



25 ANOS DE FERMENTAÇÃO O QUE APRENDEMOS??

Silvio Roberto Andrietta

BioContal
Tecnologia em Bioprocesso

Fermentação



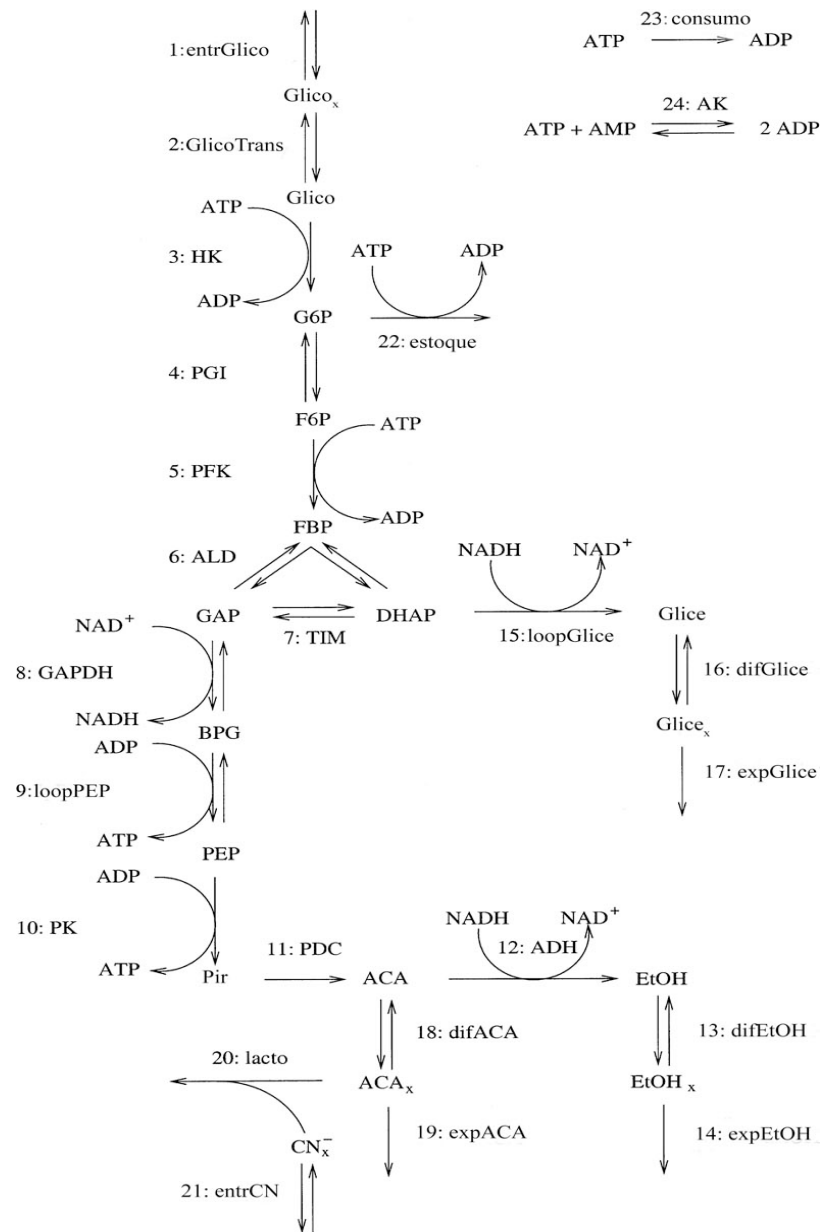
- Definição
 - Todo o processo metabólico ocorrido em anaerobiose que fornece como produto um derivado do piruvato, cuja síntese gera uma molécula de NAD

Entendendo o funcionamento da levedura

- Porque a levedura faz álcool?
 - Obtenção de energia
 - Trabalho químico (síntese de moléculas)
 - Trabalho de transporte (nutrientes e íons pela membrana)
- Onde é gerada a energia?
 - Na glicólise até a formação de piruvato
- Quanto gera de energia a produção de glicerol e etanol?
 - Nada

Entendendo o funcionamento da levedura

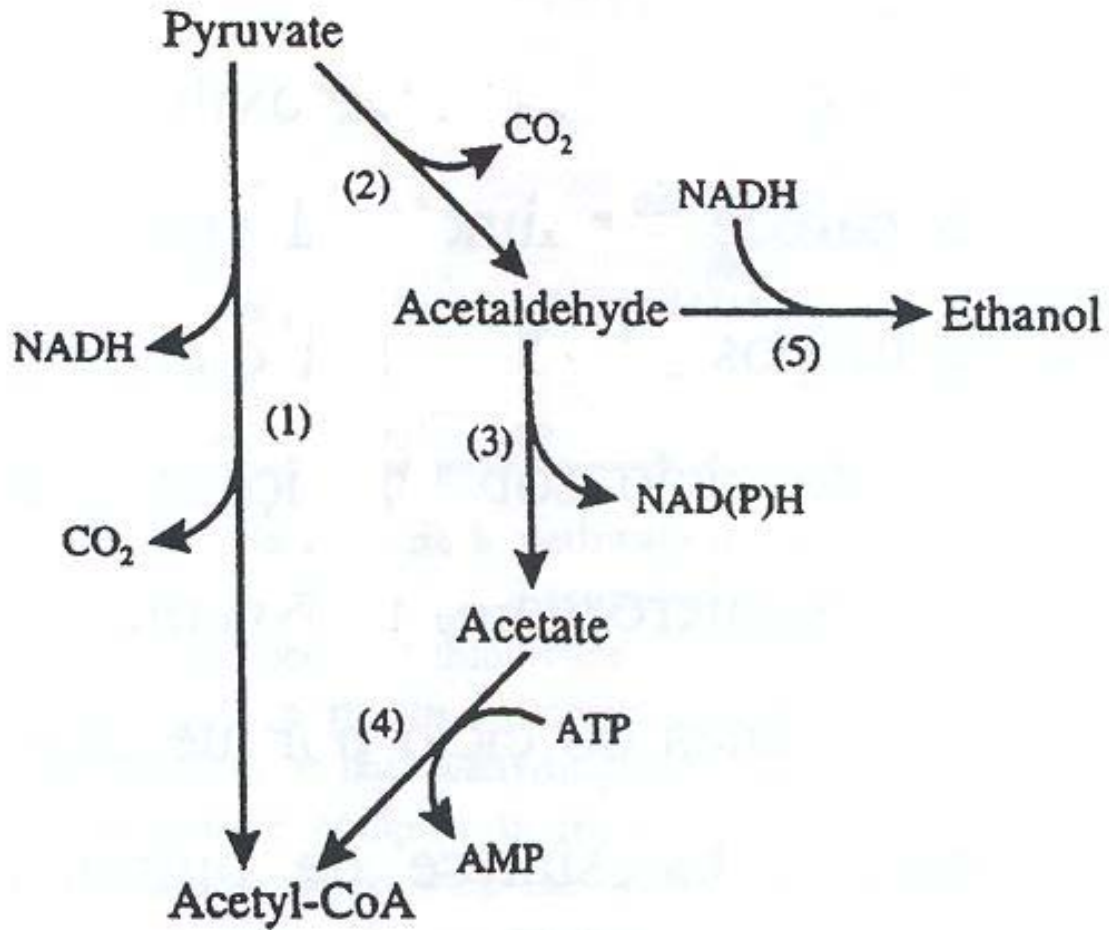
- Sabendo-se que a levedura é extremamente inteligente e esperta, pergunta-se: Porque a levedura produz estes produtos?
 - Para regenerar o NAD usado na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato na glicose
 - Sem estas rotas a levedura morreria em anaerobiose
- Produção de glicerol
 - Varia de acordo com a necessidade de NAD



