



LABORATÓRIO ABERTO DE PROCESSOS QUÍMICOS: FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E AUTOMAÇÃO DO PROCESSO DE CULTIVO DA LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

Alberto Colli Badino Jr. – badinojr@power.ufscar.br

Antonio J. G. Cruz – ajgcruz@deq.ufscar.br

Raquel de Lima Camargo Giordano – raquel@deq.ufscar.br

Roberto de Campos Giordano – roberto@deq.ufscar.br

Teresa Cristina Zangirolami – teresacz@power.ufscar.br

Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

Via Washington Luis, km 235, C.P. 676 – Monjolinho

13565-905 – São Carlos - SP

Resumo: *Este trabalho apresenta e discute os resultados obtidos por três turmas, divididas em seis grupos, durante os dois primeiros anos da implantação da disciplina Desenvolvimento de Processos Químicos 1 e 2, dentro da nova metodologia de ensino implantada no Laboratório Aberto de Processos Químicos. Os temas abordados foram: Fermentação Alcoólica com microrganismo imobilizado, avaliando o efeito da diminuição do tamanho dos pellets com o objetivo de minimizar os efeitos da transferência de massa, eliminando uma das desvantagens da imobilização. Os resultados foram comparados com aqueles realizados empregando células livres. Fermentação Alcoólica em Batelada e em Batelada Alimentada (células livres): Nesse tema, o grupo de alunos avaliou os desempenhos, quanto à produtividade em etanol, de diferentes formas de operação do reator (batelada e batelada alimentada) via simulação, utilizando como softwares disponíveis comercialmente (Maple VTM e AnaBio 1.0), e experimentalmente, a partir de cultivos em biorreator de 5 L de capacidade. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos no processo industrial (fonte: Usina Zanin - Araraquara/SP). Recuperação do Etanol arrastado pelo CO₂ formado na Fermentação Alcoólica. A partir do dado industrial de que cerca de 1% do etanol produzido na fermentação alcoólica é arrastado pelo CO₂ gerado (fonte: Usina Zanin - Araraquara/SP), a equipe de alunos equacionou o problema, tomando como hipótese que o CO₂ gerado deixa a dorna de fermentação saturado de etanol e água e, após projeto e montagem de um aparato, obtiveram experimentalmente o valor real em dorna de 5 L. Cultivo de Levedura de Panificação em reator tipo tanque agitado e aerado (20 litros de volume útil) onde os alunos avaliaram o desempenho do processo buscando minimizar o efeito Crabtree durante o processo em experimentos realizados em batelada e batelada alimentada. Automação da Produção de Levedura focando a instrumentação e controle do processo utilizando Controlador Lógico Programável e Sistema Supervisório.*

Palavras-chave: *Laboratório aberto de processos químicos, Fermentação alcoólica, Imobilização, Produção de biomassa, Automação.*

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho apresenta os resultados obtidos por três turmas (seis grupos) durante os dois primeiros anos da implantação da disciplina Desenvolvimento de Processos Químicos 1 e 2, empregando os conceitos da nova metodologia de ensino implantados com a criação do “Laboratório Aberto de Processos Químicos” do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

Os temas abordados foram:

- 1) Fermentação alcoólica em batelada empregando microrganismos livres e imobilizados, avaliando o efeito da diminuição do tamanho das partículas (*pellets*) com o objetivo de minimizar os efeitos da transferência de massa, inerente aos processos empregando microrganismos imobilizados;
- 2) Fermentação alcoólica em batelada e em batelada alimentada utilizando microrganismos livres. Nesse tema, o grupo avaliou os desempenhos quanto à produtividade em etanol, de diferentes formas de operação do reator (batelada e batelada alimentada) via simulação, utilizando como *softwares* disponíveis comercialmente (Maple VTM e AnaBio 1.0, SILVA *et al.*, 2001) e experimentalmente, a partir de cultivos em biorreator de 5 L de capacidade;
- 3) Recuperação do etanol arrastado pelo dióxido de carbono formado durante a fermentação alcoólica. A partir do dado industrial de que cerca de 1% do etanol produzido na fermentação alcoólica é arrastado pelo dióxido de carbono gerado (fonte: Usina Zanin – Araraquara-SP), a equipe equacionou o problema, tomando como hipótese que o dióxido de carbono gerado deixa a dorna de fermentação saturada de etanol e água. Após projeto e montagem de um aparato, foram realizados experimentos para avaliar a validade do equacionamento do problema;
- 4) Cultivo de levedura de panificação em reator tipo tanque agitado e aerado (20 L de volume útil) onde as equipes avaliaram o desempenho e a automação do processo buscando minimizar o efeito Crabtree (CROCOMO e GUTIERREZ, 2001; LIDÉN, 1993). Foram realizados experimentos em batelada e batelada alimentada em reator automatizado (Controlador Lógico Programável e Sistema Supervisório) focando a instrumentação e controle do processo.

