

# VARIAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DO CONSUMO DE HEXOSE POR *S. Cerevisiae* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CÉLULAS

L. M. F. LEITE<sup>1</sup>, S. R. ANDRIETTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

<sup>2</sup>. BioContal - Tecnologia em Bioprocessos

## RESUMO

Foram realizados 12 ensaios de fermentação em reatores isotérmicos a 34°C com concentração inicial de hexose de 150 g/L e diferentes concentrações iniciais de células. Esses ensaios mostraram que o consumo específico de substrato caiu de 1,57 g de substrato/g de massa seca.hora (g/g.h) para 0,60 g/g.h quando a massa inicial de célula variou de 3 g/L a 18 g/L. Acima desta concentração de células o valor do consumo específico de substrato manteve-se constante. Utilizou-se dois modelos cinéticos não estruturados para tentar descrever este comportamento, sendo que, um deles apresenta o termo de inibição pela concentração celular. Os parâmetros destes modelos foram ajustados para os dados obtidos no ensaio que utilizou massa de célula inicial de 3 g/L. Os valores de consumo específico de substrato para os demais ensaios foram obtidos por simulação, utilizando-se os parâmetros cinéticos ajustados. Os dados mostraram que ambos os modelos não foram capazes de descrever o comportamento dos dados experimentais, mostrando que as características do meio fermentativo com alta densidade celular podem causar uma resistência à transferência de massa do meio para a superfície da célula. Aparentemente a restrição à transferência de massa pela membrana celular e difusão intracelular podem ser desprezadas.

Palavras chaves: Fermentação alcoólica, processo batelada, consumo específico de substrato.

## ABSTRACT

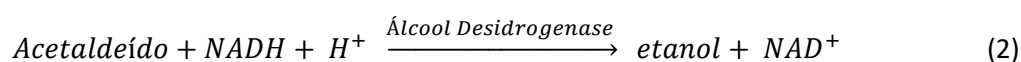
Twelve fermentation tests were carried out in isothermal reactors at 34°C with an initial hexose concentration of 150 g/L and different initial cell concentrations. These tests showed that the specific consumption of substrate dropped from 1.57 g of substrate/g of dry mass.hour (g/gh) to 0.60 g/gh when the initial cell mass ranged from 3 g/L to 18 g/L. Above this cell concentration, the specific substrate consumption value remained constant. Two unstructured kinetic models were used to try to describe this behavior, one of which presents the term inhibition by cell concentration. The parameters of these models were fitted to the data obtained in the assay that used an initial cell mass of 3 g/L. The substrate specific consumption values for the other tests were obtained by simulation, using the adjusted kinetic parameters. The data showed that both models were not able to describe the behavior of the experimental data, showing that the characteristics of the fermentative medium with high cell density can cause a resistance to the transfer of mass from the medium to the cell surface. Apparently, the restriction to mass transfer through the cell membrane and intracellular diffusion can be neglected.



Key words: Alcoholic fermentation, batch process, specific substrate consumption.

## 1. INTRODUÇÃO

A síntese de etanol por meio da fermentação alcoólica ocorre necessariamente em meio anaeróbico, com ausência de oxigênio, com o objetivo de regenerar NAD para a produção de energia celular. As leveduras consomem energia na forma de ATP para realizar as diversas reações metabólicas, incluindo o transporte de moléculas e íons através da membrana contra um gradiente de concentração. A fermentação a partir do piruvato segue a seguinte sequência (FERREIRA, 2005; TOSSETO, 2002):



Uma vez que o metabolismo anaeróbico não combina elétrons com aceptores de elétrons externos, como ocorre na respiração com metabolismo aeróbico, um balanço simples de oxidação-redução pode ser aplicado à utilização de substrato e formação de produto final na fermentação (FERREIRA, 2005; TOSSETO, 2002).