Produção de Biomassa



- Levedura – Microrganismo facultativo
 - Aerobiose
 - Limitação de glicose – Crescimento puramente oxidativo – Produto $\text{CO}_2 + \text{Água} + \text{Energia } 38 \text{ ATP}$
 - Glicose não limitada – Crescimento oxido-redutivo – Produção de etanol – Efeito Crabtree
 - Inibição de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (2 ATP)
 - Saturação da rota da piruvato desidrogenase (não definido)
 - Anaerobiose
 - Processo oxido-redutivo – Produção de etanol, glicerol, acetatos, succinatos e outros e energia 2 ATP



Produção de Biomassa



- Crescimento puramente oxidativo (aeróbico)
 - Energia obtida 38 ATP
 - Rendimento em células $Y_{x/s} = 0,5 \text{ gMS/gART}$
- Crescimento oxido-redutivo (reprimido ou anaeróbico)
 - Energia obtida 2 ATP
 - Rendimento em células $Y_{x/s} = 0,03 \text{ gMS/gART}$

Produção de Biomassa



- A produção de biomassa está vinculada à produção de etanol?
 - A levedura produz álcool para obter energia em anaerobiose
 - Produz energia para usar uma parte na síntese de moléculas (reprodução e manutenção)
 - Então a levedura produz álcool para se reproduzir e manter-se viva
 - Produção de etanol vinculada ao crescimento

BioCentral

Tecnologia em Bioprocesso

Produção de biomassa

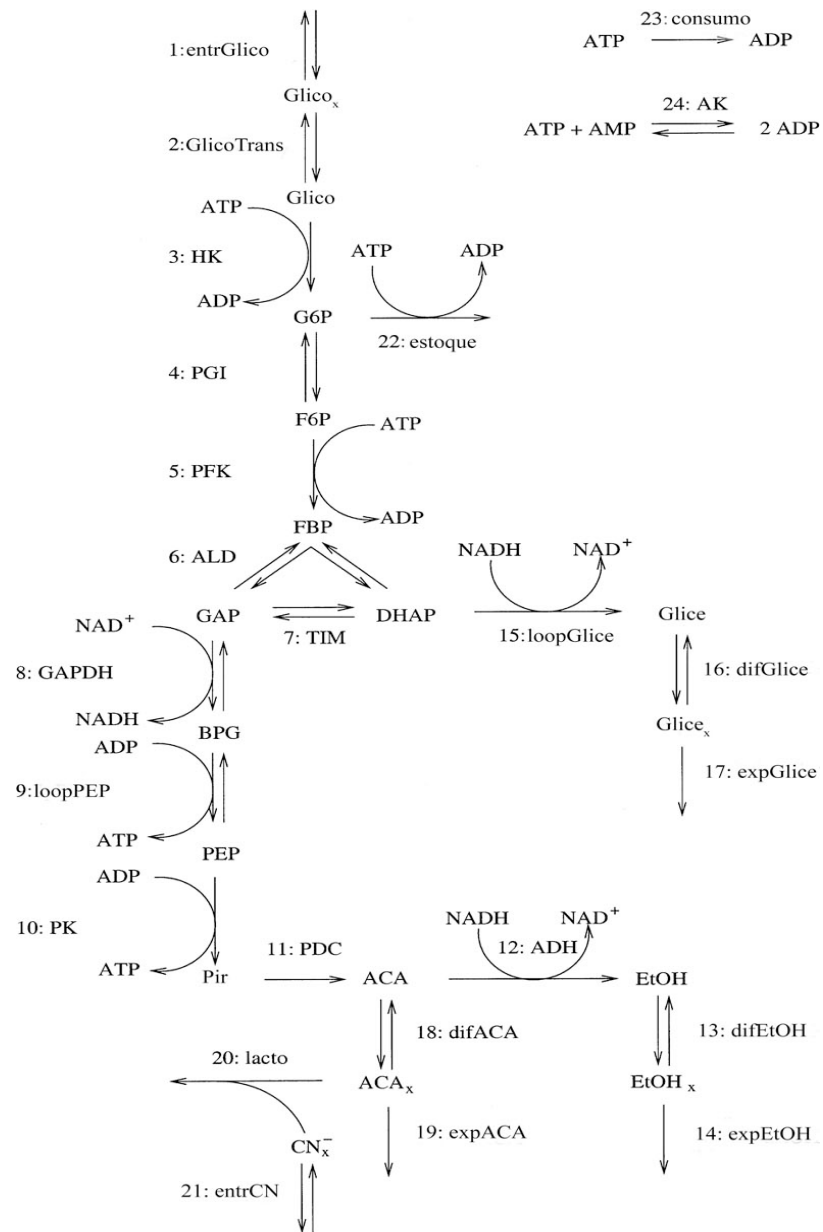


- A quantidade de energia obtida pela levedura interfere na quantidade de massa obtida?
 - Aerobiose com processo puramente oxidativo
 - Energia – 38 ATP
 - Rendimento em massa – 0,5 g MS/gART
 - Aeróbico reprimido ou anaeróbico – Processo oxido-redutivo
 - Energia – 2 ATP
 - Rendimento em massa – 0,03 g MS/ g ART

Produção de Biomassa



- O rendimento em massa em anaerobiose varia de uma linhagem para outra?
 - Sim, em teste laboratório de 0,035 até 0,05 g/g
- Mas se energia obtida por molécula de Glicose consumida é igual, como pode variar a produção de massa?
 - Na glicólise temos 2 ATP. Na glicolise não geramos glicerol e outros produtos. Portanto não sabemos se a energia gerada é igual para todas as cepas (2 ATP)
 - A composição da biomassa produzida não é constante



Produção de Biomassa



- Fatores que interferem na produção de biomassa no processo fermentativo
 - Forma de crescimento
 - Eficiência da linhagem na obtenção de energia
 - Composição de biomassa obtida
 - Características nutricionais do meio fermentativo
 - Condições de cultivo