Como os temas propostos estavam inseridos no contexto da Indústria Sucro-alcooleira, durante o primeiro semestre ao longo da disciplina Desenvolvimento de Processos Químicos 1, os alunos realizaram levantamento bibliográfico para identificar o estado da arte dos temas em estudo, no intuito de se obter e divulgar informações gerais sobre o setor de produção de açúcar, álcool e biomassa (dados técnicos e econômicos), e mais especificamente informações acerca dos temas em estudo. Os problemas foram equacionados, fazendo uso dos conceitos e conhecimentos adquiridos ao longo da formação acadêmica. A viabilidade de realizar experimentos em laboratório foi avaliada, cabendo aos alunos levantar os materiais, equipamentos, metodologias de análise necessárias à execução da proposta, assim como avaliar questões de segurança no laboratório e ambientais com a disposição adequada de eventuais resíduos gerados. As condições experimentais e cronograma de execução foram propostos e discutidos inter e entre equipes, após a simulação e discussão com os professores tutores.

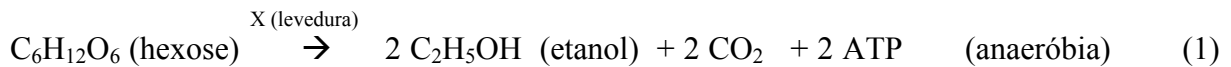
Os resultados aqui apresentados foram compilados dos relatórios finais da disciplina Desenvolvimento de Processos Químicos 2, ao final do oitavo período do curso.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

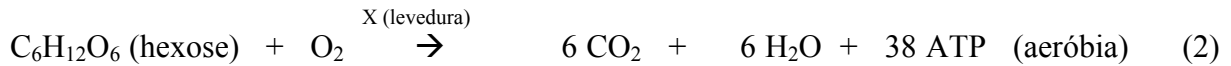
2.1 Levedura de Panificação (*Saccharomyces cerevisiae*)

Industrialmente, a fermentação alcoólica é realizada pela levedura *S. cerevisiae*, um microrganismo unicelular aeróbio facultativo. Esta espécie dispõe de uma série de enzimas

que a tornam capaz de, na ausência de oxigênio, realizar fermentação a partir de açúcares simples (monossacarídeos) ou a partir da sacarose, obtendo energia para sua sobrevivência, além de produzir subprodutos, tais como o etanol. Genericamente, a equação estequiométrica simplificada da fermentação alcoólica a partir da glicose é dada por:



No entanto, na presença de oxigênio a levedura respira segundo a estequiometria:



Observa-se um rendimento energético muito maior através da via respiratória (produção de biomassa) em comparação com a rota anaeróbia (produção de etanol). Todavia, dependendo das condições operacionais tais como disponibilidade de oxigênio e concentração de substrato, um dos mecanismos ocorre preferencialmente.

Em processos fermentativos que sintetizam metabólitos primários como o etanol, o crescimento celular e a geração do produto ocorrem simultaneamente. Nesse caso, o crescimento celular e a síntese de produto estão diretamente relacionados. Contudo, a produção de etanol pode ser prevista diretamente da cinética de crescimento celular. A partir da hipótese que a concentração celular é uma boa medida do sistema enzimático responsável pela transformação do substrato em produto, é conveniente definir a velocidade de crescimento específico como:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

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

Vários modelos foram propostos para relacionar a velocidade específica de crescimento (μ) com o substrato limitante e concentrações de inibidores. Em condições industriais (cultivo em batelada), assume-se que o crescimento celular é inibido no início do processo pela concentração de substrato e, a medida que o etanol é formado, seu acúmulo acarreta uma inibição clássica conhecida como "inibição pelo produto". Portanto, uma equação que combine os efeitos parece ser a mais adequada para modelar a produção de etanol por *S. cerevisiae*.

