

**USO DE UM SENSOR DE COMPOSTOS
VOLÁTEIS PARA O CONTROLE DE UMA
FERMENTAÇÃO EM BATELADA
ALIMENTADA DE *Saccharomyces cerevisiae***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DÉBORA DE OLIVEIRA

Engenheira de Alimentos

**USO DE UM SENSOR DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PARA O
CONTROLE DE UMA FERMENTAÇÃO BATELADA
ALIMENTADA DE *Sacharomyces cerevisiae***

Orientador:

Prof Dr Jorge Luiz Ninow

Co-orientador:

Prof Dr Ariovaldo Bolzan

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

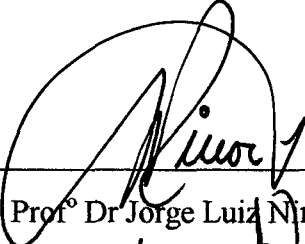
Florianópolis - SC - 1995

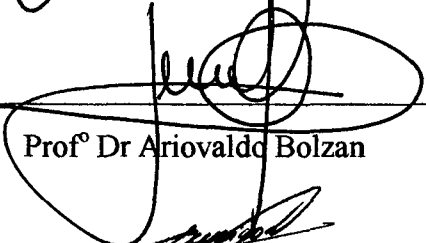
**USO DE UM SENSOR DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PARA O
CONTROLE DE UMA FERMENTAÇÃO BATELADA
ALIMENTADA DE *Sacharomyces cerevisiae***


por

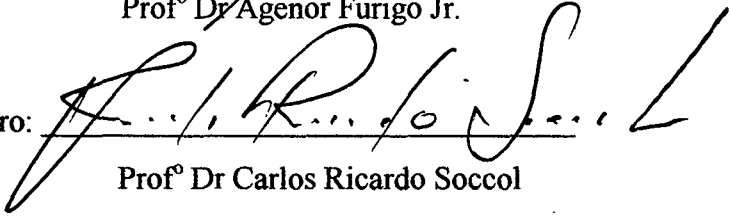
DÉBORA DE OLIVEIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela Comissão formada por:

Presidente: 
Prof.º Dr Jorge Luiz Ninow

Membro: 
Prof.º Dr Ariovaldo Bolzan

Membro: 
Prof.º Dr Agenor Furigo Jr.

Membro: 
Prof.º Dr Carlos Ricardo Soccol

Florianópolis, 31 de agosto de 1995.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Jorge Luiz Ninow pela orientação e amizade demonstrada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Ariovaldo Bolzan pela constante participação, incentivo, paciência, colaboração e principalmente, amizade prestadas no decorrer deste trabalho.

A todos os meus amigos, que de alguma forma, com paciência me incentivaram e ajudaram nesta etapa, especialmente, “Caxa”, Ciu, Dadá, Dê, Gi, Sandro e ao sempre prestativo, Edvinson.

Aos professores que acompanharam de perto meu trabalho e que, nos momentos de problemas, colaboraram de algum modo na realização deste trabalho.

Ao FUNCITEC e à CAPES, pelo suporte financeiro concedido durante esta pesquisa.

Aos meus pais, Pedro e Arlete, pelo incentivo, compreensão e carinho, meu especial agradecimento.

“Não, não tenho caminho novo

O que tenho de novo

É o jeito de caminhar.

Aprendi

(O caminho me ensinou)

A caminhar cantando

Como convém a mim

E aos que vão comigo

Pois já não vou mais sozinho.”

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO	vi
SUMMARY.....	vii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
II.1 BREVE HISTÓRICO	5
II.2 - CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
II.2.1 - Metabolismo da glicose:.....	6
II.2.2 - Características do crescimento aeróbio:.....	7
II.2.3 - Principais vias metabólicas:	15
II.3 - OS SENSORES EM LINHA.....	19
II.3.1 - Sensores para substâncias voláteis ou gasosas:.....	20
II.3.2 - A importância de um sensor de substâncias voláteis ou gasosas:.....	22
II.3.3 - As sondas à membrana:	23
II.3.4 - Influência de diferentes parâmetros sobre o comportamento do sensor:	24
II.4 - MONITORAMENTO E CONTROLE DA FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS	27
II.4.1 - Controle baseado na pré-programação da vazão de substrato:.....	27
II.4.2 - Controle baseado na manipulação da vazão de substrato:.....	28
II.4.3 - Controle baseado na estimativa em linha da vazão de alimentação em substrato:	31
II.4.4 - Critérios de otimização do processo:.....	32

CAPÍTULO III - CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS.....	40
III.1 - MICRORGANISMO.....	40
III.2 - MEIOS DE CULTURA.....	40
III.3 - SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	41
III.3.1 - Solução de alimentação.....	41
III.3.2.Solução de anti-espumante.....	42
III.3.3 - Solução para ajuste do pH (NaOH 10%):.....	43
III.4 - MÉTODOS ANALÍTICOS.....	43
III.4.1 -Amostragem.....	43
III.4.2 - Determinação da concentração celular.....	44
III.4.3 - Determinação da concentração de glicose.....	45
III.4.4 - Determinação da concentração de etanol - O sensor de produtos voláteis.....	46
III.5 - ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	51
III.5.1 - Preparo dos inóculos.....	51
III.5.2 - Condições de operação.....	52
III.6 - CONTROLE DAS FERMENTAÇÕES.....	53
III.6.1 - Fermentações descontínuas:.....	53
III.6.2 - Fermentações em batelada alimentada:.....	54
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
FERMENTAÇÕES BATELADA.....	60
- Evolução das velocidades específicas de crescimento.....	64
Determinação dos rendimentos.....	68
- Efeito da concentração inicial de glicose sobre a velocidade específica de crescimento e o rendimento celular.....	74

FERMENTAÇÕES BATELADA ALIMENTADA	76
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES.....	89
- Conclusões.....	89
- Sugestões para futuros trabalhos.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

NOMENCLATURA

X_t = Concentração de biomassa (g/l) após o tempo t (h)

X_0 = Concentração do inóculo (g/l)

S_r = Concentração de substrato original (g/l)

s = Concentração de substrato residual (g/l)

$X_{máx}$ = Concentração de biomassa máxima (g/l)

F_{in} = Vazão de alimentação (l/h)

X = Concentração de biomassa total (g/l)

V = Volume de meio no fermentador (l)

x = Concentração celular (g/l)

μ = Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

D = Taxa de diluição (h^{-1})

V_0 = Volume inicial de meio no fermentador (l)

$Y_{x/s}$ = Rendimento biomassa / substrato (g/g)

S_{in} = Concentração da solução de alimentação (g/l)

Q_{EtOH} = Velocidade específica de evolução do etanol (mmol/g.h)

QR = Quociente respiratório

DO = Densidade ótica

$Y_{x/E}$ = Rendimento biomassa / etanol (g/g)

μ_1 = Velocidade específica de crescimento sobre glicose (h^{-1})

μ_2 = Velocidade específica de crescimento sobre etanol (h^{-1}).

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA II.1 - VALORES DA TAXA DE CRESCIMENTO, μ E DO RENDIMENTO BIOMASSA/SUBSTRATO, YX/S PARA DIFERENTES CEPAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CULTIVADAS EM FERMENTAÇÕES BATELADA ALIMENTADA.....	14
TABELA II.2 - EXEMPLOS DE FERMENTAÇÕES ONDE ENTRAM EM JOGO COMPOSTOS VOLÁTEIS	21
TABELA III.1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CONSERVAÇÃO.....	41
TABELA III.2 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO	42
TABELA III.3 - CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO UTILIZADAS NO PROCESSO.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA II.1 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM REATOR BATELADA.....	8
FIGURA II.2 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM REATOR CONTÍNUO (LIEVENSE E LIM, 1982).....	9
FIGURA II.3 - METABOLISMO OXIDATIVO DA GLICOSE.....	15
FIGURA II.4 - METABOLISMO OXIDATIVO DO ETANOL.....	16
FIGURA II.5 - METABOLISMO FERMENTATIVO DA GLICOSE.....	17
FIGURA II.6 - TIPOS DE DOSAGENS EFETUADAS EM UM FERMENTADOR.....	20
FIGURA II.7 - MÉTODOS DE AMOSTRAGEM - (A) MEMBRANA, (B) "HEADSPACE".....	23
FIGURA II.8 - DIAGRAMA CLÁSSICO DE UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE LEVEDURAS: CONTROLE PRÉ-PROGRAMADO.....	28
FIGURA II.9 - RELAÇÕES ENTRE TAXA DE CRESCIMENTO, RENDIMENTO.....	35
FIGURA II.10 - RELAÇÕES ENTRE O QR E A VELOCIDADE ESPECÍFICA DE EVOLUÇÃO DO ETANOL (Q_{ETOH}) E A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (WOEHRER E ROEHR, 1981).....	36
FIGURA II.11 - RELAÇÃO ENTRE O Q_{ETOH} E O QR.....	38
FIGURA III.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BIOMASSA.....	45
FIGURA III.2 - MONTAGEM ESQUEMÁTICA DE UMA SONDA EM MEMBRANA TUBULAR.....	47
FIGURA III.3 - FOTOGRAFIA DO SENSOR À MEMBRANA TUBULAR INSERIDO NO FERMENTADOR (NEW BRUNSWICK).....	48

FIGURA III.4 - ESQUEMA DO FERMENTADOR NEW BRUNSWICK COM SEUS ACESSÓRIOS, O CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA - CG INSTRUMENTOS CIENTÍFICOS E MICROCOMPUTADOR, ONDE É REALIZADA A INTEGRAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	49
FIGURA III.5 - ESQUEMA COMPLETO DO EQUIPAMENTO.....	50
FIGURA III.6 - DISPOSITIVO DE INOCULAÇÃO ESTÉRIL.....	54
FIGURA III.7 - ESQUEMA DE UM FERMENTADOR "FED-BATCH".....	55
FIGURA IV.1.A - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM BATELADA SOBRE GLICOSE: EVOLUÇÃO DA BIOMASSA, GLICOSE E ETANOL, À CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICOSE DE 5 G/L.....	60
FIGURA IV.2 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM BATELADA SOBRE GLICOSE:.....	61
FIGURA IV.3 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM BATELADA SOBRE GLICOSE:.....	62
FIGURA IV.4 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO SOBRE GLICOSE (μ_1) E SOBRE ETANOL.....	65
FIGURA IV.5 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO SOBRE GLICOSE (μ_1) E SOBRE ETANOL.....	66
FIGURA IV.6 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO SOBRE GLICOSE (μ_1) E SOBRE ETANOL.....	66
FIGURA IV.7 - EVOLUÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO SOBRE GLICOSE, EM FERMENTAÇÕES EM.....	67
FIGURA IV.8 - EVOLUÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO SOBRE ETANOL, EM FERMENTAÇÕES EM.....	68

FIGURA IV.9 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA/GLICOSE ($Y_{x/s}$) PARA UMA FERMENTAÇÃO BATELADA, λ	69
FIGURA IV.10 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA/GLICOSE ($Y_{x/s}$) PARA UMA FERMENTAÇÃO BATELADA, λ	70
FIGURA IV.11 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA/GLICOSE ($Y_{x/s}$) PARA UMA FERMENTAÇÃO BATELADA, λ	70
FIGURA IV.12 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA/ETANOL ($Y_{x/E}$) PARA UMA FERMENTAÇÃO BATELADA, λ	71
FIGURA IV.13 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA/ETANOL ($Y_{x/E}$) PARA UMA FERMENTAÇÃO BATELADA, λ	72
FIGURA IV.14 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA/ETANOL ($Y_{x/E}$) PARA UMA FERMENTAÇÃO BATELADA, λ	72
FIGURA IV.15 - EVOLUÇÃO DO RENDIMENTO CELULAR SOBRE GLICOSE, EM FERMENTAÇÕES EM BATELADA.....	73
FIGURA IV.16 - EVOLUÇÃO DO RENDIMENTO CELULAR SOBRE ETANOL, EM FERMENTAÇÕES EM BATELADA.....	73
FIGURA IV.17 - EVOLUÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE.....	74
FIGURA IV.18 - EVOLUÇÃO DO RENDIMENTO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DA GLICOSE.	75
FIGURA IV.19 - VARIAÇÃO DO VOLUME NO REATOR COM O TEMPO.....	78
FIGURA IV.20 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BATELADA ALIMENTADA -.....	78
FIGURA IV.21 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO.	79
FIGURA IV.22 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA / SUBSTRATO.	79

FIGURA IV.23 - VARIAÇÃO DO VOLUME DO REATOR COM O TEMPO.....	81
FIGURA IV.24 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BATELADA ALIMENTADA -	82
FIGURA IV.25 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO.	82
FIGURA IV.26 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA / SUBSTRATO.	83
FIGURA IV.27 - VARIAÇÃO DO VOLUME DO REATOR COM O TEMPO.....	84
FIGURA IV.28 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BATELADA ALIMENTADA.....	85
FIGURA IV.29 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO.....	85
FIGURA IV.30 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA / SUBSTRATO.	86
FIGURA IV.31 - VARIAÇÃO DO VOLUME DO REATOR COM O TEMPO.....	87
FIGURA IV.32 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM BATELADA ALIMENTADA -	87
FIGURA IV.33 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO.	88
FIGURA IV.34 - DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO BIOMASSA / SUBSTRATO.	88

RESUMO

A proposta deste trabalho é a maximização da produção de *Saccharomyces cerevisiae*, em um processo fed-batch, usando o etanol como variável de controle. Os processos biotecnológicos que visam esta maximização têm se desenvolvido muito rapidamente nos últimos anos, devido à implantação de técnicas de controle. Estas técnicas têm por objetivo o aumento da rentabilidade econômica do processo, que depende da concentração celular obtida no final da fermentação. No entanto, esta concentração pode ser limitada pelo efeito inibidor de metabólitos secundários produzidos durante o crescimento de microrganismos. Para evitar a formação destes metabólitos ou minimizar seus efeitos, a maioria dos processos recorrem à técnica da fermentação em batelada alimentada ou contínuo. Independente do uso da técnica em batelada alimentada ("fed-batch"), a otimização de um processo fermentativo requer informações em linha sobre o processo. Para a realização deste trabalho foi utilizado um sensor à membrana hidrofóbica, colocado no meio de fermentação. Este sensor capta as moléculas voláteis presentes no meio, no caso, o etanol e as encaminha a um detector. Isto é feito por meio de um gás de arraste (N_2) que percorre a membrana e assegura que estes compostos cheguem a um cromatógrafo que, ligado a um micro computador, quantifica "on line" o etanol produzido durante a fermentação. Desta forma, pode-se manter a concentração de etanol a um valor crítico, abaixo do qual começa a haver inibição. A partir deste dado, emprega-se uma estratégia de controle da alimentação do principal substrato carbonado, a glicose, ao meio de fermentação, usando o etanol dosado em linha, como variável de observação. Os resultados obtidos revelam um aumento considerável da produção de *Saccharomyces cerevisiae*, com um rendimento final de 0,5 g de leveduras / g de glicose consumida.

SUMMARY

In this work we propose a methodology for maximizing the production of *Saccharomyces cerevisiae* in a fed-batch process using ethanol as the control variable. Lately, these biotechnology process have been subject to a fast growth due to the implementation of control strategies. The main goal of these techniques is to increase the process yield that depends on the cellular concentration at the end of the fermentation. However, this concentration can be limited by the inhibitory effect of the secondary metabolites produced during the growth of the microorganisms. In order to avoid these undesirable effects the majority of the biotechnology process uses of the fed-batch or continuous strategies. Furthermore, the optimization of the process needs on-line information. We have used a hydrophobic membrane sensor submerged in the fermentation media. The volatile molecules (ethanol), produced during the fermentation, are carried through the sensor to the chromatography by using a vector gas (nitrogen). The chromatography is on-line with the experimental equipment and the microcomputer, being able to quantify the ethanol produced in the fermentation process. Therefore, it is possible to maintain the ethanol concentration below a critical value above which the inhibition takes place. Using this critical value, we have employed a control strategy to the feed of the main substrate, glucose. Our results show a great enhancement in the *Saccharomyces cerevisiae* production with a final yield of 0,5g yeast / g glucose consumed and a final concentration of biomass of approximately 50 g/l.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

O aumento da conscientização ecológica e, conseqüentemente, o surgimento de um controle mais sério por parte dos órgãos de fiscalização ambiental tem trazido problemas a certos setores agroindustriais com respeito ao destino a ser dado a seus efluentes.

Em Santa Catarina, a Fundação de Amparo à Tecnologia e Meio Ambiente - FATMA - vem atuando com rigor no setor de indústrias transformadoras de mandioca. O problema ambiental deste setor é devido ao fato de que a água usada na fabricação de farinha de amido, um efluente de elevado teor orgânico, é devolvida aos mananciais hídricos sem nenhum tratamento.

No caso de pequenos produtores, muitas empresas têm sido fechadas, pois os custos e as áreas necessárias para o tratamento destes efluentes muitas vezes impossibilitam a produção.

Uma maneira que pode resolver, mesmo que em parte o problema do destino a ser dado a estes efluentes, é a transformação destes, via fermentativa, em proteínas de organismos unicelulares. Estas últimas, depois de um tratamento de inativação e desidratação poderão ser incorporadas a rações animais ou mesmo humanas. Desta forma, além de se diminuir os custos do tratamento, criaria-se uma atividade produtiva complementar, aumentando a produtividade do setor.

Neste sentido, nos últimos anos, a produção de biomassa proteica, via processos biotecnológicos, tem despertado grande interesse por parte das indústrias alimentícias devido à possibilidade do aproveitamento dos resíduos como o substrato para a produção de biomassa.

No entanto, quando esta produção é realizada em batelada, o rendimento é limitado, devido à influência de metabólitos secundários produzidos durante o processo, que agem como inibidores do crescimento celular.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é a maximização da produção de leveduras, utilizando para tal a técnica de cultivo em batelada alimentada. Esta técnica consiste na alimentação contínua de um certo substrato ao meio de fermentação, mantendo sua concentração no reator em valores ótimos. Desta forma, o efeito da inibição é minimizado pois a manipulação da vazão de alimentação permite que o substrato seja utilizado somente para a reprodução celular.

De acordo com o que foi descrito anteriormente, foi montado um sistema que possibilitou a realização de fermentações em batelada alimentada, determinando a influência de parâmetros importantes do processo, tais como a velocidade específica de crescimento e o rendimento biomassa/substrato, visando aumentar o rendimento deste, quando comparado à técnica em batelada. Os experimentos foram realizados em um fermentador, no qual estava imerso um sensor de compostos voláteis, que captava "on line" o etanol do meio de fermentação e os enviava a um cromatógrafo, que fazia a análise da amostra. Este sensor foi de grande importância para o controle do processo pois a produção de etanol está diretamente relacionada com a concentração residual de substrato dentro do reator.

Portanto, em uma primeira etapa deste trabalho foram realizadas fermentações em batelada, fazendo-se variar a concentração inicial de substrato e verificando-se a influência deste parâmetro na cinética do microrganismo. Isto nos possibilitou a comparação dos resultados obtidos com os apresentados na literatura. Outro fator que determinou a realização desta etapa foi a necessidade de

se conhecer estes parâmetros para a escolha de uma estratégia que possibilitasse a determinação da vazão de alimentação para o processo em batelada alimentada.

Após concluída esta etapa, foram realizadas as fermentações em batelada alimentada. O objetivo desta foi a maximização da produção de leveduras, utilizando o etanol, metabólito secundário deste tipo de fermentação, como variável de observação, através do uso do sensor de compostos voláteis em linha com o processo.

No Capítulo 2 deste trabalho foi realizada a revisão bibliográfica envolvendo o comportamento cinético da levedura utilizada (*Saccharomyces cerevisiae*) em processos batelada e batelada alimentada, bem como as principais vias metabólicas utilizadas por este microrganismo. A seguir, foram descritas as principais características e vantagens do uso de sensores em linha para processos fermentativos, bem como os problemas ligados a este dispositivo. São citadas, também, as técnicas de controle de uma fermentação em batelada alimentada e as principais variáveis de controle e manipuladas neste tipo de processo.

No Capítulo 3 foram descritos o equipamento montado para a realização dos experimentos, bem como o microrganismo utilizado nas fermentações e os meios de cultura necessários para o crescimento destes. São relatados, também, os métodos analíticos usados na determinação da concentração de glicose, biomassa e etanol. Para finalizar o capítulo, as condições de operação utilizadas durante as fermentações e o controle das fermentações batelada e batelada alimentada são expostas.

O Capítulo 4 apresentou os resultados obtidos para o processo em batelada e batelada alimentada, discutindo os pontos mais interessantes, fazendo, sempre, um paralelo com os resultados obtidos na literatura.

O Capítulo 5 apresentou as conclusões finais do trabalho e as sugestões para futuros trabalhos no Laboratório de Engenharia Bioquímica.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 - BREVE HISTÓRICO

Os processos biotecnológicos que visam a maximização da produção de leveduras têm se desenvolvido muito rapidamente nos últimos anos, devido à implantação de técnicas de controle.

Estas técnicas visam aumentar a rentabilidade econômica do processo, que depende diretamente da concentração celular obtida no final da fermentação. Esta concentração pode ser limitada pelo efeito inibidor de metabólitos secundários produzidos durante o crescimento de microrganismos. Para evitar a formação destes metabólitos ou minimizar seus efeitos, a maioria dos processos recorre à técnica da fermentação em batelada alimentada ("fed-batch") ou contínuo, dependendo das dimensões das unidades de produção (Dantigny, 1989).

Independente do uso da técnica de cultivo "fed-batch", a otimização do processo enfrenta muitos obstáculos. Isto se deve, principalmente, à não existência de um estado estacionário de operação e ao comportamento não linear da cinética de crescimento de microrganismos, bem como à extrema sensibilidade dos microrganismos frente às mudanças em seu meio de crescimento. Daí a necessidade de se ter informações em linha sobre o processo. Aliado à falta dos sensores específicos que permitam avaliar o estado dos microrganismos em tempo real, há, ainda, a necessidade de se manter o processo em condições assépticas (Ninow, 1994).

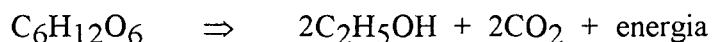
Com o sucesso da aplicação de técnicas de fermentação em batelada alimentada e com a maior disponibilidade de sistemas de aquisição de dados via computador, uma grande importância

tem sido dada a este tipo de controle de alimentação a partir de informações vindas de sensores especiais colocados no fermentador. Esta estratégia pode manter relativamente constante a concentração de nutriente, indiferente à taxa de crescimento.

II.2 - CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*

II.2.1 - Metabolismo da glicose:

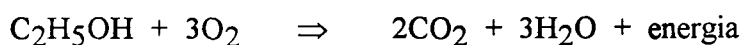
A fermentação da glicose se dá enquanto sua concentração é alta ou enquanto o oxigênio estiver ausente no meio. Este processo é relativamente ineficaz do ponto de vista energético: 2 moles de ATP (adenosina trifosfato) são produzidos por mol de glicose metabolizado.



A oxidação da glicose predomina enquanto a concentração de glicose for inferior à 50-100 mg/l em condições aeróbias (Woehrer et Roehr, 1981). O uso de um mol de glicose é muito mais eficaz e permite a formação de 16 à 28 moles de ATP (Rogers et Stewart, 1974).



A oxidação do etanol tem lugar quando os substratos fermentescíveis estão em quantidade limitada e é muito energética produzindo de 6 à 11 moles de ATP por mol de etanol oxidado (Lagunas, 1976).



II.2.2 - Características do crescimento aeróbio:

Crescimento em reator descontínuo:

Enquanto a concentração de glicose for elevada, *Saccharomyces cerevisiae* cresce rapidamente em uma primeira fase de crescimento exponencial sobre glicose. Nesta fase, a velocidade específica de crescimento varia entre 0,40 e 0,45 h⁻¹. A alta produção de etanol, o baixo rendimento em biomassa (0,15 g de biomassa / g de glicose consumida) e o quociente respiratório (QR) elevados indicam um metabolismo essencialmente fermentativo. Observa-se uma fase de latência, correspondente à adaptação da levedura a um meio sem glicose, mas rico em etanol. Uma segunda fase de crescimento exponencial pode ser verificada, com uma taxa específica de 0,14 - 0,20 h⁻¹. Um alto rendimento (0,4 à 0,7 g de biomassa / g de etanol consumido) e um QR compreendido entre 0,4 e 0,7 são característicos do metabolismo oxidativo do etanol (Dantigny, 1989).

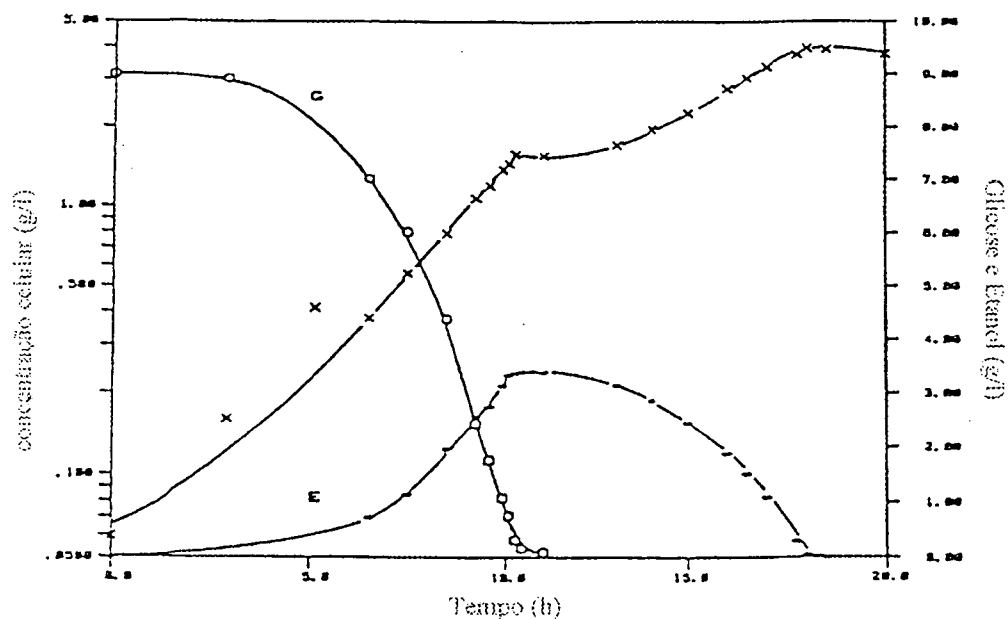


FIGURA II.1 - Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em reator batelada (Lievens e Lim, 1982).

