

# WEBLAB: FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

**Gabriel C. Fonseca; Giann B. Reis; Roberto C. Giordano; Alberto C. Badino; Antonio J. G. Cruz**

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química  
Rodovia Washington Luis (SP 310), km 235, Bairro Monjolinho  
CEP 13565-905 – São Carlos – São Paulo  
ajgcruz@ufscar.br

**Resumo:** *Este trabalho descreve o desenvolvimento, implementação e operação de experimento de acesso remoto (WebLab) baseado em experimento de fermentação alcoólica (produção de etanol). A produção de etanol é realizada em um reator (dois litros de volume útil) empregando o microrganismo Saccharomyces cerevisiae na presença de glicose como principal fonte de carbono. Durante o processo, o dióxido de carbono produzido é enviado para um tubo hermético, onde este se acumula. O aumento da pressão no interior deste tubo é monitorado com auxílio de um manômetro digital. Vários experimentos foram realizados de modo a calibrar o sistema. Dessa forma foi possível estabelecer uma relação direta da concentração de etanol no meio reacional com a pressão no interior do tubo. Desenvolveu-se no programa LabVIEW interface gráfica para o experimento (WebLab) onde se visualiza graficamente o valor da pressão e da concentração de etanol. Foi também programado modelo matemático para simular os perfis da concentração de células, de glicose e de etanol ao longo do cultivo. Implementou-se também um simulador para o WebLab, sendo este disponibilizado na internet. Assim, é possível simular a realização do experimento em diferentes condições antes da realização da prática experimental a distância.*

**Palavras-chave:** *Experimento remoto, i-Lab, Etanol, Simulador, Bioprocesso.*

## 1. INTRODUÇÃO

Na última década a instalação de acessórios para aquisição de dados em experimentos tornou-se prática comum, devido à redução dos custos da instrumentação e da popularização dos computadores. Com os experimentos automatizados e controlados via computador, o próximo passo foi associar a tecnologia Web. Surgiu, desta forma, os *WebLabs* ou *i-Labs* no final da década passada (i-CAMPUS, 2007). Um *WebLab* (laboratório de acesso remoto via Internet) pode ser definido como um laboratório de qualquer ciência experimental que pode ser remotamente acessado e controlado através da Internet. Com isto, ampliou-se o nível de interatividade dos ambientes virtuais de ensino-aprendizagem (NEDIC *et al.*, 2003). Em um *WebLab* o experimento é realizado através do acesso a um *link* (endereço eletrônico) onde o experimento encontra-se disponível. É preciso de um *Web browser* (programa para “navegar” pela Internet) e um computador conectado à Internet para ter acesso ao aparato experimental que se encontra fisicamente instalado em algum laboratório de ensino ou pesquisa. O experimento é controlado a distância e em tempo real.

No estado de São Paulo a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo), através do projeto KyaTera (programa TIDIA), financiou o desenvolvimento e a implantação de uma rede de fibras ópticas interligando várias instituições de ensino e

pesquisa. Esta rede opera em velocidade *gigabit* e conecta os laboratórios que integram o projeto original (fibras apagadas, ou seja, conectam-se laboratório a laboratório). Os *WebLabs* foram desenvolvidos para serem ferramentas colaborativas entre as instituições.

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento, implementação e operação de *WebLab* utilizado para realização de experimentos de fermentação alcoólica em biorreator de bancada (volume útil de dois litros). O experimento foi montado para que se possa remotamente acompanhar o aumento da concentração de etanol na fase líquida através do aumento da pressão no interior de tubo de PVC causada pela produção simultânea de dióxido de carbono na reação. Neste experimento é possível também visualizar a variação da concentração de células e de glicose ao longo do cultivo através de modelo matemático do processo. Foi desenvolvido também um simulador do experimento (disponibilizado na Internet). Dessa forma, é possível a simulação do experimento em diferentes condições experimentais antes do acesso remoto ao experimento real.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O etanol tem muitas aplicações como matéria-prima e solvente sendo utilizado em grandes quantidades nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos (SHULER E KARGI, 2002). No Brasil, também é empregado como combustível alternativo aos combustíveis fósseis. Na safra 2006/07 foram produzidos 17,5 bilhões de litros de etanol (JORNAL CANA, 2008). O etanol pode ser produzido pela rota química e bioquímica. Contudo, a rota bioquímica é a dominante. As leveduras são os organismos preferencialmente empregados para a produção de etanol em escala industrial. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal organismo usado para produção de álcool etílico. No Brasil a sacarose proveniente da cana-de-açúcar é a matéria-prima do processo produtivo. A levedura sintetiza em nível de parede celular a enzima invertase responsável pela conversão da sacarose em glicose e frutose (hexoses).