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \cdot \frac{S}{K_S + S + S^2 / K_{IS}} \cdot \frac{K_P}{K_P + P} \quad (4)$$

Portanto, uma vez conhecida a velocidade específica de crescimento, pode-se escrever os balanços de massa para células (X), substrato (S) e produto (P) para o processo em batelada alimentada, utilizando vazão constante (F), para o processo de fermentação alcoólica:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X \quad (5)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_F - S) - \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X \quad (6)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P X - \frac{F}{V} P \quad (7)$$

onde $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ são os coeficientes de rendimento de substrato a células e a etanol, respectivamente. Nos cultivos em batelada o equacionamento é similar, considerando $F = 0$.

2.2 Imobilização de Microrganismos

Células imobilizadas são aquelas que se encontram fisicamente confinadas em uma região definida do espaço, com manutenção de sua atividade catalítica e podendo ser reutilizadas.

Basicamente, os mesmos métodos descritos na literatura para imobilização de enzimas aplicam-se para microrganismos. Pelo fato deles serem de maior tamanho em comparação com as enzimas, a imobilização por envolvimento geralmente é satisfatória, dependendo do suporte empregado.

O método de envolvimento em gel (como alginato e pectina) tem sido intensamente aplicado para a fixação de microrganismo, devido principalmente à simplicidade e eficiência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Foi utilizada levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial com 70% de umidade.

3.2 Cultivo com Células Imobilizadas (Fermentação Alcoólica)

3.2.1 Meios de Cultura

Os cultivos utilizando microrganismo imobilizado utilizaram a seguinte composição de meio (em g/L): glicose, 44,0; sulfato de amônio, 4,5; sulfato de magnésio, 0,4 g/L; fosfato diácido de potássio, 5,0; extrato de levedura, 3,0.

3.2.2 Suporte de Imobilização e Preparo dos *Pellets*

À suspensão de pectina cítrica (6 %) adicionou-se 10% de levedura e 84% m/m de água. A solução foi preparada em um béquer e bombeada com auxílio de bomba peristáltica (Figura 1) para preparo dos *pellets*. Estes eram coletados e mantidos em recipiente contendo solução de KCl 2,0 M (tempo de cura = 1 hora). Em seguida os *pellets* eram peneirados (classificados em diferentes tamanhos) e secos para inocular o fermentador.

Foram realizados experimentos com células imobilizadas e livres em *shaker* (31°C e 150 rpm) e em fermentador de bancada (mesmas condições).

3.3 Cultivos com Células Livres em Batelada e em Batelada Alimentada

3.3.1 Meio de Cultura

Os cultivos utilizando microrganismo livre utilizaram a seguinte composição de meio (em g/L): melão e melão diluído para ca. 200 g/L de ART; sulfato de amônio, 4,5; sulfato de magnésio, 0,4 g/L; fosfato diácido de potássio, 5,0; extrato de levedura, 3,0.

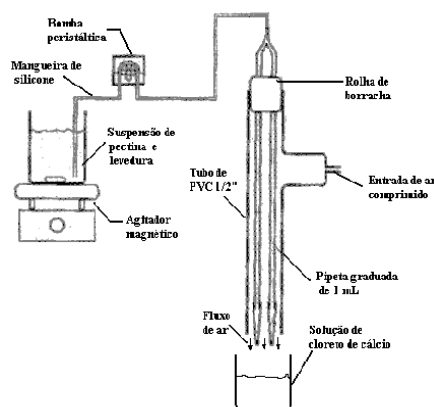


Figura 1. Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no preparo dos *pellets*.

3.4 Recuperação do Dióxido de Carbono formado durante a Fermentação

3.4.1 Meio de Cultura

Foi utilizado o mesmo meio de cultura do item anterior (3.3.1).

