




PROCESSOS INDUSTRIAIS DE CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO

**Prof. Dra Sandra H da Cruz
ESALQ/USP**

A. Bioquímica da fermentação alcoólica

- **produtos primários:** etanol e CO₂
- **produtos secundários:** aldeídos, ésteres, ácidos, álcoois superiores, compostos sulfurados, fenóis, biomassa, metanol, furfural

- * Aldeídos: intermediários da formação de álcoois superiores
 - oxidação de álcoois
 - aa + ácido pirúvico

- 
- Ésteres: processo oxidativo entre álcoois e ácidos
 - Ácidos: acético (oxidação de aldeído acético), láctico, succínico (aa = ácido glutâmico)
 - Álcoois superiores: metabolismo de aa, microrg. contaminantes
 - Glicerol: produto normal da fermentação alcoólica
 - Metanol: decomposição de pectinas
 - Furfural: pirogenação de matéria orgânica, envelhecimento

IDEAL: ésteres / álcoois superiores = 1 : 1

1. EVOLUÇÃO HISTÓRICA (Fermentação alcoólica)

10000 a.C. – preparo de queijo (cabras)

8000 a.C. – preparação de cerveja e vinho

6000 a.C. – fabricação de pão

1650 – aparecimento do microscópio

1789 – Antoine Laurent Lavoisier descreve a química da fermentação

1815 – Gay Lussac esclarece a reação da fermentação alcoólica

1836 – 1839 – Berzelius e Liebig formulam a teoria da fermentação como processo catalítico

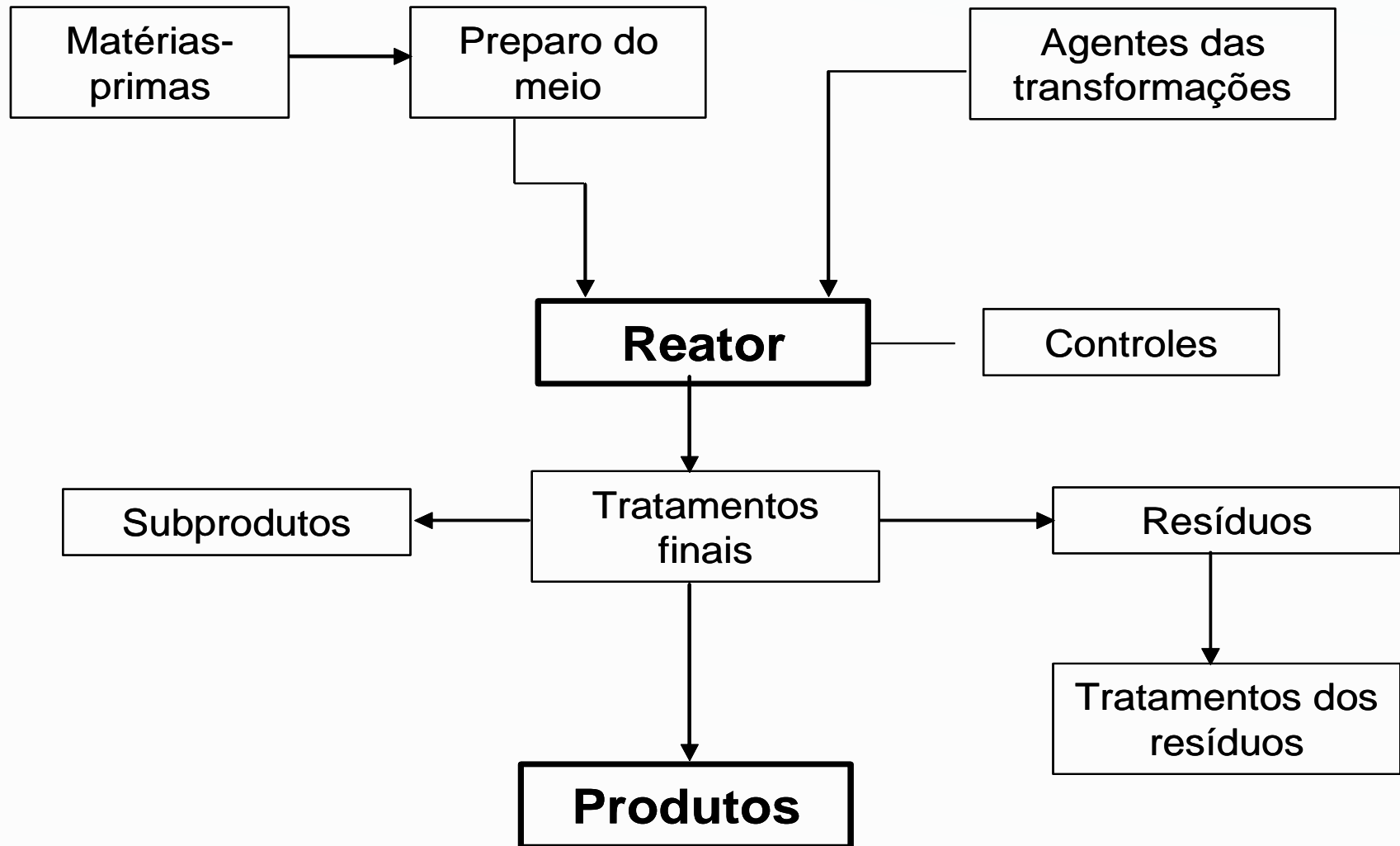
1857 – Pasteur estabelece a teoria vitalista da fermentação

1871 – Pasteur mostra que o levedo vivo é necessário para a fermentação

1898 – Harold Wager fornece descrições gerais das células de diversas leveduras

1908 – Harden e Young elaboram a equação global da fermentação alcoólica

Representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico



2. Reator: Bioreator, Dorna ou Fermentador

Historicamente, conhecidos por fermentadores e direcionado para o cultivo de células ou microrganismos, produzir metabólicos secundários, alcalóides, antibióticos, entre outros (Barruetto, 2002).

- * Fermentador - relacionado etimologicamente com fermentação
 - * raiz latina, deriva de fermentare: significa ferver, i.é., produzir bolhas de ar,
 - * alusão ao fato de os fermentadores serem destinados a processos fermentativos como, por exemplo, a produção de álcool

<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>

Dornas de Fermentação - definição

- ✓ Tanques construídos geralmente em aço carbono com capacidade variável de acordo com a capacidade do processo.
- ✓ **recipiente onde ocorre a fermentação**

FERMENTADOR – Classificação

❖ Quanto à natureza do meio de fermentação

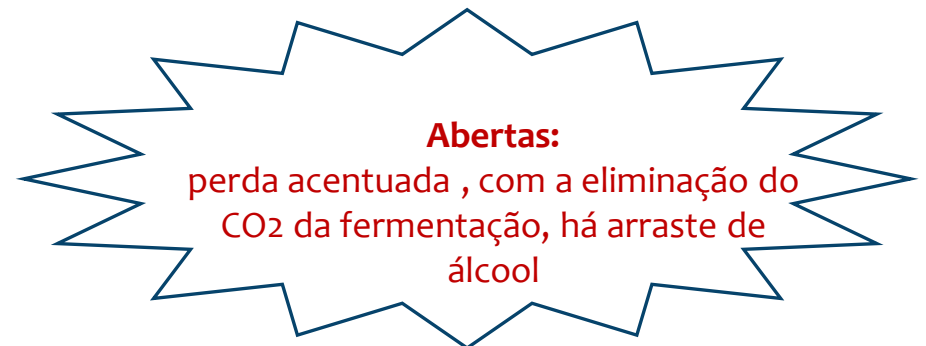
- ❖ Submersa - meio líquido
- ❖ Superficial ou semi sólido - meio sólido