Produção de Biomassa



- Problema
 - Rendimento subproduto diminui quando descarta massa de células
 - Não descartar célula provoca uma série de problemas operacionais
- Quando tem-se mais células excedentes?
 - Em fermentações saudáveis
 - Ou seja menor rendimento em processos mais saudáveis (**da para acreditar**)

BioBontal

Tecnologia em Bioprocesso

%F Dorna	% F Creme	% F Vinho Centrifugado	Vazão de vinho	Vazão Creme	Vazão vinho centrifugado
10	70	0.5	100	13.67	86.33
20	70	0.5	100	28.06	71.94
10	40	0.5	100	24.06	75.94

Produção de Biomassa

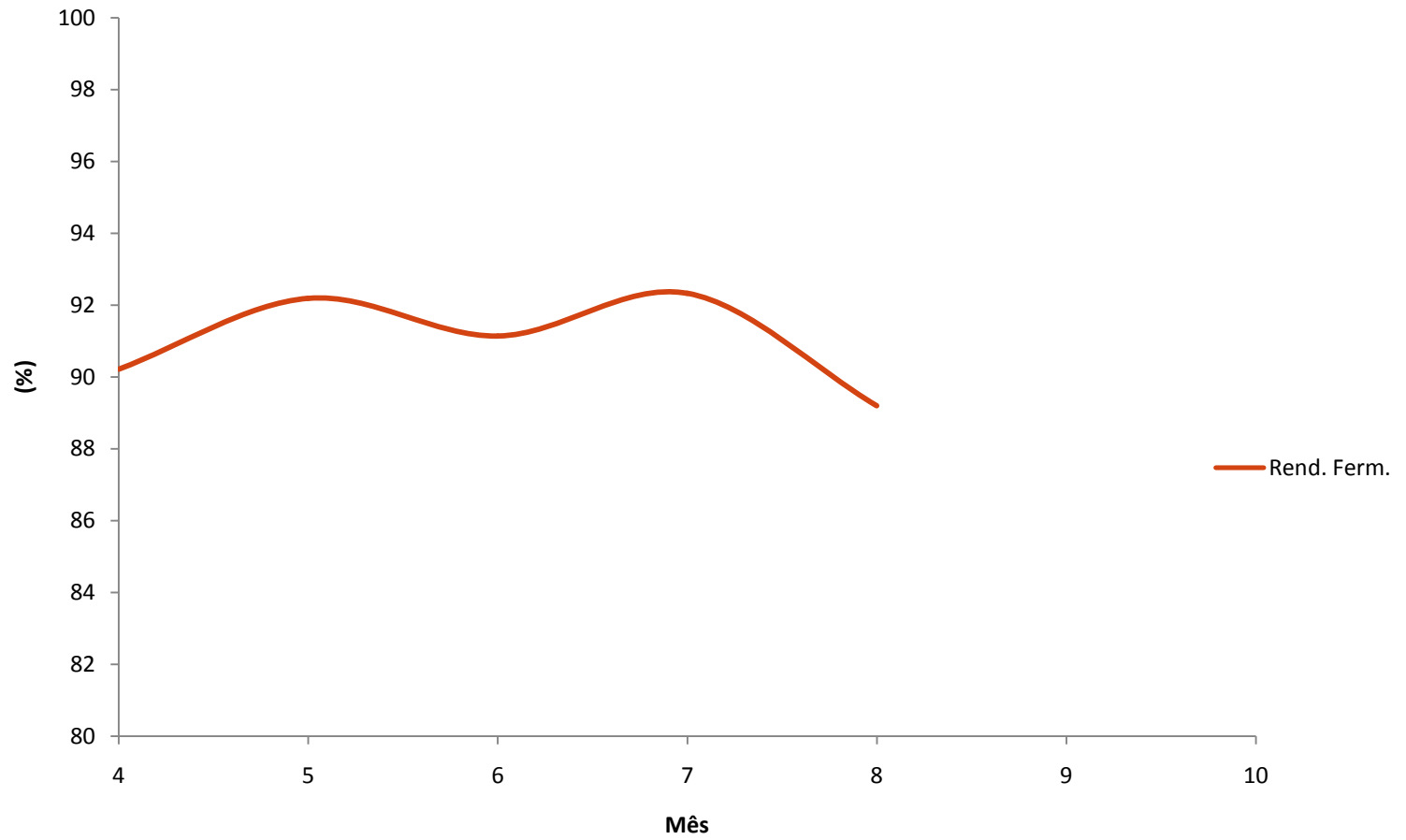


- Como contornar o problema?
 - Rendimento fermentativo por balanço de massa
 - Utilizando o álcool realmente produzido
 - Utilizando o álcool perdido vinhaça
 - Utilizando o álcool em processo (somente das dornas cubas e volante)
 - Utilizando o volume de mosto (medidor de vazão)
 - Utilizando a concentração de ART do mosto

BioContal

Tecnologia em Bioprocesso

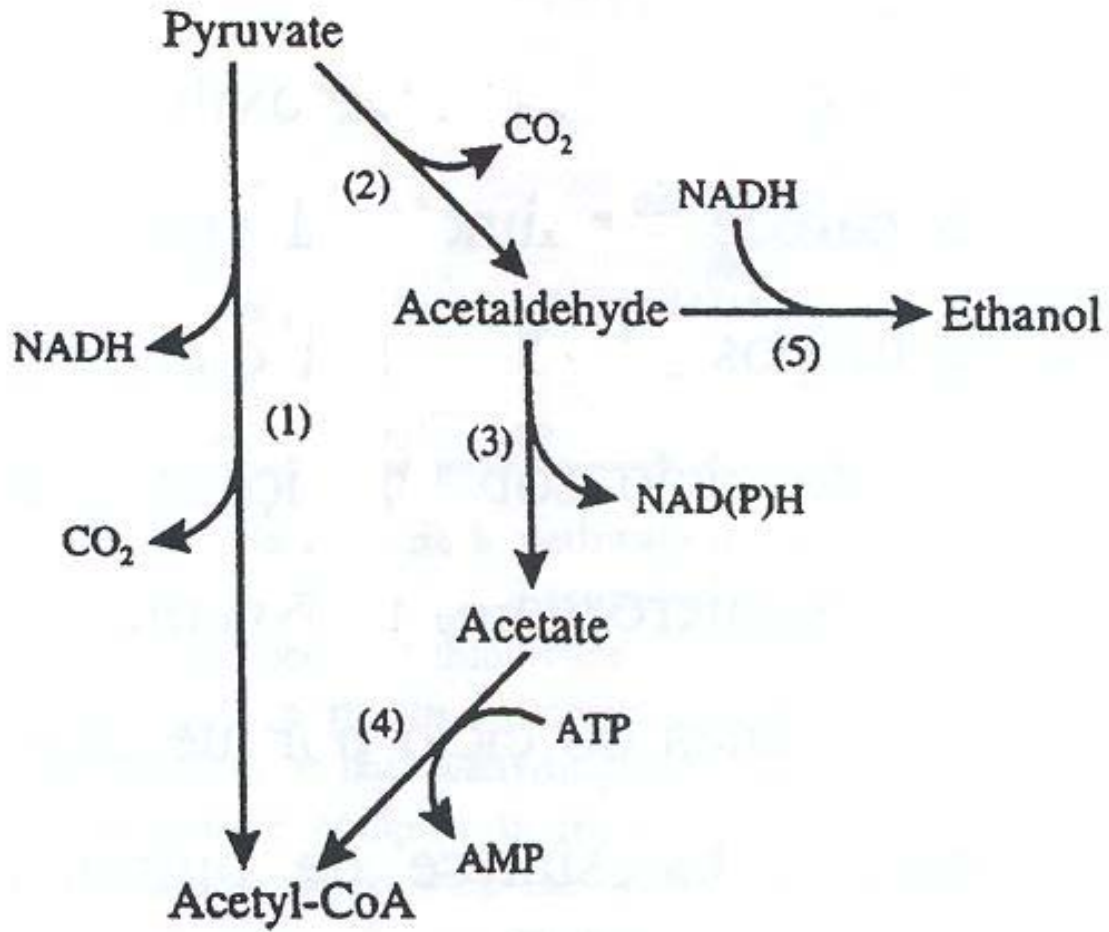
Rend. Ferm.



