



**SAMUEL FILIPE
GONÇALVES
OLIVEIRA**

**INSTALAÇÃO DE UM REATOR DE PROPAGAÇÃO
DE LEVEDURAS EM MICROCERVEJEIRA**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2017

**SAMUEL FILIPE
GONÇALVES
OLIVEIRA**

INSTALAÇÃO DE UM REATOR DE PROPAGAÇÃO DE LEVEDURAS EM MICROCERVEJEIRA

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

... à resiliência ...

o júri

presidente

Prof. Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho
investigadora de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Doutora Elisabete Coelho, Professor Doutor Manuel António Coimbra e Eng.º Nicolas Billard por todo o apoio, inspiração e acompanhamento no desenvolvimento deste projeto.

À empresa Essência D'Alma Lda., produtora da cerveja artesanal Vadia, e colegas pelo acolhimento, integração, espírito e pela partilha de conhecimentos, e preocupações.

À Unidade de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares (QOPNA) pela disponibilização de todo o equipamento para realização das análises ao mosto cervejeiro.

Aos colegas da unidade de investigação Resposta@UA pela ajuda e orientação.

Aos meus pais por todo o apoio, formação e compreensão incondicional.

Aos grandes amigos de sempre.

palavras-chave

Propagação, levedura, microcerveja, cerveja artesanal, mosto cervejeiro.

resumo

Com a crescente procura por cervejas especiais, distintas dos estilos mais consumidos mundialmente, a cerveja artesanal surge completando uma lacuna existente no mercado. Contudo, a produção de cerveja em microcervejeiras apresenta várias limitações devido à falta de recursos técnicos e científicos que as grandes cervejeiras dispõem. Uma das dificuldades é a produção de leveduras. De forma geral, as microcervejeiras dependem do fornecimento de levedura desidratada. Esta levedura apresenta taxas de viabilidade muito baixas e a sua atividade metabólica influencia de forma drástica a fermentação. Concentrações demasiado baixas ou leveduras com taxas de viabilidade baixas levam a fermentações lentas, produção de metabolitos indesejados, favorecimento de contaminações por outros microrganismos, etc. Para fazer face a esta limitação e como alternativa ao uso direto de leveduras desidratadas, é possível proceder-se à instalação de biorreatores para multiplicação de leveduras. A propagação de leveduras em contexto de microcerveja implica investimentos, os quais trazem vantagens ao processo de produção de cerveja e ao produto final em termos de parâmetros organoléticos.

Este trabalho focou-se no estudo do processo de propagação de leveduras em microcerveja. Caracterizou-se inicialmente o mosto cervejeiro para que este fosse usado como substrato de propagação. Esta análise teve em conta os quatro elementos fundamentais ao crescimento e correto estado fisiológico e metabólico das leveduras. Foram então analisadas as concentrações de açúcares livres, aminoácidos livres, proteína solúvel total, azoto elementar e zinco (elemento normalmente deficitário no mosto cervejeiro).

Após caracterização do mosto cervejeiro procedeu-se ao *design* e instalação do reator de propagação tendo em conta a capacidade produtiva da microcerveja. Estabeleceram-se também os parâmetros a monitorizar, assim como os métodos para a sua análise e quantificação. Realizaram-se três testes de propagação monitorizando-se a concentração e taxa de viabilidade da levedura com recurso a uma câmara de Neubauer com coloração com azul de metileno, pH, agitação e temperatura.

Obteve-se uma concentração máxima de levedura viável de $5,02 \times 10^{11}$ cel/L com uma taxa de viabilidade máxima de 90,6%, uma taxa específica de crescimento de $0,053 \text{ h}^{-1}$ e um rendimento biomassa/substrato de $5,38 \times 10^9$ cel/gS. Concluiu-se que houve melhorias na padronização das fermentações usando levedura propagada e melhorias nas características organoléticas da cerveja. A análise económica do processo revelou poupanças no processo de 75%, podendo-se concluir que a propagação de leveduras em microcerveja é uma alternativa possível e de implementação relativamente fácil.

keywords

Propagation, yeast, microbrewery, craft beer, wort.

abstract

There is a growing demand for speciality beers, with different characteristics from the most consumed beer styles. In this context, the craft beer industry appears fulfilling a lack in the beer market. Nevertheless, the production of beer in microbreweries has its limitations due to usual poor technical and scientific resources. One of these limitations is the production of brewing yeast. Usually microbreweries depend on the supply of dry yeast. This yeast tends to have a very low viability and its metabolic activity influences in a higher extent the fermentation process. Low concentrations of yeast or low viability result in long fermentations, production of undesirable metabolites, beer contamination with the growth of undesirable microorganisms, etc. One alternative of the direct use of dry yeast is the installation of propagation systems (bioreactors for yeast multiplication). Propagation systems in microbreweries involve investments that present advantages in the process of beer production and in the final product including the improvement of beer's flavour.

This work was focused on the study of the yeast propagation process in microbreweries. Initially the wort was studied to be used as substrate for the propagation. Four essential nutrients were analysed for the yeast growth and correct metabolic processes and morphology of the yeast. The concentrations of free sugars, free amino acids, total soluble proteins, elemental nitrogen and zinc (usually deficit in wort) were determined.

The design of the reactor was made considering the production capacity of the microbrewery. The parameters for monitoring the propagation process were established as well as the methods for analysis and quantification.

Three propagation tests were conducted. It was analysed: the yeast concentration and its viability using a Neubauer chamber with blue methylene staining, pH, agitation, and temperature.

It was achieved a maximum concentration of viable yeast of 5.02×10^{11} cel/L with a maximum viability of 90.6%, a maximum specific growth rate of 0.053 h^{-1} and a biomass/substrate coefficient yield of 5.38×10^9 cel/gS. It was concluded that there were improvements in the standardisation of the fermentations using the propagated yeast and in the beer's flavour as well. The process' economic analysis revealed great savings in the process (75%). The results allowed to conclude that yeast propagation systems can be applied on microbreweries giving a viable alternative with easy implementation.

Índice

1.	Introdução Teórica.....	1
1.1.	Contextualização do trabalho	3
1.2.	A cerveja.....	3
1.3.	A indústria da cerveja artesanal.....	4
1.4.	O processo cervejeiro	5
1.4.1.	O mosto cervejeiro	8
1.4.1.1.	Açúcares.....	9
1.4.1.2.	Aminoácidos	11
1.4.1.3.	Zinco	11
1.4.2.	A levedura	12
1.4.2.1.	Metabolismo da levedura.....	13
1.4.3.	Fermentação	14
1.5.	Propagação.....	14
1.5.1.	Parâmetros de controlo e nutrientes críticos	16
1.5.1.1.	Oxigénio.....	16
1.5.1.2.	Temperatura	16
1.5.1.3.	Nutrientes críticos	17
1.5.2.	Importância e vantagens do uso de leveduras propagadas	17
2.	Materiais e Métodos	19
2.1.	Caracterização do mosto cervejeiro.....	21
2.1.1.	Pré-tratamento das amostras de mosto	21
2.1.2.	Análise de açúcares	21
2.1.2.1.	Acetilação dos açúcares livres do sobrenadante (Sn)	21
2.1.2.2.	Análise por GC-FID dos acetatos de alditol	22
2.1.3.	Análise de aminoácidos.....	22
2.1.3.1.	Derivatização dos aminoácidos.....	22

2.1.3.2.	Análise por GC-qMS	22
2.1.4.	Análise da proteína solúvel	23
2.1.5.	Análise do azoto elementar	23
2.1.6.	Análise do zinco	23
2.2.	Design do reator de propagação	24
2.3.	Protocolo de propagação de leveduras	26
2.3.1.	Protocolo de CIP	26
2.3.2.	Produção de mosto para propagação	26
2.3.3.	Inoculação do propagador	27
2.3.4.	Propagação e amostragem	28
2.4.	Determinação dos parâmetros de análise dos testes de propagação	29
2.4.1.	Determinação da taxa específica de crescimento microbiano	29
2.4.2.	Determinação do tempo de duplicação	29
2.4.3.	Determinação do rendimento da propagação	29
3.	Resultados e Discussão	31
3.1.	Caracterização do mosto cervejeiro	33
3.2.	Propagação de levedura	35
3.2.1.	Análise do crescimento microbiano	35
3.2.2.	Análise da sedimentação da levedura	40
3.3.	Análise do perfil de fermentação da cerveja produzida com levedura propagada 42	
3.3.1.	Comparação das fermentações com levedura desidratada e com levedura propagada	42
3.3.2.	Comparação das taxas de recuperação de levedura desidratada e levedura propagada	45
3.3.3.	Impacto económico	47
4.	Conclusões	49
5.	Referências Bibliográficas	53

6. Anexos.....	59
Anexo A	61
Anexo B	62
Anexo C	63
Anexo D	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Nutrientes presentes no mosto essenciais para a fermentação alcoólica. Adaptado de (17).	9
Tabela 2 – Açúcares presentes no mosto cervejeiro e suas usuais concentrações. Adaptado de (17).	10
Tabela 3 – Concentrações de açúcares presentes numa cerveja <i>lager</i> alemã. Adaptado de (17).	10
Tabela 4 – Grupos de assimilação de aminoácidos (e amónia) pela levedura. Adaptado de (17).	11
Tabela 5 – Quantidades de malte adicionadas na brassagem para produção do substrato para propagação e cerveja.	26
Tabela 6 – Quantidades de lúpulos adicionadas para produção do substrato para propagação e cerveja.	27
Tabela 7 – Quantidades de lúpulos e sulfato de zinco adicionados no <i>whirlpool</i> para produção do substrato para propagação e cerveja.	27
Tabela 8 – Descrição dos parâmetros a variar para os testes de propagação com levedura <i>lager</i>	28
Tabela 9 – Comparação das concentrações dos nutrientes essenciais ao crescimento de leveduras presentes nos mostos em estudo com valores referência para propagação de leveduras e fermentação alcoólica.	33
Tabela 10 – Concentrações de levedura, taxas de viabilidade e taxas específica de crescimento máximos e tempos de duplicação atingidos nos testes de propagação realizados.	37
Tabela 11 – Rendimentos observados biomassa/substrato (S) obtidos na fase exponencial dos testes de propagação realizados.	39

Índice de Figuras

Figura 1 – Processo de produção cervejeira. Copyrights: Baltika, Carlsberg Group: http://eng.baltika.ru/m/6320	5
Figura 2 – Representação esquemática do metabolismo da glucose na levedura. (1) Transporte da glucose: difusão facilitada ou transporte ativo; (2) Formação do glicogénio e da trealose; (3) Glicólise; (4) Piruvato descarboxilase; (5) Álcool desidrogenase; (6) Acetaldeído desidrogenase; (7) Síntese do acetil-CoA (citoplasma); (8) Transporte da acetil-CoA para a mitocôndria via carnitina; (9) Transporte do acetato para a mitocôndria e formação da acetil-CoA via síntese de acetil-CoA mitocondrial; (10) Transporte do piruvato mitocondrial; (11) Complexo piruvato desidrogenase; (12) Ciclo do TCA; (13) Assimilação do piruvato no material celular iniciado pela piruvato carboxilase; (14) Translocador ADP/ATP; (15) Formação de ATP via fosforalização oxidativa. Adaptado de (19)	13
Figura 3 – A: projeto do reator de propagação (medidas em mm) com camisa de arrefecimento (a) e turbina (b); B: vista isométrica com corte do reator de propagação (saídas e entradas assinaladas) com turbina de 4 pás inclinadas (c); C: reator de propagação instalado.	25
Figura 4 – A: Variação da concentração de levedura total e sólidos solúveis totais (°Brix) ao longo do tempo de propagação nos três testes realizados. B: Variação da concentração de levedura viável e taxa de viabilidade ao longo do tempo de propagação nos três testes realizados.....	36
Figura 5 – Variação da concentração e taxa de viabilidade de leveduras: A) após 2 dias de sedimentação; B) após 5 dias de sedimentação.	41
Figura 6 – Comparação dos valores médios dos sólidos solúveis totais (°Brix) registados nas diferentes fermentações (cerveja loira, rubi e preta) com recurso a leveduras desidratadas (lado esquerdo) e leveduras propagadas (lado direito) ao longo do tempo.	44
Figura 7 – Diagrama de fluxo representando a recuperação de leveduras em cervejeira com as taxas de recuperação (Tx Rec) para fermentações com levedura desidratada (A) e levedura propagada (B).....	46

Lista de Abreviaturas

[] – concentração

Δ – variação

μ – taxa de crescimento microbiano

aa – aminoácidos

BCA – ácido bicinconínico

CIP – sistema de limpeza *in-place*

CCV – tanques cilindrocónicos

DMS – dimetilsulfureto

FAN – *Free Amino Nitrogen*

GC-FID – cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama

GC-qMS – cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrofotometria de massa com analisador quadruplo

$N_{\text{elementar}}$ – azoto elementar

pp – precipitado

rpm – rotações por minuto

S – substrato

Sn – sobrenadante

T – temperatura

t – tempo

V – volume

X – biomassa

$(Y_{X/S})_{\text{obs}}$ – fator de rendimento biomassa/substrato

1. Introdução Teórica

1.1. Contextualização do trabalho

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito de um estágio curricular em ambiente empresarial na empresa Essência D'Alma Lda., produtora da cerveja artesanal Vadia. A Cerveja Vadia é uma das mais antigas cervejas artesanais de Portugal, uma das grandes impulsionadoras do movimento *craft* em Portugal desde 2006.

Com reconhecimento nacional e internacional, já conquistou 12 medalhas nos principais concursos internacionais de cerveja, nomeadamente *World Beer Awards*, *Brussels Beer Challenge* e *Concours International de Lyon* sendo à data de conclusão deste trabalho, a cerveja artesanal portuguesa mais medalhada em concursos internacionais.

A marca Cerveja Vadia é comercializada em todo o país no canal HORECA e na grande distribuição, destacando-se no panorama cervejeiro por uma imagem e conceito irreverente, uma oferta alargada de cervejas nos diversos estilos, mas sobretudo por ter um produto adaptado ao consumidor português.

Este trabalho focou-se no desenvolvimento, instalação e operacionalização de um reator de propagação de leveduras com o objetivo de: 1) ultrapassar limitações do uso de leveduras desidratadas; 2) melhoria do processo de fermentação e 3) melhoria das características organoléticas do produto final, a cerveja.