Crescimento em reator contínuo:

Os resultados obtidos para uma cultura contínua de *Saccharomyces cerevisiae* usando glicose como fonte de carbono mostram que o metabolismo oxidativo da glicose predomina até uma concentração crítica da taxa de diluição ($0,20$ à $0,32 \text{ h}^{-1}$). Enquanto o valor da taxa de diluição estiver em torno do valor crítico, a concentração residual de glicose é inferior à 50 mg/l , o rendimento é de $0,5 \text{ g/g}$ e o valor do quociente respiratório (QR) próximo de 1, até que traços de etanol sejam detectados. Quando a taxa de diluição excede o valor crítico, o rendimento em biomassa decresce ($0,15 \text{ g/g}$) e o QR aumenta rapidamente. Estas observações indicam a passagem de um metabolismo oxidativo a fermentativo.

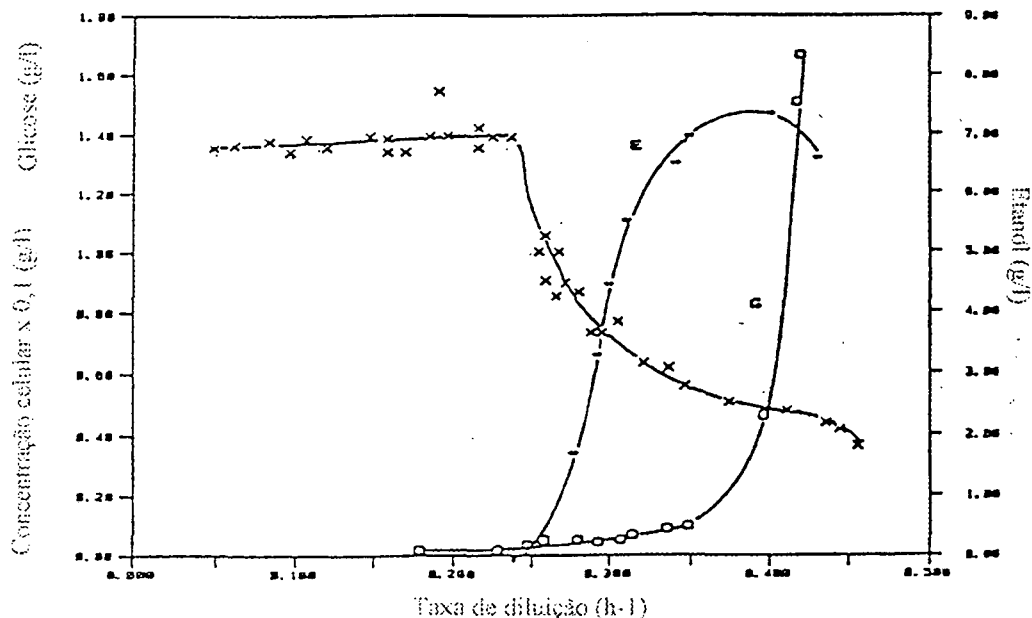


FIGURA II.2 - Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em reator contínuo (Lievense e Lim, 1982).

Crescimento em reator batelada alimentada:

Em um processo "batch" (batelada), todos os nutrientes necessários durante o cultivo, exceto o oxigênio molecular em processos aeróbicos e a amônia ou outros "químicos" para ajuste do pH, são adicionados ao meio antes do cultivo ter começado, e sô ao final do processo o produto é removido.

Em um processo contínuo, todos os nutrientes são continuamente adicionados e frações do meio são removidas com a mesma vazão do alimentado, para manter o volume da cultura constante.

Yoshida (1973) introduziu o termo "fed-batch" para descrever as culturas em batelada que são alimentadas continuamente ou sequencialmente com meio, sem a remoção do caldo. Neste caso, o volume da cultura aumenta com o tempo. A descrição da cinética da cultura "fed batch" é baseada na discussão de Pirt (1975).

Considerando uma cultura batelada na qual o crescimento é limitado pela concentração de um substrato, a biomassa em um ponto será descrito pela equação:

$$X_t = X_0 + Y_{x/s} (S_f - s) \quad (\text{II.1})$$

onde: X_t é a concentração de biomassa (g/l) após o tempo t (h) e

X_0 é a concentração do inóculo (g/l).

A concentração de biomassa produzida quando $s = 0$ pode ser descrita como $X_{\text{máx}}$ e, portanto, X_0 é desprezível quando comparado com $X_{\text{máx}}$:

$$X_{\text{máx}} = Y_{x/s} \cdot S_R \quad (\text{II.2})$$

Se, no tempo em que $X = X_{\text{máx}}$, a alimentação é iniciada, tal que a taxa de diluição é menor que $\mu_{\text{máx}}$, todo o substrato será consumido tão logo entre na cultura, então:

$$F_{in} S_R = \frac{\mu X}{V} \quad (\text{II.3})$$

onde: F_{in} é a vazão de alimentação (l / h) e,

X é a biomassa total da cultura, descrita por $X = x.V$, onde V é o volume de meio no fermentador no tempo t .

A equação anterior representa que a entrada de substrato é igualada pelo consumo de substrato pelas células. Portanto, $(dS/dt = 0)$. Embora a biomassa total na cultura (X) aumente com o tempo, a concentração celular (x) permanece constante ($dX/dt = 0$) e, então, $\mu = D$. Esta situação é conhecida como estado quase-estacionário. Com o passar do tempo, a taxa de diluição diminuirá, o volume aumentará e D será dado pela expressão:

$$D = \frac{F}{V_0 + Ft} \quad (\text{II.4})$$

onde V_0 é o volume inicial.

Quando o objetivo da fermentação é a produção de leveduras, o processo em descontínuo leva à grandes perdas no rendimento e na produtividade, pois o microrganismo utiliza a glicose tanto por via fermentativa (com produção de etanol) quanto por via respiratória (produção de células). Após a exaustão do principal substrato carbonado, a glicose, as leveduras irão utilizar o etanol e continuar a crescer. No entanto, a produção e depois o consumo do etanol leva à perdas energéticas enormes, que seriam evitadas se o metabolismo fosse dirigido unicamente para a reprodução celular (Ninow, 1994).

O objetivo da fermentação "fed-batch" é a otimização da produção da biomassa pela minimização da repressão catabólica que induz a produção de etanol. Para atingir este objetivo não se pode ultrapassar um valor crítico na concentração de açúcares (aproximadamente 0,1 g/l), de forma a evitar um acúmulo de etanol, favorecendo assim o metabolismo respiratório das leveduras (Ninow, 1994).

As principais vantagens do processo "fed-batch" em relação ao descontínuo simples são:

- possibilidade de controle da oferta de substrato às células, através do uso de uma determinada vazão de alimentação e de uma determinada concentração de substrato nesta alimentação,
- possibilidade de obtenção de elevadas concentrações celulares e,
- possibilidade de reposição da água perdida por evaporação durante o processo.

As limitações deste processo residem na:

- dificuldade de manutenção da condição de assepsia por períodos muito longos,
- possibilidade de ocorrência de mutação, no caso de períodos prolongados de fermentação e,
- dificuldade de manutenção de homogeneidade no reator, principalmente quando o microrganismo muda as características reológicas do meio.

Em cultura "fed-batch", deve-se aumentar a alimentação de substrato quando há uma alta concentração de biomassa. Existem algumas estratégias para se implementar este tipo de controle. As técnicas em malha aberta implementam um aumento da alimentação de substrato através de uma função contínua no tempo, ou em alguns casos, funções contínuas por partes, ou seja, dentro do intervalo de amostragem. A implementação do controle em malha fechada requer a ação de um controlador "feed-back".

Wu et al (1985) mostraram que o teor de etanol pode ser mantido constante enquanto a velocidade específica de crescimento sobre glicose for igual à $0,21\text{h}^{-1}$. Em contrapartida, o etanol tende a se acumular no meio à velocidades específicas de crescimento iguais ou superiores à $0,22\text{h}^{-1}$. Enquanto a velocidade específica de crescimento for igual ou inferior à $0,21\text{h}^{-1}$, o metabolismo da glicose é todo oxidativo.

A concentração crítica de glicose residual à partir da qual o etanol é formado varia conforme os autores de 130 mg/l (Namba et al, 1981) à 150 mg/l (Cooney et al, 1981). Namba et al mostraram através de experiências utilizando alimentações mistas de glicose e etanol, que este último pode ser oxidado ao mesmo tempo que a glicose, enquanto a concentração residual desta for inferior à 100 mg/l.

Quando a glicose é oxidada em fermentações batelada alimentada, o quociente respiratório está próximo de 1 e o rendimento em biomassa é da ordem de 0,5 g de biomassa por g de glicose consumida.

A Tabela II.1 mostra que o rendimento biomassa / substrato pode variar em função do tipo de substrato. A tabela mostra que o valor da velocidade específica de crescimento é variável em função do tipo de substrato e da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada.

TABELA II.1 - Valores da velocidade específica de crescimento máxima, $\mu_{\text{máx}}$ e do rendimento biomassa/substrato, $Y_{x/s}$ para diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em fermentações batelada alimentada.

SUBSTRATO	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	RENDIMENTO (g/g)	REFERÊNCIA
Melaço	0,25	0,62	Aiba, 1979
Glicose	0,23	0,50	Dairaku et al, 1981
Melaço	0,20	0,25 - 0,30	Axelsson et al, 1988
Melaço	0,18	0,70	Miskiewicz et Mischczak, 1985
Glicose	0,21		Wu et al, 1985
Glicose	0,15 - 0,19	0,33 - 0,48	Williams et al, 1986
Glicose	0,20 - 0,24	0,48 - 0,55	Aiba et al, 1976
Melaço	0,20 - 0,22	0,48 - 0,52	Aiba et al, 1976
Glicose	0,20	0,50	Wang et al, 1979
Glicose	0,17	0,50	Namba et al, 1981
Melaço	0,22		Ramirez et al, 1981

II.2.3 - Principais vias metabólicas:

Metabolismo Oxidativo da Glicose:

As vias metabólicas utilizadas na oxidação da glicose são representadas na Figura II.3. Estas vias são utilizadas enquanto a concentração de glicose é baixa e é caracterizada por uma intensa atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) e da cadeia respiratória.

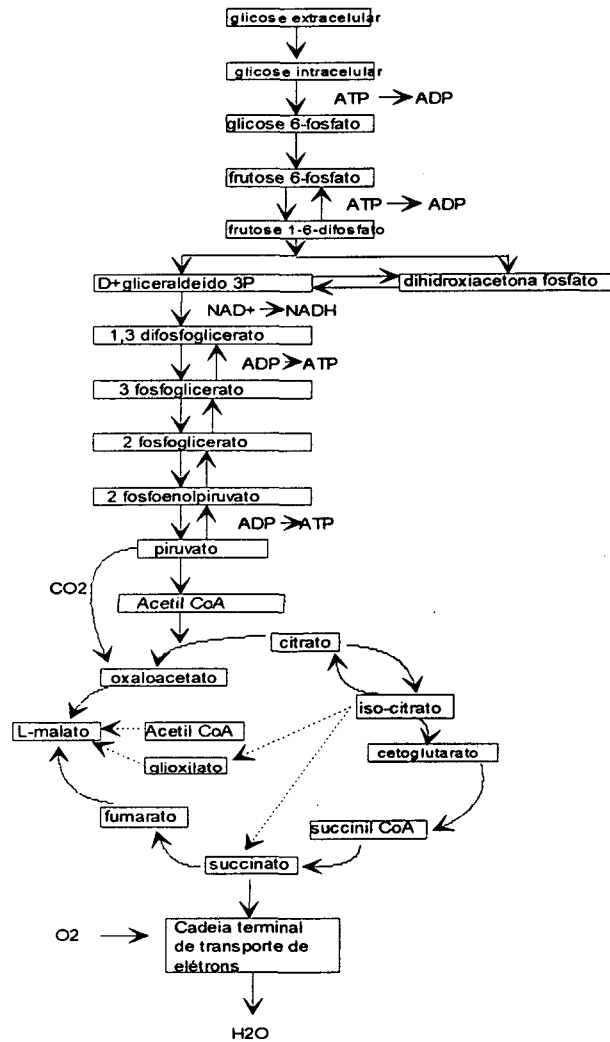


FIGURA II.3 - Metabolismo oxidativo da glicose.

Metabolismo Oxidativo do Etanol:

A oxidação do etanol, que é reprimida na presença de uma baixa concentração de glicose, mostra da mesma maneira uma forte atividade do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória que procura as células da energia e os intermediários para a biossíntese. Contudo, o crescimento sobre etanol difere daquele sobre glicose pela presença de enzimas específicas ao nível do ciclo de Krebs. A Figura II.4 mostra que a síntese de polissacarídeos de estrutura e de reserva se acompanha em particular do shunt glioxílico.

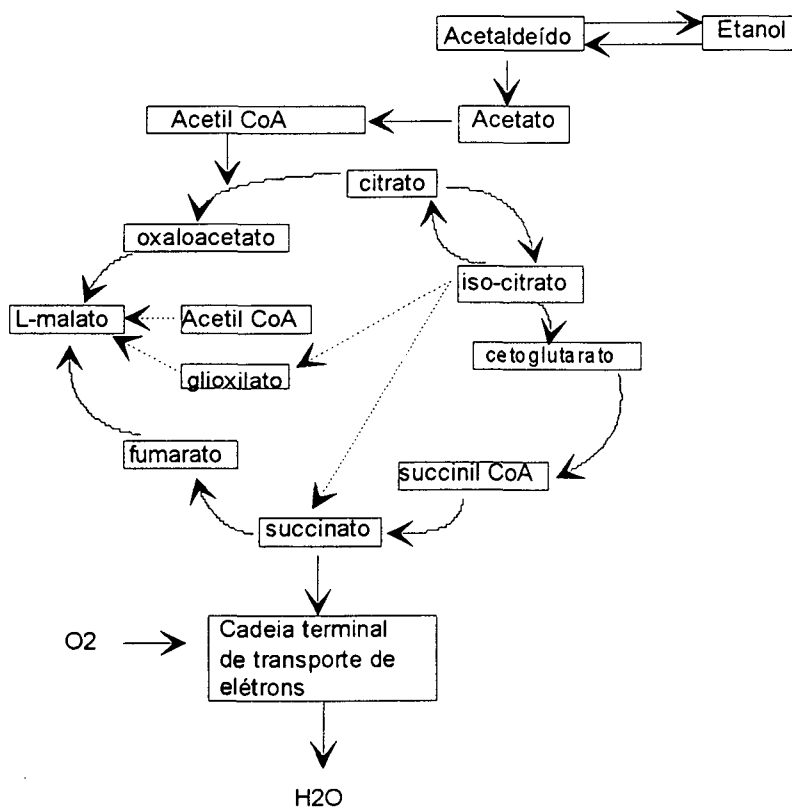


FIGURA II.4 - Metabolismo oxidativo do etanol.

Metabolismo Fermentativo da Glicose:

A fermentação da glicose é induzida na presença de fortes concentrações de glicose. A Figura II.5 mostra que a redução do piruvato em etanol permite a regeneração das moléculas de NAD^+ , co-fatores indispensáveis da glicólise. Durante a fermentação da glicose a atividade do ciclo de Krebs é reduzida, e também serve de fonte de intermediários para a biossíntese.

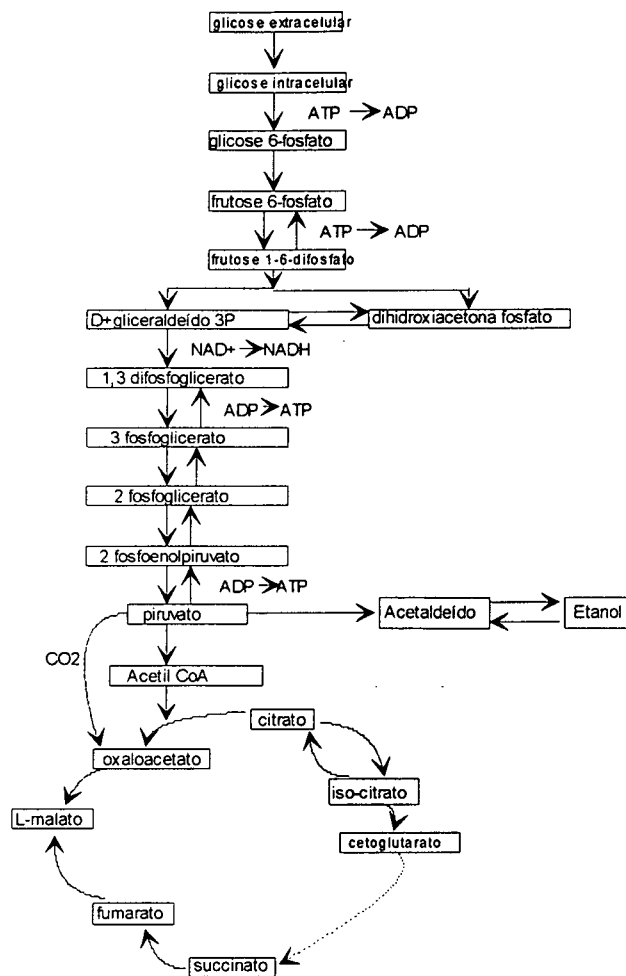


FIGURA II.5 - Metabolismo fermentativo da glicose.

Efeito Crabtree:

Este efeito surge durante as fermentações descontínuas à fortes concentrações de glicose e durante as fermentações contínuas à altas taxas de diluição. Pode-se considerar que este efeito é devido à repressão catabólica da síntese das enzimas responsáveis ao metabolismo oxidativo da glicose ou dos catabólitos derivados da glicose (Beck e Von Meyenburg, 1969).

O efeito Crabtree se traduz por uma utilização da glicose por via fermentativa em cultura aeróbia enquanto a concentração de glicose no meio for superior a um certo valor crítico estimado entre 0,2 e 0,6 g/l. Este desvio do comportamento metabólico na presença de glicose à altas concentrações é motivo de vários estudos.

Trabalhos de Hall et al (1980) mostraram que o efeito Crabtree é uma fase transitória e pode ser levado à uma adaptação da célula às condições de crescimento. Os resultados dos estudos mostram que as unidades industriais de fermentação de leveduras dependem essencialmente da importância do efeito Crabtree e das técnicas desenvolvidas para contorná-lo (Ghoul, 1983).

Efeito do etanol:

A repressão catabólica e a baixa taxa de oxigênio dissolvido no meio favorecem à formação de etanol. O etanol formado, além de constituir um desperdício de energia aos processos de produção de biomassa, intervém por seus efeitos inibidores resultantes de seu acúmulo ou de sua reassimilação pelos microrganismos (Ghoul, 1983).

Pode-se, desta forma, concluir que a otimização da produção de biomassa necessita de um conhecimento detalhado, de uma parte da influência da variação dos parâmetros de estado e de controle (pH, temperatura, concentração de glicose e oxigênio dissolvido) e, de outra parte, do comportamento metabólico da levedura utilizada com relação ao etanol produzido.

II.3 - OS SENSORES EM LINHA

Embora tenha se verificado nos últimos anos enorme progresso no desenvolvimento e aperfeiçoamento de bioreatores, principalmente em processos batelada alimentada, o estudo do controle de processos biotecnológicos deve ainda avançar, devido :

- à forte não linearidade das cinéticas de crescimento,
- ao desenvolvimento e disponibilidade de sensores em linha.

Para um bom desenvolvimento de estratégias de controle de processos fermentativos há a necessidade de sensores que possuam tempo de resposta compatíveis com a constante de tempo do sistema e, ainda, permitam manter as exigências básicas como um rápido tempo de resposta, bem como às exigências do meio de fermentação, como a esterilidade (Ninow, 1994).

Embora existam um bom número de sensores comerciais em linha que satisfaçam estes requisitos, poucos são utilizados no controle de processos fermentativos, pois não fornecem informações precisas sobre o comportamento da fermentação. Por este motivo, ainda hoje, a aquisição de dados é realizada por análises de amostras retiradas manualmente dos meios de

fermentação (Figura II.6). Sensores automáticos que funcionam sem a intervenção humana são objeto de pesquisa e desenvolvimento. Trata-se da análise em linha.

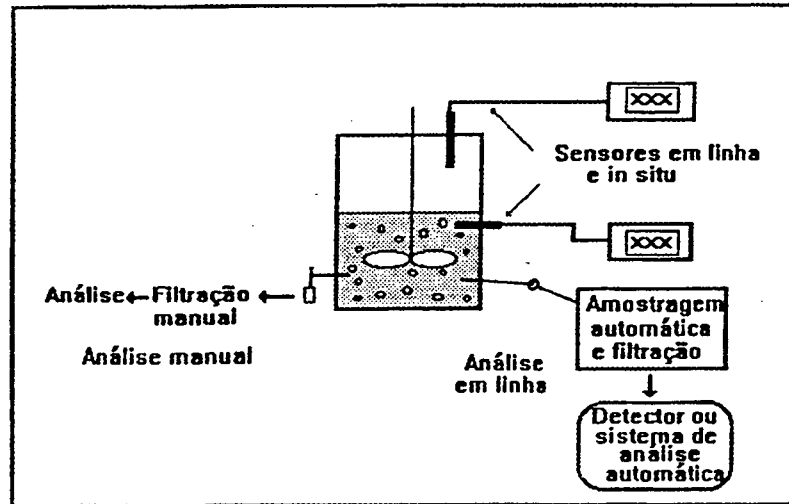


FIGURA II.6 - Tipos de dosagens efetuadas em um fermentador.

Tradicionalmente, o controle das fermentações depende das medidas em linha da temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Estas medidas são fundamentais pois o metabolismo dos microrganismos é dependente destes fatores. Os sensores utilizados para realizar estas análises permitem medidas diretas. Uma alternativa bastante utilizada devido à sua simplicidade é a análise da composição dos gases de saída do fermentador, que permite uma estimativa indireta da atividade celular (Dantigny, 1989).

II.3.1 - Sensores para substâncias voláteis ou gasosas:

Em relação a estes tipos de moléculas, diferentes trabalhos e abordagens são encontrados na literatura.

Com relação aos gases, podemos distinguir dois casos: a medida da concentração dos mesmos na corrente de saída do fermentador e as concentrações de gases dissolvidos no meio líquido (Ninow, 1994).

A primeira alternativa, utilizada há bastante tempo, permite observar o consumo e/ou a produção dos gases, bastando para isso, o uso de um detector adequado na saída da corrente do fermentador. A segunda alternativa trata da dosagem dos gases dissolvidos no caldo de cultura. A concentração do gás dissolvido é aquela que está efetivamente em contato com as células. Esta análise é assegurada por meio de sondas imersas no meio de fermentação.

As substâncias voláteis são produzidas ou consumidas em numerosos processos fermentativos (Tabela II.2). Na presença de um substrato complexo, as leveduras sintetizam diversos compostos, por exemplo, os álcoois superiores. O monitoramento destas substâncias é extremamente importante para a compreensão e regulação da fermentação.

TABELA II.2 - Exemplos de fermentações onde entram em jogo compostos voláteis.

Tipo do composto volátil em relação à fermentação	Natureza do composto	Fermentação
Substrato	Metanol	<i>Hansimula polymorpha</i>
	Etanol	<i>Candida utilis</i>
Metabólito principal	Etanol	Produção de bebidas alcoólicas
	Etanol	<i>S.cerevisiae</i>
Metabólito secundário	Acetaldeído	<i>C.utilis</i>
	Acetato de etila	<i>C.utilis</i>

II.3.2 - A importância de um sensor de substâncias voláteis ou gasosas:

Além de aparecer em concentrações elevadas em vários tipos de fermentação, os compostos voláteis podem estar presentes em numerosos processos como metabólitos secundários, presentes em concentrações reduzidas, como é o caso do acetaldeído no processo de produção de leveduras de panificação (Dantigny et al, 1989).

Os gases representam elementos importantes em uma fermentação e o conhecimento de suas concentrações na forma dissolvida no meio líquido pode também representar uma informação importante. Os gases mais comumente encontrados são o oxigênio e o gás carbônico, mas em alguns processos podem aparecer também o metano e o amoníaco (Ninow, 1994).

A análise em linha das moléculas voláteis ou gasosas pode ser efetuada de duas formas:

- a partir de amostras da fase gasosa (método headspace) ou,
- a partir de amostras da fase líquida, usando para tal uma sonda munida de uma membrana seletiva, que só permite a passagem de substâncias voláteis ou gasosas, que a seguir são encaminhadas para um detector adequado (Ninow, 1989). Em razão de problemas de equilíbrio entre a fase líquida e a gasosa, encontrados em alguns reatores industriais (Marc, 1982), os sensores à membrana têm apresentado maior interesse. Philips e Johnson (1961), Dairaku et al (1979), Yamane (1981), Lee (1981), Mandenius (1987), Pons (1985), Ninow (1989), Groboillot (1989), entre outros, utilizaram um sistema de dosagem automática de moléculas voláteis ou gasosas dissolvidas. Este sistema é formado por duas partes, uma sonda e um detector. O princípio desta técnica é baseado nas propriedades difusionais da membrana que compõe a sonda.

Estas membranas são constituídas por um polímero hidrofóbico de características homogêneas (silicone) ou microporosas (teflon) (Ninow, 1994).

No caso do sistema à membrana, o sensor está mergulhado no meio de fermentação e uma de suas faces está em contato com a fase líquida enquanto que a outra é varrida por um gás de arraste. As moléculas na forma gasosa provenientes da fase líquida, atravessam a membrana em razão do gradiente de concentração criado pela circulação de gás no interior da sonda. Estas moléculas são, então, carregadas pelo gás de arraste até um detector que realiza a medida (Figura II.7).

