



## INFORMAÇÕES GERAIS DO TRABALHO

**Título do Trabalho:** Monitoramento e controle de processo de fermentação enzimática

**Autor(es):** Lucas José Rodrigues Marinelli, Bruna Stefany Pereira, Deivisson Da Silva Tereza, Gabriela de Lima Ribeiro, Paula Caroline Oliveira Machado, Michelle Mendes Santos, Virgil Del Duca Almeida, Flávia de Faria Siqueira

**Palavras-chave:** Fermentação, Enzima, Monitoramento, Automação, Microbiologia

**Campus:** Betim

**Área do Conhecimento (CNPq):** Microbiologia; Automação Industrial

### RESUMO

As enzimas têm ganhado um crescente alcance tecnológico, com aplicações em indústrias têxtil, de papel e celulose, de ração animal, de detergentes, de alimentos e bebidas, dentre outras. Neste trabalho, enzimas bacterianas foram aplicadas na obtenção de um agente antimicrobiano que vem sendo aplicado como um conservante de alimentos natural. O objetivo principal é a construção um sistema automatizado de controle de parâmetros que influenciam o processo de fermentação biológica, dos quais alguns resultados preliminares foram apresentados. Foram avaliados meios de cultura alternativos, a fim de identificar opções econômicas e também eficientes para crescimento da linhagem bacteriana trabalhada. Após conhecer as características das etapas do processo, foi realizado um levantamento das variáveis a serem medidas e das variáveis a serem controladas, o que contribuiu para a montagem de uma representação gráfica do processo, bem como a elaboração de um protótipo inicial usando o software Elipse E3.

### INTRODUÇÃO:

A Biotecnologia proporciona inovadoras possibilidades para a produção de substâncias e processos, apresentando soluções para atender à humanidade em suas mais diferentes necessidades (alimentos, energia, medicamentos) (Pereira-Jr et al., 2008). Além disso, muitos processos e produtos biotecnológicos são capazes de superar tecnologias que poluam o ambiente ou que contribuam para a diminuição dos recursos naturais, sendo uma alternativa mais sustentável. Nesse contexto, as enzimas - além de sua importância biológica - tem ganhado um crescente alcance tecnológico, com aplicações em indústrias têxtil, de papel e celulose, de ração animal, de detergentes, de alimentos e bebidas, dentre outras. E uma promissora aplicação das enzimas, apresentada nesse trabalho, é o uso delas na obtenção de um agente antimicrobiano que vem sendo aplicado como um conservante de alimentos natural.

As indústrias de alimentos e bebidas possuem relevante espaço para a economia do país e seus produtos equivalem a 9% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil. Embora haja uma variedade de técnicas de conservação disponíveis, a intoxicação alimentar e deterioração por microorganismos continuam sendo as principais preocupações na indústria de alimentos. Dados da OMS apontam que 20% dos alimentos produzidos são perdidos por deterioração (Food Ingredients Brasil, 2011). Aliado a isso, é crescente o número de consumidores que exigem da indústria de alimentos a diminuição de uso de aditivos químicos para obtenção de alimentos mais seguros, visando o retardo das ações microbianas deteriorantes que conduzem o alimento a um estado impróprio para o consumo (Souza et al., 2005). Sendo assim, um conservante mais eficiente atenderia uma demanda crescente do mercado.

A Phoneutria Biotecnologia e Serviços (Empresa Demandante) desenvolveu um inovador antimicrobiano natural devidamente patentado (protocolo INPI nº 014120002967) denominado PHT436.



Testado exhaustivamente, demonstrou atividade antimicrobiana com grande potencial para ser utilizado na indústria de alimentos e já atrai o interesse do setor industrial. A produção desse produto envolve uma etapa preliminar de obtenção de uma enzima através de fermentação. E a demanda apresentada pela empresa envolve a produção laboratorial existente no momento deve ser modificada para escala semi-industrial através da implementação de uma planta-piloto com fermentadores e agitadores de no mínimo 250 litros. Os problemas do escalonamento ocorrem devido a transferências de massa inadequadas, perda de calor e distribuição de temperatura não uniforme e formação de gradientes no reator. Como consequência, muitos processos de fermentação em grande escala tem menor produtividade do que aquelas obtidas em laboratório. Torna-se necessário, então, um controle maior das variáveis que influenciam o processo, como por exemplo, pH, temperatura, variações de cor e medição dos gases gerados durante a fermentação.

