



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL



Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

CARTA PATENTE N.º PI 0210552-7

Patente de Invenção

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito : PI 0210552-7

(22) Data do Depósito : 20/06/2002

(43) Data da Publicação do Pedido : 27/12/2002

(51) Classificação Internacional : C12C 11/02; C12C 11/07; C12C 11/09

(30) Prioridade Unionista : 20/06/2001 US 60/299,153; 20/06/2001 US 60/299,186

(54) Título : COMBINAÇÃO DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA/INTERMITENTE

(73) Titular : Labatt Brewing Company Limited. Endereço: 303 Richmond Street, London Ontário N6B 2H8, Canadá (CA).

(72) Inventor : Phyllis Heather Pilkington. Endereço: 303 Richmond Street, London, Ontario, Canadá.; Anthony Normand Mensour. Endereço: 303 Richmond Street, London, Ontario N6H 2H8, Canadá.

Prazo de Validade : 10 (dez) anos contados a partir de 10/06/2014, observadas as condições legais.

Expedida em : 10 de Junho de 2014.

Assinado digitalmente por
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes

15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
para **“COMBINAÇÃO DE PROCESSOS DE
FERMENTAÇÃO CONTÍNUA/INTERMITENTE”**.

Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere a produção de produtos de álcool potável, especialmente cerveja, e, em particular, usando um processo híbrido compreendido de estágios de processamento de fermentação contínuo e de dosagem.

Antecedentes da Invenção

10 O número extensivo de publicações recentes nesta área ilustra o grande interesse na indústria de fabrico de bebida fermentada em imobilização. Em várias revistas (Enari, 1995; Masschelein, 1997; Mensour e outros., 1997; Stewart, 1996; Virkajarvi & Linko, 1999) no estado geral da indústria de
15 fabrico de bebida fermentada, o papel revolucionário possível de imobilização na produção de cerveja tem sido destacado. Em adição aos grupos mencionados nas seções 3.1 a 3.5, muitas outras instituições têm sido envolvidas na célula R & D imobilizada para aplicações de fabrico de bebida fermentada. A
20 Miller Brewing Company (Duncombe e outros., 1996; Tata e outros., 1999) dos Estados Unidos, pesquisaram algumas avaliações preliminares em uma unidade de teste Meura Delta, bem como no bioreator de leiteo fluidizado distribuído por Schott Engineerings. Coors Brewing também realizou experimentos
25 preliminares com o sistema Meura Delta.

A Slovak Technical University, em colaboração com Heineken, investigaram o uso de gel de pectato de cálcio em um sistema de elevação de ar para a produção de cerveja (Domeny, 1996). Mais recentemente, o grupo da Slovak
5 Technical University publicou vários artigos em suas pesquisas em desenvolvimento (Smogrovicova e outros., 1997; Smogrovicova & Domeny, 1999). Guinness inicialmente investigou o uso de vários veículos de adsorção para imobilização, e subsequente fermentação em um bioreator de leiteo
10 fluidizado (Donnelly, 1998). Em 1999, Donnelly e colegas publicaram um artigo descrevendo a cinética de metabolismo de açúcar dentro de seu bioreator de leiteo fluidizado (Donnelly e outros., 1999). Sua composição experimental envolvia o uso de gotas de vidro poroso Siran como o veículo de imobilização para
15 uma levedura de fermentação superior. Guinness tem se tornado parte do Consórcio Immocon que foi descrito na seção 2.2.5.

Holsten Brauerei AG e Lurgi AG, ambas da Alemanha, têm desenvolvido juntamente e operado uma planta piloto para a produção contínua de cerveja livre de álcool
20 (Dziondziak, 1995). Gotas de alginato de cálcio dentro de um fermentador de leiteo fluidizado de volteamento de estágio único (130 L), foram usadas para fermentação, enquanto uma coluna de fundo de peneira (7 fundos de peneira) foi usada para dealcoolizar a cerveja. O tempo de produção total para este processo foi 8,5
25 horas.

Uma equipe do Sapporo Breweries Ltd, Brewing Research Laboratories, localizados no Japão, estudou o uso de células imobilizadas em um reator de leito fluidizado para a fermentação principal de cerveja. Seus estudos envolveram o uso de gotas de gel de álcool polivinil (Shindo & Kamimur, 1990), gotas de gel de Ca-alginato (Shindo e outros., 1994a), fibras de gel de camada dupla (Shindo e outros., 1994b), e gotas de gel de Chitosan (Shindo e outros., 1994c) como matrizes de imobilização. No último estudo, um bioreator de volume de operação de um litro contendo 25% por volume de gotas de Chitopeari® tipo II (gotas de chitosan), foi operado em uma base contínua com mosto tratado com glucomilase. Este tratamento de enzima permitiu a formação de acetato de éster no sistema de célula imobilizada para ser similar àquele de fermentação de dosagem convencional, desse modo uma etapa mais próxima à equiparação do produto.

O grupo de pesquisa de Sapporo tem focalizado agora sua atenção ao desenvolvimento de um fermentador de gota fluidizado de gota de chitosan operando em modo de dosagem repetida. O sistema foi operável por 75 dias sem quaisquer problemas maiores, e a cerveja resultante era similar em qualidade a um produto comercial. Uma linhagem não-floculante foi mostrada para ser muito mais efetiva do que uma linhagem flocosa (Maeba e outros., 2000; Umemoto e outros., 1998).

Duas outras aproximações para redução de diacetil foram apresentadas no Congresso EBC mantido em

Maastricht em 1997. Pesquisadores na França (Dulieu e outros., 1997) propuseram o uso de α -acetolactato decarboxilato encapsulado para converter rapidamente α -acetolactato em acetoin. Meura Delta tem destacado resultados preliminares no uso de um zeólito de aluminossilicato como um catalisador para a conversão fria e direta de acetolactato em acetoin (Andries e outros., 1977). Se tal tratamento se comprovou ser efetivo e aceitável ao consumo, alternativas de custo inferior aos sistemas de maturação propostos por Cultor e Alfa Laval podem se tornar uma realidade.

Outra pesquisa não-industrial no campo de imobilização para produção de cerveja, inclui aquela do Singapore Institute of Standards e Industrial Research, onde o uso de um tipo em cadeia de partícula de gel de alginato para uso em um reator de leito acondicionado foi estudado e encontrado ser mais favorável do que gotas de alginato (Que, 1993). Mafra e colegas da Universidade de Minho em Portugal têm discutido o uso de uma linhagem de levedura de super-floculante para a maturação contínua de cerveja (Mafra e outros., 1997). Este mesmo grupo de pesquisa também publicou trabalho no uso de sua levedura flocosa dentro de um bioreator de elevação de ar para a produção de etanol (Vicente e outros., 1999; Domingues e outros., 2000).

Pesquisadores em várias instituições acadêmicas têm também investigado o uso de imobilização para a produção de cerveja (Argiriou e outros., 1996; Bardi e outros., 1996;

Cashin, 1996; Moll & Duteurtre, 1996; Nedovic e outros., 1996a; Nedovic e outros., 1996b; Norton e outros., 1995; Scott e outros., 1995; Wackerbauer e outros., 1996a; Wackerbauer e outros., 1996b). Grupos de pesquisa da China (Chao e outros., 1990; Yuan, 1987; Zhang e outros., 1988), Rússia (Kolpachki e outros., 1980; Sinitsyn e outros., 1986) e Tchecoslováquia (Chladek e outros., 1989; Curin e outros., 1987; Polednikova e outros., 1981), foram também envolvidos na tecnologia de célula imobilizada e resultados publicados nos anos de 1980.

10 Numerosas referências foram consideradas durante o trabalho antecedente aos estudos aos quais a presente invenção é baseada. Estas incluem:

Abbott, B.J. 1978. Células imobilizadas. Em: *Pesquisas Anuais nos Processos de Fermentação*, Ed. Perlman, D., New York: Academic Press, 2: 91.

Anon. 1994. Maturex[®] L. *Novo Nordisk publication. B 560c-GB.*

Anon. 1996. Curva de Tabela 2D. *User's Manual, Jandel Scientific.*

20 Anon. 1997. Sistemas de Bebida Fermentada Alfa Laval. *Brewers' Guardian* 126: 26.

Anon. 1998. Digox 5 Manual de Operação. *Dr. Theidig publication.*

Aquilla, T. 1997. A bioquímica da levedura: pondo fim ao mito de respiração de levedura e pondo oxigênio em seu local correto. *Brewing Techniques* 50.

Aschengreen, N.H., Jepsen, S. 1992. Uso de acetolactato decarboxilase em fermentações de fabrico de bebida fermentada. *Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section)*, Melbourne 80.

5 Atkinson, B. 1986. Células imobilizadas, sua aplicação e potencial. Em: *Aspectos da engenharia de processo de sistemas de células imobilizadas*. Ed. Webb, C., Black, G.M, Atkinson, B. Manchester: Instituto de Engenharia Química 3.

Audet, P., Paquin, C., Lacroix, C. 1988.
10 Crescimento imobilizado de bactéria de ácido láctico com kappa-carrageenan – locust bean gel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 11.

Austin, G.D., Watson, R.W.J., Nordstrom, P.A.,
D'Amore, T. 1994. Um monitor de biomassa de capacitância e sua
15 correlação com biomassa viável. *MBAA Technical Quarterly* 31:
85.

Axcell, B.C., O'Connor-Cox, E.S.C. 1996. O
conceito de vitalidade de levedura – uma aproximação alternativa.
Proceedings of Convention of the Institute of Brewing (Asia
20 *Pacific Sect.)*. Singapore 24:64.

Axelsson, A., Sisak, C., Westrin, B.A., Szajani,
B. 1994. Características de difusão de um gel de intumescência e
suas conseqüências para a performance do bioreator. *The*
Chemical Engineering Journal 55: B35.

25 Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill, Inc.

Bancel, S., Hu, W. 1996. Exame microscópio de varredura de laser confocal de distribuição de célula em micro-veículos macro-porosos. *Biotechnology Progress* 12: 398.

Barker, M.G, Smart, K.A. 1996. Mudanças morfológicas associadas com o envelhecimento celular de uma linhagem de levedura de fabrico de bebida fermentada. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54(2): 121.

Bejar, P., Casas, C., Godia, F., Sola, C. 1992. A influência das propriedades físicas na operação de um fermentador de leite fluidizado de três fases com células de levedura imobilizadas em alginato de cálcio. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34: 467.

Bickerstaff, G.F. 1997. Imobilização de enzimas e células. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*, Ed. Bickerstaff, G. F., New Jersey, U.S.A.: Humana Press, Inc. 1.

Birnbaum, S., Pendleton, R., Larson, P., Mosbach, K. 1981. Estabilização covalente de gel de alginato para prendimento de células totais vivas. *Biotechnology Letters* 3: 393.

Budac, D., Margartis, A. 1999. *Comunicação Pessoal*

Büyükgüngör, H. 1992. Estabilidade do *Lactobacillus bulgaricus* imobilizado em géis de kappa-carrageenan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53: 173.

Chahal, P.S. 1992. *Produção de dosagem de alimentação controlada de fluorsensor de Cyclosporin-A de Beauveria nivea*. Ph.D. Tese. University of Western Ontario.

Chisti, M.Y. 1989. *Bioreatores de elevação de ar*. London: Elsevier Applied Science.

Chisti, Y., Moo-Young, M. 1993. Aperfeiçoar a performance de reatores de elevação de ar. *Chemical Engineering Progress* 6: 38.

Cho, G.H., Choi, C.Y., Choi, Y.D., Han, M.H. 1982. Produção de etanol por levedura imobilizada e seus efeitos de gás de dióxido de carbono em um reator de leito acondicionado. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32: 959.

Coutts, M.W. 1956. *Patente britânica No. 872,391*.

Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H., Kahler, M. 1987. Produção de cerveja com levedura imobilizada. *European Brewing Convention Congress*, Madrid 433.

Dale, C.J., Hough, J.S., Young, T.W. 1986. Fracionamento de componentes de alto e baixo peso molecular de mosto e cerveja por cromatografia de adsorção usando o gel Sephadex LH20. *Journal of the Institute of Brewing* 92(5): 457.

Daoud, I.S., Searle, B.A. 1986. Vitalidade da levedura e performance de fermentação. *Monografia - XII*

European Brewery Convention - Symposium on Brewers' Yeast, Helsinki 108.

de Backer, L., Willaert, R.G., Baron, G.V. 1996. Modelagem de bioprocessos imobilizados. Em: *Immobilized Living Cell Systems Modelling and Experimental Methods*, Ed. Willaert, R. G., Baron, G. V., and de Backer, L., Toronto: John Wiley and Sons. 47.

de Beer, D., Van den Heuvel, J.C., Ottengraaf, S.P.P. 1993. Medições de microeletrodo da distribuição de atividade na nitrificação de agregados bacteriais. *Applied Environmental Microbiology* 59: 573.

Debourg, A., Laurent, M., Goossens, E., Borremans, E., Van De Winkel, L., Masschelein, C.A. 1994. Potencial de redução de aldeído de mosto em sistemas de levedura livre e imobilizada. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52: 100.

Dillenhofer, W., Ronn, D. 1996. Fermentação secundária de cerveja com levedura imobilizada. *Brauwelt International* 14: 344.

Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986a. Efeitos de hidroxauréia nas taxas de fermentação imobilizada e suspensa e operação de ciclo de célula. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1814.

Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986b. Efeitos de imobilização nas propriedades de crescimento e fermentação, e

composição macromolecular de *Saccharomyces cerevisiae* fixado a gelatina. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 73.

dos Santos, V.A.P.M, Bruijnse, M., Tramper, J., Wijffels, R.H. 1996. O conceito de gota-mágica: uma
5 aproximação integrada para remoção de nitrogênio com micro-organismos co-imobilizados. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 447.

Driessen, W., Habets, L., Vereijken, T. 1997. No: o processo anaeróbico e aeróbico para encontrar
10 requerimentos de desenho de planta efluente estrita. *Proceedings of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Auckland 148.

Dulieu, C., Boivin, P., Dautzenberg, H., Poncelet, D. 1996. Sistema de enzima imobilizada para evitar
15 formação de diacetil: uma nova ferramenta para acelerar a maturação da cerveja. *International Workshop on Bioencapsulation*, Potsdam 22.

Dunbar, J., Campbell, S.L., Banks, D.J., Warren, D.R. 1988. Aspectos metabólicos de um sistema de
20 fermentação contínua comercial. *Proceedings of the Convention of the Institute of Brewing*, Brisbane 151.

Estapé, D., Gòdia, F., Solà, C. 1992. Determinação de coeficientes de difusão efetiva de glucose e etanol em gel de Ca-alginate gel. *Enzyme and Microbial
25 Technology* 14: 396.

Evans, H.A.V., Cleary, P. 1985. Medição Direta de Levedura e Viabilidade Bacterial. *Journal of the Institute of Brewing* 91: 73.

5 Fan, L.-S. 1989. *Engenharia de Fluidização de Gás-Líquido-Sólido*. Boston: Butterworths.

Fernandez, E. 1996. Espectroscopia e Imagem de ressonância magnética nuclear. In: *Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods*. Toronto: John Wiley and Sons, Chapter 6.

10 García, A.I., García, L.A., Díaz, M. 1994. Diagnóstico de produção de éster em fermentação de cerveja industrial. *Enzyme and Microbial Technology* 16(1): 66.

Geankoplis, C.J. 1993. *Processos de Transporte e Operações de Unidade*. New Jersey: Prentice Hall P.T.R.

15 Gee, D.A., Ramirez, W.F. 1994. Um modelo de aroma para fermentação de cerveja. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 321.

Geiger, K.H., Compton, J. 1957. *Patente Canadense No. 545,867*.

20 Gekas, V.C. 1986. Membranas artificiais como veículos para a imobilização de bio-catalisadores. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 450.

25 Gift, E.A., Park, H.J., Paradis, G.A., Demain, A.L., Weaver, J.C. 1996. Isolamento baseado em FACS de células que se desenvolvem vagarosamente: encapsulamento

duplo de levedura em micro-gotas de gel. *Nature Biotechnology* 14: 884.

Gikas, P., Livingston, A.G. 1993. Uso de ATP para caracterizar viabilidade de biomassa em bio-reatores de
5 célula livremente suspensa e imobilizada. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1337.

Gikas, P., Livingston, A.G. 1996. Viabilidade de células imobilizadas: uso de níveis de ATP específicos e taxas de oxigênio. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 11:264.
10

Gilson, C.D., Thomas, A. 1995. Produção de etanol por levedura imobilizada de alginato em um bio-reator de leito fluidizado. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 62: 38.

15 Gòdia, F., Casa, C., Castellano, B., Solà, C. 1987. Células imobilizadas: comportamento de levedura presa de carrageenan durante fermentação contínua de etanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 342.

Gopal, C.V., Hammond, J.R.M. 1993.
20 Aplicação de leveduras imobilizadas para fermentação de cerveja. *Brewing and Distilling International* 24: 72.

Hannoun, B.J.M., Stephanopoulos, G. 1986. Coeficientes de difusão de glucose e etanol em membranas de cálcio de célula livre e célula ocupada. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 829.
25

Hardwick, W.A. 1995. *Handbook of Brewing*.
New York: Marcel Dekker, Inc.

Hayat, M.A. 1972. *Técnicas de Microscopia de
Elétron Básicas*. Toronto: van Nostrand Reinhold Co. 96.

5 Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder,
R., Weltevrede, R., Mulder, A. 1993. Desenvolvimento e escala
de um reator de suspensão de elevação de ar de biofilme aeróbico.
Water Science and Technology 27: 253.

Higbie, R. 1935. O papel de absorção de um gás
10 puro em um ainda líquido durante períodos muito curtos de
exposição. *Transactions of the American Institute of Chemical
Engineers* 31: 365.

Hines, A.L., Maddox, R.N. 1985. *Fundamentos
e Aplicações de Transferência de Massas*. U.S.A.: Prentice-Hall,
15 Inc.

Hinfray, C., Jouenne, T., Junter, G. 1994.
Produção de etanol de glucose por culturas de dosagem de agar
preso e livre de *Saccharomyces cerevisiae* em níveis de
oxigenação diferentes. *Biotechnology Letters* 16: 1107.

20 Hoekstra, S.F. 1975. Composição de mosto,
uma revisão de fatos conhecidos e desconhecidos. *Proceedings of
the European Brewery Convention*, Nice 465.

Hooijmans, C.M., Ras, C., Luyben, K.Ch.A.M.
1990. Determinação de perfis de oxigênio em partículas
25 biocatalíticas por meio de um microsensor de oxigênio

polarográfico combinado. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 178.

Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Young, T.W. 1982. Metabolismo de mosto por levedura. Em: *Malting and Brewing Science Volume 2 Hopped Wort and Beer*, Ed. Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., and Young, T. W., London, U.K.: Chapman and Hall. 566.

Hüsken, L.E., Tramper, J., Wijffels, R. 1996. Desenvolvimento e erupção de micro-colônias presas em gel. Em: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 336.

Hutter, K.J. 1996. Análise de fluxo-citométrico para asseso de capacidade fermentative de várias leveduras. *Brauwelt International* 1: 52.

Hwang, S.-J., Fan, L.-S. 1986. Alguma consideração de desenho de um leito contendo tubo de gás-líquido-sólido. *The Chemical Engineering Journal* 33: 49.

Imai, T. 1996. Avanços recentes na determinação da vitalidade de levedura. *Proceedings of the Congress of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Singapore 24: 60.

Inloes, D.S., Taylor, D.P., Cohen, S.N., Michaels, A.S., Robertson, C.R. 1983. Produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bio-reatores de

membrana de fibra vazada. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 264.

Inoue, T. 1987. Possibilidades abertas pela “nova biotecnologia” e aplicação de levedura imobilizada para
5 fabrico de bebida fermentada de cerveja. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewery Co., Ltd.* 7.

Inoue, T. 1992. Uma revisão da tecnologia de controle de diacetil. *Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section)*,
10 Melbourne 76.

Jepsen, S. 1993. Usando ALDC para aumentar a velocidade da fermentação. *Brewers' Guardian*. 55.

Jones, M., Pierce, J.S. 1964. Absorção de amino ácidos de mosto por leveduras. *Journal of the Institute of Brewing*
15 70: 307.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1984. Uma revisão de nutrição iônica de levedura – Parte I: requerimentos de desenvolvimento e fermentação. *Process Biochemistry* 19(2):
48.

20 Jones, R.P., Pamment, N., Greenfield, P.F. 1981. Fermentação de álcool por levedura – o efeito do ambiente e outras variáveis. *Process Biochemistry* 16(3): 42.

Kara, B.V., David, I., Searle, B.A. 1987. Asseso de qualidade da levedura. *Proceedings of the Congress of*
25 *the European Brewery Convention*, Madrid, 21: 409.

Karamanev, D.G. 1991. Modelo da estrutura de biofilme de *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 10: 51.

Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. 1985.
5 A imobilização de células totais: princípios de engenharia. *Chemical Engineering Science* 40: 1321.

Kasten, F.H. 1993. Introdução em sondas fluorescentes: propriedades, história e aplicações. Em: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Ed.
10 Mason, W. T. London, U.K.: Academic Press Limited 12.

Klopper, W.J. 1974. Composição de mosto, uma sobrevivência. *European Brewery Convention Monograph 1. Wort Symposium*, Zeist 8.

Korgel, B.A., Rotem, A., Monbouquette, H.G.
15 1992. Difusividade efetiva de galactose em géis de alginato de cálcio contendo *Zymomonas mobilis* imobilizado. *Biotechnology Progress* 8: 111.

Kreger-Van Rij, N. 1984. *As Leveduras: Um Estudo Taxonômico*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers
20 B.V.

Kronlöf, J., Virkajärvi, I. 1996. Fermentação principal com escala piloto de levedura imobilizada. *Proceedings of the European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 94.

25 Kunze, W. 1996. *Technology Brewing and Malting*. Berlin: VLB.

Kuriyama, H., Ishibashi, H., Umeda, I.M.T., Kobayashi, H. 1993. Controle de atividade de floculação de levedura em fermentação contínua de etanol. *Journal of Chemical Engineering Japan* 26(4): 429.

5 Kurosawa, H., Matsamura, M., Tanaka, H. 1989. Difusividade de oxigênio em gotas de gel contendo células viáveis. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 926.

Kurosawa, H., Tanaka, H. 1990. Avanços na cultura de célula imobilizada: desenvolvimento de um sistema de
10 cultura misturada co-imobilizada de organismos aeróbicos e anaeróbicos. *Process Biochemistry International* 25: 189.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. *As Leveduras, Um Estudo Taxonômico, Quarta Edição*. Amsterdam: Elsevier 361.

15 Kyung, K.H., Gerhardt, P. 1984. Produção contínua de etanol por levedura "imobilizada" em um fermentador contido em membrana. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 252.

Lee, S.S., Robinson, F.M., Wang, H.Y. 1981.
20 Determinação rápida de viabilidade de levedura. *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 11*, Gatlingburg, USA 641.

Lentini, A. 1993. Uma revisão dos vários métodos disponíveis para monitoramento do estado fisiológico de levedura: viabilidade e vitalidade da levedura. *Ferment* 6: 321.

25 Lentini, A., Takis, S., Hawthorne, D.B., Kavanagh, T.E. 1994. A influência da trub no desenvolvimento

do sabor e fermentação. *Proceedings of the 23rd Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Sydney 89.

Leudeking, R. 1967. Cinéticas do processo de fermentação. Em: *Biochemical and Biological Engineering*, Ed. Blakebrough, N., London: Academic Press, Inc. 203.

Leudeking, R., Piret, E.L. 1959. Um estudo cinético da fermentação do ácido láctico. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1: 393.

Lewandowski, Z., Altobelli, A., Fukushima, E. 1993. NMR e estudos de microelectrode de hidrodinâmicas e cinéticas em biofilmes. *Biotechnology Progress* 9: 40.

Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S. 1995. Estudos experimentais e conceituais no transporte de massa em biofilmes. *Water Science Technology* 31: 153.

Lewis, M., Young, T. 1995. *Brewing*. London: Chapman and Hall.

Li, J., Humphrey, A.E. 1991. Uso de fluorometria para monitoramento e controle de um bio-reator. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 1043.

Lim, H.-S., Han, B.-K., Kim, J.-H., Peshwa, M.V, Hu, W.-S. 1992. Distribuição espacial de células de mamíferos desenvolvidas em micro-veículos macro-porosos com cinéticas de fixação aperfeiçoadas. *Biotechnology Progress* 8: 486.

Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N. 1996. Efeito de características de floculação na performance de levedura

imobilizada. *European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 102.

Lloyd, D., Moran, C.A., Suller, M.T.E., Dinsdale, M.G. 1996. Monitoramento citométrico de rhodamina 5 123 e um corante de cianina por levedura durante fermentação. *Journal of Institute of Brewing* 102: 251.

Lundberg, P., Kuchel, P.W. 1997. Difusão de solutos em géis de agarose e alginate: estudos de ^1H e ^{23}Na PFGSE e ^{23}Na TQF NMR. *Magnetic Resonance in Medicine* 37: 10 44.

Margaritis, A., te Bokkel, D.W., El Kashab, M. 1987. Fermentação de dosagem repetida de etanol usando células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em um sistema de bio-reator fluidizado. Em: *Biological Research on Industrial Yeasts*, 15 Ed. Stewart, G.G., Russell, I., Klein, R.D., Hiebsch, R.R., Boca Raton: CRC Press 121.

Margaritis, A., Wallace, J.B. 1982. O uso de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em um novo bio-reator fluidizado para produzir 20 etanol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 147.

Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978a. O rotor-fermentador. Parte I: descrição do aparelho, requerimentos de energia, e características de transferência de massa. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 709. 25

Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978b. O rotor-fermentador. Parte II: aplicação em fermentação de etanol. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 727.

Marrs, W.M. 1998. E estabilidade de
5 carrageenans para processamento. Em: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 9*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 218: 345.

Martens, F.B., Egberts, G.T.C., Kempers, J., Robles de Medina, M.H.L., Welton, H.G. 1986. *European*
10 *Brewing Convention Monograph XII, Symposium on Brewing Yeast*, Helsinki 339.

Masschelein, C.A. 1990. Metabolismo de levedura e aroma de cerveja. Proceedings of the Third Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling 103.

15 Masschelein, C.A., Carlier, A., Ramos-Jeunehomme, C., Abe, I. 1985. O efeito de imobilização na fisiologia de levedura e qualidade da cerveja em sistemas contínuos e descontínuos. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress*, Helsinki 339.

20 Masschelein, C.A., Ramos-Jeunehomme, C. 1985. O potencial de levedura imobilizada de alginate em fermentações de fabrico de bebida fermentada. *Institute of Brewing Central and Southern African Section Proceedings of the 1st Scientific and Technical Convention*, Johannesburg 392.

25 Masschelein, C.A., Vandenbussche, J. 1999. Opinião atual e perspectivas futuras para tecnologia de levedura

imobilizada na indústria do fabrico de bebida fermentada. *Brewers' Guardian* 28(4): 35.

Masters, B.R., Thaer, A.A. 1994. Microscopia confocal de divisão de varredura de tempo real da córnea humana *in vivo*. *Applied Optics* 33: 695.

Meilgaard, M. 1982. Diagnóstico de diferenças de aroma entre cervejas de sua composição química, *Brygmesteren* 5.

Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1996. Aplicação de células de levedura imobilizadas na indústria de fabrico de bebida fermentada. Em: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 661.

Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1997. Novos Desenvolvimentos na Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada Usando Sistemas de Bio-reator de Célula de Levedura Imobilizada. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 363.

Merchant, F.J.A. 1986. *Características de Difusividade de Glucose em Matrizes de Imobilização de Alginato*. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario.

Merchant, F.J.A., Margaritis, A., Wallace, J.B. 1987. Uma nova técnica para medição de difusividades de soluto em matrizes presas usadas em imobilização. *Biotechnology and Bioengineering* 30: 936.

Mochaba, F.M. 1997. Um novo e prático método de vitalidade de levedura baseado na liberação de íon magnésio. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 99.

Mochaba, F., O'Connor-Cox, E.S.C., Axcell, B.C. 1998. Procedimentos práticos para medição de viabilidade e vitalidade de levedura antes de passo. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(1): 1.

Muhr, A.H., Blanshard, J.M.V. 1982. Difusão em géis. *Polymer* 23: 1012.

Mulder, M.H.V., Smolders, C.A. 1986. Produção contínua de etanol controlada por processos de membrana. *Process Biochemistry* 21: 35.

Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A., Mitsui, S. 1993. Fabrico de bebida fermentada de cerveja usando um sistema de bio-reator de levedura imobilizada. *Bioprocess Technology* 16: 275.

Nakanishi, K., Onaka, T., Inoue, T. 1986. Um novo sistema de reator de levedura imobilizada para produção rápida de cerveja. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewing Company* 13.

Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984a. Estudo cinético de dicetonas vicinais no fabrico de bebida fermentada (I) formação de dicetonas vicinais totais. *MBAA Technical Quarterly* 21(2): 73.

Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984b. Estudo cinético de dicetonas vicinais no

fabrico de bebida fermentada (II) aspecto teórico para a formação de dicetonas vicinais totais. *MBAA Technical Quarterly* 21(4): 175.

Nakatani, K., Fukui, N., Nagami, K., Nishigaki, M. 1991. Análise cinética de formação de éster durante fermentação de cerveja. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49(4): 152.

Narziß, L., Miedaner, H., Graf, P., Eichhorn, P., Lustig, S. 1993. Aproximação tecnológica para aperfeiçoar estabilidade de aroma. *MBAA Technical Quarterly* 30: 48.

Nava Saucedo, J.E., Roisin, C., Barbotin, J.-N. 1996. Complexidade e heterogeneidade de micro-ambientes em sistemas imobilizados. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 39.

Nedovic, A.N., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I., Cutkovic, M. 1996. Um estudo em fermentação consideravelmente acelerada de cerveja usando um bio-reator de elevação de ar com células de levedura providas de alginato de cálcio. *Fifth World Congress of Chemical Engineering* 2: 474.

Neufeld, R. J., Poncelet, D.J., Norton, S.D. 1996. *Pedido de Patente Canadense No. 2133789*.

Norton, S., D'Amore, T. 1994. Efeitos fisiológicos de imobilização de célula de levedura: aplicações

para fabrico de bebida fermentada. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 365.

Norton, S., Watson, K., D'Amore, T. 1995. Tolerância de etanol de células de levedura de fabrico de bebida fermentada immobilizada. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 18.

O'Connor-Cox, E., Mochaba, F.M., Lodolo, E.J., Majara, M., Axcell, B. 1997. Desvanecimento de azul de metileno: uso em seu próprio risco. *MBAA Technical Quarterly* 34(1): 306.

O'Reilly, A.M., Scott, J.A. 1995. Co-immobilização definida de culturas de microorganismo. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 636.

Okazaki, M., Hamada, T., Fujji, H., Mizobe, A., Matsuzawa, S. 1995. Desenvolvimento de hidrogel poli(vinil álcool) para limpeza de água de despejo. I. Estudo de gel de poli(vinil álcool) como um veículo para immobilização de organismos. *Journal of Applied Polymer Science* 58: 2235.

Oldshue, J.Y., Herbst, N.R. 1992. *UM Guia de Mistura de Fluido*. New York: Lightnin.

Opekarova, M., Sigler, K. 1982. Energia de acidificação: indicador de atividade metabólica e mudanças autolíticas em *Saccharomyces cerevisiae* (levedura). *Folia Microbiologia* 27: 395.

Øyaas, J., Storro, I., Svendsen, H., Levine, D.W. 1995. O coeficiente de difusão efetiva e a constante de

distribuição para moléculas pequenas em gotas de gel de alginato de cálcio. *Biotechnology and Bioengineering* 47: 492.

Paiva, T.C.B., Sato, S., Visconti, A.E.S., Castro, L.A.B. 1996. Processo de fermentação alcóolica continua em um reator de torre com reciclagem de levedura flocculante. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58(0): 55.

Pajunen, E., Makinen, V., Gisler, R. 1987. *Fermentação secundária com levedura imobilizada. European Brewery Convention Congress*, Madrid 441.

10 Parascandola, P., de Alteriis, E. 1996. Modelo de crescimento e atividade respiratória de células de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de padeiro) se desenvolvendo em um gel de gelatina insolubilizada. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23: 7.

15 Perry, R.H., Green, D.W. 1984. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. New York: McGraw-Hill Book Company.

Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. 1998a. Características de transferência de massa de células imobilizadas usadas em processos de fermentação. *Critical Reviews in Biotechnology* 18(2 & 3): 237.

Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I. 1998b. Fundamentos de células de levedura imobilizadas para fermentação de cerveja contínua: uma revisão. *Journal of the Institute of Brewing* 104: 19.

Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I., Russell, I. 1999. Imobilização de gel de Kappa-carrageenan de levedura de fabrico de bebida fermentada grande. *Journal of the Institute of Brewing* 105(6): 398.

5 Polson, A. 1950. Alguns aspectos de difusão em solução e uma definição de uma partícula coloidal. *Journal of Physical and Colloidal Chemistry* 54: 649.

Power, D.A., McCuen, P.J. 1988. *Manual of BBL[®] Products and Laboratory Procedures, Sixth Edition.*

10 Maryland: Becton Dickinson Microbiology Systems 249.

Priest, F.G., Campbell, I. 1996. *Brewing Microbiology 2nd Ed.*, UK: Chapman and Hall.

Rees, D.A. 1972. Géis de polissacarídeo: uma revisão molecular. *Chemistry and Industry* 19: 630.

15 Roca, E., Camesselle, C., Nunez, M. 1995. Fermentação etanólica contínua por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em gotas de Ca-alginato endurecidas com Al^{3+} . *Biotechnology Letters* 9: 815.

20 Roukas, T. 1994. Produção contínua de etanol de extrato de vagem de alfarrobeira por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em um reator de leito acondicionado. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59: 387.

25 Russell, I., Stewart, G.G. 1992. Contribuição de levedura e tecnologia de imobilização para desenvolvimento de aroma em bebidas fermentadas. *Food Technology* 148.

Ryder, D.S. 1985. O processo de crescimento de levedura de fabrico de bebida fermentada e discussão biotecnológica. *MBAA Technical Quarterly* 22: 124.

Ryu, D.D., Kim, Y.J., Kim, J.H. 1984. Efeito de suplemento de ar na performance de sistema de fermentação de etanol contínuo. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 12.

Salmon, P.M., Robertson, C.R. 1987. Limitações de transferência de massa em células imobilizadas de crescimento contendo gotas de gel. *Journal of Theoretical Biology* 125: 325.

Schumpe, A., Quicker, G., Deckwer, W.-D. 1982. Solubilidades de gás em meio de cultura microbial. *Advances in Biochemical Engineering* 24: 1.

Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. 1994. Supressão de formação de alfa-acetolactato em fabrico de bebida fermentada com levedura imobilizada. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 69.

Smart, K.A. 1995. A importância da parede de célula de levedura de fabrico de bebida fermentada. *Brewers' Guardian* 124(4): 44.

Smart, K.A. 1999. Envelhecimento em levedura de fabrico de bebida fermentada. *Brewers' Guardian* 19.

Smart, K.A., Chambers, K.M., Lambert, I., Jenkins, C. 1999. Uso de procedimentos de violeta de metileno para determinar viabilidade e validade de levedura. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57(1):18.

Sharpe, F.R. 1988. Assesso e controle de aroma de cerveja. *Journal of the Institute of Brewing* 95: 301.

Stewart, G.G. 1977. Fermentação – ontem, hoje e amanhã. *MBAA Technical Quarterly* 14: 1.

5 Stewart, G.G., Russell, I. 1986. A relevância das propriedades de floculação de levedura na indústria de fabrico de bebida fermentada de hoje. *European Brewery Convention Symposium on Brewers' Yeast*, Helsinki 53.

10 Stewart, G.G., Lyness, A., Younis, O. 1999. O controle de síntese de éster durante fermentação de mosto. *MBAA Technical Quarterly* 36(1): 61.

Takahashi, S. and Kimura, Y. 1996. Efeito dos parâmetros de fermentação principal no aroma envelhecido. *Brauwelt International* 14 (3): 253.

15 Taylor, D.G. 1989. Influência na prática de cervejaria na composição de mosto. *Brewer's Guardian* 118(2): 30.

20 Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (ASBC). 1992. *Methods of Analysis*. 8th Edition. Minnesota: ASBC.

Uttamlal, M., Walt, D.R. 1995. Um sensor de dióxido de carbono de fibra ótica para monitoramento de fermentação. *Biotechnology* 13: 597.

25 Venâncio, A., Teixeira, J.A. 1997. Caracterização de coeficientes de difusão de açúcar em membranas de alginato. *Biotechnology Techniques* 11: 183.

Vilachá, C., Uhlig, K. 1985. A medição de níveis baixos de oxigênio em cerveja engarrafada. *Brauwelt International* 70.

5 Virkajärvi, I., Kronlöf, J. 1998. Estabilidade de longo prazo de colunas de levedura imobilizada em fermentação primária. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(2): 70.

Vives, C., Casas, C., Gòdia, F., Solà, C. 1993. Determinação das cinéticas de fermentação intrínseca de células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em gotas de alginate de cálcio e observação no seu desenvolvimento. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 467.

15 Wada, M., Kato, J., Chibata, I. 1979. Uma nova imobilização de células microbiais. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 8: 241.

Wang, H.Y., Lee, S.S., Takach, Y., Cawthon, L. 1982. Carregamento de célula microbiana de maximização em sistemas de célula imobilizada. *Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 12* 139.

20 Westrin, B.A., Axelsson, A. 1991. Difusão em géis contendo células imobilizadas: uma revisão crítica. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 439.

Wheatcroft, R., Lim, Y.M., Hawthorne, D.B., Clarke, B.J., Kavanagh, T.E. 1988. Um assessorio do uso de oxigênio específico para diagnosticar a performance de fermentação de leveduras de fabrico de bebida fermentada. *The*

Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section) Proceedings of the Twentieth Convention, Brinsbane 193.

White, F.H., Portno, A.D. 1978. Fermentação continua por levedura de cervejas imobilizadas. *Journal of the*
5 *Institute of Brewing* 84: 228.

Wijffels, R.H., de Gooijer, C.D., Schepers, A.W., Tramper, J. 1996. Crescimento de célula imobilizada: limitação de difusão na expansão de micro-colônias. Em: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and*
10 *Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 249.

Wijffels, R.H., Englund, G., Hunik, J.H., Leenen, J.T.M., Bakketun, A. et al. 1995. Efeitos de limitação de difusão na nitrificação imobilizada de microorganismos em baixas
15 temperaturas. *Biotechnology and Bioengineering* 45: 1.

Aivasidis, A., 1996. Outra Olhada em Sistemas de Levedura Imobilizada. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 27.

Aivasidis, A., Wandrey, C., Eils, H.-G. & Katzke, M., 1991. Fermentação Contínua de Cerveja Livre de Álcool em Reatores de Leito Fluidizado. *Proceedings of the*
20 *European Brewery Convention Congress, Lisbon, 1991*, 569.

Akiyama-Jibiki, M., Ishibiki, T., Yamashita, H. & Eto, M., 1997. Um Ensaio Rápido e Simples para Medir
25 Floculação em Levedura de Cerveja. *Master Brewers of the Americas Technical Quarterly*, 34, 278.

Alfa Laval Brewery Systems, 1997. Sistema de Levedura Imobilizada que Reduz o Tempo de Maturação. *Brewers' Guardian*, 126, 26.

Alfa Laval Brewery Systems, 1996. *Maturação Contínua de Cerveja com Levedura Imobilizada*, Company Report.

Al Taweel, A.M. & Walker, L.D., 1983. Dispersão Líquida em Misturadores em linha Estáticos. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 61, 527.

10 Andries, M., Derdelinckx, G., Ione, K.G., Delvaux, F., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1997a. Zeólitos como Catalisadores para a Conversão Fria e Direta de Acetolactato em Acetoína. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 48.

15 Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1995. Desenho de um Sistema de Bio-reator de Levedura Imobilizada de Múltipla-Proposta para Aplicação em Processo de Fabrico de Bebida Fermentada. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the*
20 *Brewing Industry, Espoo, Finland*, 134.

Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1996a. Desenho e Aplicação de Um Bio-reator de Laço Imobilizado para Fermentação de Bebida Contínua. in *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, eds.)
25 Amsterdam: Elsevier Science, 672.

Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschlein, C.A., 1996b. Desenho e Aplicações de um Bio-reator de Laço Imobilizado para a Fermentação Contínua de Cerveja. *Proceedings of the 6th International Brewing Technology Conference*, Harrogate, 380.

Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschlein, C.A., 1997b. Resultados Práticos Usando o Sistema de Fermentação Imobilizado de Meura-Delta. *Brewers' Guardian*, 26.

Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschlein, C.A., 1997c. Primeiros Resultados na Fermentação Contínua Semi-Industrial com o Fermentador de Levedura Imobilizada Meura-Delta. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 34, 119.

Argiriou, T., Kanellaki, M., Voliotis, S. & Koutinas, A.A., 1996. Células de Levedura Kissiris-Suportada: Aperfeiçoamento na Estabilidade e Produtividade Biocatalítica Alta por Preservativos Sucessivos a 0 °C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 4028.

Audet, P. & Lacroix, C., 1989. Dois Processos de Dispersão de Fase para a Produção de Gotas de Gel de Biopolímero: Efeitos de Parâmetros Barious no Tamanho da Gota e sua Distribuição. *Process Biochemistry*, 24, 217.

Axelsson, A. & Persson, B., 1988. Determinação de Coeficientes de Difusão Efetiva em Placas de

Alginato de Cálcio com Teor Variante de Célula de Levedura. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 18, 231.

Bardi, E.P., Koutinas, A.A., Soupioni, M.J. & Kanellaki, M.E., 1996. Imobilização de Levedura em Material
5 Celulósico Deslignificado para Fabrico de Bebida Fermentada de
Baixa Temperatura. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*,
44, 463.

Berkman, P, D. & Calabrese, R, V., 1988.
Dispersão de Líquidos Viscosos por Fluxo Turbulento em um
10 Misturador Estático. *American Institute of Chemical Engineering
Journal*. 34, 602.

Borremans, E., 1997. Fermentação Secundária
de Cerveja com Levedura Imobilizada. *Cerevisia Belgian Journal
of Brewing & Biotechnology*, 22, 33.

15 Bower, J.L.. & Christensen, C.M., 1995.
Disruptive Technologies: Captação de Onda. *Harvard Business
Review*, 73, 43.

Breitenbücher, K. & Mistler, M., 1995.
Fermentadores de Leito Fluidizado para a Produção Contínua de
20 Bebida Não-Alcoólica com Veículos de Vidro Sinterizado de
Poros Abertos. *European Brewery Convention Symposium:
Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo,
Finland*, 77.

Brewers Association of Canada, 1988. *Sobre a*
25 *Cerveja e A Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada*, Ottawa,
Ontario.

Broderick, Harold M., 1979. *The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry*, 2nd Ed. Impressions Inc., Wisconsin.

Burns, J.A., 1937. *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 31.

Calleja, G.B. & Johnson, B.F., 1977. Uma Comparação de Métodos Quantitativos para Medição de Flocculação de Levedura. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 68.

Carberry, J.J., 1976. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*, McGraw-Hill.

Carberry, J.J. & Varma, A., 1987. *Chemical Reaction and Reactor Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York.

Cashin, M.-M., 1996. Estudos Comparativos de Cinco Suportes Porosos para Imobilização de Levedura por Adsorção/Fixação. *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 5.

Champagne, C.P., 1994. Overview: Tecnologia de Célula Imobilizada em Processamento de Alimento. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 33.

Chang, C.M., Lu, W.J., Own, K.S. & Hwang, S.J., 1994. Comparação de Reatores de Tanque de Elevação de Ar e de Mistura para Reações de Enzima Imobilizada. *Process Biochemistry*, 29, 133.

Chao, X., Ye, G. & Shi, S., 1990. Estudo Cinético do Processo Fermentativo Contínuo de Produção de Cerveja Verde com Levedura Imobilizada. *Huagong Jixie*, 17, 18.

Chibata, I., 1979. Células microbiais imobilizadas com Gel de Poliacrilamida e Carrageenan e suas Aplicações Industriais. American Chemical Society Series, 106, 187.

Chisti, M.Y., 1991. *Airlift Bioreactors*, Elsevier Applied Science, New York.

Chisti, Y. & Moo-Young, M., 1993. Aperfeiçoar a Performance de Reatores de Elevação de Ar. *Chemical Engineering Progress*, 6, 38.

Chladek, L., Voborsky, J., Sima, J. & Hosek, Z., 1989. *Prumysl Potravin*, 40, 590.

Coe, H.S. & Clevenger, G.H., 1916. Métodos para Determinar as Capacidades de Tanque de Espessamento de Lodo. *Transcript of the American Institute of Mechanical Engineering*, 55, 356.

Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1987. Produção de Cerveja com Levedura Imobilizada. *Proceedings of the European Brewery Convention, Madrid*, 433.

Decamps, C. & Norton, S., 1994. Novo Processo de Emulsão usando Misturador Estático para a Produção de Gotas de Gel de κ -Carrageenan. Labatt Breweries of Canada Internal Report.

Del Pozo, M., Briens, C.L. & Wild, G., 1994. Efeito de Propriedades de Coalescência Líquida na Transferência de Massa, Transferência de Calor e Hidrodinâmicas em um Leito Fluidizado de Três Fases. *The Chemical Engineering Journal*, 55, 5 1.

Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996a. Alfa Laval/Schott Sistema de Fermentação Secundária com Levedura Imobilizada. *Brewing & Distilling International*, 27, 35.

Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996b. 10 Fermentação Secundária de Cerveja com Levedura Imobilizada. *Brauwelt International*, 14, 344.

Dillenhoffer, W. & Ronn, D., 1996c Maturação Contínua de Cerveja. *Beverage World International*, 34.

Domeny, Z., Smogrovicova, D., Gemeiner, P., 15 Malovikova, A. & Sturdik, E., 1996. Gel de Pectato de Cálcio para Imobilizar Levedura para Produção de Cerveja Contínua. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group V, Potsdam, Germany*, Poster 12.

Domingues, L., Lima, N. & Teixeira, J.A., 20 2000. Contaminação de um Bioreator Contínuo de Densidade de Célula Alta. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 584.

Donnelly, D., 1998. Cinéticas de Metabolismo de Açúcar em um Bioreator de Leito Fluidizado para Produção de Cerveja. *Master Brewers Association of the Americas Annual 25 Convention*, Minneapolis, Poster 8.

- Donnelly, D., Bergin, J., Gardiner, S. & Cahill, G., 1998. Cinéticas de Metabolismo de Açúcar em um Reator de Leito Fluidizado para Produção de Cerveja. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 183.
- 5 Dulieu, C., Boivin, P., Malanda, M., Dautzenberg, H. & Poncelet, D., 1997. Encapsulamento de α -Acetolactato Decarboxilase para Evitar Formação de Diacetil. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 44.
- 10 Duncombe, D., Bower, P., Bromberg, S., Fehring, J., Lau, V. & Tata, M., 1996. A Contribuição de Células Livres em um Sistema de Levedura Imobilizada. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Poster Presentation.
- 15 Dziondziak, K. & Seiffert, T., 1995. Processo para a Produção Contínua de Cerveja Livre de Álcool. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 301.
- 20 Enari, T.-M., 1995. State of the Art of Brewing Research. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 1.
- Fix, G., 1989. Principles of Brewing Science. Brewers Publications, USA.
- Fouhy, K. & Parkinson, G., 1996. Brewers Break with Tradition. *Chemical Engineering*, 103, 45.
- 25 Gil, G.H., 1991. Produção Contínua de Etanol em um Bioreator de Célula Imobilizada e Suspensa de Dois

Estágios (Álcool Dehidrogenase). *Ph.D. Thesis*, Georgia Institute of Technology.

Gilliland, R.B., 1951. As Características da Floculação de Leveduras de Fabrico de Bebida Fermentada Durante Fermentação. *Proceedings of the European Brewing Convention*, 8, 35.

Groboillot, A., D.K. Boadi, D. Poncelet & Neufeld, R.J., 1994. Imobilização de Células para Aplicação na Indústria de Alimento. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 75.

Haikara, A., Virkajarvi, I., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Contaminações Microbiaais em Bioreatores de Levedura Imobilizada para Fermentações Primárias. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 439.

Heggart, H.M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R.J., Dowhanick, T.M. & Russell, I., 1999. Fatores que Afetam as Características de Viabilidade e Vitalidade de Levedura: Uma Revisão. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 383.

Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W. & Hoeks, F., 1989. Revisão na Aplicação de Reatores de Leito Fluidizado Anaeróbico em Tratamento De Água de Despejo. *The Chemical Engineering Journal*, 41, B 37.

Heijnen, J.J., Mulder, A., Weltevrede, R., Hols, J. & van Leeuwen, H.L.J.M., 1991. Tratamento Anaeróbico em Grande Escala de Água de Despejo Industrial Usando Reatores de Biofilme. *Water Science Technology*, 23, 1427.

Heijnen, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R.W.R. & Mulder, A., 1993. Desenvolvimento e Escala de um Reator de Suspensão de Elevação de Ar de Biofilme Aeróbico. *Water Science Technology*, 27, 253.

5 Helm, E., Nohr, B. & Thorne, R.S.W., 1953. A Medição de Floculência de Levedura e sua Significância no Fabrico de Bebida Fermentada. *Wallerstein Laboratories Communications*, 16, 315.

Horitsu, H., Wang, M.Y. & Kawai, K., 1991.
10 Um Processo Modificado para Fermentação de Tempero de Soja por Fermentação por Leveduras Imobilizadas. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 269.

Hryclik, Kevin, Gerry Ginter, Jim Helmke, & Jim Spiers, 1987. *The How's And Why's of Brewing*, Revision #2,
15 LBOC.

Hunik, J.H., Tramper, J. & Wijffels, R.H., 1994. Uma Estratégia para Processos de Nitrificação com Células Imobilizadas de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering*, 11, 73.

20 Hwang, S.-J. & Fan, L.-S., 1986. Algumas Considerações de Desenho de uma Gota de Tubo de Gás-Líquido-Sólido. *The Chemical Engineering Journal*, 33, 49.

Hyttinen, I., Kronlof, J. & Hartwall, P., 1995. Uso de Vidro Poroso em Fabrico de Bebida Fermentada de
25 Hartwall na Maturação de Cerveja com Levedura Imobilizada.

European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland, 55.

Ibrahim, Y.A.A., Briens, C.L., Margaritis, A. & Bergougnou, M.A., 1996. Característica Hidrodinâmica de uma
5 Coluna de Leito Fluidizado Inverso de Três Fases. *Journal of the American Institute of Chemical Engineering*, 42, 1889.

Inoue, T., 1995. Desenvolvimento de um Sistema de Fermentação de Levedura Imobilizada de Dois Estágios para Fabrico de Bebida Fermentada de Cerveja
10 Contínuo. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels, 25.*

Iserentant, D., 1995. Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. *Fermented Beverage Production*. (A.G.H. Lea & J.R. Piggott, eds.) London: Chapman
15 & Hall, 45.

Kaplan, R.S. & Norton, D.P., 1996. The Balanced Scorecard. *President and Fellows of Harvard College, Harvard Business School Press, Massachusetts, USA.*

Karamanev, D.G., Nagamune, T. & Endo, I.,
20 1992. Estudo de Hidrodinâmica e Transferência de Massa de um Bioreator de Leito de Tubo de Gás-Líquido-Sólido. *Chemical Engineering Science*, 47, 3581.

Karel, S.F., Libicki, S.B. & Robertson, C.R.,
1985. A imobilização de Células Totais: Princípios de
25 Engenharia. *Chemical Engineering Science*, 40, 1321.

Katzbauer, B., Narodoslowsky, M. & Moser, A., 1995. Sistema de Classificação para Técnicas de Imobilização. *Bioprocess Engineering*, 12, 173.

Kennard, M. & Janekeh, M., 1991. Mistura de
5 Duas e Três Fases em um Fermentador de Elevação de Gás de
Tubo Concêntrico. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1261.

Kolot, F.B., 1988. *Immobilized Microbial
Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications*.

Robert E. Krieger Publishing Company, Florida.

10 Kolpachki, A.P., Isaeva, V.S., Kazantsev, E.N.
& Fertman, G.I., 1980. Intensificação de Fermentação de Mosto
com Leveduras Imobilizadas. *Fermentnaya I Spirtovaya
Promyshlennost*, 9.

Krikilion, Ph., Andries, M., Goffin, O., van
15 Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Matriz Ótima e
Desenho de Reator para Fermentação de Alta Gravidade com
Levedura Imobilizada. *Proceedings of the European Brewery
Convention Congress, Brussels*, 419.

Kronlof, J., 1994. Levedura Imobilizada em
20 Fermentação Contínua de Cerveja. Tese Ph.D., VTT Publications,
167.

Kronlof, J., Linko, M. & Pajunen, E., 1995.
Fermentação Primária com Experiências de Escala Piloto de
Sistema de Leito Acondicionado de Dois Estágios. *European
25 Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications
in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 118.

Kronlof, J. & Virkajarvi, I., 1996. Fermentação Principal com Levedura Imobilizada – Escala Piloto *European Brewery Convention Brewing Science Group Bulletin, Zoeterwoude*, 94.

5 Kronlof, J., Virkajarvi, I., Storgards, E.L., Londesborough, J. & Dymond, G., 2000. Fermentação Primária e Secundária Combinadas com Levedura Imobilizada. *World Brewing Congress*, Poster #56.

Ku, W.Y., 1982. Cinéticas de Fermentação para
10 a Produção de Etanol por Células de Levedura Imobilizada (Biomass). *Ph.D. Thesis*, The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

Kunze, W., 1999. Technology Brewing and Malting. VLB Berlin, Germany.

15 Kynch, G.J., 1952. *Transcripts of the Faraday Society*, 48, 166.

Lacroix, C., Paquin, C. & Arnaud, J.P., 1990. Fermentação em Dosagem com Células de Crescimento Presas de *Lactobacillus casei*: Otimização das Propriedades Reológicas da
20 Matriz de Gel de Prendimento. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 403.

Levenspiel, O., 1972. Engenharia de Reação Química. *John Wiley & Sons*, New York.

Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N., Lindborg,
25 K., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Fermentação Principal com

Levedura Imobilizada – Uma Parada?. *Proceedings of the European Brewery Convention, Maastricht*, 385.

Livingston, A.G. & Chase, H.A., 1990. Transferência de Massa de Líquido-Sólido em um Reator de Leito Fluidizado de Tubo de Três Fases. *Chemical Engineering Communications*, 92, 225.

Livingston, A.G. & Zhang, S.F., 1993. Comportamento hidrodinâmico de Reatores de Elevação de Ar de Três Fases (Gás-Líquido-Sólido). *Chemical Engineering Science*, 48, 1641.

Lommi, H., 1990. Levedura Imobilizada para Maturação e Cerveja Livre de Álcool. *Brewing and Distilling International*, 21, 23.

Lommi, H., Gronqvist, A., & Pajunen, E., 1990. Produção de Cerveja em Reator de Levedura Imobilizada. *Food Technology*, 5, 128.

Lorenzen, K., 1996. Plantas de Levedura Imobilizada para Produção de Cerveja Livre de Álcool e Maturação Rápida. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.

Maeba, H., Umemoto, S., Sato, M. & Shinotsuka, K., 2000. Fermentação Primária com Levedura Imobilizada em Gotas de Chitosan Porosas – Ensaio de Escala Piloto. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing – Asia Pacific Section*, 82.

Mafra, I., Machado Cruz, J.M. & Teixeira, J.A., 1997. Maturação de Cerveja em um Bioreator de Operação Contínua usando um tipo de Levedura de Fabrico de Bebida Fermentada de Floculação. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 509.

Maiorella, B.L., 1983. *Fermentative Ethanol Production (Alcohol, Distillation, Economics)*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.

Margaritis, A., 1975. *A Study of the Rotorfermentor and the Kinetics of Ethanol Fermentation*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.

Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982a. Produção Contínua de Etanol de Jerusalem Artichoke Tubers, Parte I. Uso de Células Livres de *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1473.

Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982b. Produção Contínua de Etanol de Jerusalem Artichoke Tubers, Parte II. Uso de Células Imobilizadas de *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1483.

Margaritis, A. & Merchant, F., 1984. Avanços na Produção de Etanol Usando Sistemas de Célula Imobilizada. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1, 339.

Margaritis, A. & Rowe, G.E., 1983. Produção de Etanol Usando *Zymomonas mobilis* Imobilizado em Géis diferentes de Carrageenan. *Developments in Industrial Microbiology*, 24, 329.

Margaritis, A., te Bokkel, D. & El Kashab, M., 1987. Fermentação de Dosagem Repetida de Etanol Usando Células Imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em um Sistema de Bioreator Fluidizado. *Biological Research on*
5 *Industrial Yeasts. Volume I*, (G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein & R.R. Hiebsch, eds.) Boca Raton: CRC Press, 121.

Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1982. O Uso de Células Imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em um novo Bioreator Fluidizado para Produzir Etanol. *Fourth Symposium on*
10 *Biotechnology in Energy Production and Conservation*, Gatlinburg, Tennessee, 12, 147.

Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1984. Novos Sistemas de Bioreator e suas Aplicações. *Bio/Technology*, 2, 447.

15 Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978a. O Rotorfermentador. Parte I: Descrição do Aparelho, Requerimentos de Energia e Características de Transferência. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 709.

20 Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978b. O Rotorfermentador: Parte II: Aplicação à Fermentação de Etanol. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 727.

25 Masschelein, C.A., 1997. Uma Visão Realística no Papel de Pesquisa na Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada de Hoje. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 103.

Masschelein, C.A., 1994. Estado da Técnica e Desenvolvimentos Futuros na Fermentação. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 1.

Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996a. O Fermentador de Levedura Imobilizada de Meura-Delta para a Produção Contínua de Cerveja. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 28.

Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996b. Fermentador de Levedura Imobilizada de Meura-Delta para Produção Contínua de Cerveja. *Brewing & Distilling International*, 27, 16.

Masschelein, C.A., Andries, M., Franken, F., Van de Winkel, L. & Van Beveren, P.C., 1995. O Conceito de Laço de Membrana: Uma Nova Aproximação para Transferência Ótima de Oxigênio em Suspensões de Levedura de Densidade Alta de Célula. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 377.

Masschelein, C.A., Ryder, D.S. & Simon, J-P., 1994. Tecnologia de Célula Imobilizada na Produção de Cerveja. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 155.

Matsuura, K., Hirotsune, M., Nakada, F. & Hamachi, M., 1991. Um Estudo Cinético na Fermentação de Proposta Contínua. *Hakkokogaku Kaishi*, 69, 345.

McCabe, J.T., 1999. The Practical Brewer: Um Manual para a Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada. Master Brewers Association of the Americas, USA.

Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1997. Novos Desenvolvimentos na Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada Usando Sistemas de Bioreator de Célula de Levedura Imobilizada. *Journal of the*
5 *Institute of Brewing*, 103, 363.

Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1996. Aplicação de Células de Levedura Imobilizada na Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.H.
10 Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, eds.) Amsterdam: Elsevier Science, 661.

Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1995. Sistemas de Elevação de Gás para Fermentação de Célula Imobilizada. *European Brewery*
15 *Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 125.

Mensour, N., Margaritis, A., Russell, I., Briens, C.L., Decamps, C. & Norton, S., 1994. Produção de cerveja com Células de Levedura Imobilizada em um Reator de Elevação de
20 Gás de Escala de Planta Piloto. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 49.

Middleman, S., 1974. Distribuições de Tamanho de Gota Produzidas por Fluxo de Tubo Turbulento de Fluidos Imiscíveis Através de um Misturador Estático. *Industrial*
25 *Engineering and Chemical Process Design and Development*, 13, 78.

Mieth, H.O., 1995. Plantas de Levedura Imobilizada para Produção de Cerveja Livre de Álcool e Maturação Rápida. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 166.

5 Mistler, M., Breitenbücher, K. & Jaeger, R., 1995. Fermentação Contínua de Cerveja com Levedura Imobilizada em Veículos de Vidro Poroso. *Brewers Digest*, 70, 48.

Moll, M. & Duteurtre, B., 1996. Fermentação e
10 Maturação de Cerveja com Microorganismos Imobilizados. *Brauwelt International*, 3, 248.

Motai, H., Hamada, T. & Fukushima, Y., 1993. Aplicação de um Sistema de Bioreator para Produção de Tempero de Soja. em *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*.
15 (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 315.

Muhr, A.H. & Blanchard, M.V., 1982. Difusão em Géis. *Polymer*, 23, 1012.

Mwesigye, P.K & Barford, J.P., 1994.
20 Transporte de Sucrose por *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 687.

Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A. & Mitsui, S., 1993. Fabrico de Bebida Fermentada Cerveja Usando um Sistema de Bioreator de Levedura Imobilizada. em *Industrial
25 Applications of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 275.

Nakanishi, K., T. Onaka, T. Inoue & Kubo, S., 1985. Um Novo Sistema de Reator de Levedura Imobilizada para Produção de Cerveja. *Proceedings of the 20th European Brewing Convention Congress*, Helsinki, 331.

5 Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K. & Kumada, J., 1984. Estudo Cinético de Dicetonas Vicinais no Fabrico de Bebida Fermentada (I) Formação de Dicetonas Vicinais Totais. *Master Brewers Association of the Americas Technical Committee*, 21, 73.

10 Nedovic, V.A., Leskosek-Cukalovic, I. & Vunjak-Novaki, G., 1996a. Fermentação em Curto Tempo de Cerveja em um Bioreator de Elevação de Ar de Levedura de Imobilização. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.

15 Nedovic, V.A., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I. & Cutkovic, M., 1996b. Um Estudo na Fermentação Consideravelmente Acelerada de Cerveja Usando um Bioreator de Elevação de Ar com Células de Levedura Presas de Alginato de Cálcio. *Proceedings of the 5th World Congress of*
20 *Chemical Engineering, San Diego*, 474.

 Neufeld, R.J., Norton, S. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Produção de Gota de Carrageenan de Célula Imobilizada e um Processo de Fabrico de Bebida Fermentada Utilizando Células de Levedura Imobilizada de Gota de Carrageenan. *Pedido de*
25 *Patente Canadense* 2,133,789.

Nguyen, A.L. & Luong, J.H.T., 1986. Difusão em Gotas de Gel de k-Carrageenan. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1261.

5 Nielsen, J. & Villadsen, J., 1994. Modelagem de Bioreator. *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, 9.

Norton, S. & D'Amore, T., 1994. Efeitos Fisiológicos de Imobilização de Célula de Levedura: Aplicações par. Fabrico de Bebida Fermentada. *Enzyme and Microbial*
10 *Technology*, 16, 365.

Norton, S., Neufeld, R.J. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Produção de Gota de Carrageenan de Célula Imobilizada e um Processo de Fabrico de Bebida Fermentada Utilizando Células de Levedura Imobilizada de Gota de Carrageenan. *Pedido de*
15 *Patente Canadense* 2,133,789.

Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Decamps, C. & Russell, I., 1994. Fermentação Primária em Escala Piloto de Cerveja com um Reator de Levedura Imobilizada de Elevação de Gás. *Proceedings of the European Brewing*
20 *Convention, Sub-Committee*, Dublin.

Norton, S., Watson, K. & D'Amore, T., 1995. Tolerância de Etanol de Células de Levedura de Bebida Fermentada Imobilizada. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 43, 18.

25 Nothaft, A., 1995. A Partida de um Sistema de Levedura Imobilizada para Fermentação Secundária na Brahma.

European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland, 41.

Nunokawa, Y. & Hirotsune, M., 1993. Produção de Proposta Suave por um Sistema de Reator de Levedura Imobilizada. in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 235.

Pajunen, E., 1996a. O Comportamento de Células de Levedura Imobilizada. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 33.

Pajunen, E., 1996b. Sistema Imobilizado na Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 38.

Pajunen, E., 1995. Maturação de Cerveja Lager de Levedura Imobilizada: DEAE-Celulose em Sinebrychoff. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 24.

Pajunen E. & Gronqvist A., 1994. Fermentadores de Levedura Imobilizada para Maturação de Cerveja Lager Contínua. *Proceedings for the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 101.

Pajunen, E., A. Gronqvist & Lommi, H., 1989. Fermentação Secundária Contínua e Maturação de Cerveja em um Reator de Levedura Imobilizada. *MBAA Technical Quarterly*, 26, 147.