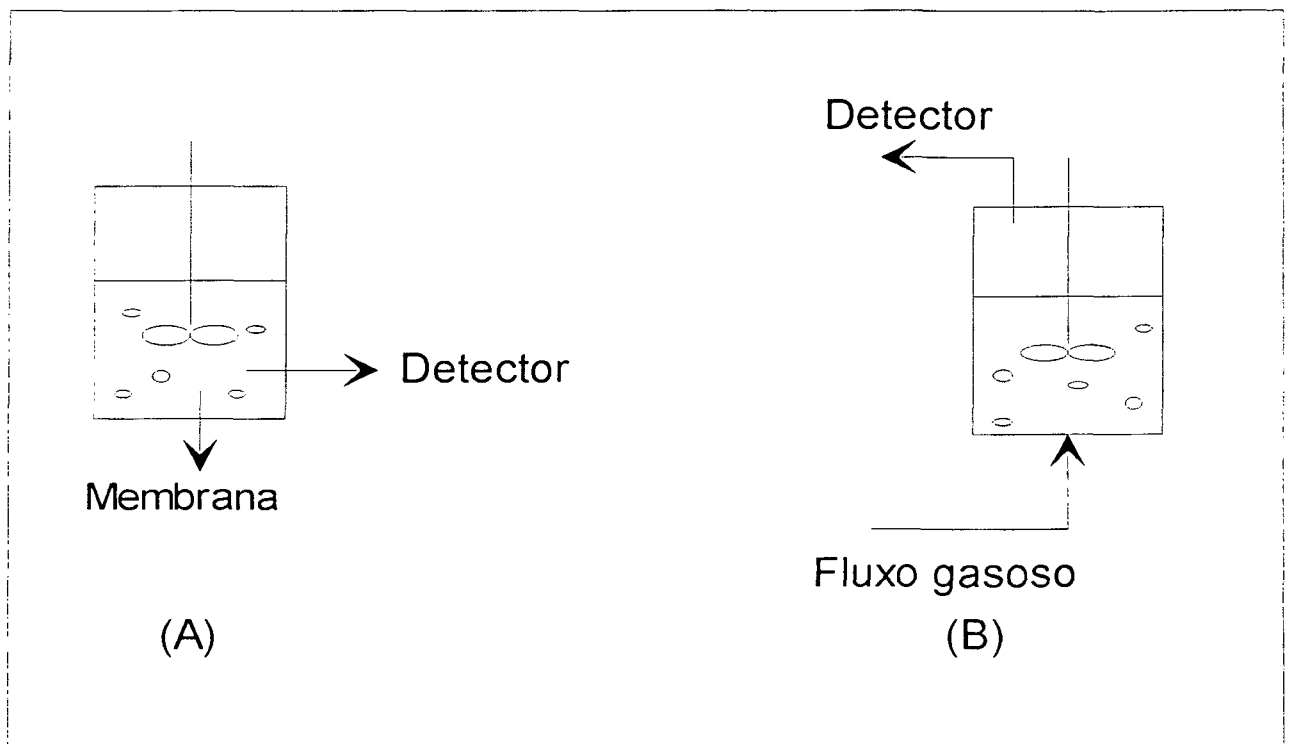


FIGURA II.7 - Métodos de amostragem - (a) membrana, (b) "headspace".

II.3.3 - As sondas à membrana:

Os sistemas baseados nas propriedades difusionais de membranas hidrofóbicas foram desenvolvidos em razão das dificuldades na dosagem de substâncias voláteis apresentadas pelo método "headspace" (Ninow, 1994). O princípio destes sensores está baseado na hidrofobicidade das membranas. Estas permitem a obtenção contínua de uma amostra gasosa à partir da fase líquida.

No caso das sondas, o objetivo é obter uma amostra gasosa representativa da fase líquida e encaminhá-la ao detector. É importante que se obtenha quantidades de amostra relativamente pequenas, a fim de evitar uma eventual saturação do detector. Para tanto utiliza-se superfícies de membrana bem reduzidas.

O uso de membranas evita os problemas ligados aos aerossóis, à presença de espumas, ou ainda aqueles devido à obstrução dos condutos e válvulas no circuito entre o fermentador e o detector. Com a sonda à membrana, as medidas não são dependentes do equilíbrio entre a fase líquida e a gasosa. Só a transferência dos compostos através da membrana influi sobre a resposta (Ninow, 1994).

II.3.4. - Influência de diferentes parâmetros sobre o comportamento do sensor:

Numerosos parâmetros podem influenciar a resposta do sensor. Pode-se distinguir os parâmetros intrínsecos do mesmo, como a vazão e a natureza do gás de arraste, a natureza e a

superfície da membrana, assim como os parâmetros ligados ao processo, que são externos ao sistema de medida.

Além do tipo de polímero usado, da sua superfície em contato com o meio, da natureza e da vazão do gás de arraste, outros fatores podem perturbar a detecção. Um destes fatores é a condensação de moléculas no interior da tubulação que liga a sonda ao sistema de detecção. Para evitar este problema deve-se ter a precaução de aquecer esta tubulação a uma temperatura superior a do meio líquido.

No que se refere à geometria da membrana, as tubulares apresentam respostas mais significativas que as planas, devido a sua maior superfície útil. Quanto à área da membrana, pode-se verificar que uma maior área representa um resultado mais importante, isto até um valor limite de resposta correspondente à concentração de equilíbrio (Ninow, 1989).

No que diz respeito à natureza da membrana, as microporosas possuem menor resistência à transferência de massa que as homogêneas (Pons et al, 1986), ressaltando a resposta do sensor.

O gás de arraste deve ser inerte em relação ao processo no qual o sistema de detecção será aplicado. Ar ou nitrogênio são utilizados em fermentações aeradas. Lancelot (1985) verificou que os coeficientes globais de transferência são afetados pela natureza do gás (N_2 ou CO_2) no caso dos álcoois. Isto se explica pelo fato de que estes solutos têm diferentes difusividades nos dois gases.

Quanto à vazão do gás de arraste, as respostas são inversamente proporcionais à mesma, isto porque quanto maior a vazão, mais diluído o soluto no gás (Ninow, 1989).

Alguns parâmetros ligados às condições de operação são importantes.

A agitação: Dependendo do tipo de molécula sob estudo, a agitação pode ou não afetar a resposta. Yamane et al (1981) mostraram experimentalmente que, no caso do etanol detectado com uma sonda tubular PTFE acoplada a um detector de ionização de chama, a agitação não exercia nenhuma influência sobre a resposta.

A temperatura: Quaisquer que sejam o soluto e o tipo de membrana utilizados, uma mudança de temperatura no meio de fermentação é acompanhada de uma forte variação no sinal de detecção (Ninow, 1994), isto porque a volatilidade do soluto aumenta com a temperatura.

A pressão: Nos limites de pressão entre 0 e 2 bars (característicos dos processos fermentativos) no interior do reator, nenhuma influência sobre a resposta foi notada para os compostos voláteis testados (Ninow, 1989).

O pH: O pH não exerce influência alguma sobre a volatilidade de álcoois ou outros compostos voláteis.

Os componentes do meio de fermentação: Numerosos compostos utilizados em meios de fermentação podem agir sobre o coeficiente de atividade, logo sobre a volatilidade dos compostos. Com relação aos açúcares, Mandenius (1987) observou que a partir de 10 g/l aparece um efeito positivo sobre a detecção do etanol. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Sorrentino (1986) que mostraram um aumento do coeficiente de atividade na presença destes substratos carbonados. Quanto aos sais minerais presentes no meio de fermentação, Punhar et al

(1980), usando uma sonda de silicone e gás de arraste não observaram qualquer efeito sobre a resposta do etanol com concentrações totais de sais até 50 g/l.

II.4 - MONITORAMENTO E CONTROLE DA FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS

Pode-se distinguir três modos principais de monitoramento e controle de fermentação em batelada alimentada:

- controle baseado na pré-programação da vazão do substrato,
- controle baseado na vazão de substrato e,
- controle baseado na estimativa em linha da vazão de substrato.

II.4.1 - Controle baseado na pré-programação da vazão de substrato:

Este tipo de controle é muito difundido no processo de produção de leveduras de panificação, devido ao fato de permitir manter as concentrações de açúcar em níveis baixos evitando, assim, o efeito inibidor por excesso de glicose.

O inconveniente deste método é a necessidade de se impor uma velocidade específica de crescimento para ajustar a glicose de acordo com funções pré-estabelecidas (em geral de perfil exponencial). Em geral, esta velocidade é baixa, o que afeta a produtividade do fermentador. O diagrama clássico de uma instalação de produção de leveduras é mostrado na Figura II.8.

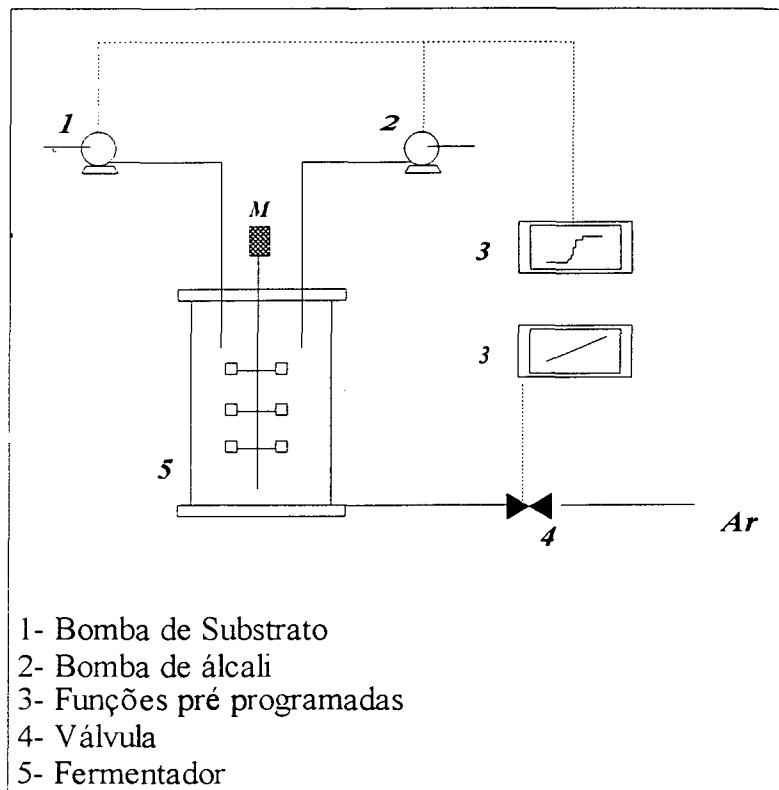


FIGURA II.8 - Diagrama clássico de uma instalação de produção de leveduras: controle pré-programado.

II.4.2 - Controle baseado na manipulação da vazão de substrato:

Para amenizar as falhas de técnicas precedentes, novas abordagens têm sido experimentadas atualmente. Estas incluem o controle baseado no cálculo do quociente respiratório, da dosagem de etanol e de glicose residual dentro do fermentador.

Controle baseado no cálculo do QR:

O quociente respiratório (QR) é definido como a razão molar entre o CO₂ produzido e o oxigênio consumido. A análise do gás na entrada e na saída do fermentador permite conhecer a cada instante o valor do QR. De trabalhos anteriores pode-se concluir que é possível utilizar o QR como um indicador do comportamento metabólico de leveduras e, conseqüentemente, como uma variável de controle da fermentação.

Os trabalhos de Aiba et al (1973) e de Cooney et al (1981), apesar de apresentarem conclusões ligeiramente diferentes obtiveram informações preciosas sobre a validade e os limites deste parâmetro no controle de processos de produção de leveduras. Cooney et al (1977) mostraram os limites de utilização deste parâmetro:

- Sensibilidade dos analisadores, pois erros nas medidas de CO₂ e O₂ podem acarretar variações consideráveis no QR,
- O estado fisiológico dos microrganismos: a evolução da composição celular ao longo da fermentação se traduz obrigatoriamente pela evolução do valor do QR. A evolução do estado fisiológico é acentuado à fortes concentrações celulares. À partir de 40-50 g/l, ocorrem baixas consideráveis na velocidade específica de crescimento e do rendimento celular. Estas baixas são acompanhadas por uma produção de etanol. A este limite de concentração o QR mantido em 1 não permite uma operação ótima.

Desta forma, o QR é uma boa variável de controle para a fermentação de leveduras, desde que a concentração de biomassa seja inferior à 50 g/l.

Controle baseado na medida em linha do etanol:

O etanol é o metabólito secundário mais importante na fermentação de leveduras. Sua produção é devido ou ao acúmulo de glicose residual no fermentador ou à aeração insuficiente. Para maximizar a produção de biomassa e assegurar um controle automático da fermentação de leveduras, novos sensores têm sido desenvolvidos. Yamane et al (1981), utilizando um sensor de compostos voláteis constituído de uma membrana tubular em PTFE mergulhada no meio líquido e um detector à ionização de chama, utilizou a medida de etanol para determinar a estratégia de controle para manipular a vazão de substrato que alimenta o fermentador e, com isso, manter a concentração de etanol no valor desejado.

Controle baseado na análise da glicose:

Devido à dificuldade de utilização dos sensores de glicose esterilizáveis, tem-se realizado, nos últimos anos, numerosas tentativas de medida para sistema de dosagem automática de glicose (Sevely et al, 1986). Estes sistemas asseguram a coleta e dosagem das amostras em condições assépticas. Os resultados da análise permitem ajustar o valor do substrato, mantendo a glicose em seu valor ótimo.

II.4.3. - Controle baseado na estimativa em linha da vazão de alimentação em substrato:

Estimativa a partir de balanços elementares e análise de gás:

A estimativa em linha da vazão de alimentação em substrato tem como princípio o uso dos balanços elementares (C,H, O e N). Estes dados permitem estimar indiretamente e ao mesmo tempo, os parâmetros cinéticos do crescimento de leveduras (biomassa, rendimento, velocidade específica de crescimento). À partir destes parâmetros, a vazão de substrato é recalculada a cada instante. Os resultados obtidos por este método são bastante satisfatórios (Cooney et al, 1981).

Estimativa da vazão e ajuste de substrato:

Com a finalidade de levar em consideração a produção de etanol resultante dos mecanismos de inibição, Aiba et al (1973) e Cooney et al (1981) desenvolveram um método de controle mais elaborado. Os princípios deste método se baseiam:

- na estimativa da vazão de alimentação de substrato e,
- no ajuste da vazão de substrato ao longo do tempo.

A estimativa da vazão de alimentação do substrato carbonado se faz a partir de balanços elementares e da análise de gás, dando um valor máximo ao rendimento celular e fixando uma velocidade específica ótima de crescimento. A velocidade específica de crescimento é considerada

ótima se o crescimento não for acompanhado de uma produção de etanol e o rendimento celular sobre o substrato for igual a 0,5 g de biomassa / g de glicose (Ghoul, 1983).

As curvas que possibilitam o ajuste da vazão são de dois tipos:

- curvas formadas à partir do QR e da análise do etanol e,
- curvas formadas à partir da diferença entre o CO₂ e o O₂ no gás na saída do fermentador.

Com este último tipo de abordagem pode-se obter resultados mais satisfatórios (Cooney et al, 1981).

II.4.4 - Critérios de otimização do processo:

Em processos fermentativos, há a necessidade de se conhecer as relações representativas da cinética do microrganismo para que se possa determinar a vazão de substrato que maximize o rendimento, pois a taxa de crescimento depende dos mecanismos de limitação e inibição (Ghoul, 1983).

Modak et al (1986) estudaram o problema de otimização da produtividade levando em conta o fato que a taxa de crescimento, μ , é função do substrato, S. A modelagem da taxa de crescimento responde à Lei de Monod. À partir de uma concentração crítica de substrato da ordem de 100 mg/l, o rendimento em biomassa em relação ao substrato decresce. A produtividade máxima é obtida com esta concentração de substrato crítica. Foi constatado que a vazão que

otimiza o processo é de forma exponencial e que o início da alimentação depende das concentrações iniciais de biomassa e de substrato.

Variáveis de ação ou variáveis manipuladas:

Em uma fermentação "fed-batch" as variáveis de controle podem ser implementadas através de duas variáveis manipuladas, a velocidade de agitação e a vazão de alimentação. Em regra geral, a primeira variável é utilizada para regular o teor de oxigênio dissolvido, e a segunda para se atingir o objetivo fixado, a maximização da produtividade (Ghoul, 1989).

Os resultados obtidos por Willians et al (1986), mostram que uma melhora da taxa de crescimento e do rendimento é obtida com o uso da velocidade de agitação para regular o oxigênio dissolvido e da vazão de alimentação para controlar o QR. Uma técnica idêntica foi utilizada por Suzuki et al (1986), onde o oxigênio dissolvido é regulado a partir da velocidade de agitação e o etanol através da manipulação da vazão de alimentação, em uma fermentação de *Candida brasílica*.

Desta forma, pode-se dizer que a melhor estratégia é o uso da velocidade de agitação para regular o oxigênio dissolvido e a vazão de alimentação para maximizar a produtividade em biomassa (Ghoul, 1983).

Variáveis de controle:

Como já foi visto, as vazões de substrato que maximizam a produtividade são exponenciais em função do tempo. As equações matemáticas que representam as vazões podem

ser determinadas por balanços elementares no fermentador, com relação à biomassa, ao substrato e produtos. A expressão da vazão $F_{in}(t)$ que maximiza a produtividade e mantém a concentração de substrato S constante é (Ghoul, 1983):

$$F_{in} = \frac{\mu X V}{Y_{x/s} S_{in}} \quad (II.5)$$

onde:

- μ é a velocidade específica de crescimento (1/h)
- X é a concentração de biomassa (g/l)
- V é o volume do reator (l)
- $Y_{x/s}$ é o rendimento (g/g)
- S_{in} é a concentração da solução de alimentação (g/l).

O uso desta expressão necessita de uma estimativa a cada instante t da velocidade de crescimento, μ e do rendimento, $Y_{x/s}$.

Glicose:

Ghoul (1985) usou a concentração de glicose residual como variável de controle. A escolha desta variável é, teoricamente, a melhor pois é a concentração de glicose o fator chave da regulação do metabolismo da levedura em fermentações em batelada alimentada. Um excesso de glicose no meio de fermentação afeta a maioria dos parâmetros cinéticos do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e provoca aumento na velocidade específica de crescimento, μ (Figura II.9a e II.9b). Por outro lado, os dois gráficos permitem obter uma relação entre a velocidade específica de crescimento e o rendimento $Y_{x/s}$ (Figura II.9c).

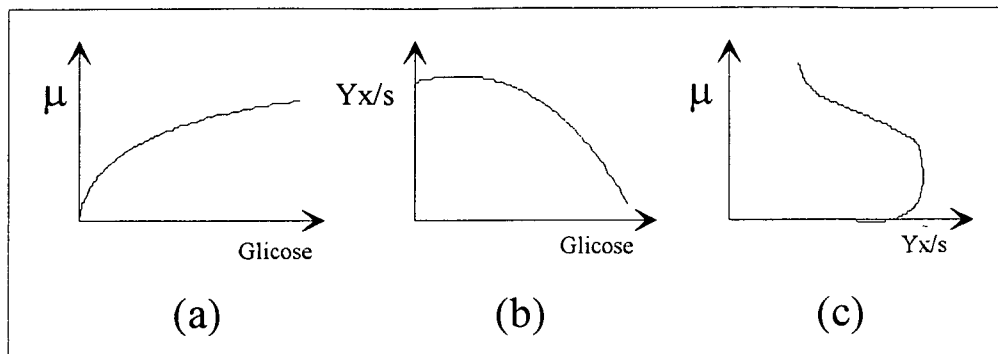


FIGURA II.9 - Relações entre taxa de crescimento, rendimento biomassa/ glicose e concentração de glicose (Ghoul, 1985).

Diferentes estudos foram realizados para determinar o perfil de concentração de glicose que convém manter-se ao longo da fermentação. Trabalhos de Sweere et al (1988) mostram que a flutuação da concentração de glicose promove uma diminuição no rendimento devido a um aumento da produção de etanol, uma vez que a produção de ácido acético e outros metabólitos secundários promovem uma inibição do crescimento.

Quociente Respiratório:

Aiba et al (1976) abordaram o comando da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* em batelada alimentada, mantendo o QR a um valor compreendido entre 1 e 1,1. Este é o método mais utilizado (Cooney et al, 1981; Aiba, 1973; Pons, 1985 e Willians et al, 1986).

A Figura II.10 mostra a evolução do QR em função da concentração de glicose (Ghoul, 1983). Um QR com valor próximo a 1 indica que a concentração de glicose é igual a concentração de substrato crítico, a partir do qual a produção de etanol se inicia.

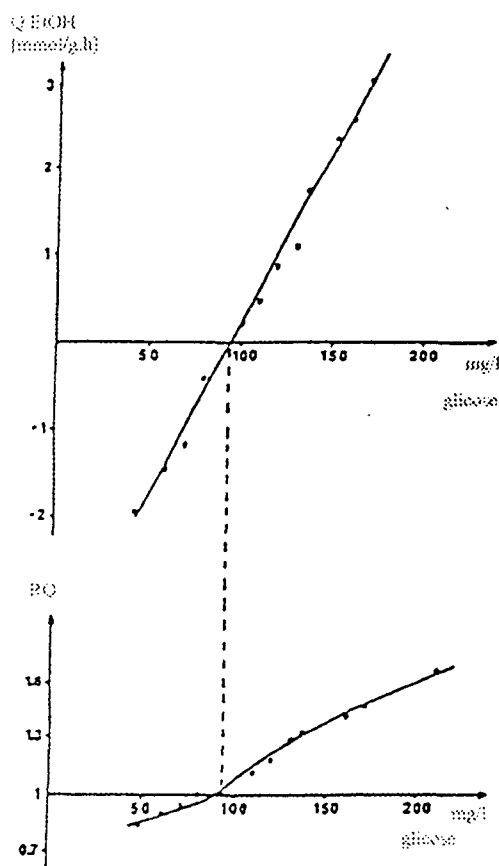


FIGURA II.10 - Relações entre o QR e a velocidade específica de evolução do etanol (Q_{EtOH}) e a concentração de glicose (Woehrer e Roehr, 1981).]

Etanol:

Com o desenvolvimento de novos sensores de substâncias voláteis, tornou-se possível a análise em linha do etanol. Este tipo de sensor pode ser utilizado no controle da produção de leveduras à partir do etanol como fonte de carbono (Yamane et al, 1981; Huang et Chu, 1981). Dairaku et al (1981) utilizou este tipo de sensor para o controle do crescimento de leveduras de panificação usando glicose como fonte de carbono. Em uma faixa de concentração de glicose de

50-170 mg/l, a produção de etanol está ligada linearmente à concentração de glicose (Figura II.11).

A concentração de etanol deve ser mantida entre 90 e 200 ppm. A escolha do melhor valor depende do limite de detecção e do tipo de material utilizado. Este valor deve ser o menor possível. Dairaku et al (1981) notaram uma diminuição da taxa de crescimento e do rendimento biomassa-substrato à partir de 2000 ppm de etanol. Os autores encontraram taxas de crescimento máximas compreendidas entre 0,28 e 0,30 h⁻¹ e rendimento ligeiramente superiores à 0,5 g de biomassa / g de glicose para uma concentração de etanol mantida à 200 ppm. Namba et al (1981) igualmente cultivaram *Saccharomyces cerevisiae* usando glicose como fonte de carbono, mantendo o etanol à 0,1 g/l, obtendo uma taxa de crescimento de 0,17 h⁻¹ e um rendimento biomassa / glicose de 0,5 g/g. Axelsson et al (1988) mantiveram uma concentração de etanol entre 0,1 e 0,2 g/l, cultivando *Saccharomyces cerevisiae* em melaço, obtendo uma taxa de crescimento de 0,20 h⁻¹ e um rendimento compreendido entre 0,25 e 0,30 g biomassa / g melaço.

A relação entre a produção de etanol e o QR é ilustrado na Figura II.5. Pode-se observar que manter o QR igual à 1 corresponde à uma produção nula de etanol. Assim, se o valor do QR deve ser constante ao longo da fermentação, isto corresponde à uma diminuição da concentração de etanol ao curso do tempo (Willians et al, 1986).

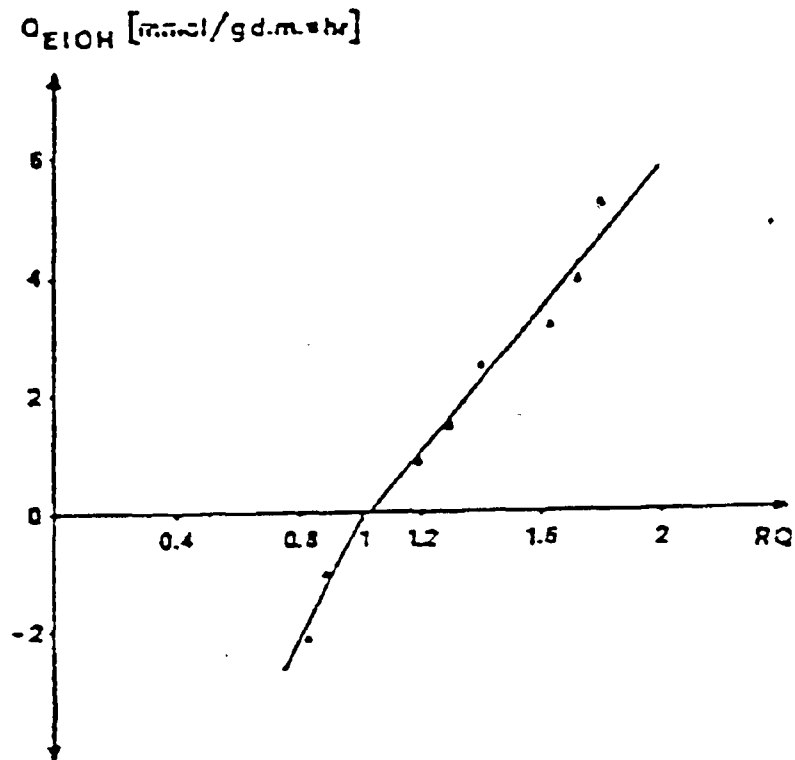


FIGURA II.11 - Relação entre o Q_{EtOH} e o QR.

Estas duas variáveis de controle, o etanol e o QR, são as mais utilizadas para o controle da fermentação de leveduras em semi-contínuo. Os valores nos quais estas variáveis devem ser mantidas estão descritas na literatura e variam de 1 a 1,1 para o QR e de 0,1 e 0,4 g/l para o etanol, de acordo com o material de detecção. O interesse na escolha destas duas variáveis reside no fato de serem acessíveis em linha.

Taxa de crescimento:

Os trabalhos de Wu et al (1985) mostraram que é possível utilizar a taxa de crescimento como variável de controle. O inconveniente desta técnica é que se necessita de uma estimativa da taxa de crescimento, que não é uma medida direta. No entanto, o interesse reside no fato de que pode-se ter informações sobre o estado do processo .

