas, visando a obtenção de perfis sensoriais e estilos de cerveja não convencionais. Aplicando as concentrações iniciais de substrato e/ou de biomassa estudadas neste trabalho, pode-se modular a formação de um ou outro composto aromático, em futuras fermentações com células imobilizadas no suporte ImoYeast.

6 CONCLUSÕES

- O processo de imobilização no suporte ImoYeast resultou em partículas com umidade média de $73,0 \% \pm 1,6$, indicando que o microambiente ao qual as leveduras estão expostas, apresenta redução na atividade de água;
- A eficiência de imobilização (EI) obtida com o método de imobilização direta (Teste 1) foi de $2,06 \% \pm 0,28$, muito abaixo do critério da empresa Bio4 Soluções Biotecnológicas Ltda para comercialização do produto (EI = 70 %);
- Dos quatro métodos de imobilização testados para aumentar a EI (Teste 2), o método C (infiltrado + revestimento 30 min) foi o escolhido como protocolo padrão de imobilização de leveduras no suporte ImoYeast, uma vez que ao fim da fermentação de teste, EI foi igual a 85 % para a linhagem SY025;
- Para as três linhagens estudadas (SY025, SY067 e SY001), a imobilização no suporte ImoYeast estimulou o crescimento microbiano, considerando o parâmetro Y_{XS} . No caso da linhagem SY025 imobilizada, o rendimento de biomassa total (fixas no suporte mais desprendidas para o meio) foi 67 % maior que o valor do rendimento de células em suspensão. De forma semelhante, os valores de Y_{XS} dos sistemas imobilizados (considerando a biomassa total no sistema) em comparação com as leveduras livres, para as linhagens SY067 e SY001 foram 78 % e 56 % maiores, respectivamente;
- As linhagens SY025 e SY001 atenderam ao critério de EI estabelecido (70 %), sendo que ao final das fermentações seus valores foram, respectivamente, 70 % e 90 %. A cepa SY067 apresentou EI = 60 %;
- Em todos os sistemas de imobilização estudados houve maior produção de glicerol e menor formação de etanol, quando comparados aos sistemas com leveduras livres, considerando os parâmetros fisiológicos Y_{PSet} e Y_{PSgly} . Os resultados indicam que, para a linhagem SY025, as leveduras em suspensão

apresentaram rendimento de etanol 9 % maior que o valor obtido pelas imobilizadas. Para as linhagens SY067 e SY001 livres, os valores de rendimento de etanol foram superiores aos sistemas imobilizados, na ordem de 9 % e 13 %, respectivamente. Considerando o glicerol, SY025 imobilizadas apresentaram fator de conversão 40 % maior que o valor obtido com as livres, enquanto que para SY067 e SY001 imobilizadas, os valores foram 53 % e 19 % maiores, respectivamente, quando comparados às células em suspensão;

- A variação da densidade do meio de fermentação, nos três estilos de cerveja estudados, foi similar tanto para leveduras livres quanto imobilizadas (todas seguiram a tendência de densidade inicial 1,06 g/mL e densidade final 1,01 g/mL);
- Houve alterações nos perfis sensoriais obtidos pelas leveduras imobilizadas, comparadas às livres, como descrito a seguir;
- Alterações na produção de compostos de *flavour* nas leveduras SY025 imobilizadas, quando comparadas às livres: aumento de 1-propanol ($43,85 \pm 1,41$ mg/L imobilizadas e $32,87 \pm 2,27$ mg/L livres), acetato de etila ($21,86 \pm 1,51$ mg/L imobilizadas e $11,75 \pm 1,21$ mg/L livres) e acetaldeído ($71,20 \pm 20,36$ g/mL imobilizadas e $65,74 \pm 9,86$ g/mL livres); e redução de 2-metil propanol ($32,67 \pm 1,32$ mg/L imobilizadas e $34,67 \pm 2,35$ mg/L livres) e 3-metil butanol ($77,92 \pm 2,46$ mg/L imobilizadas e $93,28 \pm 6,45$ mg/L livres);
- Perfil sensorial das leveduras imobilizadas SY067, comparadas às livres: aumento de 2-metil propanol ($21,57 \pm 1,96$ mg/L imobilizadas e $17,47 \pm 0,92$ mg/L livres), 3-metil butanol ($104,78 \pm 10,36$ mg/L imobilizadas e $86,96 \pm 5,10$ mg/L livres) e aceto de etila ($23,87 \pm 2,79$ mg/L imobilizadas e $19,75 \pm 1,88$ mg/L livres); e redução de 1-propanol ($22,97 \pm 2,15$ mg/L imobilizadas e $28,45 \pm 0,72$ mg/L livres) e acetaldeído ($57,9 \pm 18,11$ mg/L imobilizadas e $478,52 \pm 53,97$ mg/L livres);

- Produção de compostos *flavour* pela cepa SY001, comparação de imobilizadas e livres: aumento de 1-propanol ($22,69 \pm 1,57$ mg/L imobilizadas e $16,83 \pm 1,33$ mg/L livres), 2-metil propanol ($21,01 \pm 1,88$ mg/L imobilizadas e $18,54 \pm 1,72$ mg/L livres), 3-metil butanol ($50,59 \pm 5,08$ mg/L imobilizadas e $41,75 \pm 5,05$ mg/L livres) e acetato de etila ($5,92 \pm 0,38$ mg/L imobilizadas e $3,37 \pm 0,57$ mg/L livres); redução de acetaldeído ($22,28 \pm 3,04$ mg/L imobilizadas e $77,89 \pm 8,78$ mg/L livres);
- Os modelos cinéticos de Monod (limitação por substrato) e Hinshelwood (inibição por produto) descrevem satisfatoriamente as fermentações realizadas, tanto com leveduras livres quanto imobilizadas. Portanto, para redução da complexidade matemática, optou-se por conduzir as investigações com a cinética de Monod;
- Para a cepa SY025, a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) estimada das leveduras livres foi de $0,13 \text{ h}^{-1}$, enquanto que para as imobilizadas foi de $0,73 \text{ h}^{-1}$. No caso da linhagem SY067, verificou-se uma redução de $\mu_{\text{máx}}$ de $0,14 \text{ h}^{-1}$ (livres) para $0,093 \text{ h}^{-1}$ (imobilizadas). Por fim, os valores estimados de $\mu_{\text{máx}}$ para as leveduras SY001 livres e imobilizadas, foram $0,08 \text{ h}^{-1}$ e $0,47 \text{ h}^{-1}$, respectivamente;
- A modelagem da difusão de substrato no interior do suporte ImoYeast revelou que existe um gradiente de concentração de substrato total ao longo da partícula, e que as limitações de transferência de massa estão presentes nos sistemas com as três linhagens imobilizadas. Para a linhagem SY025, em 116 h de fermentação, o modelo estimou a disponibilidade de 60 % da concentração de substrato no centro da partícula ImoYeast, em comparação ao total encontrado na interface da superfície e do meio líquido. No caso da linhagem SY067, em 117,5 h o valor estimado foi de 70 %. E para a SY001, 95 % em 118 h de fermentação;

- Os valores de ϕ em t_5 (aproximadamente 117 h), para cada cepa, foram: $\phi_{SY025, t_5} = 1,8$; $\phi_{SY067, t_5} = 1,5$; e $\phi_{SY001, t_5} = 0,74$, indicando a presença, ainda que não muito severa, de limitações por transferência de massa de substrato;
- O fator de efetividade (η) do suporte ImoYeast não foi afetado de forma significativa, uma vez que $\eta_{SY025, t_5} = 0,834$; $\eta_{SY067, t_5} = 0,88$; e $\eta_{SY001, t_5} = 0,969$ ao fim das fermentações;
- A microscopia eletrônica de varredura (MEV) das leveduras imobilizadas no suporte ImoYeast confirmou os resultados do modelo de reação-difusão (de que há disponibilidade de substrato ao centro da partícula), uma vez que é possível observar crescimento de leveduras tanto no centro quanto na superfície das esferas;
- Por meio da microscopia, foi possível observar a formação de comunidades microbianas em estruturas tridimensionais, colonizando os poros do suporte ImoYeast;
- Os experimentos realizados em planejamento composto central resultaram em modelos estatísticos que descrevem de forma satisfatória a interação entre as variáveis concentração inicial de substrato (S_0) e de biomassa (X_0), na formação de compostos de *flavour*;
- Os resultados obtidos no planejamento composto central são úteis para o direcionamento de futuras aplicações na produção de cervejas com diferentes estilos e perfis sensoriais, utilizando-se a linhagem SY025, uma vez que fornecem dados para tendências de minimização e maximização da concentração dos compostos estudados;
- Considera-se o suporte ImoYeast uma alternativa promissora na fabricação de produtos com alto potencial de comercialização. Neste caso, as alterações fisiológicas das leveduras imobilizadas ainda carecem de explicação completa