❖ Quanto à forma espacial

- ❖ Cilíndrico - meio líquido e sólido
- ❖ Paralelepípedo- meio líquido e sólido

❖ Quanto ao fechamento

- ❖ Aberto
- ❖ Fechado



FERMENTADORES - classificação

➤ Quanto ao material de construção

- Madeira
- Alvenaria
- Aço carbono
- Aço inoxidável
- Aço carbono revestido ® aço inox, borracha, esmalte, plástico, resinas
- Plásticos e resinas

Capacidade dos biorreatores

- bastante variável, depende do processo

- Reatores da ordem de algumas centenas de litros até 1 a 2 m³ de capacidade
 - ✓ empregados no cultivo de microrganismos patogênicos, ou para o crescimento de células animais ou vegetais, em geral, objetivando a produção de produtos ligados à área de saúde.
- Escala intermediária, reatores da ordem de algumas dezenas de metros cúbicos até 100 a 200 m³,
 - ✓ especialmente empregada na produção de enzimas, antibióticos e vitaminas.
- Processos que exigem poucos ou até nenhum cuidado de assepsia (caso da fermentação alcoólica ou tratamento biológico de resíduos)
 - ✓ reatores com alguns milhares de metros cúbicos de capacidade.

Dimensão de fermentadores para alguns processos fermentativos

VOLUME DO FERMENTADOR (m ³)	PRODUTO
1 – 20	Enzimas de diagnóstico, substâncias para biologia molecular.
40 – 80	Algumas enzimas e antibióticos.
100 – 150	Penicilina, antibióticos aminoglicosídicos, proteases, amilases, transformação de esteróides, aminoácidos.
450	Aminoácidos (ácido glutâmico)