Este trabalho apresenta alguns resultados obtidos a partir do projeto intitulado "Monitoramento e controle de processo de fermentação enzimática", aprovado em dezembro de 2014 pela Chamada CNPq-SETEC/MEC Nº 17/2014, e que conta com a participação da equipe técnica da Phoneutria Biotecnologia e Serviços. O objetivo principal deste trabalho é buscar solucionar um problema real do setor produtivo: a padronização e monitoramento das condições ideais de cultivo microbiano, visando uma produção em escala comercial ou de produção. Desde então, algumas dificuldades como o atraso no repasse dos recursos financeiros, bem como a mudança de sede do IFMG Betim, fez com que o cronograma proposto no projeto fosse readequado. Sendo assim, os dados apresentados neste resumo são resultados preliminares, mas que certamente serão utilizados nas etapas posteriores de execução do projeto.

## **METODOLOGIA:**

Um dos objetivos do projeto é padronizar condições de cultivo durante o processo fermentativo de uma linhagem bacteriana (PHT436), produtora da enzima lipase. A equipe se reserva no direito de não detalhar completamente a natureza, bem como a forma de obtenção da enzima e do composto antimicrobiano, uma vez que já foi iniciado o processo de patenteamento do produto. Foram avaliados meios de cultura alternativos, a fim de identificar opções econômicas e também eficientes para crescimento microbiano. Para isso, utilizou-se o meio 2xYT (16 g de peptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio e água destilada q.s.p. 1 L) como meio controle, uma vez que é sabido que a linhagem PHT436 tem um bom crescimento e produção enzimática nessas condições. Como meios alternativos, foram testadas as seguintes formulações: a) Meio Fubá: A Peptona foi substituída por Fubá (16 g/L), o Extrato de levedura foi trocado por NuPro (10 g/L), uma ração animal rica em nucleotídeos, ácido glutâmico, inositol, aminoácidos e peptídeos e o Cloreto de sódio foi substituído por sal de cozinha (5g); b) Meio Extrato de Soja: A Peptona foi substituída por Extrato de soja (16 g/L), mantendo o NuPro e o sal de cozinha conforme descrito acima.

Todos os meios de cultura foram devidamente esterilizados antes do uso. Para o preparo do pré-inóculo, foi utilizado uma alíquota liofilizada da bactéria PHT436 em 10 mL de meio de cultura 2xYT. O pré-inóculo foi submetido à agitação e mantido em temperatura ambiente por 16 horas. A partir dessa cultura, foram inoculados 10 uL de pré-inóculo em novos frascos contendo 10 ml dos meios a serem avaliados: 2xYT, Fubá e Extrato de Soja. Novamente, os frascos foram mantidos em temperatura ambiente e sob agitação por 16 horas. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante separado para obtenção da lipase e demais produtos bacterianos.



A quantificação da lipase obtida em cada meio foi feita a partir da ação enzimática, tendo a tributirina como substrato. Em tubos de ensaio foram adicionados 100µL de solução indicadora, 300µL de Tributirina 20%, 3,2mL de solução tampão e 2,5 ml da amostra a ser testada (Lipases produzidas em meio 2xYT, Fubá e Extrato de Soja). Preparou-se também um controle negativo, substituindo o volume da amostra por água destilada estéril. A mudança do pH, que representa a ação enzimática, foi monitorada pela alteração de cor na solução presente no tubo de ensaio desde o tempo zero até a leitura final do experimento.