A Figura 2 apresenta um diagrama ilustrativo do aparato experimental utilizado nos experimentos para avaliar os desempenhos dos cultivos em batelada e em batelada alimentada e na recuperação do etanol arrastado durante a fermentação.

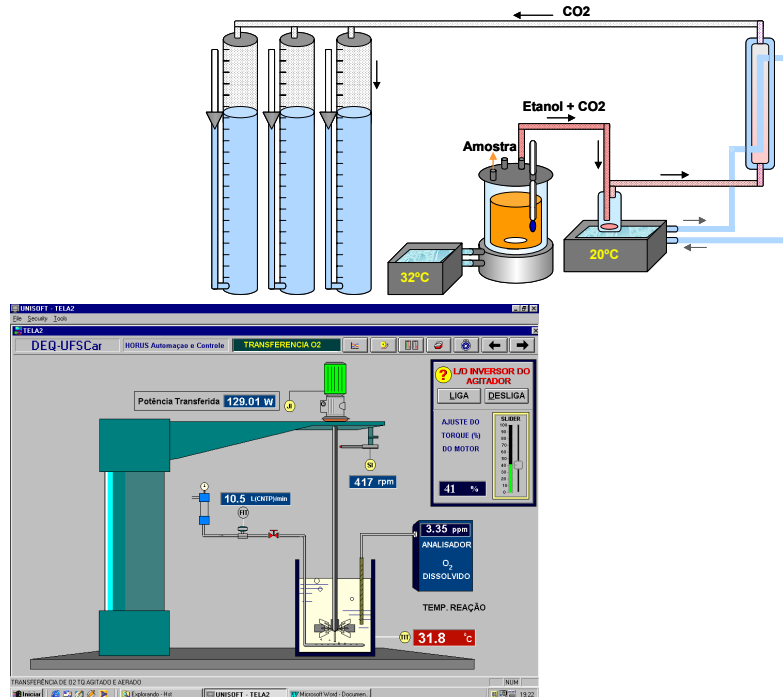


Figura 2. Aparato experimental utilizado nos experimentos em batelada e em batelada alimentada e na recuperação do etanol arrastado pelo CO₂.

3.5 Cultivo com Células Livres (Produção de Biomassa)

3.5.1 Meio de Cultura

Meio contendo a seguinte composição (em g/L): xarope de cana-de-açúcar (melaço) clarificado e diluído para ca 30 g/L de ART; sulfato de amônio, 15,0; fosfato diácido de amônio, 4,2.

A Figura 3 ilustra o aparato experimental utilizado nos experimentos com células livres para produção de etanol (item 3.3) e automação do processo de produção de biomassa.

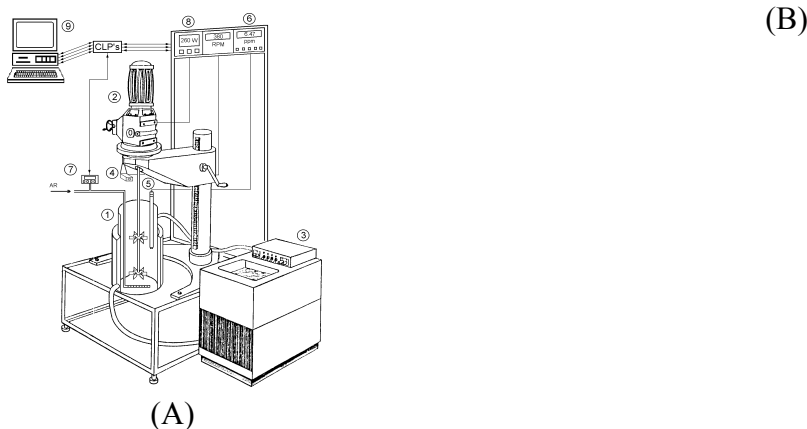


Figura 3. (A) Conjunto experimental utilizado nos experimentos com células livres (produção de etanol e biomassa). (1- tanque agitado, 2 - motor, 3 - banho termostático, 4 - fototacômetro, 5 - eletrodo de O₂ dissolvido, 6 - analisador de O₂ dissolvido, 7 - fluxômetro de massa, 8 - inversor de

frequência (indicador de potência), 9 - microcomputador supervisor); (B) Tela do Sistema Supervisório ilustrando algumas variáveis obtidas em tempo real pelo sistema de aquisição de dados.