Pajunen, E., Gronqvist, A., Simonsen, B. & Lommi, H., 1994. Fermentadores de Levedura Imobilizada para Maturação de Cerveja Lager Contínua. *ALAFACE Annual Meeting, Quito*, 13.

5 Pajunen, E., Ranta, B., Andersen, K., Lommi, H., Viljava, T., Bergin, J. & Guercia, H., 2000a. Novo Processo para Fermentação de Cerveja com Levedura Imobilizada. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing, Asia-Pacific Section*, 91.

10 Pajunen, E., Viljava, T. & Lommi, H., 2000b. Nova Fermentação Primária com Sistema de Levedura Imobilizada. *World Brewing Congress*, Oral presentation.

Paul, F. & Vignais, P.M., 1980. Fotofosforilação em Cromatóforos Bacteriais Presos em Gel de Alginato: Aperfeiçoamento das Propriedades Físicas e Biomédicas de Gotas de Gel com Bário como Agente de Indução de Gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 2, 281.

Peach, M., 1996. Fermenting Faster Pints. *New Scientist*, 2058, 23.

20 Pilkington, P.H, Margaritis, A. & Mensour, N.A., 1998a. Características de Transferência de Massa de Células Imobilizadas Usadas nos Processos de Fermentação. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18, 237.

25 Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. & Russell, I., 1998b. Fundamentos de Células de Levedura

Imobilizada para Fermentação de Cerveja Contínua: Uma Revisão. *Journal of the Institute of Brewing*, 104, 19.

Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I. & Russell, I., 1999. Imobilização de Gel
5 de Kappa-Carrageenan de Levedura de Fabrico de Bebida Fermentada de Lager. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 398.

Pirt, S.J., 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific, Oxford.

10 Pittner, H. & Back, W., 1995. Produção Contínua de Mosto Acidificado para Cerveja Livre de Álcool Usando Bactéria de Ácido Láctico Imobilizada. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 32, 163.

Pittner, H., W. Back, W. Swinkels, E.
15 Meersman, B. van Dieren & Lommi, H., 1993.

Produção Contínua de Mosto Acidificado para Cerveja Livre de Álcool Usando Bactéria de Ácido Láctico Imobilizada. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress*, Oslo, 323.

20 Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1981. Levedura de Fabrico de Bebida Fermentada Imobilizada. *Kvasny Prumysl*, 27, 193.

Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J, P., Neufeld, R. J. & Fournier, A., 1992. Produção de Gotas de
25 Alginato por Emulsificação/Gelação Interna. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 38, 39.

Poncelet, D., Poncelet de Smet, B., Beaulieu, C. & Neufeld, R. J., 1993. Escala de uma Gota de Gel e Produção de Microcápsula em Imobilização de Célula. in *Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization*, Goosen, M.F.A., Ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Prakash, A., Briens, C.L. & Bergougnou, M.A., 1987. Transferência de Massa Entre Partículas Sólidas e Líquido em um Leito Fluidizado de Três Fases. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 65, 228.

Prasad, K.Y. & Ramanujam, T.K., 1995. Coeficiente de Transferência de Massa Volumétrica Total em um Bioreator de Laço de Jato de Fluxo Reverso Modificado com Partículas de Baixa Densidade. *Bioprocess Engineering*, 12, 214.

Pritchett, Price. 1993. *Culture Shift*. Texas: Pritchett & Associates, Inc.

Que, F., 1993. Usando um Tipo em Cadeia de Partículas de Gel de Alginato como Suporte de Célula Imobilizada e Algum Conceito de Desenho de Fermentador de Leito Acondicionado. *Biotechnology Techniques*, 7, 755.

Rajotte, P., 1998. Fermentação Contínua com Células de Levedura Imobilizada. *American Brewer*, 76, 42.

Rajotte, P., 1997. Jumping into the Next Millenium Canadian Style. *American Brewer*, 75, 42.

Russell, I., Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A. & Briens, C., 1995. Células de Levedura Imobilizada:

Aplicações para Fabrico de Bebida Fermentada. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 159.

Ryder, D.S. & Masschelein, C.A., 1985. O Processo de Crescimento de Levedura de Fabrico de Bebida Fermentada e o Desenvolvimento Biotecnológico. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43, 66.

Satterfield, C.N., 1970. *Transferência de Massa em Catalisadores Heterogêneos*, MIT Press, Cambridge.

Scott, J.A., O'Reilly, A.M. & Kirkhope, S., 1995. Matriz de Esponja Fibrosa para Levedura Imobilizada para Fermentações de Bebida. *Biotechnology Techniques*, 9, 305.

Shindo, S. & Kamimur, M., 1990. Imobilização de Levedura com Gotas de Gel de PVA Vazadas. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 232.

Shindo, S., Sahara, H. & Koshino, S., 1994a. Supressão de Formação de α -Acetolactate no Fabrico de Bebida Fermentada com Levedura Imobilizada. *Journal of the Institute of Brewing*, 100, 69.

Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. & Tanaka, H., 1993. Controle de Precursor de Diacetil [α -acetolactato] Formação Durante Fermentação de Álcool com Células de Levedura Imobilizada em Fibras de Alginato com Camadas de Gel Duplas. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, 199.

Shindo, S., Sahara, S., Watanabe, N. & Koshino, S., 1994b. Fermentação Principal com Levedura Imobilizada

Usando Reator de Leito Fluidizado. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 109.

Sinitsyn, A.P., Rajnina, E.I., Efremov, A.B., Gracheva, I.M. & Gernet, M.V., 1986. Fermentação de Mash hidrolizada por Leveduras Imobilizadas em Veículos de Borosilicato. *Fermentnaya I Spirtovaya Promyshlennost*, 31.

Smogrovicova, D. & Domyeny, Z., 1999. Formação de Sub-produto Volátil de Cerveja em Temperatura de Fermentação Diferente usando Leveduras Imobilizadas. *Process Biochemistry*, 34, 785.

Smogrovicova, D., Domyeny, Z. Gemeiner, P. Malovikova, A. & Sturdik, E., 1997. Reatores para Fermentação de Cerveja Primária Contínua usando Leveduras Imobilizadas, *Biotechnology Techniques*, 11, 261.

Sodini, I., Boquien, C.Y., Corrieu, G. & Lacroix, C., 1997. Uso de um Bioreator de Célula Imobilizada para a Inoculação Contínua de Leite em Manufaturamento de queijo Fresco. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18, 56.

Speers, R.A. & Ritcey, L.L., 1995. Em direção a um Ensaio de Floculação Ideal. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 174.

Stewart, G.G., 1996. Tecnologia de Fabrico de Bebida Fermentada para o Futuro. *The Brewer*, 82, 348.

Stewart, G.G. & Russell, I., 2000. *Brewer's Yeast*. The Institute of Brewing, England.

Stewart, G.G. & Russell, I., 1981. Yeast Flocculation, in *Brewing Science*, Ed. J.R.A. Pollock, Academic Press, New York.

Stratford, M., 1996. Floculação de Levedura:
5 Re-estruturando as Teorias em Linha com Pesquisa Recente,
Cerevisiae Belgium Journal of Biotechnology, 38.

Sumino, T., Nakamura, H. & Mori, N., 1993.
Desenvolvimento de um Sistema de Tratamento de Água de
Despejo de Alta Eficiência Usando Microorganismos
10 Imobilizados. in *Industrial Application of Immobilized
Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New
York: Marcel Dekker, 377.

Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe,
D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D. & Stassi, P. 1999. Sistemas de
15 Bioreator de Levedura Imobilizada para Fermentação Contínua.
Biotechnology Progress, 15, 105.

Technical Committee and Editorial Committee
of the American Society of Brewing Chemists. 1992. *Methods of
Analysis*. 8th Edition, Minnesota, ASBC.

20 Teixeira, J.M., Teixeira, J.A., Mota, M.,
Manuela, M., Guerra, B., Machado Cruz, J.M. & Sa Almeida,
A.M., 1991. A influência da Composição da Parede de Célula de
uma Levedura Lager Flocosa de Bebida Fermentada na
Sedimentação Durante Fermentações Industriais Sucessivas.
25 *Proceedings of the European Brewery Congress*, 241.

Umemoto, S., Mitani, Y. & Shinotsuka, K., 1998. Fermentação Primária com Levedura Imobilizada em um Reator de Leito Fluidizado. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 35, 58.

5 Van de Winkel, L., 1995. Desenho e Otimização de um Bioreator de Levedura de Multiproposta para Fermentações de Bebida fermentada. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 20, 77.

Van de Winkel, L. & De Vuyst, L., 1997.
10 Sistemas de Célula de Levedura Imobilizada no Fabrico de Bebida Fermentada de Hoje e Amanhã. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 27.

Van de Winkel, L., McMurrough, I., Evers, G.,
Van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Avaliação de
15 Escala Piloto de Sistemas de Levedura Imobilizada de Carbetto de Silício para Produção de Cerveja Livre de Álcool Contínua. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 90.

Van de Winkel, L., P.C. van Beveren & C.A.
20 Masschelein, 1991a. A aplicação de um Reator de Laço de Levedura Imobilizada para a Produção Contínua de Cerveja Livre de Álcool. *Proceedings of the 23rd European Brewing Convention Congress, Lisbon*, 577.

Van de Winkel, L., P.C. van Beveren, E.
25 Borremans, E. Goosens & C.A. Masschelein, 1991b. Desenho de Reator de Levedura Imobilizada de Alta Performance para

Fermentação de Cerveja Contínua. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress, Oslo*, 307.

Van Dieren, B., 1995. Metabolismo de Levedura e a Produção de Cerveja Livre de Álcool. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 66.

Van Iersel, M.F.M., Meersman, E., Swinkels, W., Abee, T. & Rombouts, F.M., 1995. Produção Contínua de Cerveja Sem Álcool por Levedura Imobilizada à Baixa Temperatura. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 495.

Van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J., 1993. Bioreatores de Biofilme para Tratamento de Água de Despejo. *Trends in Biotechnology*, 11, 117.

Vicente, A.A., Dluhy, M. & Teixeira, J.A., 1999. Aumento de Produtividade de Etanol em um Reator de Elevação de Gás com um Tubo Modificado. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77, 497.

Virkajarvi, I. & Linko, M., 1999. Immobilization: Uma Revolução no Fabrico de Bebida Fermentada Tradicional. *Naturwissenschaften*, 86, 112.

Virkajarvi, I. & Kronlof, J., 1998. Estabilidade de Longo Prazo de Colunas de Levedura Imobilizada em Fermentação Principal. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56, 70.

Virkajarvi, I. & Pohjala, N., 1999. Profiting from Immobilized Fermentation. *Proceedings of the 5th Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*, 290.

5 Wackerbauer, K., Fitzner, M. & Gunther, J., 1996a. Technisch-technologische Möglichkeiten mit Immobilisierter Hefe. *Brauwelt*, 136, 2140.

Wackerbauer, K., Fitzner, M. & Lopsien, M., 1996b. Untersuchungen mit dem Neuen MPI-Bioreaktor-System. *Brauwelt*, 136, 2250.

10 Webb, C., G.M. Black & B. Atkinson, 1986. *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System*. England: The Institution of Chemical Engineers.

Westrin, B.A. & A. Axelsson, 1991. Difusão em Células Imobilizadas Contendo Géis: Uma Revisão Crítica. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 439.

15 Wu, W.T., Wu, J.Y. & Jong, J.Z., 1992. TRansferência de Massa em um Reator de Elevação de Gás com um Tubo de Rede. *Biotechnology Progress*, 8, 465.

20 Yamane, T., 1981. Expressões Aproximadas de Fatores de Eficiência para Biocatalisadores Imobilizados. *Journal of Fermentation Technology*, 59, 375.

Yamauchi, Y. & Kashihara, T., 1995a. Kirin Sistema Imobilizado. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 99.

25

Yamauchi, Y., Kashihara, T., Murayama, H., Nagara, A., Okamoto, T. & Mawatari, M., 1994. Scaleup of Immobilized Yeast Bioreactor for Continuous Fermentation of Beer. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 31, 90.

Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Amikura, T., Hiratsu, H., Nagara, A., Kamiya, T. & Inoue, T., 1995b. Maturação Rápida de Cerveja Usando um Bioreator de Levedura Imobilizada. 1. Conversão de Calor de α -Acetolactato. *Journal of Biotechnology*, 38, 101.

Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Nagara, A. & Noguchi, K., 1995c. Maturação Rápida de Cerveja Usando um Bioreator de Levedura Imobilizada. 2. Balanço de Redução Total de Diacetil e Regeneração. *Journal of Biotechnology*, 38, 109.

Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A. & Kashihara, T., 1995d. Fermentação Rápida de Cerveja Usando um Sistema de Bioreator de Multi-estágio de Levedura Imobilizada: Controle de Formação de Sulfito. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 277.

Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashihara, T., Yoshida, M. & Nakanishi, K., 1995e. Fermentação Rápida de Cerveja Usando um Sistema de Bioreator de Multi-estágio de Levedura Imobilizada: Controle de Balanço de Extrato e Formação de Amino Ácido. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 245.

Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashihara, T., Yoshida, M., Yasui, T. & Nakanishi, K., 1995f. Fermentação Rápida de Cerveja Usando um Sistema de Bioreator de Multi-estágio de Levedura Imobilizada: Controle de
5 Produtos Menores de Metabolismo de Carbohidrato. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 261.

Yuan, X., 1987. Aplicação de Técnica de Imobilização na Indústria de Fabrico de Bebida Fermentada. *Shijie in Kexue*, 94, 8.

10 Zhang, Z., Su, E. & Yu, J., 1988. . Estudos na Fermentação Contínua e Rápida de Cerveja por Levedura Imobilizada. *Gongye Weishengwu*, 18, 11.

Resumo da Invenção

A presente invenção se refere a um processo
15 para a produção de álcoois potáveis, que compreende um estágio de fermentação contínua que é empregado para prover e/ou pelo menos fermentar inicialmente um mosto contendo açúcares fermentáveis.

Em particular, é provido um processo preferido
20 em que a fermentação contínua é efetuada usando-se um bioreator do tipo de elevação de gás, empregando uma linhagem de levedura flocosa (e especialmente uma levedura altamente flocosa ou super-floculante), e empregando controle de oxigênio estrito.

Em uma forma particularmente preferida da
25 presente invenção, a descarga “pelo menos parcialmente fermentada” a partir do processo contínuo, é distribuída para um

estágio de processamento de dosagem para acabamento, (que no contexto das reivindicações da presente invenção pode incluir – mas não está limitado a – completção do processo de fermentação através do qual o fermentável se carbohidrata para
5 álcool).

A presente invenção se refere a produção de cervejas, (incluindo, em particular, estilos claros de cerveja, lagers, e, especialmente, cervejas estilo norte americana). Neste conjunto ver, por exemplo, os Essenciais de Estilo de Cerveja – F.
10 Eckhardt.

O processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o estágio contínuo é efetuado em um bioreator de elevação de gás.

De acordo com um estágio contínuo útil nas
15 várias práticas sob a presente invenção, é preferido que células imobilizadas sejam utilizadas, (conforme oposto às células puramente livres), e isto pode ser efetuado usando-se um selecionado um de veículo imobilizado ou leveduras de floculação. Não obstante o precedente, é preferido que leveduras
20 floculantes sejam usadas ao invés de células imobilizadas veículos, e leveduras de super-floculação são especialmente preferidas para esta proposta.

Mais detalhes concernentes às práticas preferidas e vantagens associadas com o processo contínuo são
25 providas através do curso da descrição detalhada da presente invenção. Estas incluem o uso de misturas de gás artificial (por

exemplo., controladas), e o uso de nitrogênio, dióxido de carbono e oxigênio, bem como ar.

Em adição, detalhes maiores concernentes ao estágio de processamento de retenção de dosagem são providos aqui. Nota-se que em certas concretizações da presente invenção, o foco do processo de retenção de dosagem vai além das publicações de “completação” da conversão de fermentáveis que se carboidrata em álcool (que em qualquer caso pode ser virtualmente completado no estágio contínuo do processamento).

10 Em tais concretizações, o foco principal do estágio de processamento de retenção de dosagem é uma equiparação de aroma (ou remediação), particularmente em conjunto com diacetil e acetaldeído.

Concretizações preferidas da presente invenção proporcionam a distribuição de estágio pós-contínuo do mosto provido e/ou pelo menos parcialmente fermentado através de uma tubulação de distribuição (sempre como uma tubulação fixa ou por conexão ou desconexão seletiva do conduto) entre uma pluralidade de tanques de retenção de dosagem. Em um processo de distribuição em série, um tanque é preenchido, seguido pelo próximo, e, assim por diante. Em uma concretização particularmente preferida, a capacidade total do reator contínuo e a capacidade de retenção de dosagem são equiparadas em termos de tamanho e número de reatores/vasos de retenção de dosagem –

20 tal que a taxa de fluxo da produção seja equiparada em termos de capacidade sobre o tempo. Idealmente, um vaso de retenção de

dosagem é drenado de produto acabado imediatamente no tempo de ser limpo, re-conectado e, em seguida, re-enchido a partir da descarga entrante a partir do estágio de fermentação contínua.

De acordo com outro aspecto da presente
5 invenção, certas concretizações são particularmente verificadas em relação ao teor de oxigênio do mosto/cerveja. Isto se aplica ambos aos estágios de retenção contínua e de dosagem do processo. Com relação ao estágio contínuo, a concentração de oxigênio tem uma variedade de efeitos, mas notavelmente, pode
10 ser desejado minimizá-lo de modo a otimizar a conversão de álcoois mais altos em ésteres de aroma ativo. Neste conjunto, é notado que a concentração de álcoois mais altos pode permanecer grandemente não-afetada pelo estágio de processamento de retenção de dosagem de modo que se desejado controle de O₂
15 estrito é usado para verificar balanço de aroma de éster fusel. A pré-purga de mosto com CO₂ antes da fermentação contínua pode ser útil neste conjunto.

Em uma concretização da presente invenção, a proposta primária do estágio contínuo do processamento é
20 proporcionar provisão da fermentação de dosagem à jusante que então ocorre no processo de retenção de dosagem.

Para maior certeza, os teores dos documentos de prioridade são aqui incorporados em seu todo e forma como muito de uma parte do presente relatório, como se eles fossem
25 totalmente reproduzidos aqui.

Descrição Detalhada

A seguinte é uma descrição detalhada em duas partes dos aspectos da presente invenção.

A descrição contém e/ou se refere a gráficos, fórmula, figuras e similares, cada um do qual sendo referido pelo termo “Figura”, seguido por um número de identificação específico, e de desenhos acompanhantes, cada um dos quais sendo descritos e/ou referidos pelo termo “FIGURA”, seguido por um número de identificação específico. Nestes desenhos, os itens ilus. rados podem ou não estar na escala exata.

10 Nos desenhos acompanhantes:

A FIGURA 1 é um fluxograma de processo para o Sistema de Fermentação Contínua em Escala Piloto, as peças individuais do equipamento mostrado sendo resumidas na Tabela 5.1 aqui.

15 A FIGURA 2 é um diagrama esquemático do bioreator de tubo tiragem de ar de de elevação de gás em escala piloto de 50L (GLDT).

A FIGURA 3 é uma vista em corte transversal do reator da FIGURA 2 incluindo a localização do tubo interno, bem como o separador interno.

A FIGURA 4 é um desenho detalhado da placa superior do bioreator da FIGURA 2.

A FIGURA 5 é um desenho detalhado do corpo do bioreator da FIGURA 2.

25 A FIGURA 6 é um desenho detalhado do fundo cônico do bioreator da FIGURA 2.

A FIGURA 7 é um desenho detalhado do pulverizador de tubo de gás do bioreator da FIGURA 2. Um total de 160 furos (0,16 cm de diâmetro) foram perfurados no pulverizador de tubo de 1,27 cm de diâmetro com um
5 espaçamento longitudinal de 0,8 cm de centro a centro, e um espaçamento latitudinal de 0,6 cm.

A FIGURA 8 é um diagrama da produção de gota contínua usando misturadores Pedido de Patente Labatt N° 2.133.789).

10 A FIGURA 9 é uma foto de gotas de vidro Siran® supridas por Schott Engineering.

A FIGURA 10 é uma foto de gotas de tearra diatomácea Celite® supridas por World Minerals.

15 A FIGURA 11 é uma foto de gotas de gel^k-carrageenan produzidas nos laboratórios de Labatt Brewing Company Limited (“Labatt”).

A FIGURA 12 é uma série de fotos representando leveduras não-flocosas; levedura de formação de cadeia e levedura flocosa
20 respectivamente. Estas imagens foram tomadas usando-se uma câmara de focalização microscópica em uma ampliação de 100 vezes.

25 A FIGURA 13 é uma foto microscópica da linhagem de levedura flocosa média LCC3021 em uma apmlição de 100 vezes.

A FIGURA 14 é uma foto microscópica da linhagem de levedura super-flocosa LCC290 em uma ampliação de 100 vezes.

5 A FIGURA 15 é um diagrama esquemático do processo de mistura estática para a produção de gotas de gel kappa-carrageenan. No misturador estático, o fluido se move através do misturador (preferivelmente do que o misturador através do fluido), permitindo a mistura dos fluidos a medida que eles são bombeados através da linha de tubo.

10 A FIGURA 16 é outro esquema de um sistema de bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás para fermentação primária da cerveja.

15 A FIGURA 17 é uma fotografia do vaso de bioreator de tubo de elevação de gás da FIGURA 15.

A FIGURA 18 é um desenho detalhado de um vaso de reator de tubo de elevação de gás de 13L (isto é., volume de operação de 8L) da FIGURA 16.

20 A FIGURA 19 é um desenho detalhado de uma placa superior do vaso do bioreator onde: 1- orifício de retirada de líquido para sensor de oxigênio; 2-fonte térmica para sensor de temperatura, ligada ao controlador termostático; 3-sonda de temperatura; 4-orifício de retorno de líquido para sensor de oxigênio, 5-orifício de inoculação; 6-amostra de membrana com
25 capa de aço inoxidável.

A FIGURA 20 é um perfil de orifício de retirada de líquido para sensor de oxigênio com unidade de carga submersa na fase líquida do bioreator.

A FIGURA 21 é um equipamento detalhado e diagrama frontal para fermentação de cerveja primária contínua usando um sistema de bioreator de elevação de gás (ver Tabela 5.1 para descrição detalhada do equipamento).

A FIGURA 22 é um esquema do mecanismo de gelificação de carrageenan (adaptada de Rees, 1972).

A FIGURA 23 é um esquema da utilização de constituintes de mosto por levedura imobilizada durante fermentação primária.

A FIGURA 24 é uma foto da gota de gel de kappa-carrageenan contendo levedura de lager imobilizada em fermentação de tempo zero.

A FIGURA 25 é uma foto de um conjunto de levedura de lager preso na gota de gel de kappa-carrageenan após dois dias de fermentação de dosagem mostrando sinais de origem em células de levedura individuais.

A FIGURA 26 é uma foto de uma borda externa de uma gota de gel de kappa-carrageenan mostrando células de levedura de lager após dois meses de fermentação contínua.

A FIGURA 27 é uma foto de células de levedura de lager em uma região externa de uma gota de gel de kappa-carrageenan após dois meses de fermentação contínua.

A FIGURA 28 é uma foto de células de levedura de lager no centro de uma gota de gel de kappa-carrageenan após dois meses de fermentação contínua.

A FIGURA 29 é uma foto de uma gota de gel de kappa-carrageenan total após seis meses de fermentação contínua; muitas gotas fraturadas têm centros vazados.

Descrição Detalhada – Parte 1:

LINHAGEM DE LEVEDURA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL USADO NA INOCULAÇÃO

10 A fermentação conduzida nesta tese emprega uma levedura poliplóide da família *Saccharomyces cerevisiae* (também referida como *Saccharomyces uvarum* e/ou *Saccharomyces carlsbergensis*). A comunidade de fabrico de bebida fermentada se referirá comumente a estas leveduras como
15 fermentação de fundo que produz uma cerveja tipo lager. Esta caracterização é atribuída a capacidade da levedura de lager assentar fora do meio líquido após completação da fermentação. As leveduras de ale, diferente das leveduras de lager, se elevarão para o topo do vaso de fermentação e eram, portanto, conhecidas
20 como uma linhagem de fermentação de topo. A capacidade das leveduras se assentarem ou se elevarem não é necessariamente dependente se a levedura é de um tipo lager ou de um tipo ale, mas é específico da linhagem. A levedura de lager tipicamente não fermenta à temperaturas acima de 34°C, enquanto que a
25 levedura de ale não fermenta melibiose. Os cientistas usarão estas

características para diferenciar linhagens lager das leveduras de ale (McCabe, 1999).

A linhagem de levedura flocosa de meio *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem 3021 de Labatt Culture
5 Collection, foi usada em ambas fermentações auto-agregadas de célula livre e fermentações imobilizadas de κ -carrageenan. Para os ensaios envolvendo o uso de levedura super-flocosa como o imobilizante, uma variante da linhagem LCC3021, denominada LCC290, foi usada.

10 Culturas de levedura puras foram criogenicamente armazenadas em um freezer de -80°C localizado dentro do Departamento de Desenvolvimento de Tecnologia Labatt. Quando requerido, laços estéreis de cultura de levedura foram aerobicamente pré-desenvolvidos a 21°C em placas PYG
15 Agar (3,5 g de peptona, 3,0 g de extrato de levedura, 2,0 de KH_2PO_4 , 1,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20,0 de glucose, e, 20,0 de Agar dissolvido em água destilada até um volume de um litro).

Colônias de levedura isolada foram, em seguida,
20 transferidas em tubos testes contendo 10 mL de mosto pasteurizado e encubado com agitação a 21°C por um período de 24 horas. Este inóculum foi progressivamente provido até um volume de 5 L pela adição da cultura prévia no volume de mosto apropriado (10 mL em 190 mL, 200 mL em 800 mL e 1 L em
25 4L). O inóculum de levedura foi, em seguida, transferido em jarros de centrifugação e submetido a centrifugação a 10000 rpm

e 4°C por 10 minutos. A massa desejada de levedura para todas as fermentações subseqüentes foi retirada a partir das peletes de levedura molhadas resultantes (30% w/v).

MEIO DE FERMENTAÇÃO

5 Mosto lager de grau industrial produzido pela cervejaria Labatt London foi usado como o meio nutriente para todas as fermentações. Referência é feita através de toda esta tese à gravidade específica do mosto espessa como graus Plato (°P). A Fórmula 4.1 descreve o relacionamento entre gravidade
10 específica e °P.

$$^{\circ}P = 135.997 \cdot SG^3 - 630.272 \cdot SG^2 + 1111.14 \cdot SG - 616.868$$

(4.1)

O mosto usado através de toda esta tese foi 17.5 °P, que corresponde a uma gravidade específica de 1.072.

15 A Tabela 4.1 proporciona o perfil típico de carboidrato deste mosto conforme medido pelo método de cromatografia de líquido de alta performance (HPLC) descrito na seção 4.7.2. Aproximadamente 73% dos carboidratos neste mosto são fermentáveis, enquanto a levedura de fabrico de bebida
20 fermentada neste estudo não pode prontamente levar 27% dos carboidratos de cadeia mais longa.

Tabela 4.1 Composição típica do carboidrato do mosto utilizado nos ensaios de fermentação. O mosto foi produzido pela cervejaria Labatt London, e tem uma gravidade
25 específica medida como 17.5 °P.

	Média (g/L)	Coefficiente de variação (%)	Fermentável (%)	Não- fermentável (%)
Frutose	3,3	18,0	1,9	
Glucose	16,5	4,3	9,3	
Maltose	87,7	10,1	47,8	
Maltotriose	25,2	10,8	14,2	
Maltotetrose	6,4	18,3		3,6
Polisacarídeos	41,1	9,1		23,2
Total	177,2		73,2	26,8

O coeficiente de variação para o mosto das substâncias analisadas varia entre 10% e 20%. Esta variabilidade é devido, em grande parte, ao processo de produção industrial utilizado, bem como à variabilidade nas matérias primas de uma bebida fermentada para outra.

TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO

Três tipos de imobilização – captação, adsorção e auto-agregação – foram testados durante esta pesquisa de Ph.D. Para veículos de fonte industrial, dados supridores são apresentados primeiro e, em seguida, suplementados por análise dentro de laboratório. Distribuições de fotos e tamanhos dos veículos investigados (quando disponíveis) são apresentadas aqui.

Dois tipos de matrizes de adsorção foram testadas no bioreactor de tubo de elevação de gás de escala piloto. Fotos de ambos estes veículos são apresentadas aqui. A Schott

Engineering proporcionou um veículo de gota de vidro sinterizado, Siran[®]. As partículas selecionadas eram de 1-2 mm de diâmetro, e tinham poros abertos para imobilização de levedura com 55-60 % de volume de poro e distribuição de tamanho de poro entre 60 e 300 micrômetro, um tamanho apropriado para células de levedura. Este tipo de veículo é reportado para ser biológica e quimicamente estável, fácil de limpar, re-utilizável, esterelizável com vapor, não-compacto e neutro no gosto, e é, portanto, aprovado para alimentação.

World Minerals da California supre um veículo esférico composto de terra diatomácea. Este veículo proporciona as vantagens de estabilidade térmica e química, resistência mecânica e rigidez. Diatomita, a matéria prima básica, é comumente usada na indústria de fabrico de bebida fermentada para filtração de cerveja. O veículo Celite[®] R-632 foi especificamente designado para imobilização total da célula.

As especificações do supridor eram conforme se segue:

Faixa de tamanho: 0.595 mm to
1.41 mm (14/30 malha cortada)

Diâmetro de poro médio: 7.0 micrômetros

Volume total do poro: 1.19 cm³/g

Densidade de gota compactada: 0.334 kg/m³

Gotas de gel Kappa-carrageenan, um veículo baseado em captação, foram produzidas nos laboratórios da Labatt Brewing Company Ltd. O processo de produção é descrito

na Seção 5.2, e os resultados deste processo de produção são apresentados na Seção 6.2.1.

O modo mais simples de imobilização, auto-agregação, foi possível pela seleção de linhagens de levedura capazes de floculação. A levedura lager industrial LCC3021 possui a capacidade natural de floculação, e é considerada como uma linhagem flocosa média. A medida que a fermentação progride, pequenos cepos de levedura, medindo de 0.5 mm a 1.0 mm, se formam no meio líquido. A levedura LCC290, uma variante da levedura lager LCC3021, formará mais flocos lager (de 1.0 mm a 5.0 mm, dependendo do grau de agitação), e é, portanto, classificada como uma levedura super-flocosa. Imagens dos vários tipos de flocos são apresentadas aqui.

PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM

A medida que a fermentação progride, foi necessário retirar-se amostras do líquido de fermentação em numerosos intervalos de tempo. Para realizar esta tarefa, válvulas de amostragem estéreis foram adquiridas de Scandi-brew[®]. Estas válvulas são construídas de aço inoxidável, e são equipadas com uma câmara (delimitada por um orifício de topo e de fundo) na qual etanol pode ser armazenado para manter um ambiente asséptico. Antes de tomar-se uma amostra, o etanol é liberado a partir da câmara pela remoção da capa de retenção a partir do cano de fundo. Etanol fresco (75% por volume) é deslocado através da câmara, e a tampa é, em seguida, colocada no orifício de topo da válvula. A alavanca da válvula é então impulsionada, e

aproximadamente 50 mL de amostra de líquido é coletada em um recipiente esterilizado. Uma segunda amostra é coletada para as fermentações envolvendo levedura super-flocosa, de modo que desfloculação correta pode ser realizada antes da enumeração da
5 célula. Uma vez que a amostragem é completa, a câmara da válvula é inundada com água quente, e ácido peracético e, em seguida, finalmente, com etanol. A tampa de retenção é colocada no cano de fundo, e a câmara é enchida com etanol na preparação para a próxima amostragem.

10 *MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO*

Enumeração de Célula de Levedura Livre e Viabilidade pelo Método de Azul de Metileno

Amostras de líquido contendo células de levedura livremente suspensas são primeiro coletadas do meio de
15 fermentação pelo procedimento de amostragem acima. Um Hemacitômetro de Hauser Scientific Company com um volume de 10^{-4} mL é usado em conjunto com um microscópio leve para realizar as contagens de células. As amostras de líquido devem ser diluídas com água destilada de modo a alcançar uma contagem de
20 levedura total de 150 a 200 células no campo de contagem. Heggart e outros (1999) descrevem todos os fatores que afetam as características de viabilidade e vitalidade da levedura.