### 2.1 Teoria

No interior das células as leveduras convertem as hexoses (via glicólise) em etanol e dióxido de carbono, de acordo com a estequiometria (1):



A partir da equação (1) observa-se que quantidades equimolares de dióxido de carbono e etanol são formadas para cada mol de hexose consumida.

O rendimento teórico do processo (massa de etanol formado / massa de glicose consumida) é 0,51. Normalmente subprodutos como glicerol, ácido succínico e ácido acético são produzidos, o que faz com que o rendimento obtido seja da ordem de 90 a 95% do teórico. A produção de etanol ocorre em ambiente anaeróbio (ausência de oxigênio) e o rendimento célula/substrato obtido (massa de células formada / massa de glicose consumida) é de 0,12. A fermentação ocorre a temperatura (30 - 35 °C) e pH (4 - 6) (SHULER E KARGI, 2002).

## 2.2 Cinética do Crescimento Microbiano

Em processos fermentativos que produzem metabólitos primários, como é o caso do etanol, o crescimento celular e a formação de produto ocorrem simultaneamente. Desta forma, o crescimento celular e a síntese de produto estão diretamente relacionados. Assim, a produção de etanol pode ser estimada diretamente da cinética de crescimento celular. Partindo da hipótese que a concentração celular é uma boa medida do sistema enzimático responsável pela conversão do substrato a produto, define-se de forma conveniente a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) como:

$$\mu = \frac{1}{C_x} \cdot \frac{dC_x}{dt} \quad (2)$$

onde:  $\frac{dC_x}{dt}$  é a variação da concentração celular com o tempo (t).

Vários modelos cinéticos são propostos na literatura para relacionar a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) com o substrato limitante e, quando conveniente, com concentrações de inibidores. Modelo clássico foi proposto por Monod (BAILEY e OLLIS, 1986), sendo apresentado na equação (3).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (3)$$

onde:  $\mu_{\max}$  é a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $C_s \gg K_s$ )  
 $C_s$  é a concentração do substrato limitante  
 $K_s$  é a constante de saturação do modelo de Monod

No processo de produção de etanol, altas concentrações iniciais de glicose levam a obtenção de elevadas concentrações de produto, o que inibe o crescimento celular e, conseqüentemente, a produção de etanol. Várias equações relacionando o efeito da concentração do produto ( $C_p$ ) à velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) existem na literatura. Um dos modelos propostos é apresentado na equação (4).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \frac{K_p}{K_p + C_p} \quad (4)$$

onde:  $C_p$  é a concentração de etanol  
 $K_p$  é a constante de inibição pelo produto

Um modelo para o processo de produção de etanol pode ser obtido a partir do balanço de massa para células, glicose e etanol em um biorreator operado em batelada. As equações (5), (6) e (7) apresentam este modelo, composto por três equações diferenciais ordinárias.

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (5)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{\mu \cdot C_X}{Y_{X/S}} \quad (6)$$

onde:  $Y_{X/S}$  é o coeficiente global de conversão de substrato a células

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{\mu \cdot C_X}{Y_{X/P}} \quad (7)$$

onde:  $Y_{X/P}$  é o coeficiente global de rendimento de células a produto ( $Y_{X/P} = Y_{X/S}/Y_{P/S}$ )

### 2.3 Descrição do WebLab

O *WebLab* foi implementado utilizando equipamento da National Instruments para aquisição dos dados e programa LabVIEW (versão 8.0) para elaboração do programa de supervisão e controle do processo. Um diagrama esquemático dos equipamentos que compõe o *WebLab* é apresentada na Figura 1 (Curraleiro e Badino, 2006).

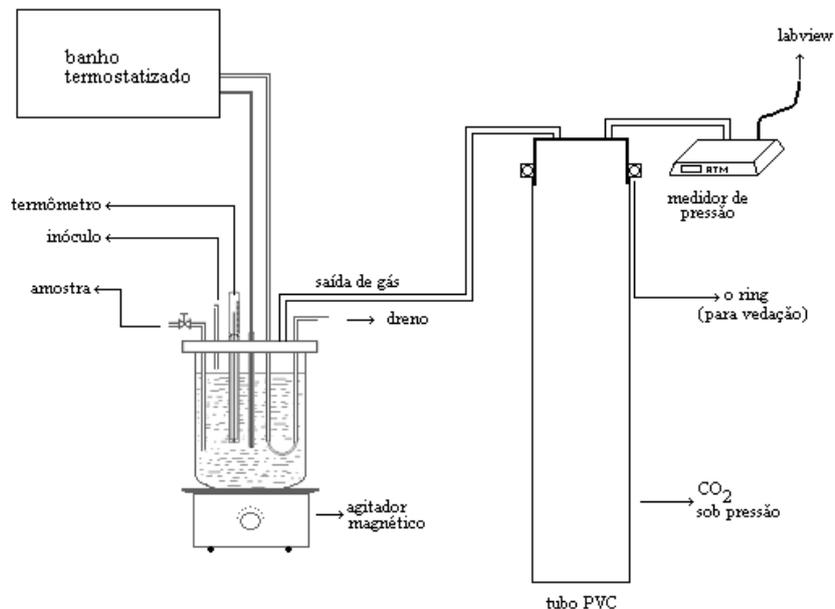


Figura 1. Diagrama esquemático do *WebLab* de fermentação alcoólica.

