

DIMENSIONAMENTO DE UMA UNIDADE-PILOTO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA COM DUPLO SISTEMA DE RECICLAGEM CELULAR

Amazile Biagioni R.A. Maia, Ana Maria Domingues Ramos, Jamil Abdo Nunes Raim,
Leonardo José de Paiva, Rodrigo Abramof.

Departamento de Engenharia Química da E. E. UFMG - Belo Horizonte - MG

Recebido em 17/11/88; cópia revisada em 16/05/89

ABSTRACT

A prototype of a settler with inclined parallel plates was constructed and its adaptation for the previous separation of the cells of an alcoholic fermentation medium of high cellular density was studied. The results obtained permitted us to dimension a pilot-unit with a double cellular recycling system for continuous alcoholic fermentation, constituted mainly of a cylindrical fermenter for 16 l of medium, and a previous settler whose underflow, rich in cells, returns to the fermenter while the overflow, with reduced cellular grade, is transferred to an ultrafiltration membrane. A filtrate free of cells was obtained at a rate of 2.1 to 4.2 liters/h when the fermentation was operated with a productivity of 15 to 30 g ethanol/l.h.

I - INTRODUÇÃO

Com o objetivo de dispor de uma montagem eficiente e versátil para a reciclagem celular, numa unidade-piloto destinada a estudos sobre fermentação alcoólica contínua, optou-se primeiramente pelo sistema de ultrafiltração, dada a possibilidade de ajustar a faixa de separação, desde PM 10.000 até diâmetros de partículas da ordem de $1,0\ \mu\text{m}$, variando o tipo de membrana. Esta faixa é de grande interesse para pesquisas, uma vez que permite associar uma eficiência de 100% na separação de células usuais de leveduras a extrações seletivas de macromoléculas, cujo acúmulo no mosto pode afetar o prosseguimento normal da fermentação alcoólica⁴. Além disso, a possibilidade de submeter a biomassa retida na membrana a vários tipos de tratamentos desintoxicantes, antes do retorno ao fermentador, garante a adequação do sistema aos fins propostos^{2,3,7,8}.

Testes operacionais preliminares, utilizando uma membrana de ultrafiltração (PM de separação 100.000), porém, mostraram ser inviável sua utilização para separação de células em mostos contendo os altos teores de biomassa requeridos para fermentações contínuas de alta produtividade⁶, uma vez que ocorre acúmulo de células sobre a membrana, acarretando grande perda de carga na filtração e até mesmo entupimento do sistema. Visando solucionar este problema, bem como dispor de uma montagem que associasse as vantagens da separação por membrana com uma operação prolongada e ininterrupta, decidiu-se projetar e

montar uma unidade com duplo sistema de reciclagem celular, antepondo um sedimentador ao filtro, de modo a reduzir o teor de biomassa no mosto alimentado à membrana de filtração.

Para fins de dimensionamento da montagem em escala-piloto, foram feitos testes preliminares de operação do sistema de ultrafiltração e de um protótipo de sedimentador de placas paralelas inclinadas, cujos resultados se apresentam neste trabalho.

II - PARTE EXPERIMENTAL

2.1 - Montagem

A unidade-piloto proposta acha-se esquematizada na figura 1.

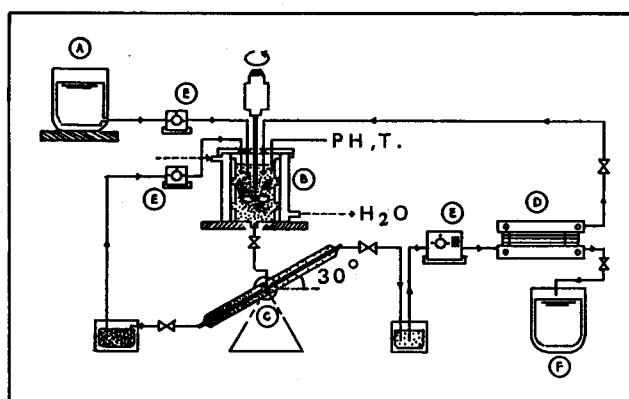


Figura 1 - Esquema da montagem para fermentação alcoólica com duplo sistema de reciclagem celular, composto de:

- (A) Recipiente de meio de fermentação;
- (B) Fermentador cilíndrico, dotado dos controles de pH, temperatura e velocidade de agitação;
- (C) Sedimentador de placas paralelas (descrito em 2.6);
- (D) Sistema Pellicon de filtração em membrana (Millipore);
- (E) Bombas peristálticas;
- (F) Recepção do mosto fermentado e isento de células.