Produção de Biomassa



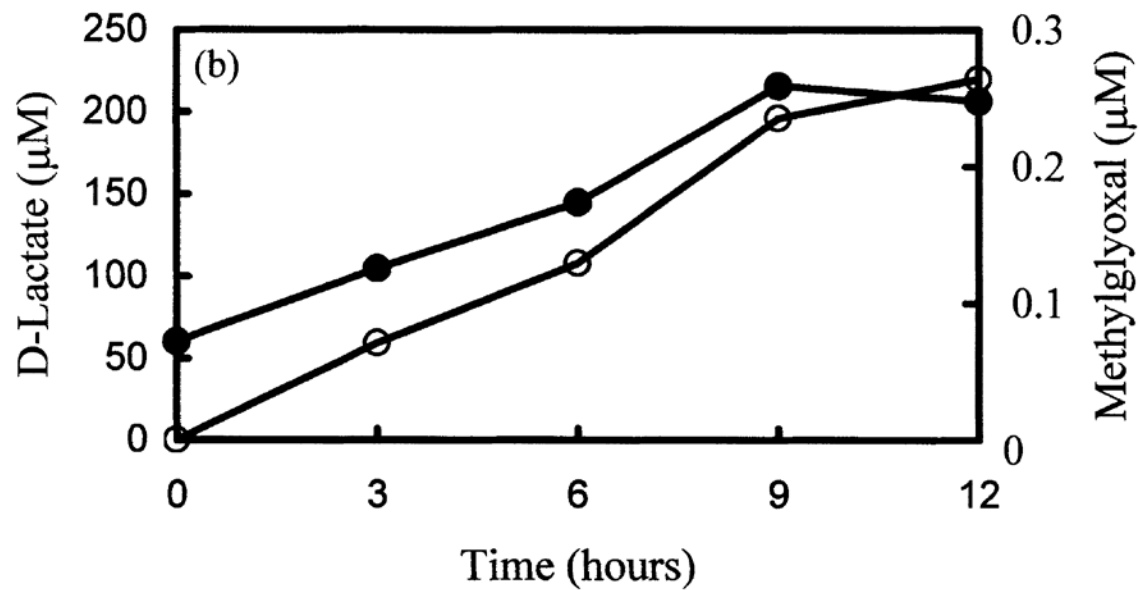
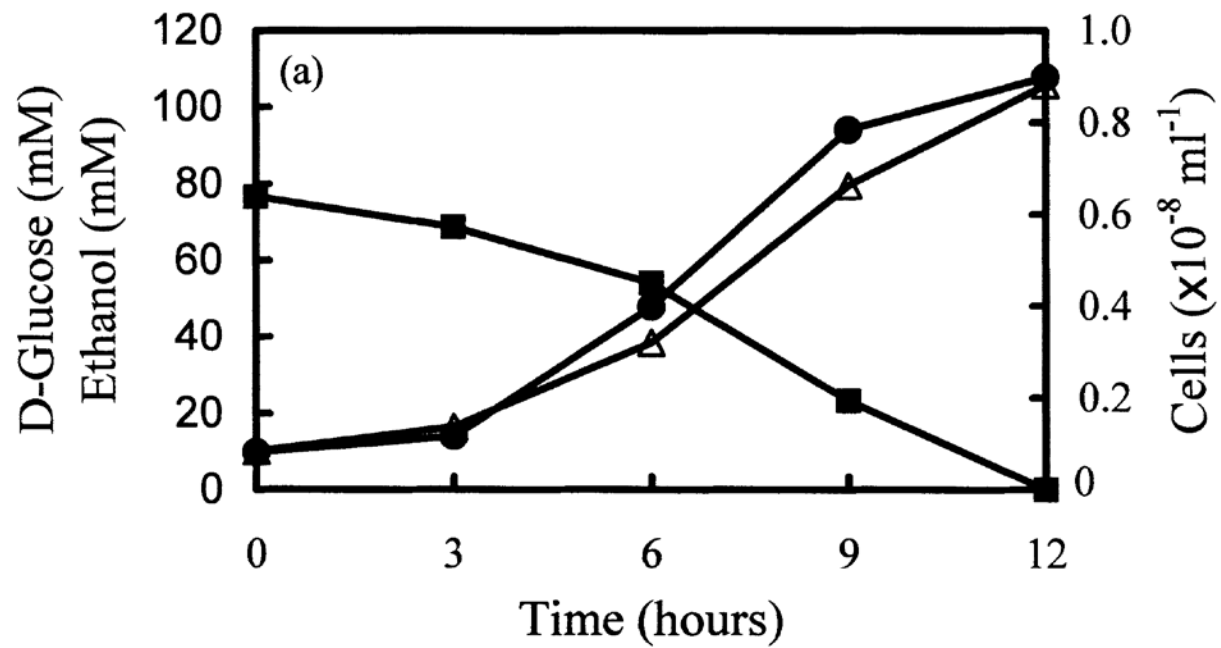
- Se houver aeração na cuba pode haver aumento de produção de massa celular?
 - Sim, uma pequena parcela do etanol presente no fermento tratado será consumido, produzindo acetaldeído, acetato, acetil CoA e entrando no ciclo respiratório
- Porque aerar a cuba então?
 - Crescimento em anaerobiose células não sintetizam componentes de membrana
 - Necessário para regeneração da membrana



