

**INSTRUMENTAÇÃO E AUTOMAÇÃO DE REATORES PARA DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS**Rafael Frederico Fonseca<sup>1</sup>, Cristiane Sanches Farinas<sup>2</sup>, Victor Bertucci-Neto<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>*Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trab. São Carlense, 400, São Carlos, SP, 13566-590*<sup>2</sup>*Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, São Carlos, SP, 13560-70*<sup>\*</sup>*Autor correspondente, e-mail: victor.bertucci@embrapa.br*

**Resumo:** Em um esforço conjunto de várias áreas do conhecimento foram desenvolvidas técnicas para avaliar o desempenho da produção de enzimas em fermentação sólida. Isto resultou em vários trabalhos acadêmicos e novas tecnologias incluindo no desenvolvimento de um reator de colunas e outro do tipo tambor agitado em escala pré-piloto. Esses equipamentos automatizados são potenciais geradores de novos processos de fermentação sólida, ajudando a indicar caminhos para se decidir sobre a viabilidade de escalonamento superior de diferentes processos.

**Palavras-chave:** fermentação, sólida, reator, enzima, automação.

***INSTRUMENTATION AND AUTOMATION OF REACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF SOLID STATE FERMENTATION PROCESSES AND ENZYME PRODUCTION***

**Abstract:** In a joint effort involving multiple areas of research techniques were developed to evaluate the performance of enzyme production on solid state fermentation. This resulted in many academic works and new technologies, including the development of a column reactor and a stirred drum reactor in pre-pilot scale. These automated equipments can potentially introduce new solid state fermentation processes indicating new ways to decide on the viability of scaling up of different process.

**Keywords:** fermentation, solid, reactor, enzyme, automation

**1. Introdução**

Há pouco mais de 10 anos iniciaram-se vários esforços na Embrapa Instrumentação incentivados por diferentes projetos de pesquisa para o desenvolvimento de processos de produção de celulasas a partir de Fermentação em Estado Sólido (FES). A produção dessas enzimas de forma eficiente é um dos gargalos para assegurar a viabilidade econômica de rotas de hidrólise enzimática para a produção de etanol celulósico (KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004; HAHN-HAGERDAL et al., 2006, FARINAS et al., 2011). Um processo de FES é basicamente o crescimento de microrganismos em substrato sólido com umidade suficiente para manter o crescimento e metabolismo, ou seja, sem água livre (RAHARDJO et al., 2006), apresentando algumas vantagens em relação à Fermentação Submersa, produzindo mais enzimas por unidade de volume fermentado, maior estabilidade térmica e menor susceptibilidade em relação a inibição por substrato (HOLKER et al., 2004), além de permitir o uso de resíduos agroindustriais como substrato e menor uso de água. Em geral, faz-se, inicialmente, uma varredura nas condições de fermentação em escala de bancada para cada espécie de microrganismo, onde são usados placas de Petri e erlenmeyers, dentre outros, para se obter uma caracterização inicial do processo. Tendo as espécies selecionadas é preciso aumentar a escala do processo. Dentre os diversos tipos de reatores de FES o modelo baseado em colunas aeradas (DURAND, 2003) é vantajoso por permitir a simulação de inúmeras condições do processo quando se varia a temperatura do meio, fluxo de ar e tipo de substrato. Cada coluna pode simular uma condição específica do processo a ser escalonado. Dessa forma, foi desenvolvido inicialmente na Embrapa Instrumentação um reator automatizado de FES que possui até 20 colunas que podem ser monitoradas simultaneamente ao longo do processo. Com o uso

intensivo desse equipamento foi possível aprofundar os conhecimentos relativos a alguns processos de FES de forma a avaliar a possibilidade de um escalonamento superior em determinadas condições físicas de operação. A etapa seguinte foi a de desenvolvimento de um reator em escala pré-piloto. Dentre os modelos mais estudados, escolheu-se o de tambor com agitação por pás de forma a tornar o meio mais homogêneo possível. Através dessa sequência de etapas pode-se então avaliar de forma mais clara a viabilidade de vários processos de FES desde que sejam compatíveis em condições físicas com os reatores desenvolvidos.