2.2 - Meio de Fermentação

Meio semi-sintético, com a seguinte composição:

Componente	A	B	C
Sacarose comercial	30.0	270.0	172.0
KH ₂ PO ₄ p.a.	5.0	5.0	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ p.a.	2.0	2.0	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O p.a.	0.4	0.4	0.4
Extrato de levedura	3.0	3.0	3.0

Obs.: Quantidades em gramas para 1 litro de meio:

- A - Meio pré-existente no fermentador ("pé-de-cuba"),
- B - Meio alimentado para posta em marcha (etapa descontínuo alimentado),
- C - Meio alimentado durante a operação em regime contínuo.

Como agente da fermentação usou-se o fermento comercial prensado, marca Fleischmann. A desidratação em estufa a vácuo, a 70°C¹, indicou teor de 54% p/p de umidade, em base úmida.

2.3 - Controles

- Teores de substrato (sacarose) e produto (etanol): método rápido, baseado na determinação das densidades do meio filtrado em membrana de 0.45 µm, antes e após a evaporação do etanol; no segundo caso, completava-se o volume evaporado com água destilada. Os resultados encontrados eram levados numa tabela padrão, previamente determinada e devidamente aferida com valores obtidos pelos métodos clássicos de determinação de açúcares e teor alcoólico^{1,10}.
- Biomassa total: determinada por centrifugação a 3000 rpm, durante 10 minutos, e expressa como %v/v (biomassa precipitada nas condições do teste).
- Vazão: determinada cronometrando-se o tempo necessário para completar um volume pré-fixado (20-50ml).

2.4 - Posta em Marcha da Fermentação Contínua

A posta em marcha da fermentação contínua, através do sistema descontínuo alimentado, permite reduzir substancialmente o tempo necessário para a entrada em regime⁵, relativamente aos valores usualmente relatados na literatura^{4,7}. Além disso, a determinação da produtividade nos últimos 30-60 minutos da alimentação, permite ajustar com mais rapidez as vazões adequadas de alimentação do meio e extração do mosto fermentado, ao se iniciar o regime contínuo. Por outro lado, posto que existe uma vazão mínima de alimentação da membrana de ultrafiltração, para evitar entupimento, a produtividade da fermentação alcoólica é o parâmetro que permite fixar o volume mínimo requerido do sistema de fermentação. A verificação da produtividade inicial do sistema a ser operado foi feita como se segue: adicionam-se 1600 gramas de fermento prensado fresco a 3.3 litros do meio pré-existente no fermentador (meio A). O meio usado para início de operação do sistema descontínuo alimentado (meio B) começa a ser adicionado a partir do momento em que o teor de açúcar cai para 0.5-1.0%. A vazão de alimentação é controlada, de modo a não permitir que o teor de substrato ultrapasse 1.0 - 2.0%. Ao se atingir o volume de 11.5 litros do meio de fermentação, o teor de etanol é da ordem de 9 - 10°G.L., e o substrato residual da ordem de 0.5 - 1.0%. A biomassa total é de 200 gramas (base úmida) por litro de meio isento de células, ou 30% v/v, pelo teste de centrifugação. Nas condições descritas, a alimentação do meio B era concluída em cerca de 7-8 horas, com uma produtividade média, nos últimos 60 minutos, na faixa de 14 - 16 g etanol/l.h. Assim, desprezando-se a pequena variação de volume decorrente da conversão, no meio aquoso, do açúcar (sólido) em etanol (líquido) e dióxido de carbono (gasoso), a produtividade de 15 gramas etanol/l.h., ao final da etapa de alimentação do meio B, indica que o mosto deve ser extraído à proporção de 120 g etanol/h, já que o volume de meio isento de células corresponde a aproximadamente 8 litros (70% de 11.5 litros). Essa proporção equivale a 1,52 l/h de mosto a 10°G.L. isento de células), procedendo-se à alimentação do meio de fermentação em regime contínuo (meio C) na mesma vazão.