Após conhecer as características das etapas do processo, foi realizado um levantamento das variáveis a serem medidas e das variáveis a serem controladas. Para isso, foram consultados artigos científicos, livros e outros materiais que contribuíssem para o planejamento da etapa de instrumentação. Dentre essas variáveis, o pH foi medido e avaliado usando como estratégia a avaliação da variação das cores. Foi adicionado a cada amostra um indicador que reagiu com a solução apresentando uma variação de cores predefinidas. Diante disso, foi desenvolvido em conjunto com os profissionais da PHT, um software capaz de identificar e registrar a variação de cores por intermédio da leitura e processamento das imagens captadas por uma câmera. Este software foi desenvolvido utilizando a linguagem de programação JavaScript e o framework Node.js.

A partir dos estudos, foi elaborada uma representação do processo de produção de enzimas usando o software Eclipse E3 a fim de validar o estudo realizado. Para isso foi usado um ARDUINO UNO atuadores e sensores simulando assim um CLP (Controlador Lógico Programável) comercial. Para que a comunicação entre o ARDUINO e o sistema supervisor desenvolvido fosse possível, foi selecionado o padrão MODBUS por ser um dos padrões utilizados na indústria que pode ser implementado utilizando os equipamentos disponíveis. No sistema desenvolvido, cada um dos sensores e atuadores foram mapeados a TAGs, representação em software do equipamentos físicos, e então foram manipulados a fim de simular o processo de produção.

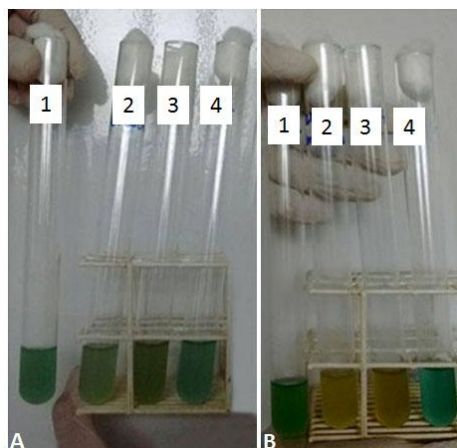
## RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Os microrganismos são adaptados ao meio ambiente natural onde vivem, e nele existem fatores limitantes ao seu crescimento, como as fontes de carbono e nitrogênio, aeração, movimentação, microelementos, entre outros, e isso confere a eles um estado de homeostase. Meios de cultura são substâncias compostas de extratos animais, vegetais, sintéticos e/ou leveduras que possuem nutrientes favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos. Além disso, o crescimento microbiano está relacionado às condições em que este é submetido, como temperatura, presença ou ausência de oxigênio, pH, dentre outros (PELCZAR, 1997).

Estão disponíveis comercialmente uma ampla variedade de meios de cultura, produzidos por indústrias de suprimentos para laboratório. Por outro lado, tais meios também podem ser elaborados de maneira alternativa, utilizando-se matéria orgânica de fácil obtenção como: pão, frutas, legumes, caldos de carne e vegetais, dentre outros (OKURA, 2008). No intuito de identificar opções econômicas, mas também eficientes para crescimento da linhagem bacteriana estudada, foram testados os meios 2xYT (Controle), meio Fubá e meio Extrato de Soja.



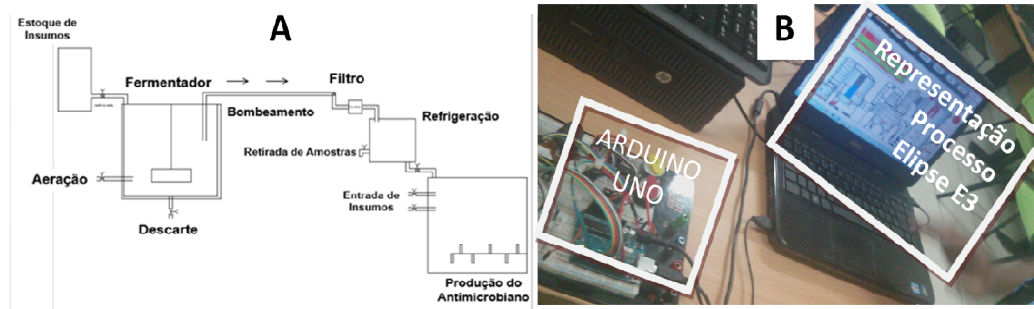
Houve crescimento da bactéria PHT436 em todos os meios de cultura testados. Avaliando as condições de cultivo, foi observado que o meio Extrato de Soja favoreceu uma produção enzimática semelhante ao meio 2xYT. Essa avaliação foi baseada na ação lipolítica de cada extrato (obtido de cada meio avaliado) sob a tributirina. Após a hidrólise desse substrato, são liberadas moléculas de ácido graxo que alteram o pH da solução. Os resultados podem ser observados na Figura 1 que mostra que, após 16 horas de ação enzimática, a solução proveniente do Extrato de Soja passou de uma coloração verde para amarelada, assim como no controle (2xYT). Sendo assim, presume-se que houve a ação lipolítica sobre a tributirina, reduzindo o pH da solução. Por outro lado, o meio Fubá não favoreceu a produção da enzima visto que não houve alteração considerável na coloração.