Produção de ácidos



- Acido acético
 - A partir do acetaldeído (1 g/L)
- Acido succinico
 - 0.38 (g/L)
- Acido Láctico
 - metabolismo metilgloxal (0.5 g/L) ou diretamente pela ação da lactato desidronenase (regeneração de NAD)



Produção de acetaldeído e fluxo de metabólicos pela membrana

- Considerando a seguinte reação
 - $ACA + NADH \rightleftharpoons EtOH + NAD^+$
- Se esta reação é reversível, esta possui uma constante de equilíbrio, portanto quanto mais álcool, mais acetaldeído
- Sem controle de fluxo pela membrana, acetaldeído é eliminado da célula

Cinética da fermentação Alcoólica

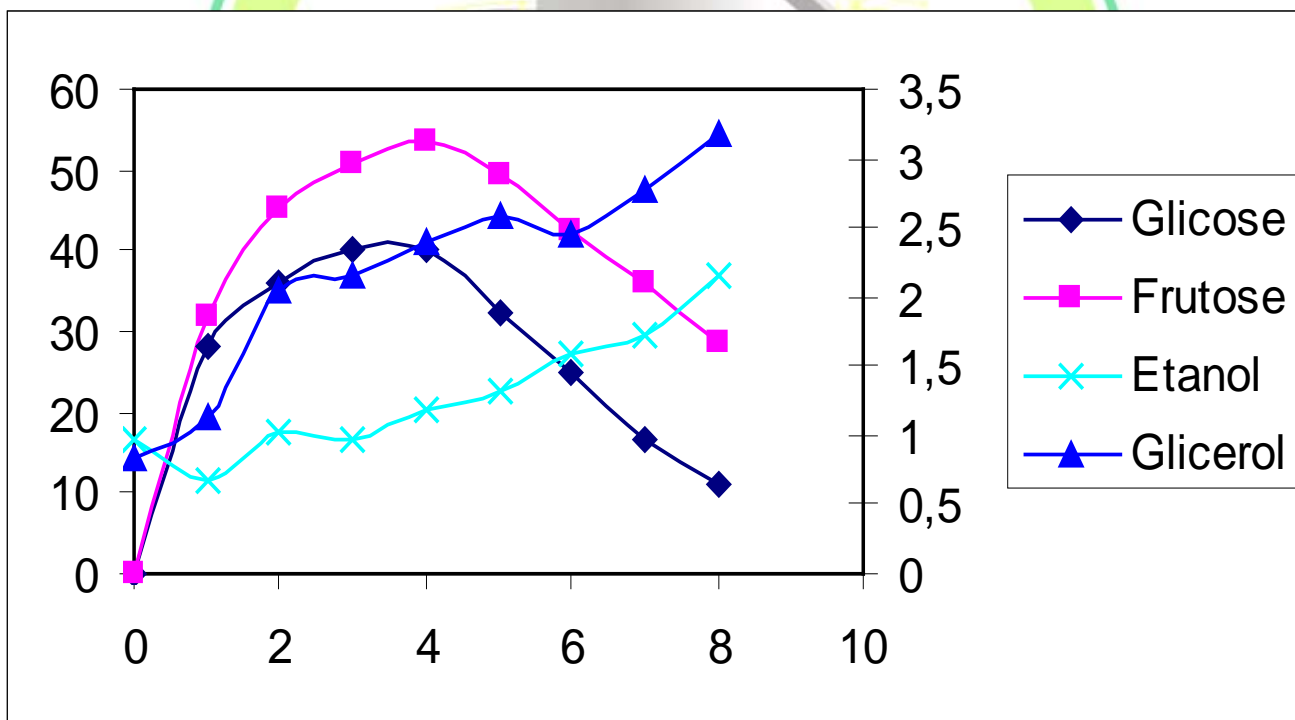


- O que é cinética de um processo de biotransformação?
 - Estudo da velocidade de conversão de um ou mais substrato em um ou mais produtos de interesse, utilizando-se como agente um biocatalisador (enzimas ou microrganismos)
- Para que serve?
 - Cálculo de biorreatores e seus periféricos
 - Definição de estratégia de operação

Dados Experimentais – Batelada Alimentada

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	ART (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0	0	0	0	0	0,84	16,58
1	0	28,24	31,98	62,67	1,13	11,36
2	0	36,12	45,05	81,18	2,05	17,36
3	0	40,26	50,81	91,07	2,16	16,65
4	0	40,26	53,72	93,99	2,39	20,30
5	0	32,49	49,41	81,91	2,58	22,57
6	0	24,97	42,53	67,50	2,44	27,40
7	0	16,60	35,98	52,59	2,76	29,75
8	0	11,23	28,42	39,65	3,19	36,72
Mosto	160,01	7,40	7,74	183,58	-	-

Levantamento dos pontos experimentais




Observações dos dados experimentais

- Substratos
 - Existem 2 substratos presentes no meio de fermentação – glicose e frutose
- Sacarose não detectada
 - Reação de hidrólise mais rápida que de conversão
- Velocidades de consumo diferentes
 - Glicose é consumida mais rapidamente
 - Glicose e frutose consumido concomitantemente

Modelos para 2 substrato

Andrietta e Tosetto


$$\mu_G = \mu_{MAXG} \frac{G}{K_G + G + \frac{G^2}{K_{IG}}} \left(1 - \frac{P}{P_{MAXG}}\right)^{NG} \left(1 - \frac{X}{X_{MAXG}}\right)^{MG}$$

$$\mu_F = \mu_{MAXF} \left(1 - \frac{G}{F}\right) \frac{F}{K_F + F + \frac{F^2}{K_{IF}}} \left(1 - \frac{P}{P_{MAXF}}\right)^{NF} \left(1 - \frac{X}{X_{MAXF}}\right)^{MF}$$

BioContal

Tecnologia em Bioprocesso

Estratégia de operação e diagrama de ocupação

- Etapas do ciclo de fermentação
 - Carga de fermento
 - Fermentação
 - Enchimento
 - Espera para finalizar a fermentação
 - Centrifugação
 - Limpeza do fermentador

Estratégia de operação e diagrama de ocupação

- Diagrama de ocupação
 - Representa graficamente a ocupação dos equipamentos em processos bateladas
- Tipos
 - Clássico
 - A soma do tempo de limpeza e carga de fermento igual ao tempo de centrifugação
 - Não convencional
 - Tempo de limpeza e carga de fermento independente

Diagrama Ocupação

Tempo	D1	D2	D3	D4	D5	D6	C1	C2	C3	
1	1,00	2,00					6,00	D - D1	Enchim.	CIP
2		1,00	2,00	2,00				CIP	Trat.	Enchim.
3	6,00	1,00						CIP	D - D2	Enchim.
4			1,00	2,00	2,00			Enchim.	CIP	Trat.
5		6,00	1,00					Enchim.	CIP	D - D3
6				1,00	2,00	2,00		Trat.	Enchim.	CIP
7			6,00	1,00				D - D4	Enchim.	CIP
8	2,00				1,00	2,00		CIP	Trat.	Enchim.
9				6,00	1,00			CIP	D - D5	Enchim.
10	2,00	2,00					1,00	Enchim.	CIP	Trat.
11					6,00	1,00		Enchim.	CIP	D - D6
12	1,00		2,00					Trat.	Enchim.	CIP

Definição da Estratégia de operação

- Exemplo

- Processo Batelada alimentada
- Seis dornas de fermentação
- Três cubas
- Produção diária = 800.000 L/dia
- Teor alcoólico = 8,5 GL
- Taxa de reciclo = 0,3

Definição da estratégia de operação

- É diferente operarmos enchendo 2 ou 3 dornas ao mesmo tempo?
- Devo utilizar o volume todo da dorna, independente da produção?
- Devo trabalhar com 6 ou 7 fermento?