1 m³ =
1000 L

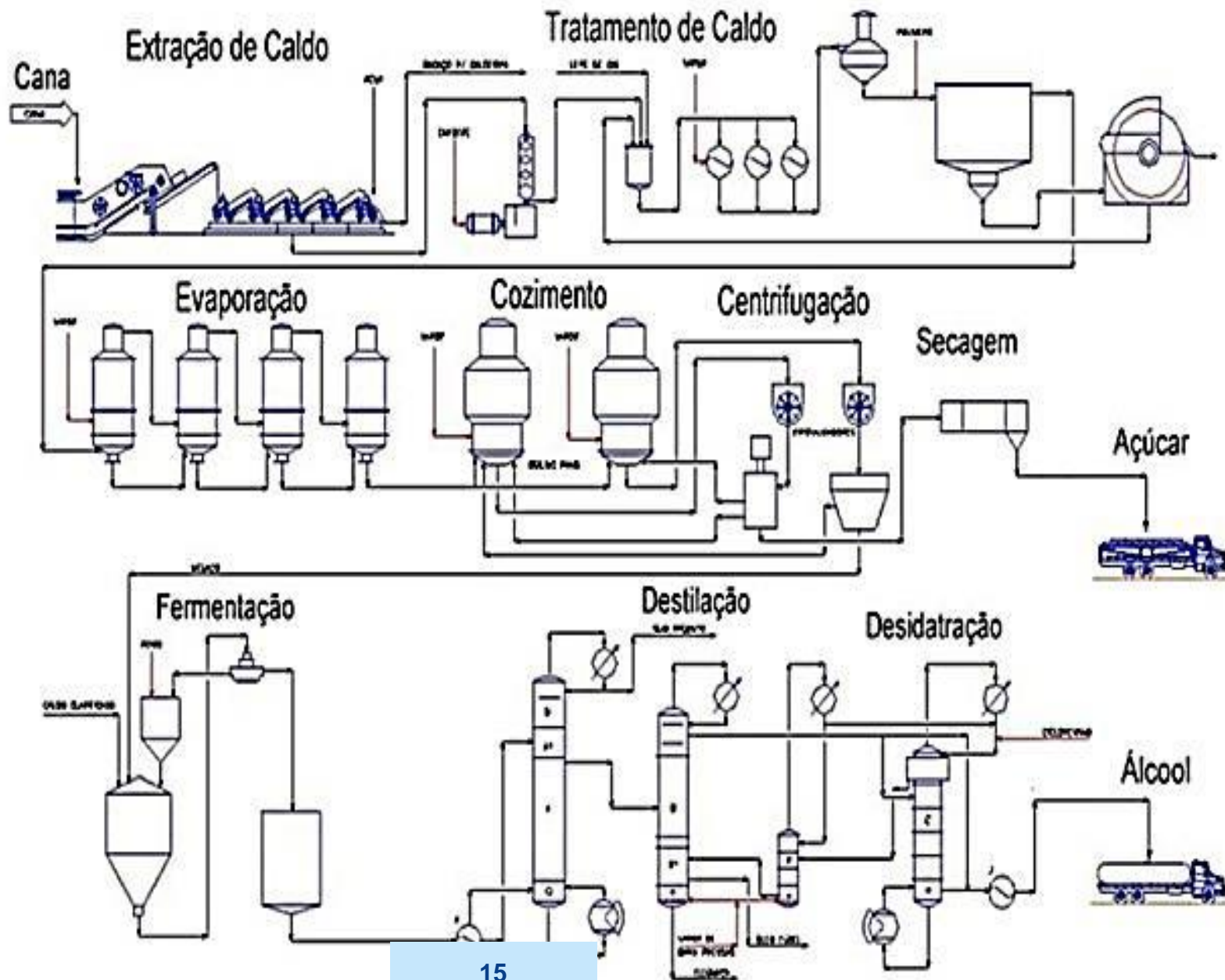


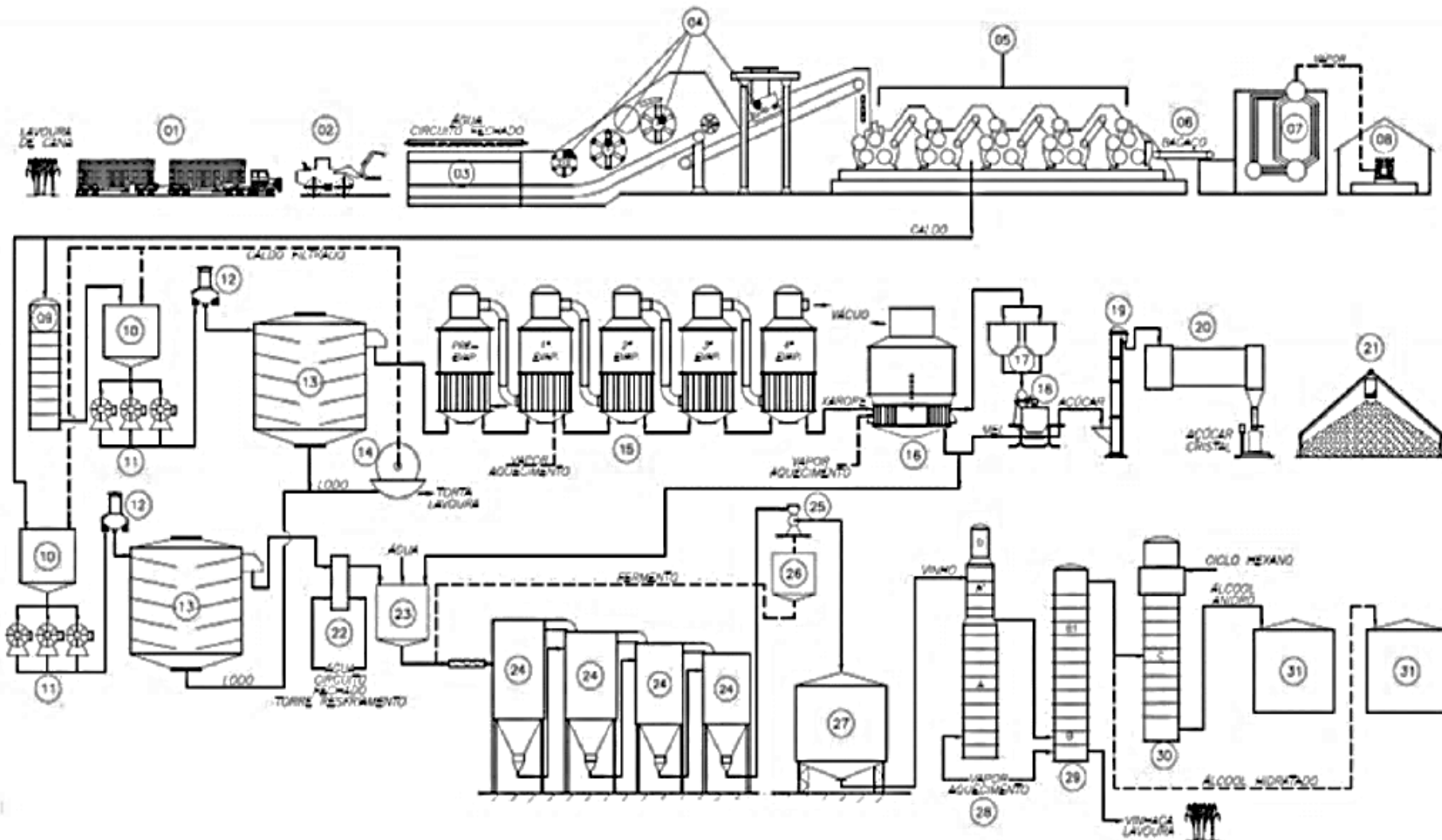
Salas e dornas de fermentação





Fermentação alcoólica





1	Transporte de cana lavoura/ Indústria
2	Depósito de cana
3	Mesa alimentadora/ Lavagem de cana
4	Nivelador/ Picador/ Desfibrador/ Eletroimã
5	Moendas
6	Esteiras de bagaço
7	Caldeiras geradoras de vapor
8	Gerador de energia elétrica
9	Sulfitação
10	Caleagem
11	Aquecedores Fábrica e Destilária

12	Balão de Flash - Fábrica e Destilaria
13	Decantadores - Fábrica e Destilaria
14	Filtro de lodo - Fábrica e Destilaria
15	Pré- evaporação e evaporação
16	Tachos cozedores
17	Cristalizadores
18	Centrifugas de açúcar
19	Elevador de canecas
20	Secador de açúcar
21	Armazém de açúcar
22	Trocador de calor

23	Tanque pulmão
24	Dornas contínuas de fermentação
25	Separadora centrífuga de fermento
26	Cuba de tratamento de fermento
27	Dorna volante de vinho
28	Coluna A
29	Coluna B
30	Coluna C
31	Tanques de armazenagem

3. PROCESSOS INDUSTRIAIS NA CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO DO MOSTO

Classificação das fermentações industriais

- Regime de alimentação da dorna
 - Processos contínuos
 - Processos descontínuos
- Reaproveitamento da massa de levedura para próxima rodada
 - Processos sem reciclo
 - Processos c/ reciclo de células

3.1 Processos descontínuos

Intermitentes, denominados simples ou alimentado

- * **Simples** - a fermentação só tem início após o preenchimento do fermentador, momento em que se mistura o mosto com o fermento
 - * possível em condições de pequenas quantidades de mosto, não sendo viável para a indústria alcooleira, tendo uso restrito para fermentações laboratoriais e farmacêuticas.
- * **Alimentado** - mistura-se o mosto ao fermento conforme a dorna vai sendo abastecida
 - * mais produtivo
 - * expõe as leveduras a menores riscos de se tornarem inativas que no processo de batelada simples

Processos descontínuos

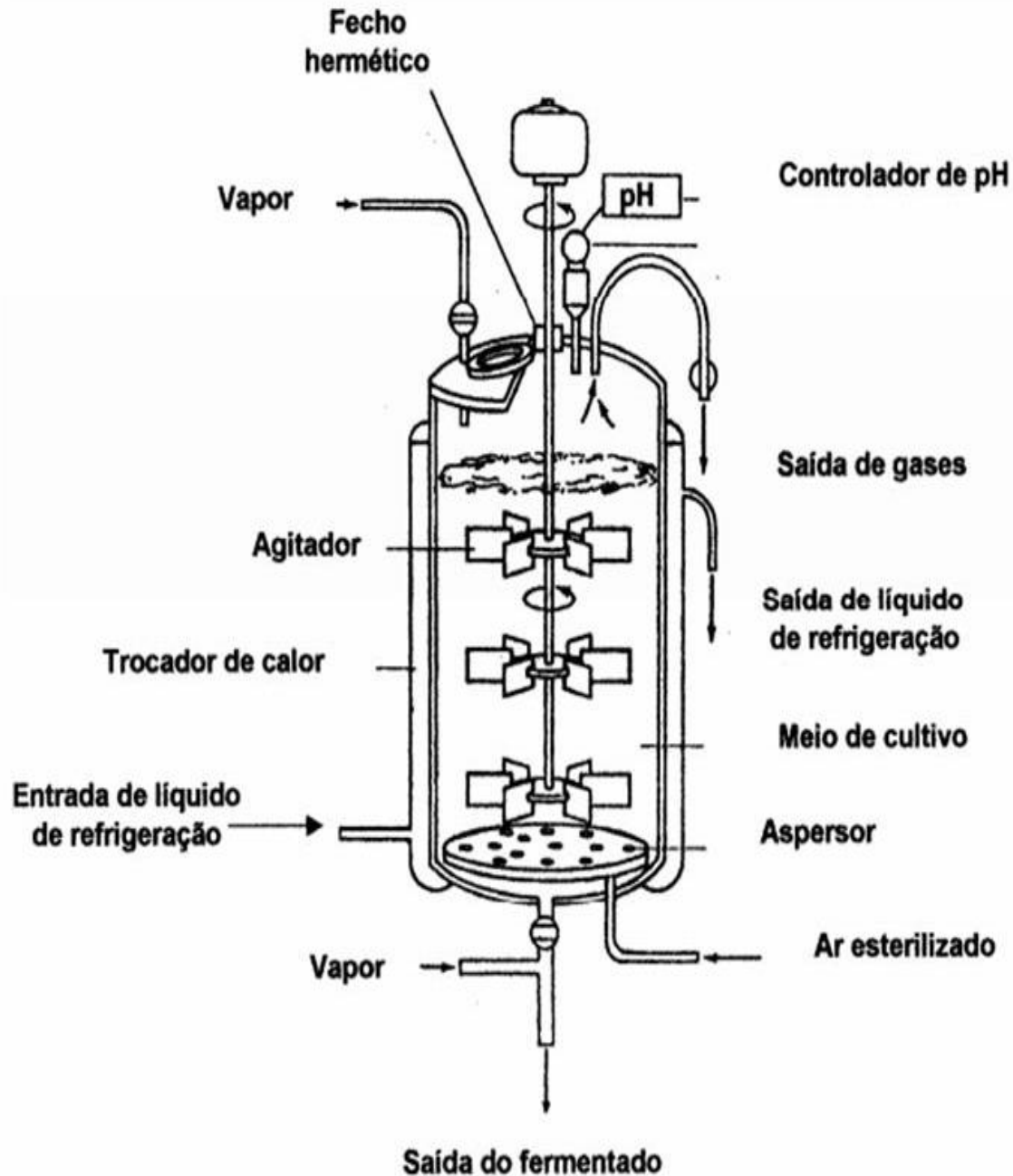
- * Caracterizado por
 - * inoculação e incubação de microrganismos,
 - * de tal forma, a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas.