(como a descrição fenomenológica da interação entre a parede celular e o suporte sólido, por exemplo), mas os resultados aqui obtidos contribuem tanto para a aplicação desta tecnologia na indústria cervejeira artesanal, quanto para as complexas questões acadêmicas que permeiam a imobilização de leveduras na produção de cerveja;

- Para o futuro, propõe-se que a imobilização de leveduras no suporte ImoYeast seja estudada no âmbito da reutilização das células imobilizadas, o que além das intrigantes questões fisiológicas associadas ao reciclo, apresenta vantagens operacionais importantes para condução de um processo de fermentação de cerveja com número de etapas e custos reduzidos.

REFERÊNCIAS¹

- ALMONACID, S. F. et al. A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 750–758, 2012.
- AXELSSON, A.; PERSSON, B. Determination of effective diffusion coefficients in calcium alginate gel plates with varying yeast cell content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 231–250, 1988.
- BAKER, D. A.; KIRSOP, B. H. Rapid beer production and conditioning using a plug fermentor. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, p. 487–494, 1973.
- BAMFORTH, C. W. **Brewing New Technologies**. Woodhead Publishing Limited, 2006.
- BAMFORTH, C. W. Progress in brewing science and beer production. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 8, p. 161–176, 2017.
- BARATI, R. Parameter estimation of nonlinear muskingum models using Nelder-Mead simplex algorithm. **Journal of Hydrologic Engineering**, v. 16, n. 11, p. 946–954, 2011.
- BEZBRADICA, D. et al. Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1348–1351, 2007.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. E. **Brewing Yeast and Fermentation**. 1. ed. Blackwell Science Ltd, 2001.
- BRÁNYIK, T. et al. Growth model and metabolic activity of brewing yeast biofilm on the surface of spent grains: a biocatalyst for continuous beer fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1733–1740, 2004.
- BRÁNYIK, T. et al. Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 653–663, 2005.
- BRÁNYIK, T. et al. Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 1010–1018, 2006.
- BRÁNYIK, T. et al. A review of flavour formation in continuous beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 1, p. 3–13, 2008.
- DE ANDRÉS-TORO, B. et al. A kinetic model for beer production under industrial operational conditions. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 48, n. 1, p. 65–74, 1998.
- DJORDJEVIĆ, V. et al. **Fungal Metabolites - Immobilized Yeast Cells and**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Secondary Metabolites. 2016.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles.** 2. ed. Academic Press, 2013.

DORAN, P. M.; BAILEY, J. E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 1, p. 73–87, 1986.

DUNN, I. J. et al. **Biological Reaction Engineering.** 2. ed. Wiley-VCH, 2003.

DZIALO, M. C. et al. Physiology , ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 95–128, 2017.

ENGAN, S. Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 78, n. 1, p. 33–36, 1971.

ENGASSER, J.-M.; HORVATH, C. Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems : evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity. **Journal of Theoretical Biology**, v. 42, n. 1, p. 137–155, 1973.

GALAZZO, J. L.; BAILEY, J. E. Fermentation pathway kinetics and metabolic fluxes control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 3, p. 162–172, 1990.

GEE, D. A.; RAMIREZ, W. F. A flavour model for beer fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, n. 5, p. 321–329, 1994.

GOLMAN, B. **Chemical Reaction Engineering with IPython: Part I - Transport Processes and Reaction in Porous Pellets.** 1. ed. Book Boon, 2016.

GURAZI, V. et al. Impact of three different immobilization techniques on batch fermentation performance and substrate inhibition. **International Journal of Crop Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2017.

HAZELWOOD, L. A. et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production : a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2259–2266, 2008.

HONIGBERG, S. M. Cell signals , cell contacts , and the organization of yeast communities. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 4, p. 466–473, 2011.

JOHANSEN, A.; FLINK, J. M. Influence of alginate properties and gel reinforcement on fermentation characteristics of immobilized yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 12, p. 737–748, 1986.

JUNCA, H. V.; DE ARAUJO, T. M. **Dimensionamento e Modelagem de um Sistema de Leito Fluidizado para a Produção de Esferas Utilizadas na Imobilização de Leveduras**, 2017.

KARABÍN, M. et al. Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology**

Advances, v. 36, n. 3, p. 691–706, 2018.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, n. 8, p. 1321–1354, 1985.

KEENER, J.; SNEYD, J. **Mathematical Physiology I: Cellular Physiology**. 2. ed. Springer, 2009. v. 46

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 317–323, 2008.

KOSSEVA, M. R. Immobilization of microbial cells in food fermentation processes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1089–1118, 2011.

KOSTOV, G. et al. Modeling of batch alcohol fermentation with free and immobilized yeasts *Saccharomyces cerevisiae* 46 EVD. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 3, p. 3021–3030, 2012.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production : a review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

KREGIEL, D.; BERLOWSKA, J.; AMBROZIAK, W. Adhesion of yeast cells to different porous supports, stability of cell-carrier systems and formation of volatile by-products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 3399–3408, 2012.

LACA, A.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Analysis and description of the evolution of alginate immobilised cells systems. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 203–215, 2000.

LOVISO, C. L.; LIBKIND, D. Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza : ésteres. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 4, p. 436–446, 2018.

MAINARDI, J. C.; REZWAN, K.; MAAS, M. Embedding live bacteria in porous hydrogel / ceramic nanocomposites for bioprocessing applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 7, p. 1215–1224, 2019.

MASSCHELEIN, C. A.; RYDER, D. S.; SIMON, J.-P. Immobilized cell technology in beer production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 155–177, 1994.

MENSOUR, N. A. et al. Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. **Progress in Biotechnology**, v. 11, p. 661–671, 1996.

MENSOUR, N. A. et al. New developments in the brewing industry using immobilised yeast cell bioreactor systems. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 103, n. 6, p. 363–370, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).
Anuário da cerveja: 2019, 2020.

MORENO-GARCÍA, J. et al. Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: actual trends and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

MORGAN, D. R.; LANE, E. T.; STYLES, D. Crafty marketing: an evaluation of distinctive criteria for “craft” beer. **Food Reviews International**, p. 1–17, 2020.

NAYDENOVA, V. et al. Encapsulation of brewing yeast in alginate / chitosan matrix: comparative study of beer fermentation with immobilized and free cells. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 19, n. 2, p. 123–127, 2013.

NEDOVIĆ, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NEDOVIĆ, V. et al. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 173–216, 2015.

NEDOVIĆ, V. A.; WILLAERT, R. G. **Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology**. 1. ed. Kluwer Academic Publishers, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5. ed. W. H. Freeman and Company, 2008.

NORTON, S.; D'AMORE, T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 5, p. 365–375, 1994.

OLANIRAN, A. O. et al. Flavour-active volatile compounds in beer: production , regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13–23, 2017.

PARCUNEV, I. et al. **Modeling of Alcohol Fermentation in Brewing - some Practical Approaches**. Proceedings 26th European Conference on Modelling and Simulation. 2012.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, n. 17, p. 1–6, 2014.

PILKINGTON, P. H. et al. Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, n. 1, p. 19–31, 1998.

PIRES, E. J. et al. Yeast : the soul of beer's aroma — a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937–1949, 2014.

POLAKOVIČ, M. et al. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 5, p. 667–683, 2017.

PROCOPIO, S.; QIAN, F.; BECKER, T. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 5, p. 721–729, 2011.

RADOVICH, J. M. Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 1, p. 2–10, 1985.

RODMAN, A. D.; GEROGIORGIS, D. I. Dynamic simulation and visualisation of fermentation: effect of process conditions on beer quality. **IFAC-PapersOnLine**, v. 49, n. 7, p. 615–620, 2016.