Para descrever a fermentação alcoólica existem inúmeros modelos, na sua maioria não estruturados. Estes modelos são adotados por possuírem parâmetros que podem ser determinados através de ensaios cinéticos simples, que podem ser corridos em escala de laboratório, o que não pode ser feito quando se utiliza modelos estruturados cujo ajuste é sempre realizado por programas computacionais criados para este fim (STREMEL, 2001; PORTO, 2005; FERREIRA, 2003).

Foi observado em experimentos em escala de bancada que existe uma queda da velocidade específica de consumo de substrato com o aumento da concentração de células no meio fermentativo.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a interferência da variação no consumo específico de substrato no ajuste de modelos cinéticos não estruturados para diferentes concentrações de células no meio fermentativo em reatores operando em batelada. Estes ensaios foram realizados após a constatação de desvios entre dados reais de uma planta industrial e os dados obtidos por modelagem. Tosseto (2002) resolveu parcialmente o problema adicionando ao modelo descrito na Equação (12) um termo de inibição pela concentração celular.

### 1.1 MODELAGEM DE UM REATOR BATELADA PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Para a modelagem de um reator batelada considera-se que o mesmo tem o comportamento de um reator de mistura perfeita, ou seja, a concentração de hexose, células e etanol é a mesma em todos os pontos do reator. Qualquer desvio da idealidade é facilmente corrigido, melhorando-se o sistema de agitação (ANDRIETTA, 1994).



### Balanço de massa global

Durante a fermentação alcoólica, tem-se a produção de dióxido de carbono na proporção 0,9567 g de CO<sub>2</sub> / g de etanol produzido. A densidade do meio em fermentação se altera segundo a Equação (3) (ANDRIETTA, 1994).

$$D = 0,004342 x \frac{S}{10} + 0,996234 \quad (3)$$

Em que: S – Concentração de hexose no meio fermentativo

Desta forma, pode-se escrever a equação de balanço geral do reator como na Equação (4)

$$\frac{d(DV)}{dt} = -0,9567 x \frac{d(PV)}{dt} \quad (4)$$

Em que: DV – Massa contida no reator

d(PV)/dt – Massa de etanol produzida no reator

### Balanço de massa celular

O balanço de massa celular no reator está mostrado na Equação (5) (ANDRIETTA, 1994).

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_x \cdot V \quad (5)$$

Em que: XV – Massa de células contida no reator

$r_x$  – Taxa de crescimento celular no reator

V – Volume de reação

A velocidade específica de crescimento microbiano ( $\mu$ ) é definida na Equação (6)

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \text{ ou } r_x = \mu \cdot X \quad (6)$$

Em que: X – Concentração de células

Substituindo a Equação (5) em (6) tem-se a Equação (7) que descreve a variação da massa celular em função do tempo no reator.

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu \cdot X \cdot V \quad (7)$$

### Balanço de substrato

O balanço de substrato para um reator de mistura perfeita operando em batelada é mostrado na Equação (8) (ANDRIETTA, 1994).

$$\frac{d(SV)}{dt} = -r_s \cdot V \quad (8)$$

Em que: SV – Massa de substrato contida no reator

$r_s$  – Taxa de consumo de substrato

Considerando o rendimento em células ( $Y_{x/s}$ ) constante ao longo do processo fermentativo, tem-se:

$$Y_{x/s} = \frac{dX/dt}{-dS/dt} = \frac{r_x}{r_s} \text{ ou } r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} \quad (9)$$

Substituindo a Equação (9) na Equação (8) tem-se a equação que descreve a variação da concentração de substrato no reator em função do tempo.

$$\frac{d(SV)}{dt} = -\frac{r_x}{Y_{x/s}} \cdot V = -\frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{x/s}} \quad (10)$$

### Balanco de produto

O balanço de produto para este reator está mostrado na Equação (11) (ANDRIETTA, 1994).