Para concluir este tema, pode-se dizer que o processo deve ser controlado manipulando-se a agitação, e com isso regular o teor de oxigênio dissolvido. Também deve-se manipular a vazão de alimentação através de duas importantes variáveis de controle: a concentração de etanol ou o QR. Os trabalhos realizados por Willians et al (1986), comparando as duas variáveis de controle, em condições idênticas, nos possibilita a melhor escolha. As outras variáveis de controle, como a taxa de crescimento ou a glicose são difíceis ou não mensuráveis diretamente e necessitam do uso de técnicas de amostragem e estimativa algumas vezes complicadas.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se a descrição do equipamento utilizado para a realização das fermentações, bem como o microrganismo usado e os meios de cultura. São citados, também, os métodos analíticos adotados para a determinação das concentrações de glicose, biomassa e etanol. Todas as condições de operação utilizadas no processo são citadas.

III.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT 1531. Esta foi isolada a partir de uma cultura de leveduras liofilizadas cedida pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello - FTPTAT - Campinas - S.P..

III.2. MEIOS DE CULTURA

A levedura foi conservada em ágar (meio YMA), em tubo inclinado e mantida à 4° C. A repicagem foi realizada mensalmente. O meio de conservação é apresentado na Tabela III.1.

TABELA III.1 - Composição do meio de conservação.

YMa (Yeast Malt Extract Agar)	Concentração (g/l)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Bactopeptona	5
Glicose	10
Ágar	20

O pH deste meio ficava entre 6,5 e 7,0. Para o preparo dos inóculos e para as fermentações foi utilizado o mesmo meio, com exceção do ágar (meio YM).

III.3. SOLUÇÕES UTILIZADAS

III.3.1 - Solução de alimentação

A solução de alimentação utilizada nas fermentações batelada alimentada é a descrita na Tabela III.2.

Foi demonstrado (Dantigny, 1989) que um déficit de sais na solução de alimentação diminui o rendimento. Isto ocorre porque os elementos K^+ , PO_4^{-3} e Mg^{+2} são fortemente consumidos pelas leveduras e desaparecem rapidamente do meio de fermentação. Daí a

necessidade de se acrescentar estes sais na solução de alimentação, utilizada nas fermentações “fed-batch”.

TABELA III. 2 - Composição da solução de alimentação

	Concentração (g/l)
Glicose	150
KH_2PO_4	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5

III.3.2. Solução de anti-espumante

Utilizou-se, também, uma solução de anti-espumante com a função de controlar o nível de espuma durante a fermentação. Para o preparo da solução dissolve-se 5 g de silicoplast em 100 ml de água destilada. A seguir, filtra-se cerca de 50 ml da suspensão e autoclava-se o filtrado à 121°C por 15 minutos.

III.3.3. Solução para ajuste do pH (NaOH 10%):

A função desta solução é manter o pH constante durante a fermentação. Para o preparo desta solução, pesa-se 10 gramas de NaOH e dilui-se em 100 ml de água. A esterilização dos meios e das demais soluções utilizadas foi feita à 121°C por 15 minutos.

III.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Neste item serão descritos os métodos analíticos utilizados para determinação da concentração de glicose, biomassa e etanol, bem como a realização da amostragem do processo fermentativo.

III.4.1. Amostragem

Durante os ensaios de fermentação em batelada, o intervalo de amostragem foi de 1 hora. No caso dos ensaios em batelada alimentada, a amostragem foi realizada em intervalos menores (30 minutos), para melhor ajuste e precisão da vazão de alimentação.

Após a inoculação, as amostras são retiradas esterilmente do fermentador, e devidamente preparadas para a determinação da concentração de biomassa e de glicose. O volume de amostra retirado é de, aproximadamente, 3 ml. A medida de etanol foi realizada “on line” pelo sistema composto pelo sensor de compostos voláteis e cromatógrafo.

III.4.2. Determinação da concentração celular

A concentração celular durante as fermentações foi determinada por dois métodos: indiretamente pela medida da absorbância e diretamente por peso da massa seca. As medidas de massa seca foram determinadas em intervalos de tempo maiores, somente para um melhor

acompanhamento do processo e para comprovar os resultados obtidos pela medida da absorvância.

As medidas de absorvância foram realizadas à 660 nm em espectrofotômetro (modelo E225D-CELM) e convertidas em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume) através do uso de uma curva de calibração.

O procedimento para a construção desta curva foi o seguinte:

- 50 ml da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* foram coletados no final da fermentação, filtrados em filtro Millipore com membrana de 0,45 μm e secos em estufa até peso constante.

- Outra porção do fermentado foi retirada e realizadas diluições, lendo-se a densidade ótica (DO) em espectrofotômetro.

- O peso de amostra obtido após a pesagem da membrana dividido pelo volume de filtrado fornece a concentração do número de células. Este valor dividido por cada diluição realizada é a massa seca.

- Plotando-se a curva da densidade ótica pela massa seca correspondente tem-se a curva de calibração da biomassa (Figura III.1).

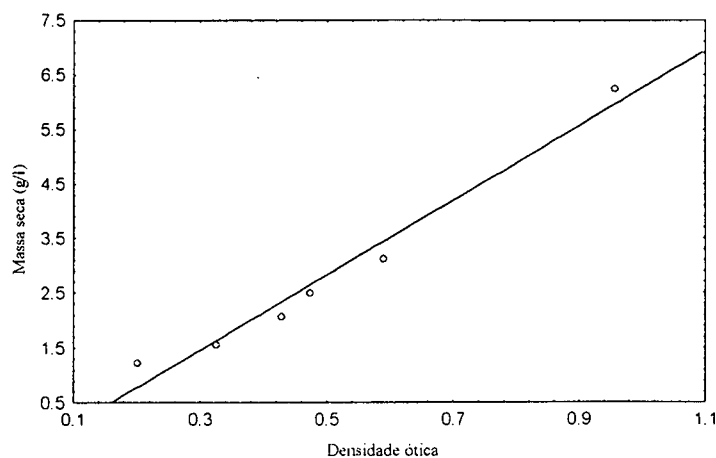


FIGURA III.1 - Curva de calibração da biomassa.

A equação obtida por regressão linear foi a seguinte:

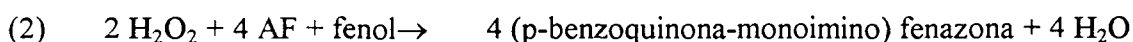
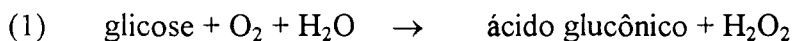
$$X = 6,862*(DO) - 0,598 \quad (\text{III.1})$$

Deve-se considerar, para o cálculo da concentração celular, a diluição utilizada em cada leitura, mantendo a DO sempre no limite de linearidade.

III.4.3. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada por método enzimático, que se fundamenta na oxidação da glicose pela gluco-oxidase (GOD) transformando-a em ácido glucônico e água oxigenada. Esta catalisa a oxidação do fenol com a 4-aminofenazona (4 AF), formando um composto chamado quinonimina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução analisada.

A sequência de reações que ocorrem é a seguinte:



Para o procedimento do método, prepara-se um tubo de ensaio com 2 ml de reagente de cor e 20µl de amostra; em outro tubo o branco, com apenas 2 ml de reagente de cor. Os tubos de ensaio são incubados por 10 minutos à 37°C, em banho termostaticado. A leitura é feita em espectrofotômetro à 530 nm.

Nestas condições, a curva de calibração mostrou linearidade até um valor de absorvância igual a 1, sendo necessário, acima deste valor, fazer diluições da amostra a ser lida.

O cálculo para determinação da glicose é realizado dividindo a absorvância da amostra pela do padrão e multiplicando pela diluição, quando esta foi realizada.

III.4.4. Determinação da concentração de etanol - O sensor de produtos voláteis

O etanol foi quantificado pelo sensor de compostos voláteis que, imerso diretamente no meio de fermentação, captava em intervalos pré-determinados de tempo, o etanol produzido durante o processo. Através do gás de arraste (N_2), o etanol era carregado até o cromatógrafo em fase gasosa (CFG), que analisava a amostra e, com o auxílio de um micro-computador ligado diretamente ao cromatógrafo, comparava a amostra com um padrão previamente elaborado e fornece a concentração de etanol na referida amostra.

O sensor é constituído por uma membrana hidrofóbica em PTFE (poli tetra fluoro etileno) que só permite a passagem de substâncias voláteis (no caso, o etanol) e as encaminha a um detector adequado. Neste caso, uma das faces da membrana está em contato com a fase líquida e a outra é varrida por um gás de arraste (N_2). As moléculas na forma gasosa provenientes da fase líquida, atravessam a membrana em razão do gradiente de concentração criado pela circulação de gás no interior da sonda. A membrana utilizada possui geometria tubular, intercalada por dois tubos em aço inoxidável. A vedação entre a parte metálica e o

polímero é assegurada por colagem à base de silicone (Figura III.2). Na Figura III.3 pode ser observada a membrana inserida no fermentador.

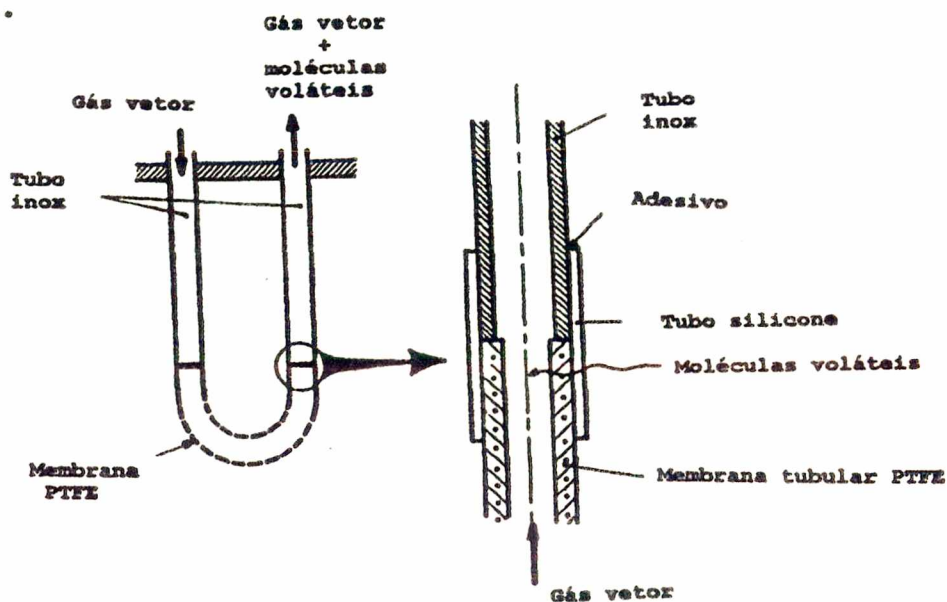


FIGURA III.2 - Montagem esquemática de uma sonda em membrana tubular.

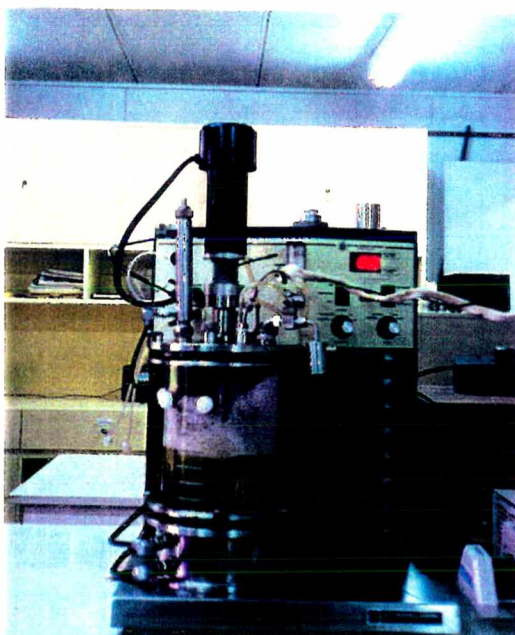


FIGURA III.3 - Fotografia do sensor à membrana tubular inserido no fermentador (NEW BRUNSWICK).

A membrana utilizada possui as seguintes características

:

- POREFLON (Sumimoto Electric Ind. Ltda), Tipo YA
- Geometria: tubular
- Comprimento:
- Diâmetro interno: 2 mm
- Espessura: 1 mm
- Diâmetro médio dos poros: 1 μ m
- Porosidade: 80%.

O sistema de detecção utilizado foi um cromatógrafo em fase gasosa com detector à ionização de chama (CG-90 DIC) (Figura III.4), equipado com:

- uma coluna à fase estacionária PORAPAK Q - 80-100 mesh, de 1 mm de diâmetro interno e comprimento de 2 m,
- um detector à ionização de chama (DIC) ar-hidrogênio,
- uma válvula de injeção automática de 6 vias.

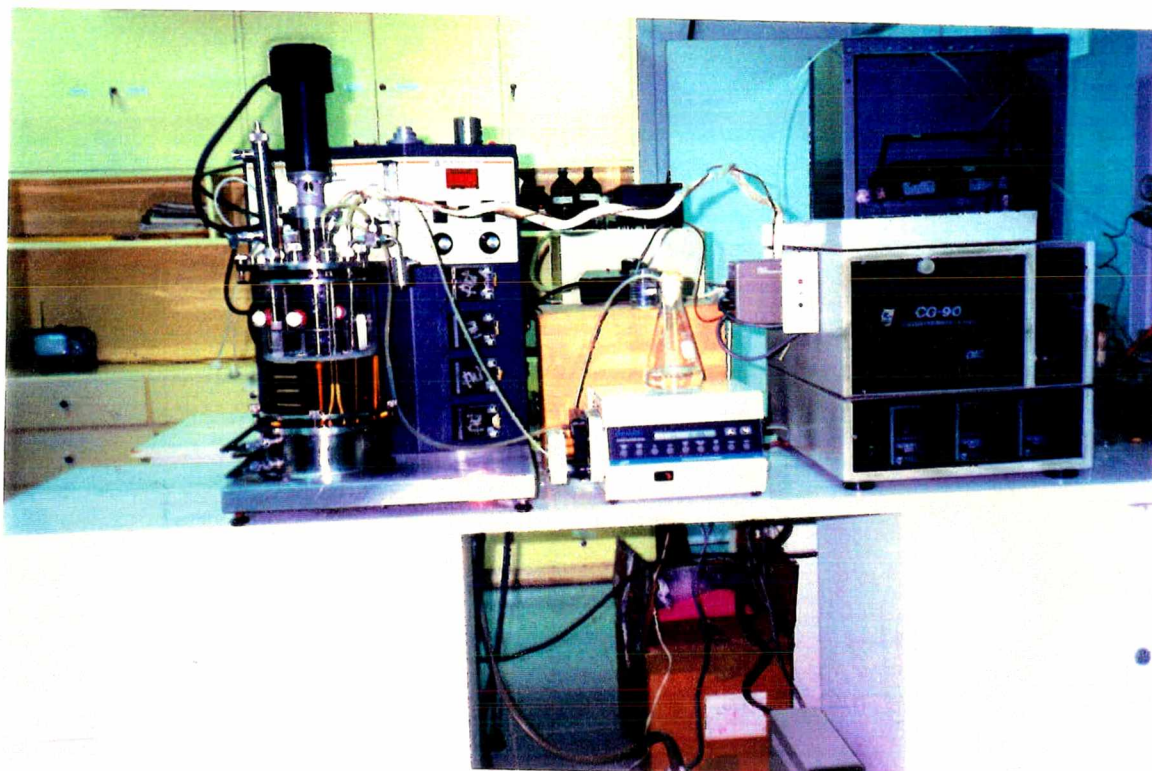


FIGURA III.4 - Esquema do fermentador NEW BRUNSWICK com seus acessórios, o cromatógrafo em fase gasosa - CG Instrumentos Científicos e microcomputador, onde é realizada a integração das análises cromatográficas.

Durante todo o processo, o gás de arraste passa continuamente por um “loop” de amostragem da válvula e sai para a atmosfera. No momento da injeção a válvula troca de posição e o gás é enviado ao detector. A integração e os cromatogramas são obtidos através de uma placa de interface AD/DA (MICROQUÍMICA S.A).

A montagem experimental completa é apresentada na Figura III.5.

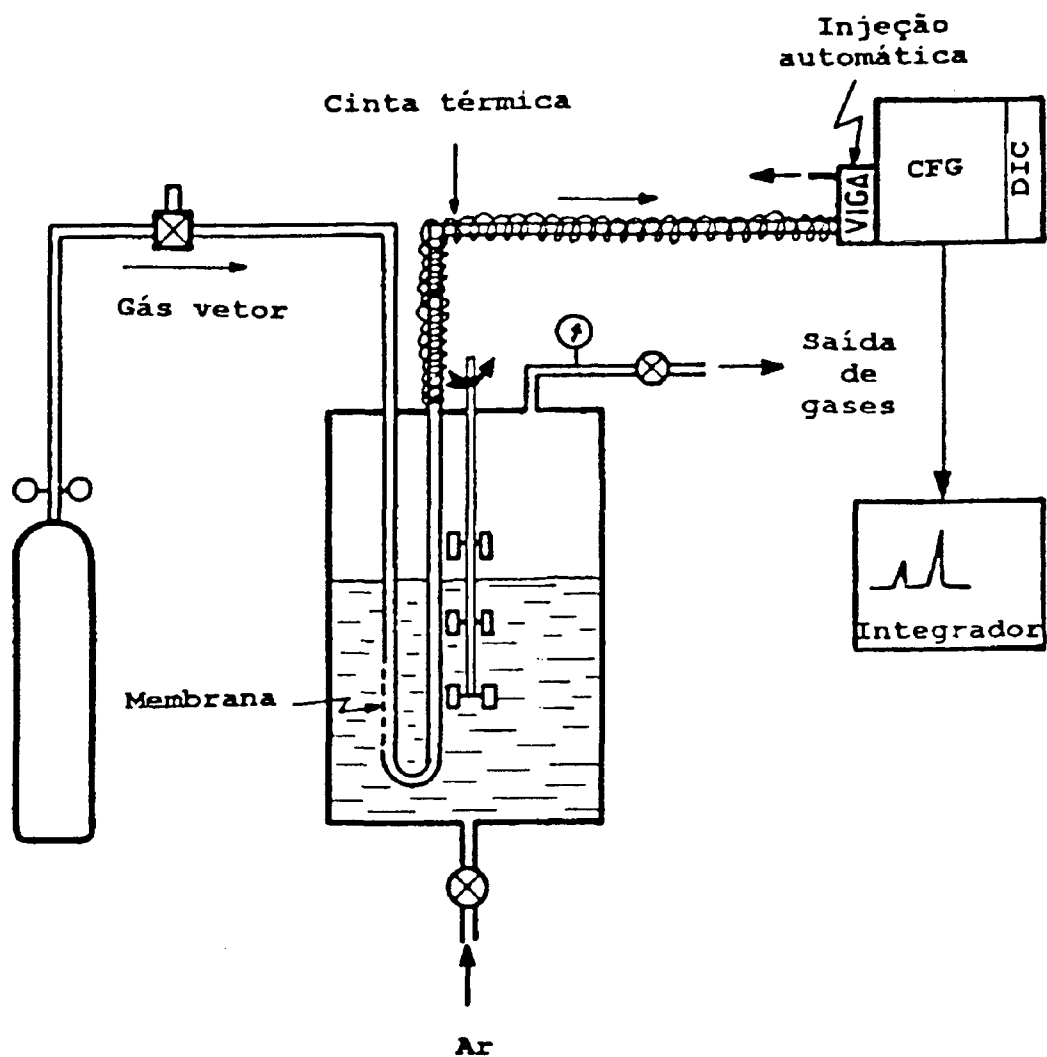


FIGURA III.5 - Esquema completo do equipamento.

III.5 - ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Foram realizados neste trabalho fermentações em batelada e em batelada alimentada, com o objetivo de determinar as velocidades específicas de crescimento e os rendimentos, para cada

um dos casos. Desta forma, pôde-se comparar os resultados obtidos com os encontrados na literatura.

III.5.1. Preparo dos inóculos

A partir das culturas estocadas sob refrigeração foi feita a ativação em tubos de ensaio com meio YMA. Estes tubos foram incubados à 30°C por 72 horas.

Para o preparo da pré-cultura, 150 ml de meio YM foram esterilizados em erlenmeyer e inoculados com duas alçadas da cultura. Este foi mantido à 30°C por 24 horas em agitador magnético para propagação da cultura.

Este procedimento foi adotado para as fermentações descontínuas, onde a concentração inicial de biomassa pode ser reduzida. Neste caso, após a propagação, a pré-cultura foi inoculada no fermentador, de maneira estéril, com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Nas fermentações em batelada alimentada, a concentração de biomassa inicial deve ser maior. Para tanto, utilizou-se a fermentação em descontínuo como inóculo da batelada alimentada.

O meio de cultura utilizado nas fermentações em batelada e batelada alimentada foi o meio YM, variando a concentração de glicose nas fermentações batelada.

III.5.2. Condições de operação

Todos os ensaios de fermentação em batelada e batelada alimentada foram realizados em fermentador BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. Inc. com capacidade total de 6,0 litros.

Este fermentador é dotado de sondas automáticas para controle de pH, nível de espuma, sensor de temperatura. Possui também quatro bombas peristálticas que permitem dosar e controlar parâmetros importantes do processo, tais como pH, através de soluções ácidas e básicas e nível de espuma através da adição de solução anti-espumante. A agitação do processo é realizada por um motor que contém duas turbinas colocadas em dois níveis, uma no centro do meio líquido para agitar a solução e outra um pouco acima do líquido para quebrar a espuma formada durante o processo. Para obtenção da aeração desejada, ar estéril foi introduzido no meio, proveniente de um compressor de ar cuja vazão era controlada através de um rotâmetro. As condições utilizadas durante as fermentações, necessárias ao desenvolvimento ótimo da levedura são descritas na Tabela III.3.

TABELA III.3 - Condições de operação utilizadas no processo.

Parâmetro	Condição utilizada
pH	4,5
Temperatura	30°C
Agitação	300 - 500 rpm
Aeração	0,9 v/v/min
Volume do fermentador	3 - 4 l.
Vazão de N ₂ no sensor	0,20 ml/min

III.6. CONTROLE DAS FERMENTAÇÕES

III.6.1 - Fermentações descontínuas:

O substrato utilizado para as fermentações descontínuas foi a glicose. O inóculo foi obtido por meio de uma pré-cultura, com uma concentração de biomassa inicial de, aproximadamente, 0,05 g/l. A inoculação do fermentador é realizada de maneira estéril, através do uso de uma bomba peristáltica, conforme a Figura III.6. Durante a realização das fermentações foi verificado que o tempo de latência é de, aproximadamente, 2 horas. O volume inicial do fermentador é de 4 litros. Foram realizados experimentos variando a concentração de substrato: 5, 10 e 15 g/l.

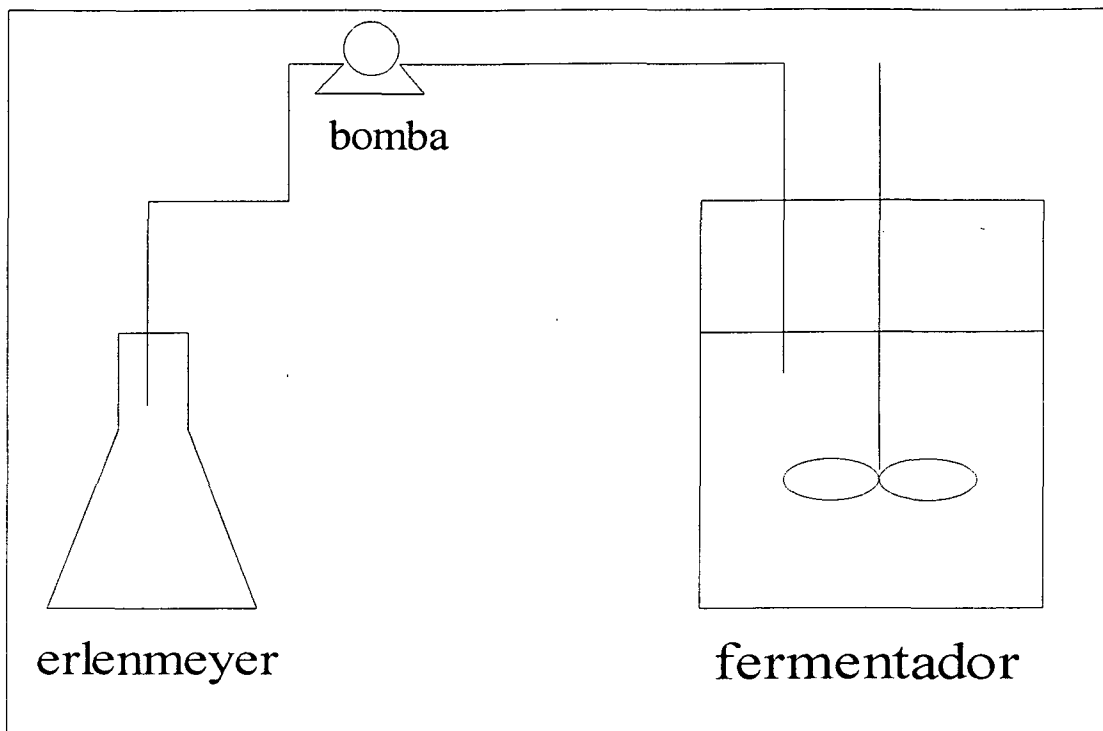


FIGURA III.6 - Dispositivo de inoculação estéril.

III.6.2 - Fermentações em batelada alimentada:

Para a realização das fermentações em batelada alimentada é necessário uma concentração inicial de biomassa acima de 2 g/l. Devido a isto, as fermentações em batelada serviram de inóculo para as em batelada alimentada. Desta forma, diminuiu-se os riscos de contaminação, comparado com a realização desta etapa em erlenmeyer, bem como o tempo necessário para decantação da biomassa para uso no “fed-batch”. Foi realizado, então, a fermentação batelada no fermentador e, posteriormente, o uso da biomassa obtida para o processo “fed- batch”.

De acordo com a influência das condições de fermentação sobre as características cinéticas, a vazão de alimentação é determinada efetuando-se a hipótese da invariabilidade do

rendimento biomassa/glicose e da taxa de crescimento. Esta vazão é determinada a partir de balanços materiais para um processo batelada alimentada, considerando sistema com volume constante e vazão constante de alimentação: (na verdade não existe um processo fed-batch com volume constante, porém se o volume total de meio alimentado for relativamente pequeno em relação ao volume total, a hipótese de volume constante é bastante razoável.). Esta hipótese apresenta a possibilidade de se fazer simplificações nos balanços materiais (Stanbury et al, 1984).