1.2. A cerveja

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas da humanidade. A sua origem remonta à antiguidade (à cerca de 10 000 anos) e o seu surgimento é incerto. Provável fruto do acaso, a fermentação do mosto em cerveja é um dos processos biotecnológicos mais antigos mas também mais descrito e investigado. (1)

Diversas matérias-primas são utilizadas para se produzir cerveja, nomeadamente: água, cereais maltados, lúpulo (ou seus derivados) e levedura. Normalmente, a cerveja contém etanol (entre 3 e 5 %), compostos de lúpulo, dióxido de carbono (cerca de 0,5 %), pH baixo (entre 3,8 e 4,7), baixa concentração de oxigénio (<0,1 ppm), e água, sendo esta o componente maioritário (90-94 %). (2) Existem ainda outros componentes minoritários, que constituem cerca de 4 % da cerveja, nomeadamente açúcares residuais não fermentáveis (D-ribose, L-arabinose, D-xilose), sais inorgânicos, aminoácidos, nucleótidos, polifenóis, vitaminas, lípidos e resinas do lúpulo. Além disso, um vasto leque de compostos voláteis contribuem de forma importante para o seu aroma e sabor,

apesar de estes representarem apenas cerca de 0,5 %. Estes compostos voláteis são maioritariamente provenientes da ação da levedura, do malte e do lúpulo, podendo encontrar-se em concentrações médias de: 10-300 mg/L de álcoois superiores, 50-250 mg/L de ácidos orgânicos, 25-40 mg/L de ésteres, 30-40 mg/L de aldeídos, 1-10 mg/L de compostos de enxofre, cetonas e compostos terpénicos. (2)

O conteúdo alcoólico, proveniente da fermentação dos açúcares, contribuiu para a vasta expansão da cerveja pelo globo. De facto, vários foram os estilos criados com as suas características e qualidades organoléticas bem definidas e influenciadas pelas tradições de cada região de origem. As diferentes matérias-primas disponíveis, o uso de diferentes leveduras, originaram mais de 100 estilos diferentes de cerveja segundo o relatório do *Beer Judge Certification Program*. (3) A diversidade de cervejas é bastante variada, nomeadamente: desde cervejas *ale* ou *lager*, filtradas ou não, pasteurizadas, refermentadas em garrafa, usando maltes de cevada, trigo, centeio, cereais não maltados, etc.

O crescimento do seu consumo foi contínuo até ao início do século XXI. Gerou-se uma indústria imensa, não só na produção da cerveja em si, mas também na produção de cereais, malte (cereais maltados, cereais que sofrem um processo inicial de germinação e posteriormente secos) e lúpulo (flor proveniente de um arbusto que atribuir amargor à cerveja). Segundo o relatório anual da *The Brewers of Europe*, a produção cervejeira europeia gera cerca de 110 mil milhões € por ano (dados de 2014), tendo sido produzidos 411 298 000 hL de cerveja em 2015. (4,5)

1.3. A indústria da cerveja artesanal

No final do século XX surgiu um novo movimento e milhares de *players* juntaram-se a esta indústria. Num retorno à verdadeira essência e qualidade da cerveja, nos anos 70 começaram a surgir cervejeiros artesanais nos EUA que revolucionaram esta indústria naquele país.

Hoje em dia, este movimento encontra-se globalizado. Desde o início do milénio, várias empresas têm surgido na Europa, afirmando-se neste contexto. Em Portugal, segundo a Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja (APCV), o movimento iniciou-se a partir de 2005, dando-se o grande *boom* da cerveja artesanal portuguesa a partir de 2010. Atualmente, existem mais de 100 marcas registadas produzidas por cerca de 40 microcervejeiras em Portugal. (5)

No entanto, a cerveja artesanal depara-se com várias dificuldades, nomeadamente a

criação de uma cultura cervejeira num país de cultura vínica (que é bastante importante e omnipresente), por vezes a falta de conhecimento científico por parte dos cervejeiros artesanais, ou a falta de equipamento técnico adequado. De facto, um dos pontos problemáticos é o manuseamento e gestão do agente catalisador desta bebida, que é a levedura. Numa cervejeira industrial (macrocervejeira), a levedura é propagada desde a escala laboratorial até à escala industrial, para depois ser inoculada nos fermentadores. (6) Contudo em microcervejeiras, frequentemente não existe a capacidade de realizar o *scale-up* da levedura. A levedura é comprada a um fornecedor, encontrando-se, na maior parte dos casos, desidratada. Contudo, existem problemas associados à sua utilização e portanto, a instalação de equipamentos de *scale-up* e propagação de leveduras é primordial. (7)

1.4. O processo cervejeiro

Para obter um substrato adequado ao crescimento da levedura, é necessário transformar o cereal maltado em mosto. Na Figura 1 representa-se esquematicamente o processo de produção de mosto e cerveja.

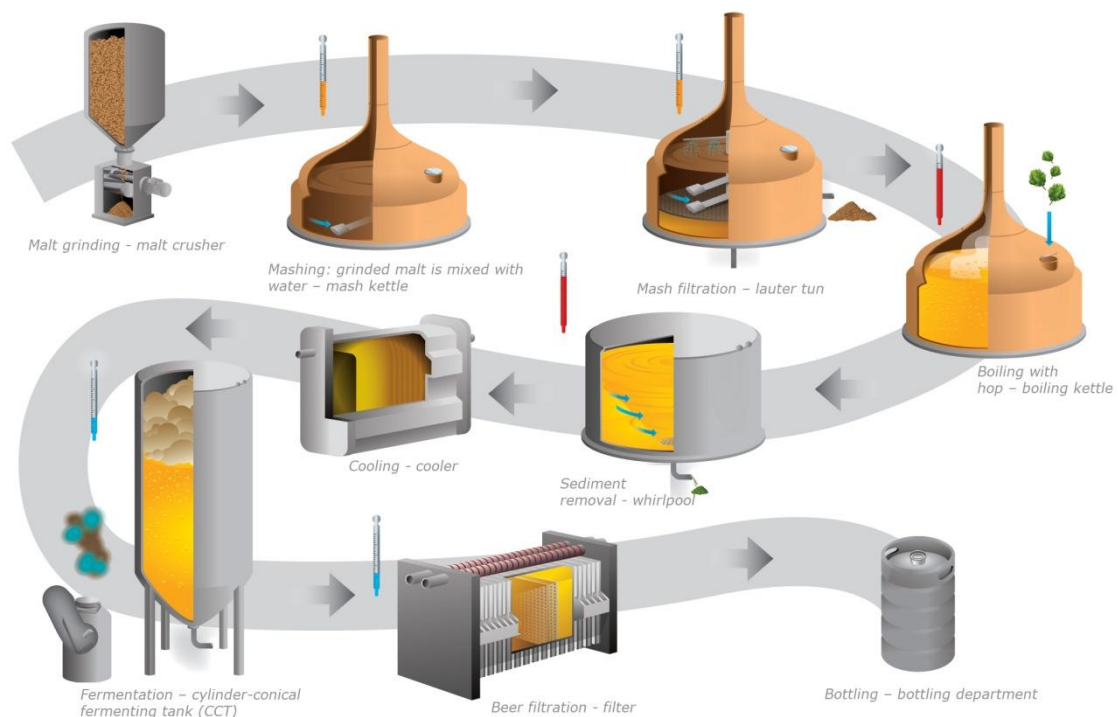


Figura 1 – Processo de produção cervejeira. Copyrights: Baltika, Carlsberg Group: <http://eng.baltika.ru/m/6320>

Começa-se por moer o malte, que depois é adicionado a um tanque de brassagem. Durante a brassagem, a degradação enzimática do amido é iniciada, devido à temperatura aplicada, havendo a sua hidrólise em açúcares fermentáveis. As enzimas α -amilase e β -amilase, naturalmente presentes nos grãos dos cereais e mantidas durante o processo de maltagem, degradam o amido a temperaturas ótimas de 70-75 °C e 60 °C, respetivamente. (8,9) Dependendo das condições de brassagem, tais como a viscosidade do mosto, presença de iões de cálcio, inibidores, entre outros, as temperaturas ótimas da atividade enzimática podem ser influenciadas. (9) Assim, durante a brassagem do malte, primeiramente a temperatura é elevada até aos 60-65 °C geralmente durante 60 min, para promover a atuação da β -amilase sobre as moléculas de amido. Após esse período, a temperatura é aumentada para os 70-75 °C, e assim atuar a α -amilase. A α -amilase hidrolisa as ligações α -(1,4)-glucose, clivando sucessivamente as longas cadeias do amido, produzindo maltotriose, maltose e glucose. A β -amilase atua no terminal não redutor dando origem à maltose. Nem a α -amilase nem a β -amilase têm capacidade de hidrolisar as ligações α -(1,6) do amido, dando origem a maltodextrinas (como a panose e isopanose). Após a hidrólise do amido em açúcares fermentáveis (glucose, maltose, maltotriose), a temperatura é aumentada até aos 80 °C para promover a desnaturação das enzimas. Este processo de brassagem é de grande importância, uma vez que uma brassagem ineficiente (degradação do amido pouco extensa) pode levar à produção de um mosto com uma baixa quantidade de açúcares fermentáveis, o que originará uma fermentação limitada, com baixa produção de álcool. O amido residual no mosto, para além de não fermentável pela levedura, origina turbidez no produto final. (10)

Após a brassagem, o mosto é transferido para um tanque de filtração onde o mosto é separado dos resíduos de malte (dreche). Apesar de ser um resíduo da indústria cervejeira, a dreche contém elevada quantidade de fibra alimentar, alguns açúcares e proteínas, podendo portanto ser ainda aproveitada para inúmeros fins, por exemplo alimentação animal e como fertilizante. Durante a filtração, as cascas do cereal, por ação da gravidade, depositam-se no fundo do tanque, formando-se um bolo de filtração que melhora a separação de partículas. (10)

Após a filtração, o mosto é fervido para esterilização, sendo adicionado o lúpulo (as inflorescências de *Humulus lupulus* L.). Durante a ebulição do mosto, o lúpulo liberta compostos designados por α -ácidos (humulona, co-humulona e adhumulona) e β -ácidos (lupulona, colupulona e adlupulona), sendo os α -ácidos a fração mais abundante. Por ação da temperatura da ebulição ou de processos anteriores para produção de produtos

processados à base de lúpulo como extratos, os α -ácidos são isomerizados tornando-os mais solúveis em soluções aquosas e com maior poder amargor. Os iso- α -ácidos (iso-humulona, iso-co-humulona e iso-adhumulona) são importantes para a preservação da cerveja pois tem atividade antibacteriana para bactérias gram-negativas, potenciais contaminantes da cerveja. (11) Os α -ácidos atuam nas bombas de iões das membranas celulares, reduzindo a força motriz de prótons (*proton motive force* - pmf). Assim sendo, a assimilação de nutrientes dependentes da pmf é impossibilitada, levando à morte celular. (12)

Após ebulição, o mosto pode também sofrer mais um processo de separação de resíduos. Este processo decorre num tanque *whirlpool*, onde o mosto é bombeado tangencialmente originando um fluxo rotacional, que permite separar os resíduos remanescentes de malte, mas principalmente de lúpulo (resinas, ceras, matéria vegetal), para clarificação do mosto. Nesta etapa é adicionado um segundo lúpulo, desta vez um lúpulo aromático, que liberta óleos essenciais que poderão contribuir para o aroma do produto final. (10,11) Seguidamente, o mosto é arrefecido (p.e. num permutador de placas) e transferido para uma cuba de fermentação. (10) A inoculação da levedura é efetuada na cuba de fermentação, que poderá demorar cerca de 5 dias a fermentar o mosto. Por anaerobiose, os açúcares são metabolizados em etanol e CO₂. Durante este processo, uma vasta gama de compostos voláteis são produzidos (principalmente álcoois e ésteres que irão contribuir para o *bouquet* de aroma da cerveja). (10) Os compostos voláteis do produto final podem ter diversas origens, quer seja nas matérias-primas (malte e lúpulo), quer seja provenientes do processo (principalmente do metabolismo da levedura, mas também do processo de pasteurização), ou do envelhecimento da cerveja, e dependendo do estilo da cerveja determinados grupos de compostos voláteis são mais perceptíveis que outros. (1,11,13,14) Em cervejas do estilo *Bohemian Pilsener* existe a presença de deduzidos níveis perceptíveis de diacetilo (normalmente considerado *off-flavour* noutros estilos) e ausência de ésteres com descritor de aroma frutado, ao contrário de cervejas do estilo *German Pilsener* que não possuem diacetilo nem ésteres frutados acima dos seus níveis de deteção sensorial mas contém ligeiras quantidades de dimetilsulfureto (DMS) acima do seu nível de perceção sensorial (DMS também considerado na maioria dos estilos como sendo um *off-flavour*). (3)

De seguida, inicia-se o processo de maturação da cerveja, que dependendo do estilo da cerveja, esta pode prolongar-se de 2 semanas a vários meses. Nesta etapa, as

leveduras metabolizam compostos associados a *off-flavours*, nomeadamente o diacetilo (aroma a manteiga), em que este é reduzido a acetoína e posteriormente a 2,3-butanodiol (pouca contribuição para o aroma). (1,13,15,16) Durante a maturação, há uma diminuição da temperatura (entre 0 °C e 4 °C) para promover a sedimentação das leveduras e a precipitação de material polimérico e de complexos proteína-polissacarídeo. Após o término do processo de clarificação, as leveduras são retiradas do fermentador. (10)

Em geral, após a maturação, a cerveja é filtrada e pasteurizada seguindo-se o seu embalamento, quer seja em garrafa, lata ou barril (*keg*). De salientar que em alguns estilos de cerveja, estas não são filtradas (p.e. estilo *weissbier*) ou pasteurizadas (comum em cervejeira artesanal). (10)

1.4.1. O mosto cervejeiro

O mosto cervejeiro é obtido após o processo de brassagem. A mistura do malte de cereal moído em água é aquecida para ativação das enzimas (α -amilase e β -amilase) presentes no malte, para degradação do amido em açúcares fermentáveis, sendo que são estabelecidos patamares de temperatura para ativação dessas enzimas. (10)

O mosto cervejeiro (substrato para a fermentação) é constituído por inúmeros nutrientes essenciais para o crescimento da levedura, e posteriormente para uma fermentação adequada, nomeadamente: açúcares, fontes de azoto (proteínas, aminoácidos, amónia), lípidos, compostos de enxofre, oxigénio dissolvido, fosfatos e outros compostos inorgânicos. Estes nutrientes têm determinados níveis de concentração mínimos no mosto, os quais se encontram descritos na Tabela 1. (10,17)

Tabela 1 – Nutrientes presentes no mosto essenciais para a fermentação alcoólica. Adaptado de (17).

Nutriente	Concentração (mg/mL)
Açúcares fermentáveis totais	67,8 - 95,6
Açúcares totais	92,6 - 128,1
Aminoácidos livres (FAN)	0,20 - 0,25
Azoto total	0,90 - 1,09
Lípidos totais	0,05 - 0,06
Fosfato total	0,64 - 1,02
Enxofre total	64,8 - 100 (µg/L)
Outros compostos inorgânicos	Concentração (ppm)
Sódio	10 - 180
Potássio	410 - 565
Cálcio	27 - 61
Cobre	0,1 - 7,2
Ferro	0,37 - 0,46
Zinco	0,06 - 0,54
Vitaminas	Concentração (µg/100 mL)
Biotina	0,85 - 1,15
Ácido fólico	10 - 13
Inositol	1,8 - 6 (mg/100 mL)
Ácido nicotínico	0,8 - 1,75 (mg/100 mL)
Ácido pantoténico	45 - 98
Piridoxina	58 - 105
Riboflavina	33 - 90
Tiamina	28 - 75

De seguida, descrevem-se os nutrientes mais importantes na avaliação do mosto cervejeiro.

1.4.1.1. Açúcares

Em conjunto com as fontes de azoto, os açúcares são os nutrientes com maior influência e impacto na performance da levedura. Estes são a fonte de carbono e energia das leveduras, e provêm da brassagem. Na Tabela 2 estão descritos os açúcares normalmente presentes no mosto, com as suas concentrações mais usuais. (17)

Tabela 2 – Açúcares presentes no mosto cervejeiro e suas usuais concentrações. Adaptado de (17).