nuo alimentado (meio B) começa a ser adicionado a partir do momento em que o teor de açúcar cai para 0.5-1.0%. A vazão de alimentação é controlada, de modo a não permitir que o teor de substrato ultrapasse 1.0 - 2.0%. Ao se atingir o volume de 11.5 litros do meio de fermentação, o teor de etanol é da ordem de 9 - 10°G.L., e o substrato residual da ordem de 0.5 - 1.0%. A biomassa total é de 200 gramas (base úmida) por litro de meio isento de células, ou 30% v/v, pelo teste de centrifugação. Nas condições descritas, a alimentação do meio B era concluída em cerca de 7-8 horas, com uma produtividade média, nos últimos 60 minutos, na faixa de 14 - 16 g etanol/l.h. Assim, desprezando-se a pequena variação de volume decorrente da conversão, no meio aquoso, do açúcar (sólido) em etanol (líquido) e dióxido de carbono (gasoso), a produtividade de 15 gramas etanol/l.h., ao final da etapa de alimentação do meio B, indica que o mosto deve ser extraído à proporção de 120 g etanol/h, já que o volume de meio isento de células corresponde a aproximadamente 8 litros (70% de 11.5 litros). Essa proporção equivale a 1,52 l/h de mosto a 10°G.L. isento de células), procedendo-se à alimentação do meio de fermentação em regime contínuo (meio C) na mesma vazão.

2.5 - Requisitos Operacionais para Filtração Contínua em Membrana

A vazão mínima de entrada no sistema de ultrafiltração foi determinada usando um mosto formulado de modo a conter biomassa na proporção de 9% v/v (30% do teor contido no meio de fermentação), etanol a 10% v/v e substrato entre 1.0 e 2.0% p/v. Os testes foram feitos com membrana de polissulfona (Millipore), com PM de separação de 100.000. Nestas condições, encontrou-se ser requerida uma taxa mínima de alimentação de 140 ml/min., de modo a prevenir a deposição de células dentro do sistema de filtração. A vazão do permeado isento de células foi mantida entre 25 e 50% da vazão da alimentação, sem problemas operacionais.

Com base, pois, na vazão mínima para alimentação da membrana de ultrafiltração, e fixando a taxa do permeado em 25% da alimentação, chega-se à vazão do permeado de 35 ml/min., ou 2.1 l/h. Considerando a produtividade média de 15 g etanol/l.h, e o teor alcoólico do mosto 10°G.L., o volume requerido do meio de fermentação ficou estabelecido em cerca de 16 litros (incluído o volume ocupado pelas células).

2.6 - Pré-Sedimentador de Células

Para projeto do pré-sedimentador de células adotou-se a premissa de que a sedimentação celular se faz por mecanismo similar ao da precipitação de uma partícula esférica numa suspensão diluída, a baixo número de Reynolds, cuja velocidade é expressa pela lei de Stokes:

$$V = ((2/9) \cdot R^2 \cdot g (Dp - Dm)/Mm) \quad (1)$$

onde: V = Velocidade de sedimentação,
R = Raio da partícula,
g = Aceleração da gravidade,

D_p = Densidade da partícula,
 D_m e M_m = Densidade e viscosidade do meio líquido,
 respectivamente.

De acordo com a equação (1), o tempo requerido para a precipitação de uma partícula esférica num meio líquido é:

$$t = H/V \quad (2)$$

onde: t = Tempo de sedimentação,

H = Distância percorrida pela partícula até sedimentar.