## 2. Materiais e Métodos

No reator de colunas manteve-se como princípio de funcionamento uma razão entre fluxo de ar seco com outro de ar saturado com água de forma a obter um fluxo de ar constante com umidade também constante, conforme a necessidade do operador. O sistema é composto de uma entrada de ar saturado de água e outra de ar seco. Cada uma dessas linhas de entrada possui um controlador de fluxo de massa de 0 a 1 litro/minuto comandados por sinais elétricos entre 0 e 5 volts DC com saída elétrica proporcional à medida de fluxo. As tubulações de ar seco e úmido são ligadas entre si para fazer a mistura ajustada pelos comandos. Um conjunto sensor mede a umidade relativa e a temperatura do ar resultantes dessa mistura. Um segundo conjunto sensor mede a concentração de CO<sub>2</sub> na saída de cada coluna aerada. O sistema pode comportar até 20 colunas aeradas com o mesmo valor de fluxo, umidade, e temperatura do ar. Todos os componentes relacionados ao fluxo de ar (colunas de fermentação e tubulação) são imersos em banho com temperatura controlada. Um sistema mecânico divide a taxa de fluxo igualmente para todas as colunas. As medidas são armazenadas através de uma placa de aquisição de dados com canais de entradas e saídas analógicas e digitais para monitoramento e acionamento. A sequência de medidas, armazenamento de dados, desenhos de gráficos em tempo real, e acionamento dos controladores de fluxo de massa, é feita com auxílio de um pacote de programação por interface gráfica, LabView, da National Instruments. Este pacote permite o desenvolvimento de instrumentos virtuais que fazem interface com placas de aquisição de dados, a exemplo do que foi usado no sistema. As medidas e acionamentos são feitas em intervalos de tempo escolhidos pelo operador (BERTUCCI-NETO et al. 2011; FONSECA, 2012, FARINAS et al. 2011). Na Figura 1 vê-se a representação da montagem do reator de colunas.



Figura 1. Representação esquemática do Reator de FES em colunas aeradas.

Quanto à construção do reator de tambor agitado foram considerados os controles de fluxo de ar, da agitação e da temperatura do meio. Devido à ausência de água livre no meio torna-se difícil remover o calor produzido frente aos baixos coeficientes de trocas térmicas do meio, prejudicando a capacidade de controle e repetição do processo. Cada tipo de reator possui uma característica para remoção apropriada de calor e segundo a literatura os do tipo bandeja, ou tipo tambor rotativo/agitado são mais adequados para produção de enzimas. Portanto, o controle de temperatura do meio é crucial para o sucesso da operação. As etapas a serem consideradas são: controle da agitação (acionando motor de passo com velocidades entre 0,5 e 3,2 rpm), do fluxo de ar (acionando dois controladores de 0 a 5 litros/minuto, um para ar seco e outro para úmido) e da temperatura das paredes externas com monitoramento da temperatura meio através de uma sonda (o sistema de aquecimento do reator foi constituído resistência elétrica de 250W, duas placas de

alumínio e oito dissipadores para de alumínio), além da programação em computador para gerenciar todo o sistema. A Figura 2 ilustra a montagem em vista superior frontal. O ar frio, soprado por um ventilador colocado no alto da peça, é forçado através dos dissipadores e aquecido nesse processo. O ar é então direcionado perpendicularmente pela parte de baixo do biorreator e circulado ao redor deste. O acionamento da resistência elétrica é feito através de um relé. O ciclo de acionamento da potência é de 30 segundos e o tempo de acionamento, calculado por um controlador (FONSECA, 2016). O volume útil do reator é da ordem de 10 litros.

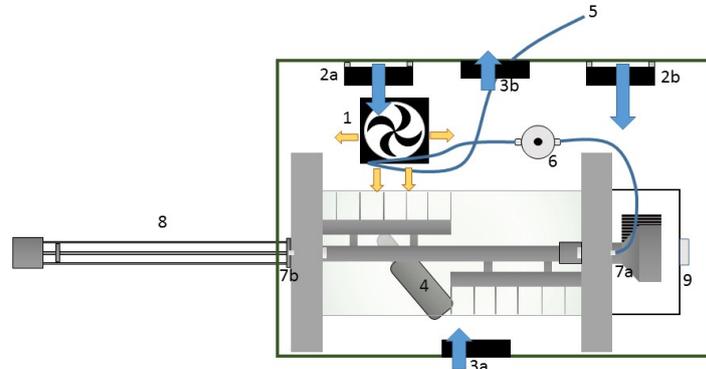


Figura 2. Vista superior do reator. 1- Aquecedor da cuba e da linha de alimentação de ar; 2 a, b- ventiladores para circulação interna de ar; 3 a, b- entrada e saída de ar forçada para refrigeração da cuba; 4- sensor da temperatura interna da cuba; 5- linha de alimentação de ar; 6- sensor de temperatura e umidade relativa do ar que alimenta o reator; 7a entrada de ar do biorreator e 7b- saída de ar; 8- sonda de temperatura do meio; 9- suporte metálico para conectores eletrônicos e proteção do conjunto motor/redução. As setas indicam o sentido do fluxo de ar, as setas laranjas representam o ar aquecido.

Os microrganismos usados neste trabalho estão no Cadastro de Acesso N° A9C5CF5.