Açúcar	Concentração (mg/mL)
Frutose	1,0 - 9,7
Glucose	5,0 - 14,7
Sacarose	1,0 - 5,3
Maltose	38,9 - 57,8
Maltotriose	11,4 - 17,7
Açúcares fermentáveis totais	67,8 - 95,6
Maltotetraose	2,0 - 12,7
Oligossacarídeos > 4 unidades glucose	19,5 - 29,4
Maltodextrinas totais	23,0 - 42,1
Açúcares totais	92,6 - 128,1
Açúcares (% extrato total)	90 - 92

Os açúcares fermentáveis correspondem a cerca de 62-68 % da matéria seca do mosto. Contudo, devido à grande variedade de estilos de cerveja, estas concentrações podem variar muito entre estilos. Na Tabela 3 estão descritas as concentrações usuais para uma cerveja *lager* de estilo alemão. (17)

Tabela 3 – Concentrações de açúcares presentes numa cerveja *lager* alemã. Adaptado de (17).

Açúcar	Concentração (mg/mL)
Frutose	3,9
Glucose	14,7
Sacarose	4,6
Maltose	57,8
Maltotriose	14,6
Açúcares fermentáveis totais	95,6

As maltodextrinas (que incluem todos os açúcares com cadeias de glucose até 10 unidades) não são assimiláveis pela levedura, sendo consideradas açúcares não fermentáveis. (10,18)

1.4.1.2. Aminoácidos

Os aminoácidos (aa) ou também descritos como FAN (do inglês *Free Amino Nitrogen*) são de máxima importância, pois são necessários para a biossíntese de novas leveduras.(10)

Para a sua adequada performance e morfologia, a levedura consome entre 100 e 140 mg FAN/mL de mosto. A prolina é um dos aminoácidos maioritários presentes no mosto, contudo não é facilmente assimilada pela levedura. Assim, a concentração de FAN no mosto deve ser de 200 a 220 mg/mL, correspondendo a cerca de 12 % da matéria seca do mosto. Os vários aminoácidos são então classificados pelo seu grau de assimilação em grupo A, B C e D, como descrito na Tabela 4. (17)

Tabela 4 – Grupos de assimilação de aminoácidos (e amónia) pela levedura. Adaptado de (17).

Grupo A Assimilados primeiramente e mais rapidamente.	Grupo B Assimilados mais lentamente que os aa do grupo A.	Grupo C Assimilados mais lentamente que os aa dos grupos A e B.	Grupo D Apenas lentamente utilizados.
Ácido Glutâmico Ácido Aspártico Asparagina Glutamina Serina Treonina Lisina Arginina	Valina Metionina Leucina Isoleucina Histidina	Glicina Fenilalanina Triptofano Tirosina Alanina Amónia	Prolina

1.4.1.3. Zinco

O zinco é um elemento importante para a levedura durante o processo de fermentação e propagação. Contudo este encontra-se em quantidade deficiente no mosto cervejeiro. (1,17,19)

O zinco é essencial para a estrutura e função de mais de 300 enzimas, sendo que uma dessas enzimas é a álcool desidrogenase envolvida na última reação enzimática na fermentação alcoólica (ponto 5 na Figura 2), na conversão do etanal (acetaldeído) em etanol. (1) O zinco é também essencial na redução do diacetilo em acetoína por ação da diacetilo reductase. (20)

Apenas 20 % do zinco presente no malte é extraído para o mosto, sendo que durante o processo de brassagem, este valor baixa consideravelmente. (17) Uma deficiência na concentração de zinco tem como principais consequências: 1) Crescimento retardado da levedura; 2) Fermentação lenta; 3) Redução incompleta do diacetilo a acetoína. (10)

1.4.2. A levedura

Originalmente e baseando-se no seu comportamento de floculação, foram classificados dois tipos de leveduras: levedura de fermentação alta (*ale* e *weiss*) e leveduras de fermentação baixa (*lager*). O seu comportamento é tão distinto que os dois tipos principais de cerveja são baseados no comportamento da levedura, existindo cervejas *ale* e cervejas *lager*. (1)

As leveduras *ale* (similares às leveduras *weiss*) são geneticamente mais diversas e fermentam a temperaturas mais altas, entre os 18 e os 24 °C. (1) As leveduras *weiss* produzem cervejas com aromas a especiarias, cravinho, baunilha e noz-moscada devido à presença do gene POF (PAD1). (1) As leveduras *lager* são menos diversas que as leveduras *ale* e fermentam a temperaturas mais baixas, entre os 8 e os 14 °C. (1)

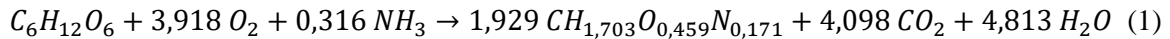
Estes tipos de leveduras diferenciam-se fenotipicamente pela sua morfologia (p.e. ao microscópio ótico as leveduras *weiss* aglomeram-se entre si em cadeias alongadas) e características fermentativas (floculação, perfis de aroma). (1)

Atualmente, e apesar dos avanços tecnológicos no estudo de genomas, a taxonomia de estirpes de levedura continua confusa e problemática, sendo portanto muitas vezes generalizado na indústria (e neste trabalho) a levedura cervejeira como sendo *Saccharomyces cerevisiae*. (1)

As espécies de *Saccharomyces sensu stricto* contêm algumas das mais importantes espécies de microrganismos na indústria alimentar. Nomeadamente a *S. cerevisiae* na produção de vinho, pão, *sake*, cervejas *ale* e *weiss*; a *S. bayanus* responsável pela fermentação de vinhos e cidras e a *S. pastorianus* na fermentação de cervejas *lager*. Relativamente à *S. pastorianus* (ou *S. carlsbergensis*), é uma estirpe híbrida, sendo que se assume que a sua origem deveu-se a cruzamentos ocorridos de forma natural entre uma estirpe de *S. cerevisiae* e uma estirpe não-*S. cerevisiae*, provavelmente uma estirpe de *S. bayanus*. A existência de dois genomas distintos em estirpes de leveduras *lager* foi confirmada por Rainieri *et al.* (1,21)

1.4.2.1. Metabolismo da levedura

O processo de respiração celular permite a obtenção de energia necessária para o metabolismo das leveduras. Na respiração, as leveduras degradam a glucose na sua totalidade em água e dióxido de carbono, como descrito na equação macroquímica do crescimento microbiano, neste caso *S. cerevisiae* em glucose (Equação 1).



A respiração é o processo, e via metabólica, mais eficaz no que diz respeito à produção de energia através da decomposição da glucose, sendo que nenhuma outra via tem um rendimento superior a este. (10) Contudo, a levedura é capaz de crescer em meio anaeróbico, convertendo o açúcar também em álcool e dióxido de carbono (Figura 2). Nesta via, a produção de energia é menor que na respiração. (1,22)

Nas duas vias, a degradação da glucose (ou outros açúcares assimiláveis pela levedura) requer um conjunto de reações enzimáticas sucessivas. Essas enzimas localizam-se dentro da célula em estruturas celulares específicas. Enquanto a glicólise e a fermentação alcoólica ocorrem no citoplasma, a respiração ocorre na mitocôndria. Para além destas estruturas, proteínas específicas que integram a parede celular, permitem o transporte dos substratos e produtos para dentro e fora da célula. (10)

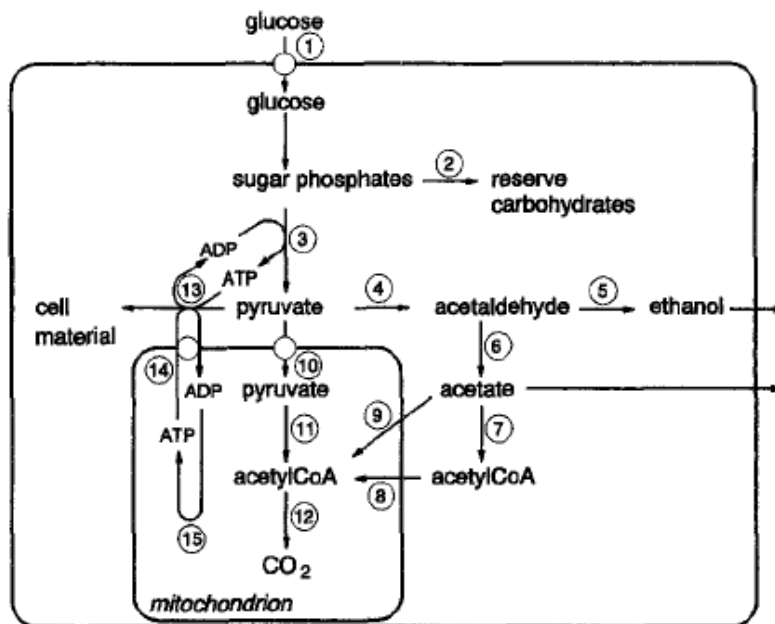


Figura 2 – Representação esquemática do metabolismo da glucose na levedura. (1) Transporte da glucose: difusão facilitada ou transporte ativo; (2) Formação do glicogénio e da trealose; (3) Glicólise; (4) Piruvato descarboxilase; (5) Álcool desidrogenase; (6) Acetaldeído desidrogenase; (7) Síntese do acetyl-CoA (citoplasma); (8) Transporte da acetyl-CoA para a mitocôndria via carnitina; (9) Transporte do acetato para a mitocôndria e formação da acetyl-CoA via síntese de acetyl-CoA mitocondrial; (10) Transporte do piruvato mitocondrial; (11) Complexo piruvato desidrogenase; (12) Ciclo do TCA; (13) Assimilação do piruvato no material celular iniciada pela piruvato carboxilase; (14) Translocador ADP/ATP; (15) Formação de ATP via fosforilação oxidativa. Adaptado de (19)

1.4.3. Fermentação

A fermentação começa com a conversão da glucose, através da glicólise, em piruvato. Dependendo das condições de anaerobiose ou aerobiose, a levedura prossegue para a fermentação ou para o ciclo de Krebs, respetivamente. Durante a fermentação, o piruvato é convertido via acetaldeído em etanol e dióxido de carbono. (1)

Devido às necessidades de sedimentação e recuperação de levedura, libertação de *off-flavours* e manutenção (ou recuperação) do dióxido de carbono, os sistemas de fermentação foram evoluindo ao longo do tempo. Os *designs* originais eram baseados nas propriedades da levedura (fermentações altas ou baixas), no estilo da cerveja, na tradição e na disponibilidade de materiais de construção. Existem vários tipos de fermentadores, desde fermentadores quadrangulares abertos ou fechados até tanques cilíndricos horizontais ou verticais. Atualmente, os fermentadores cilíndricos (em inglês *cylindroconical vessels* – CCVs) são os mais usuais e populares para fermentações *batch*. Estes reatores são constituídos por um cilindro vertical fechado no topo, com uma base em forma de cone, todo ele em aço inoxidável (usualmente). Os CCVs tornaram-se os reatores mais usados e preferidos na indústria cervejeira moderna devido ao seu baixo custo (custo do investimento e operacionalização), eficiência (menos desperdícios de cerveja, maior volume útil do reator, fácil recolha de CO₂ e limpeza por sistema de CIP (do inglês *Clean In-Place*)) e menor área utilizada para o mesmo volume (p.e. comparativamente a tanques de fermentação quadrangulares abertos). As propriedades do aço inoxidável tornam os CCVs robustos, inertes, resistentes à corrosão, de fácil manutenção e limpeza, e têm boa condutividade térmica (ideal para controlo da temperatura de fermentação p.e.). (1,10)

Os princípios base de construção e operacionalização dos CCVs podem ser transpostos para sistemas de propagação.(7)

1.5. Propagação

O processo de propagação de leveduras pode ser descrito como o processo pelo qual uma estirpe de levedura é escolhida, retirada do seu armazenamento, e colocada em condições adequadas ao seu crescimento (aerobiose) até atingir um número de células em quantidade suficiente para a fermentação de determinado volume de mosto. Essa quantidade de levedura inicial, o inóculo do fermentador, trata-se da geração zero e tem de estar livre de contaminantes e em condições fisiológicas adequadas. (1,23)

Apesar de habitualmente se fazerem reutilizações de levedura após cada

fermentação, há necessidade de ter leveduras novas propagadas (geração zero) de modo a garantir o uso de culturas puras, livres de microrganismos contaminantes; remediar as alterações metabólicas, morfológicas e genéticas após sucessivas recuperações (mutações causadas pelo envelhecimento de culturas e por ação do *stress* alcoólico), e prevenir problemas de performance fermentativa das leveduras. (23)

O armazenamento de leveduras (ou a sua origem) pode ser diverso, desde culturas em placas, a culturas preservadas em azoto líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. O método de armazenamento depende das necessidades de integridade da cultura, facilidade de utilização e transporte. (1)

A propagação de leveduras divide-se normalmente em duas etapas distintas tendo em conta o volume utilizado para *scale-up* da cultura microbiana: propagação em laboratório e propagação em cervejaria/fábrica. Tendo como objetivo final obter leveduras em boas condições fisiológicas e em quantidade suficiente para a fermentação do mosto, em ambas as etapas deve-se favorecer o crescimento microbiano, certificando-se que todas os requisitos são preenchidos (condições de higiene, oxigenação, mistura, fornecimento de nutrientes). A propagação em laboratório é iniciada aquando da inoculação de balões *Erlenmeyer* (~ 200 mL) com a cultura armazenada em placas ou em azoto líquido. O volume dos reatores é aumentado sucessivamente até obter quantidade de leveduras suficiente para a inoculação de frascos de *Carlsberg* (~ 25 L). Na propagação em fábrica, sabendo-se a quantidade final de levedura necessária para realização das fermentações é preciso calcular-se os fatores de *scale-up* adequados, normalmente maiores que 1 e menores ou iguais a 5, correspondendo ao aumento do volume do reator seguinte (p.e. se tivermos um propagador inicial de 100 L, o seguinte deverá ter um volume superior compreendido entre 1+ e 5 vezes mais). Deste modo procede-se ao *design* e determinação dos volumes dos reatores, sucessivamente superiores. (6) É necessário também ter-se em conta o rendimento máximo que cada propagador consegue atingir (concentração máxima de levedura e rendimento biomassa/substrato) para se dimensionar o sistema de propagação e *scale-up*. (1,7)

1.5.1. Parâmetros de controlo e nutrientes críticos

1.5.1.1. Oxigénio

O principal ponto de distinção entre o processo fermentativo e o processo de propagação é a presença de oxigénio, para que ocorra a respiração celular. Em aerobiose obtém-se o maior crescimento microbiano possível, pois é o processo metabólico mais eficiente para conversão dos açúcares em biomassa. (23) O oxigénio é também essencial para a síntese de esteróis e ácidos gordos insaturados. Estes estão incorporados na membrana celular das leveduras permitindo a sua fluidez para absorção de nutrientes, proteção contra *stress* osmótico e tolerância a elevadas concentrações de álcool no meio. (1,24) Os esteróis e os ácidos gordos insaturados são também necessários para a estabilidade das floculinas na superfície da célula, facilitando o processo de floculação das leveduras. (25)