De modo a avaliar o grau de viabilidade dentro da amostra, a técnica de desvanecimento de azul de metileno
25 descrita por American Society of Brewing Chemists foi usada (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC,

1992). Células vivas podem tornar o azul de metileno incolor pela oxidação do mesmo. Células mortas, por outro lado, se tornarão azuis. Os reagentes que se seguem foram usados na preparação de aziul de metileno para assesso de viabilidade:

5 Solução A: 0.1 g of azul de metileno em 500 mL de água destilada

Solução B: 13.6 g de KH_2PO_4 em 500 mL de água destilada

10 Solução C: 2.4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada

O azul de metileno tamponado Fink-Kuhles foi, em seguida, preparado pela mistura de 500 mL de solução A com 498.75 mL de solução B e 1.25 mL de solução C para produzir uma mistura final em um pH de 4.6.

15 Uma mistura de suspensão de célula diluída e azul de metileno foi preparada em um tubo de teste e, em seguida, totalmente misturada. Após permitir-se que esta mistura assentasse por vários minutos (assegura contato entre células e o corante), uma gota de líquido foi colocada entre o vidro de
20 contagem do hemacitômetro e o cursor da tampa (volume definido). A percentagem de células viáveis foi determinada pela contagem de ambas a viabilidade e células mortas dentro do campo de contagem em, em seguida, dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células.

25 4.5.2 Contagens de Auto-Agregação de Célula de Levedura Imobilizada

Quando se usam células de levedura com uma tendência a formar flocos, torna-se difícil assessor precisamente o número de células presentes em uma amostra de líquido porque as células tenderão a assentar no jarro de amostra. De modo a obter-se uma amostra representativa, um agente de desfloculação foi usado. Nestes experimentos, uma solução de ácido sulfúrico de 0.5% por volume foi empregada para desestabilizar as células de levedura floculadas, permitindo, conseqüentemente, uma contagem de célula de levedura representativa. O mesmo procedimento de enumeração e viabilidade esboçado na seção 4.5.1 foi usado com o ácido sulfúrico substituindo a água destilada como o agente diluente.

Contagens de Célula de Levedura Imobilizada-Gotas de Gel

Antes das contagens de levedura serem realizadas nas células presas com gel, é necessário romper-se a matriz de gel usando um aparelho Polytron[®] (Brinkmann Instruments). Uma amostra de gotas foi primeiro passada através de uma peneira estéril (500 micrômetros de tamanho de malha) e, em seguida, inundada com água estéril. Um mililitro de gotas de célula presa com gel e 19 mL de água destilada foram adicionados em um recipiente de amostra de 50 mL. O Polytron[®] foi, em seguida, usado para romper fisicamente o gel e, desse modo, liberar a levedura em solução. Os métodos de enumeração e viabilidade descritos na seção 5.5.1. foram, em seguida, realizados na amostra rompida de gel.

Monitoramento de Contaminação

Todas as fermentações realizadas através de toda esta tese foram regularmente monitoradas para contaminação. O programa de monitoramento consistia de pelo menos uma verificação por semana do líquido nos fermentadores contínuos de 50-L, e do mosto nos vasos de armazenamento. As amostras de líquido foram retiradas assepticamente e, em seguida, espalhadas em placas de cultura compostas de Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories) e 10 mg/L de cicloheximidina. Estas amostras testes foram, em seguida, incubadas a 28 °C por até 10 dias em ambas condições aeróbicas e anaeróbicas. Colocam-se as placas selecionadas em jarros contendo um acondicionamento AnaeroGen[®] (Oxoid), que remove qualquer oxigênio remanescente no jarro, criado no ambiente de crescimento anaeróbico desejado. O uso de uma tira indicadora (vira rosa se oxigênio está presente) nos permite verificar que o ambiente estava, de fato, anaeróbico. Contaminantes bacteriais, se presentes na amostra de líquido, então seriam detectados por este método.

A detecção de levedura selvagem ou sem fermentação requer um meio de crescimento separado que não favoreceria crescimento bacteriano e/ou de fermentação de bebida. Quatro placas preparadas com meio de levedura (YM, Difco Laboratories), suplementadas com 0.4 g/L CuSO₄, foram utilizadas para permitir seletivamente o crescimento de qualquer levedura selvagem potencial (incubação a 25

°C por 7 dias). Incuba-se a amostra de líquido colocada na placa em PYN agar (Peptone Yeast-Extract Nutrient, Difco Laboratories) por 7 dias a 37 °C, permitida para a detecção de levedura de fabrico de bebida fermentada não-lager. O crescimento de levedura Lager é inibido em temperaturas acima de 34 °C; desse modo, qualquer crescimento nestas placas indicaria uma contaminação de levedura ale.

MÉTODOS ANALÍTICOS

10 Calibrações apropriadas foram realizadas em todo o equipamento relevante conforme prescritas pelos procedimentos de operação industrial padrões.

Etanol

15 A concentração de etanol na cerveja e amostras de fermentação foi analisada usando-se o método de cromatografia de gás descrito pelo Comitê Técnico e o Comitê Editorial da Sociedade Americana de Químicas de Fabrico de Bebida Fermentada (1992). Uma amostra desgaseificada de líquido foi combinada com 5% v/v de isopropanol interno padrão, 20 seguido pela injeção de 0.2 μ L desta mistura em um Cromatógrafo de Gás Perkin Elmer 8500. A lista seguinte proporciona detalhe adicional com relação a composição exata do GC:

Detector de ionização de chama (FID)

25

Auto-amostrador Dynatech

Chromosorb 102, um acondicionamento de suporte de malha 80-100

Gás transportador de hélio que flui a 20 mL/min
Temperatura de injetor de 175 °C, temperatura
5 de detector de 250 °C & temperatura de coluna de 185 °C
isotermicamente.

Carbohidratos

As concentrações de glucose, frutose, maltose, maltotriose, maltotetrose, polisacarídeos e glicerol foram medidas
10 usando-se um sistema de cromatografia de líquido de alta performance (Spectra-Physics SP8100XR HPLC). Uma coluna de troca de cátion (Bio-Rad Aminex HPX-87K) com fosfato de potássio dibásico como a fase móvel foi usada para separar estes carbohidratos a medida que eles eluíram através do sistema. A
15 quantidade dos compostos foi, em seguida, determinada usando-se um detector de índice de refração para gerar os picos de composto apropriados. A HPLC foi operada em uma pressão de retorno de 800 psi, uma temperatura de coluna de 85 °C, e uma temperatura de detector de 40 °C. As amostras foram
20 desgaseificadas e diluídas aos níveis apropriados. Uma injeção de 10 μ L foi, em seguida, introduzida no sistema à uma taxa de fluxo de 0.6 mL/min.

A indústria de fabrico de bebida fermentada comumente usa outra medida para avaliar o nível de
25 carbohidrato total do líquido. A gravidade específica do líquido expressa em graus Plato foi medida usando-se um Densitômetro

Anton Paar DMA-58. As amostras filtradas e desgaseificadas foram transferidas em um tubo U especial, que foi, em seguida, submetido a uma oscilação eletrônica. A frequência da oscilação através do líquido foi, em seguida, medida e, em seguida, correlacionada a uma gravidade específica de líquido (g/100 g ou °P). Deve ser notado que esta medição é uma aproximação da concentração de carboidrato total da amostra (ou gravidade específica), visto que as calibrações são realizadas em soluções de sucrose aquosas a 20 °C, cuja gravidade específica é a mesma conforme o mosto em questão.

Dicetonas Vicinais

Concentrações de diacetyl total (2,3-butanodiona) e 2,3-pentanodiona total foram determinadas usando-se um Cromatógrafo de Gás Perking Elmer 8310 equipado com um detector de captura de elétron. O metano 5% em gás transportador de argônio que flui a 1.0 mL/min foi usado como o gás transportador, e a amostra foi passada através de uma coluna J & W DB-Wax. A temperatura do injetor foi mantida a 105 °C, enquanto a temperatura do detector foi ajustada a 120 °C. Um auto-amostrador de espaço de cabeça Hewlett Packard 7694E facilitou esta análise. A quantificação foi calculada pela avaliação da área de pico do componente de amostra selecionado e, em seguida, cruzando-se por referência ao mesmo ao valor de calibração de padrão interno de 2,3-hexanodiona.

De modo a assessor a concentração “total” destes compostos, foi primeiro necessário equilibrar estas

amostras a 65 °C e, em seguida, manter então por 30 minutos nesta temperatura. Este manuseio da pré-análise da amostra permitiu a conversão de α -acetolactato e β -hydroxibutirato em suas respectivas dicetonas, diacetil e 2,3-butanodiona.

5 Ésteres e Álcoois Mais Altos

Alguns dos mais importantes dos compostos de aroma detectados na cerveja foram medidos usando-se um método de cromatografia de gás de espaço de cabeça. Acetaldeído, etil acetato, isobutanol, 1-propanol, isoamil acetato, isoamil álcool, etil hexanoato e etil octanoato foram quantificados usando-se n-butanol como o padrão interno. Um Cromatógrafo de Gás Hewlett Packard 5890 equipado com um detector de ionização de chama, um auto-amostrador de espaço de cabeça HP 7994, e uma coluna de capilaridade J&W DB-Wax, foram utilizados. A temperatura do injetor foi ajustada para 200 °C, e a temperatura do detector foi 220 °C. O perfil da temperatura do forno foi como se segue: 40 °C por 5 min, rampa de 40 °C para 200 °C em taxa de 10 °C/min, rampa de 200 °C a 220 °C em uma taxa de 50 °C/min, e finalmente uma retenção a 220 °C por 5 min. Um gás de composição de hélio a 30 mL/min (28 psig), uma corrente de hidrogênio a 50 mL/min (25 psig), e uma corrente de ar a 300 mL/min (35 psig) suplementaram um fluxo de gás transportador de hélio de 6.0 mL/min. O ciclo de GC total para um círculo de amostra de 1 mL foi 40 minutos.

25 Outras Análises

Várias outras medições analíticas foram realizadas em uma base necessária no líquido de fermentação que foi submetido a envelhecimento e acondicionamento. As análises do produto acabado foram realizadas pelo departamento de Controle de Qualidade da Labatt para os padrões de cerveja acabada. Os métodos descritos pelo Comitê Técnico e o Comitê Editorial da Sociedade Americana de Química de Fabrico de Bebida Fermentada (1992) foram a base para estas medições. Uma lista das análises, bem como uma breve descrição da relevância destas medições, é provida na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Análise de Controle de Qualidade e Descrição

Es- pecificação	Descrição
Ar	Ar total transportado durante o processo de acondicionamento; especificação é menor do que 1 mL
-xido de Carbono	Dió Nível de carbonação introduzido no produto; reportado como % com especificação de 2.75 %
-xido de Enxofre	Dió Quantidade de dióxido de enxôfre na cerveja medida por GC; alvo de <10 mg/L
metil Sulfeto	Di- Quantidade de dimetil sulfeto (cheiro de milho cozido) na cerveja

margor	A-	<p>medida por GC; alvo de <70 mg/L</p> <p>Quantidade de amargor contribuída pelos lúpulos para a cerveja; medição de alfa-ácidos na cerveja; 1 unidade de amargor (BU) é equivalente a ~1 mg/L de alfa-ácido.</p>
Cor	Cor	<p>Cor da cerveja medida por espectrofotometria; absorvância de amostra em 430 nm para trajetória de luz de 0.5 polegada</p>
pH	pH	<p>Medido usando-se medidor de pH calibrado; $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$</p>
trato Aparente	Ex-	<p>Quantidade de massa solúvel disponível no líquido sem compensar o efeito do álcool na densidade relativa do líquido; medida usando-se um hidrômetro e reportada como °P; AE</p>
trato Real	Ex-	<p>Mesmo conforme extrato aparente, exceto o álcool está sendo contado nesta medição; RE</p>
trato Original Calculado	Ex-	<p>Baseado no experimento de Balling que 2.0665 g de extrato produz 1.0000 g de álcool; $\text{COE} = 100 * [(2.0665 * (\% \text{ peso/peso de álcool}) + \text{RE}) / (100 + 1.0665 * (\% \text{ peso/peso de álcool}))]$</p>

Ne- voeiro Quente	Nevoeiro presente na cerveja à temperatura ambiente (21 °C) sem romper o sedimento; avaliado usando-se método nefelométrico baseado no difusor de luz e reportado como Unidade de Turbidez de Formazin (FTU); espec é < 200 FTU
Ne- voeiro Frio Inicial	Nevoeiro formado na cerveja quando ela é esfriada de temperatura ambiente (21°C) para 0°C sem romper o sedimento; método de medição conforme acima; espec é <100 FTU
Es- puma	Medição do potencial de espumamento da cerveja usando-se o instrumento NIBEM; a espuma é gerada em uma matéria controlada e a ataxa de espuma rompida é registrada; espec é >170 segundos

*PROTÓCOLO DE ASSENTAMENTO DE
LEVEDURA – LCC290*

Preparação de Amostra Teste de Levedura

5 Levedura super-flocosa (LCC290) foi desenvolvida no mosto conforme descrito na seção 4.1. Este inóculum foi, em seguida, centrifugado a 4 °C e 10000 rpm por 15 minutos de modo a obter-se um pelete de levedura para

inoculação adicional. O mosto, conforme descrito na seção 4.2, foi pasteurizado a 100 °C por 60 minutos e, em seguida, um litro foi assepticamente transferido em frascos de mistura de 6 X 2L. Cada frasco de mistura foi inoculado com 4 g de levedura centrifugada. Os frascos foram colocados em um batedor que opera a 135 rpm (temperatura ambiente de 21 °C), e permitidos fermentarem. Um frasco foi retirado nos seguintes intervalos de tempo: 24 h, 40 h, 48 h, 64 h, 71 h, e 192 h. Em cada intervalo de tempo, uma pequena amostra de líquido foi tomada para análise de carboidrato e para medições de concentração de levedura e viabilidade (métodos atuais descritos no Capítulo 4). A mistura de líquido/levedura remanescente foi submetida ao protocolo de assentamento de levedura descrito na seção 4.7.2.

Protocolo de Assentamento de Levedura

A taxa de assentamento para linhagens de levedura super-flocosa LCC290 foi medida usando-se o método seguinte. Cada amostra foi permitida fermentar até o intervalo desejado conforme descrito na seção 4.7.1. No tempo prescrito, o frasco de amostra apropriado foi retirado. As amostras foram agitadas de modo a assegurar que todas as partículas fossem suspensas. Os conteúdos do frasco foram, em seguida, imediatamente transferidos em um cilindro graduado de 1000 mL. A medida que os flocos assentam, a distância entre a superfície do líquido e a interface floco-líquido foi medida em intervalos de tempo de 30 segundos. A taxa de assentamento foi calculada pela aplicação da seguinte equação:

$$\text{Taxa de assentamento} = [(\Delta H) / (\Delta t)] / [(H_0 - H_t) / (t - t_0)]$$

T(5.1)

Usando-se o método de Kynch padrão (1952), uma taxa de assentamento versus curva de concentração de célula
 5 foi gerada a partir das curvas de assentamento para cada intervalo de fermentação.

MÉTODOS DE CIRCULAÇÃO & TAXA DE MISTURA

De modo a medir o tempo de mistura e taxa de
 10 circulação dentro do bioreator de tubo de elevação de gás de três fases, um sistema de injeção de ácido ligado a um sistema de aquisição de dados foi utilizado. Pela aplicação de um pulso de um ácido forte no bioreator, foi possível calcular ambos taxa de circulação e tempo de mistura pelo monitoramento da mudança
 15 no pH sobre o tempo, e, em seguida, relacionando-os às equações apresentadas na seção 3.2.2. O sistema de aquisição de dados consistia de:

uma sonda de pH Ingold (Cole-Parmer, cat. #P-05990-90) acoplada a um Transmissor de pH Baseado em
 20 Microprocessador Ingold (Model 2300)

um cartão de Translação de Dados DT2805

um computador personal 386DX

e um programa de aquisição de dados Quick Basic (escrito por C. Hudson e J. Beltrano em 1994 e modificado
 25 por N. Mensour em 1998).

Dez mililitros de ácido hidrolórico 10 N foram injetados na seção anular do bioreator de tubo de elevação de gás (diagrama é provido na Figura 5.5) imediatamente sob a localização da sonda de pH. Esta distância corresponde a uma altura de 26 cm abaixo da placa superior. A sonda de pH foi submetida a uma calibração de dois pontos com tampões padrões certificados (tampão verde Beckman pH 7.0 e tampão vermelho Beckman pH 4.0) antes de todos os experimentos da mistura. A corrente de 4-20 mA produzida pelo medidor de pH foi conectada a uma borda de terminal de parafuso, onde a corrente foi transformada em uma voltagem, que foi, em seguida, medida pelo cartão de aquisição de dados localizado dentro do computador. O programa de aquisição de dados foi iniciado simultaneamente à injeção de ácido. O comprimento de coleção de dados foi de 5 minutos em uma frequência de amostragem de 50 Hz. O tamanho da série no programa foi ajustado em 3750 (total de 15000 pontos coletados) com um ganho de 1 ajuste para o cartão de aquisição de dados.

O dado coletado foi transferido a partir do laboratório para um computador mais potente (microprocessador Pentium II) para análise adicional. A Curva da Tabela 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Canada), foi utilizada extensivamente para análise de dados devido a sua capacidade de proporcionar ajustes de dados grandes, bem como suas funções de manuseio de dados em muitas composições (afinamento de dados, ajuste de curvar, etc.). O algoritmo de Savitzky-Golay, um

método de afinamento de domínio de tempo baseado no ajuste polinomial quártico menos quadrados através de uma janela de movimento, foi aplicado aos dados originais para eliminar o ruído. Os dados afinados foram, em seguida, ajustados para refletirem uma mudança no pH preferivelmente do que a medição de pH atual. Uma função sinusoidal de queda foi ajustada para os dados ajustados. Os tempos de mistura e taxas de circulação foram, em seguida, calculados a partir dos parâmetros de ajuste.

Estes experimentos de mistura foram conduzidos nas fermentações atuais dentro do bioreator de elevação de gás de 50-L com um de três veículos de imobilização presentes (ou levedura super-flocosa LCC290, levedura flocosa média LCC3021, ou gotas de gel de κ -carrageenan). A fase líquida era cerveja fermentada com uma gravidade específica de 2.5 °P e a fase de gás foi compreendida de gás de pulverização de dióxido de carbono. A temperatura de fermentação foi controlada a 15 °C. As velocidades superficiais do gás de pulverização foram variadas entre 2.0 e 6.0 mm/s. Em uma dada taxa de fluxo, o sistema foi permitido equilibrar por 10 minutos. O teste de injeção de ácido em seguida começaria e seria repetido 3 vezes. A próxima taxa de fluxo de gás seria selecionada, e a mistura dentro do reator teria seu pH reajustado ao nível de partida.

DESENHO DE UM SISTEMA DE BIOREATOR DE TUBO DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE ESCALA PILOTO

SISTEMA DE FERMENTAÇÃO DE BIOREATOR DE TUBODE ELEVAÇÃO DE GÁS

Sistemas de leito fluidizado de tubo (DTFB) têm mostrado seu valor para uso em sistemas de três fases. Dois
5 bioreatores de tubo de elevação de gás de escala piloto foram desenhados, construídos e instalados na Cervejaria Experimental da Labatt Brewing Company Ltd. de modo a efetuar o trabalho experimental para esta tese. Em adição, vários vasos existentes foram modificados para ambos armazenamento de mosto e coleta
10 de cerveja. O fluxograma na FIG. 1 representa o processo total usado nos experimentos de fermentação contínua de escala piloto, e a Tabela 5.1 lista uma descrição mais detalhada do equipamento representado na FIG. 1.

O mosto foi suprido a partir da planta de
15 London Brewing através de linhas de aço inoxidável de 5.08 cm, e transferido em tanques de armazenamento de mosto de volume de operação de 1600 L (WT1 & WT2). Com um sistema de dois tanques, foi possível assegurar um suprimento contínuo de meio de nutriente para os fermentadores contínuos de escala piloto (R1
20 & R2). Cada tanque de retenção é equipado com um sistema de pulverização de dióxido de carbono para oxigênio e controle de homegeneidade, e um sistema de jaqueta de arrefecimento de glicol para controle de temperatura. Esta fonte central de meio de nutriente foi provida para alimentar até 3 fermentadores
25 independentes através de um sistema superior de válvula (V7, V8 & V9). Bombas peristálticas Masterflex (P1 & P2) foram

utilizadas para distribuir um fluxo prescrito de mosto para os bioreatores de escala piloto (R1 & R2).

Tabela 5.1. Descrição de equipamento individual representado na Figura 5.1

5

<i>Item</i>	<i>Descrição</i>
Ar	suprimento de ar de 100 psig da planta London
CO ₂	suprimento de dióxido de carbono de 100 psig da planta London
F1	filtro estéril na admissão de dióxido de carbono
F2	filtro estéril na admissão de dióxido de carbono
F3	filtro estéril na descarga de exaurimento de WT1
F4	filtro estéril na descarga de exaurimento de WT2
F5	filtro estéril na admissão de gás de aspergimento
F6	filtro estéril na admissão de gás de aspergimento
F7	filtro estéril na descarga de WBT1

GLR	retorno de linha de glicol; 25 psig
GLS	suprimento de linha de glicol; 45 psig
NV1	válvula de agulha de dióxido de carbono
NV2	válvula de agulha de dióxido de carbono
NV3	válvula de agulha em admissão de ar
NV4	válvula de agulha em admissão de dióxido de carbono
NV5	válvula de agulha em admissão de ar
NV6	válvula de agulha em admissão de dióxido de carbono
P1	bomba de alimentação peristáltica Masterflex para R1
P2	bomba de alimentação peristáltica Masterflex para R2
PR1	regulador de pressão de dióxido de carbono
PR2	regulador de pressão de dióxido de carbono
PR3	regulador de pressão de ar

PR4	regulador de pressão de dióxido de carbono
PR5	regulador de pressão de ar
PR6	regulador de pressão de dióxido de carbono
R1	bioreator de tubo de elevação de gás de escala piloto, volume de operação de 50 L
R2	bioreator de tubo de elevação de gás de escala piloto, volume de operação de 50 L
RM1	rotômetro de dióxido de carbono; escala de 0 a 20 scfh
RM2	rotômetro de dióxido de carbono; escala de 0 a 20 scfh
RM3	rotômetro de ar; escala de 0 a 2.5 scfh
RM4	rotômetro de dióxido de carbono; escala de 0 a 10 scfh
RM5	rotômetro de ar; escala de 0 a 2.5 scfh
RM6	rotômetro de dióxido de carbono; escala de 0 a 10 scfh
V1, V2, V3	válvulas borboletas na admissão/descarga de WT1

V4, V5, V6	válvulas borboletas na admissão/descarga de WT2
V7, V8, V9	válvula esfera no cabeçote de distribuição de mosto
V10, V11	válvulas esferas na admissão de mosto de R1
V12	válvula de desconexão rápida na admissão de gás de aspersamento
V13	válvula borboleta na descarga de R1
V14, V15	válvulas esferas na admissão de mosto de R2
V16	válvula de desconexão rápida na admissão de gás de aspersamento
V17	válvula borboleta na descarga de R2
V18	válvula borboleta na descarga de WBT1
WBT1	tanque de cerveja de despejo; volume de operação de 200 L
WT1	tanque de armazenamento de mosto equipado com jaquetas de parede de glicol e

	capacidades de aspergimento; volume de operação de 1600 L
WT2	tanque de armazenamento de mosto equipado com jaquetas de parede de glicol e capacidades de aspergimento; volume de operação de 1600 L

Gás dióxido de carbono e ar foram aspergidos no sistema de elevação de gás através de aspergidores de tubo de gás de aço inoxidável (FIG. 7). Rotômetros (RM3, RM4, RM5 & RM6) foram usados para monitorar as taxas de fluxo injetadas no sistema. Filtros estéreis (0.2 micrômetro de malha) foram instalados nas linhas de gás para assegurar que nenhum contaminante foi introduzido nos bioreatores. O produto escoado do reator através de um sistema de sobre-fluxo (FIG. 4). A bomba de alimentação apenas controla, portanto, o tempo de residência do líquido. Ambos os reatores (R1 & R2) foram conectados a um tanque de cerveja de despejo (WBT1) para coletar o líquido de sobre-fluxo. Tanques de coleta especiais de 50 L foram utilizados para coleta de produto e processamento em uma base conforme necessário.

Diagramas mais detalhados e dimensões exatas do bioreator de escala piloto de 50-L são providos na seção 5.1.1. O manuseio do mosto e protocolo de armazenamento serão apresentados na seção 5.1.2, enquanto os protocolos de limpeza e

esterilização para o sistema de fermentação contínua serão discutidos na seção 5.1.3. A seção 5.1.4 cobre o protocolo de fermentação seguido através de todo este trabalho de tese.

Desenho e Especificações do Reator

5 O bioreator de volume de operação de 50-L designado para esta operação foi construído totalmente de aço inoxidável 304L com 4 janelas de inspeção Plexiglas localizadas no corpo do reator, de modo que o movimento de partícula e fluido pode ser observado. O material de construção foi escolhido
10 por sua resistência para químicos de sanitização (cáusticos e ácido), bem como por sua durabilidade para esterilização de vapor. Outro aspecto importante do desenho foi a minimização de ajustes rosqueados em contato direto com o meio de fermentação. Ao invés, orifícios foram soldados e, onde necessário, ajustes
15 sanitários TriClover foram usados. O reator foi desenhado com uma região de cabeça expandida de modo a maximizar o desengatamento de gás e, desse modo, promover melhor transferência de massa de líquido-sólido (Chisti & Moo-Young, 1993). O fundo do reator foi desenhado com um ângulo de cone
20 de 90 graus de modo a minimizar quaisquer sólidos de coleta no fundo.

A FIG. 2 é um diagrama esquemático dos sistemas de escala piloto de 50-L que foram instalados na Labatt Experimental Brewery. Este diagrama indica a localização do gás de aspergimento de admissão, a admissão do líquido, a jaqueta de
25 arrefecimento de glicol, a descarga de produto, o sistema de

detecção e controle da temperatura, bem como a localização dos dois orifícios de amostragem de sanitário. A FIG. 3 é um esquema do mesmo reator de GLDT com dimensões providas em centímetros. As FIGS. 4 a 6 são desenhos em corte detalhados do bioreator de tubo de elevação de gás de 50 L, e a FIG. 7 é um esquema do dispositivo de aspergimento de gás utilizado nestes experimentos.

O tubo de tiragem de ar interno e o separador de partícula (chicana) são ilustrados na FIG. 3. Um diâmetro de tubo para razão de diâmetro de reator de $2/3$ foi escolhido baseado nos dados de literatura (Chisti, 1991). O separador de partícula foi dimensionado para permitir melhor separação de gás da mistura sólido-líquido. Aumentando-se o diâmetro deste dispositivo de chicana (20.32 cm comparado a um diâmetro de tubo de 10.16 cm), é possível obter-se um diferencial maior entre a velocidade de elevação de bolha e a velocidade de queda de fluido líquido-sólido. O arraste de gás no anular do sistema de tubo de arraste de ar será abaixado, e uma melhor transferência de massa de sólido-líquido resultará.

Um aspergidor de tubo (FIG. 7) foi desenhado para a injeção de gás de mistura de dióxido de carbono na seção de tubo de arraste de ar. Um total de 160 furos medindo 0.16 cm de diâmetro foi perfurado no aspergidor de 1,27 cm de diâmetro. Os furos foram posicionados com um espaçamento longitudinal de 0.8 cm centro a centro, e um espaçamento latitudinal de 0,6 centro a centro (8 séries de 20 furos). Devido a mistura ser a função

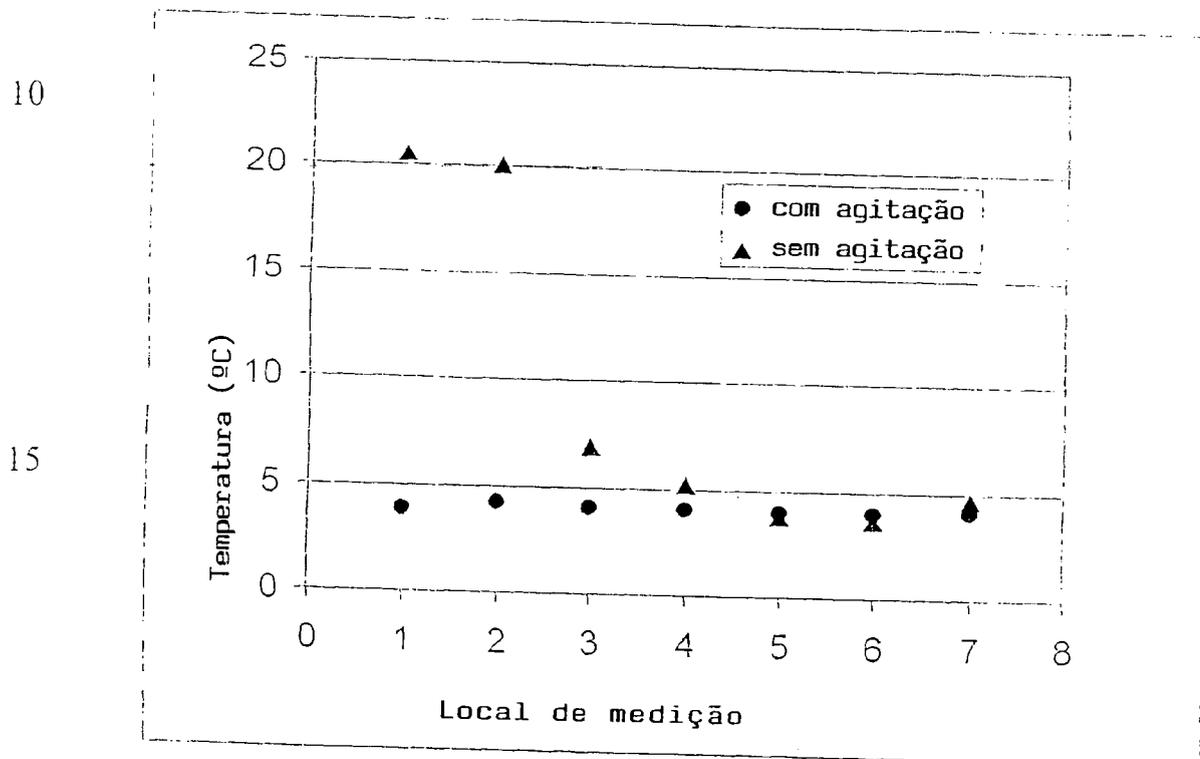
principal do gás aspergido, um diâmetro de furo de aspergimento de 0.16 cm foi selecionado.

Protocolo de Manuseio e Armazenamento de Mosto

5 Nas práticas de fermentação tradicionais, o mosto não é mantido por períodos estendidos de tempo sem ser breado com levedura. O mosto oxigenado é um excelente meio de crescimento para muitos organismos, incluindo levedura. Devido ao protocolo de fermentação para os sistemas de elevação de gás
10 contínuos requerer que grandes quantidades de mosto sejam retidas, é necessário desenvolver transferência de mosto e protocolos de retenção. Foi a opinião dos pesquisadores que mosto frio não-oxigenado pode ser armazenado por até duas semanas sem que ele seja comprometido por contaminação, se o
15 mosto foi transferido para o vaso de retenção apropriadamente.

Foi também considerado necessário assegurar que a temperatura do mosto fosse controlada apropriadamente uma vez dentro do vaso de retenção do mosto. A capacidade do tanque disponível dentro do Fabrico de Bebida Fermentada
20 Experimental foi originalmente designada para fermentação preferivelmente do que retenção do mosto. Um teste destas capacidades do tanque para manter a temperatura de líquido estagnante foi realizado. A FIG. 2 ilustra claramente que estes vasos não podem ser usados sem agitação se uma temperatura
25 constante de 4 °C é para ser mantida. O mosto foi inicialmente introduzido nestes vasos à uma temperatura de 4 °C. As medições

de temperatura foram realizadas em vários pontos através de todo tanque, de modo a ganhar uma melhor compreensão da temperatura real. Quando o líquido foi deixado no vaso por 24 horas sem agitação, a temperatura do líquido perto do topo chegou a aproximadamente 20 °C. O líquido na parte média do tanque também se elevou levemente (ΔT de ~ 3 °C), enquanto que no cone do tanque permaneceu perto da original 4 °C.