A Figura 2 apresenta a tela do programa desenvolvido em LabVIEW (versão 8.0) para simulação do processo de produção de etanol. Nesta tela o usuário visualiza o aparato experimental (composto pela dorna de fermentação, reator, conectada ao tubo de PVC). A temperatura do processo é monitorada em um mostrador. O valor da pressão no interior do tubo é visualizado graficamente. Os valores das concentrações de células, de glicose e etanol são apresentados também graficamente. O usuário deve fornecer os valores dos parâmetros cinéticos ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ,  $k_s$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{X/P}$ ) além das condições iniciais utilizadas (concentração celular, de glicose e de etanol). O tempo desejado para realizar o experimento deve também ser fornecido.

O próximo passo consiste em clicar sobre o botão <INICIAR>. A qualquer momento o usuário pode parar o experimento, reiniciando a partir do mesmo ponto. Ao término do experimento, basta clicar sobre o botão <LIMPAR GRÁFICOS> e uma nova simulação pode

ser realizada em diferente condição. Caso o usuário queira sobrepor gráficos (experimentos em diferentes condições), não é necessário clicar no botão <LIMPAR GRÁFICOS>.

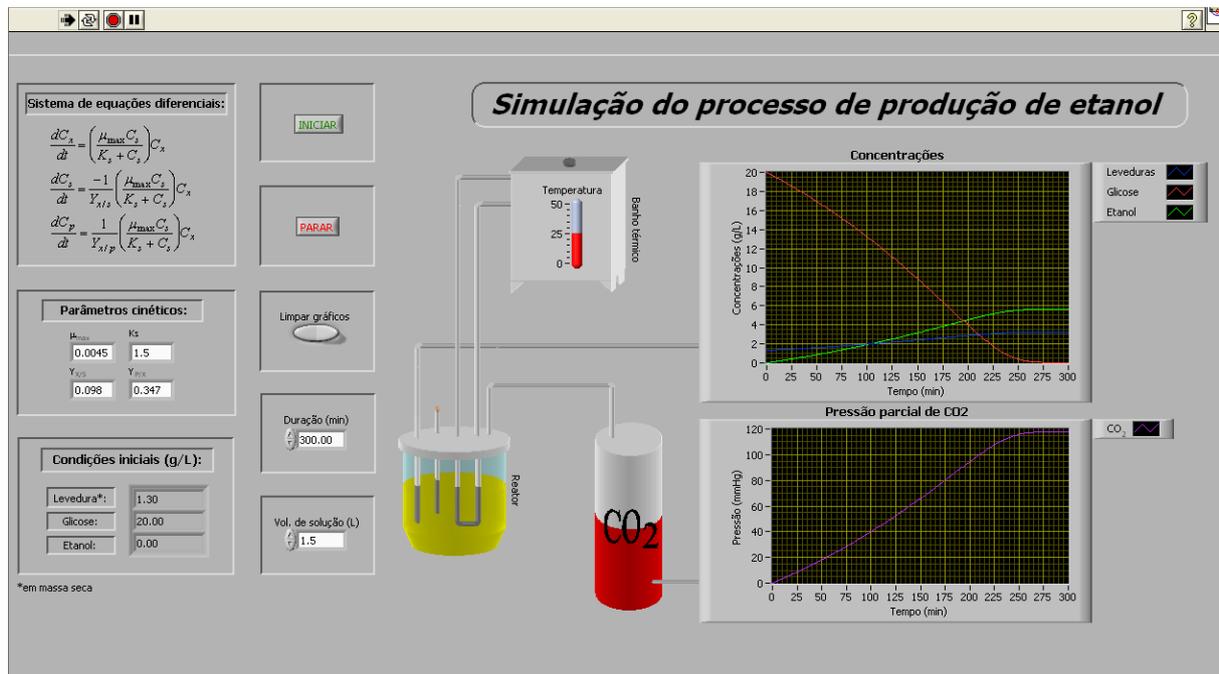


Figura 2. Tela do simulador do experimento de produção de etanol implementada no programa LabVIEW (versão 8.0).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo

Foi empregado o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* – fermento comercial marca “Fleischmann”, com teor de umidade de 70% em todos os experimentos.