**FIGURA 1:** Atividade enzimática dos extratos bacterianos obtidos a partir dos meios de cultura Fubá (1), Extrato de Soja (2) e 2xYT (3). O tubo 4 representa o controle negativo, sem adição de enzima. Em A observa-se reação no tempo zero e, em B, após 16 horas de incubação.

É importante destacar que o tal procedimento foi repetido em dois momentos diferentes, chegando ao mesmo resultado. Embora o meio Extrato de Soja tenha tido um bom desempenho e seja consideravelmente mais barato, ressalta-se que a preparação deste meio de cultura é mais trabalhoso pois a ração NuPro tem solubilidade em água reduzida. Outras condições de cultivo serão avaliadas, como temperatura e tempo de incubação.

A partir do levantamento das variáveis a serem medidas e das variáveis a serem controladas no processo, foi criada uma representação da sequência de operações (Figura 2A). Para o sistema de supervisão, o software Eclipse E3 foi selecionado para propor protótipo inicial. Na construção do protótipo o micro controlador ARDUINO UNO, parte esquerda da figura 2B, é responsável por monitorar as variáveis selecionadas. Boa parte dos sensores utilizados fornecem os dados coletados no formato analógico, portanto o ARDUINO UNO os transforma em um conjunto de dados digitais que podem ser utilizado por um computador e por intermédio do protocolo de comunicação MODBUS RTU esses dados são transferidos. Já no computador o processo é representado utilizado o software Eclipse E3, parte direita da figura 2B onde cada uma das variáveis monitoradas é relacionada a um objeto, por exemplo, uma válvula física controlada pelo ARDUINO UNO é relacionada a um objeto que a representa si sistema. Desta maneira todo o processo pode ser monitorado e ações podem ser realizadas remotamente permitindo o controle e a automação.



**FIGURA 2:** Em A) Representação do Processo de Produção de Enzimas. Em B) Montagem do protótipo a esquerda: o ARDUINO UNO utilizado e a montagem simulando a existência de sensores e atuadores; a direita: a representação do processo utilizando o software Elipse E3.

Os estudos iniciais de instrumentação do processo sugerem que as principais variáveis que deverão ser medidas são: nível, temperatura, vazão (estes três parâmetros são controlados também para fermentação em estado sólido, conforme TOSTES, 2015; FONSECA, 2012), pressão e pH,. As variáveis que deverão ser controladas são: vazão, nível e temperatura. Para o controle e monitoração do processo, são necessários sensores e atuadores. A fim de definir qual o tipo adequado de instrumento para realizar essas tarefas, foi realizado um estudo dos principais instrumentos relacionados com as grandezas citadas. A seguir, um resumo desses instrumentos será apresentado.

Pode se dizer que temperatura é uma propriedade de um objeto associada à agitação média das moléculas. Em processos industriais, o princípio de medição de temperatura mais utilizado é a medição da variação do valor da resistência elétrica de um condutor metálico em função da temperatura. Dentre os metais, aqueles que se mostraram mais adequados para a utilização na termometria de resistência são: Cobre, Níquel e Platina (FIALHO, 2015).