- * Neste tipo de produção, nada é adicionado, exceto
 - * oxigênio (processo aeróbio),
 - * ácido ou base (controle de pH) ou
 - * antiespumante.

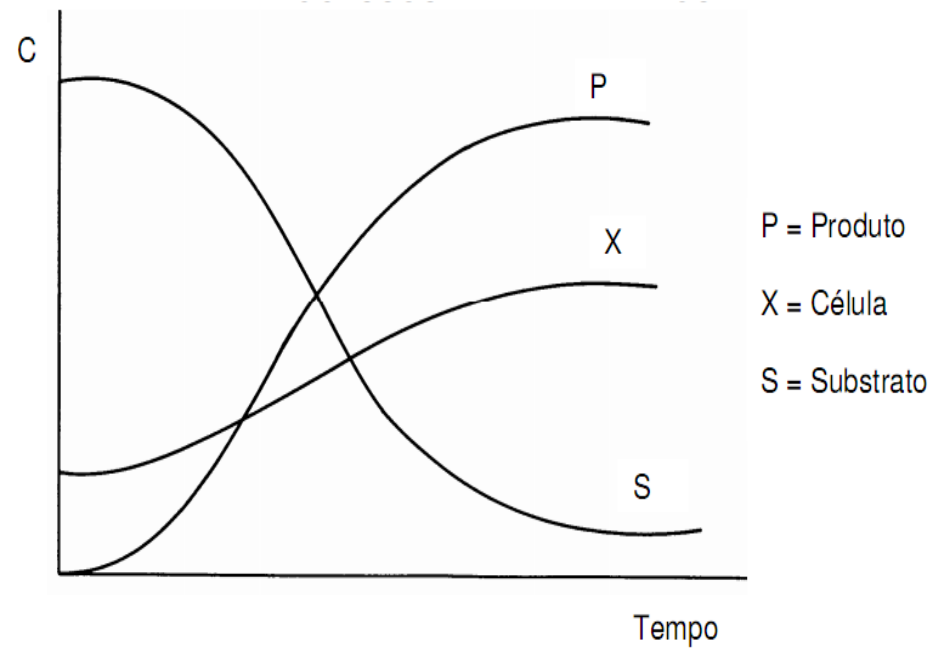
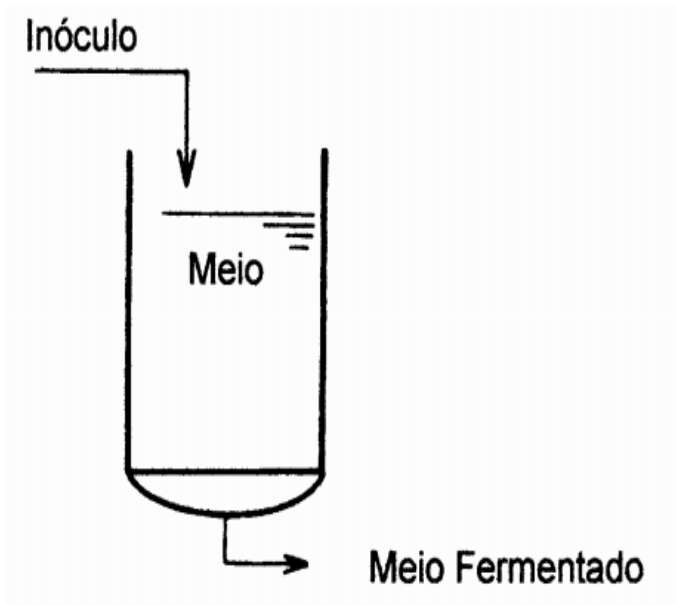
Processo descontínuo

- * Utiliza-se várias dornas geralmente com capacidade menor que as do processo contínuo,
- * Pode-se dizer que neste tipo de processo, trabalha-se com várias pequenas fermentações,
- * pois as dornas são cheias, fermentadas e processadas uma a uma.

Desenho esquemático de fermentador



Fermentação descontínua ou batelada



Processos descontínuos simples – Sem recirculação de células

* Vantagens:

- * Fácil operação;
- * Menor risco de contaminação;
- * Construção e instrumentação simples e barata;
- * Processo adequado para curtos períodos de tempo;
- * Versatilidade de usos

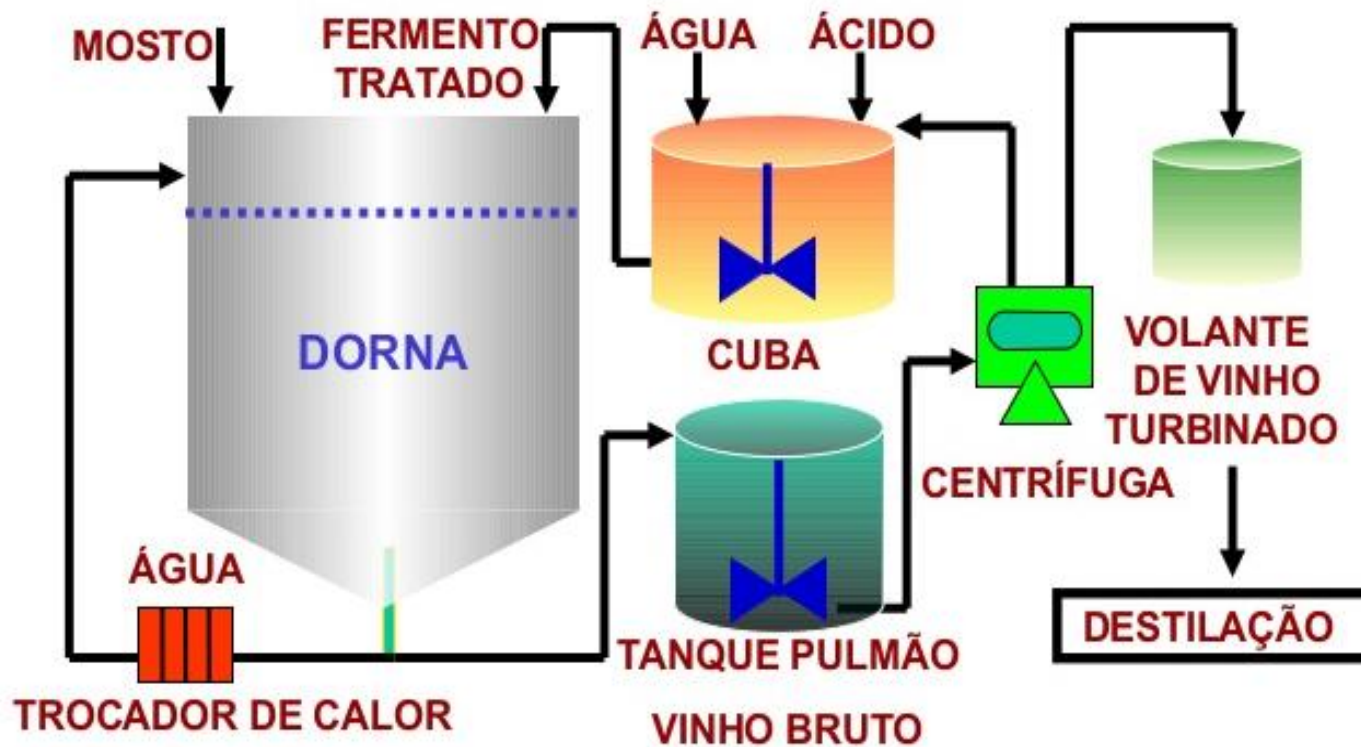
* Desvantagens:

- * Esgotamento do meio de cultivo e acúmulo de compostos tóxicos ou degradação do produto;
- * Menor produtividade volumétrica;
- * Preparo do reator entre uma batelada e outra reduz tempo útil e aumenta custos.



- **TEMPERATURA:** 28 a 32°C
- **TEMPO DE RETENÇÃO:** 6 a 9 horas
- **CHEIRO:** frutado
- **ASPECTO DA ESPUMA:** bolhas pequenas e regulares rebentando na superfície.
- **°BRIX ALIMENTAÇÃO:** 14 – 16
- **°BRIX FINAL:** ideal igual a zero.
- **TEOR ALCOÓLICO:** 6 – 9
- **pH:** 4 a 6 (coleta amostra e analiso).
- **ART (Sacarose, Glicose e Frutose) e AR (Glicose e Frutose)**

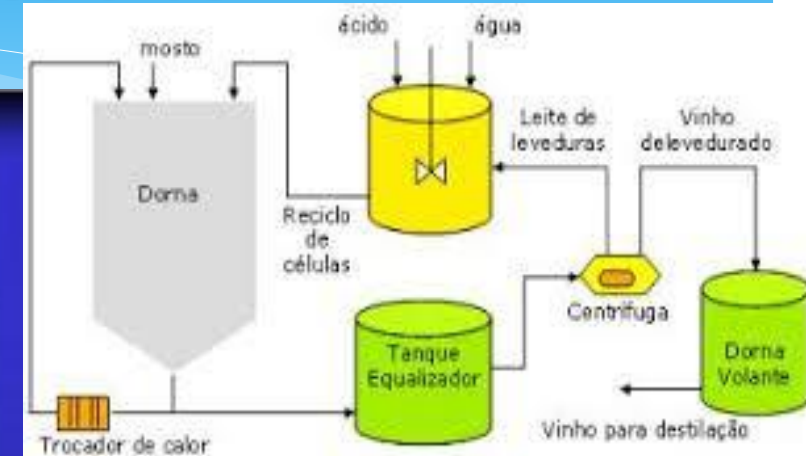
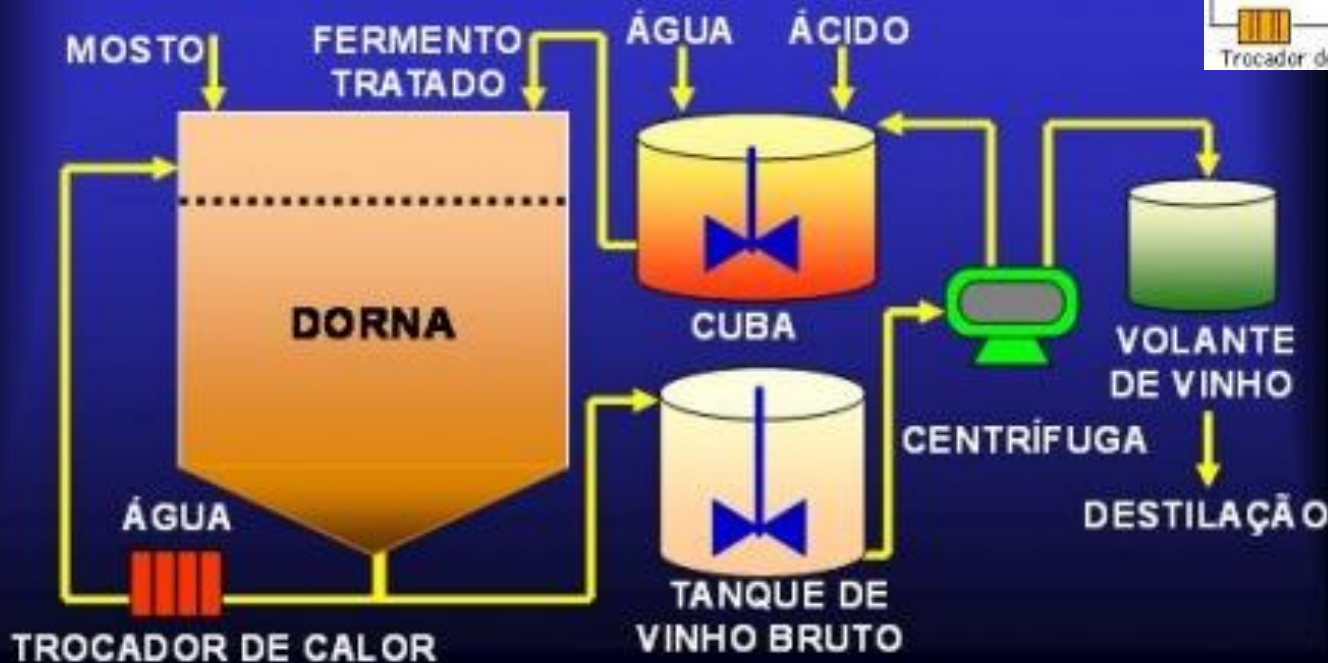
Processos descontínuos – Com recirculação de células