Durante a propagação as leveduras necessitam de uma concentração mínima de oxigénio de 8 a 10 mg O₂/L. Em meio industrial, os modos de operação mais descritos relativamente aos períodos de oxigenação são os seguintes: intervalos de 1 e 2 minutos de oxigenação com 8 e 9 minutos sem oxigenação; intervalos de 1 minuto de oxigenação de 15 em 15 minutos no primeiro dia de propagação e de 1 minuto de oxigenação de 5 em 5 minutos no segundo dia e seguintes. (10)

1.5.1.2. Temperatura

A maioria das leveduras cervejeiras tem uma temperatura ótima de crescimento de 30 °C. Para leveduras *lager* a temperatura ótima de crescimento é de 27-30 °C e para leveduras *ale* pode chegar aos 30-35 °C. (10) A esta temperatura o processo de propagação ocorre de forma bastante mais rápida. (6) No entanto, tendo em conta que as temperaturas de fermentação da cerveja decorrem a temperaturas inferiores a 20 °C, é preferível o uso de temperaturas de propagação inferiores (a rondar os 15-20 °C) de modo a evitar o *stress* causado por choques de temperatura entre o meio de propagação e o de fermentação. As temperaturas elevadas levam à produção de elevadas concentrações de álcoois superiores e acetaldeído e baixas concentrações de ésteres, o que podem originar aromas indesejados na cerveja produzida na primeira fermentação após a propagação. Assim, deve-se baixar a temperatura de propagação de forma gradual até à temperatura de fermentação, de modo a diminuir a fase lag de crescimento microbiano nos fermentadores. (6), (10) É aconselhável que a temperatura de inoculação seja entre os 14 e os 16 °C. (10)

1.5.1.3. Nutrientes críticos

Como descrito anteriormente no ponto 1.4.1.2, os aminoácidos presentes no substrato são essenciais para a levedura na medida em que irão constituir as leveduras em multiplicação. Durante a multiplicação celular é necessário no mínimo uma concentração de 200-240 mg aminoácidos/L no meio. (10)

Também o zinco é essencial durante a fermentação e propagação de leveduras (ver ponto 1.4.1.3) e a sua concentração no meio de propagação deverá ser de 0,15 mg/L no mínimo. (10)

1.5.2. Importância e vantagens do uso de leveduras propagadas

A propagação de leveduras permite ao cervejeiro a constante disponibilidade de culturas puras de levedura em fase exponencial do seu crescimento, com taxas de viabilidade e vitalidade adequadas, permitindo um início de fermentação mais rápido ao diminuir a fase lag durante a fermentação e diminuindo a produção de *off-flavors*. (23)

Apesar da disponibilidade de levedura excedentária e apesar de haver a possibilidade de recuperar levedura após cada fermentação, essas recuperações e inoculações sucessivas de leveduras resultam numa deterioração da levedura. Essa deterioração da cultura pode ocorrer devido a vários fatores: 1) contaminação do inóculo com outras estirpes de leveduras, leveduras selvagens ou bactérias; 2) perda de propriedades da cultura fundamentais à fermentação (floculação, sedimentação, idade e tamanho das células); 3) diminuição da qualidade da levedura (alterações genéticas, mutações e alterações fisiológicas causadas pelo *stress*).

O *stress* imposto às leveduras durante as fermentações e o seu manuseamento pode inclusive causar a sua morte. (1,23) Foram identificadas duas razões para a morte celular: necrose e senescência. A necrose foi definida como a acumulação de danos irreparáveis em componentes intracelulares, comprometendo a integridade da célula, levando à sua morte e autólise. A senescência é a cessação de vida predeterminada resultante do envelhecimento da célula controlado geneticamente. Esta senescência foi provada na reutilização de leveduras na indústria cervejeira, tendo sido verificado que a vida média de uma levedura é de 10-30 divisões. (1) Existe assim a necessidade de inocular os fermentadores com levedura nova fresca para ultrapassar estas limitações da recuperação de leveduras.

A propagação de leveduras consegue ultrapassar as limitações inúmeras previamente. A única desvantagem associada à propagação de leveduras é o facto de ser necessário um investimento relativamente elevado em equipamento (principalmente para cervejeiras artesanais). Contudo, atualmente existem alternativas, seja o recurso a leveduras desidratadas ou até fermentações escalonadas (*fed-batch*). (1) Porém, vários estudos apontam problemas no uso de leveduras desidratadas. Inicialmente, estudos realizados concluíram que leveduras desidratadas tinham performances muito semelhantes às leveduras frescas. (26) Contudo, novos estudos evidenciaram que ao contrário de leveduras *ale* (que apresentaram resultados semelhantes quando desidratadas comparativamente a leveduras frescas), as leveduras *lager* eram afetadas pelo processo de desidratação, tanto ao nível de floculação, como de turvação na cerveja. Mais impressionantes foram os valores de viabilidade obtidos para estas leveduras, sendo a viabilidade das leveduras *lager* desidratadas 20 a 30 % inferior à das leveduras frescas, afetando negativamente a turvação e também a estabilidade da espuma. (27)

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização do mosto cervejeiro

Tendo em conta o objetivo deste trabalho e de modo a conhecerem-se as concentrações no mosto dos elementos determinantes ao crescimento da levedura, fez-se uma análise aos nutrientes disponíveis no mosto.

Para a determinação da concentração de açúcares livres (fermentáveis) procedeu-se a uma análise dos acetatos de alditol por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID, *Gas Chromatography Flame Ionization Detector*).

A concentração de aminoácidos foi determinada após derivatização, recorrendo à cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*). A concentração total de proteína solúvel foi determinada usando o método do ácido bicinconínico (BCA) e o azoto elementar total realizado por análise elementar.

A concentração de zinco no mosto foi determinada por espetrometria de absorção atómica.

2.1.1. Pré-tratamento das amostras de mosto

Centrifugaram-se as amostras de mosto recolhidas na cervejeira a 15000 rpm, durante 10 min a 4°C. Após centrifugação, recolheu-se o sobrenadante (Sn) e o precipitado (pp). As análises de zinco, de proteína solúvel e de açúcares livres foram realizadas no sobrenadante após centrifugação dos mostos.

2.1.2. Análise de açúcares

2.1.2.1. Acetilação dos açúcares livres do sobrenadante (Sn)

Para se poder proceder à quantificação dos açúcares livres adicionou-se às amostras um padrão interno, 2-desoxi-glucose na concentração de 1,005 mg/mL. (28) Os açúcares livres, nomeadamente os monossacarídeos e os oligossacarídeos no sobrenadante (Sn) foram então derivatizados adicionando 200 µL de solução de borohidreto de sódio (15 % (m/v) em NH₃ 3M) e foram incubados a 30 °C durante 60 min. O excesso de agente redutor foi destruído por adição de 100 µL de ácido acético glacial. A acetilação dos alditóis foi realizada adicionando 450 µL de 1-metilimidazol e 3,0 mL de anidrido acético. Deixou-se reagir durante 30 min a 30 °C. Após esse tempo, foi adicionada à solução 3,0 mL de água para decompor o excesso de anidrido acético e os acetatos de alditol foram extraídos com 5,0 mL de diclorometano. A fase de

diclorometano foi lavada duas vezes com 3,0 mL de água e evaporada até secagem completa.

Foram preparados os padrões de glucose, maltose, maltotriose (1 mg/mL) para a construção das curvas de calibração, para o cálculo dos fatores de resposta em relação ao padrão interno na análise por GC-FID (Anexo A). Estes padrões foram submetidos ao mesmo protocolo de redução e acetilação.

2.1.2.2. *Análise por GC-FID dos acetatos de alditol*

Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 µL acetona anidra e analisou-se por GC-FID com uma coluna capilar 400-5HT (25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,05 µm de espessura). (28) O programa usado foi: temperatura inicial de 100 °C, aumento de temperatura de 10 °C/min até 200 °C permanecendo durante 2 min, seguido de um aumento de 1,0 °C/min até 250 °C permanecendo durante 2 min e com um aumento linear final de 15 °C/min até 400 °C permanecendo durante 1 min. As temperaturas do injetor e do detetor foram de 300 °C e 400 °C respectivamente. O gás de arraste foi H₂ com um caudal de 1,7 mL/min.

2.1.3. *Análise de aminoácidos*

2.1.3.1. *Derivatização dos aminoácidos*

Adicionaram-se a 600 µL de amostra (Sn), 400 µL de etanol absoluto e 100 µL de L-norleucina (de concentração 0,1 mg/mL) como padrão interno. (29) À mistura adicionaram-se 100 µL de piridina e 50 µL de etilcloroformato. A mistura foi sonicada 60 s a 20 °C. De seguida adicionaram-se 300 µL de clorofórmio, 100 µL de NaOH (7M) e 50 µL de etilcloroformato. Agitou-se no vortex 30 s. Centrifugaram-se os tubos a 3000 rpm durante 3 min.

Após centrifugação descartou-se a fase aquosa dos tubos e à fase orgânica foi adicionado 100 mg de sulfato de sódio anidro.

2.1.3.2. *Análise por GC-qMS*

Os aminoácidos da amostra foram separados e analisados por GC-qMS com recurso a um cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra equipado com uma coluna capilar DB-1 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura). (29) A amostra foi injetada no injetor com um *split*

de 5 min a 250 °C. O programa de temperaturas utilizado foi: temperatura inicial de 70 °C a 10 °C/min até 260 °C e 20 °C/min até 300 °C permanecendo durante 10 min. O GC foi conectado com um detetor de massa quadrupolo. Os aminoácidos foram quantificados tendo em conta os fatores de resposta de cada aminoácido de acordo com as curvas de calibração (Anexo B).

2.1.4. Análise da proteína solúvel

Para determinação da proteína solúvel foi utilizado o método do ácido bicinconínico (BCA) com recurso a um kit da Sigma-Aldrich.

Foi preparado o reagente de BCA misturando 50 partes de solução de ácido bicinconínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em NaOH (0,1 M) com 1 parte de solução de sulfato de cobre (II) pentahidrato (4%) e agitou-se até obter a cor verde clara. Foram adicionadas a 1 parte de amostra (sobrenadante Sn do mosto), 8 partes de reagente de BCA. Foi utilizado um leitor de placas para as leituras de absorvância a 562 nm. Para cada amostra, colocaram-se 25 µL de amostra e 200 µL de reagente de BCA nos poços do leitor de placas. Procedeu-se de igual modo com os padrões de albumina de soro bovino (BSA) (Anexo C). A leitura da absorvância ocorreu após incubação a 37 °C durante 30 min.

2.1.5. Análise do azoto elementar

Para determinação da concentração de azoto elementar nas amostras procedeu-se a uma análise elementar (equipamento Truspec 630-200-200). A temperatura de combustão foi de 1075 °C e o método de deteção foi por condutividade térmica da amostra.

2.1.6. Análise do zinco

A concentração de zinco no sobrenadante (Sn) foi determinada por espectrometria de absorção atómica com chama. Devido à baixa concentração de zinco nas amostras, este foi quantificado pelo método da adição padrão (0-0,400 mg/L). Tanto os padrões como as amostras foram lidas diretamente a 213,9 nm com fluxo de acetileno.

2.2. Design do reator de propagação

Antes de proceder ao *design* do reator de propagação, foram definidos alguns parâmetros e o modo de operação. Definiu-se que o inóculo a usar seria levedura desidratada e usado mosto cervejeiro como meio nutricional. Foi ainda definido que numa fase inicial o modo de operação do reator seria em descontínuo (*batch*).

Tendo em conta o modo de operação procedeu-se então ao *design* do equipamento como apresentado na Figura 3.

Definiu-se que a geometria a implementar seria um tanque perfeitamente agitado, devido à facilidade de implementação e operacionalização e à flexibilidade do modo de operação (possibilidade de alterar o modo de operação futuramente para alimentação escalonada/*fed-batch* ou contínua). No *design* do reator cilíndrico (CCV) definiu-se ainda que o tipo de agitação seria mecânica utilizando uma turbina com 4 pás inclinadas a diferentes alturas (circulação de fluxo axial) (Figura 3, b e c). Tendo em conta o volume dos fermentadores industriais a inocular (2000 L), definiu-se que o volume útil de reação do propagador seria 300 L tendo o reator como volume total 500 L. Para o controlo de temperatura e devido ao facto da cervejeira possuir um sistema de refrigeração instalado, instalou-se uma camisa de arrefecimento interna no propagador (Figura 3, a). Para o método de arejamento foi decidida uma entrada de oxigénio (100 % oxigénio, em garrafa) simples abaixo das pás de agitação (Figura 3, B), para promover uma melhor dissolução do oxigénio no meio, definindo-se as entradas e saídas de substrato, oxigénio e biomassa.

Por fim definiram-se os parâmetros operacionais para controlo e monitorização da propagação: 1) pH; 2) temperatura; 3) tempo; 4) oxigenação; 5) agitação; 6) concentração celular; 7) consumo de açúcares (por determinação do ° Brix).



Figura 3 – A: projeto do reator de propagação (medidas em mm) com camisa de arrefecimento (a) e turbina (b); B: vista isométrica com corte do reator de propagação (saídas e entradas assinaladas) com turbina de 4 pás inclinadas (c); C: reator de propagação instalado.

2.3. Protocolo de propagação de leveduras

2.3.1. Protocolo de CIP

Foi executado um protocolo de CIP para limpeza e desinfecção das cubas de produção de mosto e do reator de propagação. A limpeza foi feita com uma solução aquosa de um detergente alcalino para aplicações em circuitos CIP de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio a 4 % (MIDA FLOW 110 da Christeyns). A solução foi recirculada pelo sistema durante 30 min a 70 °C. Após limpeza com o detergente alcalino, o sistema foi desinfetado durante 30 min a 20 °C com uma solução aquosa ácida de peróxido de hidrogénio, ácido peracético e ácido acético a 2 % (MIDA CHRIOX 5 da Christeyns).

2.3.2. Produção de mosto para propagação

De modo a integrar a produção do substrato para a propagação, à produção de cerveja, utilizou-se mosto cervejeiro como meio de crescimento no reator de propagação. Escolheram-se dois mostos para servir de meio de crescimento, mosto de cerveja loira e mosto de cerveja de trigo.

Para produzir um *batch* de 1000 L de mosto procedeu-se à produção de mosto com uma concentração superior em malte em relação ao mosto para produção de cerveja. Na Tabela 5 estão descritas as quantidades de malte utilizadas.

Tabela 5 – Quantidades de malte adicionadas na brassagem para produção do substrato para propagação e cerveja.

Mosto Loira		Mosto Trigo	
Tipo de Malte	Malte (kg)	Tipo de Malte	Malte (kg)
Pilsen	230,2	Pilsen	119,6
Ácido	4,5	Trigo	119,6
		Caramelo	5,2
		Ácido	5,2
V _{final} de mosto		1000 L	

De forma a esterilizar o substrato para a propagação, decidiu-se proceder à ebulição (mesmo processo de produção do mosto cervejeiro). Pelo facto dos α -ácidos presentes no lúpulo terem atividade antibacteriana (ajudando na preservação do mosto), decidiu-se que também seria adicionado lúpulo ao mosto para propagação. Assim sendo, as quantidades de lúpulo usadas na produção de mosto cervejeiro foram aumentadas de forma a contemplar a produção de substrato para a propagação. Na Tabela 6 estão

descritas as quantidades de lúpulo adicionadas na ebulição.