No sistema em estudo, as partículas correspondem às células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), as quais não se encontram em suspensão diluída, visto operar-se a alta densidade celular (30% v/v). Além disso, o meio não é "estável", posto que as células mantêm certa atividade fermentativa, dentro do sedimentador, que leva ao consumo do açúcar remanescente no meio, com produção concomitante de etanol e dióxido de carbono, (os quais fluem de dentro para fora das células), além de outros metabólitos, que variam conforme a densidade celular e as condições específicas do meio^{7,10}. Contudo, a equação é útil para indicar a tendência do efeito de parâmetros que afetam a velocidade de sedimentação. Dentre estes, somente é possível atuar sobre a densidade e a viscosidade do meio, evidentemente com pequena margem de variação operacional, e a distância a ser percorrida pelas células, no que existe mais ampla flexibilidade.

A figura 2 ilustra tal afirmativa, mostrando de modo esquemático como a inclinação do sedimentador pode favorecer a redução da distância a ser percorrida pelas partículas, e portanto a redução do tempo de sedimentação, relativamente a um sedimentador vertical de igual capacidade.

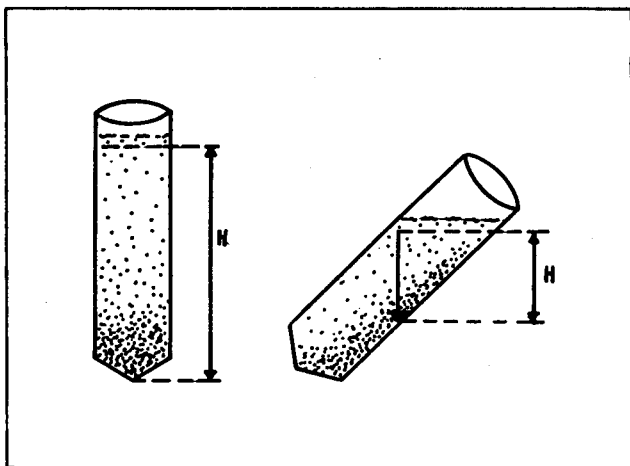


Figura 2 - Esquema ilustrativo do efeito da inclinação do sedimentador sobre a distância (H) a ser percorrida pelas partículas até sedimentarem sobre a parede inferior.

Com base nas considerações acima, optou-se pela montagem de um protótipo de placas paralelas inclinadas, conforme mostrado na figura 3.

O sedimentador era alimentado com mosto formulado, na faixa de teores correspondentes às condições estacionárias previstas no fermentador, a saber: teor alcoólico inicial de 8% v/v, teor de substrato na faixa de 1,0-2,0% p/v e teor

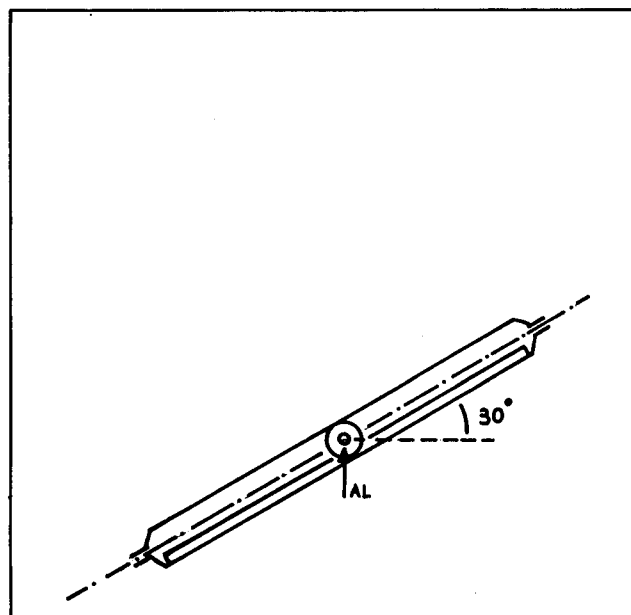


Figura 3 - Esquema do sedimentador de placas paralelas usado para testes de pré-sedimentação.