ROUF, A.; KANOJIA, V.; NAIK, H. R. Cell immobilization: an overview on techniques and its applications in food industry. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 6, p. 1817–1824, 2017.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia Industrial, Vol. 2**. 1. ed. Editora Edgard Blücher Ltda., 2001.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2. ed. Prentice Hall, 2002.

ŠMOGROVIČOVÁ, D.; DÖMÉNY, Z. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 785–794, 1999.

STEWART, G. G. The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations. **Fermentation**, v. 3, n. 4, 2017.

TANAKA, H.; IRIE, S.; OCHI, H. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 3, p. 216–219, 1989.

THIELE, E. W. Relation between catalytic activity and size of particle. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 916–920, 1939.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 3–4, p. 199–224, 1986.

VAN IERSEL, M. F. M. et al. Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 8, p. 602–607, 2000.

VASSILEV, S. et al. **Modeling of alcohol fermentation in brewing – comparative assessment of flavor profile of beers produced with free and immobilized cells**. Proceedings 27th European Conference on Modelling and Simulation. 2014.

VERBELEN, P. J. et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1515–1525, 2006.

VIRKAJÄRVI, I. **Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast**. 2001.

VIRKAJÄRVI, I. et al. Productivity of immobilized yeast reactors with very-high-gravity worts. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 60, n. 4, p. 188–197, 2002.

VIRKAJARVI, L.; POHJALA, N. Primary fermentation with immobilized yeast: some effects of carrier materials on the flavour of the beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 5, p. 311–318, 2000.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. 1. ed. v. 1. John Wiley & Sons, 1998.

WALSH, P. K.; MALONE, D. M. Cell growth patterns in immobilization matrices. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 94, p. 13–43, 1995.

WEISZ, P. B. Diffusion and chemical transformation. **Science**, v. 179, n. 4072, p. 433–440, 1973.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast - The Practical Guide to Beer Fermentation**. 1. ed. Brewers Publications, 2010.

WILLAERT, R.; NEDOVIĆ, V. A. Primary beer fermentation by immobilised yeast – a review on flavour formation and control strategies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 8, p. 1353–1367, 2006.

YAMAUCHI, Y. et al. Beer brewing using an immobilized yeast bioreactor design of an immobilized yeast bioreactor for rapid beer brewing system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 443–449, 1994.

YAMAUCHI, Y. et al. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor . 1 . Heat conversion of α -acetolactate. **Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 101–108, 1995a.

YAMAUCHI, Y. et al. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor . 2 . Balance of total diacetyl reduction and regeneration. **Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 109–116, 1995b.

YIN, H. et al. Intracellular metabolite profiling of industrial yeast and the synthesis of flavour compounds in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 328–336, 2017.

APÊNDICE A – Análise estatística da eficiência de imobilização (EI)

Para os quatro tratamentos estudados, criou-se a Tabela A1, onde os valores das colunas representam as eficiências de imobilização obtidas em cada replicata.

Tabela A1 – Resultados dos tratamentos

	A	B	C	D
	45,27	60,86	84,92	90,55
	57,51	68,57	66,97	68,27
	48,26	68,33	78,68	72,51
$\hat{y}$	50,35	65,92	76,86	77,11
M	67,56	67,56	67,56	67,56
d	-17,21	-1,64	9,30	9,55

Fonte: O autor. Resultados de eficiência de imobilização (EI) obtidos pelos diferentes métodos de imobilização (tratamentos). Onde: A = revestimento; B = infiltrado; C = infiltrado + revestimento (30 min); D = infiltrado + revestimento (*overnight*); $\hat{y}$ = média dos tratamentos; M = grande média; e d = diferença entre a grande média e a média dos tratamentos ($M - \hat{y}$).

Então, seguiu-se com o cálculo das somas dos quadrados dos vetores, como apresentado na Tabela A2.

Tabela A2 – Cálculo da soma de quadrados

Y				D = Y - M				T				R			
45,27	60,86	84,92	90,55	-22,29	-6,70	17,36	22,99	-17,21	-1,64	9,30	9,55	-5,08	-5,06	8,06	13,44
57,51	68,57	66,97	68,27	-10,05	1,01	-0,59	0,71	-17,21	-1,64	9,30	9,55	+ 7,17	2,65	-9,88	-8,84
48,26	68,33	78,68	72,51	-19,30	0,77	11,12	4,95	-17,21	-1,64	9,30	9,55	-2,08	2,41	1,82	-4,60
SQ				1995,97				1430,03				565,94			
								=				+			
GL				11				3				8			

Fonte: O autor. Obtenção da soma de quadrados das variáveis no modelo estatístico. Onde: Y = matriz de valores amostrais; D = diferença entre a matriz de valores amostrais (Y) e o vetor contendo o valor da grande média (M); T = matriz de diferenças nos tratamentos, calculado pela diferença entre o vetor de médias dos tratamentos ($\hat{y}$) e o vetor de grande média (M); R = matriz de resíduos; SQ = soma dos quadrados; e GL = graus de liberdade.

Calculados os valores das somas dos quadrados, a tabela ANOVA foi construída (Tabela A3).

Tabela A3 – Tabela ANOVA One-way

Fonte de variação	Soma de quadrados		Graus de liberdade		Média dos desvios quadrados (variância)		Estatística F (distribuição F _{3,8})	Valor p
Entre tratamentos	sT	1430,03	vT	3	mT	476,68	6,74	A probabilidade de $F_{3,8} \geq 6,74$ está entre 5 % e 1 %
Dentro dos tratamentos	sR	565,94	vR	8	mR	70,74		
Total em torno da grande média	sD	1995,97	vD	11				

Fonte: O autor.

Para a análise estatística, assumiram-se as seguintes hipóteses, considerando um nível de significância $\alpha = 0,05$:

- H_0 : as médias são estatisticamente iguais;
- H_1 : pelo menos uma média é estatisticamente diferente.

Uma vez que a estatística F está na região de rejeição ($F(5\%), 3;8 = 4,07$), a hipótese nula H_0 é rejeitada.

Assim, prosseguiu-se com a aplicação do teste de Tukey, para identificação de qual das médias é significativamente distinta. Utilizou-se a tabela para o teste de Tukey considerando $\alpha = 0,05$, quatro tratamentos ($k = 4$) e 8 graus de liberdade ($vR = 8$). Então, $q(5\%), 4; 8 = 4,53$. Calculou-se a diferença mínima significativa (DMS) pela Equação A1.

$$DMS = q \sqrt{\frac{mR}{\text{número de repetições}}} \quad (A1)$$

Utilizando-se o valor resultante da diferença mínima significativa ($DMS = 22$) e o critério apresentado na Equação A2, as diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas, conforme apresentado na Tabela A4.

$$\text{Se } |\hat{y}_1 - \hat{y}_2| \geq DMS, \text{ então } \hat{y}_1 \text{ e } \hat{y}_2 \text{ são estatisticamente diferentes} \quad (A2)$$

Tabela A4 – Resultados do teste de Tukey

Comparações	Diferenças das Médias	DMS	Conclusão
$\hat{y}_a - \hat{y}_b$	15,57	22	Iguais
$\hat{y}_a - \hat{y}_c$	26,51		Diferentes
$\hat{y}_a - \hat{y}_d$	26,77		Diferentes
$\hat{y}_b - \hat{y}_c$	10,94		Iguais
$\hat{y}_b - \hat{y}_d$	11,19		Iguais
$\hat{y}_c - \hat{y}_d$	0,25		Iguais

Fonte: O autor.

APÊNDICE B – Correlações experimentais entre contagem em câmara de Neubauer (número de células) e concentração de biomassa (g/L)

APÊNDICE C – Modelagem da cinética de fermentação (estimação de parâmetros)

Os programas aqui descritos foram modificados com base no algoritmo desenvolvido pelo colega de mestrado Matheus Neves.