Tabela 6 – Quantidades de lúpulos adicionadas para produção do substrato para propagação e cerveja.

Mosto Loira		Mosto Trigo	
1º lúpulo Sladek	1,0 kg	1º lúpulo Perle	0,8 kg
2º lúpulo Sladek	0,4 kg		
2º lúpulo Saaz	0,4 kg		

Após a ebulição, procedeu-se à centrifugação por *whirlpool* para separação de partículas, onde se adicionaram os lúpulos de aroma e o sulfato de zinco (Tabela 7) como complemento ao défice de zinco no mosto (ver resultados obtidos em 3.1, pág. 33).

Tabela 7 – Quantidades de lúpulos e sulfato de zinco adicionados no *whirlpool* para produção do substrato para propagação e cerveja.

Mosto Loira		Mosto Trigo	
3º lúpulo Saaz	1,6 kg	3º lúpulo Perle	0,8 kg
Sulfato de Zinco	0,165 kg	Sulfato de Zinco	0,165 kg

Após a centrifugação por *whirlpool* adicionaram-se 300 L de mosto quente para o propagador, garantindo a esterilização do propagador (previamente esterilizado por CIP).

Após trasfega do mosto quente para o propagador, ligou-se o controlo de temperatura e agitação, deixando arrefecer *overnight* até à temperatura estabelecida como temperatura de propagação, 15 °C ou 20 °C dependendo do teste a realizado.

2.3.3. Inoculação do propagador

Após arrefecimento do mosto e ser atingida a temperatura de propagação, procedeu-se à inoculação do propagador com a levedura a multiplicar.

Hidrataram-se 500 g de levedura desidratada de acordo com o protocolo do fornecedor: foram adicionados num recipiente desinfetado 5 L de água tépida, entre os 21 e 25°C (para leveduras *lager*) e entre os 25 e 29 °C (para leveduras *ale*). Deixou-se repousar durante 15 a 30 min. Agitou-se o recipiente para homogeneização da suspensão de leveduras.

Fez-se a análise das leveduras do inóculo como descrito nos pontos a) e b) de 2.3.4,

pág. 28. Inoculou-se o propagador com os 5 L de suspensão de levedura.

2.3.4. Propagação e amostragem

Os parâmetros testados para avaliar o crescimento da levedura foram: oxigenação, temperatura e agitação.

Os testes de otimização do reator foram feitos com uma levedura *lager* e mosto de cerveja loira variando-se a oxigenação e temperatura de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8 – Descrição dos parâmetros a variar para os testes de propagação com levedura *lager*.

Teste	Oxigenação	Velocidade de agitação	Temperatura
1	1º dia 1 min de 15 em 15 min 2º dia 1 min de 5 em 5 min	30 rpm contínuo	15 °C
2	1 min oxigenação 9 min pausa	30 rpm contínuo	15 °C
3	1 min oxigenação 9 min pausa	30 rpm contínuo	20 °C das 0 h às 48 h 15 °C das 48 h às 72 h 12 °C (temperatura de fermentação) das 72 h às 120 h

A monitorização da propagação da levedura foi efetuada por diferentes metodologias, sendo que para tal foram recolhidas amostras a cada ~12 h. Foram analisados os seguintes parâmetros:

a) Concentração de levedura total (cel/L): por contagem em microscópio ótico (Omegon) com recurso a uma Câmara de Neubauer (Zuzi).

b) Taxa de viabilidade (%): por contagem em microscópio ótico (Omegon) com recurso a uma Câmara de Neubauer (Zuzi) após coloração de leveduras mortas com azul de metileno 1,5 % (Sigma-Aldrich).

c) Concentração de sólidos solúveis totais (° Brix), como estimativa da quantidade de açúcares: com recurso a um refratómetro (HI96813 da Hanna Instruments) medindo a percentagem de sólidos suspensos.

d) Temperatura: com recurso à sonda instalada no propagador (modelo 905626244 da Bresimar).

e) pH: com recurso a um potenciómetro (elétrodo digital edge® de pH HI11310 da Hanna Instruments).

Após obtenção da concentração de levedura esperada (entre $3,62 \times 10^{11}$ e $4,56 \times 10^{11}$ cel/L – concentrações para inoculação de 3 fermentadores de 2000 L) manteve-se a agitação e oxigenação e inocularam-se as cubas de fermentação (aproximadamente 100 L de inóculo em cada cuba).

2.4. Determinação dos parâmetros de análise dos testes de propagação

2.4.1. Determinação da taxa específica de crescimento microbiano

Para a determinação da taxa específica de crescimento máximo da levedura ($\mu_{\text{máx}}$) calcularam-se os declives das retas de tendência correspondentes à fase exponencial da cultura, nas curvas de crescimento microbiano de acordo com a equação 2 (Anexo D).

$$\ln(X) = \mu t + \ln(X_0) \quad (2)$$

Em que,

X é a concentração de biomassa;

μ é a taxa específica de crescimento da biomassa;

t é o tempo;

E X_0 é a concentração de biomassa no tempo $t=0$.

2.4.2. Determinação do tempo de duplicação

Tendo como base a equação 1, determinou-se o tempo de duplicação (t_D) de cada teste realizado segundo a equação 3.

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (3)$$

2.4.3. Determinação do rendimento da propagação

O fator de rendimento ($(Y_{X/S})_{\text{obs}}$) de cada teste de propagação foi calculado segundo a equação 4.

$$(Y_{X/S})_{\text{obs}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (4)$$

Em que,

$(Y_{X/S})_{\text{obs}}$ é o fator de rendimento expresso em cel/g de substrato;

ΔX é a variação da biomassa (levedura) expressa em cel/L determinada pela equação

5.

$$\Delta X = X_{final} - X_{inicial} \quad (5)$$

E ΔS é a variação do substrato (açúcares presentes no mosto) expresso em g/L determinada pela equação 6.

$$\Delta S = S_{final} - S_{inicial} \quad (6)$$

Dado que não se dispunham de meios para quantificar açúcares na cervejaria, e dada a importância do cálculo do fator de rendimento para comparação dos resultados de cada teste de propagação, fez-se uma aproximação da concentração de açúcares a partir do teor em sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) medidos. Sabendo que o $^{\circ}$ Brix indica a percentagem de sólidos no mosto assumiu-se que os sólidos solúveis na solução fossem majoritariamente açúcares.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do mosto cervejeiro

Como descrito anteriormente foram analisados os mostos de cerveja loira e trigo de forma a quantificar os seus nutrientes (açúcares, fontes de azoto e zinco). Esta quantificação permitiu saber se os mostos continham os nutrientes em concentrações adequadas à fermentação e à propagação de leveduras (Tabela 9). Os valores de referência para a fermentação são referentes a um mosto de cerveja *Lager* estilo alemão (17) por se aproximar mais ao estilo da cerveja loira da empresa.

Tabela 9 – Comparação das concentrações dos nutrientes essenciais ao crescimento de leveduras presentes nos mostos em estudo com valores referência para propagação de leveduras e fermentação alcoólica.

Nutriente	Mosto Trigo	Mosto Loira	Referência Propagação (10)	Referência Fermentação (17)
[açúcares] (mg/mL)				
Glucose	12,5	13,9	-	14,7
Maltose	85,1	77,7		57,8
Maltotriose	7,6	9,9		14,6
TOTAL	105,2	101,4		95,6
[aa] _{livres} (mg/mL)	1,5	1,6	0,200-0,240	0,200-0,220
[proteína] _{solúvel} (mg/mL)	11,9	15,7	-	-
[N] _{elementar} (mg/mL)	1,111	1,048	-	-
[zinco] (mg/L)	0,068	0,123	0,15	0,10-0,15

Verifica-se que tanto no mosto de trigo e de loira, a concentração de glucose é inferior aos valores referência (12,5 e 13,9 mg/mL respetivamente). Contudo, obtiveram-se 85,1 mg/mL de maltose para o mosto de trigo e 77,7 mg/mL para o mosto de loira., sendo que estes valores são bastante superiores ao valor referência (57,8 mg/mL). Relativamente à maltotriose obteve-se uma concentração de 7,6 mg/mL e 9,9 mg/mL para o mostro de trigo e de loira, respetivamente. Estes valores estão também abaixo do valor de referência de 14,6 mg/mL.

Relativamente à concentração total de açúcares fermentáveis (somatório das concentrações de glucose, maltose e maltotriose), verifica-se uma concentração de 105,2 mg/mL e 101,4 mg/mL para o mostro de trigo e loira, respetivamente. Este valor é superior ao valor referência de 95,6 mg/mL permitindo concluir que os dois mostos estudados têm açúcares na sua composição em concentrações suficientes para uma correta fermentação. As diferenças de valores entre alguns tipos de açúcares podem justificar-se por diferentes quantidades e diferentes tipos de malte que são utilizados na receita da cerveja (malte Pilsen, malte caramelo, malte de trigo, etc.). (9,10) MacWilliam et al. (1968) descreve que as diferentes temperaturas de brassagem influenciam as concentrações de cada tipo de açúcar (17); para além disso, diferentes

tempos e temperaturas de brassagem e o pH do mosto influenciam também a ação das α e β -amilases. (8) Assim, um patamar de temperatura entre os 70 e 75 °C muito curto provocará uma atividade enzimática da α -amilase muito restrita resultando numa maior produção de maltotriose na hidrólise do amido. Ao prolongar-se este patamar de temperatura permite-se que a enzima hidrolise de forma mais extensa o amido formando açúcares menor grau de polimerização, a glucose. (30)

Analisando os açúcares livres, monossacarídeos e oligossacarídeos (Tabela 9) observou-se também que a brassagem executada tem um rendimento satisfatório, não tendo detetado picos nos cromatogramas referentes a açúcares não fermentáveis (p.e. maltotetraose). Assim observa-se que a hidrólise do amido pelas α -amilase e β -amilase durante o processo de brassagem é extensa produzindo na sua grande maioria açúcares fermentáveis (mono, di e trissacarídeos de glucose).

Uma vez que as fontes de azoto são fundamentais para o normal funcionamento e multiplicação de leveduras, foram quantificadas as suas possíveis proveniências do mosto (aminoácidos livres, proteína solúvel e azoto elementar). (10) Na quantificação de aminoácidos livres obtiveram-se concentrações de 1,47 mg/mL no mosto de trigo e 1,55 mg/mL no mosto de loira. Estes valores são muito mais elevados que os valores referência, tanto para a propagação, como para a fermentação (mínimo de 0,200 mg/mL em ambos os processos). (10,17) Relativamente à concentração de proteína solúvel, esta variou entre 11,9 mg/mL e 15,6 mg/mL, para o mosto de trigo e de loira, respetivamente. Na quantificação de azoto elementar obtiveram-se concentrações de 1,1 mg/mL no mosto de trigo e 1,0 mg/mL no mosto de loira. Pela estimativa de concentração de proteína, multiplicando a concentração de azoto elementar pelo fator de Kjeldahl (6,25), verifica-se que a concentração de proteína solúvel está sobrestimada, pois não está concordante com a concentração de azoto elementar, tendo em conta o uso deste fator. Esta diferença poderá justificar-se pelo fato de a determinação da concentração de proteína solúvel pelo método do BCA ter interferentes, nomeadamente compostos fenólicos. (31)

Na quantificação de zinco, elemento normalmente deficitário no mosto, determinou-se uma concentração de 0,068 mg/L no mosto de trigo e 0,123 mg/L no mosto de loira. É essencial que o mosto tenha uma concentração entre 0,10 e 0,15 mg/L no processo fermentativo, e 0,15 mg/L no processo de propagação. (10,17) Assim, verificou-se que o mosto de trigo tem uma carência em zinco (0,068 mg/L) e o mosto de loira não tem zinco em quantidades suficiente para a propagação (0,123 mg/L). Devido a este facto,

foi necessário suplementar os dois mostos com zinco, sendo que foram suplementados com sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ da PanReac AppliChem ITWReagents) na concentração de 0,15 mg/L.

Pode-se então concluir que, regra geral, os dois mostos (mosto de cerveja de trigo e mosto de cerveja loira) têm nutrientes em concentrações suficientes e adequadas tanto para a fermentação como a propagação de leveduras, com exceção da concentração em zinco.

3.2. Propagação de levedura

3.2.1. Análise do crescimento microbiano

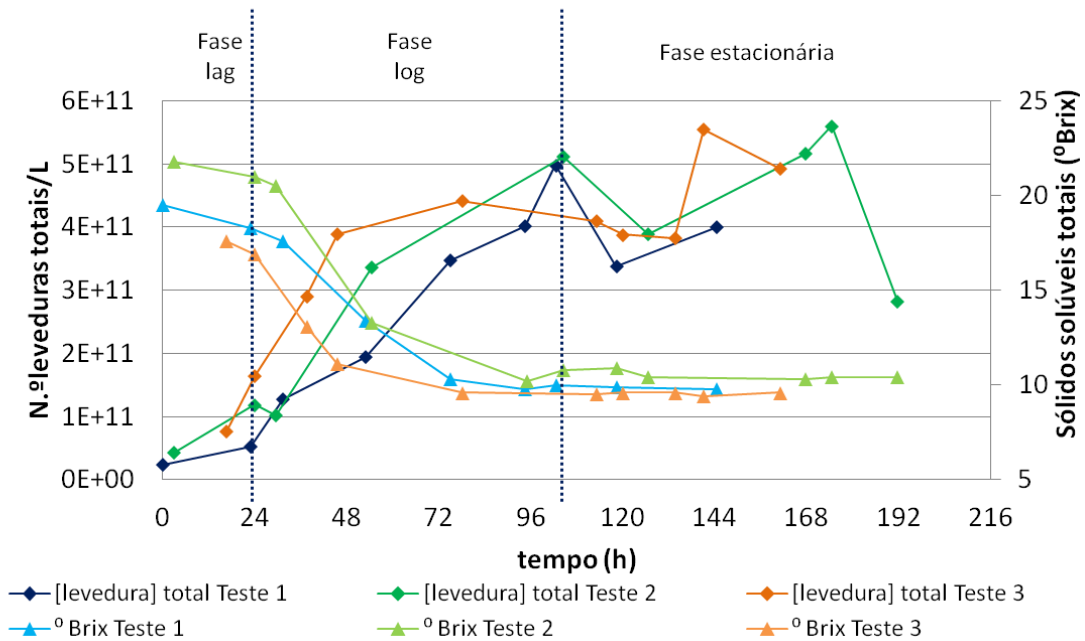
Realizaram-se três ensaios de propagação, como descrito no ponto 2.3, onde se avaliou o crescimento da levedura.

O teste de propagação 1 (Figura 4 (azul) e Tabela 10) foi realizado a 15 °C com maior oxigenação, atingiu uma concentração máxima de levedura total de $5,18 \times 10^{11}$ cel/L, e uma concentração máxima de levedura viável de $4,98 \times 10^{11}$ cel/L (com 96,1 % de taxa de viabilidade) ao fim de cerca de 100h de propagação. Neste teste foi possível ainda atingir uma taxa de viabilidade de 99,0% por volta das 140h de propagação.