As equações dos balanços materiais para a biomassa e para o substrato são deduzidos abaixo, de acordo com o esquema apresentado na Figura III.7.

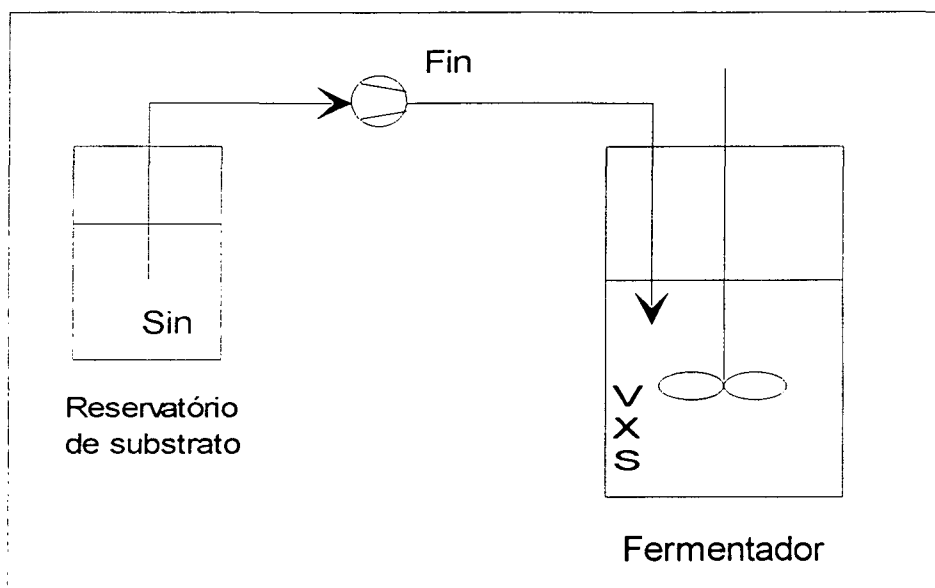


FIGURA III.7 - Esquema de um fermentador "fed-batch".

Balanço material para as células:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{d(V \cdot x)}{dt} = V \cdot r_x = V \cdot \mu x \quad (\text{III.2})$$

onde: $\frac{dx}{dt}$ é a variação da massa de célula no fermentador;

$V \cdot r_x$ é a velocidade constante de aparecimento da célula pelo crescimento.

Como: $V \approx \text{cte}$, tem-se:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (\text{III.3})$$

Balço material para o substrato:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d(Vs)}{dt} = \frac{V \cdot ds}{dt} = F_{in} \cdot S_{in} - V \cdot r_{sx} \quad (\text{III.4})$$

onde: $F_{in} \cdot S_{in}$ é a vazão mássica de fornecimento de substrato (l/h);

$V \cdot r_{sx} \rightarrow$ consumo de substrato para o crescimento (l/h).

Dividindo por V , tem-se:

$$\frac{ds}{dt} = \frac{F_{in}}{V} \cdot S_{in} - r_{sx} \quad (\text{III.5})$$

Como: $r_{sx} = \mu \cdot X / Y_{x/s}$

E definindo: $F_{in} / V = D$, onde D é a taxa de diluição, temos:

$$\frac{ds}{dt} = D \cdot S_{in} - \frac{\mu x}{y_{x/S}} \quad (\text{III.6})$$

Situações particulares:

Caso 1: $F_{in} \cdot S_{in} > V \cdot r_{Sx}$

Neste caso:

$$\frac{ds}{dt} > 0 \quad (\text{ocorre acúmulo de substrato})$$

Balanço para as células:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \rightarrow \frac{dx}{x} = \mu dt \rightarrow x = x_0 e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (\text{III.7})$$

Caso2: $F_{in} \cdot S_{in} = V \cdot r_{Sx}$

Neste caso:

$$\frac{ds}{dt} = 0 \quad (\text{não ocorre variação da concentração de substrato no fermentador})$$

$$F_{in} = \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \cdot \frac{V}{S_{in}} \quad (\text{III.8})$$

onde: μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});

x = concentração de biomassa (g/l);

V = volume do reator (l);

$Y_{x/s}$ = rendimento biomassa/glicose (g/g);

s = concentração de glicose no fermentador (g/l);

S_{in} = concentração de glicose na solução de alimentação (g/l), e

F_{in} = vazão da solução de alimentação (l/h).

A equação III.8 representa o comportamento da vazão de alimentação, sendo necessário para o uso desta, a concentração de biomassa inicial, do rendimento biomassa / substrato e da velocidade específica de crescimento. Desta forma, a biomassa inicial é determinada pela medida da densidade ótica. A taxa de crescimento inicial é de, aproximadamente, $0,25 \text{ h}^{-1}$ e o rendimento $0,5 \text{ g/g}$.

No início de cada novo período, a biomassa x_0 é determinada pela medida da densidade ótica e o volume V_0 é calculado após a adição da solução de alimentação. A análise da concentração da biomassa permite calcular a taxa de crescimento média entre dois pontos. Pode-se, desta forma, calcular a vazão para o tempo seguinte. O volume inicial das fermentações em batelada alimentada foi de 3 litros.

A alimentação em glicose à uma concentração de 150 g/l foi realizada por meio de uma bomba peristáltica com vazão programável. A vazão, a cada intervalo de tempo, foi determinada

pela equação (III.8) e programada na bomba. Durante o período de tempo estipulado, a bomba alimenta o fermentador com a solução de glicose. Após este período, a vazão é recalculada e o mesmo procedimento seguido.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados para as fermentações em batelada, que serviram de suporte para o cálculo da vazão de alimentação utilizada nas fermentações em batelada alimentada. Os resultados obtidos para estas últimas mostraram que foi possível a otimização da produção de biomassa através do uso desta técnica de cultivo.

IV.1. FERMENTAÇÕES BATELADA

As fermentações em batelada foram realizadas com o objetivo de se determinar as velocidades específicas de crescimento (μ) e os rendimentos ($Y_{x/s}$ e $Y_{x/e}$) para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes experimentos foram realizados mantendo-se constante todas as condições de operação, variando a concentração inicial de glicose no meio, objetivando também verificar a influência desta última sobre os parâmetros cinéticos e comparar os resultados com os obtidos na literatura.

As variações das concentrações de biomassa, glicose e etanol para estas três fermentações são mostradas nas figuras seguintes.

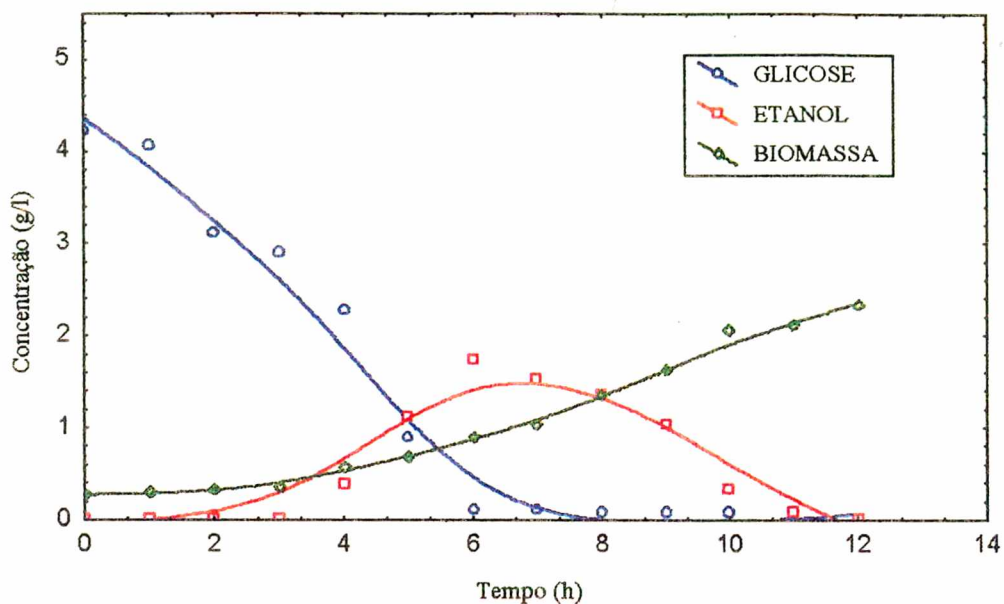


FIGURA IV.1 - Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em batelada sobre glicose: Evolução da biomassa, glicose e etanol, à concentração inicial de glicose de 5 g/l.

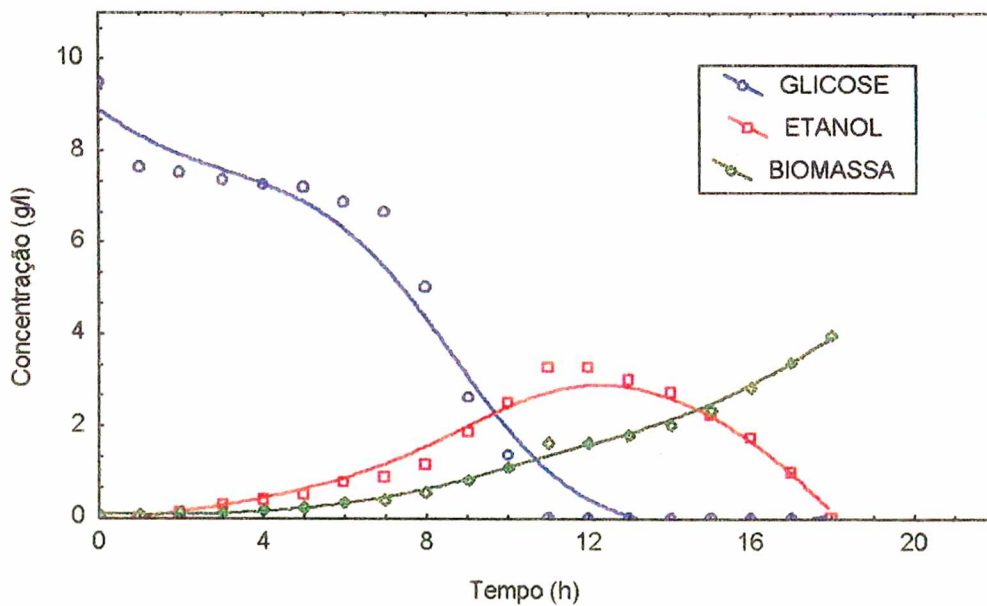


FIGURA IV.2 - Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em batelada sobre glicose: evolução da biomassa, glicose e etanol, à concentração inicial de glicose de 10 g/l.

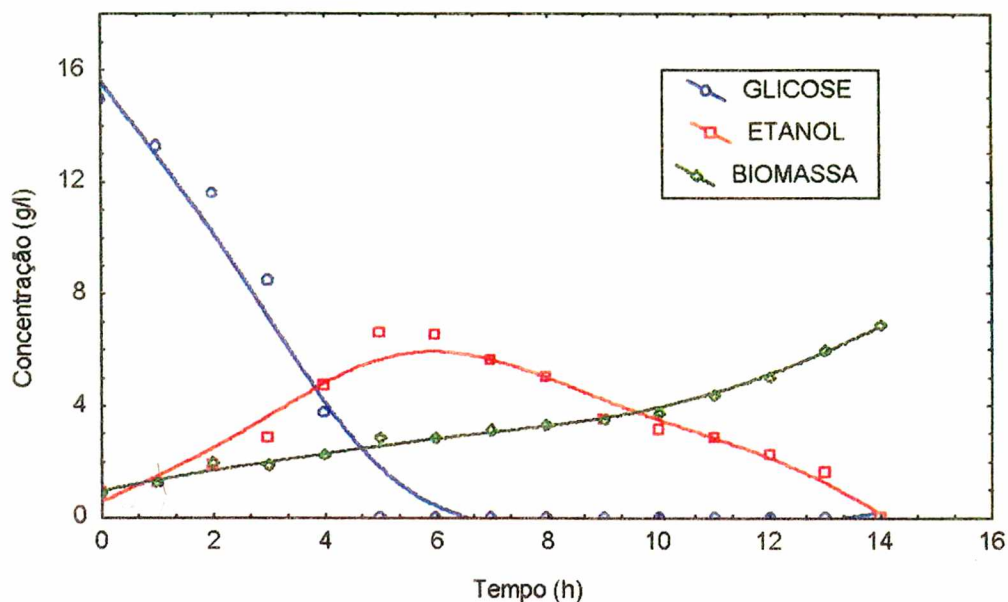


FIGURA IV.3 - Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em batelada sobre glicose: evolução da biomassa, glicose e etanol, à concentração inicial de glicose de 15 g/l.

Com base nos resultados apresentados nas figuras acima e nos trabalhos de Ghoul (1985), Rajab (1983) e Dantigny (1989), verifica-se que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* sobre glicose se faz em três etapas principais:

A primeira etapa do crescimento é essencialmente fermentativa, ou seja, ocorre a utilização da glicose com a produção de etanol. Esta primeira fase é caracterizada por valores variáveis para as velocidades específicas de crescimento. Pode-se observar, também, que uma diminuição da concentração de glicose proporciona um aumento nesta velocidade. Isto é resultado da inibição causada por fortes concentrações de glicose. O rendimento $Y_{x/s}$ é igualmente variável. Quanto ao rendimento da produção de etanol em razão à glicose consumida, este diminui ao final desta fase.

A segunda fase é iniciada quando o substrato principal, a glicose, é exaurida. Caracteriza-se por uma “quase parada” no crescimento, que pode variar de 1 à 4 horas, período em que a levedura adapta-se ao novo substrato, sintetizando as enzimas necessárias para a assimilação do etanol. Durante esta fase, os parâmetros cinéticos se mantêm praticamente constantes a valores baixos, com atividade metabólica reduzida.

A terceira fase do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* envolve a reutilização do etanol e é caracterizada por um aumento da atividade respiratória. Durante esta fase, a velocidade específica de crescimento, baixa no início, aumenta rapidamente até $0,30 \text{ h}^{-1}$ e diminui em seguida em razão da diminuição da concentração de etanol. O rendimento celular nesta fase é baixo no início do crescimento, depois aumenta rapidamente e se estabiliza à $0,60 \text{ g de biomassa / g de etanol assimilado}$.

Estes experimentos em batelada sobre glicose foram realizados em duplicata, apresentando boa reprodutibilidade dos resultados. As pequenas variações observadas ocorreram, provavelmente, devido ao diferente estado fisiológico das leveduras na pré-cultura.

Os resultados obtidos para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* sobre glicose mostram a grande sensibilidade desta levedura ao efeito da glicose. Desta forma, durante a primeira fase de crescimento, é notado um desvio do metabolismo desta levedura para a via fermentativa devido à uma concentração inicial de glicose elevada. Este desvio tende a

desaparecer com a diminuição da concentração de glicose no meio de cultura. As enzimas respiratórias são inicialmente reprimidas por um excesso de glicose. Após a glicose ser inteiramente consumida, observa-se uma fase de latência correspondente à biossíntese das enzimas necessárias para a assimilação do etanol. O uso do etanol no decorrer desta fase sem um aumento notável da biomassa é explicado, de uma parte, pela utilização do etanol para a manutenção celular e, de outra parte, pelo acúmulo provável do etanol intra-celular.

De acordo com o discutido acima, mostrou-se uma boa concordância entre os resultados obtidos e o comportamento cinético desta levedura encontrado na literatura.

IV.1.1 - Evolução das velocidades específicas de crescimento

As Figuras IV.4, IV.5 e IV.6 mostram a evolução do crescimento celular. Nas concentrações de glicose de 5, 10 e 15 g/l, os valores da velocidade específica de crescimento foram 0,20, 0,28 e 0,20 h⁻¹, respectivamente.

A análise destes resultados mostra que não ocorre inibição significativa do crescimento para esta levedura nas concentrações iniciais de glicose estudadas. A velocidade específica de crescimento sobre etanol depende da concentração inicial de glicose, diminuindo à medida que esta aumenta. Os valores obtidos para as velocidades específicas de crescimento sobre etanol foram de 0,16, 0,13 e 0,10 h⁻¹, para as concentrações de glicose inicial de 5, 10 e 15 g/l, respectivamente. De acordo com Rajab (1983), o responsável pela inibição, tanto durante a fase fermentativa quanto durante a fase respiratória do etanol, é o acetato, sub-

produto da fermentação da glicose, mesmo estando presente em baixas concentrações. No entanto, o acetato não foi medido neste trabalho pois este não é volátil, dissociando-se quando em solução, sendo impossível dosá-lo com o sensor.

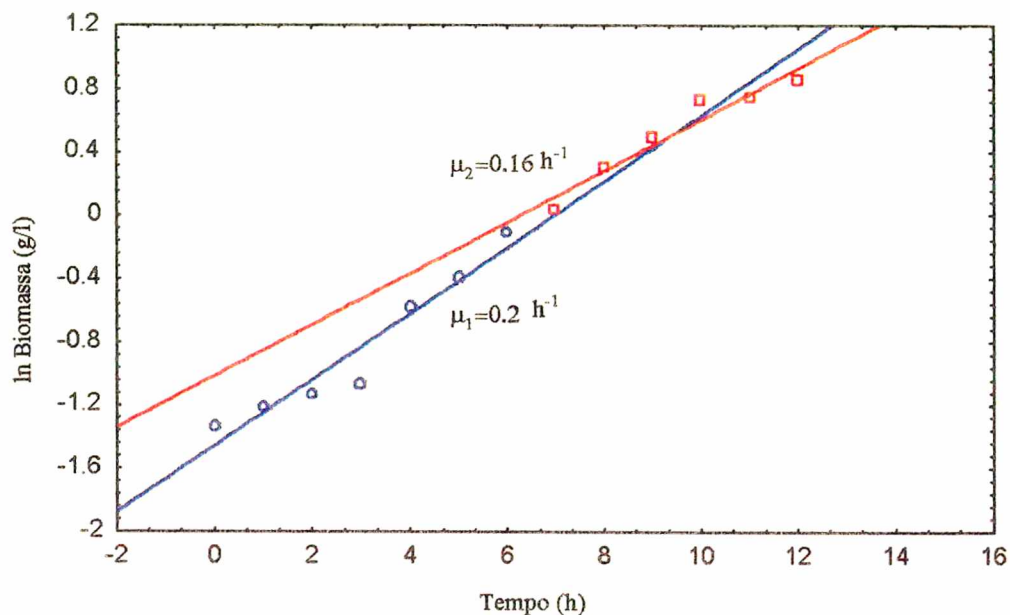


FIGURA IV.4 - Determinação da velocidade específica de crescimento sobre glicose (μ_1) e sobre etanol (μ_2), em fermentação em batelada, à concentração inicial de glicose de 5 g/l.

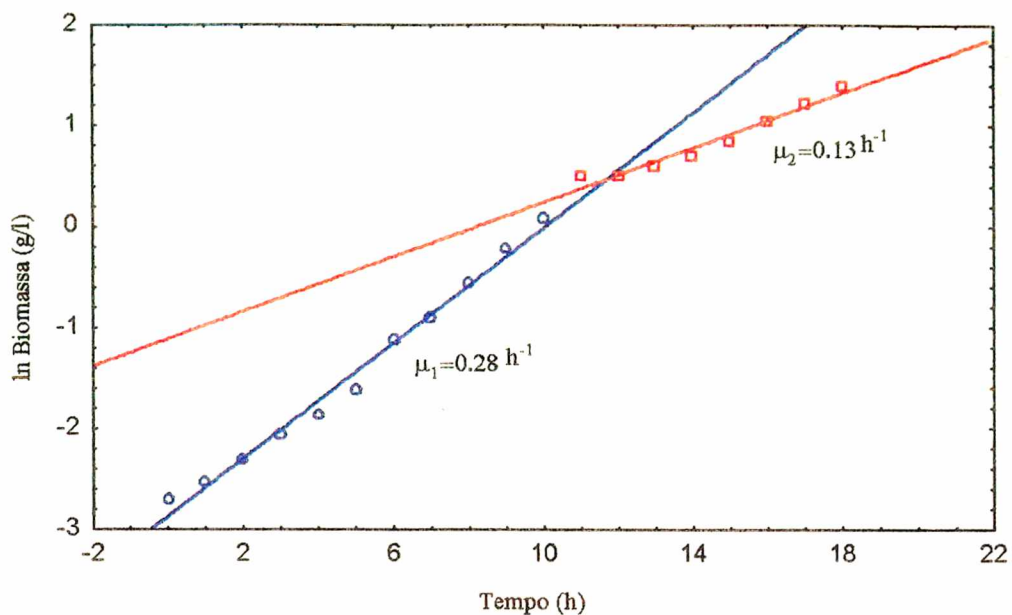


FIGURA IV.5 - Determinação da velocidade específica de crescimento sobre glicose (μ_1) e sobre etanol (μ_2), em fermentação em batelada, à concentração inicial de glicose de 10 g/l.

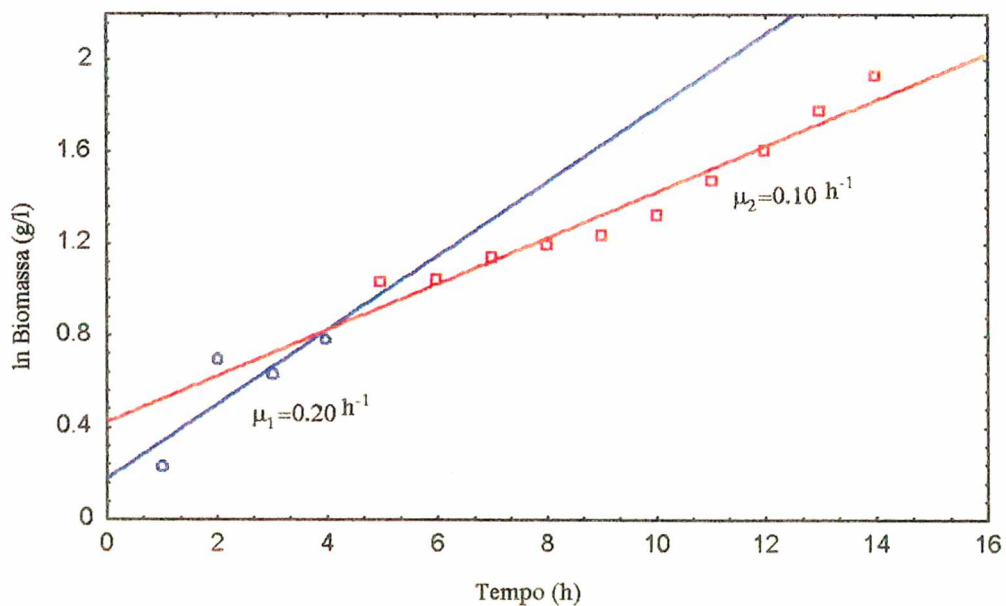


FIGURA IV.6 - Determinação da velocidade específica de crescimento sobre glicose (μ_1) e sobre etanol (μ_2), em fermentação em batelada, à concentração inicial de glicose de 15 g/l.

A variação das velocidades específicas de crescimento sobre glicose e sobre etanol com o tempo podem ser observadas nas figuras IV.7 e IV.8. Como exemplo para este caso, foi escolhida a fermentação com concentração inicial de glicose de 10 g/l. Pode-se observar que a velocidade específica de crescimento sobre glicose e sobre etanol variam com o tempo, mostrando um valor máximo para a velocidade de crescimento sobre glicose de $0,41 \text{ h}^{-1}$ e sobre etanol de $0,18 \text{ h}^{-1}$.

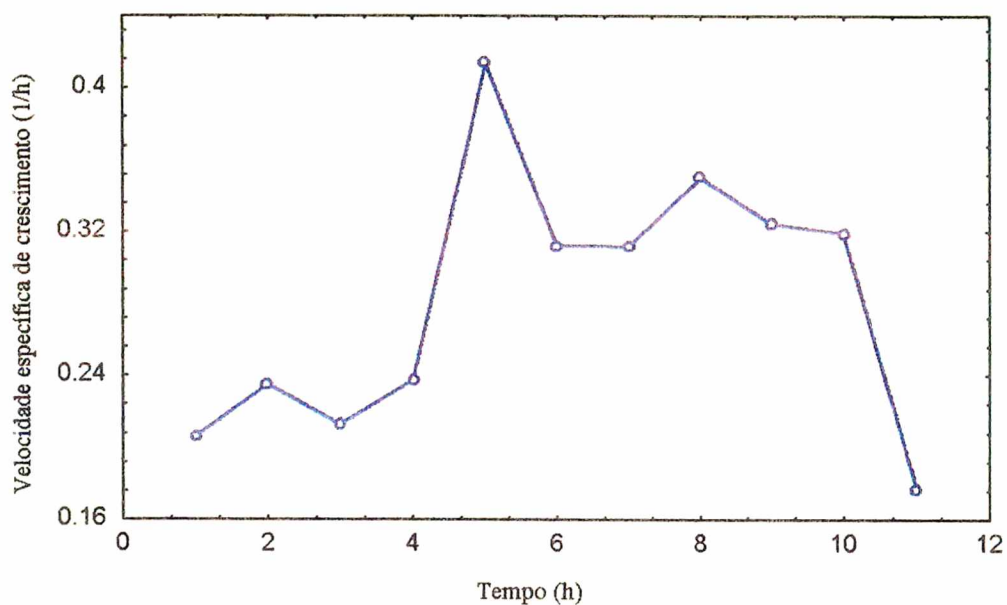


FIGURA IV.7 - Evolução da velocidade específica de crescimento sobre glicose, em fermentações em batelada.