20

FIGURA 5.8 EFEITO DE AGITAÇÃO POR ASPERGIMENTO DE GÁS NO PERFIL DE TEMPERATURA NO TANQUE DE RETENÇÃO DE MOSTO CILINDROCÔNICO. O MOSTO FOI INTRODUZIDO NO VASO À UMA TEMPERATURA DE 4 °C. MEDIÇÕES FORAM REALIZADAS 24 HORAS

SEGUINDO ENCHIMENTO DO TANQUE. GÁS DIÓXIDO DE CARBONO FOI ASPERGIDO NO VASO À UMA TAXA DE FLUXO DE 0.113 CM³/HORA. A TEMPERATURA AMBIENTE ERA 19.8 °C. LOCALIZAÇÃO DA MEDIÇÃO:

- 5 (1) TOPO DO TANQUE NA PAREDE; (2) TOPO DO TANQUE NO CENTRO; (3) MEIO DO TANQUE NA PAREDE; (4) MEIO DO TANQUE NO CENTRO; (5) TOPO DO CONE NA PAREDE; (6) TOPO DO CONE NO CENTRO; (7) FUNDO DO CONE

10 Pela introdução de agitação leve através da injeção de dióxido de carbono à uma taxa de fluxo de 0,133 cm³/hora, foi possível manter a temperatura do mosto dentro do vaso de retenção à 4 °C. Como um resultado destas descobertas, ambos os vasos de retenção de mosto foram assentados na base do
15 cone com um revestimento sanitário a ser usado para agitação do mosto.

Mosto não-aerado foi subseqüentemente transferido da planta de Labatt London através da linha de aço inoxidável de 5.08 cm em um tanque de tampão. A partir deste
20 tanque, o mosto foi passado através de um pasteurizador em um dos tanques de retenção de mosto (WT1 ou WT2), onde ele foi armazenado a 2 °C por até 2 semanas. Esta etapa de pasteurização foi posta no lugar como uma medida de precaução para assegurar que microorganismos indesejados fossem eliminados a partir do
25 mosto durante o período de retenção total. Utilizando-se mosto não-oxigenado, o dano ao mosto quente pelo oxigênio (formação

de aldeídos) seria minimizado. Em adição, o ar introduzido com o gás de aspergir pode, portanto, efetuar estritamente o controle de oxigênio para os fermentadores contínuos.

Medições de oxigênio dissolvido foram realizadas no mosto uma vez dentro do vaso de retenção de mosto. A Figure 5.9 representa a concentração de oxigênio dissolvido do mosto com o tempo seguindo três protocolos de transferência. No primeiro exemplo, o mosto foi transferido no vaso de retenção, e o aspergir de dióxido de carbono foi iniciado (0.085 m³/h), para assegurar controle correto da temperatura. A concentração de oxigênio dissolvido no mosto aumentou no primeiro dia para alcançar aproximadamente 1.3 mg/L, e foi subseqüentemente reduzida para aproximadamente 0.1 mg/L pelo quinto dia. No segundo ensaio, o vaso de retenção de mosto foi purgado por 3 horas com 0.85 m³/h de dióxido de carbono antes do enchimento. A captação de oxigênio inicial foi grandemente aumentada, e mosto dentro do teor de oxigênio desejado (< 0.1 mg/L) foi alcançado em 2 dias.

5

10

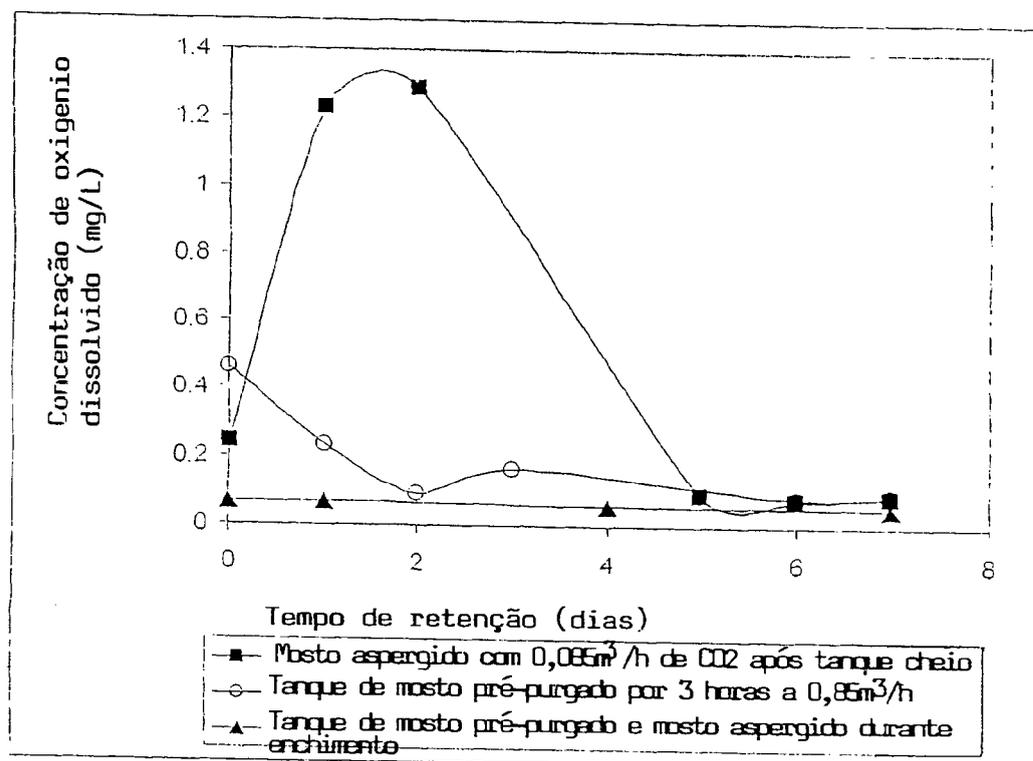


FIGURA 5.9 CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO NO MOSTO DURANTE TRANSFERÊNCIA DA PLANTA DE LONDON. TRÊS PROTOCOLOS DE ENCHIMENTO FORAM AVALIADOS COM O TERCEIRO SIMPLEMENTE SENDO UMA COMBINAÇÃO DOS DOIS MÉTODOS ANTERIORES. A TEMPERATURA DO MOSTO FOI MANTIDA A 4 °C

No ensaio final, o tanque foi pré-purgado conforme acima, e um aspergimento de dióxido de carbono contínuo (0.085 m³/h) foi introduzido através do processo de enchimento, bem como durante o período de retenção. O teor de oxigênio dissolvido foi mantido em um mínimo (<0.1 mg/L) através de toda a fase de retenção. Conseqüentemente, este

25

método foi adotado como o protocolo para todas as futuras coletas de mosto.

5.1.2 Protocolo de Limpeza & Esterilização

Os tanques de retenção de mosto foram submetidos a um ciclo de limpeza consistindo de um pré-enxaguamento com água quente (85 °C), um enxaguamento de limpeza cáustica (40 % cáustica a 60 °C), seguido por um enxaguamento pós-água (85 °C). A sanitização destes vasos foi efetuada pelo contato com uma solução de ácido peracético (2 % peso/volume). A tubulação de transferência de mosto também vai através do mesmo regime de limpeza e sanitização.

Os bioreatores de 50-L seguem um protocolo de limpeza e esterilização diferente. Os sistemas foram enxaguados com água quente (60 °C) e, em seguida, enchidos ao topo com uma água quente a 40 °C. Um agente de limpeza industrial, Diversol CX/A (DiverseyLever, Canada), foi, em seguida, adicionado a esta água para formar uma solução de 2 % peso/volume. Ar foi aspergido no fundo do reator a uma velocidade de gás superficial de 5 mm/s para assegurar dissolução correta e contato correto dentro do reator. Após um tempo de contato de uma hora, o reator foi esvaziado e inundado com água da cidade fresca. Este procedimento de limpeza foi repetido uma segunda vez, culminando em dois ciclos de enchimento-esvaziamento de água da cidade fria final.

O vaso de cerveja de despejo foi limpo usando-se uma solução a 2% peso/volume de Diversol CX/A. Diferente

dos bioreatores de elevação de gás, o aspergimento não foi utilizado uma vez que o WBT não foi ajustado com um aspergidor. Agitação mecânica foi efetuada pelo rolamento deste vaso em seu lado. O ciclo foi repetido duas vezes, e foi seguido
5 por dois ciclos de enchimento-esvaziamento de água.

Antes da esterilização de vapor, os bioreatores de 50-L foram conectados ao vaso de cerveja de despejo, e a linha de alimentação de mosto foi desconectada, conforme foi a linha de aspergimento de gás. As válvulas V10, V11, V12, V13, V14,
10 V15, V16, V17 e V18 foram abertas, e os filtros F5, F6 e F7 foram removidos. Estas linhas de gás e filtros foram autoclavadas separadamente por 15 minutos à 121 °C. O suprimento de vapor foi conectado às válvulas V12 e V16. A válvula de vapor foi vagarosamente aberta para minimizar dano ao equipamento, e
15 a temperatura dentro do reator foi monitorada proximamente. Uma esterilização de 1 hora foi efetuada uma vez que uma temperatura interna de 100 °C foi alcançada. As válvulas V10, V11, V14, V15 e V18 foram fechadas primeiro. O suprimento de vapor foi, em seguida, interrompido, e o filtro esterilizado F7 foi
20 conectado. Os filtros esterilizados F5 e F6 foram imediatamente conectados à linha de suprimento de gás, e uma velocidade de gás de dióxido de carbono superficial de 3 mm/s foi iniciada. Esta corrente de gás não somente assegura que os reatores não se romperiam durante arrefecimento, mas também deslocassem
25 qualquer ar presente nos bioreatores de elevação de gás de 50-L.

A linha de alimentação de mosto foi conectada ao bioreator após uma temperatura interna de 20 °C ser alcançada. Com as válvulas V2, V5, V10 e V14 ainda na posição fechada, e com as válvulas V6, V7, V8, V9, V11, e V15 abertas, o
5 suprimento de vapor foi conectado em qualquer V3 ou V6, dependendo do suprimento de mosto sendo utilizado. O ciclo de vaporização atrasa por 1 hora, após cujo tempo as válvulas V9, V11 e V15 foram interrompidas simultaneamente com o suprimento de vapor. Uma vez que as linhas tenham alcançado
10 temperatura ambiente (20 °C), as válvulas V3 e V6 foram fechadas, e o suprimento de vapor foi desconectado. Neste ponto, o sistema de fermentação contínuo total, incluindo o suprimento de mosto, os bioreatores de 50 L, e o tanque de cerveja de despejo, estava esterilizado e pronto para fermentação.

15 5.1.3 Protocolo de Fermentação

Os bioreatores de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto de 50-L foram usados para a fermentação primária contínua de mosto de cervejaria em cerveja. Uma jaqueta térmica de glycol proporciona controle de
20 temperatura com uma temperatura de líquido de 15 °C objetivada através de todos os ensaios de fermentação. Cada reator foi equipado com uma sonda de temperatura para proposta de medição, e um termopar de temperatura, e válvula solenóide de glicol, para o ajuste de alimentação de glicol para o reator. Os
25 fermentadores de elevação de gás foram também equipados com um gás de mistura primário (dióxido de carbono ou nitrogênio),

bem como com um suprimento de ar para dosagem de oxigênio. A mistura desejada de gás foi selecionada pelo ajuste da combinação apropriada rotômetro/válvula agulha, e, em seguida, passando esta mistura de gás através do filtro estéril (Millipore, Millex[®]-FG₅₀, 0.2 μ m Filter Unit), e no tubo de arraste de ar do bioreator. Uma velocidade de ar superficial de 0.39 mm/s (0.4 scfh) foi injetada no reator para todas as fermentações, enquanto que a taxa de fluxo do gás de mistura primário foi ajustada para adequar o tipo de imobilização específico.

10 O bioreator de elevação de gás de 50-L seguiu uma partida de dosagem tradicional antes de um modo contínuo de operação ser iniciado. Após limpeza e esterilização conforme descritos na seção 5.1.2, o bioreator de elevação de gás foi preenchido com 50 litros de mosto a partir dos tanques de
15 retenção de mosto (WT1 ou WT2), e, em seguida, injetado com 200 gramas de levedura (4 g/L) através do orifício de amostra estéril Scandi-Brew[®]. No caso das gotas de gel de k-carrageenan, 20 L de gotas foram injetadas no reator, produzindo uma concentração inicial de levedura flocosa média LCC3021 de 4
20 gramas por litro. Os bioreatores foram amostrados diariamente, e a evolução de diacetil e a gravidade específica de líquido foram proximamente monitoradas. Uma vez que a gravidade específica tenha alcançado seu valor mínimo, e a concentração de diacetil tenha caído abaixo de \square g/L, foi considerado que o sistema podia
25 ser ajustado em operação contínua.

O meio de fermentação (mosto) foi continuamente alimentado através do fundo do reator, enquanto que cerveja “verde” inundou através do funil o topo do reator. A medida que o volume de operação do reator foi fixado, a seleção da taxa de fluxo da alimentação de mosto fresco no reator controla o tempo de residência de líquido médio. As amostras de líquido foram retiradas do reator diariamente na descarga através da válvula de amostragem estéril (Scandi-Brew[®]) para ambas análises química e microbiológica (métodos descritos no Capítulo 4).

Em períodos de tempo selecionados, o produto de fermentação contínua foi coletado do bioreator de fermentação primária de 50-L em grandes quantidades (latas de aço inoxidável estéril de 40-L), e submetido a processamento de pós-fermentação de modo a produzir uma cerveja acabada vendável para avaliação e comparação para cerveja de controle produzida industrialmente. O bioreator de 50-L selecionável foi desconectado do vaso de cerveja de despejo, e imediatamente conectado ao vaso de coleta de cerveja. Uma vez que o líquido desejado tenha sido coletado, o bioreator foi re-conectado ao vaso de cerveja de despejo. A cerveja “verde” coletada foi submetida a um período de retenção de pós-fermentação de modo a reduzir o nível de diacetil no líquido abaixo de 30 μ g/L. A levedura transportada com o líquido foi permitida assentar, e o líquido (concentração de células de ~ 1-5 milhões células/mL) foi colocado em armazenamento frio para envelhecimento (7 dias a 2 °C). Após o período de

envelhecimento, o líquido foi filtrado, diluído em álcool 5 % por volume, e carbonatado antes de ser acondicionado em garrafas de 341-mL. Todo líquido acondicionado foi, em seguida, submetido a pasteurização através do equipamento de planta Labatt.

5 *5.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOTA DE GEL CONTÍNUA*

O objetivo desta seção de trabalho experimental foi avaliar um processo de produção de gota contínuo para a produção de gotas de gel inoculadas de levedura de modo a suprir células de levedura LCC3021 imobilizadas para os bioreatores de tubo de arraste de ar de elevação de gás contínuos de 50-L. descrito na seção 5.1.

O processo de produção (FIG. 8) primeiro objetiva a formação de uma emulsão entre a fase contínua não-aquosa (óleo vegetal) e a fase dispersa aquosa (solução de gel de κ -carrageenan misturada com células de levedura), com o uso de misturadores estáticos. Arrefecimento rápido para induzir gelação de polímero segue esta etapa. As gotas formadas foram, em seguida, introduzidas em uma solução de cloreto de potássio que ambos promove endurecimento, bem como separação das gotas a partir da fase de óleo.

A formação da emulsão de gota de gel de κ -carrageenan foi conduzida em um banho de água controlado para temperatura de 37 °C, de modo a impedir gelificação prematura do gel de carrageenan. O polímero esterilizado foi mantido a 37 °C em um banho de água regulado para temperatura, e o inóculum

de levedura foi mantido a 20 °C antes da imobilização. Usando-se bombas peristálticas Masterflex (Cole Parmer Company, USA), o gel e a pasta fluida de levedura foram bombeados através de 24 elementos do misturador estático de 6.4 mm de diâmetro, de modo a dispersar as células constantemente através do gel. O óleo esterilizado, armazenado á temperatura ambiente, foi bombeado (bomba peristáltica Masterflex) no banho de água quente para também alcançar uma temperatura de 37 °C.

O polímero inoculado (fase aquosa) foi, em seguida, misturado com o óleo (fase contínua) através de outra série de misturadores estáticos, para criar a emulsão desejada. Esta emulsão resultante foi rapidamente arrefecida a 5 °C dentro de um banho de água/gelo, provocando a gelificação das gotículas de polímero nas gotas. As gotas, em seguida, procedem em uma solução de cloreto de potássio de 22 g/L estéril que auxilia seu endurecimento e permite sua separação da fase óleo. O óleo do processo foi reciclado de volta para o processo, e a fase aquosa (gotas e solução de cloreto de potássio) foi transferida em um tanque separado para classificação de tamanho antes do carregamento nos bioreatores de 50-L.

5.2.1 Misturador Estático – Tipo Kenics

No coração deste novo processo de produção de gota estão os misturadores estáticos Kenics (Cole Parmer Instrument Company, Niles, Illinois, USA). Eles são compostos de uma série de elementos estacionários colocados em um tubo com um diâmetro interno equivalente àquele do diâmetro do

misturador estático. Estes elementos formam canais cruzados, que promovem a divisão e a recombinação longitudinal do líquido que flui através do misturador estático. A ruptura transversal destas linhas de corrente finamente criadas em uma emulsão aumentadamente homogênea é adicionalmente provocada por este sistema de mistura. A Tabela 5.2 lista os três tipos de misturadores estáticos que foram usados neste estudo.

Tabela 5.2 Descrição dos misturadores estáticos Kenics usados (supridos por Cole Parmer)

Modelo	Diâmetro do misturador Estático (mm)	Número de elementos (N_r)
G-04667-04	6,4	12
G-04667-06	9,5	12
G-04667-08	12,7	12

10

5.2.2 Materiais de Produção de Gel

Os dois materiais principais na produção das gotas de gel foram o óleo e o polímero. κ -Carrageenan (tipo X-0909, lot 330360, Copenhagen Pectin, Denmark), um polímero de polisacarídeo extraído de alga vermelha, foi uma doação generosa de Copenhagen Pectin A/S. Este polímero possui a propriedade única de termo-gelação, onde sua temperatura de gelação depende das concentrações de ambos κ -carrageenan ($[Car]$) e cloreto de potássio ($[KCl]$). O polímero foi dissolvido em uma concentração

15

de 30 g/L em água destilada a 80°C contendo 2.0 g/L de KCl. A solução de gel resultante tinha uma temperatura de gelificação de 28°C. O gel foi auto-clavado por 1 hora a 121 °C, e, em seguida, colocado em em um banho de água de 40 °C de modo que ele não
5 endureceria. Óleo de milho de grau comercial (Pasquale Bros. Inc., Canada) foi também esterilizado por 1 hora a 121°C, e, em seguida, armazenado à temperatura ambiente (20°C) até seu uso. Uma pasta fluida de levedura foi preparada conforme descrito na seção 4.1.

10 5.2.3 Medição do Diâmetro da Gota

Amostras de gota foram coletadas na saída do trocador de calor de 5 °C em frascos contendo 100 mL de 22 g/L de solução de KCl. As gotas foram permitidas afundarem nesta solução por 2 horas para promover seu endurecimento. O óleo foi
15 removido da fase gasosa por lavagens sucessivas com solução de cloreto de potássio. As amostras foram, em seguida, armazenadas a 4 °C para impedir contaminação microbiana antes da análise.

A medição do diâmetro da gota foi realizada usando-se o software de análise de imagem Optimas (Versão
20 4.02, BioScan, Inc, USA) ligado a uma câmera de vídeo (Pentax Macro 50 mm). Uma amostra de gota foi transferida em um prato petri contendo uma película fina de água (usada para separar as gotas) e, em seguida, colocada sobre a câmera. Um total de 300 a
25 400 gotas foram medidas usando-se este sistema. As capacidades do software Optimas assentam entre 100 µm e vários mm, com um erro máximo absoluto de 30 µm. Os dados obtidos de Optimas

foram analisados adicionalmente usando-se Microsoft Excel. As distribuições de tamanho da amostra resultante foram caracterizadas por seu diâmetro médio de amostra (D_B), e coeficiente de variação (COV).

5 5.2.4 Avaliação do Sistema de Gota – Plano Experimental

Um total de 3 diâmetros de misturador estático ($D_s = 6.4$ mm, 9.5 mm and 12.7 mm) foram comparados para avaliar que tipo de população de gota seria produzida conforme medida pelo diâmetro de gota médio da amostra e coeficiente de variação da distribuição de tamanho. O número de elementos de misturador estático (N_s) foi variado entre 12 e 120 elementos, enquanto a fração de volume de polímero (φ_c) foi estudada entre 8.3 % volume/volume e 50 % volume/volume de gel em uma solução de óleo. Acima de um φ_c de 50%, as fases dispersa (gel) e contínua (óleo) tornam-se invertidas, isto é, inclusão de gotícula de óleo dentro da matriz de polímero resultada ao invés de gotículas de gel dentro da matriz de óleo. A velocidade líquida superficial da emulsão de óleo/gel através da seção de emulsão foi ajustada na faixa de 3.6 cm/s e 17.8 cm/s. A velocidade líquida superficial (V_{SL}) através do misturador estático de emulsão foi calculada pela seguinte equação:

$$V_{SL} = (Q_{\text{óleo}} + Q_{\text{car}}) / S$$

onde S é a área de corte transversal do revestimento que contém o misturador estático, $Q_{\text{óleo}}$ é a taxa de

fluxo volumétrica da fase óleo, e Q_{car} é a taxa de fluxo volumétrica da solução de gel de carrageenan.

RESULTADOS E DISCUSSÕES: FERMENTAÇÕES & DINÂMICAS DE MISTURA NO 5 INTERIOR DE BIOREADORES DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50-L

O uso de células imobilizadas para a produção de etanol foi publicado. Nas últimas duas décadas, os pesquisadores têm tentado otimizar o processo de produção de etanol pelo acoplamento de tecnologia de célula imobilizada com processamento contínuo (Kuu, 1982; Gil, 1991; Maiorella, 1983). Muitos têm encontrado com grande sucesso, e o uso de sistemas de célula imobilizada contínuos para produção de etanol tem se tornado industrial. Contudo, a implementação de tal processo contínuo na indústria de fabrico de bebida fermentada para a fermentação primária de cerveja não é tão simples. A cerveja é compreendida não somente de etanol, mas também de uma miríade de compostos de aroma, que adicionam ambos complexidade e profundidade ao produto final. O capítulo seguinte descreve os resultados obtidos pelo autor na questão da produção de uma cerveja bem balanceada dentro do fermentador GLDT de escala piloto.

6.1 FERMENTAÇÕES DE DOSAGEM NO SISTEMA GLDT DE ESCALA PILOTO

25 Fermentações de dosagem utilizando células de levedura livremente suspensas foram conduzidas no bioreator de

tubo de arraste de ar de elevação de gás de escala piloto de 50-L. Estes ensaios proporcionam a oportunidade de avaliar a praticabilidade de usar-se um sistema para a fermentação de mosto na cerveja. Em adição, os ensaios servem para estabelecer
5 uma marca de nível para comparação futura com líquidos de fermentação contínuos. Duas fermentações de dosagem foram experimentadas no bioreator de 50-L usando-se uma linhagem de levedura lager a partir de Labatt Culture Collection (LCC3021). A taxa de crescimento da levedura, bem como o consumo de
10 nutrientes e liberação de produtos, foram monitorados através de todas as fermentações.

As Figuras 6.1 e 6.2 apresentam a concentração de levedura e perfis de viabilidade para fermentação de Dosagem 1 e 2, respectivamente. Em ambos os exemplos, o crescimento da
15 levedura segue as taxas clássicas reportadas na literatura. As viabilidades conforme medidas pelo azul de metileno permanecem altas, com valores permanecendo variando perto de noventa por cento. Os perfis de concentração de carboidrato para as dosagens 1 e 2 são apresentados nas Figuras 6.3 e 6.4. Os
20 açúcares simples, glucose e frutose, foram compostos primeiro pela levedura, seguido pelo consumo de maltose e maltotriose. Os níveis de maltotetrose, bem como os polisacarídeos maiores permanecem não-mudados através da fermentação.

O etanol é um dos mais importantes sub-
25 produtos de metabolismo de levedura. Uma fermentação anaeróbica otimizada produzirá cerca de 48 g de etanol e 47 g de

dióxido de carbono por 100 g de glucose metabolizada. Pequenas quantidades de glicerol também serão produzidas (3.3 g por 100 g de glucose) a medida que este sub-produto é envolvido na manutenção do balanço de redox dentro da levedura de fermentação, bem como suporte da célula em seu balanço osmótico, particularmente no meio hipertônico. As Figures 6.5 e 6.6 ilustram a evolução das concentrações de etanol e glicerol sobre o tempo de fermentação. Os níveis de etanol se elevam muito lentamente no começo da fermentação devido a presença de oxigênio no meio de fermentação a medida que as células de levedura estão em sua fase de crescimento aeróbico. Uma vez que o oxigênio tenha sido desdobrado, os níveis de etanol se elevam exponencialmente até que os açúcares fermentáveis sejam desdobrados, em cujo ponto os níveis de concentração recuam. As dicetonas vicinais são também muito importantes sub-produtos de metabolismo de levedura. A diacetil total e concentrações de pentanodiona para dosagens 1 e 2 são providas nas Figuras 6.7 e 6.8. Estes compostos se elevam até aproximadamente 40 horas na fermentação, correspondendo aos níveis de pico de concentração de levedura e são um resultado da síntese de amino ácido que experimenta levedura durante sua fase de crescimento. Durante a última porção da fermentação, diacetil, pentanodiona e seus precursores α -acetolactato and α -cetobutirato, são convertidos pela levedura em seus dióis ativos menos aromáticos correspondentes.

A partir dos resultados apresentados nesta seção, parece que as duas fermentações de dosagem procedem normalmente dentro do bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás. O crescimento da levedura e tomada de

5 carboidrato seguem as trajetórias esperadas, conforme os subprodutos etanol, diacetil e pentanodiona. Uma comparação dos dados de dosagem individuais indica que as duas dosagens fermentam de maneira muito similar. A Figura 6.9 compara a concentração de etanol das dosagens 1 e 2. As curvas individuais

10 segem o mesmo perfil com muitos dos pontos de dados sobrepondo um ao outro, indicando um nível de repetibilidade. Embora a seqüência de consumo de substratos e rendimento subsequente de produtos não mude dentro do sistema de elevação de gás, a taxa de fermentação o faz. A completção de

15 fermentação primária representada pela concentração de etanol pico foi alcançada em ambas as dosagens em cerca de 80-85 horas. A redução de diacetil para abaixo de 30 $\mu\text{g/L}$ foi alcançada em um adicional de 20 horas. Estes resultados sugerem que a fermentação primária de mosto de alta gravidade pode ser

20 completada em cerca de 100 horas conforme comparado a 120-168 horas para fermentação de lager de dosagem tradicional. A agitação provida pelo bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás contribui para este aumento no tempo de fermentação devido a transferência de massa aumentada oferecida

25 por tais sistemas. Com esta informação, ensaios de fermentação futuros foram realizados com confiança que o bioreator de tubo

de arraste de ar de elevação de gás não altera significativamente o metabolismo de fermentação de levedura, e que fermentação com levedura livremente suspensa dentro deste sistema pode reduzir o tempo de fermentação de dosagem por pelo menos 20 horas.

5

10

15

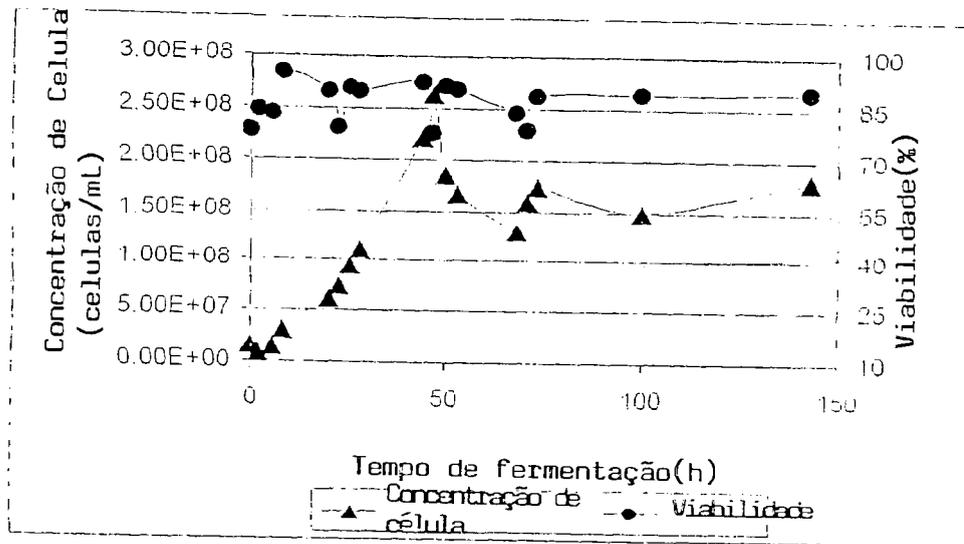
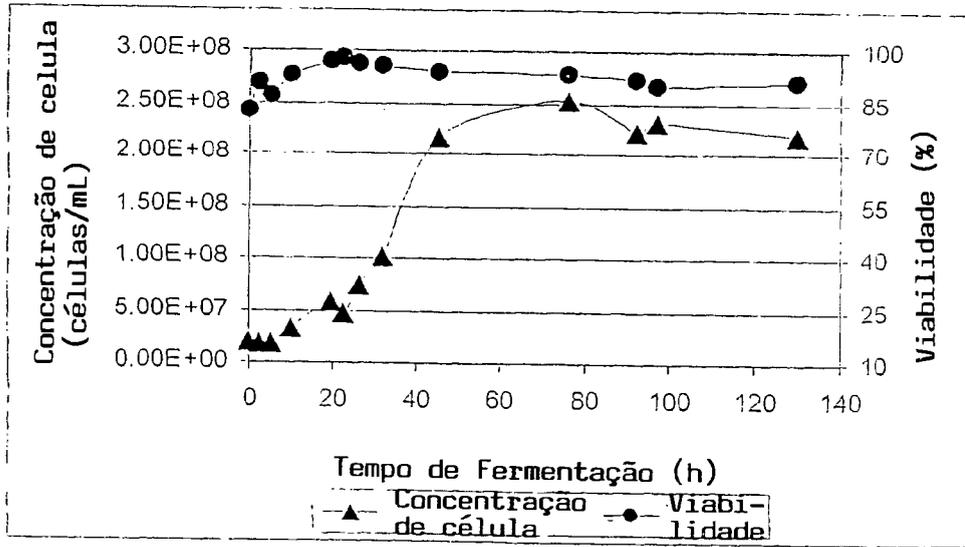


FIGURA 6.1 CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE TOTAL DE CÉLULA VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 1 DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

20

5

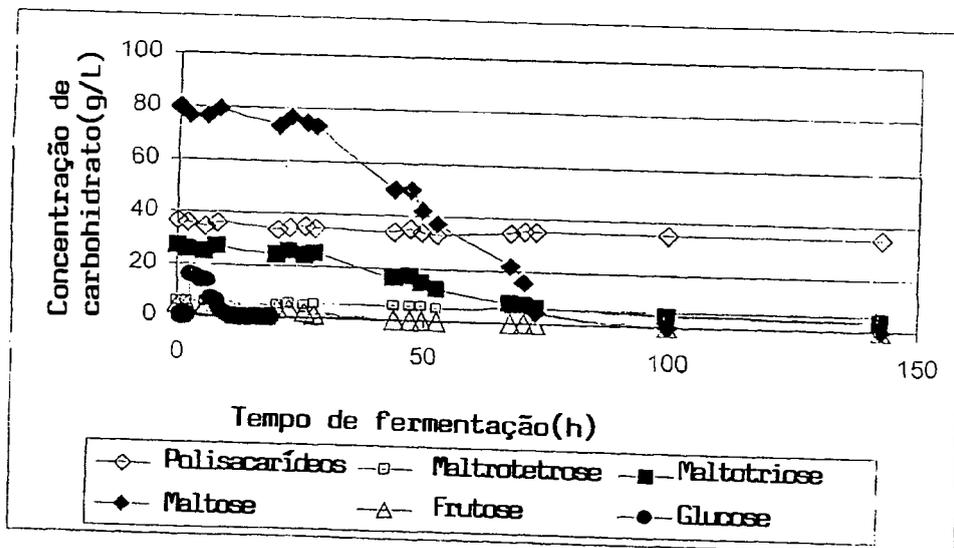


10

FIGURA 6.2 CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE TOTAL DE CÉLULA VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 2 DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