C1. Cinética de Monod – Livres (exemplo linhagem SY025)

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
```

Created on Tue Apr 21 15:12:41 2020

Fermentation kinetics mathematical modelling
Master's research "immobilised yeast physiology in brewing fermentation" - USP

Thiago Machado de Araujo
"""

Kinetic Model - Fermentation Kinetics SY025 - Free Cells

```
import pandas as pd
from scipy.integrate import odeint
from scipy.optimize import minimize
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
def mass(MASSA_DATA_FREE_SY025,time,mimax,ksx,yxs,ypx_et,ypx_glycerol):
    X,S,Pet,Pglycerol = MASSA_DATA_FREE_SY025
```

PARAMETERS (experimentally calculated)

```
# yxs = 0.015
# ypx_et = 23.81
# ypx_glycerol = 0.74
# yps_et = 0.509
# yps_glycerol = 0.015
```

KINETIC EQUATIONS

```
mi = (mimax*S)/(ksx + S)    # Monod expression
qs = mi/yxs                 # Specific substrate consumption incorporating cell
growth and prodcut formation
qp_et = mi*ypx_et           # Specfic product formation considering products
associated to energy metabolism
qp_glycerol = mi*ypx_glycerol
```

NONLINEAR MASS BALANCES

```
dXdt = mi*X
dSdt = qs*X
dPetdt = (qp_et)*X
dPglyceroldt = (qp_glycerol)*X
    return [dXdt,
            - dSdt,
```

```

        dPetdt,
        dPglyceroldt]

# ERROR BETWEEN PREDICTED AND EXPERIMENTAL VALUES
def par_est(par):
    mimax,ksx,yxs,ypx_et,ypx_glycerol = par

    sol = odeint(mass,y0,t_int, args = (mimax,ksx,yxs,ypx_et,ypx_glycerol))
    x_sim = sol[:,0]
    s_sim = sol[:,1]
    pet_sim = sol[:,2]
    pglycerol_sim = sol[:,3]

    erro = 0.0
    for i in range(len(tempo)):
        erro += (x_sim[i] - x_real[i])**2 + (s_sim[i] - s_real[i])**2 + (pet_sim[i] -
pet_real[i])**2 + (pglycerol_sim[i] - pglycerol_real[i])**2

    print ('resíduo = ', erro)
    return erro

# DATA IMPORTATION
df = pd.read_csv('MASSA_DATA_FREE_SY025.csv')
tempo = df.iloc[:,0].values
x_real = df.iloc[:,1].values
s_real = df.iloc[:,2].values
pet_real = df.iloc[:,3].values
pglycerol_real = df.iloc[:,4].values

# INITIAL CONDITIONS (X0, S0, P0et and P0glycerol)
y0 = [0.09,22.27,0.07,0.08]

# INTEGRATION TIMES FOR MASS BALANCES SOLUTION (experimental times)
t_int = [0.0,20.0,44.0,68.0,92.0,116.0]

# INITIAL PARAMETERS GUESS
# mimax, ksx, yxs, ypx_et, ypx_glycerol
x0 = [0.15, 250.0, 0.015, 23.81, 0.74]

# OPTIMIZATION PROBLEM SOLUTION
sol = minimize(par_est,x0,method='Nelder-Mead')

# SIMULATED RESULTS WITH OPTIMISED PARAMETERS
mimax = sol.x[0]
ksx = sol.x[1]
yxs = sol.x[2]
ypx_et = sol.x[3]
ypx_glycerol = sol.x[4]

previsao = odeint(mass,y0,t_int, args = (mimax,ksx,yxs,ypx_et,ypx_glycerol))

```



```

x_predito = previsao[:,0]
s_predito = previsao[:,1]
pet_predito = previsao[:,2]
pglycerol_predito = previsao[:,3]

print('mimax = ', mimax)
print('ksx = ', ksx)
print('aimed 0.015 yxs = ', yxs)
print('aimed 23.81 ypx_et = ', ypx_et)
print('aimed 0.74 ypx_glycerol = ', ypx_glycerol)

# EXPERIMENTAL DATA AND PREDICTED VALUES COMPARISON
plt.rcParams.update({'font.size':20})

fig, x = plt.subplots()
x.plot(tempo,x_real,'sk',tempo,x_predito,'k-', label = 'X', linewidth=2, markersize=15)
x.set_xlabel('Tempo (h)')
x.set_ylabel('Massa de biomassa (g)')
plt.show()

fig, s = plt.subplots()
s.plot(tempo,s_real,'ok',tempo,s_predito,'k-', label = 'S', linewidth=2, markersize=15)
s.set_xlabel('Tempo (h)')
s.set_ylabel('Massa de substrato (g)')
plt.show()

fig, pet = plt.subplots()
pet.plot(tempo,pet_real,'^k',tempo,pet_predito,'k-', label = 'Pet', linewidth=2,
markersize=15)
pet.set_xlabel('Tempo (h)')
pet.set_ylabel('Massa de etanol (g)')
plt.show()

fig, pglycerol = plt.subplots()
pglycerol.plot(tempo,pglycerol_real,'vk',tempo,pglycerol_predito,'k-', label =
'Pglycerol', linewidth=2, markersize=15)
pglycerol.set_xlabel('Tempo (h)')
pglycerol.set_ylabel('Massa de glicerol (g)')
plt.show()

```

C2. Cinética de Hinshelwood – Livres (exemplo linhagem SY025)

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
```

```
Created on Tue May 12 14:33:07 2020
```

```
Fermentation kinetics mathematical modelling
```

```
Master's research "immobilised yeast physiology in brewing fermentation" - USP
```

```
Thiago Machado de Araujo
```

```
"""
```

```
# Kinetic Model - Fermentation Kinetics SY025 - Free Cells
```

```
import pandas as pd
```

```
from scipy.integrate import odeint
```

```
from scipy.optimize import minimize
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
def
```

```
mass(MASSA_DATA_FREE_SY025,time,mimax,ksx,yxs,ypx_glycerol,kpx,qpmax,ks
p,kpp):
```

```
    X,S,Pet,Pglycerol = MASSA_DATA_FREE_SY025
```

```
    # PARAMETERS (experimentally calculated)
```

```
    # yxs = 0.015
```

```
    # ypx_et = 23.81
```

```
    # ypx_glycerol = 0.74
```

```
    # yps_et = 0.509
```

```
    # yps_glycerol = 0.015
```

```
    # KINETIC EQUATIONS
```

```
    mi = ((mimax*S)/(ksx + S))*(1-kpx*Pet)    # Hinshelwood expression
```

```
    qs = mi/yxs                                # Specific substrate consumption rate
```

```
    incorporating cell growth and prodcut formation
```

```
    qp_et = ((qpmax*S)/(ksp + S))*(1-kpp*Pet) # Specific product formation rate
```

```
    considering products associated to energy metabolism
```

```
    qp_glycerol = mi*ypx_glycerol
```

```
    # NONLINEAR MASS BALANCES
```

```
    dXdt = mi*X
```

```
    dSdt = qs*X
```

```
    dPetdt = (qp_et)*X
```

```
    dPglyceroldt = (qp_glycerol)*X
```

```
    return [dXdt,
```

```
            - dSdt,
```

```
            dPetdt,
```

```
            dPglyceroldt]
```

```
# ERROR BETWEEN PREDICTED AND EXPERIMENTAL VALUES
```

```

def par_est(par):
    mimax,ksx,yxs,ypx_glycerol,kpx,qpmax,ksp,kpp = par

    sol = odeint(mass,y0,t_int, args =
(mimax,ksx,yxs,ypx_glycerol,kpx,qpmax,ksp,kpp))
    x_sim = sol[:,0]
    s_sim = sol[:,1]
    pet_sim = sol[:,2]
    pglycerol_sim = sol[:,3]

    erro = 0.0
    for i in range(len(tempo)):
        erro += (x_sim[i] - x_real[i])**2 + (s_sim[i] - s_real[i])**2 + (pet_sim[i] -
pet_real[i])**2 + (pglycerol_sim[i] - pglycerol_real[i])**2

    print ('resíduo = ', erro)
    return erro

# DATA IMPORTATION
df = pd.read_csv('MASSA_DATA_FREE_SY025.csv')
tempo = df.iloc[:,0].values
x_real = df.iloc[:,1].values
s_real = df.iloc[:,2].values
pet_real = df.iloc[:,3].values
pglycerol_real = df.iloc[:,4].values

# INITIAL CONDITIONS (X0, S0, P0et and P0glycerol)
y0 = [0.09,22.27,0.07,0.08]

# INTEGRATION TIMES FOR MASS BALANCES SOLUTION (experimental times)
t_int = [0.0,20.0,44.0,68.0,92.0,116.0]

# INITIAL PARAMETERS GUESS
# mimax, ksx, yxs, ypx_glycerol, kpx, qpmax, ksp, kpp
x0 = [0.25, 500.0, 0.015, 0.74, 0.025, 0.7, 1.8, 0.1]

# OPTIMIZATION PROBLEM SOLUTION
sol = minimize(par_est,x0,method='Nelder-Mead')

# SIMULATED RESULTS WITH OPTIMISED PARAMETERS
mimax = sol.x[0]
ksx = sol.x[1]
yxs = sol.x[2]
ypx_glycerol = sol.x[3]
kpx = sol.x[4]
qpmax = sol.x[5]
ksp = sol.x[6]
kpp = sol.x[7]