### 3. Resultados e Discussão

Para o funcionamento adequado de cada sistema é fundamental o desenvolvimento de programas de gerenciamento de equipamentos. Na Figura 3 vê-se o painel frontal do reator de tambor agitado e na Figura 4 detalhe da programação visual feita em LabView.

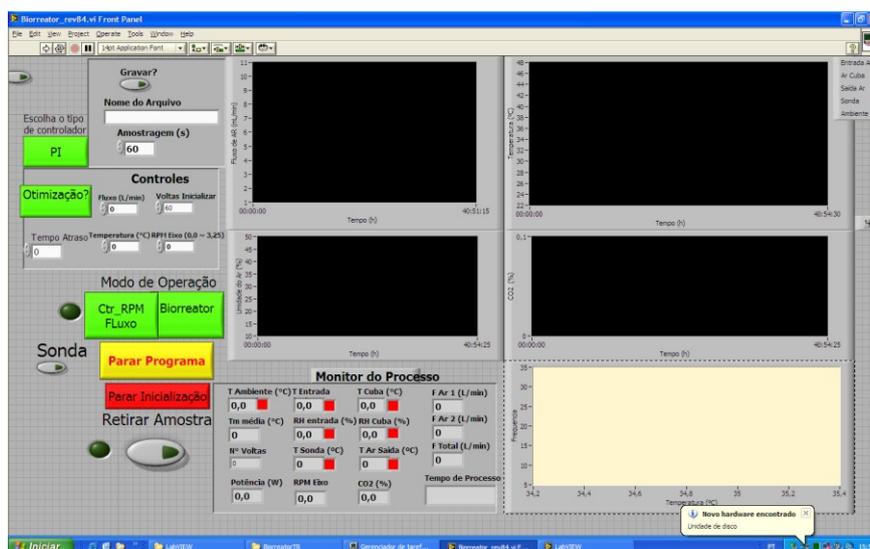


Figura 3. Painel frontal do instrumento virtual feito em LabView para reator tambor agitado.

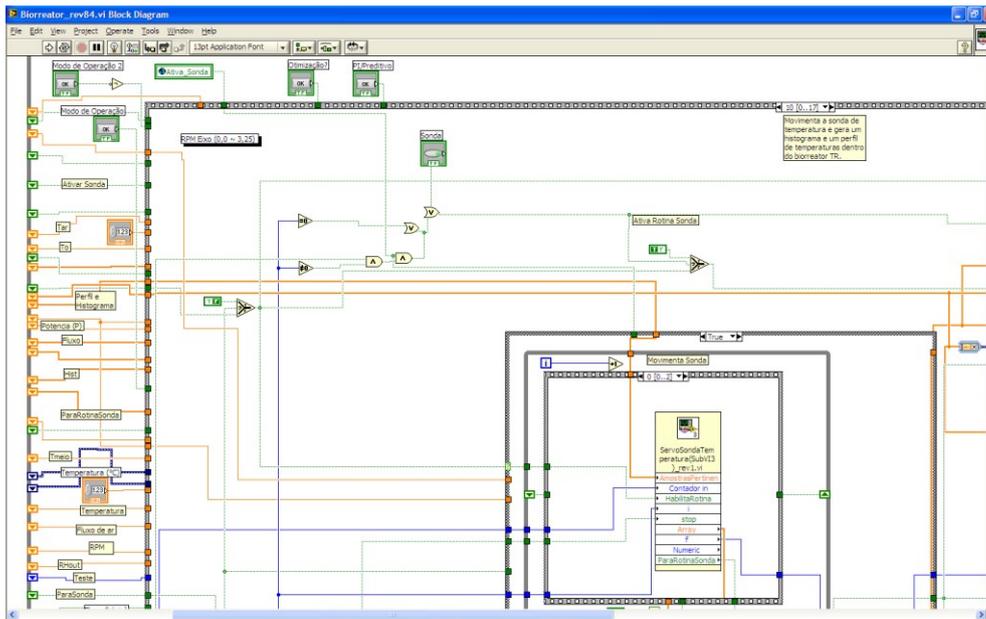


Figura 4. Trecho da programação visual de instrumento virtual feito em LabView para reator tambor agitado.

Na Figura 5.1 vê-se o comportamento da respiração dos microrganismos (fungo *Aspergillus niger* 3T5B8), pela medida da concentração de  $CO_2$  em cada coluna do reator de FES para as mesmas condições ambientais. Na Figura 5.2 vê-se a evolução da produção de endoglucanase e do crescimento microbiano, em medidas reais e simuladas. Em 6.2.(a) e (d)  $T_m=37^\circ C$ , em (b) e (f)  $T_m=30^\circ C$  e em (c) e (g)  $T_m=27^\circ C$ , sendo  $T_m$  a temperatura do meio. Em (a), (b) e (c) os losangos pretos mostram os dados experimentais. Em (d), (e) e (f) as linhas pretas mostram os dados experimentais de  $CO_2$ . O perfil de cores mostrado indica a frequência com que um determinado evento ocorreu durante os experimentos (FONSECA, 2018).