15

20



25

FIGURA 6.3 PERFIS DE
 CONCENTRAÇÃO DE CARBOHIDRATO VERSUS
 TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE
 DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 1 DENTRO DE UM
 5 BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

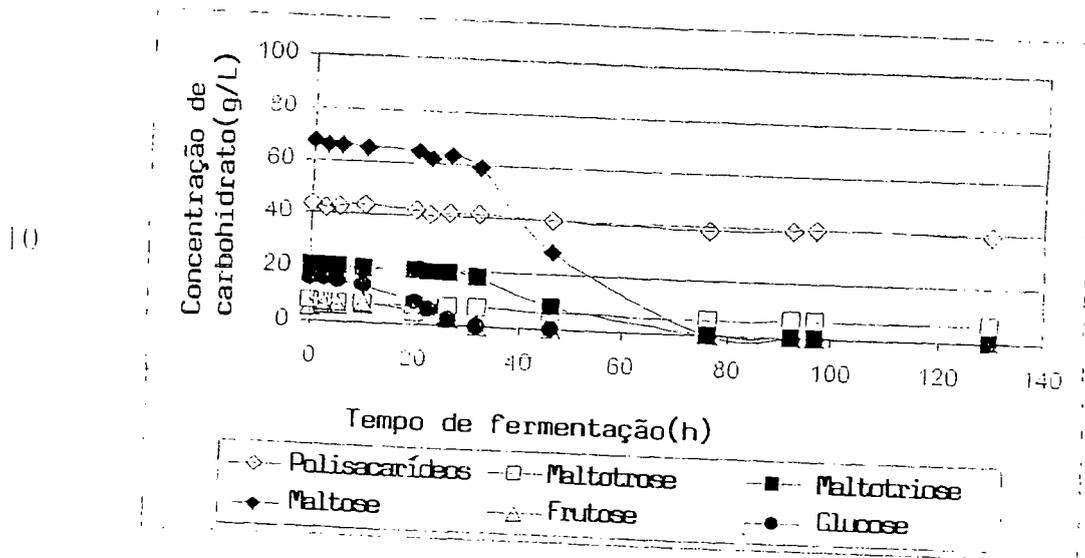
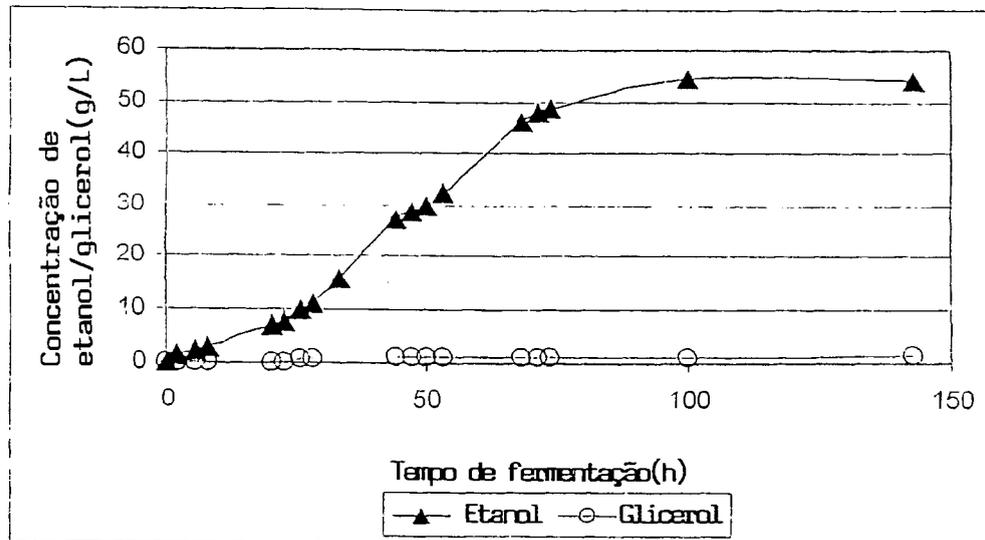


FIGURA 6.4 PERFIS DE
 CONCENTRAÇÃO DE CARBOHIDRATO VERSUS
 TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE
 DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 2 DENTRO DE UM
 20 BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

5

10



15

FIGURA 6.5 CONCENTRAÇÕES DE ETANOL E GLICEROL VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 1 DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

20

25

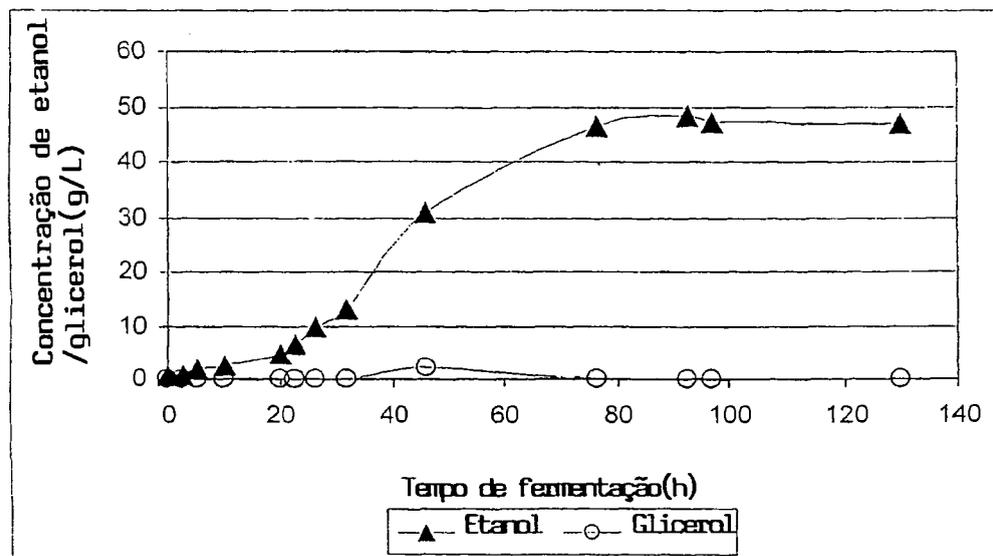


FIGURA 6.6 CONCENTRAÇÕES DE ETANOL E GLICEROL VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 2 DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

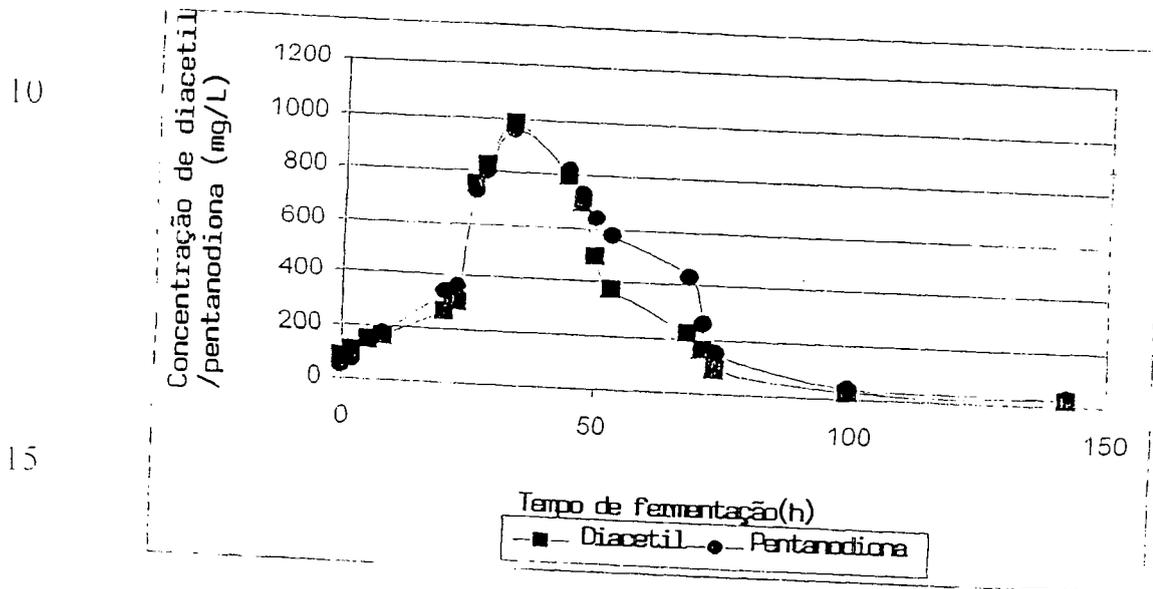
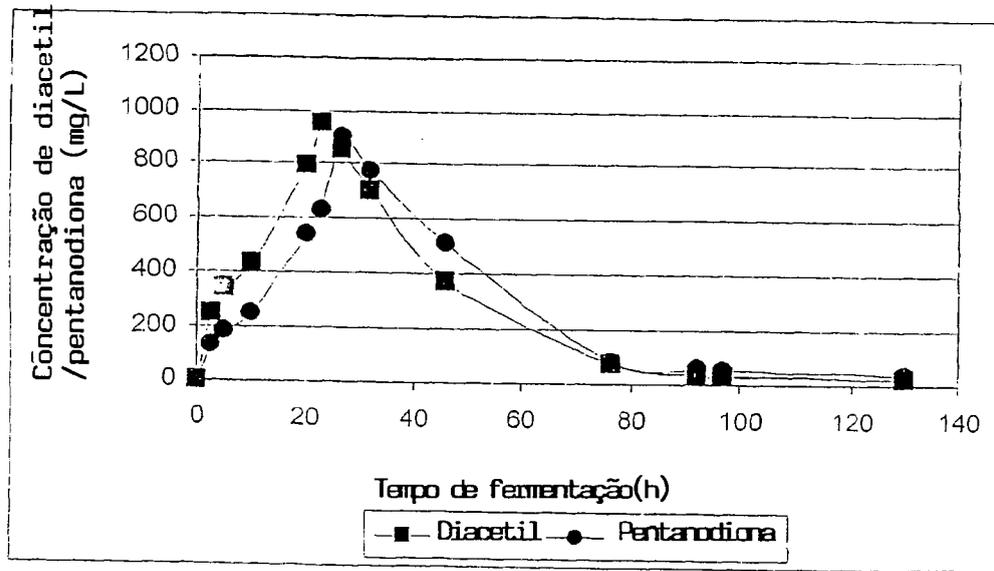


FIGURA 6.7 CONCENTRAÇÕES DE DIACETIL E PENTANODIONA VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 1 DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

5

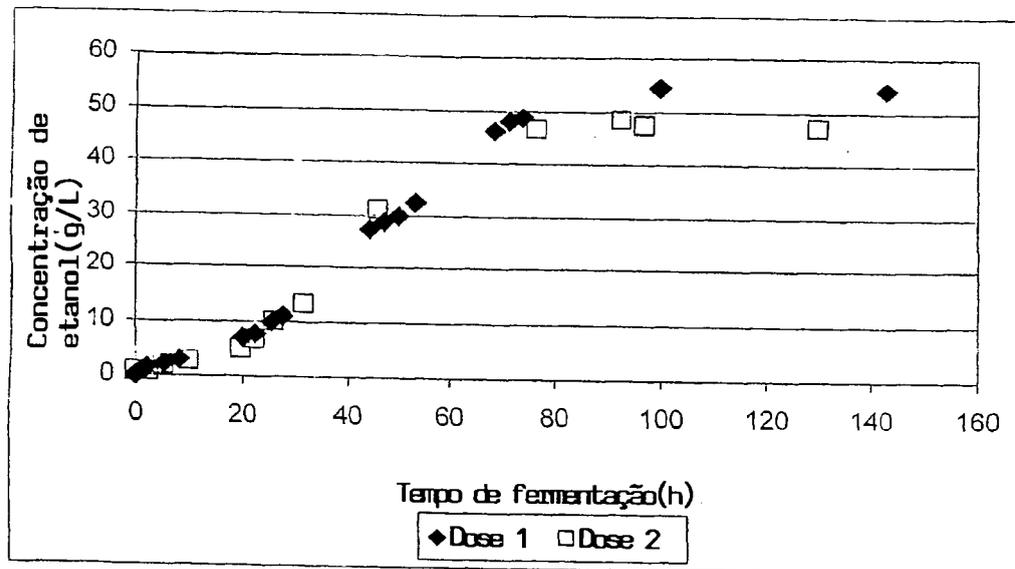


10

FIGURA 6.8 CONCENTRAÇÕES DE DIACETIL E PENTANODIONA VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC3021 2 DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

15

20



25

FIGURA 6.9 COMPARAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ETANOL PARA DOSAGEM E DOSAGEM 2 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO. LEVEDURA LCC3021 FOI USADA DENTRO DE UM BIOREATOR GLDT DE ESCALA PILOTO.

6.2 TRANSPORTADORES DE IMOBILIZAÇÃO

Vários transportadores foram investigados através de todo projeto de pesquisa para identificar as alternativas mais promissoras para trabalho de desenvolvimento futuro. Três modos distintos de imobilização foram testados dentro do bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de tubo de 50-L. Dois transportadores de adsorção comercialmente disponíveis com tamanhos variando entre 1 e 2 mm foram avaliados. Siran[®], um transportador de gota de vidro suprido por Schott Engineering (FIG. 9), e Celite[®], uma gota de terra diatomácea provida por World Minerals (FIG. 10), foram testados por causa de sua fácil proposta de manuseio, e sua disponibilidade comercial. Transportadores baseados em adsorção proporcionam a oportunidade de operação mais asséptica, visto que o reator pode ser primeiro carregado com o transportador, seguido pela esterilização no local, e, finalmente, inoculação de levedura diretamente no reator. A partir de um ponto de vista industrial, esta opção é muito atrativa a medida que o transportador não requereria armazenamento especial, e a planta não teria que alterar significativamente suas práticas de inoculação.

Os resultados da fermentação inicial com ambos estes veículos no bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás de 50-L foram desfavoráveis. Os problemas que se elevaram foram principalmente devido às altas densidades de partícula do Siran[®] e Celite[®] conforme comparados ao meio líquido. Estes sistemas de tubo de arraste de ar de elevação de gás de três fases operam melhor quando a razão do veículo e as densidades de líquido são mantidas próximas à unidade. No caso do Siran[®], a razão foi 1.34, pelo que a razão para Celite[®] foi 1.31. A conseqüência de ter-se tais diferenças de densidade altas entre a fase sólida e líquida foi um aumento significativo na velocidade de fluidização de gás mínima para operar o bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás de 50-L. Para 4 litros de veículo Siran[®] (8% v/v de carregamento de sólidos), uma velocidade de gás de 21.5 mm/s (baseada no diâmetro de tubo de arraste de ar) foi requerida de modo a alcançar circulação. Esta velocidade de gás mais alta não era um problema significativo quando o teste foi realizado em uma solução de água; contudo, logo que o meio líquido era mosto, falha catastrófica ocorreu dentro do sistema de tubo de arraste de ar de elevação de gás (GLDT). A velocidade de gás requerida causou espumamento excessivo dentro do reator, que ultimamente reduziu o nível de líquido para abaixo do tubo de arraste de ar, cessando efetivamente a circulação de líquido e sólido. Falha similar àquela encontrada com o Siran[®] ocorreu quando o Celite[®] foi substituído como o material de imobilização.

Devido a estes resultados, ambos estes veículos baseados em adsorção foram abandonados nos ensaios de fermentação de elevação de gás.

O uso de um veículo baseado em prendimento similar a k-carrageenan permite que o sistema seja carregado em uma base de 40% (v/v) com sólido, e requer cerca de 0.17 metros cúbicos padrão por hora de gás (velocidade de gás superficial de 5.8 mm/s) para sua fluidização e circulação subsequente. Os resultados positivos experimentados com operação do sistema com gotas de célula de levedura presa com carrageenan foram devido a densidade inferior do veículo (cerca de 1100 kg/m^3), e facilidade conseqüente de fluidização. Similarmente, carregamento de sólidos desejado com levedura de auto-agregação, LCC 3021 (meio flocoso) e LCC290 (super flocoso), foi alcançado com velocidades de fluidização de gás de aproximadamente 3 mm/s requeridas para assegurar circulação correta. A Seção 6.2.1 descreve em mais detalhes o veículo de gel de k-carrageenan, e a Seção 6.2.2 descreve a levedura de auto-agregação – flocos LCC3021 e flocos LCC290, que foram avaliados como matrizes de imobilização para fermentação primária contínua dentro do fermentador de 50-L GLDT.

6.2.1 Gotas de Gel de k-Carrageenan

Métodos de imobilização baseados em prendimento requerem a inclusão das células de levedura dentro da matriz antes de sua introdução no vaso de fermentação. Desde que a inoculação do reator in-situ não é segura neste momento, é

necessário produzir estas gotas de gel antes do começo da fermentação. Ainda não está claro quais os efeitos de armazenamento a longo prazo que tem nas gotas de gel inoculadas. De modo a minimizar quaisquer efeitos de armazenamento negativos potenciais, foi decidido produzir grandes quantidades de gotas de gel dentro de um curto período de tempo (8 horas). O processo de gota de misturador estático descrito na Seção 5.2 foi, portanto, utilizado para esta proposta. As gotas ideais teriam diâmetros de particular (D_B) entre 0.8 mm e 1.4 mm, com coeficiente de variação (COV) da distribuição de tamanho mantido em um mínimo. Foi necessário ajustar vários parâmetros do processo de produção de gota para produzir a quantidade desejada e consistência de gotas. A seção seguinte apresenta um resumo da seleção de parâmetro de processo de gota, e a Seção 6.2.1.2 descreve as gotas usadas nos ensaios de fermentação contínua.

6.2.1.1 Processo de Produção de Gota: Seleção Variável

A caracterização do processo de produção de gota foi empreendida em colaboração com outros pesquisadores com ênfase colocada nos seguintes parâmetros de processo: diâmetro do misturador estático (D_s), número de elementos do misturador estático (N_s), taxa de fluxo de líquido superficial (V_{SL}) e fração de volume de polímero (ϕ_C). As Figuras 6.12 a 6.21 resumem os resultados obtidos através de experimentos.

A Figura 6.12 ilustra uma distribuição de tamanho típica obtida usando-se o processo de misturador estático para imobilizar levedura dentro do gel carrageenan. Neste exemplo, os seguintes parâmetros foram utilizados: diâmetro de misturador estático de 12,7 mm, 60 elementos de misturador estático, velocidade de líquido superficial de 10,5 cm/s, e fração de volume de polímero de 0.25. O diâmetro de gota médio foi medido a 701 μ m, com um coeficiente de variação de 45%. A distribuição de tamanho cumulativa ilustrada na Figura 6.13 pareceu ajustar uma distribuição cumulativa normal calculada com a amostra média e desvio padrão. O método de Kolmogorof Smirnov (Scheaffer et McClave, 1990) foi usado para testar a normalidade. A distância máxima entre os dados experimentais e os dados ajustados (K-S estatística D) foi calculada em 0.0274. O valor D modificado que corresponde aos dados que seguem uma distribuição normal deve estar abaixo de 0,895 em um nível de confiança de 95%. Em nosso caso, o valor D modificado foi calculado para ser 0,174, bem abaixo do limite de 0,895, e pode ser concluído que nossos dados ajustam uma distribuição normal.

Todos os dados coletados a partir deste processo de produção de gota mostraram distribuições de tamanho com apenas um pico. Poncelet e outros. (1992), contudo, mostrou a ocorrência de picos satélites e/ou um pico secundário correspondente às gotas com diâmetros menores do que 200 μ m para gotas de alginato produzidas por dispersão em um tanque agitado. É possível que gotas menores produzidas em nosso

processo fossem simplesmente perdidas durante a etapa de lavagem e, portanto, não apareceriam em nossos dados de distribuição de tamanho.

Os efeitos da velocidade de líquido superficial e diâmetro do misturador estático no diâmetro de gota médio e no coeficiente de variação da distribuição de tamanho, são representados nas Figuras 6.14 e 6.15, respectivamente. O diâmetro de gota médio diminui com um aumento da velocidade de líquido superficial para todos os três diâmetros de misturador estático com um efeito mais pronunciado no misturador estático de 12,7-mm. Gotas com diâmetros médios maiores do que 700 μm não foram produzidas com os misturadores estáticos de diâmetros menores (6,4 mm e 9,5 mm) em todas as velocidades de líquido testadas, pelo que o misturador estático de diâmetro de 12,7 mm produziu gotas maiores do que 700 μm em velocidades de líquido abaixo de 11 cm/s. Todos os três diâmetros de misturador estático produzem gotas com coeficientes de variação entre 38% e 58%. Também parece que a medida que a velocidade aumenta o coeficiente de variação diminui nos três casos. O coeficiente de variação variou com o diâmetro do misturador estático, com os valores mais baixos produzidos com o misturador estático de diâmetro mais baixo.

Em uma velocidade de líquido superficial de 3,5 cm/s, a fração de volume de polímero pareceu afetar o diâmetro de gota médio, enquanto velocidades acima de 7 cm/s não produziram relativamente diferenças nos valores experimentais de

\bar{c} variando entre 0,083 e 0,5 (Figura 6.16). Pouco ou nenhum efeito apareceu no coeficiente de variação pela fração de volume com o aumento das velocidades de líquido superficial (Figura 6.17).

5 As Figuras 6.18 e 6.19 ilustram os efeitos da velocidade de líquido superficial e o número de elementos do misturador estático no diâmetro de gota médio. A medida que a velocidade do líquido aumenta, o diâmetro de gota médio diminui para todas as variações do número de elementos do misturador
10 estático (Figura 6.18). O diâmetro de gota médio em uma dada velocidade de líquido foi similar para 24 elementos a 120 elementos, enquanto a configuração de 12 elementos produziu diâmetros de gota maiores do que as cinco outras configurações testadas. A Figura 6.19 também mostra que o diâmetro de gota
15 médio alcança um mínimo acima de 24 elementos de misturador estático.

A Figura 6.20 representa o efeito da velocidade de líquido superficial no coeficiente de variação para vários números de elementos de misturador estático. Pareceu que a
20 velocidade de líquido não afetou o coeficiente de variabilidade para todas as configurações testadas. O efeito do número de elementos de misturador estático no coeficiente de variabilidade foi mais pronunciado (Figura 6.21). O coeficiente de variação diminuiu com um aumento dos elementos de misturador estático,
25 e alcançou um mínimo de 45% em 60 elementos e acima. Estes

resultados foram consistentes para velocidades de líquido superficiais variando entre 3,6 cm/s e 17,8 cm/s.

Foi hipotetizado que um aumento no diâmetro de misturador estático (D_s) criaria heterogeneidade de forças de cisalhamento dentro do misturador, induzindo um aumento na dispersão de tamanho conforme medida pelo coeficiente de variação. Concorrentemente, um aumento no D_s diminuiria a intensidade das forças de cisalhamento aumentando, desse modo, o diâmetro de gota médio. Ambos estes efeitos foram observados na experimentação com o misturador estático de diâmetro mais baixo, produzindo gotas com o diâmetro de gota médio menor (400 μ m – 500 μ m), e o coeficiente de variação menor (aproximadamente 40%), ou dispersão de tamanho.

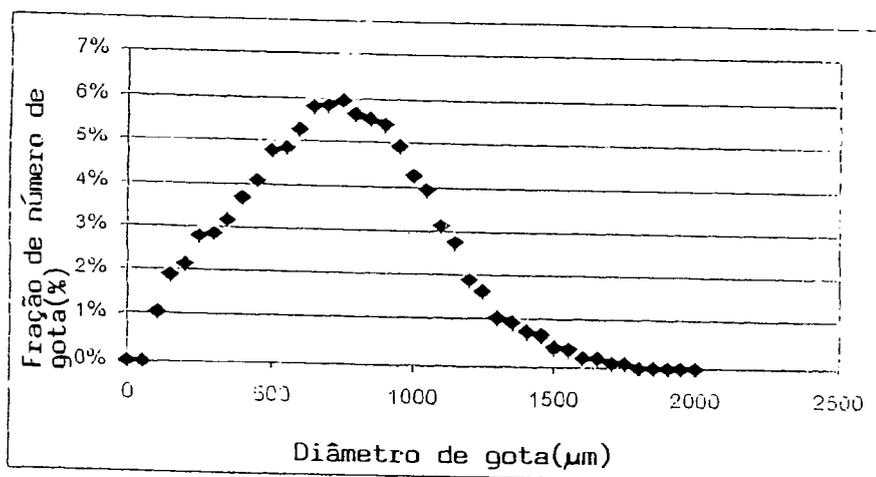
A energia requerida para criar uma emulsão é proporcional à área interfacial criada pelo polímero e a fase óleo. Quanto menor o tamanho da gota, menor a energia requerida para formação. Berkman e Calabrese (1988) mostraram que um aumento na velocidade de líquido superficial média (V_s) provoca um aumento na energia dissipada por unidade de massa de fluido, favorecendo, desse modo, uma redução no tamanho de gota. Um aumento na velocidade de líquido superficial médio (testado entre 3,6 cm/s e 17,8 cm/s) produziu um aumento no tamanho de gota médio. Tal aumento na velocidade resulta em um diferencial de pressão entre a admissão e descarga do misturador estático. Este diferencial de pressão é proporcional à energia dissipada por unidade de massa de líquido. Um aumento na velocidade,

portanto, induz um aumento na energia dissipada do sistema, que favorece uma redução no tamanho da gota. A redução no diâmetro de gota D_B , foi observada nas velocidades de líquido aumentada. Al Taweel e Walker (1983) mostraram que um equilíbrio dinâmico é estabelecido entre a formação de gotas e a coalescência entre gotas para velocidades altas correspondentes a níveis de turbulência significantes. Para diâmetro de misturador estático constante (D_s) e número de elementos (N_s), a velocidade superficial tem pouco efeito no coeficiente de variação. A velocidade é, portanto, um parâmetro, que permite a manipulação e seleção do diâmetro de gota médio sem modificar significativamente a dispersão de tamanho.

Dentro do escopo desta pesquisa, a fração de volume de gel de carrageenan (α_c) tem pouco efeito ou no diâmetro de gota médio, ou no coeficiente de variação, exceto para velocidade estudada mais baixa de 3,6 cm/s onde o diâmetro de gota médio diminuiu com um aumento no α_c . Audet e Lacroix (1989) estudaram este parâmetro para a produção de gotas de carrageenan em um sistema de dispersão de duas fases (processo de misturador estático não-contínuo com tanque agitado de dosagem), e eles concluíram que α_c não tinham efeito no diâmetro de gota médio para uma solução de polímero com uma concentração de 3% (peso/volume). O efeito específico da concentração de gota de α -carrageenan na distribuição de tamanho de gota foi examinado por Audet e Lacroix (1989), que mostrou que este parâmetro influenciou fortemente a distribuição

de tamanho. O aumento das concentrações de gel resultou no aumento do diâmetro de gota médio (D_B) e coeficiente de variação (COV). O efeito notado foi atribuído à viscosidade aumentada do gel em concentrações mais altas, resultando em
5 forças de cisalhamento mais baixas e, desse modo, gotas maiores. Embora o efeito de concentração de gel no tamanho de gota não fosse investigado nesta tese, ele pode ser usado como outro meio de controlar o tamanho de gota se necessário.

Um aumento no número de elementos de
10 mistura (N_s) aumenta o tempo de residência médio que um elemento de fluido gasta dentro do misturador estático, resultando em uma mistura mais homogênea e, desse modo, na formação de gotas menores e mais apertadamente dispersas. Na experimentação, um equilíbrio na dispersão (medido pelo
15 coeficiente de variação) foi alcançado ao redor de 60 a 72 elementos. Middleman (1974) mostrou que 10 elementos foram suficientes para alcançar tal equilíbrio no caso de emulsões com baixa viscosidade (0.6 a 1.0 cP). A solução de carrageenan usada
20 nestes experimentos [3% peso/volume] tem uma viscosidade média de 200 cP e a viscosidade do óleo foi 25 cP. Conseqüentemente, esta viscosidade mais alta requer um tempo de residência mais longo dentro do misturador de modo a alcançar pseudo-homogeneidade.

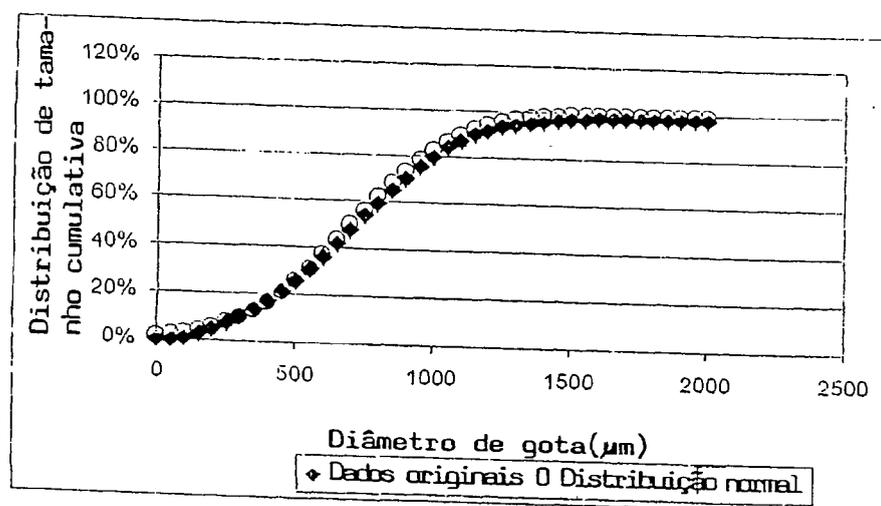


5

10

FIGURA 6.12. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO TÍPICO DE GOTAS PRODUZIDAS USANDO O PROCESSO DE MISTURADOR ESTÁTICO. OS PARÂMETROS DE PROCESSO NESTE EXEMPLO FORAM: $D_S = 12,7 \text{ MM}$, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10,5 \text{ CM/S}$ E $\epsilon_C = 0,25$.

15



20

25

FIGURA 6.13. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO CUMULATIVO TÍPICO DE GOTAS PRODUZIDAS USANDO O PROCESSO DE MISTURADOR ESTÁTICO. OS PARÂMETROS DE PROCESSO NESTE EXEMPLO FORAM: $D_s = 12,7$ MM, $N_s = 60$, $V_{SL} = 10,5$ CM/S E $\phi_c = 0,25$.

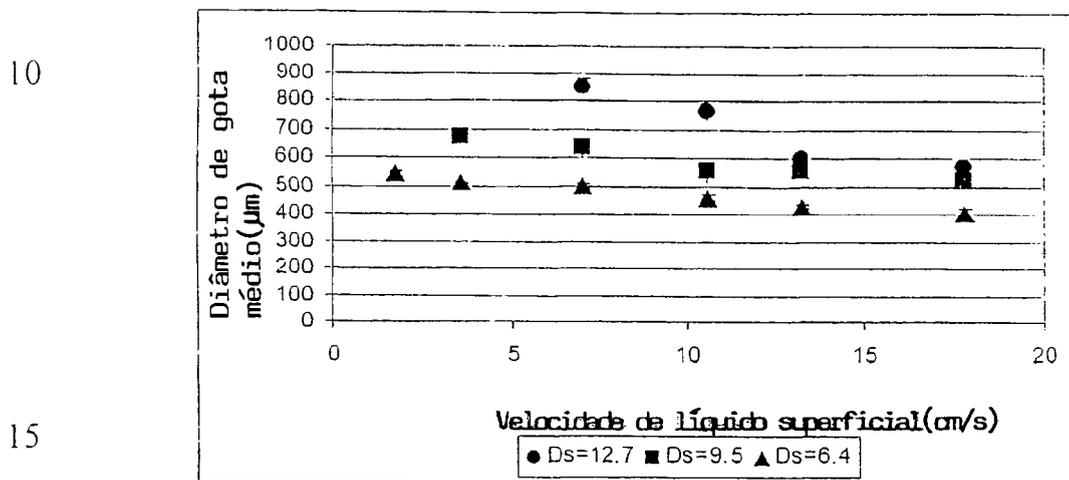


FIGURA 6.14. VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) VERSUS DIÂMETRO DE GOTA MÉDIO (µM). TRÊS DIÂMETROS DE MISTURADOR ESTÁTICO DIFERENTES FORAM AVALIADOS (D_s DE 12,7 MM, 9,5 MM E 6,4 MM). O NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s) FOI MANTIDO CONSTANTE EM 48 E A FRAÇÃO DE POLÍMERO (ϕ_c) FOI AJUSTADA EM 0,25.