```

```

previsao = odeint(mass,y0,t_int, args =
(mimax,ksx,yxs,ypx_glycerol,kpx,qpmax,ksp,kpp))
x_predito = previsao[:,0]
s_predito = previsao[:,1]
pet_predito = previsao[:,2]
pglycerol_predito = previsao[:,3]

print('mimax = ', mimax)
print('ksx = ', ksx)
print('aimed 0.015 yxs = ', yxs)
print('aimed 0.74 ypx_glycerol = ', ypx_glycerol)
print('kpx = ', kpx)
print('qpmax = ', qpmax)
print('ksp = ', ksp)
print('kpp = ', kpp)

# EXPERIMENTAL DATA AND PREDICTED VALUES COMPARISON
plt.rcParams.update({'font.size':20})

fig, x = plt.subplots()
x.plot(tempo,x_real,'sk',tempo,x_predito,'k-', label = 'X', linewidth=2, markersize=15)
x.set_xlabel('Tempo (h)')
x.set_ylabel('Massa de biomassa (g)')
plt.show()

fig, s = plt.subplots()
s.plot(tempo,s_real,'ok',tempo,s_predito,'k-', label = 'S', linewidth=2, markersize=15)
s.set_xlabel('Tempo (h)')
s.set_ylabel('Massa de substrato (g)')
plt.show()

fig, pet = plt.subplots()
pet.plot(tempo,pet_real,'^k',tempo,pet_predito,'k-', label = 'Pet', linewidth=2,
markersize=15)
pet.set_xlabel('Tempo (h)')
pet.set_ylabel('Massa de etanol (g)')
plt.show()

fig, pglycerol = plt.subplots()
pglycerol.plot(tempo,pglycerol_real,'vk',tempo,pglycerol_predito,'k-', label =
'Pglycerol', linewidth=2, markersize=15)
pglycerol.set_xlabel('Tempo (h)')
pglycerol.set_ylabel('Massa de glicerol (g)')
plt.show()

```

C3. Cinética de Monod – Imobilizadas (exemplo linhagem SY025)

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
```

```
Created on Wed May 13 14:47:38 2020
```

```
Fermentation kinetics mathematical modelling
```

```
Master's research "immobilised yeast physiology in brewing fermentation" - USP
```

```
Thiago Machado de Araujo
```

```
"""
```

```
# Kinetic Model - Fermentation Kinetics SY025 - Immobilised Cells
```

```
import pandas as pd
```

```
from scipy.integrate import odeint
```

```
from scipy.optimize import minimize
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
def
```

```
mass(MASSA_DATA_IM_SY025,time,mimax_im,ksx_im,yxs_im,ypx_et_im,ypx_glyc
erol_im,mimax_desp,ksx_desp,yxs_desp,ypx_et_desp,ypx_glycerol_desp,kmax,km):
```

```
    Xim,Xdesp,S,Pet,Pglycerol = MASSA_DATA_IM_SY025
```

```
    # PARAMETERS (experimentally calculated)
```

```
    # yxs_im = 0.016
```

```
    # ypx_et_im = 10.693
```

```
    # ypx_glycerol_im = 0.518
```

```
    # yxs_desp = 0.01
```

```
    # ypx_et_desp = 44.062
```

```
    # ypx_glycerol_desp = 1.979
```

```
    # yps_et = 0.464
```

```
    # yps_glycerol = 0.021
```

```
    # KINETIC EQUATIONS
```

```
    # Immobilised biomass
```

```
    mi_im = (mimax_im*S)/(ksx_im + S)    # Monod expression
```

```
    qs_im = mi_im/yxs_im                # Specific substrate consumption rate
```

```
    incorporating cell growth and prodcut formation
```

```
    qp_et_im = mi_im*ypx_et_im          # Specific product formation rate
```

```
    considering products associated to energy metabolism
```

```
    qp_glycerol_im = mi_im*ypx_glycerol_im
```

```
    # Detached biomass
```

```
    mi_desp = (mimax_desp*S)/(ksx_desp + S)
```

```
    qs_desp = mi_desp/yxs_desp
```

```
    qp_et_desp = mi_desp*ypx_et_desp
```

```
    qp_glycerol_desp = mi_desp*ypx_glycerol_desp
```

```
    k = (kmax*Xim)/(km + Xim)
```

```

# NONLINEAR MASS BALANCES
dXimdt = (mi_im*Xim) - (k*Xim)
dXdespdt = (mi_desp*Xdesp) + (k*Xim)
dSdt = (qs_im*Xim) + (qs_desp*Xdesp)
dPetdt = (qp_et_im*Xim) + (qp_et_desp*Xdesp)
dPglyceroldt = (qp_glycerol_im*Xim) + (qp_glycerol_desp*Xdesp)

return [dXimdt,
        dXdespdt,
        - dSdt,
        dPetdt,
        dPglyceroldt]

# ERROR BETWEEN PREDICTED AND EXPERIMENTAL VALUES
def par_est(par):

    mimax_im,ksx_im,yxs_im,ypx_et_im,ypx_glycerol_im,mimax_desp,ksx_desp,yxs_desp,ypx_et_desp,ypx_glycerol_desp,kmax,km = par

    sol = odeint(mass,y0,t_int, args =
(mimax_im,ksx_im,yxs_im,ypx_et_im,ypx_glycerol_im,mimax_desp,ksx_desp,yxs_desp,ypx_et_desp,ypx_glycerol_desp,kmax,km))

    xim_sim = sol[:,0]
    xdesp_sim = sol[:,1]
    s_sim = sol[:,2]
    pet_sim = sol[:,3]
    pglycerol_sim = sol[:,4]

    erro = 0.0
    for i in range(len(tempo)):
        erro += (xim_sim[i] - xim_real[i])**2 + (xdesp_sim[i] - xdesp_real[i])**2 + (s_sim[i] - s_real[i])**2 + (pet_sim[i] - pet_real[i])**2 + (pglycerol_sim[i] - pglycerol_real[i])**2
    print('resíduo = ', erro)
    return erro

# DATA IMPORTATION
df = pd.read_csv('MASSA_DATA_IM_SY025.csv')
tempo = df.iloc[:,0].values
xim_real = df.iloc[:,1].values
xdesp_real = df.iloc[:,2].values
s_real = df.iloc[:,3].values
pet_real = df.iloc[:,4].values
pglycerol_real = df.iloc[:,5].values

# INITIAL CONDITIONS (Xim0, Xdesp0, S0, P0et and P0glycerol)
y0 = [0.05,0.00,19.88,0.03,0.07]
# INTEGRATION TIMES FOR MASS BALANCES SOLUTION (experimental times)
t_int = [0.0,20.0,44.0,68.0,92.0,116.0]

```

INITIAL PARAMETERS GUESS

```
# mimax_im, ksx_im, yxs_im, ypx_et_im, ypx_glycerol_im, mimax_desp,
ksx_desp, yxs_desp, ypx_et_desp, ypx_glycerol_desp, kmax, km
x0 = [0.75, 470.0, 0.018, 23.19, 0.93, 0.15, 300.0, 0.042,
104.07, 0.14, 0.06, 0.03]
```

OPTIMIZATION PROBLEM SOLUTION

```
sol = minimize(par_est,x0,method='Nelder-Mead')
```

SIMULATED RESULTS WITH OPTIMISED PARAMETERS