#### 3.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura empregados nos experimentos têm as composições (em g/L) apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo empregado nos experimentos.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20,0 – 40,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4
Extrato de levedura	3,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,8
Anti-espumante	1 mL / L
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p.

O pH do meio de cultivo foi ajustado em 4,6 utilizando-se ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio diluídos. Os meios foram preparados imediatamente antes dos cultivos e, devido à alta concentração de inóculo utilizada (levedura), ao baixo valor de pH e ao curto período de fermentação (aproximadamente 240 minutos), não houve necessidade de esterilização dos mesmos.

### 3.3 Métodos Analíticos

#### *Determinação da Concentração Celular ( $C_X$ )*

A concentração celular foi avaliada pelo método da massa seca.

#### *Determinação da Concentração de Glicose ( $C_S$ )*

A concentração de glicose foi analisada pelo método do DNS (ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

#### *Determinação da Concentração de Etanol ( $C_P$ )*

A concentração de etanol foi analisada pelo método de oxidação pelo dicromato de potássio (JOSLYN, 1970).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Realização de Cultivos para Determinação de Parâmetros Cinéticos

Foram realizados cultivos para determinação de parâmetros cinéticos do processo. Em todos os ensaios foram retiradas amostras em intervalos regulares para a análise da concentração de células, de substrato e de etanol. A Figura 3 ilustra os dados experimentais e simulados de um dos experimentos realizados. Os valores dos parâmetros empregados na simulação estão na Tabela 2.

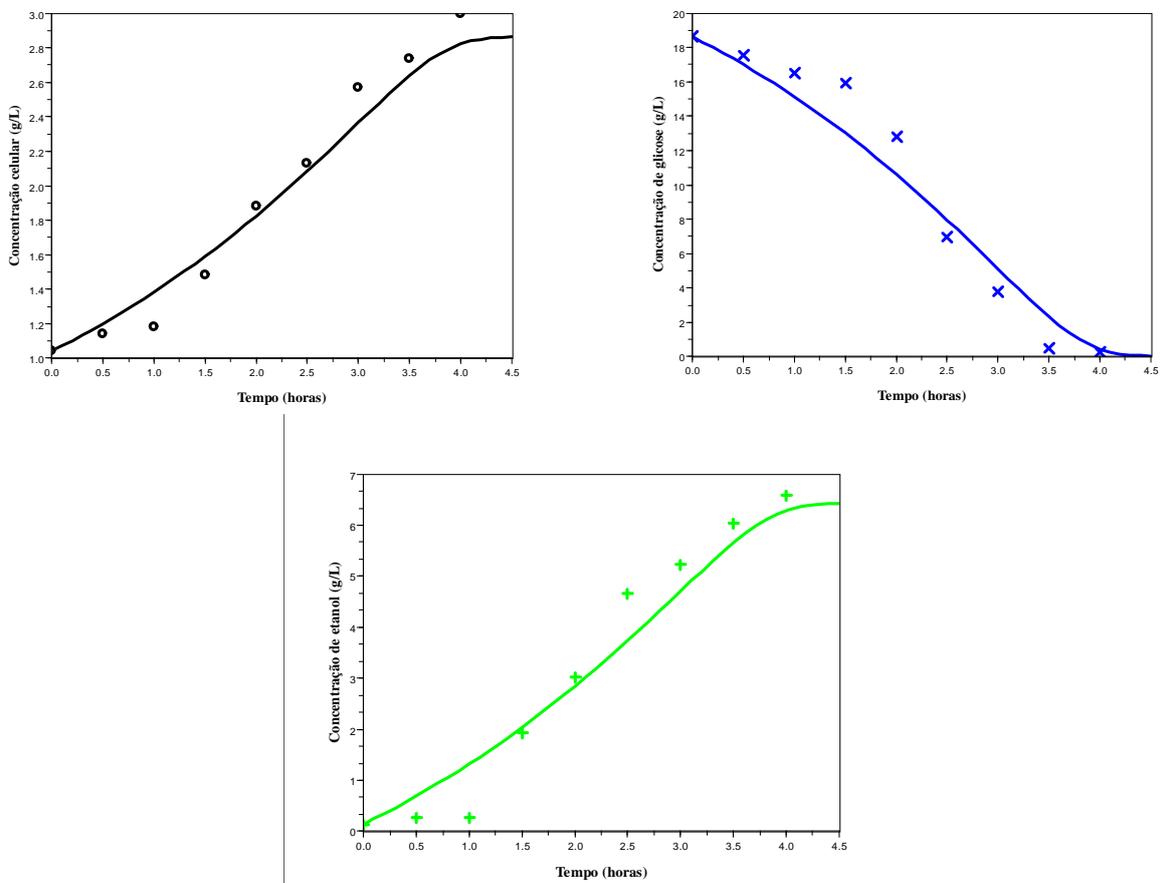


Figura 3. (A) Concentração de células, (B) concentração de glicose e (C) Concentração de etanol, ao longo do experimento 6.