5

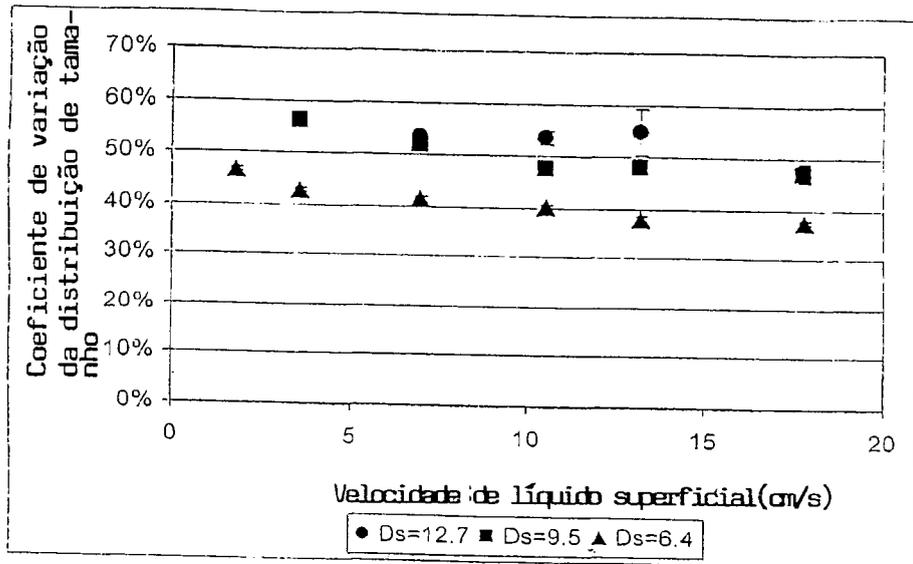


FIGURA 6.15. VELOCIDADE DE
 10 LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) VERSUS COEFICIENTE
 DE VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (%). TRÊS
 DIÂMETROS DE MISTURADOR ESTÁTICO
 DIFERENTES FORAM AVALIADOS (D_s DE 12,7 MM, 9,5
 15 MM E 6,4 MM). O NÚMERO DE ELEMENTOS DE
 MISTURADOR ESTÁTICO (N_s) FOI MANTIDO
 CONSTANTE EM 48, E A FRAÇÃO DE POLÍMERO (ϕ_c)
 FOI AJUSTADA EM 0,25.

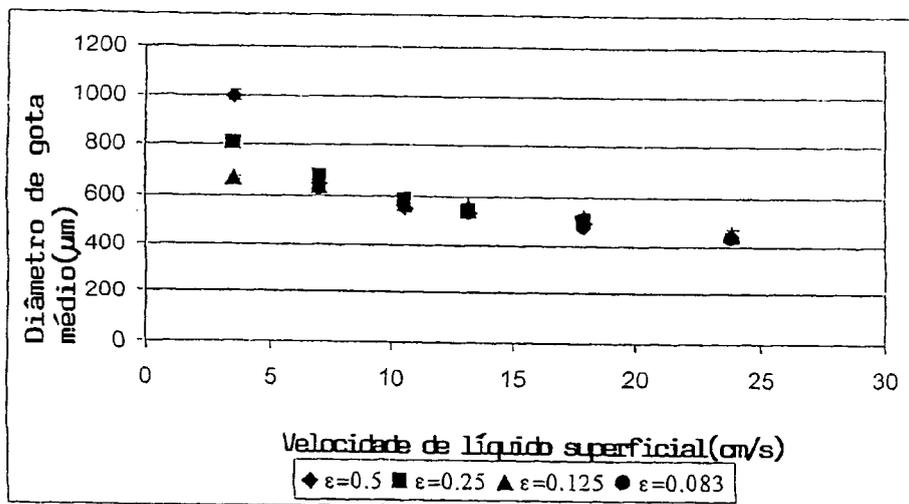


FIGURA 6.16. VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) VERSUS DIÂMETRO DE GOTA MÉDIO (μM). QUATRO FRAÇÕES DE POLÍMERO (ϵ_c DE 0,5, 0,25, 0,125 E 0,083) FORAM AVALIADAS. O NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s) FOI MANTIDO EM 48, E O DIÂMETRO DE MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM 12,7 MM.

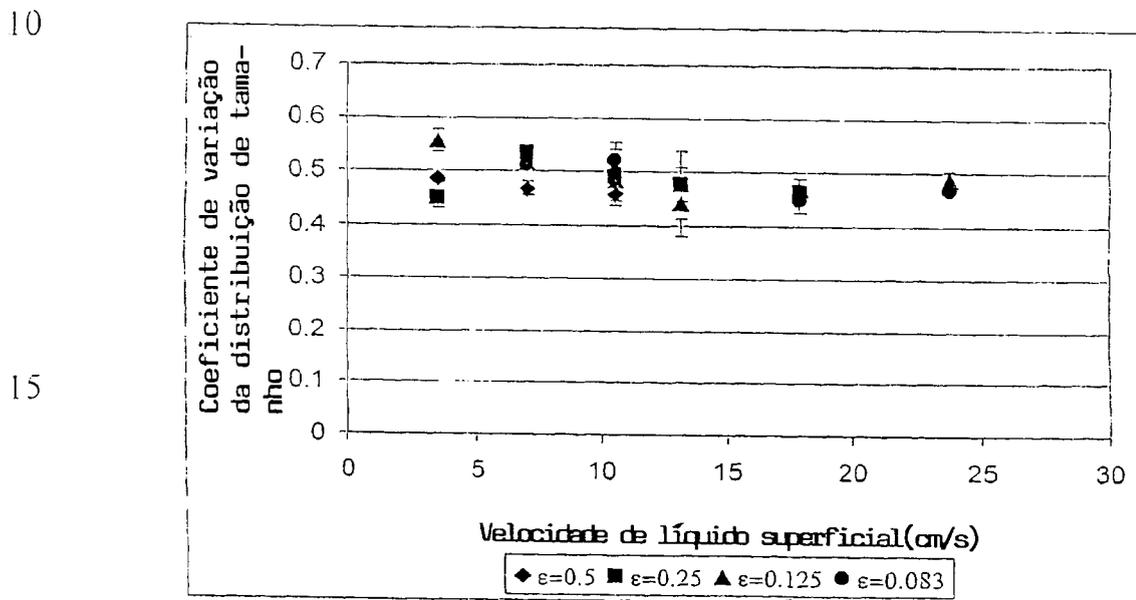
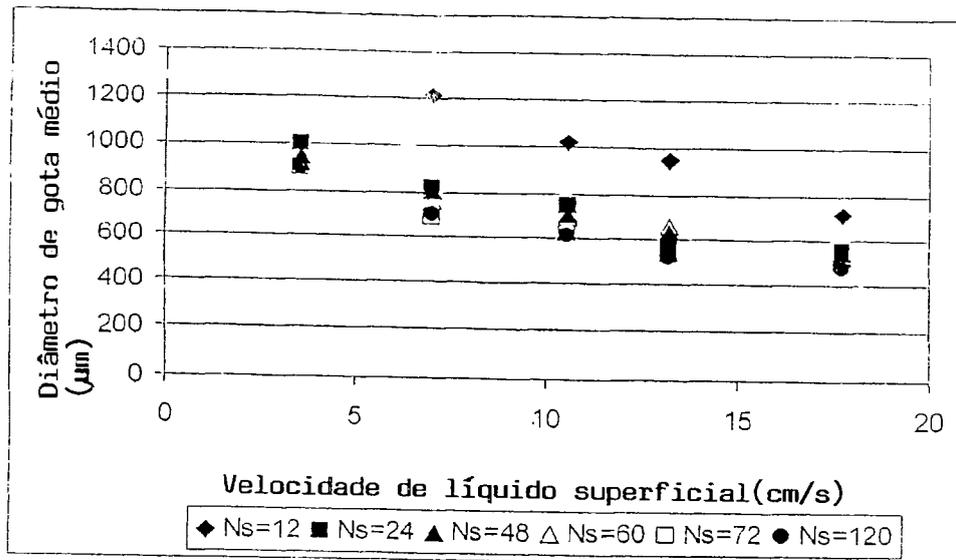
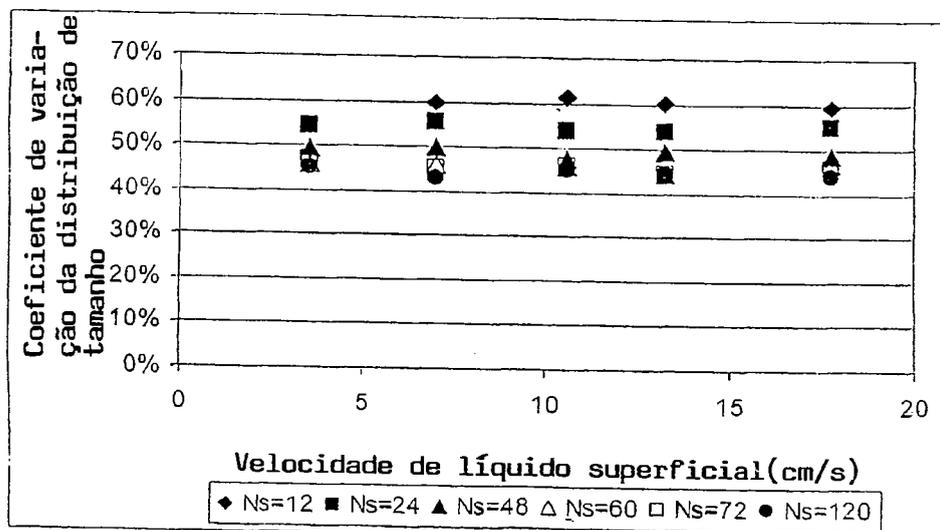


FIGURA 6.17. COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (%). QUATRO FRAÇÕES DE POLÍMERO (ϵ_c DE 0,5, 0,25, 0,125 E 0,083) FORAM AVALIADAS. O NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s) FOI MANTIDO EM 48 E O DIÂMETRO DE MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM 12,7 MM.



10 **FIGURA 6.18. VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) VERSUS DIÂMETRO DE GOTA MÉDIO (µM). O NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s) FOI VARIADO PARA 12, 24, 48, 60, 72 E 120. A FRAÇÃO DE POLÍMERO (ϕ_c) FOI**
 15 **MANTIDA CONSTANTE EM 0.25, E O DIÂMETRO DE MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM 12,7 MM.**



25

FIGURA 6.19. VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) VERSUS COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (MM). O NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s) FOI VARIADO PARA 12, 24, 48, 60, 72 E 120. A FRAÇÃO DE POLÍMERO (E_c) FOI MANTIDA CONSTANTE EM 0,25 E O DIÂMETRO DE MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM 12.7 MM.

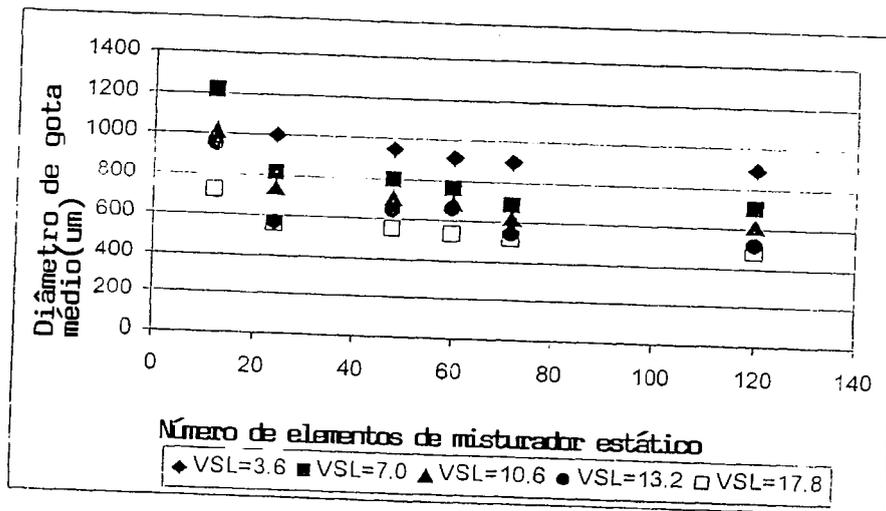
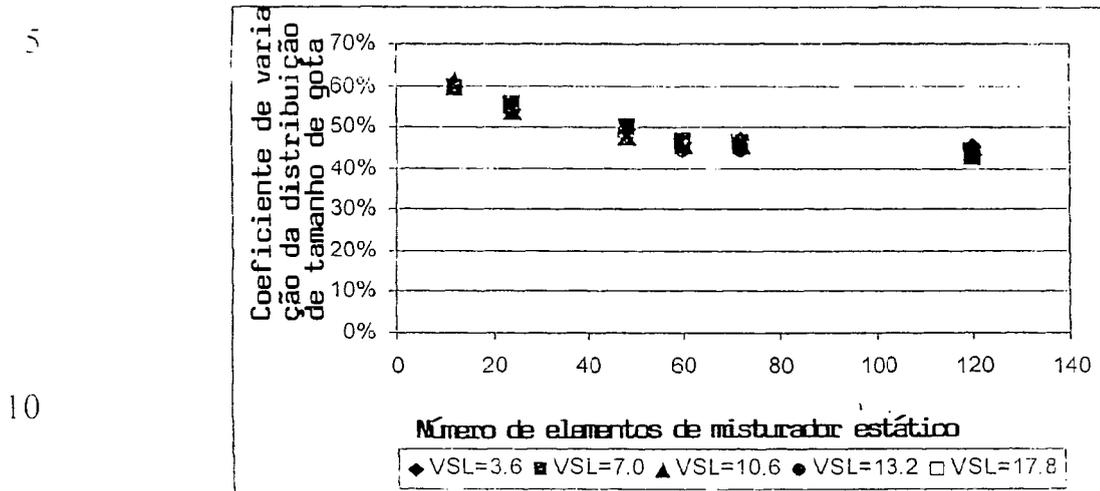


FIGURA 6.20. DIÂMETRO DE GOTA MÉDIO (µM) VERSUS NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s). A VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) FOI VARIADA PARA 3,6, 7,0, 10,6, 13,2 E 17,8. A FRAÇÃO DE POLÍMERO (E_c) FOI MANTIDA CONSTANTE EM 0,25, E O DIÂMETRO DO MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM

DO MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM 12,7 MM.



15 FIGURA 6.21. COEFICIENTE DE VARIÇÃO DO DIÂMETRO DE GOTA (%) VERSUS NÚMERO DE ELEMENTOS DE MISTURADOR ESTÁTICO (N_s). A VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (CM/S) FOI VARIADA ENTRE 3,6 E 17,8. A FRAÇÃO DE POLÍMERO (\square_c) FOI MANTIDA

20 CONSTANTE EM 0,25, E O DIÂMETRO DO MISTURADOR ESTÁTICO (D_s) FOI AJUSTADO EM 12,7 MM.

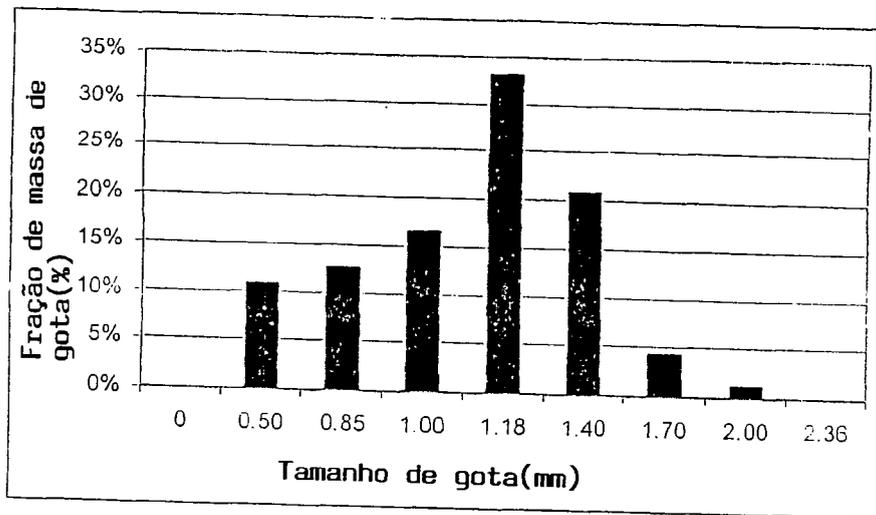
6.2.1.2 Processo de Produção de Gota:

Características da Gota de \square -Carrageenan

25 A partir dos dados descritos na seção anterior, foi possível selecionar parâmetros de processo de produção de

gota para produzir gotas com as características desejadas para os ensaios de fermentação. Para minimizar o coeficiente de variação para um diâmetro de misturador estático particular, 60 elementos de mistura foram escolhidos para criar a dispersão óleo-gel. Gotas com um diâmetro médio de aproximadamente um mm foram selecionadas para minimizar a transferência de massa externa, e para facilitar a separação por meios mecânicos a partir do líquido de fermentação. Para alcançar isto, o misturador estático maior testado (12.7 mm) e a velocidade testada mais baixa (3.6 cm/s) foram selecionados. Desde que a fração de polímero tinha pouco efeito no coeficiente de variação, uma razão de 50/50 ($\phi_c = 0.5$) de gel para óleo foi empregada de modo a maximizar a produtividade de gota.

Várias dosagens de gotas de gel, com levedura LCC3021 presa, foram produzidas no laboratório usando-se o processo descrito na Seção 5.2 com $D_s = 12.7$ mm, $N_s = 60$, $V_{SL} = 3.9$ cm/s e $\phi_c = 0.5$. As gotas resultantes (FIG. 11) foram passadas através de uma série de peneiras para remover gotas maiores do que 2.0 mm e aquelas menores do que 0.5 mm. A distribuição de tamanho de partícula resultante está presente na Figura 6.23. A Figura 6.24 ilustra a distribuição de tamanho cumulativa destas gotas. Esta foi a distribuição típica empregada através dos ensaios de fermentação de elevação de gás de 50-L.



10

FIGURA 6.23. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE GOTA DE GEL DE K-CARRAGEENAN UTILIZADA NOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA NO INTERIOR DO BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50L.

15

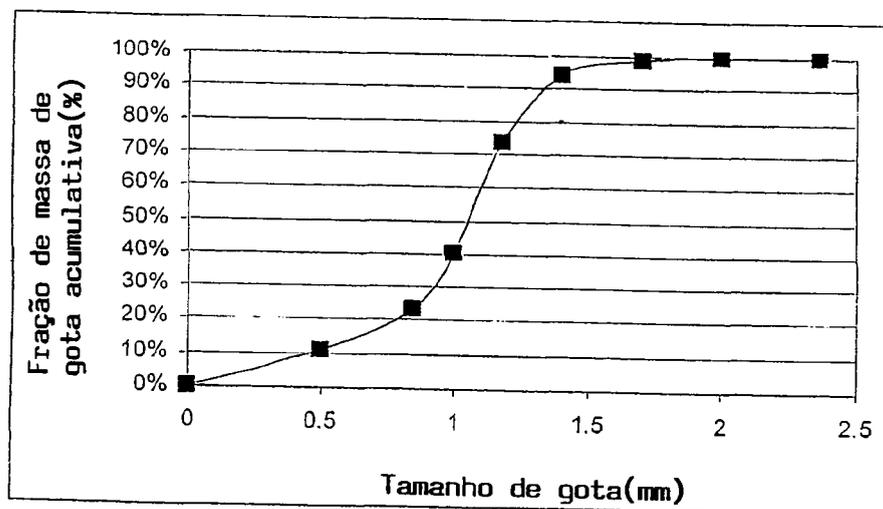


FIGURA 6.24. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE GOTA CUMULATIVA DE GOTAS DE GEL DE K-CARRAGEENAN UTILIZADA NOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA NO INTERIOR DO BIOREATOR DE TUBO DE ARRASTE DE AR DE ELEVÇÃO DE GÁS DE 50L.

6.2.1.3 Limitações do Processo de Gota Com Relação a Aplicação em Escala Industrial

Um processo produzindo 10 L de gotas por hora, por misturador estático, foi desenvolvido e implementado em um nível de planta piloto. Vários aspectos deste processo requerem desenvolvimento adicional e/ou otimização antes que a produção de gota em escala industrial possa ser considerada. Um aumento na produtividade volumétrica do sistema é necessário de modo a suprir o volume de células imobilizadas requerido para alimentar um bioreator de grande escala. Por exemplo, um bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás de 2000-hL requereria aproximadamente 800 hL de gotas. Para alcançar tais volumes, um aumento em ambos os fluxos de gel e óleo são necessários. Os dados sugerem que a velocidade aumentada resultante usando os misturadores estáticos de diâmetros de 6,4 mm a 12,7 mm induziria à formação de gotas muito menores a serem usadas no sistema de fermentação. Seria, portanto, necessário, aumentar o diâmetro dos misturadores estáticos, aumentando, desse modo, o diâmetro de gota médio. Contudo, o uso de misturadores estáticos com um diâmetro maior também

aumentará a dispersão de tamanho de gota, produzindo uma percentagem maior de gotas fora da faixa desejada.

Outra alternativa seria a implementação de um sistema usando misturadores estáticos de tamanho médio (12,7 mm) colocados em paralelo. Com um sistema com 10 misturadores estáticos, produtividades alcançando 100 L/h são concebíveis. Para o exemplo industrial de 2000-hL, o processo operaria continuamente por 800 horas ou aproximadamente 34 dias para produzir o volume requerido de gotas. Vários sistemas podem ser implementados para reduzir o tempo de produção, mas isto adicionaria ainda outro nível de complexidade. O tempo de produção podia tornar-se menos de uma emissão se fosse possível armazenar as gotas por períodos estendidos de tempo, enquanto retém a viabilidade da levedura. É concebível que um processo para secagem das gotas ou armazenagem das gotas em um recipiente vedado com vácuo pode ser desenvolvido.

Poncelet e co-operadores (1993) publicaram trabalhos indicando que o tipo de misturador estático usado para criar a dispersão deve ser considerado. Com seu sistema proposto usando outro tipo de misturador estático, conforme oposto ao tipo Kenics usado nesta pesquisa, pode ser possível utilizar-se um misturador de diâmetro maior sem comprometer a distribuição de tamanho das gotas (mantendo-se um coeficiente baixo de variação).

Considerações adicionais com o processo piloto existente incluem o sistema a 40 °C e o uso de óleo vegetal e

soluções de cloreto de potássio para produção de gota. Devido a alta temperatura de produção, ambos sistemas de aquecimento e arrefecimento são requeridos no processo. O choque térmico potencial que as células de levedura são expostas requer
5 investigação adicional de modo que um asseso pode ser feito como para implicações negativas potenciais. Neste estudo, gotas de célula imobilizada com altas viabilidades de levedura (acima de 90%) foram produzidas, mas quaisquer outros efeitos que o processo pode ter causado na população de levedura não foram
10 investigados.

Devido ao óleo ser usado para produzir a emulsão desejada e, conseqüentemente, a formação das gotas, e desde que o óleo agirá como um tenso-ativo, suprimido, desse modo, a formação de espuma, o resíduo de óleo na superfície da
15 gota é uma emissão. Embora este resíduo ajudaria durante o estágio de fermentação, qualquer transporte na cerveja final seria prejudicial, visto que espuma é desejável nos produtos acabados. Os grandes volumes de solução de cloreto de potássio utilizada para separar a fase sólida (gotas) do óleo, e o método de remover
20 esta solução salina a partir da pasta fluida de gota no bioreator requer atenção. De outro modo, pode ser necessário inundar esta solução a partir do reator seguindo a adição de gotas ao reator.

Desde que as gotas de célula imobilizada são produzidas fora do bioreator, técnicas assépticas devem ser
25 utilizadas através de todo processo de formação de gota, e esterilidade mantida até que as gotas sejam introduzidas no

bioreator. Os vários pontos de interferência entre tanques proporcionam a oportunidade de contaminação, e devem ser monitorados devido ao fato que a presença de um contaminante podia resultar em sua co-imobilização dentro da gota. Como um
5 resultado de diligência dentro do laboratório, foi possível produzir consistentemente gotas assépticas. Contudo, o ambiente dentro do assentamento de uma planta pode não ser como hospitaleira conforme o laboratório, requerendo, portanto, controle muito estrito.

10 6.2.2 Células de Levedura Flocosas

Uma das formas mais naturais de imobilização é a auto-agregação de microorganismo em flocos de células. Calleja e Johnson (1977) propuseram três razões possíveis para as células entrarem em contato com outra para formarem agregados, com
15 todas as propriedades de ligação distintivas. A primeira envolve células de sexos diferentes sendo atraídas à cada outra pela liberação de feromônios (α e fatores a). Este tipo de ligação é temporária e envolve ligação de proteína-proteína entre α e a-aglutininas ancoradas nas paredes de célula complementares.

20 Células podem também serem agregadas através de sua falha em separar da célula mãe durante o processo de enxertamento. Esta falha pode ser inerente à linhagem de levedura particular, ou pode ser causada por privação de nutriente ou mutação de um número de genes. Este fenômeno é referido como
25 formação de cadeia e não floculação. As ligações entre estas

células podem ser irreversivelmente destruídas por cisalhamento mecânico (Stratford, 1996).

O terceiro cenário é mais comumente conhecido como floculação. Stewart e Russell (1981) definiram floculação como um “fenômeno reversível no qual as células de levedura aderem em grupos e seu sedimento rapidamente a partir do meio no qual elas são suspensas ou elevadas para a superfície do meio”. Evidência extensiva indica que a floculação é geneticamente controlada, e o mecanismo de floculação assenta nas moléculas selecionadas que agem como pontes entre paredes de célula adjacentes. Mais especificamente, é ensinado que lectinas específicas são ligadas a α -mannans das células de união na presença de íons Ca^{2+} (Calleja e Johnson, 1977). Esta ligação de proteína/carboidrato foi encontrada para ser irreversivelmente inibida por agentes quelantes, ou por açúcares específicos.

A FIG. 12 representa três configurações de célula de levedura possíveis, a saber, levedura não-flocosa, levedura de formação de cadeia e levedura flocosa. No caso da levedura de formação de cadeia, embora as células tenham se agregado, não é considerada como um tipo de floculação, visto que estas células nunca foram simples para iniciar, e floculação implica em células simples vindo juntas para formarem uma massa por causa de condições ambientais favoráveis (íons Ca^{2+} e níveis baixos de açúcares de inibição). No caso de células flocosas, o tamanho específico do floco pode ser dependente das

genéticas da célula, bem como das condições hidrodinâmicas dos íons aos quais a célula é exposta (ambiente de cisalhamento).

As FIG. 13 e FIG. 14 revelam duas linhagens de levedura lager Labatt com graus variantes de floculação. A
5 linhagem de levedura flocosa média LCC3021 é apresentada na FIG. 13. Na presença de íons cálcio, esta linhagem formará agregados de 0.5 mm a 1.0 mm, uma vez que a glicose tenha sido desdobrada a partir do meio líquido. A FIG. 14 é um gráfico da
10 linhagem de levedura super-flocosa LCC290 que formará flocos maiores do que 1 mm de tamanho, e sob ambiente de cisalhamento baixo agregará grupos medindo até 5 mm de diâmetro. Sob condições moderadamente agitadas, o diâmetro do floco de LCC290 estará entre 1 e 2 mm.

Vários métodos de medição foram propostos
15 para o asseso de floculação de levedura (Speers & Ritcey, 1995; Akiyama-Jibiki e outros., 1997; Teixeira e outros, 1991; Stewart & Russell, 2000). Em “Brewer’s Yeast” (Stewart & Russell, 2000), foi proposto que os métodos de floculação de levedura podem ser sub-divididos em três categorias, a saber, métodos de
20 sedimentação, métodos de fermentação estática, e observação direta de formação de floco no meio de crescimento.

O método de sedimentação primeiro descrito por Burns em 1937 foi modificado por Helm e colegas em 1953, e é atualmente parte dos métodos padrões de análise reconhecidos
25 pelo Comitê Técnico da Sociedade Americana de Química de Fabrico de Bebida Fermentada (1992). Esta técnica é referida

como uma técnica *in vitro* a medida que as características de assentamento da levedura são assessadas em um tampão de sulfato de cálcio, e não no meio de fermentação atual. O método de fermentação estática (também conhecido como o método de Gilliland) envolve crescimento da levedura em mosto, e medindo-se suas características de floculação *in vivo*. Ambos estes métodos envolvem meios de absorvância de amostras de leveduras assentadas versus amostras de leveduras que foram desfloculadas usando-se um espectrofotômetro de UV/Visível.

Stewart e Russell (2000) apresentaram um método de medição para floculação de levedura pela descrição visual do nível de floculação que ocorre em amostras de crescimento de levedura em garrafas de vidro com tampa roscada de 20 mL. Para expressar o grau de floculação, eles usaram uma medição subjetiva, por exemplo: 5 – extremamente flocosa, 4 – muito flocosa; 3- moderadamente flocosa, 2- fracamente flocosa, 1 – dissonante e 0 – não-flocosa. A linhagem de levedura super-flocosa, LCC290, recebeu uma classificação de 4 – muito flocosa, pelo que a linhagem de levedura LCC3021 foi classificada como 3 – moderadamente flocosa.

A floculência é uma característica importante na indústria de fabrico de bebida fermentada, visto que a tendência natural da levedura a ou sedimentar-se ou elevar-se para a superfície é comumente usada como um método de separação para esta levedura a partir do líquido de fermentação. Contudo, uma linhagem de levedura que se flocula antes da fermentação ter

completado é indesejável, visto que o líquido não terá alcançado seu nível de álcool e açúcar residual ideal. Na fermentação contínua e em particular, fermentação contínua de tudo de arraste de ar de elevação de gás, a levedura flocosa age como a matriz de
5 imobilização. Sua tendência em assentar é compensada pela injeção de gás de espargimento, que a mantém em suspensão. Com tal sistema, o receio de super-fermentação do meio líquido é eliminado, visto que as partículas sólidas são continuamente circuladas e mantidas em contato íntimo com o líquido de
10 fermentação.

Na seção 6.2.2.1, as propriedades de assentamento e a performance de fermentação da levedura super-flocosa, LCC290, foram caracterizadas. O interesse estava na identificação do começo da floculação para esta linhagem de
15 levedura particular. Em adição, a velocidade de assentamento da levedura foi determinada de modo a proporcionar informação valiosa que podia ser usada no futuro no desenho de vasos de assentamento de levedura.

6.2.2.1 Caracterização de Levedura Super- 20 Flocosa LCC290

Antes de se realizar fermentações contínuas com a levedura super-flocosa LCC290 dentro do bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás, foi decidido caracterizar-se a levedura em fermentações de frasco batidos em escala de
25 laboratório. A Figura 6.28 mostra a evolução da população de levedura com o tempo. Conforme esperado, a concentração

aumentou agudamente nas primeiras 48 horas, em seguida nivelada com uma leve diminuição no final da fermentação. Nas primeiras 48 horas, existiram nutrientes o bastante e oxigênio presente no mosto para permitir crescimento da levedura.

5 Contudo, como a levedura continua a consumir carboidratos na ausência de oxigênio, ela não se reproduzirá, mas preferivelmente entrará em sua fase fermentativa anaeróbica. Uma vez que o suprimento de carboidrato tenha terminado, uma pequena população de levedura começa a morrer. Este fenômeno é

10 representado na Figura 6.29, onde a viabilidade da célula diminui de aproximadamente 97 % para imediatamente acima de 90 %.

A Figura 6.30 mostra o consumo de carboidratos com o curso de fermentação. As células de levedura primeiro consomem os açúcares simples glucose e fructose, em

15 seguida seqüencialmente a maltose e maltriose. A levedura de fabrico de bebida fermentada não pode metabolizar ou maltotetrose ou os polissacarídeos de cadeias mais longas (poli 1 & 2). Como a concentração de carboidrato total diminui (representada pela curva de gravidade específica na Figura 6.31),

20 a concentração de etanol aumenta proporcionalmente. Em aproximadamente 37 horas na fermentação, as concentrações de etanol e carboidrato foram iguais.