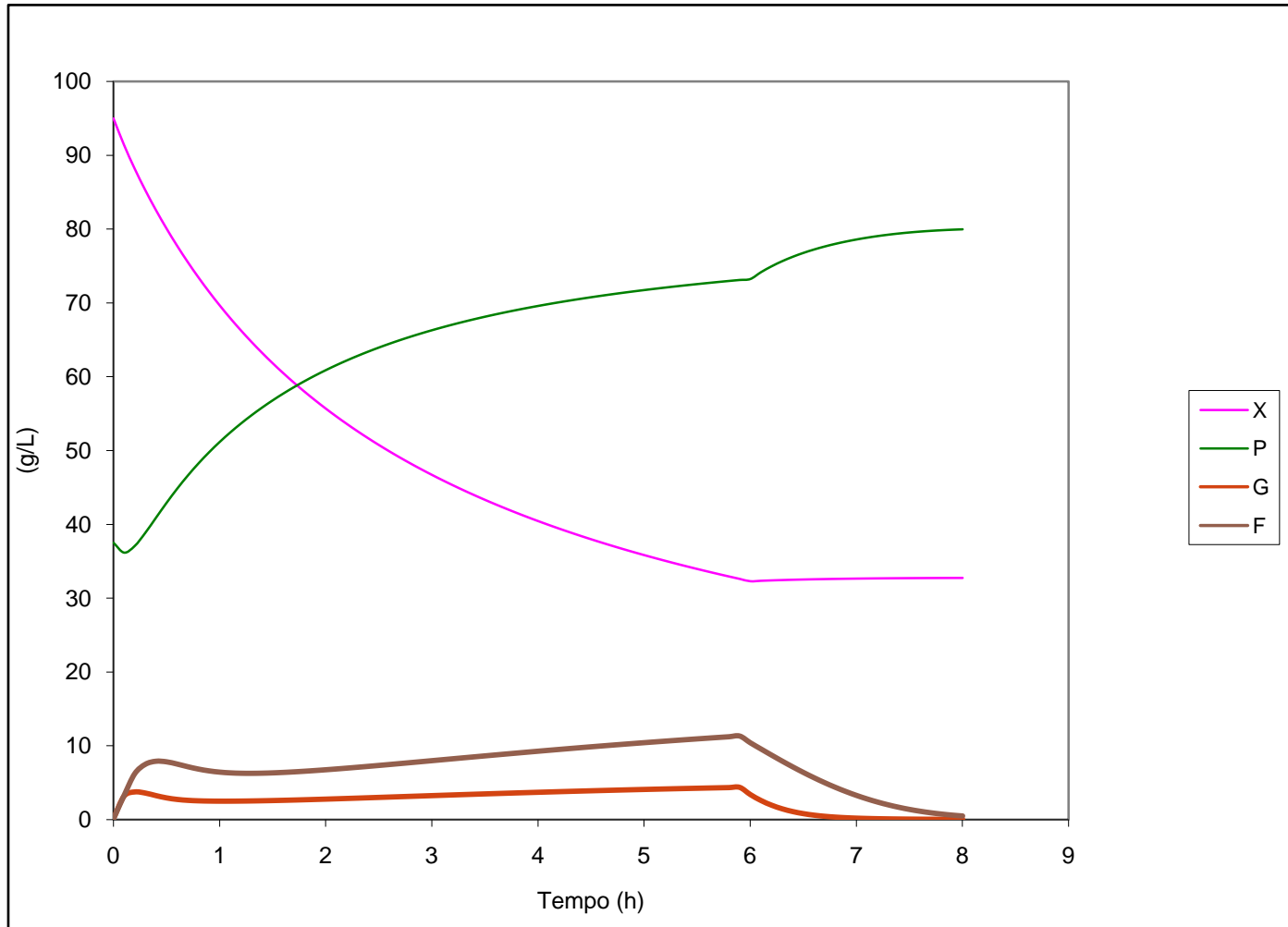
Definição da estratégia de operação 1

- Tempo de fermentação = 8 horas
- 3 dornas sendo alimentadas ao mesmo tempo
- Tempo de enchimento = 6 horas
- Concentração de ART do mosto = 16%
- Enchimento com vazão constante