A partir dos valores experimentais, procedeu-se a determinação do coeficiente de conversão célula/substrato ( $Y_{X/S}$ ) e da velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ). As Figuras 4 e 5 apresentam os gráficos elaborados para determinação destes parâmetros.

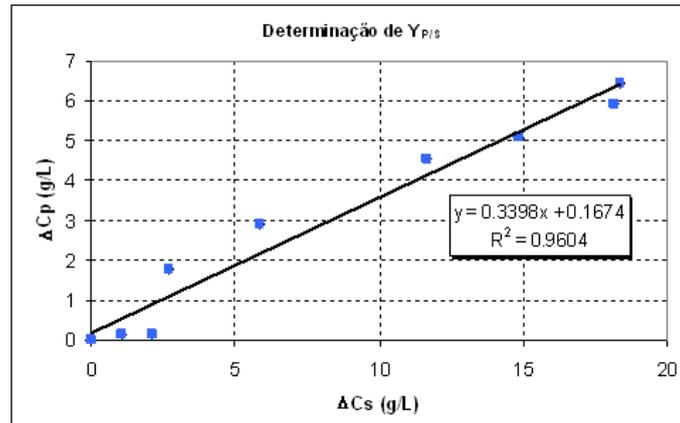


Figura 4. Gráfico para determinação de  $Y_{X/S}$ .

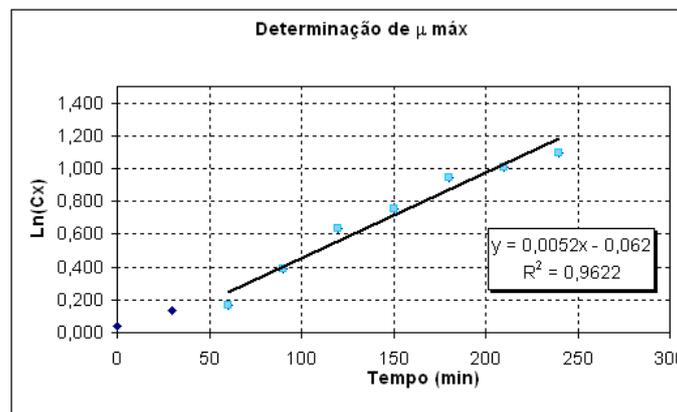


Figura 5. Gráfico para determinação de  $\mu_{\max}$ .

A Tabela 2 apresenta os valores dos parâmetros  $Y_{X/S}$  e  $\mu_{\max}$  obtidos nos experimentos realizados.

Tabela 2 – Valores experimentais dos parâmetros  $Y_{X/S}$  e  $\mu_{\max}$ .

Experimento 1	$C_{s0} = 20,0 \text{ g/L}$ e $C_{x0} = 1,3 \text{ g/L}$
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,12
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,26
Experimento 2	$C_{s0} = 40,0 \text{ g/L}$ e $C_{x0} = 6,0 \text{ g/L}$
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,08
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,16
Experimento 3	$C_{s0} = 30,0 \text{ g/L}$ e $C_{x0} = 4,0 \text{ g/L}$
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,14
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,23
Experimento 4	$C_{s0} = 30,0 \text{ g/L}$ e $C_{x0} = 4,0 \text{ g/L}$
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,11
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,21

Experimento 5	$C_{s0} = 30,0 \text{ g/L}$ e $C_{x0} = 4,0 \text{ g/L}$
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,29
Experimento 6	$C_{s0} = 20,0 \text{ g/L}$ e $C_{x0} = 1,0 \text{ g/L}$
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,098
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,31
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,34

Os valores obtidos para o coeficiente de conversão célula/substrato ( $Y_{X/S}$ ) e para a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ) estão próximos daqueles encontrados na literatura (BADINO E HOKKA, 1999).

#### 4.2 Influência do Aumento da Pressão na Produção de Etanol

A influência da pressão na formação de etanol foi investigada. Os resultados da concentração de etanol obtida em cultivos realizados sem pressurização foram comparados com resultados de cultivos realizados com pressurização do reator. O gráfico da Figura 6 apresenta esta comparação. Foram comparados os experimentos realizados em condições experimentais semelhantes (experimento 2 com experimentos 4 e 5; e experimento 1 com experimento 6).