No teste de propagação 2 (Figura 4) (verde)), realizado a 15 °C mas com menor oxigenação, obteve-se uma concentração máxima de levedura total de $5,60 \times 10^{11}$ cel/L e uma concentração máxima de levedura viável de $4,85 \times 10^{11}$ cel/L (com 86,6% de taxa de viabilidade) ao fim de cerca de 170 h de propagação. Ao fim de cerca de 90 h de propagação, neste teste atingiu-se uma taxa de viabilidade de 93,7 %.

No teste de propagação 3 (Figura 4 (laranja)), com menor oxigenação e realizado a 20 °C nas primeiras 48 h de propagação e decréscimo gradual da temperatura até aos 12 °C (correspondendo à temperatura de fermentação), obteve-se uma concentração máxima de levedura total de $5,54 \times 10^{11}$ cel/L e uma concentração máxima de levedura viável de $5,02 \times 10^{11}$ cel/L (com 90,6 % de taxa de viabilidade) ao fim de cerca de 140 h de propagação. Ao fim de cerca de 120 h de propagação, neste teste atingiu-se uma taxa de viabilidade máxima de 93,3 %.

A Crescimento microbiano e consumo de açúcares ao longo da propagação



B Variação da taxa de viabilidade das leveduras

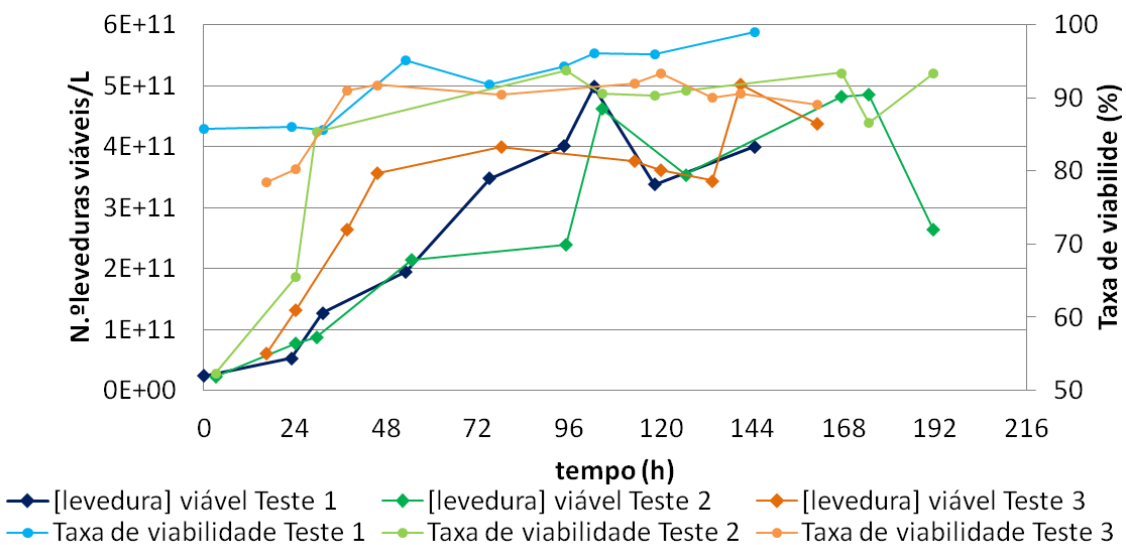


Figura 4 – A: Variação da concentração de levedura total e sólidos solúveis totais (°Brix) ao longo do tempo de propagação nos três testes realizados. B: Variação da concentração de levedura viável e taxa de viabilidade ao longo do tempo de propagação nos três testes realizados.

Tabela 10 – Concentrações de levedura, taxas de viabilidade e taxas específica de crescimento máximos e tempos de duplicação atingidos nos testes de propagação realizados.

Teste	[levedura] _{total máx} (cel/L)	[levedura] _{viável máx} (cel/L)	Taxa		$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	r ²	t _D (h)
			viabilidade inóculo (%)	viabilidade máxima (%)			
1	5,18×10 ¹¹	4,98×10 ¹¹	85,8	99,0	0,018	0,968	38,5
2	5,60×10 ¹¹	4,85×10 ¹¹	52,3	93,7	0,020	0,851	34,7
3	5,54×10 ¹¹	5,02×10 ¹¹	78,4	93,3	0,053	0,950	13,1

Analisando a Figura 4, podem-se identificar as várias fases do crescimento da levedura. Poderá então assumir-se que a fase lag do crescimento das leveduras no propagador ocorreu durante as primeiras 24 h de propagação para os testes 1 e 2. Contudo no teste 3 a fase lag foi reduzida em 6 h devido à temperatura superior (20 °C). Após este período, a levedura manteve-se em fase log ou exponencial até às cerca de 100 h de propagação (cerca de 4 dias aproximadamente) nos teste 1 e 2. No teste 3 após 48 h de propagação a fase log terminou, havendo um abrandamento da velocidade de multiplicação da levedura, momento em que a temperatura de propagação diminuiu para os 15 °C. Assim, é possível concluir-se que para uma temperatura de propagação superior, as leveduras conseguem multiplicar-se a uma velocidade superior. (10,19) Este facto vem confirmar-se pela determinação da taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) a partir dos declives das retas de tendência na fase log. No teste 1 obteve-se uma taxa específica de crescimento de 0,018 h⁻¹, no teste 2 foi de 0,020 h⁻¹, e no teste 3 foi de 0,053 h⁻¹. Este valor significa que na fase log do teste 3, a velocidade de divisão das leveduras era de 0,053 por hora, sendo este o valor obtido mais elevado. Pode-se prever que se se prolongasse no tempo o teste 3 a uma temperatura de 20 °C, poderia ter-se obtido uma concentração de levedura superior no final da fase log deste teste.

Após a realização do teste 1 e 2 e devido aos resultados serem muito semelhantes na concentração de levedura obtida, fixou-se a oxigenação para o teste 3 nas seguintes condições: 1 min de oxigenação a cada 10 min de propagação.

Após a fase exponencial, a taxa de morte e a taxa de multiplicação das leveduras igualaram-se, entrando as leveduras em fase estacionária após cerca de 96 h de propagação nos teste 1 e 2 e após cerca de 72 h no teste 3. Quando a taxa de morte é superior, finda a fase estacionária e começa a fase de morte ou declínio. No estudo realizado não se conseguiu identificar com certezas esta fase.

Para o cálculo do volume de levedura a inocular no mosto para a produção da cerveja, foram usadas as informações das fichas técnicas das leveduras comerciais (2,28×10¹⁰ cel/L). Contudo, sabe-se que para a fermentação ocorrer corretamente é

necessário uma concentração de levedura de $1,81 \times 10^{10}$ cel/L. (10)

Fazendo o cálculo da equação 6:

$$V_{inóculo} = \frac{[levedura]_{fermentação} \times V_{fermentador}}{[levedura]_{máx\ propagador}} \quad (6)$$

pode-se concluir que o período de propagação deverá ser apenas entre 48 h e 100 h para se obter um inóculo de levedura com viabilidade máxima e com uma concentração de leveduras adequada à fermentação. Ao fim desse tempo de propagação, obtém-se inóculo para cerca de 60 a 80 hL de mosto para produção de cerveja.

Nos teste 1 e 2, obtiveram-se tempos de duplicação da cultura de leveduras muito próximos, 38,5 h e 34,7 h respetivamente. Contudo no teste 3 obteve-se um tempo de duplicação bastante menor, 13,1 h. Como o objetivo inicial era obter uma multiplicação de 4 vezes poderá concluir-se que ao fim de 24-30 h de propagação obtém-se a quantidade total de levedura suficiente para a inoculação de um fermentador de 2000 L. Contudo deve ter-se em conta o volume de inóculo necessário, ou seja, com uma multiplicação de 4 vezes a concentração inicial, o volume de inóculo necessário seria de 300 L pois a levedura estaria totalmente suspensa no meio. A quantidade de meio a ser usado como inóculo poderá ter influência nas qualidades organolépticas da cerveja, uma vez que teria de se adicionar 300 L num fermentador de 2000 L, uma quantidade superior aos 5-10 % normalmente utilizados como inóculo. Para além disso, é importante não desprezar a forte oxigenação a que este meio foi submetido durante a propagação, encontrando-se no final deste fortemente oxidado e alterado. (32,33) Assim, com vista a ultrapassar este problema, é necessário haver uma propagação mais extensa como a realizada neste estudo. O resultado final deverá ser uma suspensão de leveduras suficientemente concentrada para que o inóculo seja o menor volume possível. Nos testes realizados obtiveram-se inóculos entre 50 e 100 L.

Na Tabela 10 pode-se também observar de que forma a taxa de viabilidade das leveduras aumentou em relação ao inóculo de levedura desidratada usado. No teste 1 a taxa de viabilidade do inóculo foi de 85,8 %, tendo-se atingido uma taxa de viabilidade máxima de 99,0 % neste teste. No teste 3 a taxa de viabilidade aumentou de 78,4 % para 93,3 %. Já para o teste 2, este foi onde se verificou um maior aumento da taxa de viabilidade, passando de 52,3 % para 93,7 %. Estes resultados comprovam os dados apontados por outros autores em que comprovaram taxas de viabilidade inferiores em leveduras desidratadas quando comparadas com as taxas de viabilidade de leveduras

frescas. (27)

Para todas as situações, houve um aumento significativo da taxa de viabilidade o que favorece enormemente a fermentação e a qualidade organolética da cerveja obtida. Uma elevada concentração de levedura morta (superior a 15 %) presente no mosto pode originar a libertação de compostos indesejáveis, tais como composto sulfurosos com aroma desagradável para o consumidor (o sulfureto de hidrogénio por exemplo tem como descritor de aroma ovos em estado de putrefação), proteínases que afetam negativamente a estabilização da espuma da cerveja, entre outros. (14,32,34) Outra consequência da concentração elevada de levedura morta associada a uma baixa concentração de levedura viável é também um início de fermentação demasiado grande (fase lag muito extensa), aumentando assim o tempo de fermentação. (15) Esta fase lag muito extensa também pode promover o crescimento de culturas de microrganismos contaminantes que competem pelos mesmos nutrientes que as leveduras, podendo ocorrer a libertação de metabolitos indesejados para o mosto, p.e. bactérias lácticas que libertam ácido láctico acidificando a cerveja. (12)

Foram também calculados os rendimentos observados de biomassa/substrato em cada teste na sua fase exponencial (Tabela 11) com o objetivo de comparar os rendimentos de cada teste. Este parâmetro indica o número de leveduras produzidas por grama de substrato presente no meio.

Tabela 11 – Rendimentos observados biomassa/substrato (S) obtidos na fase exponencial dos testes de propagação realizados.

Teste	$(Y_{X/S})_{obs}$ (cel/gS)	ΔX	X_{final} (cel/L)	$X_{inicial}$ (cel/L)	$ \Delta S $	$S_{inicial}$ (g/L)	S_{final} (g/L)
1	$5,16 \times 10^9$	$4,90 \times 10^{11}$	$5,18 \times 10^{11}$	$2,78 \times 10^{10}$	95,0	195	100
2	$4,33 \times 10^9$	$4,68 \times 10^{11}$	$5,11 \times 10^{11}$	$4,30 \times 10^{10}$	108,0	216	108
3	$5,38 \times 10^9$	$3,50 \times 10^{11}$	$3,89 \times 10^{11}$	$3,87 \times 10^{10}$	65,0	176	111

Novamente, o teste 3 apresenta os melhores resultados tendo-se obtido um rendimento de $5,38 \times 10^9$ cel/g de substrato (S). No teste 1 obteve-se um rendimento de $5,16 \times 10^9$ cel/gS e no teste 2 um rendimento de $4,33 \times 10^9$ cel/gS.

Uma vez que o objetivo da propagação é a inoculação de fermentadores com levedura em fase log, pode-se concluir que as condições de operacionalização que devem ser implementadas são as do teste 3: uma temperatura de 20 °C no início da propagação e um decréscimo gradual até à temperatura de fermentação (12 °C).

Analisando o consumo de açúcares pela levedura (Figura 4) pela medida dos sólidos

solúveis totais, poderá concluir-se que o seu consumo não foi completo para todos os ensaios. Inicialmente, os sólidos solúveis totais (°Brix) no mosto eram de 19,5 % no teste 1, de 21,8 % no teste 2 e 21,2 % no teste 3. No final das propagações obtiveram-se 9,8 %, 10,4 % e 9,4 % respetivamente. Mesmo tendo em conta que o refratómetro mede os sólidos totais em suspensão, dando uma aproximação ao total de açúcares (fermentáveis e não fermentáveis), estes valores ficaram muito acima do observado por exemplo com a percentagem de sólidos solúveis totais obtidos no final das fermentações da cerveja. Havendo açúcares fermentáveis disponíveis poderá pôr-se em questão a inibição do crescimento das leveduras devido à carência de outro nutriente (aminoácidos, zinco). (19), (35)

Na medida em que não foi possível analisar e quantificar a dissolução do oxigénio no meio de propagação por falta de equipamentos adequados, este poderá ser outro fator a ter em conta. Caso o teor de oxigénio dissolvido no mosto não tenha sido suficiente para a levedura proceder à respiração celular, uma parte destas poderá ter entrado em anaerobiose, e assim, ter fermentado. Sabe-se que o álcool produzido na fermentação é inibidor do crescimento da levedura (24), assim para se testar esta hipótese, deveria ter-se analisado o conteúdo alcoólico do mosto no final da propagação.

3.2.2. Análise da sedimentação da levedura

Foi feito um ensaio de sedimentação de levedura após a propagação teste 1 com o objetivo de se obter um volume de inóculo inferior, para possível armazenamento da mesma em barris. Para tal foi necessário precipitar a levedura propagada, através da paragem de agitação e oxigenação do reator, permitindo a sedimentação da levedura. Para além disso, foi necessário definir-se a temperatura do reator entre os 0 e os 4 °C, por forma a inativar e preservar a levedura, num estado de “dormência”.

Deste modo, foi possível a obtenção de um inóculo mais concentrado, em forma de lama de leveduras, com um volume muito menor (entre 30 a 50L de inóculo).

Com o objetivo de estudar então mais profundamente o processo de sedimentação da levedura e tentar caracterizar as camadas de levedura procedeu-se à sua sedimentação. Retiraram-se amostras a cada 5 e 10 L de sedimento (lama de leveduras). Os resultados obtidos estão esquematizados na Figura 5.