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_p \cdot V \quad (11)$$

Em que: PV – Massa de produto contida no reator

$r_p$  – Taxa de produção de etanol

Considerando o rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) constante ao longo do processo fermentativo, tem-se:

$$Y_{p/s} = \frac{dP/dt}{-dS/dt} = \frac{r_p}{r_s} \text{ ou } r_p = Y_{p/s} \cdot r_s \quad (12)$$

Substituindo a Equação (12) na Equação (11), tem-se:

$$\frac{d(PV)}{dt} = Y_{p/s} \cdot r_s = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X \cdot V \quad (13)$$

## 1.2 MODELO CINÉTICO UTILIZADO

Para este estudo, foram utilizados dois modelos cinéticos descritos pelas Equações (14) e (15) (TOSSETO, 2002).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{S+K_S+\frac{S^2}{K_i}} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \quad (14)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{S+K_S+\frac{S^2}{K_i}} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^m \quad (15)$$

Em que:  $S$  - concentração de substrato limitante

$K_S$  - constante de Monod, sendo dependente do tipo de microrganismo e das condições de cultura.

$K_I$  – Termo de inibição pelo substrato

$n$  e  $m$  – constantes para o ajuste do modelo cinético.

$P_{m\acute{a}x}$  – Concentração máxima de produto em que cessa o crescimento celular

$X_{m\acute{a}x}$  – Concentração máxima de célula em que cessa o crescimento celular



$\mu_{m\acute{a}x}$  – velocidade específica máxima

O modelo apresentado pela Equação (14) leva em consideração a inibição e limitação pelo substrato, além da inibição pelo produto. Já o modelo apresentado pela Equação (15) também leva em consideração a inibição pela concentração de célula.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO ESPECÍFICO DE SUBSTRATO

Vários ensaios foram realizados em escala de laboratório com o objetivo de se determinar a influência da concentração celular no meio fermentativo com a velocidade de conversão.

Estes ensaios foram corridos em fermentadores de 5 Litros operando em batelada com temperatura controlada a 34°C e concentração inicial de substrato a 150 g/L. Foram realizados 12 ensaios com concentração inicial de células variando entre 3 e 36 g/L.

O tempo necessário para o consumo total de substrato foi determinado pela ausência de produção de CO<sub>2</sub> detectada quando a variação da massa do fermentador ficou abaixo de 0,1 g/h.

Desta forma, conhecendo-se a concentração de hexose no vinho fermentado e a massa de hexose alimentado ao reator foi possível determinar a massa de hexose consumida. Sabendo-se a massa de célula utilizada como inóculo e o tempo gasto para o consumo completo dos açúcares foi possível calcular o consumo específico de substrato (g hexose/g massa seca.h).

As análises de concentração de hexose no meio fermentativo e no vinho fermentado foram realizadas por cromatografia líquida utilizando detector de índice de refração.

### 2.2 AJUSTE DO MODELO

Com os perfis de concentração de substrato, células e etanol no ensaio 3 g/L de massa inicial de células foram ajustados os parâmetros cinéticos de ambos os modelos utilizados. Com os valores destes parâmetros ajustados foram simulados os perfis de concentração de substrato, etanol e células para os demais ensaios com diferentes concentrações de células iniciais. Os resultados destas simulações forneceram os valores estimados pelo modelo para o tempo necessário para consumo de todo o substrato, permitindo obter os valores de consumo específico de substrato para cada ensaio e para cada modelo.

### 2.3 SIMULAÇÃO DO REATOR

Para simular o reator foi utilizado o programa simulador MGSA.Bat, criado para simulação de fermentações alcoólicas em reatores bateladas, fazendo-se uso dos parâmetros cinéticos ajustados para o ensaio com massa inicial de 3 g/L.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados de consumo específico de substrato para os ensaios realizados.