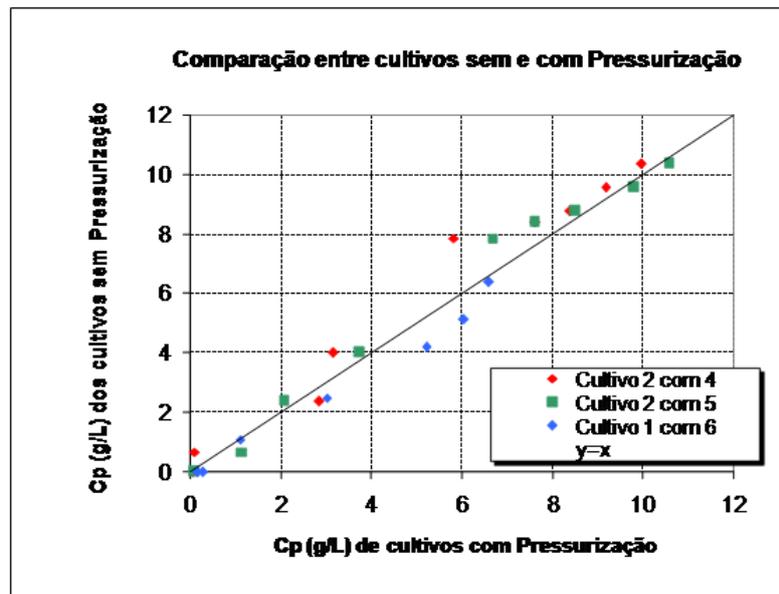


Figura 6. Comparação da concentração celular em cultivos sem pressurização (experimentos 1 e 2) com a concentração em cultivos com pressurização (experimentos 4, 5 e 6).

A partir da Figura 6 é possível concluir que a pressurização não teve influência na produção de etanol nas condições experimentais avaliadas.

#### 4.3 Estimativa da Concentração de Etanol a partir da Pressão

Para obter uma relação entre a concentração de etanol produzida (presente na fase líquida) e a pressão gerada no interior do tubo de PVC elaborou-se o gráfico da Figura 7. Foi

ajustada uma equação (curva de calibração para o sistema) relacionando a pressão com a concentração de etanol em cada instante (equação 8).

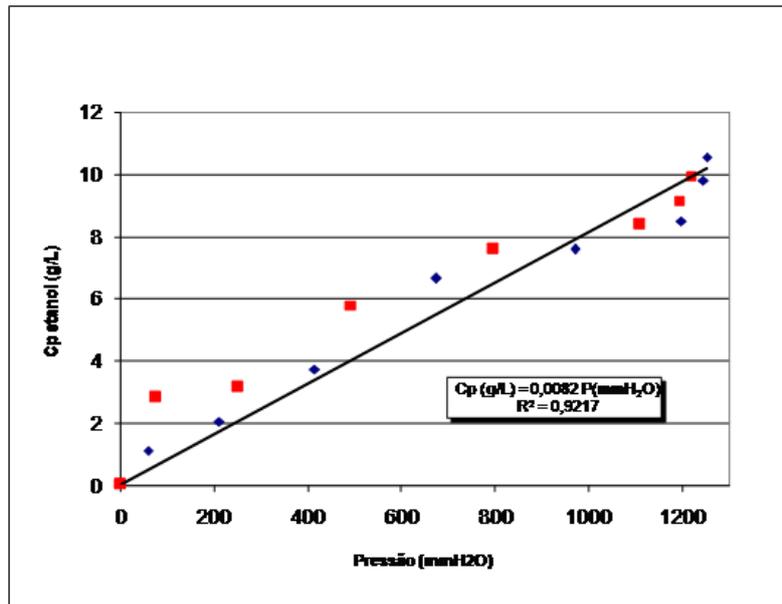


Figura 7. Gráfico da concentração de etanol *versus* a pressão no interior do tubo de PVC ao longo do experimento.

$$C_{P,\text{estimado}} \text{ (g/L)} = 0,0082 \cdot P \quad (8)$$

onde:  $C_{P,\text{estimado}}$  é a concentração estimada de etanol (g/L)  
 $P$  é a pressão (mmH<sub>2</sub>O)

A concentração de etanol referente ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) gerado e acumulado na fase gasosa (interior do tubo de PVC) foi determinada utilizando a equação dos gases ideais, para calcular o número de mols de CO<sub>2</sub> no interior do tubo de PVC, e supondo quantidades equimolares de etanol e CO<sub>2</sub> gerados na fermentação.