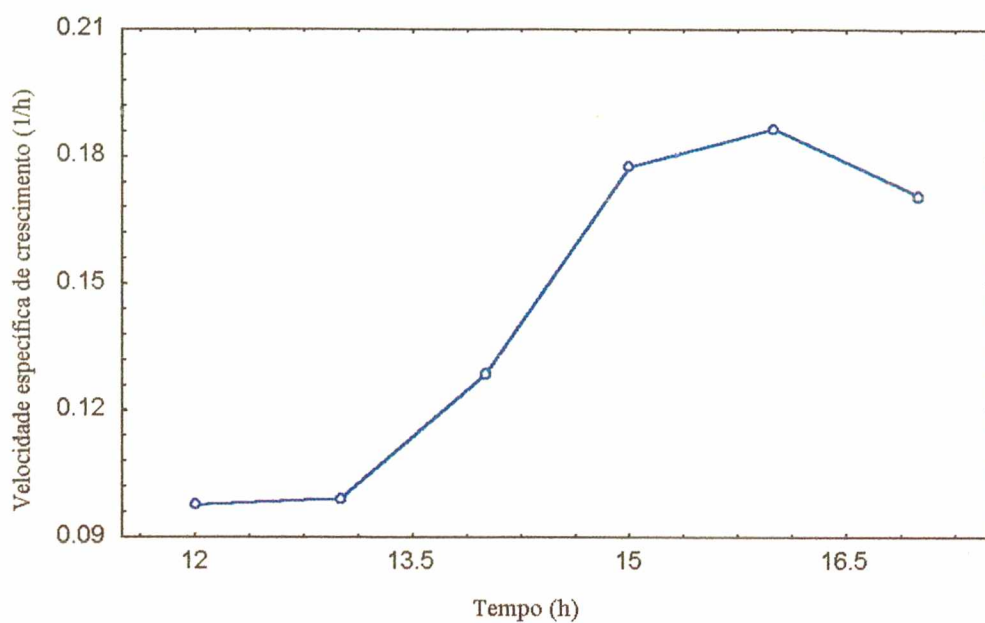


FIGURA IV.8 - Evolução da velocidade específica de crescimento sobre etanol, em fermentações em batelada.

IV.1.2. Determinação dos rendimentos

As figuras IV.9, IV.10 e IV.11 mostram a evolução do rendimento biomassa/substrato ($Y_{x/s}$) para as diferentes fermentações. O rendimento é praticamente constante ao longo do tempo e não varia de uma fermentação a outra, apresentando valores de, aproximadamente, 0,14 g de biomassa por g de glicose.

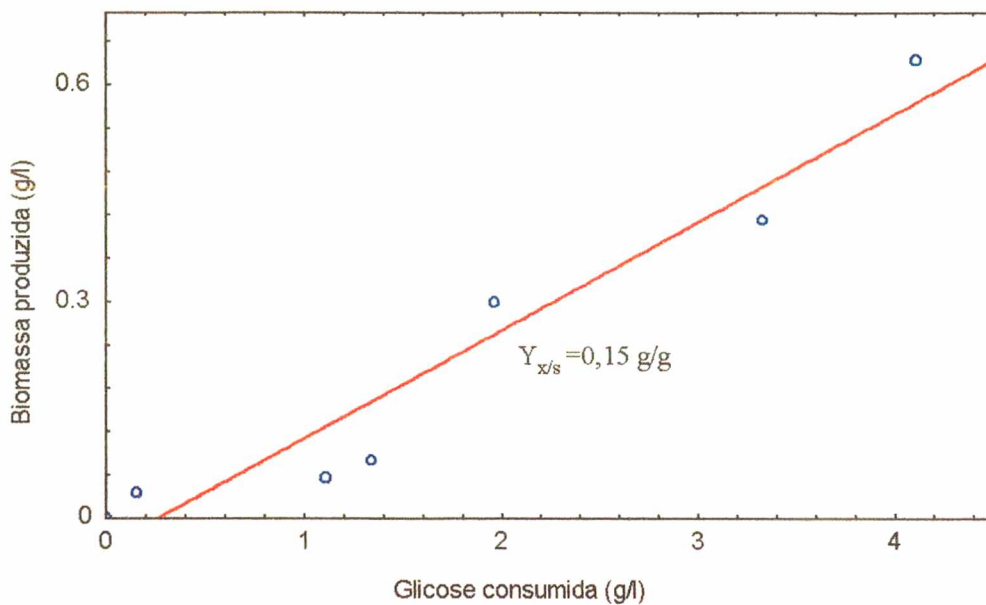


FIGURA IV.9 - Determinação do rendimento biomassa/glicose ($Y_{x/s}$) para uma fermentação batelada, à concentração inicial de glicose de 5 g/l.

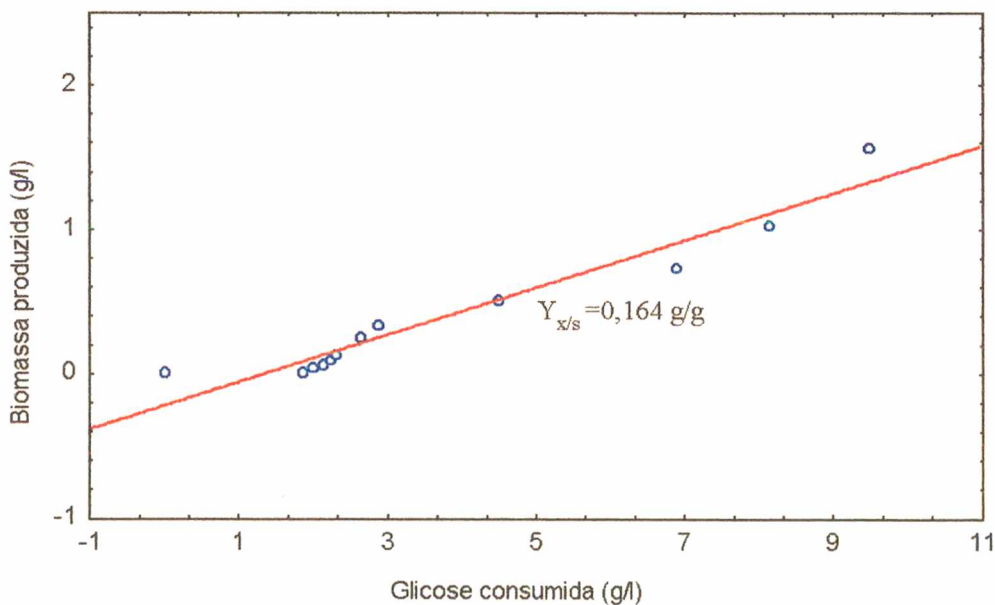


FIGURA IV.10 - Determinação do rendimento biomassa/glicose ($Y_{x/s}$) para uma fermentação batelada, à concentração inicial de glicose de 10 g/l.

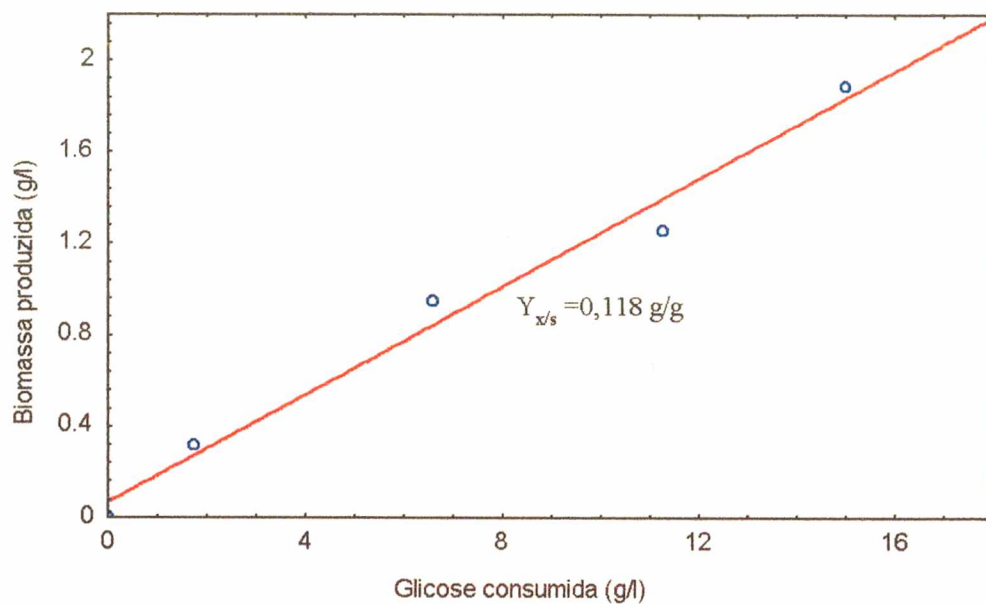


FIGURA IV.11 - Determinação do rendimento biomassa/glicose ($Y_{x/s}$) para uma fermentação batelada, à concentração inicial de glicose de 15 g/l.

Da mesma forma, pode-se verificar que o rendimento biomassa/etanol ($Y_{x/e}$) permanece praticamente constante para as três diferentes concentrações iniciais de glicose, a valores de, aproximadamente, 0,65 g de biomassa/ g de etanol consumido.

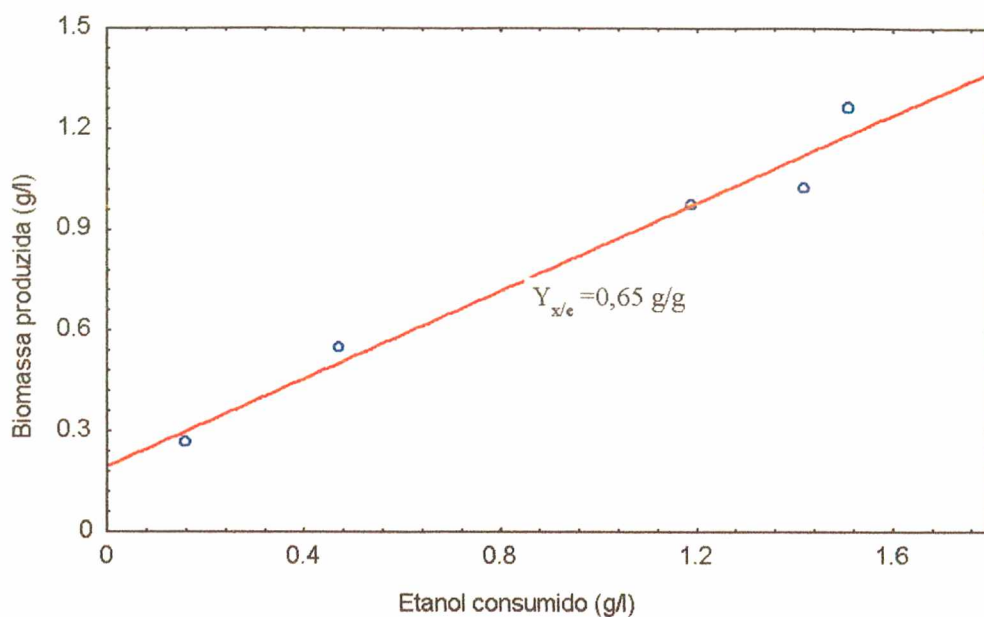


FIGURA IV.12 - Determinação do rendimento biomassa/etanol ($Y_{x/e}$) para uma fermentação batelada, à concentração inicial de glicose de 5 g/l.

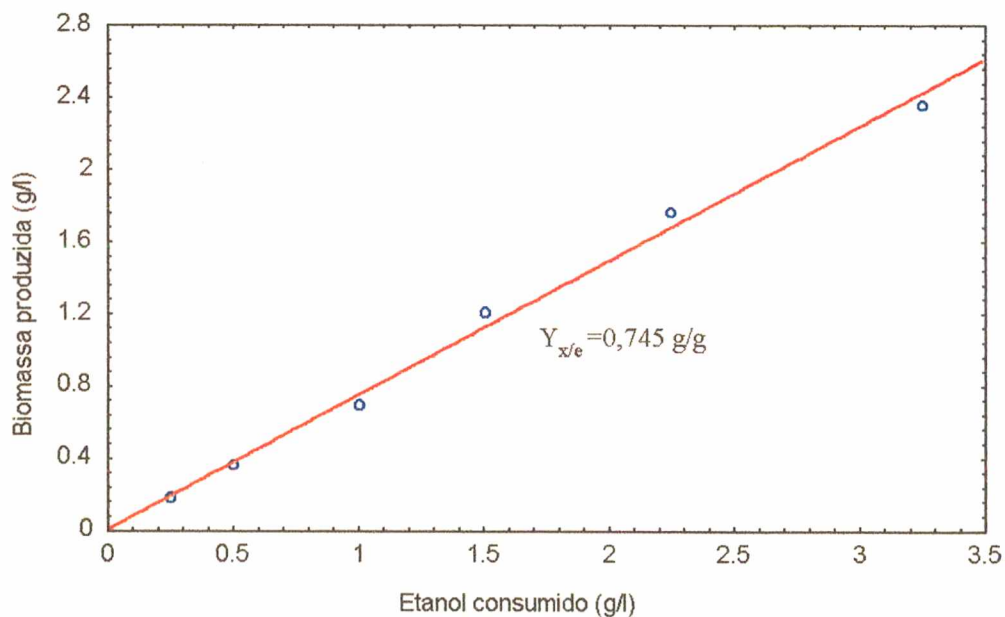


FIGURA IV.13 - Determinação do rendimento biomassa/etanol ($Y_{x/e}$) para uma fermentação batelada, à concentração inicial de glicose de 10 g/l.

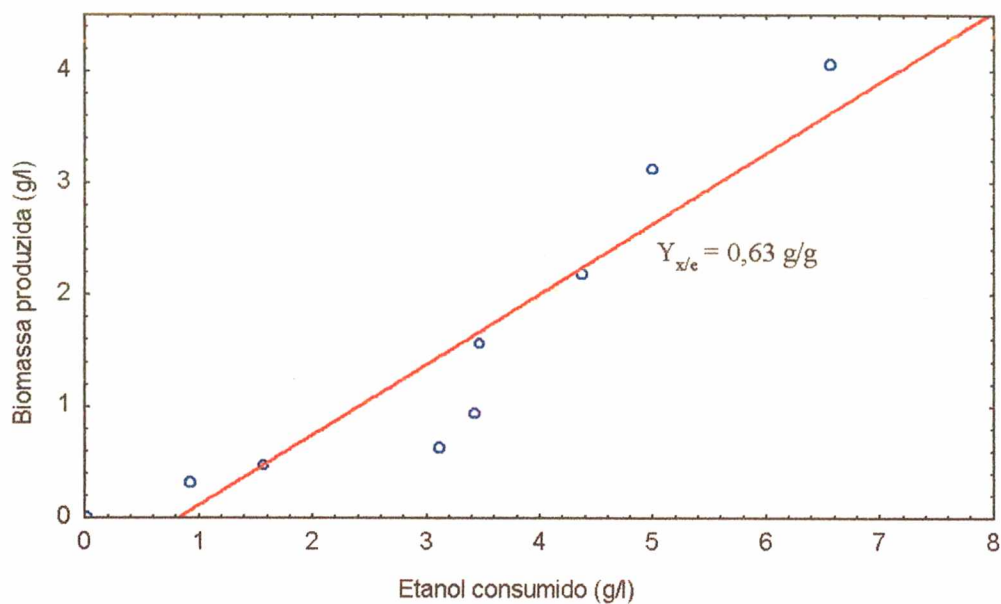


FIGURA IV.14 - Determinação do rendimento biomassa/etanol ($Y_{x/e}$) para uma fermentação batelada, à concentração inicial de glicose de 15 g/l.

Nas figuras IV.15 e IV.16 pode ser observada a evolução dos rendimentos biomassa/substrato ($Y_{x/s}$) e biomassa/etanol ($Y_{x/e}$) com o tempo, para o caso da fermentação realizada à 15 g/l de glicose inicial.

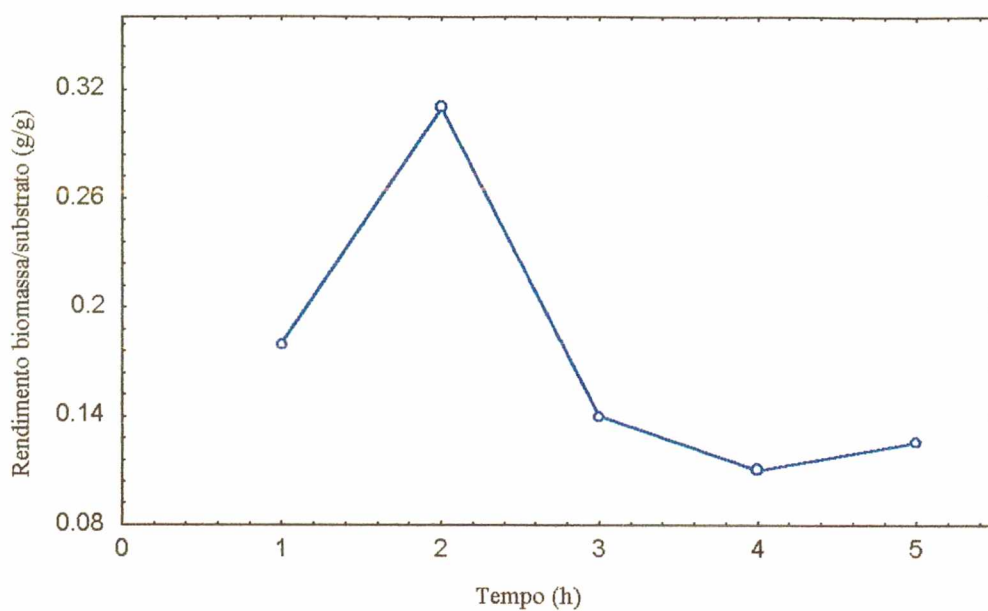


FIGURA IV.15 - Evolução do rendimento celular sobre glicose, em fermentações em batelada.

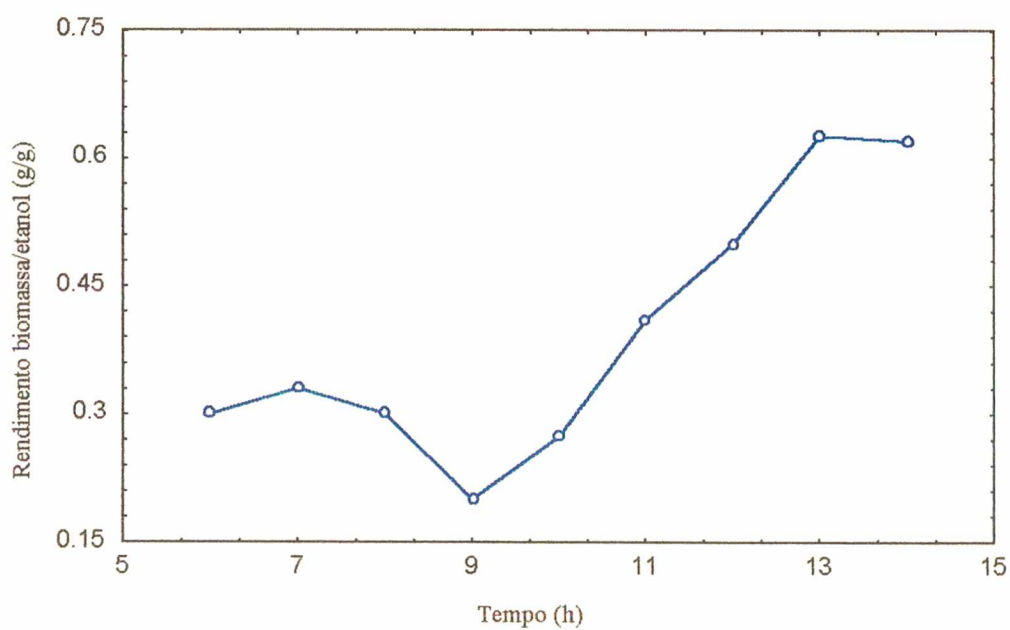


FIGURA IV.16 - Evolução do rendimento celular sobre etanol, em fermentações em batelada.

Da mesma forma que as velocidades específicas, os rendimentos biomassa/substrato e biomassa/etanol também variam com o tempo. Os gráficos acima mostram que o rendimento máximo biomassa/etanol (0,6 g/g) é bem maior que o rendimento máximo biomassa/substrato (0,31 g/g).

IV.1.3 - Efeito da concentração inicial de glicose sobre a velocidade específica de crescimento e o rendimento celular

Para pôr em evidência a importância do efeito inibidor do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* pela glicose foram realizadas fermentações variando a concentração inicial de glicose (Figuras IV.17 e IV.18).

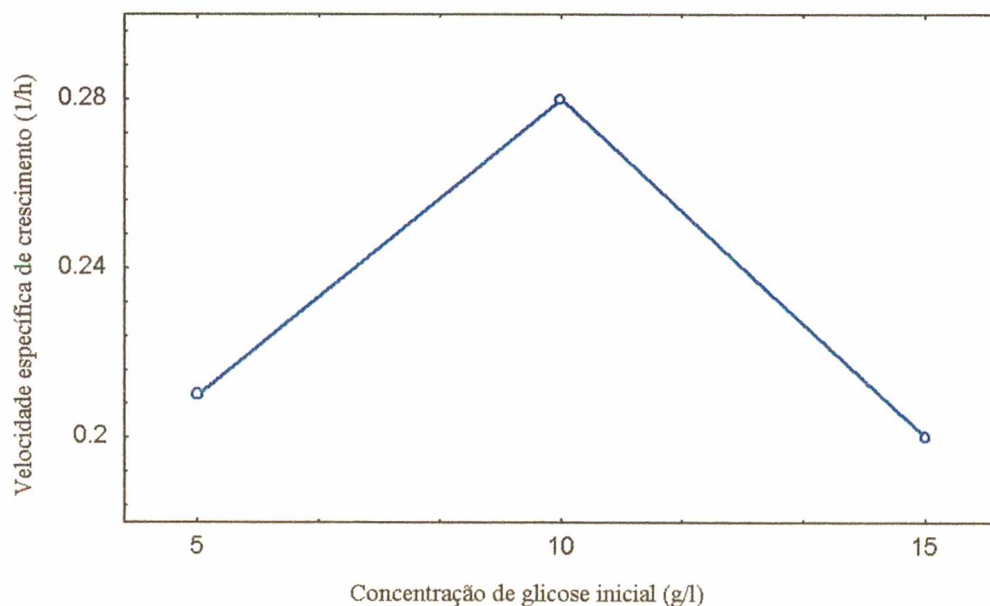


FIGURA IV.17 - Evolução da velocidade específica de crescimento em função da concentração inicial de glicose.

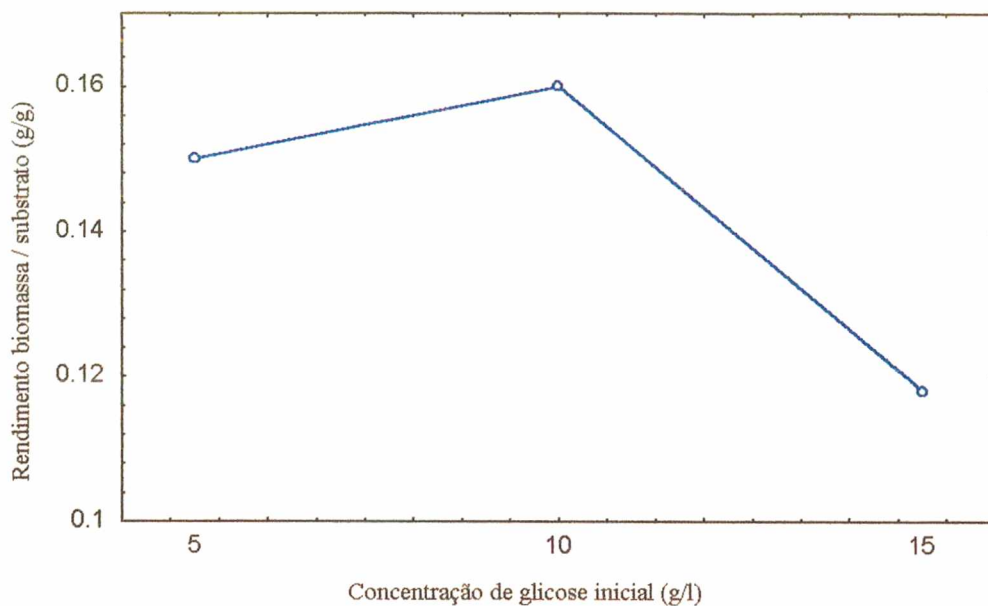


FIGURA IV.18 - Evolução do rendimento celular em função da concentração inicial da glicose.

De acordo com estas figuras, para as três concentrações iniciais de glicose utilizadas, observou-se que, à concentração inicial de 10 g/l, a velocidade específica de crescimento e o rendimento biomassa/substrato apresentaram valores mais elevados ($0,28 \text{ h}^{-1}$ e $0,16 \text{ g/g}$, respectivamente).

Contrariamente aos trabalhos de Ghoul (1985), Dantigny (1989) e Rajab (1993), não foi observado claramente o efeito inibidor da glicose. Estes autores concluíram que à medida que a concentração inicial de glicose aumenta, os valores destes parâmetros diminuem.

Como este não era o objetivo principal do trabalho, não foram estudadas mais a fundo as causas desta discordância. Sugere-se, aqui, um posterior trabalho que verifique estes resultados.

IV.2. FERMENTAÇÕES BATELADA ALIMENTADA

Uma vez conhecidos os principais parâmetros cinéticos da levedura, μ e $Y_{x/s}$, necessários para implementar a estratégia para a determinação da vazão de alimentação, foram realizados experimentos visando maximizar o rendimento do processo. Algumas variações foram feitas no processo de modo que pudessem ser determinadas as melhores condições de operação e, conseqüentemente, atender o objetivo fixado, de obter um rendimento biomassa / substrato na ordem de 0,5 g/g.

No decorrer das fermentações batelada alimentada foram determinados os valores da concentração de biomassa, de glicose residual no meio de fermentação e de etanol, este último em linha. São apresentadas, também, as variações do volume do reator com o tempo em cada uma das fermentações realizadas.

Os resultados demonstram que este objetivo foi alcançado, através de algumas manipulações no processo.

Serão descritas neste capítulo a influência de certas condições de operação no comportamento do processo.

As fermentações em batelada alimentada são realizadas à vazões pré-determinadas, neste caso, da forma:

$$F_{in} = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \cdot \frac{V}{S_{in}} \quad (III.8)$$

Um primeiro experimento foi realizado fazendo-se a alimentação do processo com uma solução de glicose à uma concentração de 150 g/l, sem a adição de sais, para verificar a necessidade destes. Os resultados obtidos neste experimento são mostrados nas Figuras IV.19, IV.20, IV.21 e IV.22.

A equação (III.8) foi utilizada para o cálculo da vazão de alimentação e o volume de glicose adicionado durante cada intervalo de tempo foi somado ao volume inicial do reator. Desta forma, foi possível mostrar a variação do volume do reator com o tempo. Pode-se observar (Figuras IV.19, IV.23, IV.27 e IV.31) que o perfil obtido segue um comportamento praticamente exponencial.