AL = Alimentação
 EI = Efluente Inferior
 ES = Efluente Superior

de biomassa de 30% v/v (conforme teste de centrifugação). A cada 60 minutos faziam-se as dosagens de substrato e de etanol no meio. Quando o teor de açúcar encontrado estava abaixo de 1,0%, adicionava-se sacarose comercial sólida, em quantidade calculada para recuperar o teor de 2,0%, homogeneizando o mais rapidamente possível. Caso o teor alcoólico ultrapassasse 10% v/v, adicionava-se novo meio formulado, isento de etanol, para retornar ao limite inferior de 8%. Para início de operação, ajustava-se o ângulo de inclinação do sedimentador em 30 graus. O sedimentador era então alimentado através de um tubo perfurado, pela sua altura média, a vazão constante, mantendo a válvula inferior fechada. O tempo de enchimento era controlado em 25-30 minutos. Ao se observar o início de fluxo pela saída superior assinalava-se o "tempo zero", abrindo simultaneamente a válvula inferior. Efetuavam-se então uma série de ajustes na vazão do efluente inferior, de modo a atingir e manter sua concentração celular pelo menos três vezes mais alta que a do efluente superior. A tabela 1 apresenta uma corrida operacional típica, representativa dos resultados obtidos.

Com base nas vazões médias dos efluentes inferior e superior mostradas na tabela acima, deduz-se que o tempo médio de residência do meio no sedimentador foi de 26 minutos. O efluente superior teve uma concentração média de células de 12% v/v, acima, portanto, do valor testado na alimentação da membrana (9% v/v). As vazões médias dos efluentes foram 33 ml/min. para o superior (4.3 vezes menor que o mínimo necessário para alimentação da membrana) e 47 ml/min. para o inferior. Observam-se desvios-padrão elevados correspondentes às vazões da alimentação e do efluente superior. Isso ocorreu porque, tendo-se optado pelo maior rigor no controle da vazão do efluente inferior, a taxa do efluente superior foi apenas medida e não contro-

Tabela 1 – Resultados Operacionais do Pré-sedimentador

Tempo (min.)	Vazão (ml/min.)		Concentração (% v/v)		
	Alim.	Efluente Inferior	Efluente Superior	Efluente Inferior	Efluente Superior
0	–	(22)	(14)	(33)	(13)
40	64	45	19	36	10
55	66	45	21	38	11
70	64	45	19	40	11
90	77	47	30	37	13
110	92	47	45	36	13
125	96	48	48	34	13
145	87	47	40	34	14
165	87	49	38	35	14
185	90	48	42	31	19
210	70	48	32	40	07
220	78	48	30	34	14
240	75	47	28	37	11
260	83	50	33	42	11
Média	79	47	33	36	12
DP	11	1.5	9.6	3.0	2.8

lada, sendo diretamente afetada pelas variações na taxa de alimentação do sedimentador.

III – CONCLUSÃO

Sob condições operacionais que levem a produtividade média de 15 g etanol/l.h, a unidade-piloto destinada a fermentação alcoólica contínua com duplo sistema de separação para reciclagem celular compõe-se de um fermentador com volume útil de 16 litros, de modo a permitir a extração de 2,1 l/h de mosto fermentado, isento de células e contendo 8-10% de etanol, no efluente permeado através da membrana de ultrafiltração, a qual, por sua vez, requer uma taxa de alimentação de 8,4 l/h do efluente superior do sedimentador.