3.6 Análises Químicas

Para quantificação da massa celular empregou-se o método da massa seca. A concentração de ART foi determinada pelo método DNS (ácido dinitrosalisílico) (MILLER, 1959). O etanol foi quantificado pelo método do dicromato de potássio (JOSLYN, 1970) e a partir do volume de CO₂ coletado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Fermentação Alcoólica empregando Microrganismos Imobilizados

A Figura 4 apresenta os resultados experimentais realizados em *shaker* para os três diferentes tamanhos de *pellets* investigados neste estudo.

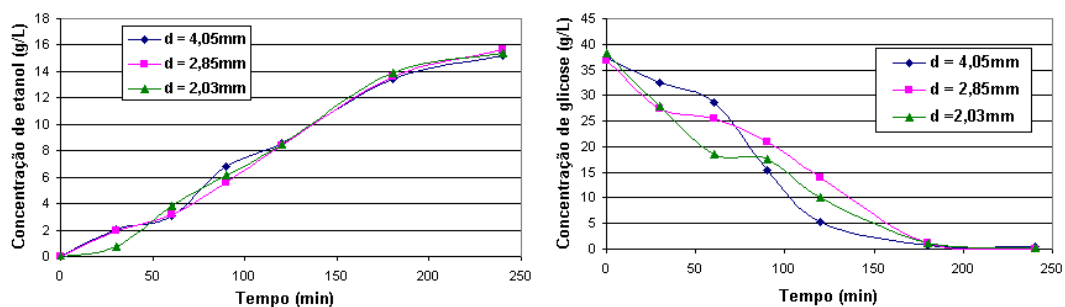


Figura 4. Efeito do diâmetro dos *pellets* na produção de etanol e no consumo de glicose pelo microrganismo.

A Figura 5 apresenta o resultado obtido para ensaio realizado em fermentador de bancada (400 mL de meio de cultura inoculado com 100ml de suspensão com 10% de levedura – células livres e 100 g de *pellets* com 10% de levedura – células imobilizadas).

A partir dos resultados ilustrados pelas Figuras 4 e 5 concluiu-se que:

- os três diferentes diâmetros apresentaram resultados semelhantes;
- o açúcar foi totalmente consumido em três horas;
- o efeito difusivo pôde ser considerado desprezível.

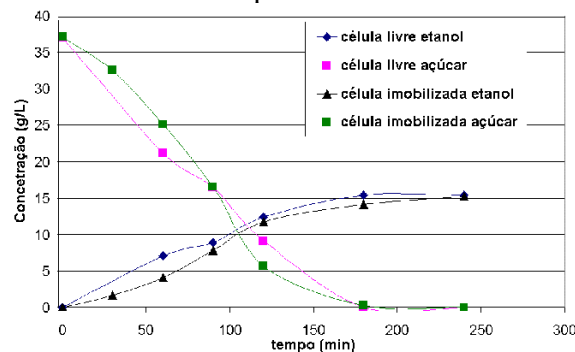


Figura 5. Ensaio realizado em fermentador de bancada empregando células livres e imobilizadas.

4.2 Fermentação Alcoólica em Batelada e em Batelada Alimentada com Microrganismos Livres

Inicialmente, foi realizado um experimento em batelada para obtenção de parâmetros cinéticos do modelo dado pela Equação 4 empregando o *software* AnaBio 1.0 (SILVA *et al.*,

2001). A Tabela 1 apresenta os valores ajustados dos parâmetros cinéticos do modelo utilizado e a Figura 6 ilustra o ajuste obtido para as concentrações de substrato e de produto.

Tabela 1. Parâmetros do modelo cinético (Equação 4) e coeficientes de rendimento globais.