Pressão é a força aplicada sobre uma determinada área ou superfície. Dentre os medidores de pressão mais utilizados atualmente nas indústrias, tem-se o tubo de Bourdon que sofre uma deformação, originada da compressão de um fluido em seu interior, causando-lhe uma deformação proporcional que é acusada por um ponteiro movendo-se sobre uma escala. Também podem ser utilizados transdutores de pressão por silício que são sensores que convertem a grandeza física pressão em sinal elétrico.

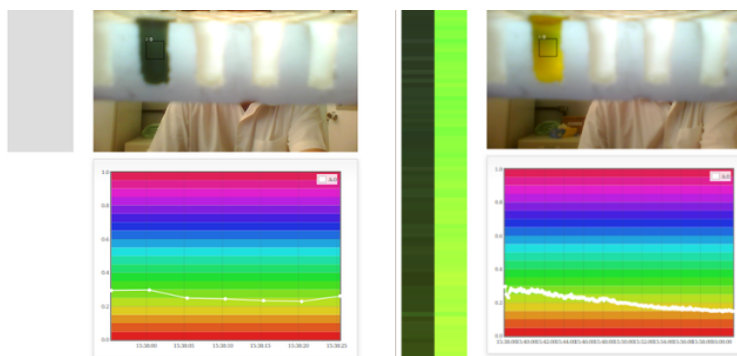
Em relação ao nível, avalia-se a altura do líquido ou sólido dentro de um recipiente. Para se medir a variável nível existem meios diretos e indiretos. A medição realizada por meio de visores é um método de medição direta que consiste em uma janela de vidro de alta resistência a impacto, elevadas temperaturas e pressão bem como ação de ácidos. Outra forma de se medir a variação do nível é medir a diferença de pressão entre dois pontos utilizando um dos instrumentos descritos anteriormente. Outra forma de aferir o nível é através da reflexão de onda. Quando uma onda é emitida e encontra em sua frente um obstáculo, parte dela é refletida. Nesse caso, instala-se um conjunto emissor-receptor no topo do reservatório. O emissor envia uma onda em direção ao fluido. O receptor capta a reflexão dessa mesma onda. Ao medir a diferença de tempo entre a emissão e a reflexão, é possível calcular a distância do obstáculo (nesse caso, o fluido no interior do reservatório) ao sensor. A partir dessa distância, tem-se o nível. O sensor mais utilizado para a medição de nível nesse tipo de processo é o ultrassônico.



A variável vazão pode ser conceituada como uma quantidade de volume de fluido por unidade de tempo que flui através de um orifício. Para se calcular a vazão existem meios diretos e indiretos. Os meios indiretos utilizam, normalmente, os conceitos de pressão diferencial. Esses são os meios mais utilizados. Para aferir a vazão, mede-se a diferença de pressão observada no interior e no exterior de um tubo, que é causada pelo movimento do fluido (FIALHO, 2015).

Conforme avaliado nos testes dos meios de cultura alternativo, a medição de pH pode ser acompanhada pela variação das cores de uma solução. A cada segundo uma imagem foi capturada e processada pelo software desenvolvido. Foram extraídas de cada imagem as quantidades de Vermelho, Verde e Azul, comparando-os com tubos de pH conhecido (referência) e os valores coletados, permitindo assim inferir um pH aproximado. A figura 3 ilustra uma medição realizada com uma amostra da enzima produzida. No instante inicial, figura a esquerda, nota-se que a coloração inicial é um verde escuro, o que nos indica um meio com pH próximo a 7. No decorrer do tempo, conforme a ação enzimática aconteceu, ocorreu a modificação na coloração indicando, ao término das coletas, que o pH se estabilizou entre 1 e 4. Essa análise utilizando um software e o processamento de imagem é importante pois a identificação do momento em que a variação de pH ocorreu permite inferir a qualidade da enzima produzida.

Nos casos em que a medição de pH é realizada por meio da coleta de amostras, essa análise colorimétrica é possível. Porém, se houver necessidade de medição constante do pH dentro do reservatório, será necessário utilizar a medição do pH por meio de eletrodos. Esse tipo de instrumento emite uma corrente elétrica e afere o pH pela medição da condutividade do fluido.