O protótipo de sedimentador testado, com volume total de 2,1 litros, permitiu obter um efluente superior com teor de células de 12% v/v, a uma vazão média de 33ml/min. (aproximadamente 2 l/h). Sendo 140 ml/min. a vazão mínima de alimentação do sistema de ultrafiltração, faz-se necessário um sedimentador 4,3 vezes maior, desde que mantido o desenho original. Neste caso, o volume de meio previsto no sedimentador eleva-se a 9,0 litros. Tendo em vista a operação com tempo de residência 26 minutos, conclui-se que o sedimentador deva ser visualizado como parte integrante do fermentador. Isso porque, havendo disponibilidade de substrato, ocorrerá transformação em etanol de parte substancial do mesmo, dentro do sedimentador: a uma produtividade de 15 g etanol/l.h, e considerando o rendimento da fermentação no sedimentador equivalente ao rendimento obtido no fermentador, 9 litros de mosto correspondem a 56% da capacidade do fermentador (16 litros de mosto), no que tange à produção de etanol.

Por outro lado, há necessidade de aumentar a eficiência de separação no sedimentador, de modo a reduzir em cerca de 25% a concentração celular no efluente superior. Isso pode ser conseguido introduzindo modificações na composição do meio ou na geometria do sedimentador. Na primei-

ra hipótese, procurar-se-ia reduzir o teor de substrato no mosto (a 0,1 - 0,2%, ou menos) e elevar o teor alcoólico (a 9,8 - 10,0%). Tal medida permite favorecer a velocidade de separação, diminuindo e mantendo mais estáveis a densidade e a viscosidade do mosto. Além disso, permite restringir a atividade fermentativa dentro do sedimentador, minimizando o efeito de arraste de células para o efluente superior através do gás carbônico. Por outro lado, descaracteriza a proposta anterior de operação de um sistema conjunto "fermentador-sedimentador". A segunda alternativa, mais exequível e de maior efeito, consiste em procurar reduzir o tempo de sedimentação, seja diminuindo a distância entre as placas da câmara de sedimentação, seja operando o sedimentador a ângulos de inclinação mais baixos (10-20 graus). Deve ser destacado que as considerações anteriores referem-se ao modelo de fermentação e separação originalmente proposto no trabalho (figura 1). Evidentemente podem ser visualizadas modificações no modelo original, capazes de elevar a eficiência global do sistema. Entre elas devem-se destacar as alternativas de acoplamento do sedimentador a um fermentador de múltiplo estágio (reduzindo o teor de biomassa na alimentação do sedimentador), assim como de montagem de placas paralelas em série, permitindo efetuar a etapa da sedimentação em duas ou mais fases sucessivas. Tais estudos acham-se em andamento no Departamento de Engenharia Química da EE. UFMG.

Finalmente, deve ser destacado que os parâmetros da fermentação podem ser modificados e ajustados com vistas ao aumento da produtividade. A elevação da produtividade, por exemplo, a 30 g etanol/l.h, que não é incomum em sistemas contínuos (4,6), permite elevar a capacidade da montagem projetada para extração de 4,2 l/h de mosto fermentado isento de células. Para isso, é suficiente reduzir a relação entre as vazões do retido e do filtrado na membrana, de 3:1 para 1:1.

Trabalho desenvolvido com apoio financeiro da FAPEMIG Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ADAC, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12 ed. Washington, ADAC, 1975.
- Geneix, C. et al. *C.R.Acad.Sc.Paris*, (1983), 296D, 943.
- Lafon-Lafourcade, S. et al; *Appl. Env. Microbiol.* (1984), 47, 1246.
- Lafforgue, C. *Nouvelles conduites operatoires de la fermentation alcoolique*. Toulouse, INSA, 1984.(D.E.A.).
- Lessa, A.S.C. et al; Fermentação alcoólica por processo contínuo. Belo Horizonte, DEQ-UFMG, 1987.(Rel.Técnico).
- Maia, A.B.R.A. et al. Tecnologias alternativas para a fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* (1987), 29, 175.
- Mota, M.J.M.G.; *Inhibition et fermentation alcoolique: quelques concepts non conventionnels*. Toulouse, INSA, 1985. (these Doct).
- Norstrom, K.; *J. Inst. Brew.*, (1964), 70, 223
- Stephanopoulos, G. et al; *Biotechnol. Progress.* (1985), 1, 250.
- Strehaiano, P. Phenomenes d'inhibition et fermentation alcoolique. Toulouse, INPT, 1984. (These Doct.).