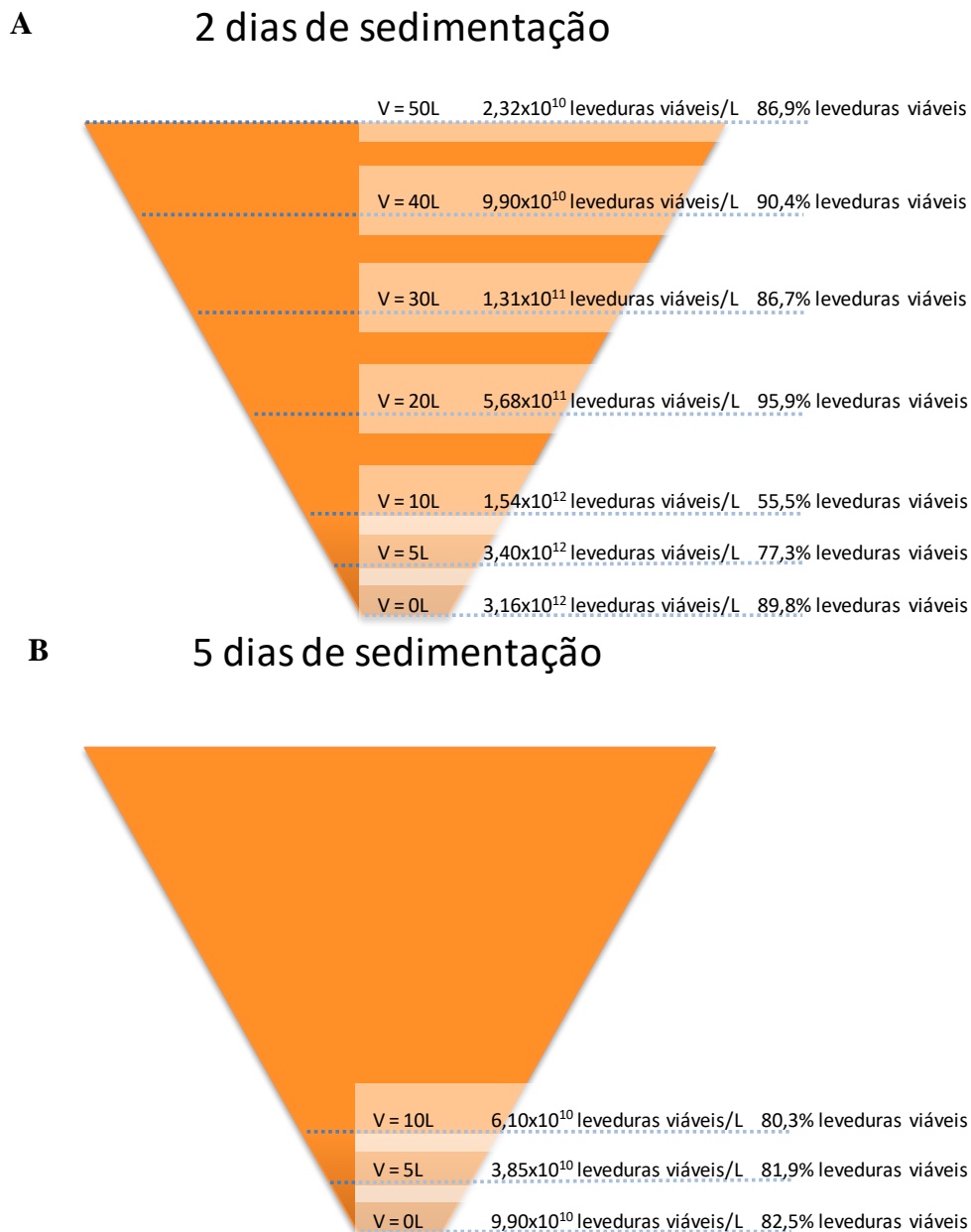


Figura 5 – Variação da concentração e taxa de viabilidade de leveduras: A) após 2 dias de sedimentação; B) após 5 dias de sedimentação.

Através da figura 5, é possível observar-se que o processo de sedimentação não tem relação direta no que respeita à taxa de viabilidade da levedura. Apenas se pode concluir que, como seria de esperar, a concentração de levedura (total e viável) é superior no fundo do sedimento e vai diminuindo gradualmente até ao topo do cone do fermentador. (36)

Apesar de se ter conseguido sedimentar a levedura, houve uma grande quantidade de levedura que se manteve em suspensão (como se poderá ver pelas camadas mais superficiais após 5 dias de sedimentação), contudo com uma concentração demasiado

baixa para que servissem de inóculo a fermentadores, sendo essa quantidade inutilizável. Com base nestes resultados optou-se que não se procederia à sedimentação de leveduras por duas razões principais:

- 1) para não haver desperdício de levedura propagada em suspensão por sedimentar, e
- 2) para inocular os fermentadores com levedura propagada logo no final da fase exponencial, sendo este um dos objetivos principais da propagação.

Relativamente ao armazenamento de leveduras, no caso de não ser possível por questões de planeamento de produção de cerveja, o propagador pode servir como cuba de armazenamento, diminuindo-se a temperatura para os 0 - 4 °C.

Através dos resultados obtidos no crescimento microbiano, poderá fazer-se uma adaptação e agendamento do fim da propagação, de acordo com o planeamento da produção de cerveja. Assim, poderá proceder-se a uma propagação mais lenta ou mais rápida: propagações a 15 °C para crescimentos mais lentos, ou propagações a 20 °C para crescimentos mais rápidos.

3.3. Análise do perfil de fermentação da cerveja produzida com levedura propagada

3.3.1. Comparação das fermentações com levedura desidratada e com levedura propagada

Após definidas as condições ideais de propagação da levedura, esta foi propagada e posteriormente foi inoculada em cubas de fermentação. Sendo levedura *lager* em estudo produziram-se ao longo do estudo três tipos de cerveja *lager*: cerveja loira, rubi e preta. Diferentes parâmetros foram monitorizados diariamente para controlo das fermentações na cervejeira. Um desses parâmetros foi o teor em sólidos solúveis totais (°Brix), que permite indicar uma estimativa do consumo de açúcares, e consequente, produção de álcool por parte da ação da levedura.

Para comparar o comportamento fermentativo da levedura propagada com a levedura desidratada anteriormente utilizada, foram calculados os valores médios do teor em sólidos solúveis totais (°Brix) registados (Figura 6).

Como referido anteriormente, um dos objetivos da propagação de leveduras é o início rápido da fermentação, contudo a partir dos dados obtidos (Figura 6) não se

verifica um consumo mais acentuado de açúcares para os três casos estudados (cerveja loira, rubi e preta), ocorrendo em todos entre o dia 0 e o 7º dia de fermentação. No entanto, a análise das curvas de consumo de açúcares (Figura 6) observa-se que o desvio padrão médio em todas as cervejas é menor quando fermentadas com levedura propagada. Conclui-se assim que o uso de leveduras propagadas favoreceu a padronização das fermentações, e conseqüentemente do produto final. De notar que a padronização dos produtos é um dos grandes e atuais desafios das cervejas artesanais. É importante referir que no caso da cerveja preta, o perfil fermentativo observado foi muito similar entre o uso das diferentes leveduras. No entanto, as diferenças ao nível do produto final teriam de ser avaliadas, nomeadamente a análise qualitativa e quantitativa de compostos voláteis presentes nas cervejas obtidas. As características organoléticas das cervejas determinam o sucesso ou insucesso da fermentação, sendo de salientar que a taxa de abate de cerveja devido ao surgimento de *off-flavours* é um parâmetro a ter em consideração. A taxa de abate de cerveja fermentada com levedura desidratada era de 12,5% e sendo a taxa de abate de cerveja fermentada com levedura propagada de 6,1%, registou-se portanto uma redução de 50 % no número de abates. Foram também realizadas análises sensoriais qualitativas por parte dos *sommeliers* da empresa que afirmaram haver uma grande melhoria na qualidade organolética do produto final produzido com a utilização da levedura propagada.

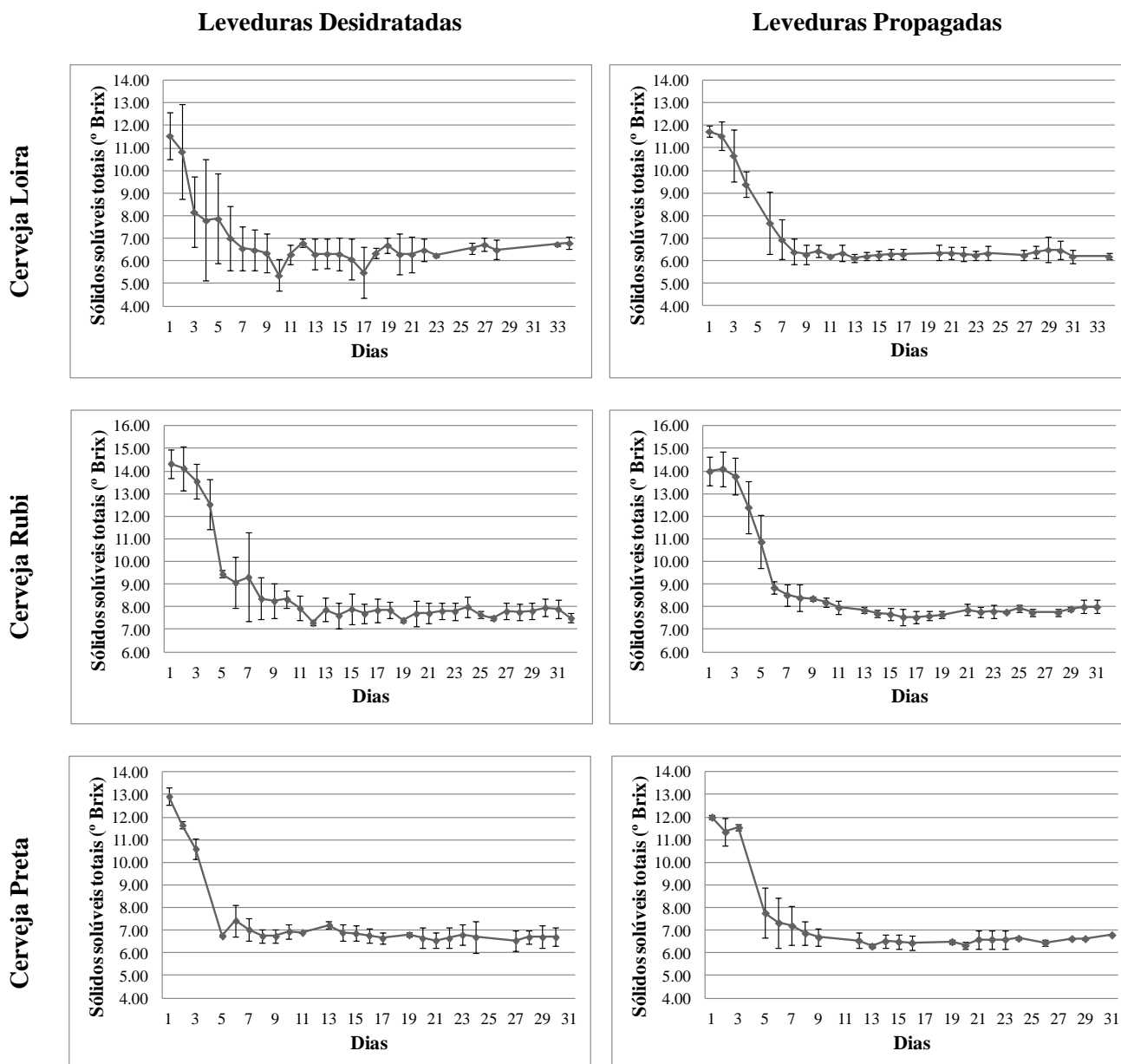


Figura 6 – Comparação dos valores médios dos sólidos solúveis totais (°Brix) registados nas diferentes fermentações (cerveja loira, rubi e preta) com recurso a leveduras desidratadas (lado esquerdo) e leveduras propagadas (lado direito) ao longo do tempo.

3.3.2. *Comparação das taxas de recuperação de levedura desidratada e levedura propagada*

Um dos aspectos importantes na gestão de levedura na cervejeira é também a taxa de reutilização e recuperação de levedura excedentária após cada fermentação. Como descrito anteriormente é possível recuperar a levedura após cada fermentação, contudo essa recuperação não é infinita, uma vez que a levedura vai sofrendo *stress* e mutações, cujas implicações se refletem no produto final. (1) Na Figura 7 pode-se observar um diagrama representativo da recuperação de leveduras.

Em relação às leveduras desidratadas, foi obtida uma taxa de recuperação de 0,8 na primeira reutilização, ou seja após uma fermentação e uma taxa de 0,5 na segunda reutilização (após duas fermentações). No período de estudo e desenvolvimento deste trabalho, não foi possível ir além da segunda recuperação devido à presença de grandes taxas de morte nas leveduras recuperadas após a terceira fermentação (Figura 7).

Relativamente às fermentações com leveduras propagadas, obteve-se uma taxa de recuperação igual a 2 na primeira reutilização (após uma fermentação), uma taxa de recuperação de 0,71 na segunda reutilização (após duas fermentações), e por fim ainda uma taxa de recuperação de 0,29 na terceira reutilização (após três fermentações). Conclui-se assim que as leveduras propagadas têm maior capacidade de preservação das suas propriedades fermentativas, mantendo taxas de viabilidade superiores durante mais fermentações, comprovando os problemas associados a leveduras desidratadas como descrito anteriormente. (26,27)

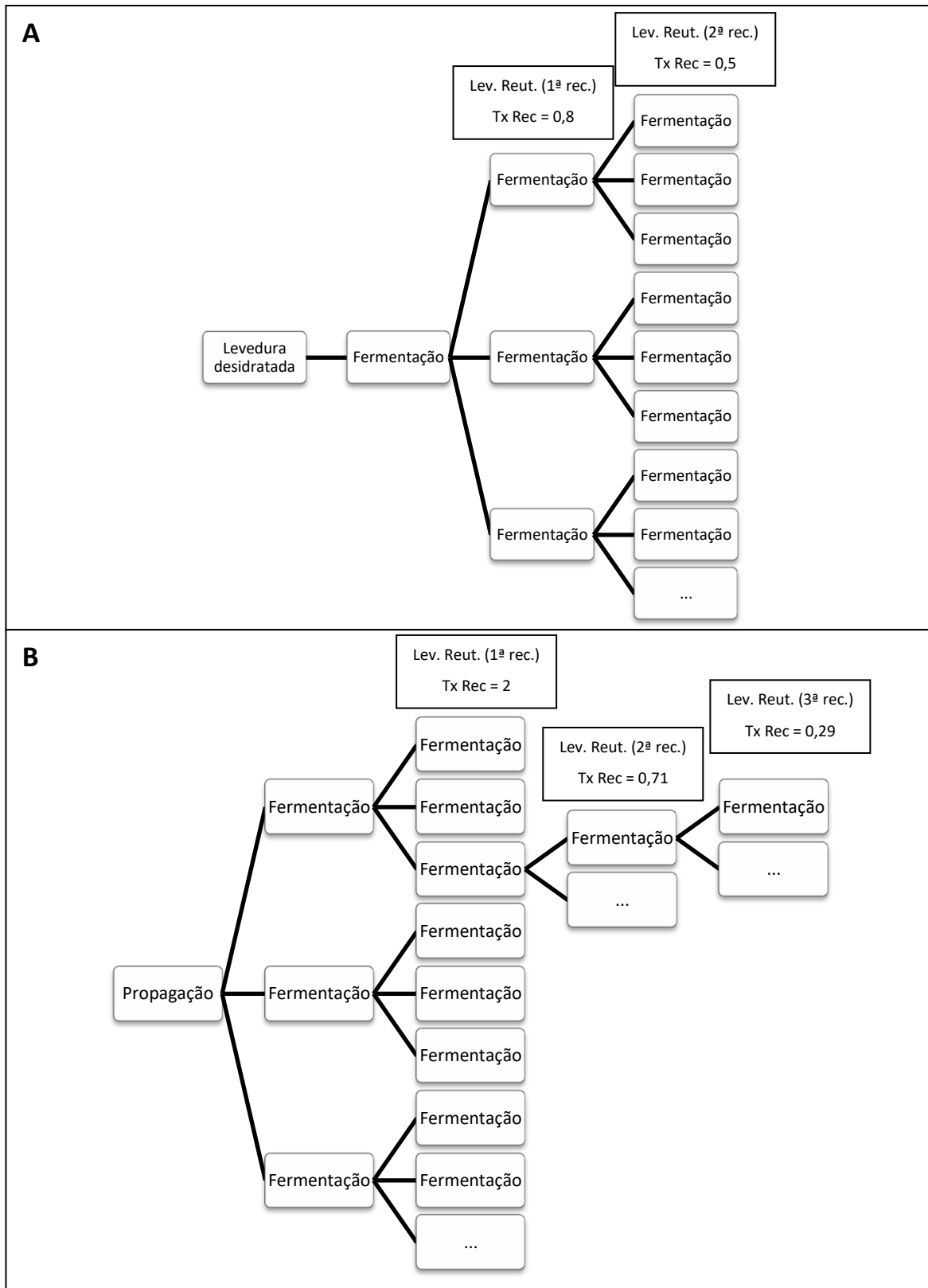


Figura 7 – Diagrama de fluxo representando a recuperação de leveduras em cervejeira com as taxas de recuperação (Tx Rec) para fermentações com levedura desidratada (A) e levedura propagada (B).