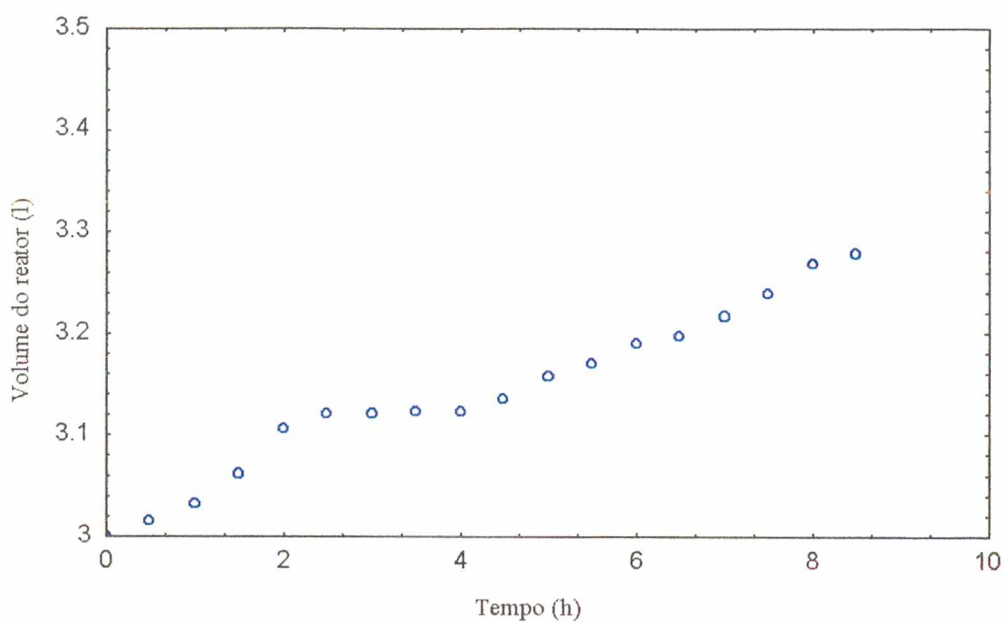


FIGURA IV.19 - Variação do volume no reator com o tempo.

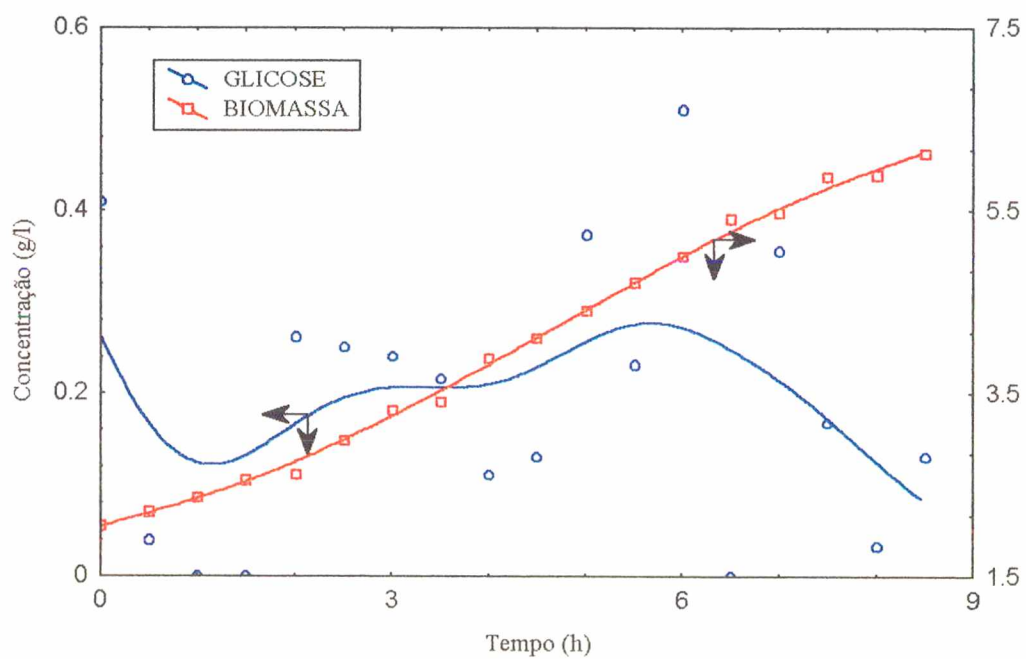


FIGURA IV.20 - Cinética de crescimento em batelada alimentada - Evolução da glicose e da biomassa.

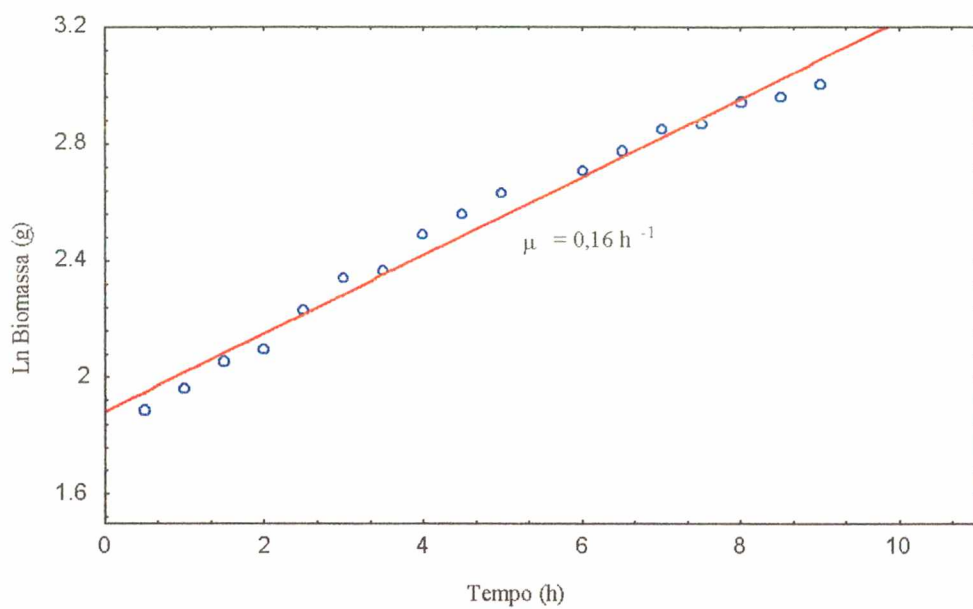


FIGURA IV.21 -Determinação da velocidade específica de crescimento.

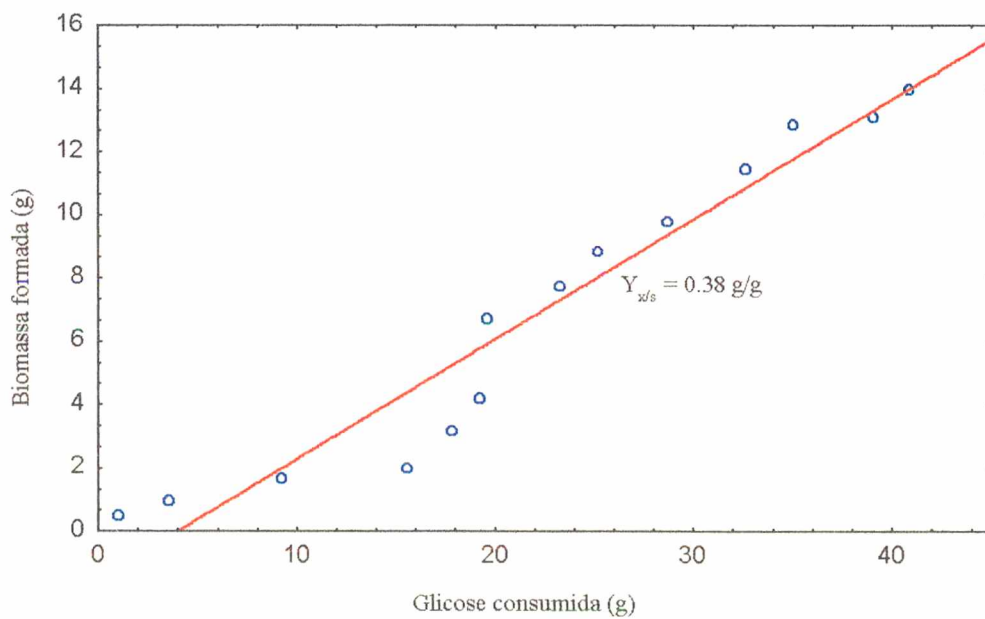


FIGURA IV.22- Determinação do rendimento biomassa / substrato.

Com base nas figuras acima pode ser verificado que o rendimento biomassa/substrato permaneceu praticamente constante, num valor médio de 0,38 g/g e a velocidade específica de crescimento próxima à 0,16 h⁻¹. Estes valores não satisfazem o objetivo pré-fixado de um valor de rendimento próximo à 0,5 g/g. Isto se deve, provavelmente, ao fato explicado no item III.3.1, em que os sais são fortemente consumidos pelas leveduras e desaparecem rapidamente do meio de fermentação, influenciando no rendimento do processo.

Um segundo experimento, utilizando solução de alimentação composta por glicose (150g/l) e sais, conforme descrito na Tabela III.1, foi realizado para se confirmar a influência destes sais no comportamento do processo.

Como pode ser verificado nas Figuras IV.23, IV.24 e IV.25 e IV.26, houve um aumento no rendimento, confirmando assim, a necessidade da presença destes sais no meio de fermentação para um maior crescimento das leveduras.

O rendimento global obtido neste experimento foi de 0,45 g de levedura por g de glicose consumida e a velocidade específica de crescimento foi de 0,131 h⁻¹.

Nestes dois primeiros experimentos, a glicose foi mantida em valores próximos ao valor crítico (0,1 - 0,5 g/l), mencionado anteriormente neste trabalho. Neste caso, não ocorreu a formação de etanol. Isto pode ser explicado pelo fato de a glicose adicionada ao meio ser utilizada apenas para a reprodução celular.

Um outro experimento foi realizado forçando-se o aparecimento de etanol, através da manutenção da concentração de glicose acima do valor crítico, fazendo com que esta seja usada para reprodução celular (metabolismo respiratório) e produção de etanol (metabolismo fermentativo), simultaneamente. A concentração de etanol foi mantida em valores baixos, tentando, assim, se evitar a inibição do crescimento pelo etanol. Com o aparecimento do etanol, pôde ser verificada que a concentração de glicose precisou estar em valores acima do valor crítico. O objetivo foi constatar a possibilidade de se trabalhar com concentração de glicose acima do valor estipulado como crítico, ou seja, procurar um limite superior na concentração de glicose, sem que haja inibição do crescimento.

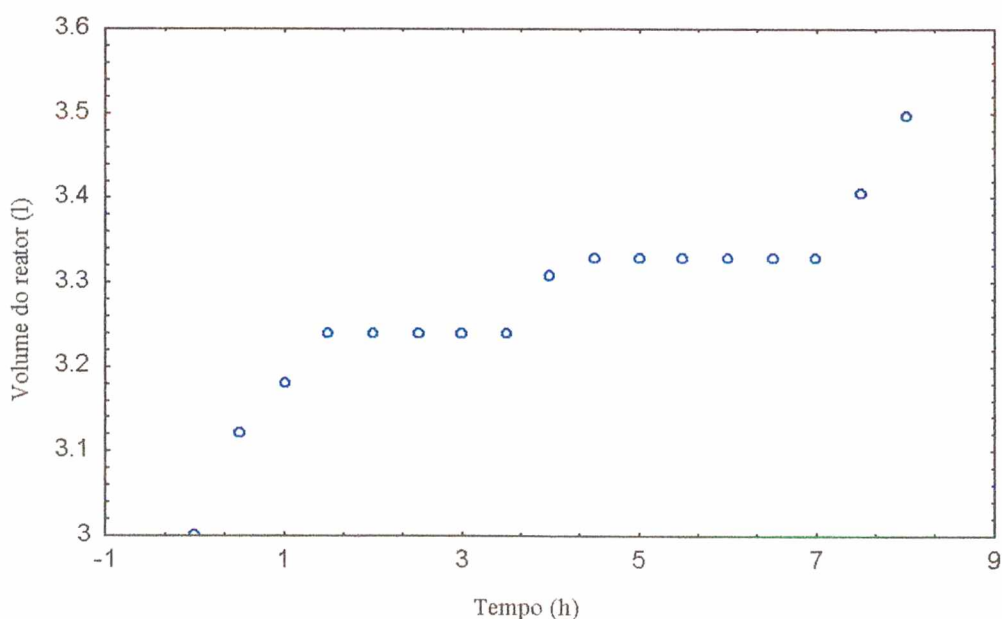


FIGURA IV.23 - Variação do volume do reator com o tempo.

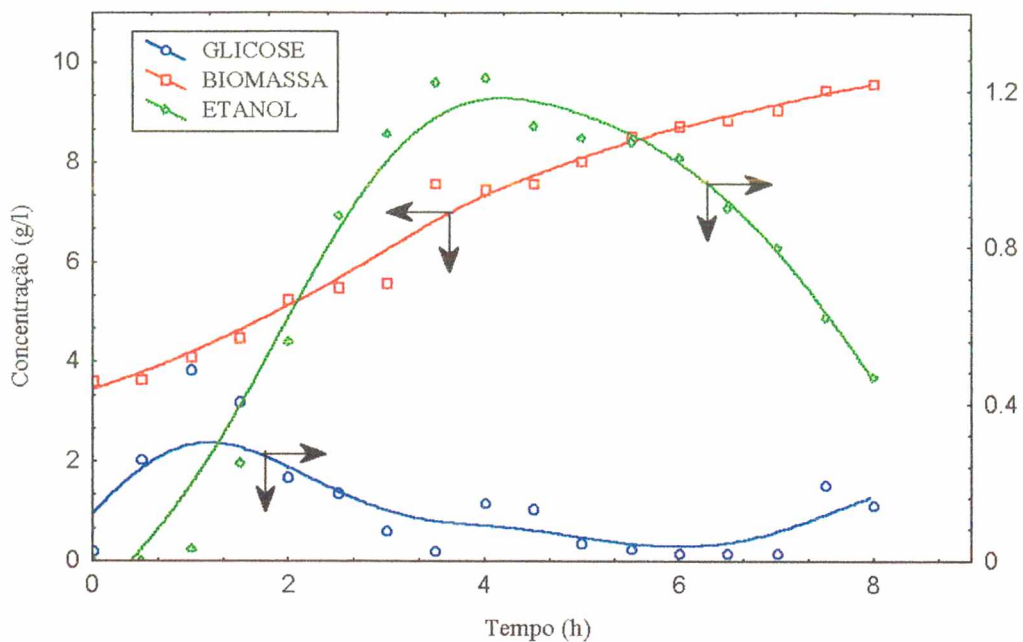


FIGURA IV.24 - Cinética de crescimento em batelada alimentada - Evolução da glicose, biomassa e etanol.

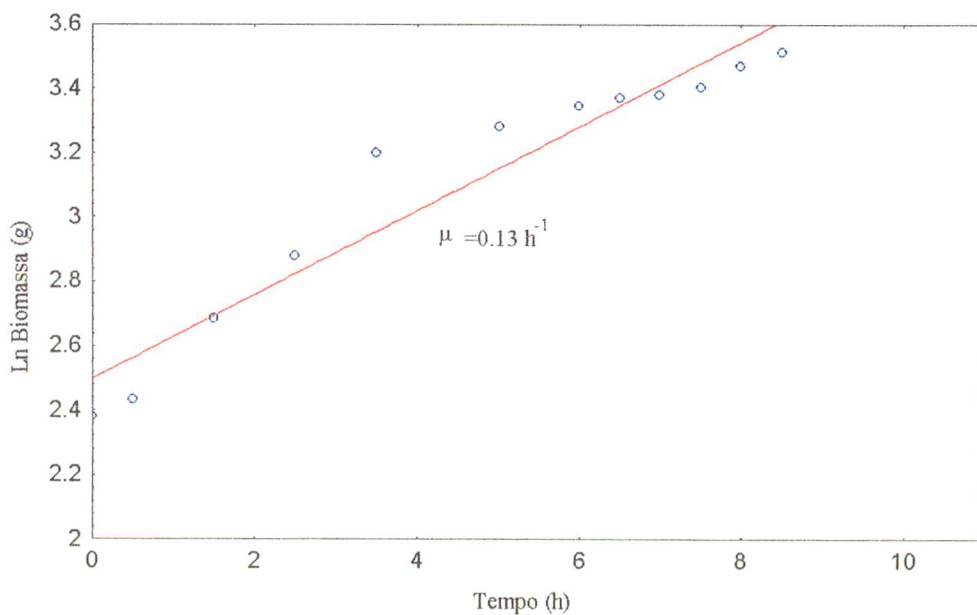


FIGURA IV.25 - Determinação da velocidade específica de crescimento.

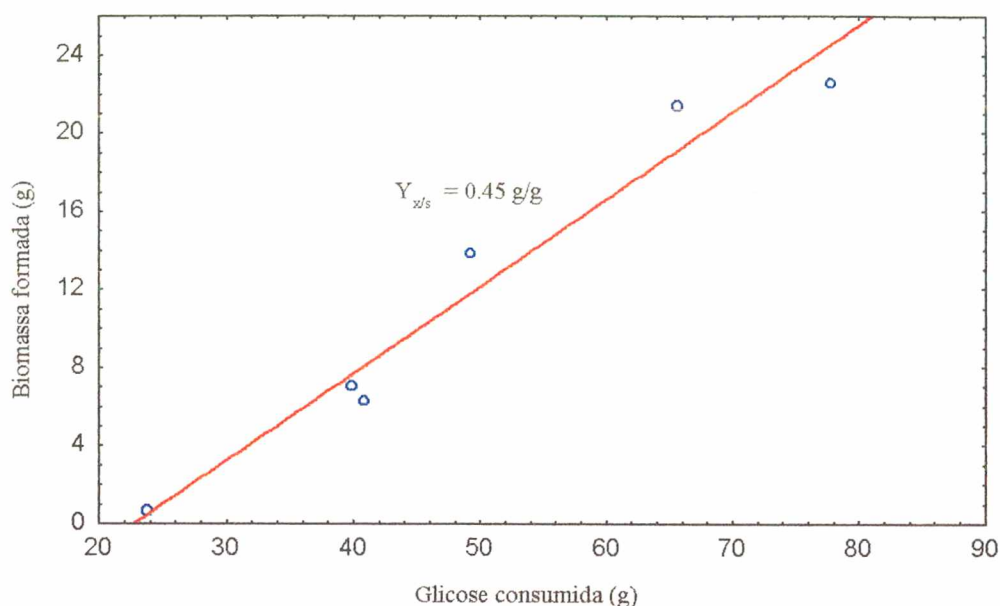


FIGURA IV.26 - Determinação do rendimento biomassa / substrato.

Os resultados obtidos para este experimento são mostrados nas Figuras IV.27, IV.28, IV.29 e IV.30. De acordo com os gráficos podemos verificar que o rendimento biomassa/substrato atingido durante o processo foi de 0,515 g/g, que, além de satisfazer nosso objetivo, nos permitiu concluir que, a concentração crítica de glicose a ser mantida durante o processo não é tão restrita, podendo haver oscilação, de modo a aumentar o rendimento do processo. Pôde-se concluir também que, o etanol, em baixas concentrações no meio de fermentação não age como inibidor. Com relação a este composto, um valor crítico (0,1 - 0,4 g/l) deve ser respeitado.

De acordo com estes resultados, foram realizadas algumas fermentações usando apenas o etanol como variável de observação e a vazão da solução de alimentação como variável manipulada. Neste caso, a concentração de etanol, medida em intervalos de 10 minutos, pôde ser

observada e mantida em valores baixos, pela manipulação da concentração de glicose. Desta forma, o sensor de compostos voláteis foi utilizado diretamente no controle do processo. A amostragem foi feita automaticamente e, paralelo a isto, foi obtida a concentração de etanol. A partir daí, foi tomada a decisão sobre a manipulação da vazão de alimentação. Se a concentração de etanol estava acima do crítico (0,1 - 0,5 g/l), por exemplo, uma parada na alimentação era realizada, até que as leveduras consumissem o etanol e, quando este retornava à faixa permitida, a vazão foi recalculada e se reiniciava a alimentação.

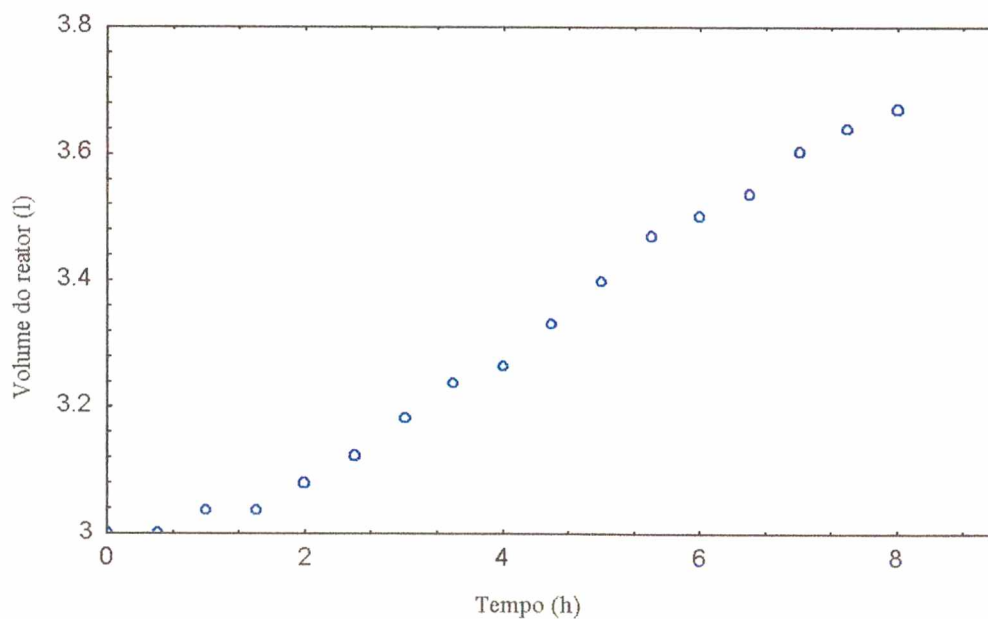


FIGURA IV.27 - Variação do volume do reator com o tempo.

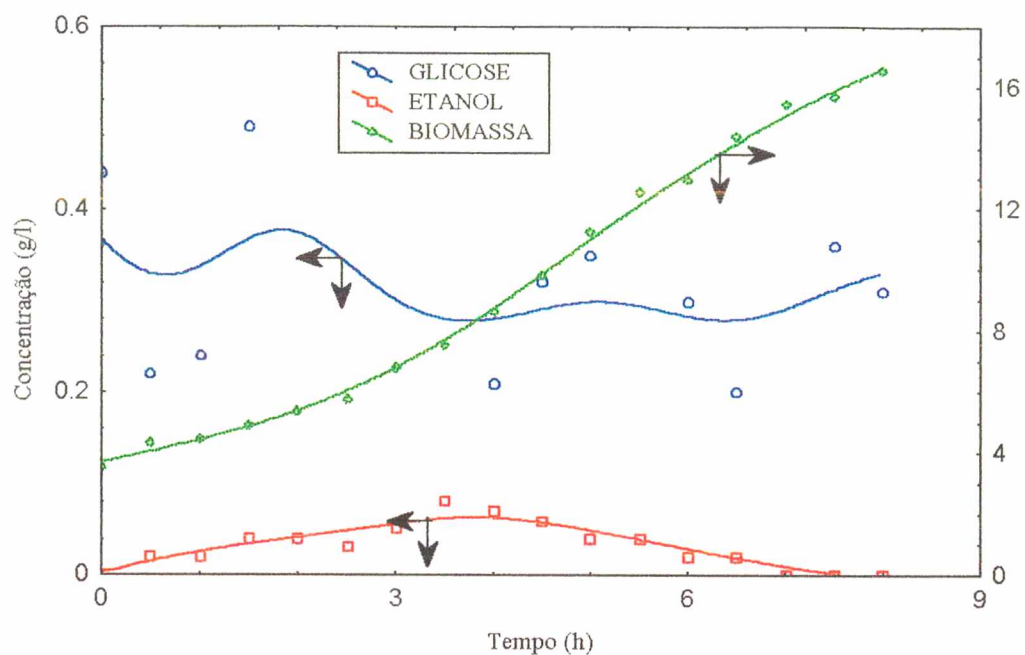


FIGURA IV.28 - Cinética de crescimento em batelada alimentada - Evolução da glicose, biomassa e etanol.

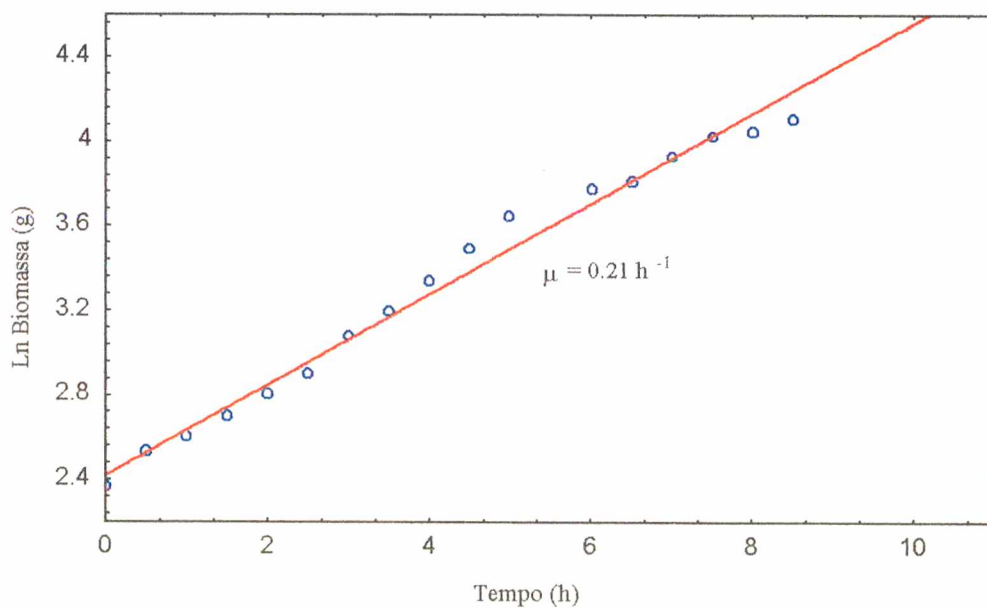


FIGURA IV.29 - Determinação da velocidade específica de crescimento.