Tabela 1. Consumo específico de substrato pelas células de leveduras para diferentes massas de células utilizadas como inóculo (Dados experimentais)

Células (gMS/L)	Tempo Real (h)	Conc. ART Inicial (g/L)	Volume Inicial (L)	Massa ART Inicial	Massa Inicial células	Cons. Esp ART real
3	31,87	150,00	5,00	750,00	15,00	1,57
6	24,58	150,00	5,00	750,00	30,00	1,02
9	20,53	150,00	5,00	750,00	45,00	0,81
12	17,65	150,00	5,00	750,00	60,00	0,71
15	15,42	150,00	5,00	750,00	75,00	0,65
18	13,60	150,00	5,00	750,00	90,00	0,61
21	12,05	150,00	5,00	750,00	105,00	0,59
24	10,72	150,00	5,00	750,00	120,00	0,58
27	9,54	150,00	5,00	750,00	135,00	0,58
30	8,49	150,00	5,00	750,00	150,00	0,59
33	7,53	150,00	5,00	750,00	165,00	0,60
36	6,66	150,00	5,00	750,00	180,00	0,63

Observa-se pelos dados da Tabela 1 que o consumo específico de substrato diminui com o aumento de concentração de massa celular. Esse efeito é observado nas concentrações iniciais de células de 3 a 18 g/L, variando de 1,57 g/g.h a 0,61 g/g.h. A partir da concentração inicial de células de 18 g/L o valor do consumo específico de substrato permaneceu praticamente constante em torno de 0,6 g/g.h.

Este fato pode estar relacionado a inibição do crescimento celular pela concentração de células ou por restrição de transferência de massa devido a alta concentração de células no meio fermentativo (de  $5 \times 10^7$  a  $6 \times 10^8$  cel/mL).

Para avaliar se a causa desta redução está associada às inibições ao crescimento celular, foram utilizados os dados das simulações realizadas para os ensaios com diferentes concentrações de células iniciais considerando um modelo com e outro sem inibição pela massa células, onde se considerou a limitação de transferência de massa externa às células desprezíveis e a reação sendo rápida o suficiente para considerar que a mesma ocorre na superfície do microrganismo, desprezando assim o efeito de transferência de massa pela membrana e difusão interna das células.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos por meio do ajuste dos dados experimentais do ensaio corrido com concentração inicial de células de 3 g/L que foram utilizados nas simulações dos demais ensaios para determinar o tempo necessário para o consumo total de substrato e conseqüentemente o valor do consumo específico de substrato para ambos os modelos.



Tabela 2. Parâmetros considerados para os modelos cinéticos

Parâmetro	Valor	Unidade
$\mu_{m\acute{a}x}$	0,105	$h^{-1}$
$K_S$	6,0	$g.L^{-1}$
$K_i$	58,0	$g.L^{-1}$
$P_{m\acute{a}x}$	180,0	$g.L^{-1}$
$X_{m\acute{a}x}$	110,0	$g.L^{-1}$
N	2	-
M	1	-

A 1 mostra as curvas de consumo específico de substrato em função da concentração de células no meio para ambos os modelos e para o dado experimental.

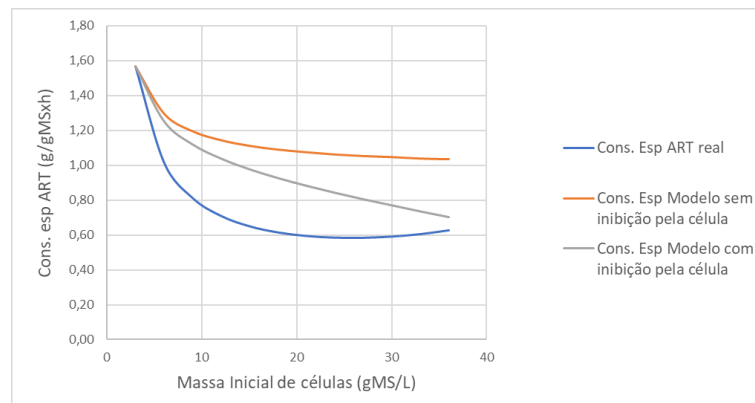


Figura 1. Curvas de consumo específico de substrato em função da concentração de células no meio: Experimentais, Modelo cinético I e Modelo cinético II