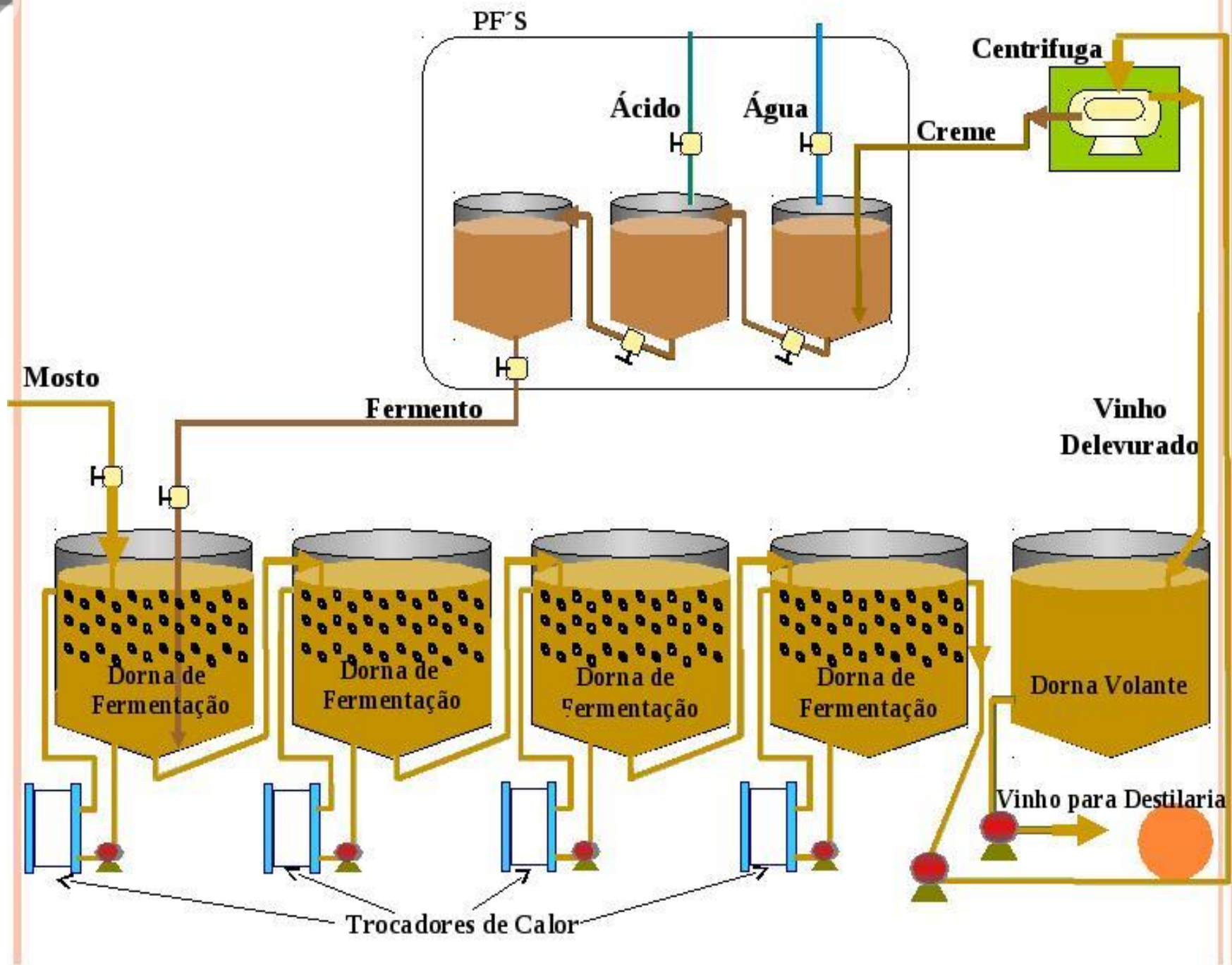


Processo
Melle-Boinot

Processos descontínuos – Com recirculação de células

BATELADA COM RECICLO: CENTRIFUGAÇÃO (MELLE BOINOT)





Fermento Reciclado / Seleccionado (creme de levedura)

- ▶ Pressupõe-se a levedura habilitada do ciclo anterior;
 - 10^8 células de leveduras/mL
 - 25 a 28°C
 - pH: 3,5 a 4,2
 - mosto diluído: 8°Brix
- ▶ Adição de N e P no mosto
- ▶ Aumento gradual do teor de açúcar (sem plasmólise).

Tabela 4. Parâmetros Típicos do Processo Melle-Boinot

Equipamentos e Desempenho			
<i>Descrição</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Capacidade</i>	<i>Informações adicionais</i>
Fermentadores	8 – 12	300 m ³	Cilíndricos; aço carbono
Centrifugas	3 – 6	45 m ³ / h	Disco, com bocal de descarga
Trocadores de calor	4 – 6	1,2 x 10 Kcal/ h	Placas
Produtividade	3 – 6	Kg EtOH/L. h	
Dados do Processo			
Mosto de Fermentação			
Açúcares totais (como glicose, %)			12 -15
PH			5,5 - 6,2
Temperatura (°C)			26 - 30
Vinho (Mosto fermentado)			
Açúcares totais (%)			< 0,5
Teor de álcool (Graus GL)			7 - 11 GL (9 em média)
Concentração de células (% p/v)			7 - 16
Temperatura de fermentação (°C)			34 - 38
Rendimento estequiométrico (%)			85 - 92
Tempo de fermentação (h)			5 - 9
Inoculo			
Açúcares totais (%)			< 0,25
Teor de álcool (G.L)			< 4 GL
PH			2,2 - 2,8
Concentração de leveduras (%)			15 - 35
Tempo de tratamento ácido (horas)			1 - 4
Temperatura (°C)			28-32
Subprodutos			
Glicerol			6 % do álcool
Ácidos			2 - 6 % do álcool
Fermento (leveduras)			4 - 10 do álcool (base seca)

FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA

* Operação:

- * *Instante inicial:* a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com o microrganismo e incubada de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas.
 - * No *decorrer do processo* fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos (na forma de ar), antiespumante, e ácido ou base para controle do pH.
 - * *Terminada* a fermentação, descarrega-se a dorna e o meio fermentado segue os tratamentos finais.
 - * Lavar a dorna, esterilizar e recarregar com mosto e inóculo.
- * Volume = constante

* Desvantagens:

- * Baixo rendimento ou produtividade quando o substrato exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos não desejáveis;
- * Apresenta “tempos mortos”,
 - * tempo de carga e descarga de dorna
 - * período correspondente à lavagem e esterilização do fermentador.

* Vantagens:

- * Menos riscos de contaminação (comparando com o contínuo)
- * Grande flexibilidade de operação (fermentador pode ser utilizado para a fabricação de diferentes produtos)
- * É o mais utilizado na indústria

Fermentação descontínua alimentada

- * Também denominada processo por batelada alimentada.
- * Definido basicamente como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos permanecem até o final da fermentação.
- * É utilizada para evitar o efeito glicose (repressão) ou indução.
- * É útil para o estudo de cinética de processos fermentativos.

Fermentação semicontínua

- * Após colocar o meio e o inóculo, faz-se;
 - * aguarda-se o termino da fermentação;
 - * retira-se parte do meio fermentado, mantendo-se, no reator o restante de mosto fermentado;
 - * adiciona-se ao reator um volume de meio fermentado retirado na operação 2.

- * OBS: o meio fermentado não retirado do fermentador (2) serve de inóculo ao meio de fermentação adicionado em (3). Reinicia-se, desse modo, a seqüência de operações acima descritas, que será repetida enquanto não houver queda da produtividade do processo.

- * Volta meio + microrganismo (geralmente centrifugado).

3.2 FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

- ✓ Alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante.
- ✓ Volume é constante através da retirada contínua de caldo fermentado.
- ✓ Manutenção do volume
 - ✓ sistema em estado estacionário ou regime permanente (“steady state”)
- ✓ As variações (concentração de célula, de substrato limitante e produto) permanecem constantes
- ✓ Pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário.