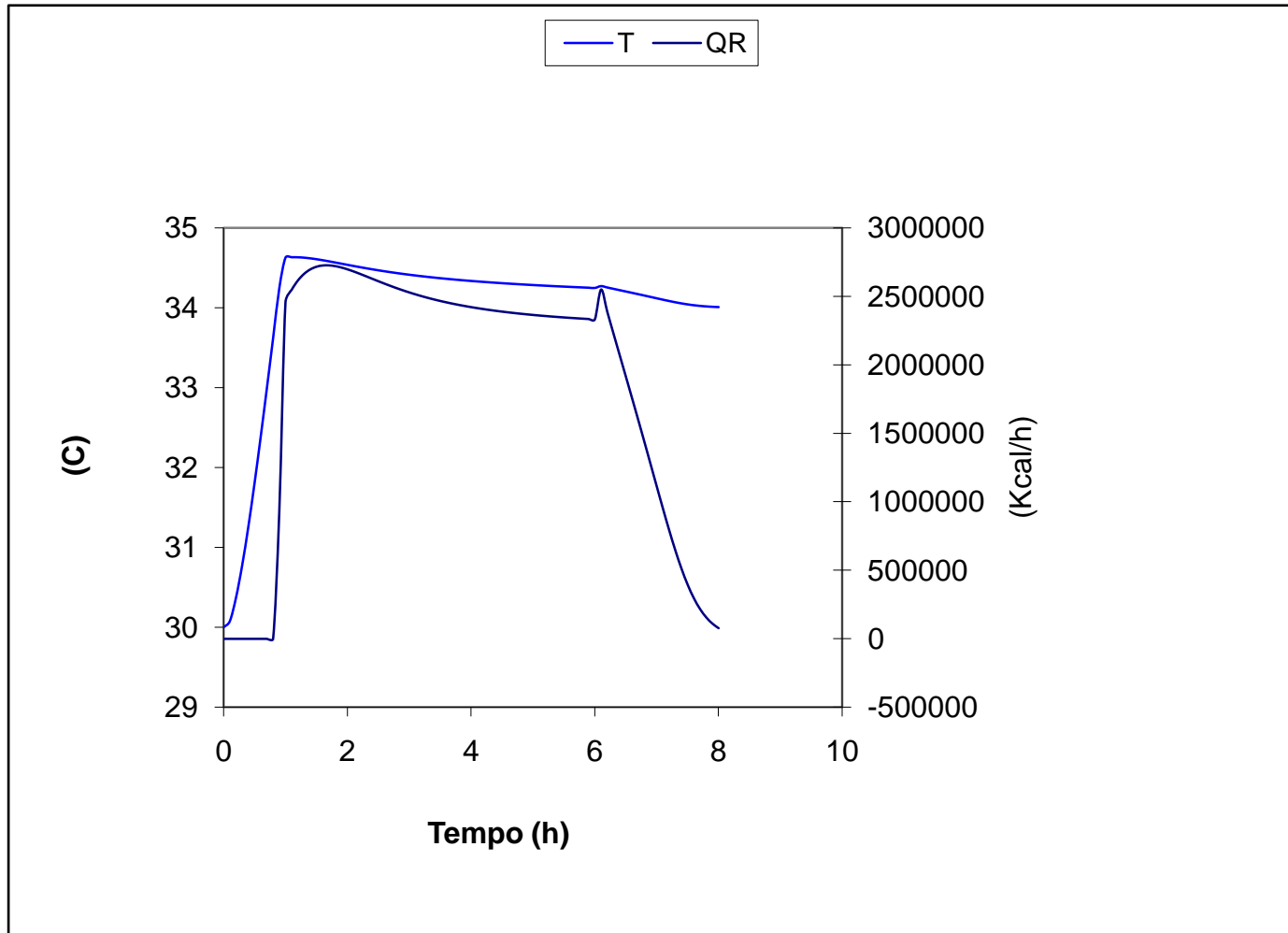
Diagrama Ocupação 1

Tempo	D1	D2	D3	D4	D5	D6	C1	C2	C3	
1	1,00	2,00					6,00	D - D1	Enchim.	CIP
2		1,00	2,00	2,00				CIP	Trat.	Enchim.
3	6,00	1,00						CIP	D - D2	Enchim.
4			1,00	2,00	2,00			Enchim.	CIP	Trat.
5		6,00	1,00					Enchim.	CIP	D - D3
6				1,00	2,00	2,00		Trat.	Enchim.	CIP
7			6,00	1,00				D - D4	Enchim.	CIP
8	2,00				1,00	2,00		CIP	Trat.	Enchim.
9				6,00	1,00			CIP	D - D5	Enchim.
10	2,00	2,00					1,00	Enchim.	CIP	Trat.
11						6,00	1,00	Enchim.	CIP	D - D6
12	1,00		2,00					Trat.	Enchim.	CIP

Simulação – Operação 1




Simulação – Operação 1



Definição da estratégia de operação 2

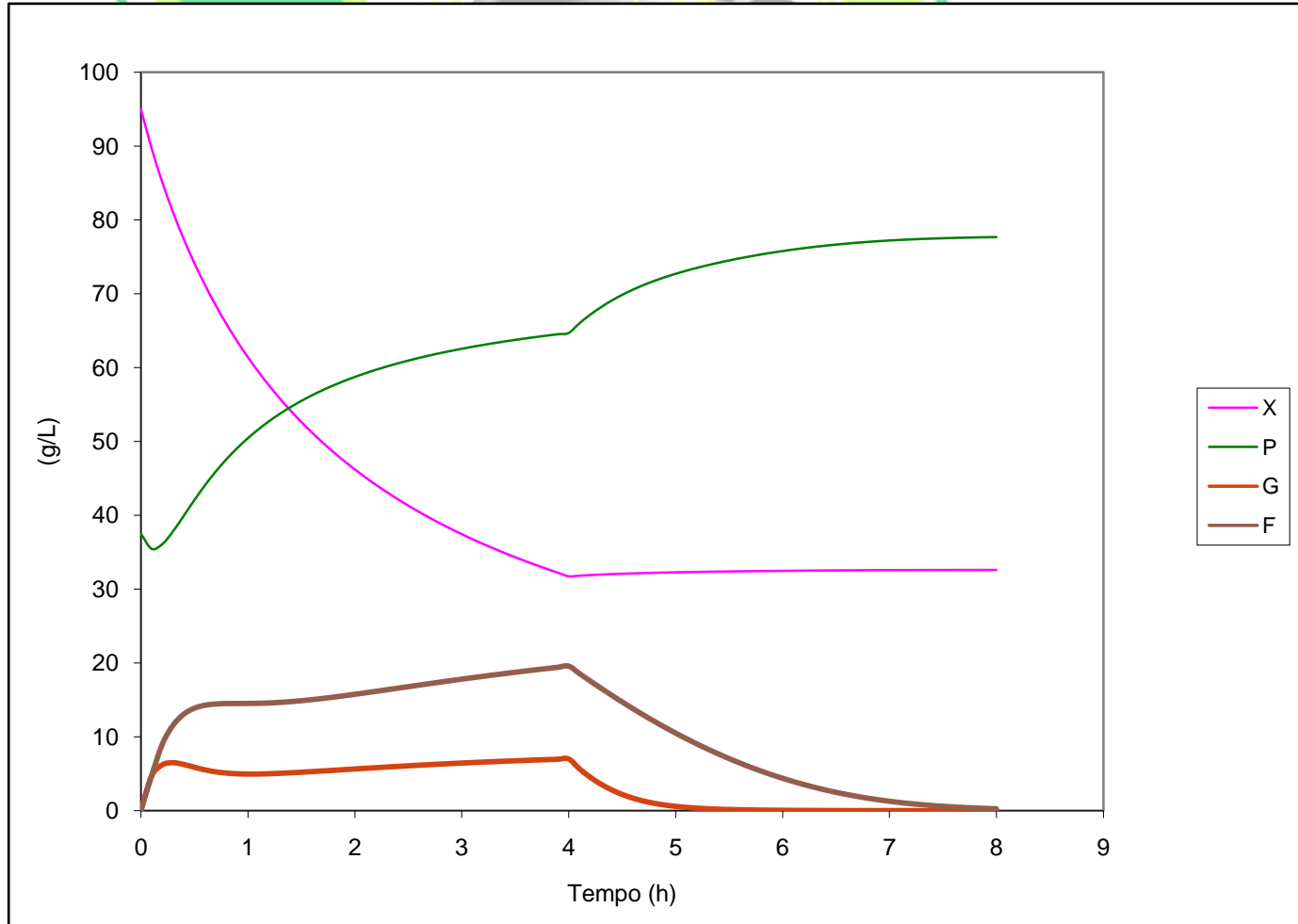
- Tempo de fermentação = 8 horas
- 2 dornas sendo alimentada ao mesmo tempo
- Tempo de enchimento = 4 horas
- Concentração de ART do mosto = 16%
- Enchimento com vazão constante