$$C_{P,\text{estimado}} \text{ (g/L)} = \frac{P \cdot V_{\text{PVC}}}{R \cdot T} \cdot \frac{MM_{\text{Etanol}}}{V_{\text{meio\_cultivo}}} \quad (9)$$

onde:  $P$  é a pressão no interior do tubo de PVC (m.c.a)  
 $V_{\text{PVC}}$  é o volume do tubo de PVC (cm<sup>3</sup>)  
 $R$  é a constante dos gases ideais (847,37 m.c.a · cm<sup>3</sup> · mol<sup>-1</sup> · K<sup>-1</sup>)  
 $T$  é a temperatura (K)  
 $MM_{\text{Etanol}}$  é a massa molar do etanol (g · gmol<sup>-1</sup>)  
 $V_{\text{meio-cultivo}}$  é o volume do meio de cultivo (cm<sup>3</sup>)

A Tabela 3 apresenta os resultados de concentração de etanol calculada ( $C_{P,\text{estimado}}$ ) utilizando-se a equação (9) e os valores de concentração de etanol experimental ( $C_p$ ) obtidos em análise química empregando o método da oxidação pelo dicromato de potássio (experimento 6).

Tabela 3 – Concentrações de etanol experimental e calculada pela equação (9).

Tempo (horas)	P (mmH <sub>2</sub> O)	C <sub>P</sub> (g/L)	C <sub>P,estimado</sub> (g/L)
0,0	0	0,137	0,010
0,5	37	0,275	0,163
1,0	97	0,275	0,415
1,5	180	1,923	0,771
2,0	257	3,023	1,109
2,5	514	4,671	2,235
3,0	743	5,221	3,265
3,5	949	6,045	4,219
4,0	1008	6,595	4,537

#### 4.4 WebLab do Experimento

A Figura 8 ilustra a primeira tela do *WebLab* desenvolvido. Nesta tela o usuário fornece os valores das concentrações iniciais de célula, glicose e etanol (estes valores são a condição inicial para integração das equações diferenciais ordinárias referentes aos balanços de massa, equações 5, 6 e 7; a integração é realizada no próprio LabVIEW).

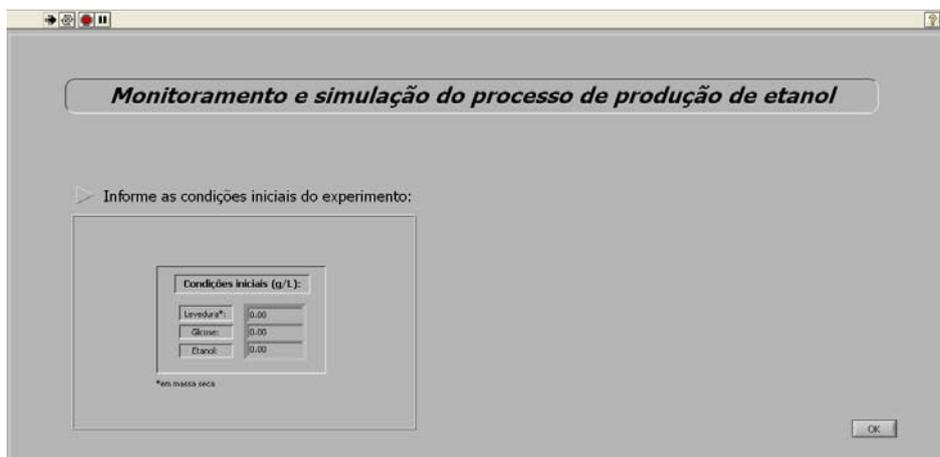


Figura 8. Primeira tela do *WebLab* de fermentação alcoólica.

Assim que a dorna é inoculada é possível acompanhar a variação da pressão no interior do tubo de PVC (experimental e simulada), conforme ilustra a Figura 9. O valor simulado é obtido a partir da equação (9). Nesta equação obtém o valor da pressão a partir do valor simulado da concentração de etanol no meio de cultivo (integração do sistema composto pelas equações 5, 6 e 7).

A Figura 10 apresenta a simulação da concentração celular, de glicose e etanol durante o experimento.