- ✓ **Problemas:**
- ✓ vazões idênticas de alimentação e retirada de meio
- ✓ formação intensa de espuma

Vantagens:

- * aumento da produtividade do processo;
- * obtenção de caldo fermentado uniforme (facilita o downstream);
- * manutenção das células em um mesmo estado fisiológico;
- * possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção;
- * maior facilidade no emprego de controles avançados;
- * menor necessidade de mão-de-obra.

Desvantagens (ou problemas práticos)

- * maior investimento inicial na planta;
- * possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas, resultando na seleção de mutantes menos produtivos;
- * maior possibilidade de ocorrência de contaminações, por se tratar de um sistema essencialmente aberto, necessitando pois, de manutenção de condições de assepsia nos sistemas de alimentação e retirada de meio;
- * dificuldades de manutenção de homogeneidade no reator, quando se trabalha com baixas vazões, ou quando o caldo adquire comportamento pseudoplástico (cultivo fungos filamentosos)
- * dificuldades de operação em estado estacionário em determinadas situações.

Formas de operação no sistema contínuo

- * Processo de fermentação contínua normalmente tem início em um processo descontínuo, ou seja,
 - * carrega-se inicialmente o reator com meio de cultura,
 - * procede-se à inoculação com o microrganismo responsável pela conversão;
 - * após algum tempo de operação descontínua,
 - * inicia-se a alimentação de meio de cultura e retirada de caldo, dando-se início efetivamente ao processo contínuo.

FERMENTAÇÃO CONTINUA

PROCESSO ANDRIETTA-STUPIELLO

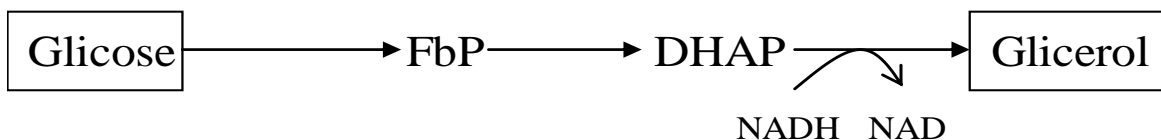


Tabela 5. Parâmetros Típicos do Processo Contínuo de Fermentação

Equipamentos e Desempenho	
Descrição	
Número de fermentadores	5
Volume do primeiro fermentador	700 m ³
Trocadores de calor	3
Vazão de ar (pré-fermentador e primeiro reator)	0,01 vvm
Produtividade	6 – 9 Kg EtOH/ m ³ .h
Dados do Processo	
Mosto de Fermentação	
Açúcares totais (como glicose, %)	12 -15
pH	5,5 - 6,2
Temperatura (°C)	26 –30
Vinho (Mosto fermentado)	
Açúcares totais %	< 0,5
Teor de álcool (Graus GL)	7 - 11 (8,3 em média)
Concentração de células (% p/v)	7 – 12
Temperatura de fermentação (°C)	34 – 36
Rendimento estequiométrico (%)	85 - 92
Tempo de fermentação (h)	4 – 7
Inóculo	
Açúcares totais (%)	< 0,25
Teor de álcool (GL)	< 4 GL
pH	2,2 - 2,8
Concentração de leveduras (%)	15 – 35
Tempo de tratamento ácido (horas)	1 - 4

Formação de Produtos Secundários da Fermentação (leveduras)

Produtos Secundários de fermentação	Reação (formação)	Condição (fatores)
Glicerol		Tipo de levedura; Pressão osmótica (+); Formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) (+); Produção de biomassa (+)



Ácido Succínico	Ac. Glutâmico (autólise de proteínas) ↓ aldeído succínico ↓ + O ₂ ac. Succínico	Anaerobiose, NADH
-----------------	---	-------------------

Álcoois Superiores	Vem da transformação dos aminoácidos Leucina → álcool isoamílico Valina → álcool isobutílico	Aminoácidos, Potencial redox do meio.
--------------------	--	--

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

- açúcares + leveduras → álcool etílico + CO₂
(mosto) (fermento) (vinho)

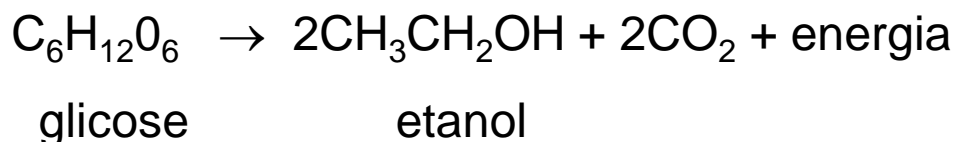
*Saccharomyces
cerevisiae*

- formação de compostos secundários: congêneres

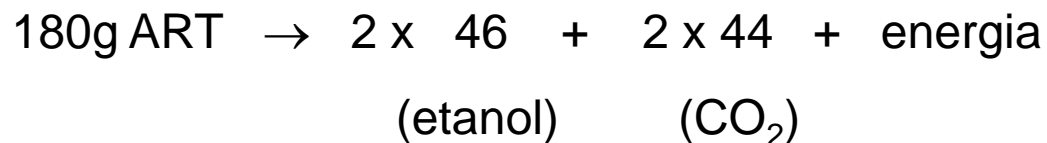
PARÂMETROS DE CONTROLE DA FERMENTAÇÃO

1) Eficiência da fermentação (np(%))

- Eq. De Gay-Lussac para a fermentação:



Rendimento Ideal (Yt):



180g ART ----- 92g de etanol

100g ----- x g

$$x = 51,11\text{g ou } 51,11 / 0,78932 \text{ (densid - } 20^\circ\text{C)} = 64,75\text{ml de etanol a } 20^\circ\text{C}$$

∴ Yt = 51,11g ou 64,75ml etanol a 20°C por 100g de ART

Rendimento Prático (Yp):

$Y_p = \text{g de etanol obtidos do vinho} / \text{g de ART fornecido} \times 100$

Eficiência (Yp/Yt): $\eta_p (\%) = (Y_p/Y_t) \times 100$

2) Produtividade de Fermentação - PR:

- expressa a velocidade com que o etanol é produzido, relacionando sua concentração no vinho pela unidade de tempo:

$$PR \text{ (g de etanol. L de vinho}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{[etanol no vinho] (g.L}^{-1})}{\text{tempo de fermentação (h)}}$$

3) Atenuação de Brix

- Início: rápido até enchimento da dorna
- Meio: lentamente até próximo do término
- Final: leituras coincidentes

4) Temperatura

- temp: 32 a 35°C

5) Tempo de Fermentação

Mostos de caldo e de melaço: 6 a 8h

6) Açúcares Residuais

- levedo e mosto bem preparado → AR → zero





Fermentação contínua - Usina São Manoel



D. Fermentações industriais

- * podem ser classificadas de acordo com os tipos de alimentação das dornas e desenvolvimento da fermentação
- * Tipos de processos mais comuns:
 - Descontínuo (ou Batelada) (Figura 1a)
 - Contínuo (Figura 1 b)
 - Semi Batelada (ou semi contínuo) (Figura 1c, 1d e 1e)