3.3.3. *Impacto económico*

Foi feito realizado um estudo para avaliar o impacto económico da propagação de leveduras, foram calculados os custos de produção tendo em conta todos os consumos associados nomeadamente: oxigénio, inóculo de levedura desidrata, substrato (maltes, lúpulo e sulfato de zinco) e energia. Obteve-se então um valor de 195,53 € para um volume de propagação de 300 L, ou seja, 0,65 €/L de levedura propagada. Para a mesma quantidade de levedura, a utilização de levedura desidratada tem um custo associado de 779,04 €. Assim sendo, é possível obter-se uma poupança de 583,51 €, através da utilização de leveduras propagadas, que corresponde a uma poupança de 74,9%.

Relativamente ao investimento da empresa no reator de propagação, este foi de 3936,00 €, sendo que ao fim de cerca de 6,75 propagações, o valor do investimento é amortizado.

Considera-se portanto que mesmo considerando custos de produção e de investimento, a propagação de leveduras constitui um processo quer mais rentável a nível produtivo, quer a nível financeiro, comparativamente com o uso de leveduras desidratadas.

4. Conclusões

Neste trabalho foi possível concluir-se que a concentração de açúcares fermentáveis totais no mosto de trigo foi de 105,1 mg/mL e de 101,4 mg/mL no mosto de loira. Destes açúcares, a maioria eram maltose (85,0 mg/mL no mosto de trigo e 77,7 mg/mL no mosto de loira), sendo este um açúcar de assimilação rápida por parte da levedura. Observou-se também que a brassagem executada tem um rendimento satisfatório, não tendo sido detetados açúcares não fermentáveis (p.e. maltotetraose). Concluiu-se portanto que a hidrólise do amido pelas α e β -amilases foi extensa durante a brassagem. Obtiveram-se concentrações de aminoácidos livres (FAN) de 1,47 mg/mL no mosto de trigo e 1,55 mg/mL no mosto de loira. As concentrações de açúcares e de FAN quantificadas permitem concluir que os dois mostos possuem nutrientes em quantidades adequadas tanto para a fermentação de mosto (produção de cerveja), como para a propagação de leveduras. O único nutriente deficitário determinado foi o zinco (0,068 mg/L no mosto de trigo e 0,123 mg/mL no mosto de loira). Apesar de o mosto de loira ter quantidades de zinco suficientes para a fermentação, os dois mostos necessitaram de ser suplementados com zinco para o processo de propagação.

Após realização de três testes de propagação em que se variaram as temperaturas de propagação e os períodos de oxigenação, obteve-se uma concentração de levedura total máxima de $5,60 \times 10^{11}$ cel/L (teste 2), uma concentração de levedura viável máxima de $5,02 \times 10^{11}$ cel/L (teste 3) e uma taxa de viabilidade máxima de 99,0 % (teste 1). Foi no teste 3 que se obteve uma taxa específica de crescimento máxima mais elevada ($0,053 \text{ h}^{-1}$) e um rendimento biomassa/substrato maior ($5,38 \times 10^9$ cel/gS). Estes resultados devem-se ao facto de neste teste se ter usado uma temperatura de propagação superior (20 °C ao contrário dos 15 °C nos outros testes executados). Concluiu-se que o teste 3, realizado a uma temperatura de 20 °C e menor tempo de oxigenação, obteve os melhores resultados. Foi por isso implementado este protocolo na cervejeira.

Pela análise dos perfis fermentativos das cervejas produzidas com recurso a leveduras desidratadas e leveduras propagadas, concluiu-se que as leveduras propagadas permitiram uma padronização do processo fermentativo, e com maiores taxas de recuperação após fermentações.

Por fim, concluiu-se que o processo de propagação é economicamente rentável (representando 75 % de poupança face ao uso de leveduras desidratadas), mesmo tendo em conta os investimentos necessários na produção e instalação do reator de propagação (investimento amortizado em 7 propagações).

Assim pode-se concluir que os objetivos definidos no início do projeto foram

alcançados, uma vez que a propagação de leveduras em microcerveja permite: 1) ultrapassar as limitações do uso de leveduras desidratadas; 2) melhorar o processo de fermentação e 3) melhorar as características organolépticas do produto final, a cerveja.

5. Referências Bibliográficas

1. Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res.* 2008;8(7):1018–1036.
2. Martins C, Brandão T, Almeida A, Rocha SM. *Saccharomyces spp.* Role in Brewing Process and its Serial Repitching Impact. In: *Beer: production, consumption and health effects, from the series Food and Beverage Consumption and Health.* New York: Nova Science Publishers Inc.; 2016. 213–256.
3. Strong G, England K. *BJCP Beer Style Guidelines - 2015 Edition.* 2015.
4. Europe Economics, The Brewers of Europe. *The Contribution made by Beer to the European Economy.* 2016.
5. The Brewers of Europe. *Beer statistics - 2016 Edition.* 2016.
6. Boulton C, Quain D. Yeast management. In: *Brewing Yeast and Fermentation.* Blackwell Publishing Ltd; 2001. p. 468–509.
7. Quain D. Yeast supply and propagation in brewing. In: *Brewing: New Technologies.* Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006. 167–182.
8. Bertoft E, Andtfolk C, Kulp S-E. Effect of pH, temperature, and calcium ions on barley malt α -amylase isoenzymes. *J Inst Brew.* 1984;90(5):298–302.
9. Briggs DE, Boulton C a., Brookes P a., Steven R. *Brewing: science and practice.* Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press. 2004.
10. Kunze W. *Technology Brewing & Malting.* 4th Edition. Berlin: VLB Berlin; 2010.
11. Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *J Inst Brew.* 2014;120(4):289–314.
12. Sakamoto K, Konings WN. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int J Food Microbiol.* 2003;89(2-3):105–124.
13. Parker DK. *Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis.* *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research.* Woodhead Publishing Limited; 2011. 133-158.
14. Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T, Vicente AA. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(5):1937–1949.
15. Guido L. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chem.* 2004;87(2):187–193.

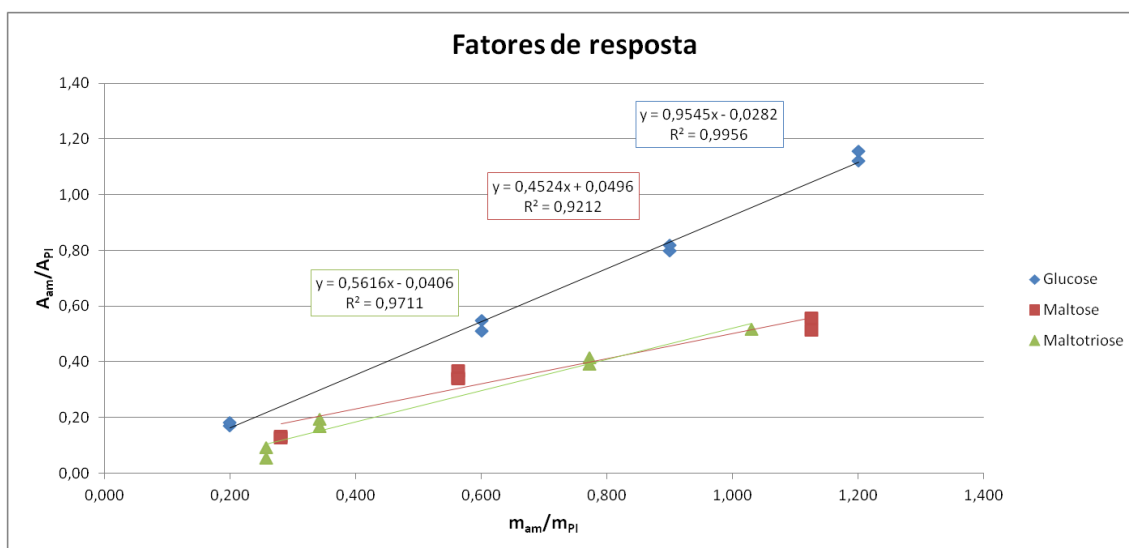
16. Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, Derdelinckx G. The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chem.* 2006;95(3):357–381.
17. MacWilliam IC. Wort Composition - A Review. *J Inst Brew.* 1968;74(1):38–54.
18. Engan S. Wort composition and beer flavour. II. The influence of different carbohydrates in the formation of the flavour components during fermentation. *J Inst Brew.* 1972;78:169-173.
19. van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1993;63(3–4):343–352.
20. Romano P, Suzzi G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):309–315.
21. Rainieri S, Kodama Y, Kaneko Y, Mikata K, Nakao Y, Ashikari T. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):3968–3974.
22. Boulton CA, Quain DE. Brewing Yeast. In: *Brewing Yeast and Fermentation.* Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2001. 143–259.
23. Hulse GA. Yeast Propagation. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance.* 2nd Edition. Blackwell Science; 2003. 250–256.
24. D’Amore T, Stewart GG. Ethanol tolerance of yeast. *Enzym Microb Technol.* 1987;9:322–330.
25. Vidgren V, Londesborough J. 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. *J Inst Brew.* 2011;117(4):475–487.
26. Muller RE, Fels S, Gosselin Y. Brewery fermentations with dried lager yeast. *Proc Congr - Eur Brew Conv.* 1997;26(1):431–438.
27. Finn DA, Stewart GG. Fermentation characteristics of dried brewers yeast: Effect of drying on flocculation and fermentation. *J Am Soc Brew Chem.* 2002. 60(3):135–139.
28. Coimbra MA, Delgadillo I, Waldron KW, Selvendran RR. Isolation and analysis of cell wall polymer from olive pulp. *Mod Methods Plant Anal.* 1996;17:20–43.
29. Qiu Y, Su M, Liu Y, Chen M, Gu J, Zhang J, et al. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling. *Anal Chim Acta.* 2007;583(2):277–283.

30. Ajandouz EH, Abe J ichi, Svensson B, Marchis-Mouren G. Barley malt- α -amylase. Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using p-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol.* 1992;1159(2):193–202.
31. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem.* 1989;180(1):136–139.
32. Brown AK, Hammond JRM. Flavour control in small-scale beer fermentations. *Food and Bioprod. Process,* 2003;81(1):40-49.
33. Cheong C, Wackerbauer K, Kang SA. Influence of aeration during propagation of pitching yeast on fermentation and beer flavor. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(2):297–304.
34. Verbelen PJ, Dekoninck TM, Saerens SM, Van Mulders SE, Thevelein JM, Delvaux FR. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Appl Microbial Biotechnol.* 2009;82(1):155–167.
35. Salmon JM, Barre P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3831–3837.
36. Powell CD, Quain DE, Smart KA. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance , attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res.* 2003;3(2):149–157.

6. Anexos

Anexo A

Curva de calibração para cálculo dos fatores de resposta para quantificação de açúcares por GC-FID.



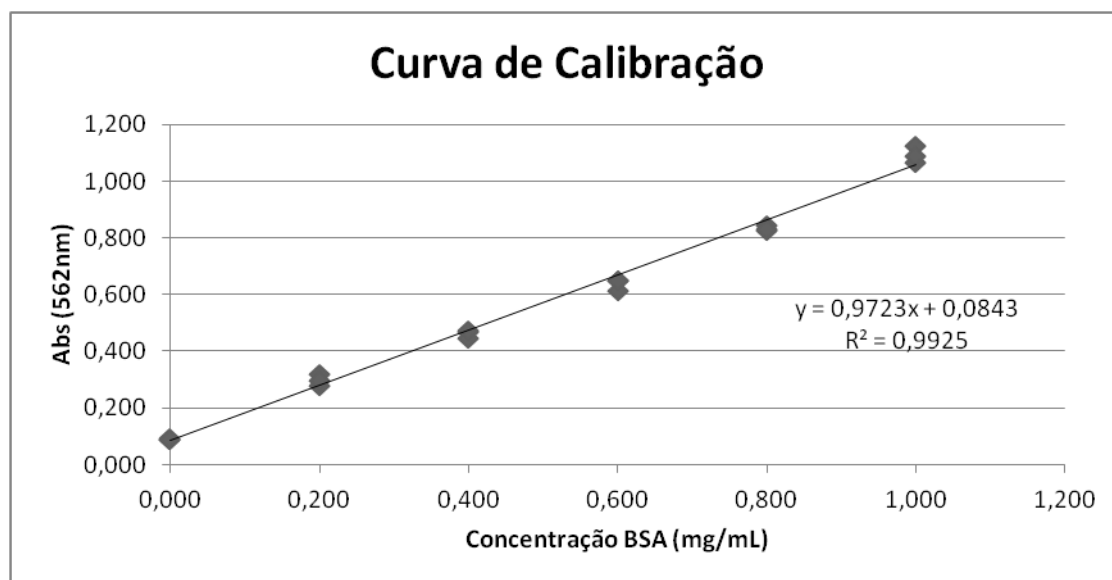
Anexo B

Equações das curvas de calibração para cálculo dos fatores de resposta para quantificação de aminoácidos por GC-qMS.

Aminoácido	Equação da reta	r²
Valina	$y = 0,6871x + 0,7148$	0,9908
Leucina	$y = 1,0189x - 0,002$	0,9982
Serina	$y = 0,6871x - 0,7297$	0,9937
Isoleucina	$y = 1,128x + 0,0179$	0,9910
Prolina	$y = 0,9612x - 0,0119$	0,9990
Ácido Aspártico	$y = 0,488x - 0,0031$	0,9961
Metionina	$y = 1,096x + 0,0034$	0,9986
Ácido Glutâmico	$y = 0,3020x + 0,365$	0,9594
Fenilalanina	$y = 2,4068x + 3,0492$	0,9633
Lisina	$y = 0,8822x - 0,1968$	0,9914
Histidina	$y = 0,7182x - 0,8608$	0,9816
Tirosina	$y = 3,6211x - 2,0168$	0,9820
Triptofano	$y = 0,9069 - 0,4608$	0,9449

Anexo C

Curva de calibração para quantificação de proteína solúvel pelo método do ácido bicinonínico.



Anexo D

Retas de tendência para determinação da taxa específica de crescimento máximo da levedura ($\mu_{\text{máx}}$) em cada teste realizado.