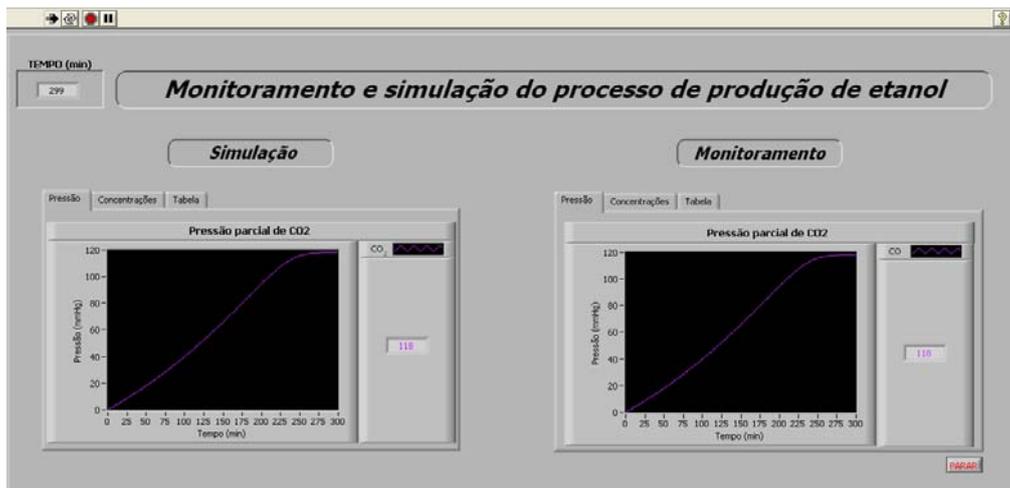


Figura 9. Simulação e monitoramento em tempo real do valor da pressão no interior do tubo de PVC.



Figura 10. Simulação dos valores da concentração celular, de glicose e etanol a partir das condições iniciais assumidas.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho apresentou-se o desenvolvimento, implementação e operação remota de *WebLab* onde se realizam experimentos de fermentação alcoólica.

A implantação de *WebLabs* torna possível o compartilhamento de experimentos por diferentes instituições de ensino, permitindo que os estudantes possam ter uma formação mais homogênea (nem todos laboratórios dispõem do mesmo conjunto de práticas experimentais). O uso de *WebLabs* permite explorar o grande potencial de novas ferramentas de ensino voltadas para a Internet. O simulador desenvolvido mostra-se adequado para ser utilizado como uma ferramenta de treinamento antes da realização da atividade experimental.

O experimento mostrou-se adequado para ser operado remotamente. É adequado como atividade de prática laboratorial devido ao tempo de duração (aproximadamente quatro horas; este tempo pode ser reduzido aumentando-se a concentração celular do inóculo). Encontra-se disponível para acesso dos demais laboratórios participantes do projeto KyaTera.

### ***Agradecimentos***

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro para realização deste projeto (Processos 03/08155-1 e 05/01377-4).

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering**. New York, USA: Academic Press, 2006.

BADINO, A.C.; HOKKA, C.O. Laboratory Experiment in Biochemical Engineering: Ethanol Fermentation. **Chemical Engineering Education**, v. 33(1), p. 54, 1999.

CURRALEIRO, R. G.; BADINO, A. C. Sistema para Execução Remota e Monitoramento de Experimento de Fermentação Alcoólica. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2, 2006, São Carlos. **Anais**. São Carlos: UFSCar, 2006. P. 348.

i-CAMPUS. Citação de referências e documentos eletrônicos. Disponível em: <<http://icampus.mit.edu/spotlights/iLab.shtml>> Acesso em 06 junho 2008.

JORNAL CANA. Citação de referência e documentos eletrônicos. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>>. Acesso em 06 de junho de 2008.

JOSLYN, M.A. **Methods in Food Analysis**. New York, USA: Academic Press, 1970.

NEDIC, Z.; MACHOTKA, J.; NAFALSKI, A. **Remote Laboratories Versus Virtual and Real Laboratories**. Mawson Lakes, USA, 2003. Disponível em <<http://fie.engrng.pitt.edu/fie2003/papers/1077.pdf>>. Acesso em 06 de junho 2008.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall PTR, 2002.

MILLER, G. L. Use of the Acid Dinitrosalicilic for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-431, 1959.

### **WEBLAB: ALCOHOLIC FERMENTATION**

**Abstract:** *This work describes the design, implementation and internet remote operation of WebLab based on alcoholic fermentation (ethanol production). The ethanol production is carried out in a vessel (two liter working volume) employing Saccharomyces cerevisiae microorganism. Glucose is used as main carbon and energy source. During the process, the carbon dioxide produced is sent to a hermetically sealed PVC tube. The pressure increase is monitored by means of a digital manometer. Various experiments were conducted in order to calibrate the system. It was possible to establish a direct relation between ethanol concentration in the liquid phase and the pressure inside the tube. A program was*

*implemented in LabVIEW (graphical interface) for the WebLab. In this program it was possible to monitor the pressure inside the PVC tube and the ethanol concentration in the medium during the process. A mathematical model was implemented to infer the cell, glucose and ethanol concentration during the production process. A simulator was developed for training purpose. Therefore it can be possible to simulate the experiment in different conditions before to access and to carry out the WebLab experiment.*

**Key-words:** *Remote experiment, i-Lab, Ethanol, Simulator, Bioprocess.*