```
mimax_im = sol.x[0]
ksx_im = sol.x[1]
yxs_im = sol.x[2]
ypx_et_im = sol.x[3]
ypx_glycerol_im = sol.x[4]
mimax_desp = sol.x[5]
ksx_desp = sol.x[6]
yxs_desp = sol.x[7]
ypx_et_desp = sol.x[8]
ypx_glycerol_desp = sol.x[9]
kmax = sol.x[10]
km = sol.x[11]
```

```
previsao = odeint(mass,y0,t_int, args =
(mimax_im,ksx_im,yxs_im,ypx_et_im,ypx_glycerol_im,mimax_desp,ksx_desp,yxs_d
esp,ypx_et_desp,ypx_glycerol_desp,kmax,km))
```

```
xim_predito = previsao[:,0]
xdesp_predito = previsao[:,1]
s_predito = previsao[:,2]
pet_predito = previsao[:,3]
pglycerol_predito = previsao[:,4]
```

```
print('mimax_im = ', mimax_im)
print('ksx_im = ', ksx_im)
print('aimed 0016 yxs_im = ', yxs_im)
print('aimed 10.693 ypx_et_im = ', ypx_et_im)
print('aimed 0.518 ypx_glycerol_im = ', ypx_glycerol_im)
print('mimax_desp = ', mimax_desp)
print('ksx_desp = ', ksx_desp)
print('aimed 0.01 yxs_desp = ', yxs_desp)
print('aimed 44.062 ypx_et_desp = ', ypx_et_desp)
print('aimed 1.979 ypx_glycerol_desp = ', ypx_glycerol_desp)
print('kmax = ', kmax)
print('km = ', km)
```

EXPERIMENTAL DATA AND PREDICTED VALUES COMPARISON

```
plt.rcParams.update({'font.size':20})
```

```
fig, x = plt.subplots()
```

```

x.plot(tempo,xim_real,'xk', tempo,xim_predito,'k-', label = 'Xim', linewidth=2,
markersize=15)
x.plot(tempo,xdesp_real,'sk',tempo,xdesp_predito,'k-', label = 'Xdesp', linewidth=2,
markersize=15)
x.set_xlabel('Tempo (h)')
x.set_ylabel('Massa de biomassa (g)')
plt.show()

```

```

fig, s = plt.subplots()
s.plot(tempo,s_real,'ok',tempo,s_predito,'k-', label = 'S', linewidth=2, markersize=15)
s.set_xlabel('Tempo (h)')
s.set_ylabel('Massa de substrato (g)')
plt.show()

```

```

fig, pet = plt.subplots()
pet.plot(tempo,pet_real,'^k',tempo,pet_predito,'k-', label = 'Pet', linewidth=2,
markersize=15)
pet.set_xlabel('Tempo (h)')
pet.set_ylabel('Massa de etanol (g)')
plt.show()

```

```

fig, pglycerol = plt.subplots()
pglycerol.plot(tempo,pglycerol_real,'vk',tempo,pglycerol_predito,'k-', label =
'Pglycerol', linewidth=2, markersize=15)
pglycerol.set_xlabel('Tempo (h)')
pglycerol.set_ylabel('Massa de glicerol (g)')
plt.show()

```


C4. Cinética de Hinshelwood – Imobilizadas (exemplo linhagem SY025)

```
# -*- coding: utf-8 -*-
```

```
"""
```

```
Created on Fri May 15 11:31:33 2020
```

```
Fermentation kinetics mathematical modelling
```

```
Master's research "immobilised yeast physiology in brewing fermentation" - USP
```

```
Thiago Machado de Araujo
```

```
"""
```

```
# Kinetic Model - Fermentation Kinetics SY025 - Immobilised Cells
```

```
import pandas as pd
```

```
from scipy.integrate import odeint
```

```
from scipy.optimize import minimize
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
def
```

```
mass(MASSA_DATA_IM_SY025,time,mimax_im,ksx_im,kpx_im,yxs_im,qpmax_im,k  
sp_im,kpp_im,ypx_glycerol_im,mimax_desp,ksx_desp,kpx_desp,yxs_desp,qpmax_d  
esp,ksp_desp,kpp_desp,ypx_glycerol_desp,kmax,km):
```

```
    Xim,Xdesp,S,Pet,Pglycerol = MASSA_DATA_IM_SY025
```

```
    # PARAMETERS (experimentally calculated)
```

```
    # yxs_im = 0.016
```

```
    # ypx_et_im = 10.693
```

```
    # ypx_glycerol_im = 0.518
```

```
    # yxs_desp = 0.01
```

```
    # ypx_et_desp = 44.062
```

```
    # ypx_glycerol_desp = 1.979
```

```
    # yps_et = 0.464
```

```
    # yps_glycerol = 0.021
```

```
    # KINETIC EQUATIONS
```

```
    # Immobilised biomass
```

```
    mi_im = ((mimax_im*S)/(ksx_im + S))*(1-kpx_im*Pet)    # Hinshelwood
```

```
expression
```

```
    qs_im = mi_im/yxs_im    # Specific substrate
```

```
consumption rate incorporating cell growth and prodcut formation
```

```
    qp_et_im = ((qpmax_im*S)/(ksp_im + S))*(1-kpp_im*Pet) # Specific product
```

```
formation rate considering products associated to energy metabolism
```

```
    qp_glycerol_im = mi_im*ypx_glycerol_im
```

```
    # Detached biomass
```

```
    mi_desp = ((mimax_desp*S)/(ksx_desp + S))*(1-kpx_desp*Pet)
```

```
    qs_desp = mi_desp/yxs_desp
```

```
    qp_et_desp = ((qpmax_desp*S)/(ksp_desp + S))*(1-kpp_desp*Pet)
```

```
    qp_glycerol_desp = mi_desp*ypx_glycerol_desp
```

```
    k = (kmax*Xim)/(km + Xim)
```

```
    # NONLINEAR MASS BALANCES
```

```

dXimdt = (mi_im*Xim) - (k*Xim)
dXdespdt = (mi_desp*Xdesp) + (k*Xim)
dSdt = (qs_im*Xim) + (qs_desp*Xdesp)
dPetdt = (qp_et_im*Xim) + (qp_et_desp*Xdesp)
dPglyceroldt = (qp_glycerol_im*Xim) + (qp_glycerol_desp*Xdesp)

return [dXimdt,
        dXdespdt,
        - dSdt,
        dPetdt,
        dPglyceroldt]

# ERROR BETWEEN PREDICTED AND EXPERIMENTAL VALUES
def par_est(par):

    mimax_im,ksx_im,kpx_im,yxs_im,qpmax_im,ksp_im,kpp_im,ypx_glycerol_im,mimax_
    _desp,ksx_desp,kpx_desp,yxs_desp,qpmax_desp,ksp_desp,kpp_desp,ypx_glycerol
    _desp,kmax,km = par

    sol = odeint(mass,y0,t_int, args =
    (mimax_im,ksx_im,kpx_im,yxs_im,qpmax_im,ksp_im,kpp_im,ypx_glycerol_im,mimax
    _desp,ksx_desp,kpx_desp,yxs_desp,qpmax_desp,ksp_desp,kpp_desp,ypx_glycerol
    _desp,kmax,km))

    xim_sim = sol[:,0]
    xdesp_sim = sol[:,1]
    s_sim = sol[:,2]
    pet_sim = sol[:,3]
    pglycerol_sim = sol[:,4]

    erro = 0.0
    for i in range(len(tempo)):
        erro += (xim_sim[i] - xim_real[i])**2 + (xdesp_sim[i] - xdesp_real[i])**2 + (s_sim[i]
        - s_real[i])**2 + (pet_sim[i] - pet_real[i])**2 + (pglycerol_sim[i] - pglycerol_real[i])**2
    print('resíduo = ', erro)
    return erro

# DATA IMPORTATION
df = pd.read_csv('MASSA_DATA_IM_SY025.csv')
tempo = df.iloc[:,0].values
xim_real = df.iloc[:,1].values
xdesp_real = df.iloc[:,2].values
s_real = df.iloc[:,3].values
pet_real = df.iloc[:,4].values
pglycerol_real = df.iloc[:,5].values