**FIGURA 3:** Exemplo de leitura e registro temporal da variação das cores.

O controle de Nível e Vazão deve ser acompanhado em processos fermentativos. Por se tratar de um processo em batelada que envolve a adição e mistura de fluidos, os atuadores necessários para o controle de nível e vazão para os reservatórios são as Válvulas, para entrada e saída dos fluidos, os Motores, para mistura e agitação, e as Bombas para elevação de fluidos quando a sua entrada está acima do nível de armazenamento. As válvulas têm como objetivo a regulação do fluxo de um fluido. Ela se abre e se fecha, fazendo o controle da entrada e saída de fluxos. Existem dois tipos de válvulas: *on-off*, ou solenóides e válvulas de controle. As válvulas solenóides apresentam apenas dois estados - aberta ou fechada, permitindo ou não a passagem do fluido. As válvulas de controle permitem a abertura parcial, permitindo o controle da vazão do fluido. Os motores serão utilizados neste projeto para movimentação das pás misturadoras. Durante o processo de fermentação é necessária a agitação do material no interior do reservatório tanto para aeração



do ambiente e melhor crescimento bacteriano, quanto para aumentar a superfície de contato entre as fases da mistura. Em processos industriais dessa natureza, os motores mais utilizados são os motores de corrente contínua, por serem mais fáceis de se realizar o controle.

Conforme apresentado na Figura 2A, na etapa de separação da fase líquida da mistura do fermentador, é necessário “puxar” o líquido para conduzi-lo a um filtro, que irá retirar o restante das partículas em suspensão. Isso ocorre pois, após deixar a mistura em repouso por algum tempo, há decantação do sólido. Dessa forma, é mais interessante bombear o líquido por cima do que deixá-lo apenas escoar por baixo. Para fazer essa elevação do líquido, será utilizada uma bomba. As bombas são constituídas por motores (no caso deste processo, elétricos), que criam uma pressão negativa na tubulação, fazendo com que o líquido seja sugado e conduzido ao recipiente seguinte.

### **CONCLUSÕES:**

Os resultados apresentados nesse resumo indicam que o conhecimento sobre todas as etapas do processos tornam-se imprescindíveis para alcançar o objetivo proposto. Foi observado que meios de cultura mais econômicos podem ser uma boa alternativa, visto que em um dos meios avaliados houve crescimento microbiano e produção enzimática. Novas condições de cultivo serão avaliadas posteriormente, como temperatura de incubação, agitação, tempo de cultivo, dentre outras.

O estudo sobre o processo de instrumentação contribuiu para o alinhamento do conhecimento do processo e da execução do projeto, visto que este tem um caráter interdisciplinar, envolvendo docentes e discentes de áreas como Automação, Mecânica, Biologia e Química. De posse destes dados, o esquema gráfico do processo, bem como o protótipo criado no Elipse, permitiu a equipe do IFMG e da PHT dimensionarem a realização do projeto em sua totalidade.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro. CNPq e a Phoneutria Biotecnologia e Serviços pela colaboração.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

FONSECA, Rafael Frederico Fonseca. Sistema de Controle de Fluxo, Temperatura e Umidade Relativa do Ar para Processos de Fermentação em Estado Sólido. Dissertação de Mestrado. São Carlos: USP/EESC, 2012.

FIALHO, A.B. Instrumentação Industrial Conceitos, Aplicações e Análises, 7ª edição, 2015, pag. 47 a 126 e 162 a 216.

OKURA, Mônica Hitomi; RENDE, José Carlos. Microbiologia: roteiros de aulas práticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2008. 201 p.

PELCZAR, M, CHAEL et al. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. Volume I, 2ª Ed. São Paulo: Editora Pearson, 1997.

TOSTES, Lucas Rodrigues de Moraes. Instrumentação e Controle do Processo de Produção de uma Microcervejaria. Trabalho de Conclusão de Curso. Rio de Janeiro: UFRJ, 2015.

### **Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:**

Ainda não há publicações relacionadas a esse projeto.