Observa-se pelos perfis contidos na Figura 1 que nenhum dos dois modelos testados foi capaz de descrever a queda do consumo específico de substrato com o aumento da concentração de células no meio fermentativo. O modelo com inibição pela concentração celular, apesar de se aproximar mais dos valores experimentais, mostrou um perfil que não corresponde ao obtido nos dados experimentais. Já o modelo sem a inibição pela concentração de células mostrou uma diferença maior para os dados experimentais, mas um perfil similar ao apresentado por estes. De uma forma geral, os dois modelos utilizados não foram capazes de descrever com precisão a queda do consumo específico de substrato com o aumento da concentração celular, mostrando que um efeito não vinculado com a cinética microbiana é responsável pelo desvio.

Com base em dados da literatura, pode-se afirmar que o etanol tem passagem livre pela membrana, o que não ocorre com as hexoses utilizadas como substrato. Estas tem sua entrada regulada. Estudos realizados por diferentes autores mostram que quando presente no meio glicose e frutose, a glicose tem preferência no consumo. Quando somente um destes açúcares estão presentes, a velocidade de

consumo é praticamente a mesma, mostrando que existe uma certa seletividade induzida quando dois substratos estão presentes no meio.

Considerando fermentações com um único substrato, com base nos resultados de consumo específico obtidos nos ensaios de laboratório, pode-se afirmar que aparentemente existe uma limitação de transporte de substrato até a membrana celular, devido à alta concentração de células no meio. Assim, pode-se desprezar a interferência da parede no transporte de substrato de fora para dentro da célula quando um único substrato é utilizado. Na presença de dois substratos o modelo proposto por Andrietta 2003 descreve satisfatoriamente esta seletividade por afinidade dos transportadores.

O etanol tem passagem livre pela membrana e sua concentração no interior das células deve ser um pouco mais elevada que no meio em fermentação. Em células saudáveis, nota-se uma boa relação entre o etanol produzido e o substrato consumido, mostrando que a velocidade de entrada de substrato e saída de produto se correlacionam muito bem. Assim, pode-se afirmar que o efeito da membrana na velocidade de saída de etanol da célula parece ser desprezível. Em caso de problema de acúmulo de etanol nas células, devido a problemas na membrana será facilmente detectado com o aumento da concentração de ácido acético e acetaldeído no meio em fermentação, produtos de desvio metabólico pela redução de velocidade da transformação de acetaldeído para etanol, catalisada pela enzima álcool desidrogenase.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi observado uma diminuição do consumo específico de substrato relacionada ao aumento da concentração de células no meio fermentativo entre 3 e 18 g/L, diminuindo de 1,57 para 0,6 g/g.h.

Em concentrações de células acima de 18 g/L não foi observada variação no consumo específico de substrato.

Os modelos cinéticos, ajustados para concentração inicial de célula de 3g/L não foram capazes de descrever a queda do consumo específico de substrato.

Apesar do modelo que leva em consideração a inibição pela concentração celular mostrar menor desvio em relação aos dados experimentais, este não manteve o perfil observado pelos dados experimentais, portanto não representa de forma adequada o fenômeno.

Com base nos dados observados pode-se afirmar com certa segurança que os desvios observados entre os modelos e os dados experimentais devem estar associados a um fenômeno de transferência de massa do meio fermentativo para a superfície da membrana celular.

Provavelmente a resistência de transferência de massa causada pela membrana celular e difusão interna às células de substrato e etanol podem ser desprezadas, levando-se em consideração que a variação da concentração de substrato e etanol no meio fermentativo estão associadas, ou seja, a produção de etanol e o consumo de substrato estão proporcionalmente relacionadas.



## **BIBLIOGRAFIA**

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial.** 197 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1994.

FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada.** 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2005.

FERREIRA, R. M. **Modelagem e simulação de biorreatores tipo torre operando com leveduras auto-imobilizáveis para produção de etanol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade de Campinas. 2003.

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2005.

STREMEL, D. P. **Desenvolvimento de modelos estruturados alternativos para o processo de produção de etanol.** 283 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2001.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol.** 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2002.