# INITIAL CONDITIONS (Xim0, Xdesp0, S0, P0et and P0glycerol)
y0 = [0.05,0.00,19.88,0.03,0.07]
# INTEGRATION TIMES FOR MASS BALANCES SOLUTION (experimental times)
t_int = [0.0,20.0,44.0,68.0,92.0,116.0]

```

INITIAL PARAMETERS GUESS

```
# mimax_im, ksx_im, kpx_im, yxs_im, qpmax_im, ksp_im, kpp_im,
ypx_glycerol_im, mimax_desp, ksx_desp, kpx_desp, yxs_desp, qpmax_desp,
ksp_desp, kpp_desp, ypx_glycerol_desp, kmax, km)
x0 = [0.51, 163.45, 0.0004, 0.022, 1.12, 3.27, 0.03, 0.79, 0.1,
228.05, 0.037, 0.009, 1.26, 2.62, 0.018, 4.79, 0.05, 0.03]
```

OPTIMIZATION PROBLEM SOLUTION

```
sol = minimize(par_est,x0,method='Nelder-Mead')
```

SIMULATED RESULTS WITH OPTIMISED PARAMETERS

```
mimax_im = sol.x[0]
ksx_im = sol.x[1]
kpx_im = sol.x[2]
yxs_im = sol.x[3]
qpmax_im = sol.x[4]
ksp_im = sol.x[5]
kpp_im = sol.x[6]
ypx_glycerol_im = sol.x[7]
mimax_desp = sol.x[8]
ksx_desp = sol.x[9]
kpx_desp = sol.x[10]
yxs_desp = sol.x[11]
qpmax_desp = sol.x[12]
ksp_desp = sol.x[13]
kpp_desp = sol.x[14]
ypx_glycerol_desp = sol.x[15]
kmax = sol.x[16]
km = sol.x[17]
```

```
previsao = odeint(mass,y0,t_int, args =
(mimax_im,ksx_im,kpx_im,yxs_im,qpmax_im,ksp_im,kpp_im,ypx_glycerol_im,mimax
_desp,ksx_desp,kpx_desp,yxs_desp,qpmax_desp,ksp_desp,kpp_desp,ypx_glycerol
_desp,kmax,km))
```

```
xim_predito = previsao[:,0]
xdesp_predito = previsao[:,1]
s_predito = previsao[:,2]
pet_predito = previsao[:,3]
pglycerol_predito = previsao[:,4]
```

```
print('mimax_im = ', mimax_im)
print('ksx_im = ', ksx_im)
print('kpx_im = ', kpx_im)
print('aimed 0.016 yxs_im = ', yxs_im)
print('qpmax_im = ', qpmax_im)
print('ksp_im = ', ksp_im)
print('kpp_im = ', kpp_im)
print('aimed 0.518 ypx_glycerol_im = ', ypx_glycerol_im)
```

```

print('mimax_desp = ', mimax_desp)
print('ksx_desp = ', ksx_desp)
print('kpx_desp = ', kpx_desp)
print('aimed 0.01 yxs_desp = ', yxs_desp)
print('qpmax_desp = ', qpmax_desp)
print('ksp_desp = ', ksp_desp)
print('kpp_desp = ', kpp_desp)
print('aimed 1.979 ypx_glycerol_desp = ', ypx_glycerol_desp)
print('kmax = ', kmax)
print('km = ', km)

```

EXPERIMENTAL DATA AND PREDICTED VALUES COMPARISON

```
plt.rcParams.update({'font.size':20})
```

```

fig, x = plt.subplots()
x.plot(tempo,xim_real,'xk', tempo,xim_predito,'k-', label = 'Xim', linewidth=2,
markersize=15)
x.plot(tempo,xdesp_real,'sk',tempo,xdesp_predito,'k-', label = 'Xdesp', linewidth=2,
markersize=15)
x.set_xlabel('Tempo (h)')
x.set_ylabel('Massa de biomassa (g)')
plt.show()

```

```

fig, s = plt.subplots()
s.plot(tempo,s_real,'ok',tempo,s_predito,'k-', label = 'S', linewidth=2, markersize=15)
s.set_xlabel('Tempo (h)')
s.set_ylabel('Massa de substrato (g)')
plt.show()

```

```

fig, pet = plt.subplots()
pet.plot(tempo,pet_real,'^k',tempo,pet_predito,'k-', label = 'Pet', linewidth=2,
markersize=15)
pet.set_xlabel('Tempo (h)')
pet.set_ylabel('Massa de etanol (g)')
plt.show()

```

```

fig, pglycerol = plt.subplots()
pglycerol.plot(tempo,pglycerol_real,'vk',tempo,pglycerol_predito,'k-', label =
'Pglycerol', linewidth=2, markersize=15)
pglycerol.set_xlabel('Tempo (h)')
pglycerol.set_ylabel('Massa de glicerol (g)')
plt.show()

```

APÊNDICE D – Cálculos de ϕ e β (exemplo linhagem SY025)

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
```

```
Created on Wed Jun 10 14:46:10 2020
```

```
Thiele Modulus and Saturation Parameter estimation - SY025
```

```
Thiago Machado de Araujo
"""
```

```
import math as m
```

```
# CONSTANTS
```

```
yeast_mass = 7.92E-11 # mass of one yeast cell [g]
```

```
matrix_mass = 15 # mass of matrix [g]
```

```
Dstd = (0.48E-9)*3600 # (1.73E-6 [m²/h]) standard diffusion coefficient of sucrose
in calcium alginate 2 % (w/v) at 25 °C , obtained from Doran 2 ed.
```

```
# SUBSTRATE CONCENTRATION AT THE SURFACE OF THE PARTICLE (g/L =
Kg/m³)
```

```
Ssup0 = 99.42
```

```
Ssup1 = 80.59
```

```
Ssup2 = 40.11
```

```
Ssup3 = 16.69
```

```
Ssup4 = 2.81
```

```
Ssup5 = 0.72
```

```
# DETERMINATION OF EFFECTIVE DIFFUSIVITY (Deff)
```

```
# Number of cells inside the particles
```

```
cells_t0 = 9.76E8
```

```
cells_t1 = 9.03E9
```

```
cells_t2 = 1.46E10
```

```
cells_t3 = 1.46E10
```

```
cells_t4 = 1.03E10
```

```
cells_t5 = 1.08E10
```

```
# Weight fraction of yeast in the particle
```

```
yc_0 = (cells_t0*yeast_mass)/(matrix_mass+(cells_t0*yeast_mass))
```

```
yc_1 = (cells_t1*yeast_mass)/(matrix_mass+(cells_t1*yeast_mass))
```

```
yc_2 = (cells_t2*yeast_mass)/(matrix_mass+(cells_t2*yeast_mass))
```

```
yc_3 = (cells_t3*yeast_mass)/(matrix_mass+(cells_t3*yeast_mass))
```

```
yc_4 = (cells_t4*yeast_mass)/(matrix_mass+(cells_t4*yeast_mass))
```

```
yc_5 = (cells_t5*yeast_mass)/(matrix_mass+(cells_t5*yeast_mass))
```

```
# Deff calculation
```

```
Deff_t0 = (Dstd*(1-yc_0))/(1+(yc_0/2))
```

```
Deff_t1 = (Dstd*(1-yc_1))/(1+(yc_1/2))
```

```
Deff_t2 = (Dstd*(1-yc_2))/(1+(yc_2/2))
```

```
Deff_t3 = (Dstd*(1-yc_3))/(1+(yc_3/2))
```

```

Deff_t4 = (Dstd*(1-yc_4))/(1+(yc_4/2))
Deff_t5 = (Dstd*(1-yc_5))/(1+(yc_5/2))
# PARAMETERS
D = 0.0075          # bead diameter [m]
R = D/2             # bead radius [m]
mimax = 0.73        # maximum specific growth rate [1/h]
ksx = 234.07         # Monod substrate constant [kgs]
yxs = 0.023          # biomass yield from substrate [kgx/kgs]

# IMMOBILISED BIOMASS CONCENTRATION (g/L = Kg/m³)
X0 = 0.24
X1 = 2.26
X2 = 2.58
X3 = 2.58
X4 = 2.59
X5 = 2.71

# THIELE MODULUS ( $\phi$ ) AND SATURATION PARAMETER ( $\beta$ ) ESTIMATION
# time 0
 $\phi_0 = R * m.\text{sqrt}((mimax*X0)/(yxs*Deff\_t0*ksx))$ 
 $\beta_0 = Ssup0/ksx$ 
print('φ0 = ',  $\phi_0$ )
print('β0 = ',  $\beta_0$ )
print("\n")

# time 1
 $\phi_1 = R * m.\text{sqrt}((mimax*X1)/(yxs*Deff\_t1*ksx))$ 
 $\beta_1 = Ssup1/ksx$ 
print('φ1 = ',  $\phi_1$ )
print('β1 = ',  $\beta_1$ )
print("\n")

# time 2
 $\phi_2 = R * m.\text{sqrt}((mimax*X2)/(yxs*Deff\_t2*ksx))$ 
 $\beta_2 = Ssup2/ksx$ 
print('φ2 = ',  $\phi_2$ )
print('β2 = ',  $\beta_2$ )
print("\n")

# time 3
 $\phi_3 = R * m.\text{sqrt}((mimax*X3)/(yxs*Deff\_t3*ksx))$ 
 $\beta_3 = Ssup3/ksx$ 
print('φ3 = ',  $\phi_3$ )
print('β3 = ',  $\beta_3$ )
print("\n")

# time 4
 $\phi_4 = R * m.\text{sqrt}((mimax*X4)/(yxs*Deff\_t4*ksx))$ 
 $\beta_4 = Ssup4/ksx$ 
print('φ4 = ',  $\phi_4$ )