Parâmetro	Valor Ajustado
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,23
K_{IP} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	30
K_{S} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	6
K_{IS} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	450
$Y_{\text{X/S}}$ ($\text{g}_x\cdot\text{g}_s$)	0,057
$Y_{\text{P/S}}$ ($\text{g}_p\cdot\text{g}_s$)	0,42

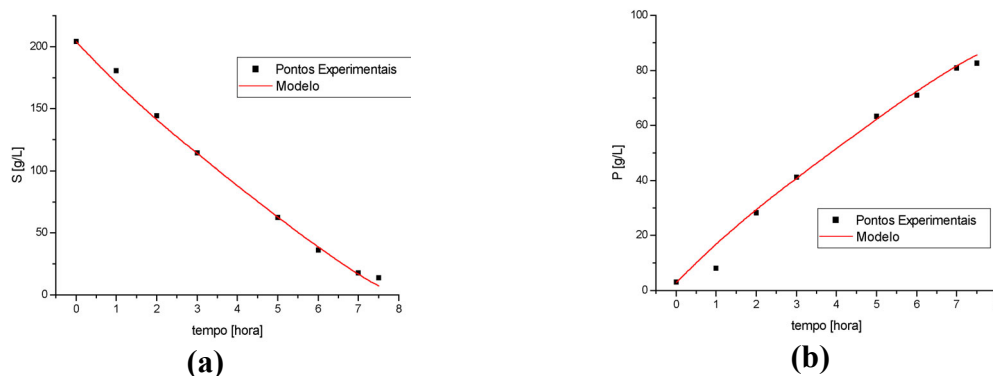


Figura 6. Ajuste do modelo cinético (Equação 4) aos valores experimentais de S e P do cultivo em batelada.

Uma vez obtidos os parâmetros cinéticos a partir do cultivo em batelada padrão, foram realizadas várias simulações, variando-se o tempo de início da alimentação bem como as concentrações de substrato inicial da etapa em batelada e do meio suplementar, na procura de se obter uma condição operacional que se maximiza a produtividade em etanol do processo, dada em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, imaginando que essa estratégia pudesse minimizar, no início do cultivo, os efeitos inibitórios da alta concentração de substrato. Os resultados da melhor simulação foram comparados com os resultados obtidos num cultivo em condições industriais (fonte: Usina Zanin - Araraquara), onde o caldo é alimentado à dorna juntamente com o "leite de levedura" (inóculo: 10% v/v). Como na indústria a dorna apresenta um volume de 250 m^3 , são necessárias 4 horas para o seu enchimento, sendo que o processo demora de 8 a 12 horas. Essas condições experimentais foram reproduzidas em escala de laboratório. Ainda, para que a comparação entre os resultados das simulações para os cultivos em batelada alimentada e os cultivos em batelada padrão e industrial se desse em condições similares, a somatória das massas de substrato presentes nos meios de cultura inicial (batelada) e suplementar foi exatamente igual às massas iniciais utilizadas nos cultivos em batelada padrão e industrial, que divididas pelos volumes totais definiram uma concentração inicial de substrato em torno de $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A Figura 7 ilustra para fins comparativos os resultados obtidos nos três cultivos.

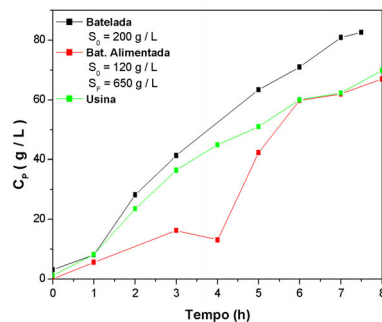


Figura 7. Comparação entre as produções de etanol nas condições de operação estudadas.

Os resultados obtidos mostraram que não foi encontrada nenhuma condição de operação para o cultivo em batelada alimentada que superasse a produtividade do cultivo industrial (usina).

4.3 Recuperação do Etanol

Para abordar o problema foi necessário prever as formas pelas quais o etanol é desprendido na dorna. Considerou-se, em princípio, que a perda de etanol ocorre de três formas:

- Evaporação (difusão): devido ao gradiente de concentração existente entre a superfície da dorna e o ambiente externo;
- Arraste pelas bolhas de CO₂: é ocasionado pelo movimento provocado pelas bolhas de CO₂ que carregam o etanol na forma líquida;
- Bolha de CO₂ saturada de etanol: como a bolha formada durante a fermentação é muito pequena (nível molecular) e o caminho percorrido dentro da dorna é grande, pode-se afirmar que as bolhas deixam a dorna saturadas em etanol.