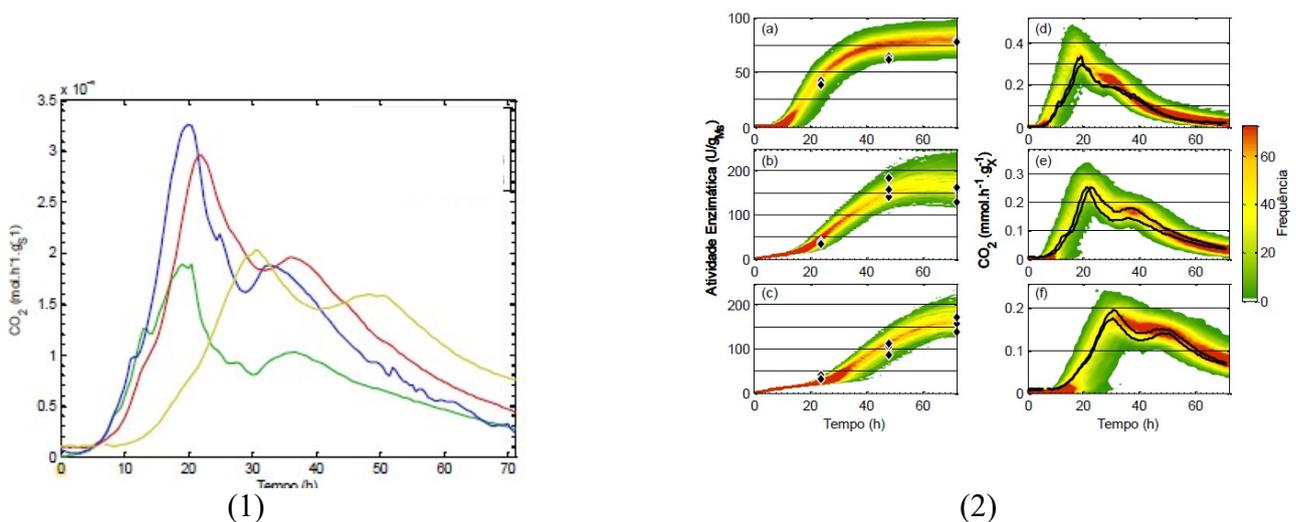


Figura 5.1. Comportamento da respiração dos microrganismos. 5.2 Evolução da produção de endoglucanase e do crescimento microbiano, em medidas reais e simuladas.

#### 4. Conclusões

O desenvolvimento dos reatores em escalas distintas (coluna e tambor agitado) possibilitou a realização de diversos trabalhos de pesquisa mostrando um grande potencial para estudos de

viabilidade econômica e tecnológica de novos processos de produção de enzimas, os quais não se limitam apenas a ramos de energia, mas também aos de alimentos, cosméticos, e tratamento e aproveitamento de resíduos, entre outros.

### Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo projeto de pesquisa Embrapa 13.14.09.004.00.00

### Referências

- BERTUCCI NETO, V., FONSECA, R. F., PIROTA, R. D. P. B., FARINAS, C. S.. Sistema Automatizado para Processos de Fermentação em Estado Sólido: Produção de Enzimas pelo Fungo *Trichoderma harzianum*. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, Mar 2003.
- FARINAS, C., VITCOSQUE, G. L., FONSECA, R. F., BERTUCCI-NETO, V., COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, JUL 2011 2011.
- FONSECA, R. F. Sistema de Controle de fluxo, temperatura e umidade relativa do ar para processos de fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.
- FONSECA, R. F. Dinâmica, Otimização e Controle de Processos de Fermentação em Estado Sólido: Desenvolvimento de Metodologias em Escala Laboratorial. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.
- FONSECA, R. F., MELO, C. C. B., SANCHES, B. C. P., BERTUCCI-NETO, V., FARINAS, C. S., KWONG, W. H. Modelling of Solid-State Fermentation over Wide Operational Range for Application in Process Optimization. *THE CANADIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING*, VOLUME 96, AUGUST 2018.
- HAHN-HAGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F., LIDÉN, G., ZACCHI, G., 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24, 549-556.
- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, n. 2, p. 175-186, Apr 2004.
- KNAUF, M., MONIRUZZAMAN M., 2004. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *Int. Sugar J.* 1263, 147-150.
- RAHARDJO, Y.S.P., TRAMPER, J., RINZEMA, A., 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 24, 161–179.