```

```
print('β4 = ', β4)
print("\n")

# time 5
φ5 = R * m.sqrt((mimax*X5)/(yxs*Deff_t5*ksx))
β5 = Ssup5/ksx
print('φ5 = ', φ5)
print('β5 = ', β5)
print("\n")
```

APÊNDICE E – Modelo de reação-difusão

O programa aqui descrito foi obtido em Golman (2016).

```
%matplotlib inline
import numpy as np
from scipy.sparse.linalg import spsolve
from scipy.linalg import norm
from scipy import sparse
from scipy.integrate import trapz
from matplotlib.pylab import *
from IPython.display import clear_output, display, HTML
from ipywidgets import interact, FloatSlider, HTML
from IPython.display import Latex

# Main function
def fmain( $\phi$ ,  $\beta$ , **kwargs):

# The number of internal grid points
    N = 299

# Set grid spacing
    delta_rho = 1./(N + 1.)

# Specify uniform grid of internal points
    rho = np.linspace(delta_rho, 1.-delta_rho, N)

# Allocate arrays of common coefficients A and C
    A = np.zeros(N)
    C = np.zeros(N)

# Define constant common coefficient B
    B = -2./(delta_rho**2)

# Define coefficients A and C at each mesh point
    A = 1./(delta_rho**2) - 1./(delta_rho*rho)
    C = 1./(delta_rho**2) + 1./(delta_rho*rho)

# Specify initial guess for solution of nonlinear equations
# Using uniform profiles : s0=1
    s0 = np.ones(N)

# Solve the system of nonlinear equations using the Newton-Raphson method
    u,f_val,iter, exitflag = fsolve(s0,  $\phi$ ,  $\beta$ , A, B, C)

    if not exitflag:
        print('Too many iterations')
    else:
        print('Successful solution: the number of iterations is %s'%iter)
```



```

# Save resulting concentration profile
concentration = np.zeros(N+2)
concentration[1:N+1] = u[0:N]

# Add concentration value at rho = 0
concentration[0] = 4.*u[0]/3. - u[1]/3.

# Add concentration value at rho = 1
concentration[N + 1] = 1.

# Plot graphs
rad = np.linspace(0.0, 1.0, N + 2)
matplotlib.rcParams.update({'font.size': 12})
fig = plt.figure()
axes = fig.add_subplot(111)
axes.plot(rad,concentration, color="red", linestyle="solid", linewidth=2)
title1 = 'Biomass Catalyzed Reaction in a Spherical Particle \n'
title1 += '$\phi$ = %s, $\beta$ = %s '
axes.set_title(title1 % ( $\phi$ ,  $\beta$ ))
axes.set_xlabel(r'Dimensionless radius, $\rho$ [-]')
axes.set_ylabel('Dimensionless concentration, s [-]')
axes.grid()
axis([0., 1., 0.0, 1.0])
plt.show()

# Calculate effectiveness factor
integrand = np.zeros(N+2)
integrand = concentration * (rad**2) / (1 +  $\beta$ *concentration)
 $\eta$  = 3*(1+ $\beta$ )*trapz(integrand, rad)
print (' Effectiveness factor:  $\eta$  = %.3f ' %  $\eta$ )

# Solve the system of nonlinear equations using Newton- Raphson method with
tridiagonal Jacobian
def fsolve(x0,  $\phi$ ,  $\beta$ , A, B, C, tolX = 1e-8, tolG = 1e-8, maxIter = 100):

    x = x0
    for i in range (maxIter):
        gx = g(x,  $\phi$ ,  $\beta$ , A, B, C)
        xNew = x - spsolve (J(x,  $\phi$ ,  $\beta$ , A, B, C), gx )
        if (norm(xNew-x) < tolX):
            return [x,gx,i,'True']
        if(norm(gx) < tolG):
            return [xNew,gx,i,'True']
        x = xNew
    return[x, gx, i, 'False']

# Define the system of nonlinear equations
def g (s,  $\phi$ ,  $\beta$ , A, B, C):
    # Allocate arrays
    N = len(s)

```

```

f = np.zeros(N)

# Reaction term
f[0:N] -= ( $\varphi^{**2}$ ) * s[0:N] / (1. +  $\beta$ *s[0:N])

# Pellet internal points
for k in range (1,(N-1)):
    f[k] += A[k]*s[k-1] + B * s[k] + C[k]*s[k+1]

# Pellet center
f[0] += (2.*B/3. + A[0] - C[0]/3.)*s[0] + (C[0]-A[0]/3.)*s[1]

# Pellet surface
f[N-1] += A[N-1]*s[N-2] + B * s[N-1] + C[N-1]

return f

# Define Jacobian matrix
def J (s,  $\varphi$ ,  $\beta$ , A, B, C):

# Main diagonal d1
N = len(s)
d1 = np.zeros(N)

# Derivative of reaction rate with respect to concentration
d1[0:N] += -( $\varphi^{**2}$ )/((1. +  $\beta$ *s[0:N])**2)

# Pellet internal points
for k in range (1,(N-1)):
    d1[k] += B

# Pellet center
d1[0] += A[0] + 2.*B/3. - C[0]/3.

# Pellet surface
d1[N-1] += B

# Position of non-zero elements
Jd1 = arange(0, N)
ld1 = arange(0, N)

# Lower diagonal d2
d2 = np.zeros (N-1)

# Pellet internal points
d2[0:N-2] = A[1:N-1]

# Pellet surface
d2[N-2] = A[N-1]

```

```

# Position of non-zero elements
ld2 = arange(1, N)
Jd2 = arange(0, N-1)

# Upper diagonal d3
d3 = np.zeros (N-1)

# Pellet center
d3[0] = C[0] - A[0]/3.

# Pellet internal points
d3[1:N-1] = C[1:N-1]

# Position of non-zero elements
Jd3 = arange(1, N)
ld3 = arange(0, N-1)

# Combine diagonals in one array
d= concatenate((d1,d2,d3), axis = 0)
lr = concatenate((ld1,ld2,ld3), axis = 0)
Jc = concatenate((Jd1,Jd2,Jd3), axis = 0)

# Form sparse Jacobian matrix
Jac = sparse.coo_matrix((d,(lr,Jc)),shape=(N,N))
Jac = Jac.tocsr()

return Jac

# Specify widgets
h1=HTML(value="<h4><b> Mass Transfer and Biomass Catalyzed Reaction in
Isothermal Spherical Particle</b>",color="brown")
h2=HTML(value = "<br> ")
h3=Latex("$$\mbox{Specify parameters: } $$",)
display(h1)
display(h2)
display(h3)
phi_slider = FloatSlider(min=0, max=20, step=0.01, value=10)
beta_slider = FloatSlider(min=0, max=1, step=0.01, value=0.5)
w = interact(fmain,  $\phi$  = phi_slider,  $\beta$  = beta_slider)

```