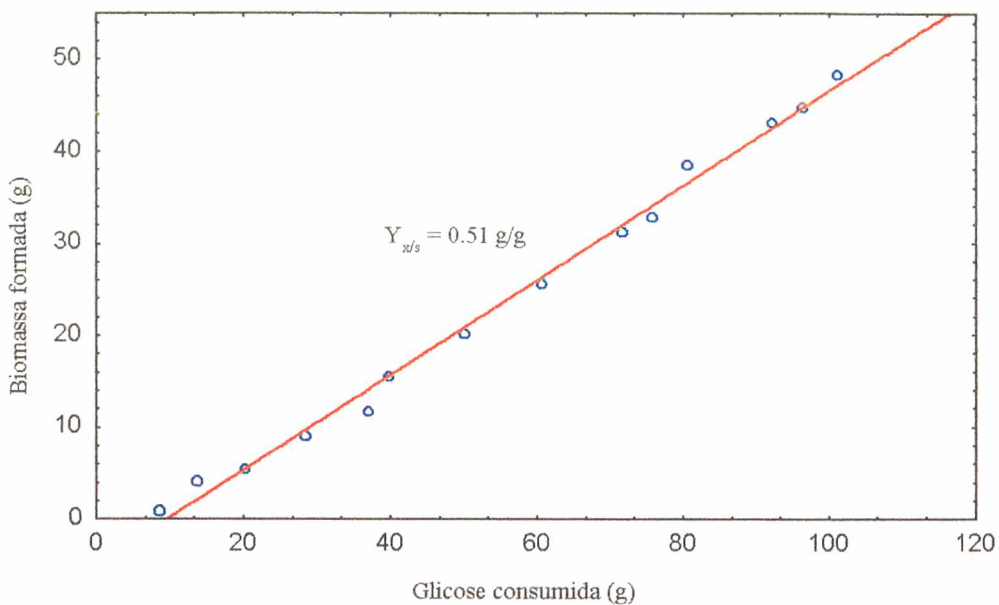


FIGURA IV.30 - Determinação do rendimento biomassa / substrato.

As Figuras IV.31, IV.32, IV.33 e IV.34 mostram que o rendimento biomassa/substrato permaneceu praticamente constante durante a fermentação, em valores bem próximos do estipulado anteriormente (0,5 g/g) e velocidades específicas de crescimento de $0,21 \text{ h}^{-1}$. A grande importância deste experimento foi a comprovação de que o etanol, em baixas concentrações no meio não é um inibidor do crescimento. Esta inibição só tem início quando a concentração de etanol ultrapassa ao valor crítico, entre 0,1 e 0,4 g/l.

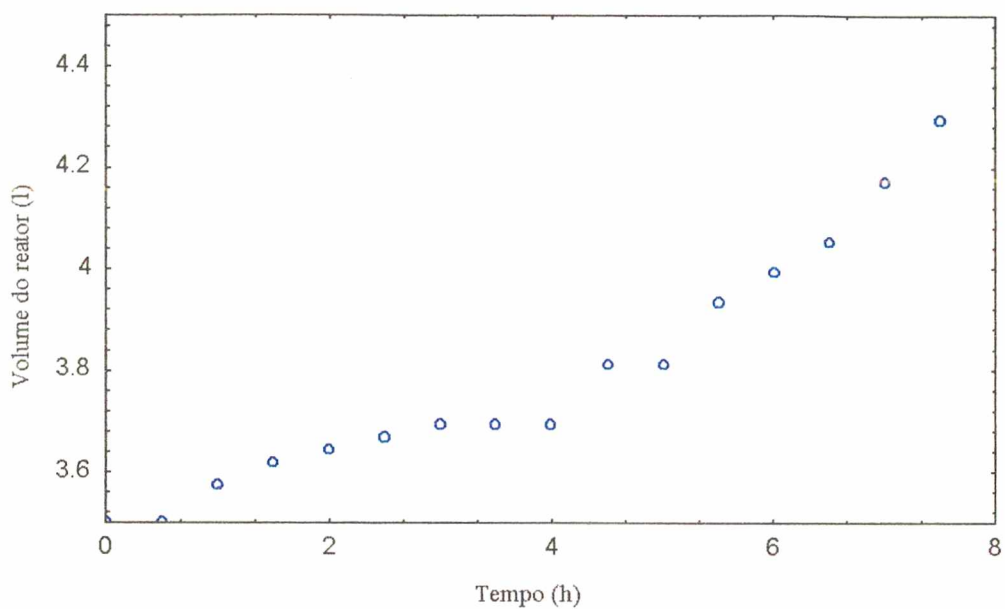


FIGURA IV.31 - Variação do volume do reator com o tempo.

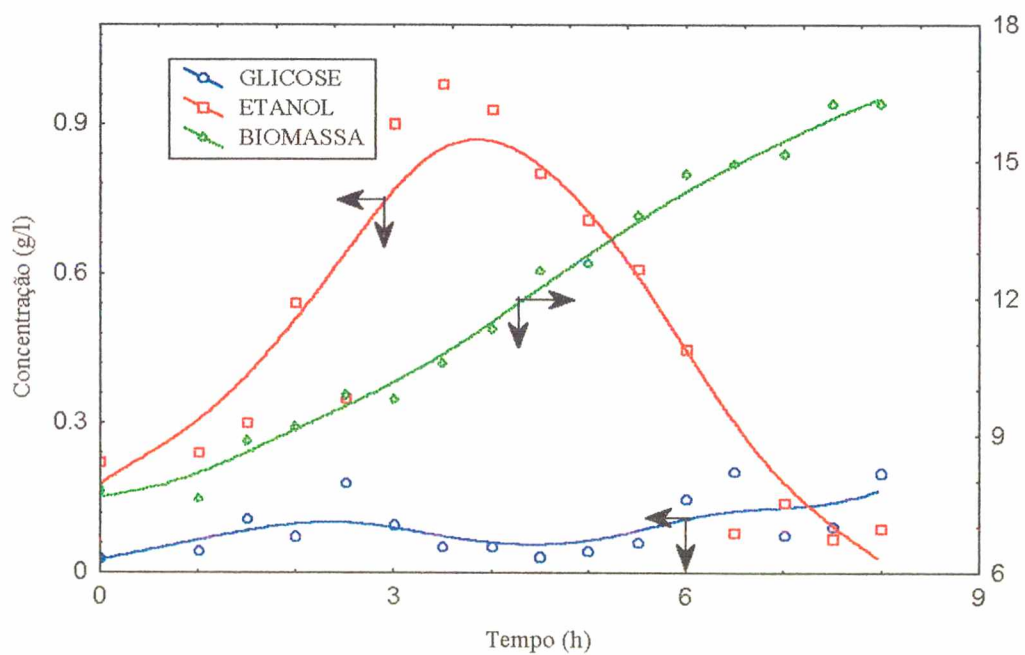


FIGURA IV.32 - Cinética de crescimento em batelada alimentada - Evolução da glicose, biomassa e etanol.

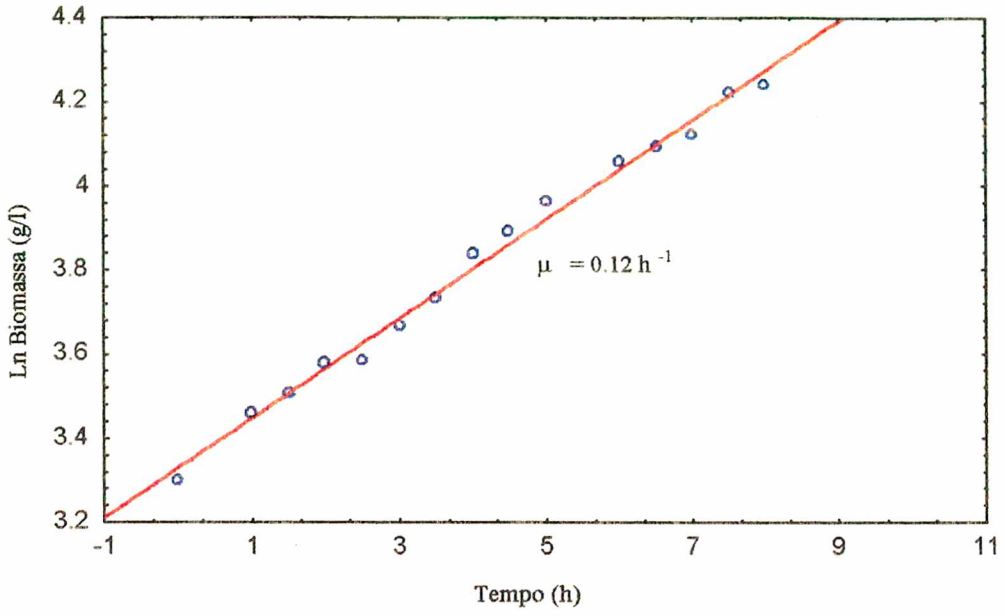


FIGURA IV.33 - Determinação da velocidade específica de crescimento.

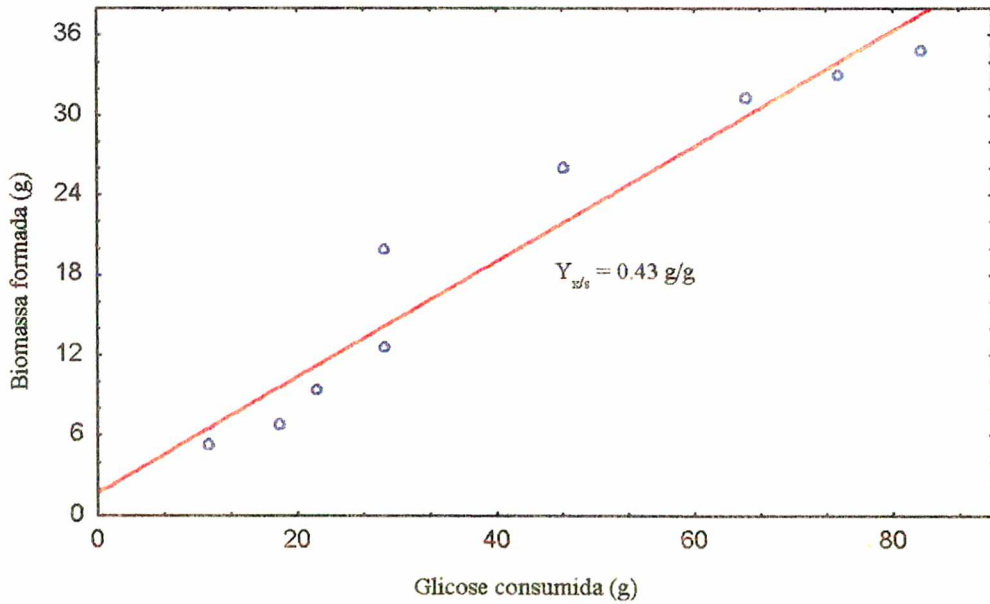


FIGURA IV.34 - Determinação do rendimento biomassa / substrato.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES

V.1 - Conclusões

O objetivo deste trabalho foi a maximização da produção de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), tendo glicose como principal fonte de carbono. Para isto, foram realizadas fermentações utilizando a técnica de cultivo em batelada alimentada. Anteriormente a isto, foi feito um estudo dos principais parâmetros cinéticos do microrganismo utilizado, através da realização de fermentações em batelada. Apesar destes resultados não confirmarem os da literatura, onde observa-se claramente uma diminuição da velocidade específica de crescimento e do rendimento biomassa/glicose com o aumento da concentração inicial de glicose, eles serviram de base para a quantificação da vazão de alimentação no processo batelada alimentada.

Além disso, foi de importância fundamental o emprego do sensor de produtos voláteis na dosagem "on line" do etanol produzido e/ou consumido durante o processo fermentativo. Os resultados fornecidos por este sensor possibilitaram estabelecer a estratégia de alimentação em substrato: A partir de um "set point" de etanol (concentração crítica - 0,4 g/l), mantinha-se ou interrompia-se a alimentação em substrato.

Mantidas estas condições, o processo atingiu o rendimento estipulado, de 0,5 g. de levedura / g. de substrato consumido.

V.2 - Sugestões para futuros trabalhos

Muito embora este trabalho tenha atingido resultados bastante promissores, isto representa apenas um começo, outros trabalhos deverão complementar o presente estudo, tais como:

* Estudo da influência da concentração inicial de glicose, em fermentações em batelada, utilizando valores intermediários aos determinados, bem como concentrações mais elevadas. Desta forma, o comportamento cinético da levedura seria mais bem definido.

* Utilização do mesmo procedimento adotado para as fermentações em batelada alimentada, substituindo o meio sintético por resíduos de feculárias, como substrato principal para o crescimento da levedura. Para isto, um estudo de hidrólise enzimática seria necessário, para converter o amido, presente em grande quantidade no resíduo, em glicose. A partir daí, poder-se-ia aproveitar este resíduo para produção de proteínas de organismos unicelulares.

* Implementação da estratégia de controle da fermentação em batelada alimentada, pela adaptação de uma bomba que permitisse a alimentação de substrato de forma exponencial com o tempo. Poder-se-ia, deste modo, trabalhar à velocidades específicas de crescimento constantes, ou seja, manter o crescimento exponencial com o tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S., HUMPHREY, A.E., MILLIS, N.F., Biochemical Engineering, Academic Press, 1973.
- AXELSSON, J.P., MANDENIUS, C.F., HOLST, O., HAGANDER, P., MATTIASSON, B., Experience in using an ethanol sensor to control molasses feed-rates in bakers yeast production. Bioproc. Eng., v.3; p.1-9, 1988.
- BECK, E., VAN MEYENBURG, H.K., Katabolit repression und der sprossunskzyclus van *Saccharomyces cerevisiae*. Zurich: E.T.H., 1969. Dissertação de mestrado. E.T.H., 1969.
- COONEY, C., KOPLOVE, M., HAGSTROM, M., Transient phenomena in continuous culture. Continuous culture of cells. v.1, CRC Press, 1981.
- DAIRAKU, K., YAMANE, T., Use of the porous teflon tubing methods to measure gaseous or volatile substances dissolved in fermentation liquids. Biotechnol. & Bioeng. v.21, p.1671-1676, 1979.
- DAIRAKU, K., YAMASAKI, K., SHIOYA, S., TAKAMATSU, T., Maximum production in a baker's yeast fed - batch culture by a tubing method. Biotechnol. & Bioeng. v.23, p.2069-2081, 1981.

DANTIGNY, Philippe. Cinétique, Modélisation de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* - Commandes non-linéaires de type L/A d'un procédé semi-continu. Nancy: INPL, 1989. p.221. Tese de doutorado. INPL, 1989.

GHOUL, Mohamed. Cinétique et conduite de fermentations de levures. Nancy: INPL, 1983. p.175. Tese de doutorado. INPL, 1983.

GROBOILLOT, Anne. Comparaison de capteurs à membrane gazeuse utilisant soit un chromatographe soit un spectromètre de masse. Nancy: INPL, 1989. p.189. Tese de doutorado. INPL, 1989.

HALL, R.J., BARFORD, J.P. *Biotechnol. & Bioeng.*, v.23, p.1763, 1981.

HUANG, S.Y., CHU, W.B. *Biotechnol. & Bioeng.*, v.23, p.1491, 1981.

LAGUNAS, R. *Biochim. & Biophys. ACTA* 440, p.661, 1976.

LANCELOT, L. Etude de la faisabilité d'un capteur à CO₂ dissous par perméation à travers une membrane; Influence du gaz vecteur sur la perméation de volatils à travers une membrane. Nancy: INPL, 1985. Tese de doutorado. INPL, 1985.

LEE, J.H., WOODARD, J.C., PAGAN, R.J., ROGERS, P.L. Evaluation of semi-conductor gas sensor for on line ethanol estimation. *Biotech. Lett.*, v.3, p.251-256, 1981.

LIEVENSE, J.C., LIM. H.C. Annual reports on fermentation processes, Academic Press, v.5, p.211, 1982 apud DANTIGNY, Philippe. Cinetique, Modelisation de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* - Commandes non-lineaires de type L/A d'un procede semi-continu. Nancy: INPL, 1989. p.221. Tese de doutorado. INPL, 1989.

MANDENIUS, C.F.,MATTIASON, B., AXELSSON, J.P., HARANDER,P., Control of an ethanol fermentation carried out with alginate entrapped *S. cerevisiae*. Biotechnol. & Bioeng., v.29, p. 941-949, 1987.

MARC, Ivan. Modelisation de la fermentation de la biere dans un reacteur cylindro-conique. Nancy: INPL, 1982. p.209. Tese de doutorado. INPL, 1982.

NAMBA, A., HIROTA, F., NAGAI, S., Micro computer-coupled baker's yeast production. J. Ferment. Technol., v.59, p.383-389, 1981.

NINOW, J.L. Proprietes de capteurs a membrane PTFE pour la detection de produits volatils. Application au suivi en ligne de procedes de fermentation. Nancy: INPL, 1989. p.141. Tese de doutorado. INPL, 1989.

NINOW, J.L. Desenvolvimento de um sensor "on-line" de produtos voláteis para o monitoramento e controle de processos fermentativos. Florianópolis: UFSC, 1994. p.120. Monografia. UFSC, 1994.

PHILIPPS, D.H., JOHNSON, M.J. Measurement of dissolved oxygen in fermentations. J. Biochem. Microbiol. Technol. & Eng., v.3, p.261-275, 1961.

PIRT, S.J. Principles of microbe and cultivation. Blackwell Scientific Publication, 1975

PONS, M.N., DUCOURET, P., ENGASSER, J.M., Mass transfer characteristics of hydrophobic tubing membrane sensors. *Biotechnol. Lett.*, v.8, p.407, 1986.

PUNHAR, E., GUERRA, L.H., LORENCEZ, I., FIECHTER, A., A combination of methods for the on line determination of alcohols in microbial cultures. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.9, p.227-233, 1980.

RAJAB, A. Modélisation et conduite automatique de la fermentation de *S. cerevisiae*. Nancy: INPL, 1986. Tese de doutorado. INPL, 1986.

ROGERS, P.L., STEWARD, T.R., *Arch. Mikrob.*, v.99, p.25, 1974 apud DANTIGNY, Philippe. Cinétique, Modelisation de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* - Commandes non-lineaires de type L/A d'un procede semi-continu. Nancy: INPL, 1989. p.221. Tese de doutorado. INPL, 1989.

SEVELY, Y., POURCIEL, J.B., *Colloque Soc. Fr. Microbiol.*, p.223-252, 1980 apud GHOUL, Mohamed. Cinétique et conduite de fermentations de levures. Nancy: INPL, 1983. p.175. Tese de doutorado. INPL, 1983.

SORRENTINO, F., VOILLEY, A., RICHON, D., *AIChE J.*, v.12, p.32, 1986 apud DANTIGNY, Philippe. Cinétique, Modelisation de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* -

Commandes non-lineaires de type L/A d'un procede semi-continu. Nancy: INPL, 1989. p.221.

Tese de doutorado. INPL, 1989.

STANBURY, P.F., WHITAKER, A., Principles of fermentation technology. New York: Pergamon Press, 1986. p.255.

SUZUKI, T., YAMANE, T., SHIMIZU, S. J. Ferment. Technol., v.64, p.317, 1986 apud

DANTIGNY, Philippe. Cinetique, Modelisation de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* -

Commandes non-lineaires de type L/A d'un procede semi-continu. Nancy: INPL, 1989. p.221.

Tese de doutorado. INPL, 1989.

SWEERE, A.P.J., MATLA, Y.A., ZANDVLIET, J., LUYBEN, K.A.M., KOSSEN, N.W.F.,

Appl. Microbiol. Biotechnol., v.28, p.109, 1988.

WILLIAMS, D., YOUSEFPOUR, T., WELLINGTON, E.M.H., Biotechnol. Bioeng., v.28,

p.631, 1986.

WU, W.T., CHEN, K.C., CHIOU, H.W., Biotechnol. Bioeng., v.27, p.756, 1985.

YAMANE, T., MATSUDA, E., Application of porous teflon tubing method to automatic fed-

batch culture of microorganisms: Mass transfer through porous teflon tubing. Biotechnol.

Bioeng., v.23, p.2493-2507, 1981.

YOSHIDA, F., YAMANE, T., NAKAMOTO, K., Fed-batch hydrocarbon fermentations with

colloidal emulsion feed. Biotechnol. Bioeng., v.15, p.257-270, 1973.

APÊNDICE A

APÊNDICE A

As tabelas listadas neste apêndice apresentam os valores experimentais de obtidos durante as fermentações em batelada e batelada alimentada, utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento, nas condições utilizadas.

TABELA A.1.1 - Dados experimentais para a fermentação em batelada com concentração inicial de glicose de 5 g/l.

Tempo (h)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	4,223	0,264	0
1	4,075	0,300	0
2	3,116	0,321	0
3	2,887	0,343	0
4	2,266	0,561	0,390
5	0,893	0,678	1,100
6	0,121	0,897	1,740
7	0,097	1,080	1,510
8	0,073	1,348	1,350
9	0,073	1,630	1,040
10	0,082	2,054	0,320
11	0,082	2,103	0,090
12	0	2,341	0

TABELA A.1.2 - Dados experimentais para a fermentação em batelada com concentração inicial de glicose de 10 g/l.

Tempo (h)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	9,500	0,0670	0
1	7,620	0,080	0,125
2	7,500	0,100	0,250
3	7,370	0,127	0,375
4	7,250	0,154	0,500
5	7,200	0,200	0,750
6	6,870	0,320	0,875
7	6,620	0,400	1,125
8	5,000	0,570	1,875
9	2,620	0,800	2,500
10	1,370	1,090	3,250
11	0	1,640	3,250
12	0	1,640	3,250
13	0	1,820	3,000
14	0	2,000	2,750
15	0	2,340	2,250
16	0	2,840	1,750
17	0	3,400	1,000
18	0	4,000	0

TABELA A.1.3 - Dados experimentais para a fermentação eb batelada com concentração inicial de glicose de 15 g/l.

Tempo (h)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	15,000	0,930	0,930
1	13,250	1,250	1,250
2	11,560	2,000	1,875
3	8,437	1,875	2,812
4	3,750	2,1875	4,687
5	0	2,812	6,560
6	0	2,821	6,530
7	0	3,125	5,625
8	0	3,280	5,000
9	0	3,437	3,437
10	0	3,750	3,125
11	0	4,375	2,812
12	0	5,000	2,187
13	0	5,940	1,562
14	0	6,870	0

TABELA A.1.4 - Dados experimentais obtidos na fermentação em batelada alimentada (Figuras IV.19, IV.20, IV.21 e IV.22).

Tempo (h)	Volume (l)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	3,000	0,410	2,052	0
0,5	3,014	0,040	2,191	0
1,0	3,032	0	2,342	0
1,5	3,062	0	2,545	0
2,0	3,107	0,262	2,608	0
2,5	3,122	0,251	2,985	0
3,0	3,122	0,241	3,322	0
3,5	3,122	0,215	3,396	0
4,0	3,122	0,112	3,872	0
4,5	3,136	0,130	4,092	0
5,0	3,157	0,373	4,403	0
5,5	3,171	0,232	4,717	0
6,0	3,189	0,510	5,002	0
6,5	3,198	0	5,415	0
7,0	3,218	0,355	5,464	0
7,5	3,238	0,168	5,857	0
8,0	3,268	0,032	5,894	0
8,5	3,278	0,131	6,132	0

TABELA A.1.5 - Dados experimentais para as fermentações em batelada alimentada (Figuras IV.23, IV.24, IV.25 e IV.26).

Tempo (h)	Volume (l)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	3,000	0,187	3,600	0
0,5	3,120	2,037	3,650	0
1,0	3,180	3,840	4,090	0,030
1,5	3,240	3,196	4,480	0,250
2,0	3,240	1,680	5,260	0,560
2,5	3,240	1,380	5,490	0,880
3,0	3,240	0,590	5,570	1,090
3,5	3,240	0,210	7,570	1,220
4,0	3,306	1,150	7,450	1,230
4,5	3,328	1,028	7,560	1,110
5,0	3,328	0,380	7,990	1,080
5,5	3,328	0,230	8,540	1,070
6,0	3,328	0,160	8,740	1,030
6,5	3,328	0,170	8,830	0,900
7,0	3,328	0,170	9,040	0,800
7,5	3,406	1,520	9,440	0,620
8,0	3,496	1,120	9,550	0,470

TABELA A.1.6 - Dados experimentais para as fermentações em batelada alimentada (Figuras IV.27, IV.28, IV.29 e IV.30).

Tempo (h)	Volume (l)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	3,000	0,440	3,550	0
0,5	3,000	0,220	4,300	0,020
1,0	3,036	0,240	4,420	0,020
1,5	3,036	0,490	4,910	0,040
2,0	3,080	0,810	5,380	0,040
2,5	3,124	0,730	5,780	0,030
3,0	3,180	0,640	6,790	0,050
3,5	3,236	0,700	7,510	0,080
4,0	3,264	0,210	8,620	0,070
4,5	3,332	0,320	9,830	0,060
5,0	3,400	0,350	11,230	0,040
5,5	3,468	0,580	12,600	0,040
6,0	3,502	0,300	12,940	0,020
6,5	3,536	0,200	14,420	0,020
7,0	3,604	0,590	15,460	0
7,5	3,638	0,360	15,730	0
8,0	3,672	0,310	16,540	0

TABELA A.1.7 - Dados experimentais para as fermentações em batelada alimentada (Figuras

IV.31, IV.32, IV.33 e IV.34).

Tempo (h)	Volume (l)	Glicose (g/l)	Biomassa (g/l)	Etanol (g/l)
0	3,500	0,027	7,780	0,220
1,0	3,500	0,043	7,600	0,240
1,5	3,572	0,107	8,900	0,300
2,0	3,620	0,074	9,190	0,540
2,5	3,644	0,180	9,880	0,350
3,0	3,668	0,097	9,800	0,900
3,5	3,692	0,054	10,600	0,980
4,0	3,692	0,054	11,320	0,930
4,5	3,692	0,033	12,580	0,800
5,0	3,812	0,045	12,770	0,710
5,5	3,812	0,060	13,800	0,610
6,0	3,932	0,147	14,710	0,450
6,5	3,992	0,204	14,930	0,080
7,0	4,052	0,077	15,160	0,140
7,5	4,172	0,094	16,270	0,070
8,0	4,292	0,200	16,240	0,090

TABELA A.1.8 - Parâmetros cinéticos obtidos para as fermentações em batelada alimentada.

Experimento	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$
SEM SAIS	0.16	0.38
COM SAIS SEM CONTROLE [ETANOL]	0.13	0.45
COM SAIS COM CONTROLE [ETANOL]	0.21	0.51