A Tabela 2 apresenta os valores da porcentagem de etanol recuperado em função das condições operacionais utilizadas.

Através dos experimentos pôde-se constatar que o melhor modelo para prever a arraste de etanol pelo CO₂ é aquele que considera a saturação da bolha de CO₂ de etanol e água (equilíbrio químico). No entanto, os valores experimentais foram superiores àqueles obtidos pelo modelo, o que indica estar ocorrendo um outro fenômeno de arraste. Possivelmente, a explosão das bolhas na superfície da dorna eleva gotículas que são arrastadas mecanicamente pelo alto fluxo de CO₂ que deixa a dorna.

Tabela 2. Porcentagem de etanol recuperado em função das condições operacionais.

Experimento	Condição no condensador	Recuperação
Simulação	Condensação total	0,214%
1º Cultivo	0°C	0,365%
2º Cultivo	20°C	0,082%
4º Cultivo	25°C	0,030%

4.4 Produção de Levedura de Panificação

Foram realizados cultivos em reator tipo tanque agitado e aerado com o objetivo de minimizar a formação de etanol durante o crescimento da levedura de panificação. Estes foram realizados com participação de ambas equipes, sendo uma responsável pelo preparo do cultivo e análises químicas e a outra pela operação do aparato experimental (reator e sistema de aquisição de dados composto por Controlador Lógico Programável e Sistema

Supervisório). Foram monitoradas em tempo real variáveis como a temperatura, velocidade de agitação, vazão de ar, oxigênio dissolvido.

A Figura 8 apresenta os resultados de cultivo realizado em batelada.

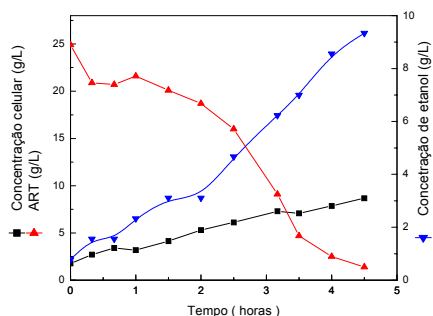
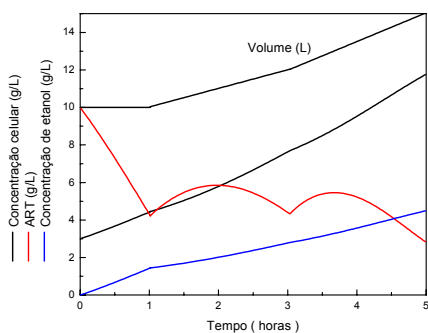
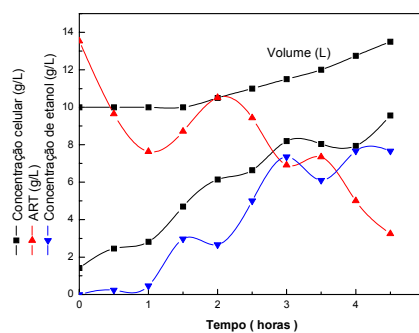


Figura 8. Dados experimentais obtidos no cultivo da levedura de panificação em condições aeróbias operado em batelada.

Com objetivo de reduzir a formação de etanol, inerente ao processo em batelada, que inicia com concentrações elevadas de substrato, simulações de cultivos em batelada alimentada foram realizadas com o auxílio do *software* AnaBio (SILVA *et al.*, 2001). Na Figura 9 (A) são apresentados os resultados de uma destas simulações e na Figura 9 (B) os resultados experimentais obtidos.