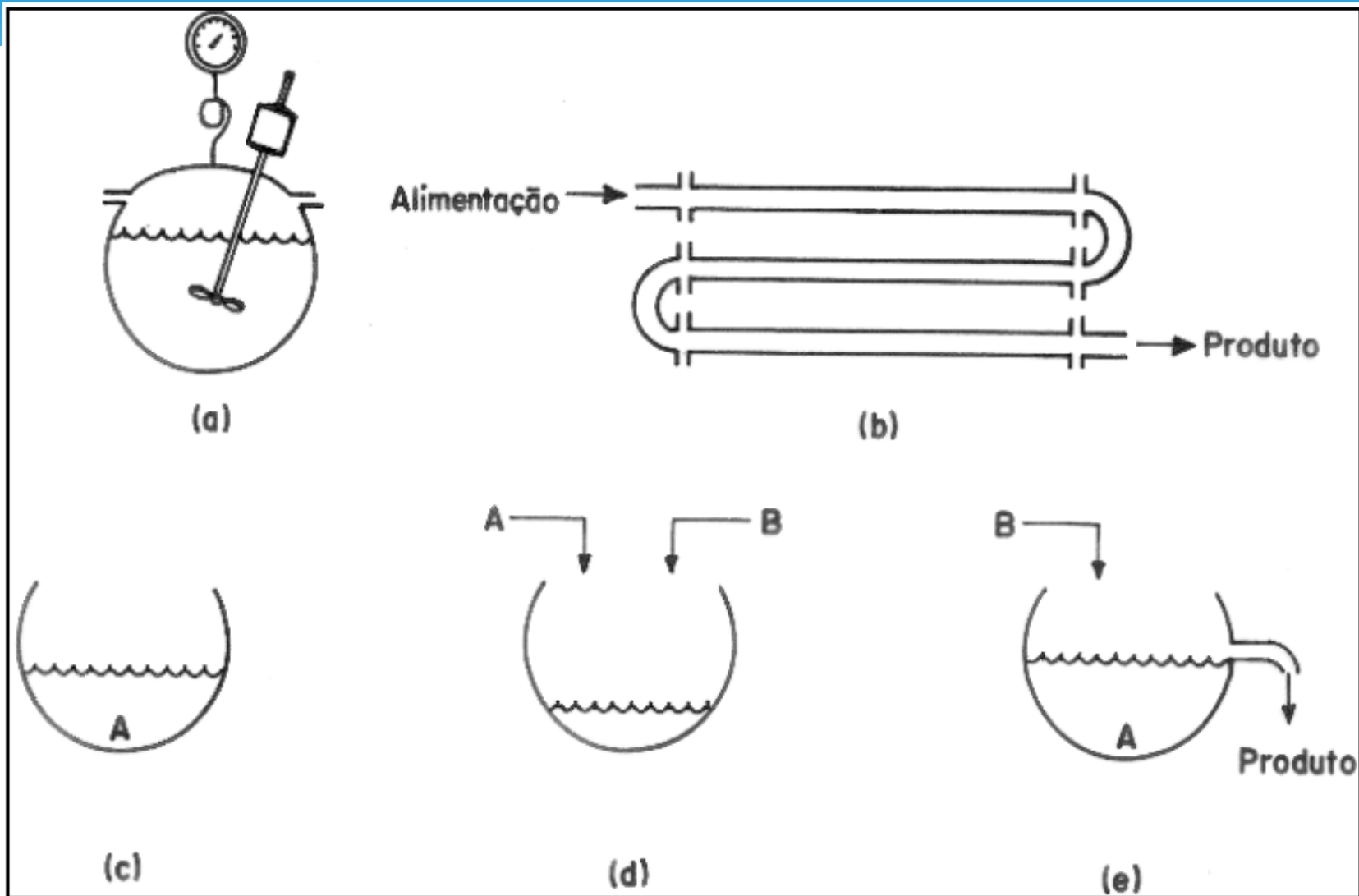


Figura 1 – Formas de alimentação de um sistema (Levenspiel)

EXEMPLO	OPERAÇÃO	VOLUME	COMPOSIÇÃO
(a)	Batelada	Constante	Variável
(b)	Contínua	Constante	Constante (no mesmo ponto)
(c)	Semi Batelada	Variável	Variável
(d)	Semi Batelada	Variável	Constante
(e)	Semi Batelada	Constante	Variável

Tabela 1 - Análise da variação do volume e da composição do meio reacional em função do tempo para diferentes formas de operação de um reator.

Processos contínuos

- * Primeiros sistemas - **dornas ligadas em série**,
 - * com quantidade e tamanhos variados, em cascata,
 - * as primeiras dornas continham cerca de 70% do volume total em fermentação.
- * Com a evolução dos processos da fermentação
 - * otimização dos mesmos com redução dos volumes e do tempo de fermentação com aumentos na produção
- * O processo ainda é em cascata, com melhoramento nos sistemas de agitação e com diferenciado traçado geométrico das dornas.

- * Algumas vantagens observadas na condução dos processos contínuos :
 - * maior produtividade;
 - * menor volume de equipamentos em geral;
 - * amplas possibilidades de total automação e uso da informática;
 - * Redução do consumo de insumos, de uma maneira geral.

Processos contínuos

- * Mais complexo,
- * sistema aberto e sensível à contaminações,
- * maior custo com o meio de cultura,
- * maior investimento no processo downstream (mais produto/dia)

Mais utilizados em bancada para desenvolvimento de processos, não são muito usados industrialmente

CONTROLE DE PROCESSOS

FERMENTATIVOS - Monitoramento

* Parâmetros físicos

- * Tempo
- * Temperatura
- * Atividade de água
- * Pressão
- * Vazão de líquidos
- * Vazão de gases
- * Velocidade de agitação

✓ Parâmetros químicos

- ✓ pH e acidez
- ✓ Sólidos solúveis (°Brix)
- ✓ O₂ dissolvido
- ✓ O₂ na fase gasosa
- ✓ CO₂ na fase gasosa

* Parâmetros biológicos

- * Medidas de crescimento - biomassa
- * Medida de contaminação



Centrifugação separadora do levedo do vinho
- saída do vinho por pressão pelo centro superior

Fermentações Anaeróbicas

Tipo de fermentação	Aplicação	Produto	Microrganismos envolvidos
ALCOÓLICA	Bebidas fermentadas	Cerveja Vinho Sake	<i>Saccharomyces calrsbergensis</i> <i>Saccharomyces uvarum</i> <i>Saccharomyces</i> ; <i>Aspergillus orizae</i>
	Bebidas destiladas	Cachaça Aguardente de frutas Whisky, rum, tequila	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Produtos químicos	Álcool	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Malo - Láctica	Bebidas	Vinhos em geral	Bacterias: <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>
Láctica	Alimentos tradicionais	Queijos, iogurte, leites, fermentados, manteiga	<i>Lactobacillus</i> e outros, como <i>Streptococcus</i> e <i>Penicillium</i>
		Picles, azeitonas, chucrute	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		Pescados	<i>Pediococcus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Leuconostoc</i> . <i>Lactobacillus</i> e outros
Butírica	Produtos químicos	Acetona, butanol	<i>Clostridium</i>

Fermentações Aeróbicas

	Alimentos	Pão, massas	<i>Saccharomyces</i>
Reprodução de microrganismos	Químicos e farmacêuticos	Biopolímeros (plásticos biodegradáveis)	<i>Beijerinckia sp</i>
	Cosméticos	Eritrucelulose	<i>Gluconobacter</i>
	Condimentos	Glutamato monossódico	Leveduras selecionadas
	Fármacos	Penicilina	<i>Penicillium notatum</i>
Acética	Condimento Químico	Vinagre Ácido acético	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>