Diagrama Operação 2

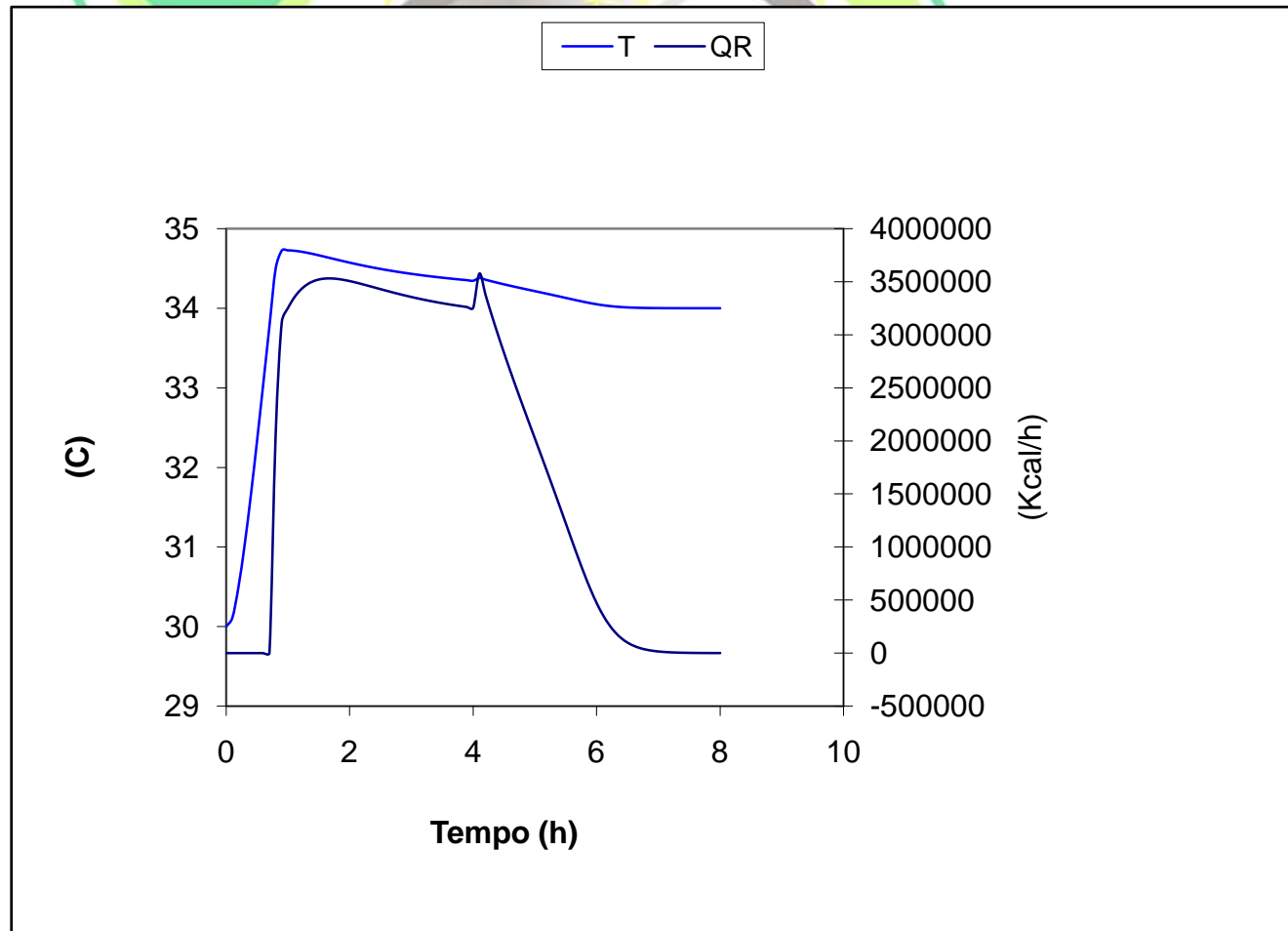


Tempo	D1	D2	D3	D4	D5	D6	C1	C2	C3	
1	1,00	2,00					4,00	D - D1	Enchim.	CIP
2		1,00	2,00		4,00			CIP	Trat.	Enchim.
3	4,00	1,00						CIP	D - D2	Enchim.
4			1,00	2,00		4,00		Enchim.	CIP	Trat.
5		4,00	1,00					Enchim.	CIP	D - D3
6				1,00	2,00		4,00	Trat.	Enchim.	CIP
7			4,00	1,00				D - D4	Enchim.	CIP
8	4,00				1,00	2,00		CIP	Trat.	Enchim.
9				4,00	1,00			CIP	D - D5	Enchim.
10	2,00	4,00					1,00	Enchim.	CIP	Trat.
11					4,00	1,00		Enchim.	CIP	D - D6
12	1,00		4,00					Trat.	Enchim.	CIP

Simulação – Operação 2



Simulação – Operação 2



Diferenças básicas entre processo contínuo e batelada

- Batelada

- Estado transiente, ou seja, as condições do meio em fermentação variam ao longo do tempo de fermentação
- Existência de tempo morto dos equipamentos
- Todo o fermento é tratado de uma única vez.
- Fermento retorna para uma dorna vazia e limpa.
- Permite correção de erros mais facilmente

BioContal

Tecnologia em Bioprocesso

Diferenças básicas entre processo contínuo e batelada

- Contínuo
 - Estado estacionário
 - Utilização de 100% dos equipamentos
 - Somente 20% da massa de fermento está em tratamento e retorna para a dorna 1 que está sempre cheia.
 - Propaga erros, dificultando sua correção
 - Exige mais atenção e preparo dos operadores

Fermentações bateladas e contínuas



- Quando usar uma ou outra
 - Bateladas
 - Para regiões de operação descontinuada (chuvas)
 - Para processar matéria prima de baixa qualidade (meis esgotados)
 - Região de mão de obra desqualificada
 - Contínuas
 - Regiões com operação continuadas
 - Para mostos com até 40% de ART proveniente de mel
 - Região com mão de obra qualificada

Relação Kg ART/kg MS



- Batelada
 - Até 4,5 kg de ART/kg MS
 - Tempo de fermentação de 7 a 8 horas
- Contínua
 - Até 3,5 kg de ART/kg MS
 - Tempo de fermentação de 7 a 8 horas