(A)

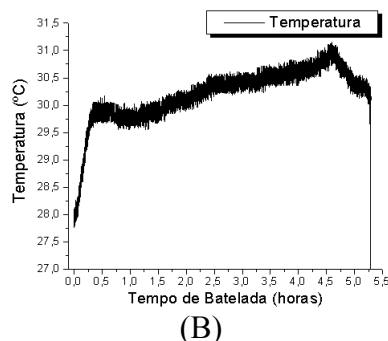
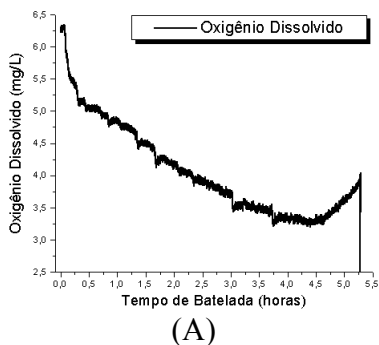


(B)

Figura 9. Dados simulados (A) e experimentais (B) no cultivo da levedura de panificação em batelada alimentada (Vazão de suplementação: 1,0 L/h entre 1^a e 3^a horas e 1,5 L/h após; Concentração de ART no meio suplementar: 100 g/L).

Objetivou-se iniciar este experimento com concentrações de ART e de células de 10 g/L e 3,0 g/L, respectivamente. Devido a um erro na diluição, após análise experimental encontrou-se 14,0 g/L de ART e 1,8 g/L para concentração celular (Figura 9 (B)).

A Figura 10 apresenta duas variáveis de processo obtidas em tempo real durante o cultivo realizado em batelada alimentada.



Figuras 10. Perfil da concentração de oxigênio dissolvido e temperatura obtidas no cultivo realizado em batelada alimentada.

Apesar do erro experimental, observa-se uma diminuição na concentração de etanol nesta condição de operação.

Agradecimentos

Ao PADCT III/CNPq, Processo 01-QEQ-01/97-03/01-7 – RC: 1.2.6-0005/98, pelos recursos necessários à implantação do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CROCOMO, O.J. e GUTIERREZ, L.E. Caminhos metabólicos. *In*: BORZANI, W., SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A., AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial, vol. 1: Fundamentos, Editora Edgar Blücher Ltda, São Paulo, 2001.

JOSLYN, M.A. Methods in Food Analysis. Academic Press, 2nd edition, New York, 1970.

LIDÉN, G. On-Line Monitoring Techniques for the Study of Yeast Physiology. Some Studies on the Yeasts *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Department of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Dinamarca, 1993. (Tese de Doutorado).

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31(3): 426-428, 1959.

SILVA, F.H., MOURA, L.F., BADINO JR, A.C. AnaBio: Um Programa para Análise de Biorreatores. *In*: Anais do IV Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Maringá, Paraná, 2001.

OPEN LABORATORY OF CHEMICAL PROCESSES: ALCOHOLIC FERMENTATION AND AUTOMATION OF BAKER'S YEAST CULTIVATION

Abstract: *This paper presents and discusses the results obtained by three classes of students, allocated in six teams, during the two first years of the course Chemical Processes Development 1 and 2, following a new learning methodology: the "Open Laboratory of Chemical Processes". The topics studied were: 1) Alcoholic Fermentation employing*

immobilized microorganism, studying the effect of decreasing the pellet size with the aim of eliminating effects of mass transfer, thus avoiding one of the disadvantages of immobilization. The results were compared to that obtained with free cells. 2) Batch and Fed-Batch Alcoholic Fermentation (free cells): In this topic, the teams evaluate the ethanol productivity for different reactor operating conditions (batch and fed-batch) using simulation by commercial software (Maple and AnaBio 1.0) and throughout experiments in a 5 L bioreactor. The results were compared to that obtained in an industrial process (source: Usina Zanin – Araraquara/SP). 3) Ethanol recovery from the fermentation off-gas: Based on industrial information that 1% of ethanol is lost during fermentation process stripped by carbon dioxide (source: Usina Zanin – Araraquara/SP), the team approached the problem assuming the hypothesis that the carbon dioxide leaving the bioreactor is saturated in ethanol and water. The students planned and set up an experimental apparatus to get real data in a 5 L bioreactor. 4) Bakers' yeast cultivation in a stirred and aerated tank reactor (20 L working volume). The students evaluated the performance of the process, aiming to reduce the Crabtree effect during batch and fed-batch cultivations. 5) Automation of Baker's Yeast process, focusing on instrumentation and control using a Programmable Logic Controller and a Supervisory System.

Key-words: *Open Laboratory of Chemical Processes, Alcoholic fermentation, Immobilization, Biomass production, Automation.*