De uma perspectiva de crescimento e metabolismo de carboidrato, parece que a levedura super-flocosa

25 se comportou como a linhagem de levedura industrial LCC3021. A fermentação pareceu alcançar completação quando a gravidade

específica do líquido alcançou aproximadamente 2.7 °P. É comum as linhagens de levedura flocosa formarem grupos maiores (flocos), e assentarem fora da solução antes do término da fermentação; este fenômeno é conhecido na indústria de fabrico
5 de bebida fermentada como uma fermentação “suspensa”. Em nossos ensaios de dosagem, nós fomos capazes de terminar a fermentação porque os frascos foram agitados mantendo, portanto, a levedura em suspensão e em contato íntimo com o suplemento de nutriente.

10 Outra característica importante que foi investigada foi a capacidade da levedura de flocular. Em particular, nós estamos interessados em estabelecer a velocidade com a qual a levedura assentaria, bem como obter uma indicação de quando esta linhagem de levedura particular começaria a
15 floculação. Ambas estas características são de importância para os ensaios de fermentação contínuos a medida que eles desempenham um papel na manutenção de uma população de levedura saudável dentro do fermentador de elevação de gás. A Figura 6.32 mostra curvas de assentamento de levedura sobre o
20 curso de fermentação. Muito pouco assentamento ocorreu na amostra testada em 24 horas na fermentação. A floculação é inibida pela presença de certos açúcares; glucose é um inibidor conhecido, conseqüentemente a floculação começará somente uma vez que este inibidor tenha sido desdoblado. Na amostra em
25 fermentação de dosagem de 40 horas, as células começam a flocular e assentar fora de solução quando testada usando-se o

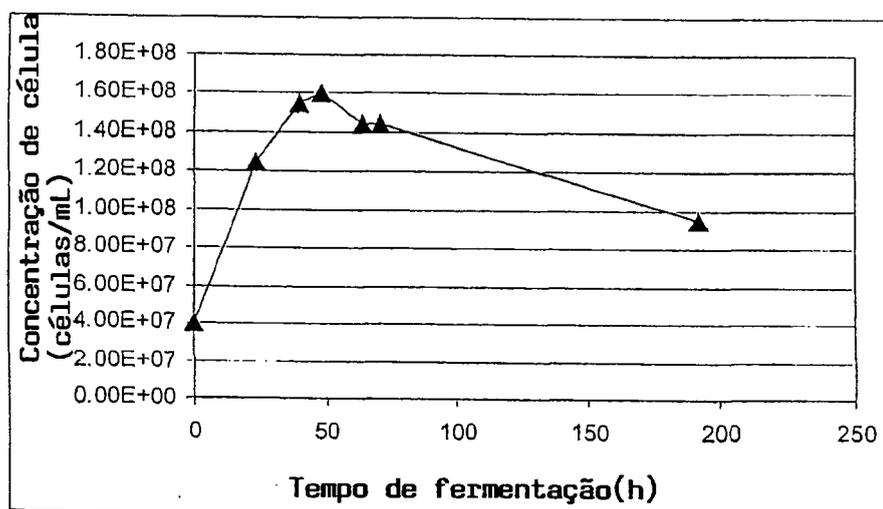
método descrito na seção 4.7. O assentamento foi muito rápido para todos os intervalos testados, exceto em 24 horas quando nenhum assentamento ocorreu. Durante o ensaio de assentamento mais lento, conduzido em 40 horas, a levedura levou 90 segundos para assentar completamente fora do aparelho de teste. Em 71 horas, menos do que 50 segundos foram requeridos para assentamento.

Os pesquisadores têm proposto que a taxa de assentamento é uma função da concentração de sólidos (Coe e Clevenger, 1916). A Figura 6.33 plota a velocidade de assentamento dos sólidos em uma dada concentração de célula de levedura. Os pontos de dados para esta curva foram gerados usando-se o método proposto por Kynch (1952) nos dados de assentamento coletados em cada intervalo de fermentação. Os resultados assentam em aproximadamente a mesma curva, confirmando o mesmo fenômeno que Coe e Clevenger (1916) tinham observado.

Os resultados coletados durante o teste de assentamento indicaram que a linhagem de levedura super-flocosa LCC290 floculará em gravidades específicas de líquido de 6 °P e inferior. Este valor pode ser usado como um guia para fermentações contínuas para indicar se a gravidade específica de líquido de pseudo estado constante deve ser mantida se é desejado manter as células floculadas. Operando-se o reator acima de 6 °P, correria-se o risco de desestabilizar as células floculadas e, possivelmente, conduziria a lavagem da população de levedura

imobilizada. As características de assentamento da levedura super-flocosa indicam que a população de levedura assentaria muito rapidamente se estagnante é deixado. Com um bioreator de tubo de arraste de ar de elevação de gás de três fases, será possível manter-se estas células em circulação; contudo, no caso de uma falha no sistema de suprimento de gás, a população de célula assentaria rapidamente e, possivelmente, necessitaria de gás de aspergimento auxiliar para re-suspender os sólidos. Para o processamento de pós-fermentação, esta característica de assentamento rápido é vantajosa a medida que dispositivos de separação de sólidos, tais como assentadores de gravidade, podem ser usados para remoção de sólidos densos. Na indústria de fabrico de bebida fermentada, isto diminuiria a carga de sólidos no equipamento de centrifugação e, portanto, permitiria tempos de curso mais longos entre as descargas de caçamba centrífuga. Menos perdas de cerveja seriam esperadas e o nível de aromas concedido à cerveja pela centrífuga (embora mínimo) seria minimizado por causa dos níveis inferiores de biomassa de levedura que passam através da centrífuga.

20



25

FIGURA 6.28 CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA DE LEVEDURA TOTAL DE FERMENTAÇÕES DE DOSAGEM AGITADA DE LCC290 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO. A TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO FOI MANTIDA A 15 °C.

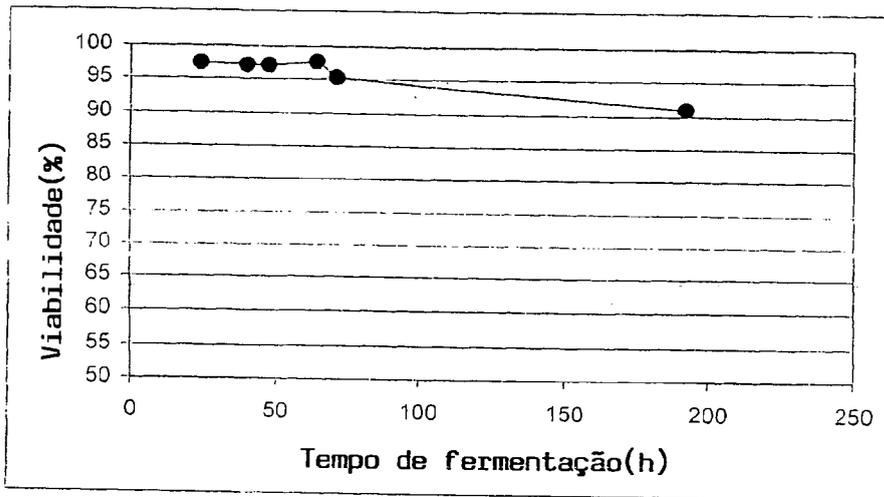


FIGURA 6.29 VIABILIDADE DE CÉLULA DE LEVEDURA CONFORME MEDIDA POR AZUL DE METILENO VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

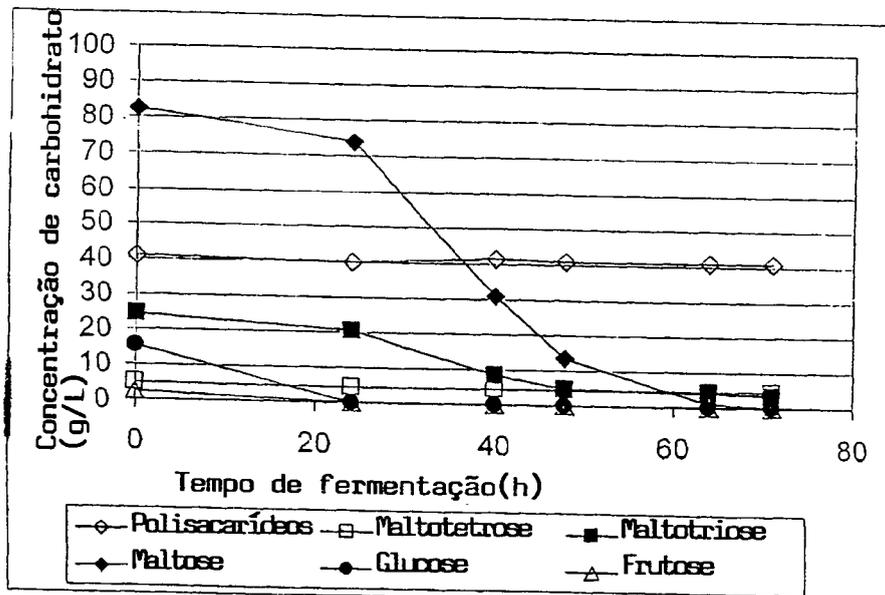
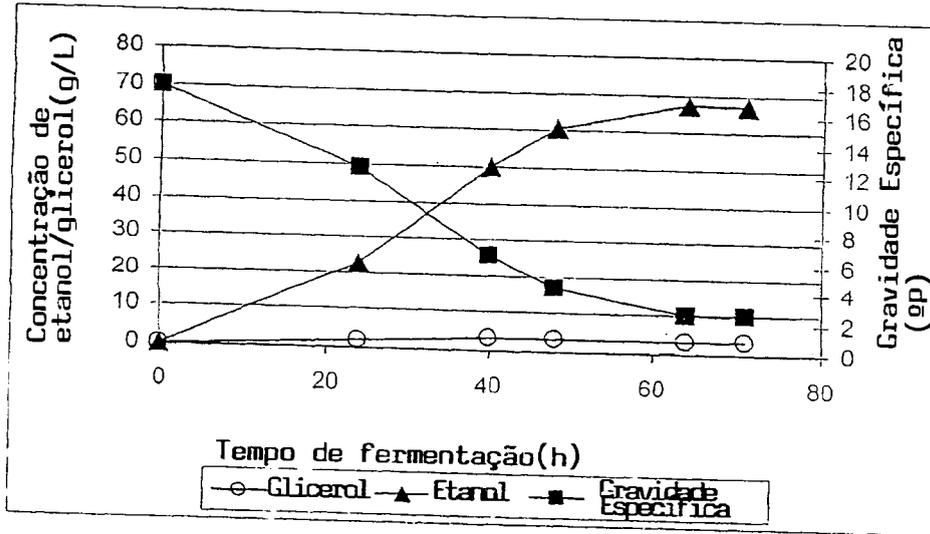


FIGURA 6.30 PERFIS DE CONCENTRAÇÃO DE CARBOHIDRATO VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÕES DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC290.

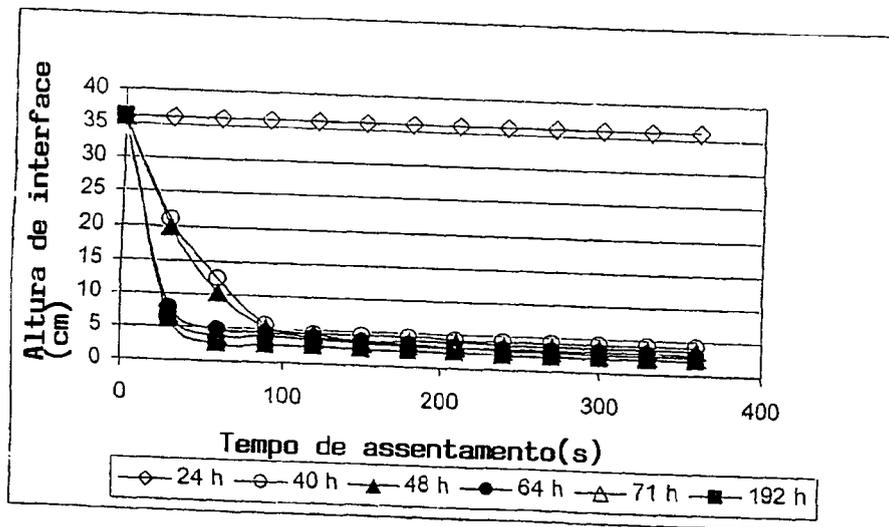
5



10

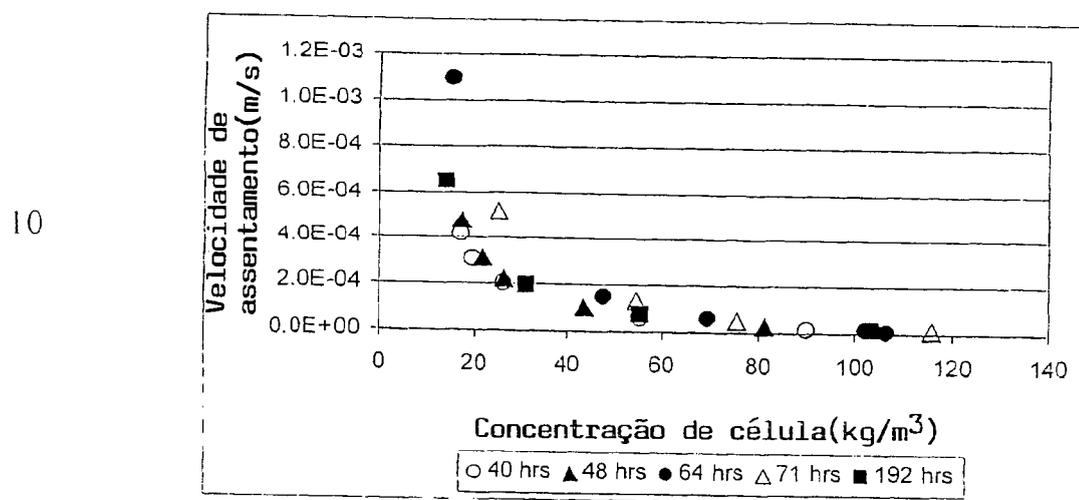
FIGURA 6.31 CONCENTRAÇÕES DE ETANOL E GLICEROL E GRAVIDADE ESPECÍFICA DE LÍQUIDOS VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA FERMENTAÇÕES DE DOSAGEM DE LEVEDURA LCC290.

20



25

FIGURA 6.32 ALTURA DE INTERFACE DE UMA SUSPENSÃO DE LEVEDURA VERSUS TEMPO DE ASSENTAMENTO. OS VALORES PARA ESTE GRÁFICO FORAM COLETADOS EM VÁRIOS INTERVALOS DE FERMENTAÇÃO.



15

FIGURA 6.33 VELOCIDADE DE ASSENTAMENTO DE UMA SUSPENSÃO DE LEVEDURA VERSUS CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA. OS VALORES PARA ESTE GRÁFICO FORAM COLETADOS EM VÁRIOS INTERVALOS DE FERMENTAÇÃO.

6.3 ASSESSO DE TECNOLOGIA DE ELEVAÇÃO DE GÁS PARA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE CERVEJA

25 O primeiro e mais importante objetivo desta tese foi avaliar a segurança de operação do bioreator de elevação de gás em escala piloto de 50-L no modo contínuo usando gotas de

gel de k-carrageenan para prender células de *Saccharomyces carlsbergensis* (descrito na seção 6.2.1). Em adição, foi nosso desejo investigar se uma cerveja Norte Americana tipo lager de qualidade de aroma aceitável podia ser produzida com tal sistema.

- 5 Nós também tentamos determinar o tempo de residência mínimo requerido para atenuação completa do mosto de alta gravidade (17.5 °P), bem como estabelecer uma faixa de operação para o oxigênio dentro do sistema de fermentação contínuo.

O tempo de residência mínimo onde todos os
10 açúcares de mosto foram consumidos foi 24 horas. Isto pode ser comparado com um tempo de fermentação de dosagem clássico de cinco a sete dias. A concentração de oxigênio dissolvido medida pela sonda de oxigênio Ingold no local dentro do bioreator estava próxima de zero, indiferente do oxigênio
15 adicionado ao gás de aspergimento (variado de 0 a 20% v/v). Isto indica que o oxigênio suprido no mosto foi ou consumido rapidamente pelas células de levedura, ou foi simplesmente ventilado no gás de saída. O nível de células livres no sobre-fluxo de cerveja foi na ordem de 10^8 células por mL de cerveja verde.
20 Os níveis das dicetonas vicinais, diacetil e 2,3-pentanodiona, bem como o nível de acetaldeído, diminuiu com a diminuição das proporções de oxigênio no gás de aspergimento (Figuras 6.34 e 6.35). Os ésteres medidos (etil acetato e isoamil acetato) e álcoois mais altos (propanol, isobutanol, isoamil álcool), não parecem
25 serem afetados pela mudança no suprimento de oxigênio (Figura 6.36).

A Figura 6.37 compara vários compostos de aroma ativo em duas cervejas testes acabadas produzidas com o sistema de célula imobilizada contínuo em uma cerveja de controle produzida industrialmente (fermentação de dosagem de célula livre). Algumas diferenças nos ésteres (etil acetato, isoamil acetato) e em álcoois mais altos (propanol), foram consistentemente observadas entre a cerveja continuamente fermentada e o controle, indiferente do nível de suprimento de oxigênio. O gosto da cerveja acabada produzida com 2% de oxigênio foi julgado por um painel de gosto treinado para ser relativamente próximo à cerveja de controle (produto industrial). A cerveja produzida com 20% de oxigênio, contudo, foi julgada inaceitável, com sinais de oxidação de aroma e um gosto de “papel” e “vinho”.

No estado pseudo-constante, o bioreator de escala piloto foi operado com um tempo de residência de 24 horas sobre um período de 6 semanas. A cerveja “verde” tinha um perfil de aroma aceitável, e nenhum defeito maior (traços de enxôfre) foi notado. A quantidade de oxigênio no gás de aspergimento comprovou ser um elemento crítico nesta experimentação. Cervejas produzidas com 2 a 5 % de oxigênio no gás de aspergimento deram os melhores perfis de sabor. Este ponto de controle crítico necessita de atenção adicional com o foco nas técnicas de medição de oxigênio mais precisas com medições realizadas em um conjunto maior de analistas de pré-fermentação e pós-fermentação.

Na fermentação primária de dosagem tradicional, o mosto é dosado com oxigênio antes de ser transferido no fermentador. Após inoculação do meio, a concentração de oxigênio dissolvido diminui rapidamente a medida que as células de levedura o consome (primeiras 24 horas de fermentação se crescimento de levedura ocorre). O restante da fermentação é, portanto, efetuada sob condições muito anaeróbicas. O uso de um sistema homogêneo contínuo para fermentação primária não permite esta mudança de concentração de oxigênio com o tempo. Por esta razão, pode ser muito difícil alcançar uma equiparação de aroma completa para a cerveja produzida usando-se fermentações contínuas e de dosagem.

Indiferente destas diferenças, a configuração de bioreator testada neste asseso inicial produziu uma crveja com uma qualidade de aroma aceitável e perfil analítico. Pelo uso de um bioreator de elevação de gás com gotas de tamanho relativamente pequeno (~ 1 mm), foi possível aumentar a produtividade do bioreator volumétrico pela redução do tempo para fermentação primária por vários dias. O nível de biomassa liberado na cerveja existente mostrou que o nível de crescimento de levedura no bioreator de célula imobilizada foi equivalente àquele da fermentação de dosagem de célula livre sob condições similares. Estas observações confirmam a confiança de formação de aroma no nível de crescimento de levedura. Isto podia explicar a falha de tentativas anteriores de produzir cerveja aceitável com sistemas de célula imibilizada de crescimento restrito. O

suprimento de uma mistura de gás controlada pode ser uma ferramenta poderosa no ajuste fino de propriedades organolépticas da cerveja em fermentações de célula imobilizada contínua.

O alto nível de diacetil no líquido existente foi também observado por outros pesquisadores (Virkajarvi & Pohjala, 1999; Kronlof e outros., 2000). Nas cervejas Norte Americanas tipo lager, o nível alvo de diacetil é 30 mg/L, conforme comparado aos níveis de 400-800 mg/L no líquido de fermentação contínuo existente. O uso de tecnologia de envelhecimento tradicional (envelhecimento à frio a 2 °C por 14 dias) abaixou o diacetil para a faixa desejada, mas para o detrimento de produtividade de processo total. O uso da tecnologia de fermentação secundária rápida reportada no Capítulo 2 ajudaria a reduzir o diacetil sem abaixar significativamente a produtividade (2 horas de processo). Os custos adicionais, contudo, podem ser proibitivos, e todos os fabricantes de cerveja podem não querer submeter sua cerveja à altas temperaturas (80 °C a 90 °C).

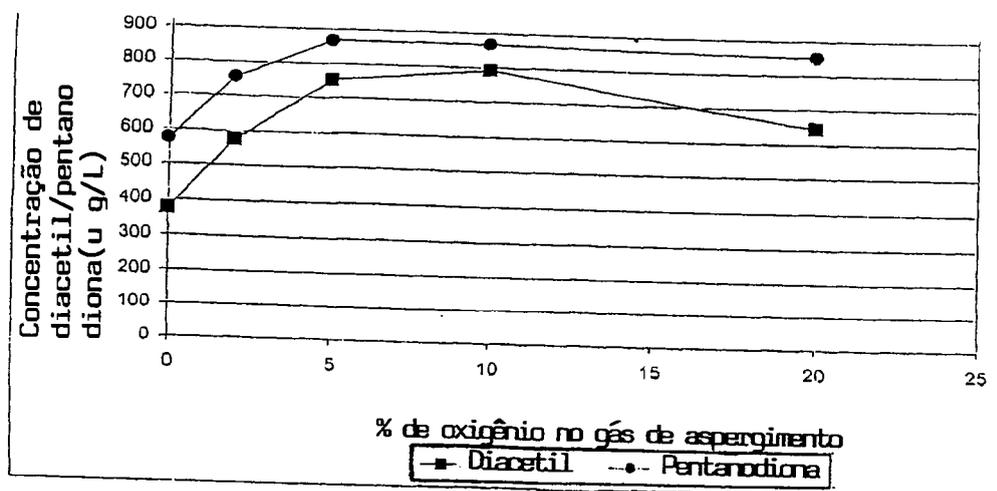


FIGURA 6.34 CONCENTRAÇÃO DE DICETONAS VICINAIS VERSUS PERCENTAGEM DE OXIGÊNIO NO GÁS DE ASPERGIMENTO. AS FERMENTAÇÕES FORAM EFETUADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50-L CARREGADO COM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN 40% (V/V). A TAXA DE GÁS DE ASPERGIMENTO TOTAL FOI MANTIDA CONSTANTE A 6.4 SCFH. O TEMPO DE RESIDÊNCIA FOI 24 HORAS.

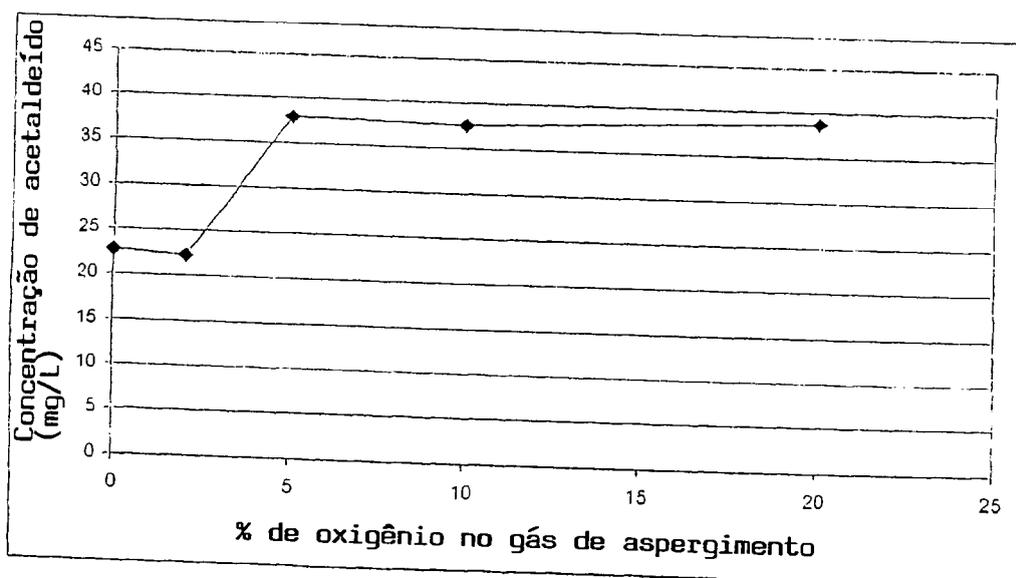
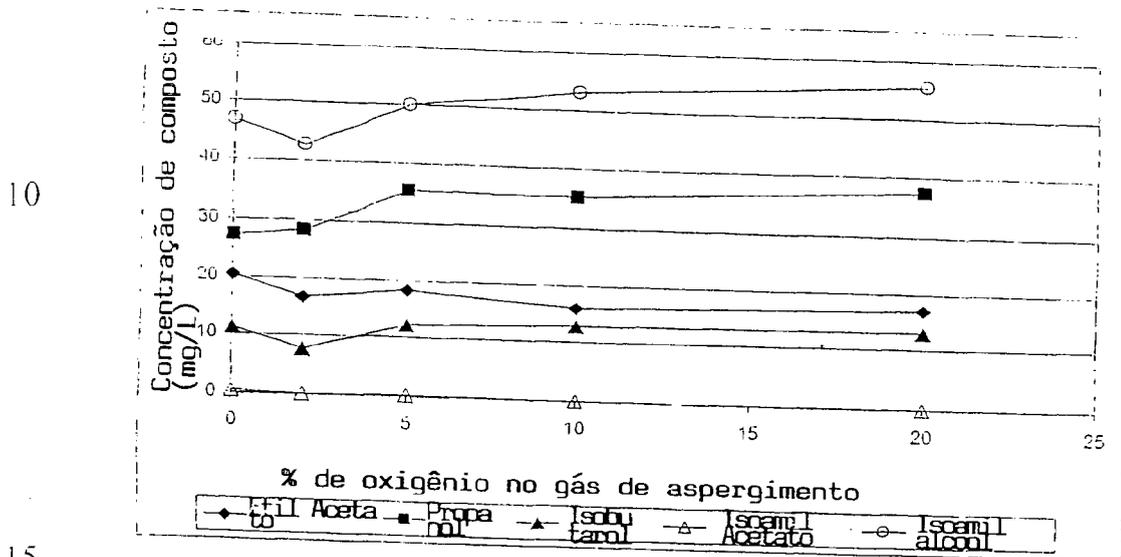


FIGURA 6.35. CONCENTRAÇÃO DE ACETALDEÍDO VERSUS PERCENTAGEM DE OXIGÊNIO NO GÁS DE ASPERGIMENTO. AS FERMENTAÇÕES FORAM EFETUADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50-L CARREGADO COM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN 40% (V/V). A TAXA TOTAL DE ASPERGIMENTO FOI MANTIDA

CONSTANTE EM 6.4 SCFH. O TEMPO DE RESIDÊNCIA FOI 24 HORAS.

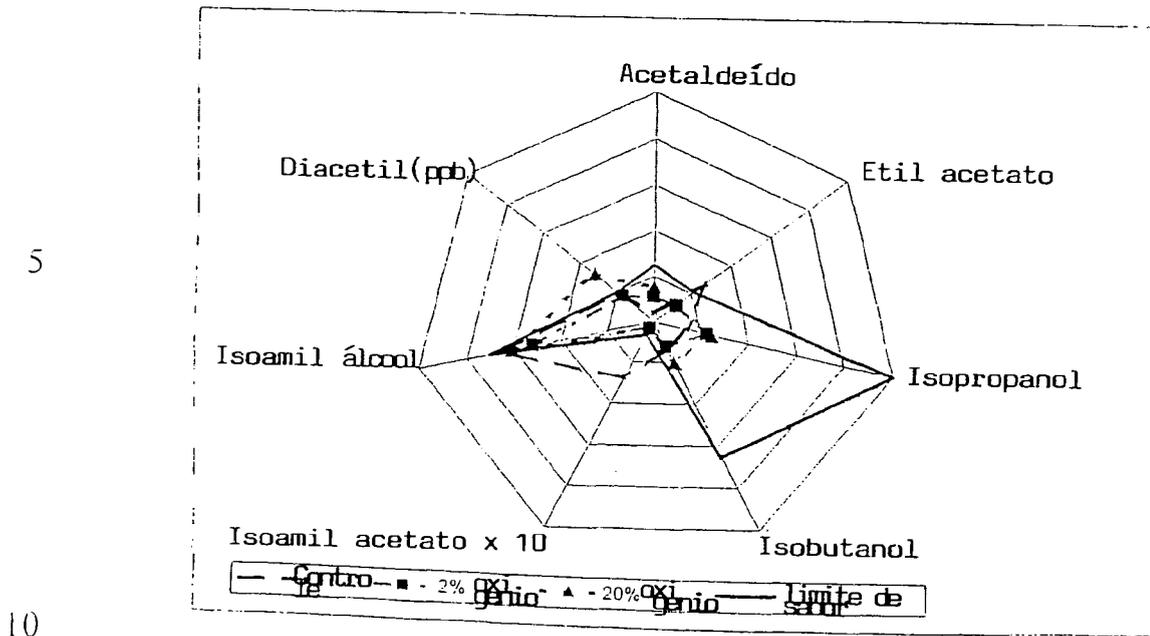
5



15

FIGURA 6.36. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÉSTERES E ALCOÓIS AMÍLICOS VERSUS PERCENTAGEM DE OXIGÊNIO NO GÁS DE ASPERGIMENTO. AS FERMENTAÇÕES FORAM EFETUADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50-L CARREGADO COM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN 40% (V/V). A TAXA TOTAL DE ASPERGIMENTO FOI MANTIDA CONSTANTE EM 6.4 SCFH. O TEMPO DE RESIDÊNCIA FOI 24 HORAS.

FIGURA 6.36. CONCENTRAÇÃO DE ÉSTERES E ÁLCOOIS AMÍLICOS VERSUS PERCENTAGEM DE OXIGÊNIO NO GÁS DE ASPERGIMENTO. AS FERMENTAÇÕES FORAM EFETUADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50-L CARREGADO COM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN 40% (V/V). A TAXA TOTAL DE ASPERGIMENTO FOI MANTIDA CONSTANTE EM 6.4 SCFH. O TEMPO DE RESIDÊNCIA FOI 24 HORAS.



15

20

FIGURA 6.37. COMPARAÇÃO DE PRODUTO ACABADO PRODUZIDO COM 2% DE OXIGÊNIO E 20 % DE OXIGÊNIO NO GÁS DE ASPERGIMENTO VERSUS A CERVEJA INDUSTRIALMENTE PRODUZIDA E LIMITES DE SABOR. PARA OS PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA, AS FERMENTAÇÕES FORAM EFETUADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50-L CARREGADO COM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN 40% (V/V). A TAXA TOTAL DE ASPERGIMENTO FOI MANTIDA CONSTANTE EM 6.4 SCFH. O TEMPO DE RESIDÊNCIA FOI 24 HORAS.

6.4 TAXAS DE MISTURA E CIRCULAÇÃO DE FERMENTAÇÕES DENTRO DE UM BIOREATOR DE TUBO DE ARRASTE DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE TRÊS FASES

Experimentos de mistura foram conduzidos usando-se o método de injeção de ácido esboçado na seção 4.8. Os objetivos desta fase de experimentação foram dois. Nós queremos primeiro avaliar se o sistema de elevação de gás foi bem misturado pelo cálculo da taxa de circulação de líquido e tempo de mistura resultante para um número de veículos de 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

imobilização em velocidades de fluidização superficial diferentes. A distribuição destes ensaios daquela reportada na literatura foi que a experimentação total foi conduzida no meio de fermentação atual com células de levedura ativas preferivelmente do que nas soluções modelos (sistemas de água-sólido-gás). Estes experimentos de mistura foram também gerados em direção ao cálculo das velocidades de líquido superficial, que podia ser usado para a escala futura do sistema piloto.

6.4.1 Calibração da Sonda

A sonda de pH utilizada nos estudos de mistura foi calibrada usando-se o método descrito na seção 4.8. O sinal de 4-20 mA emitido a partir da sonda de pH foi passado através de um resistor de 250 Ohm, e transformado em um sinal de 1 - 5 Volts, que podia ser registrado pelo cartão de aquisição de dados (DAC). A sonda de pH foi imersa sequencialmente em uma série de tampões conforme se segue: pH de tampão 4.6, pH de tampão 4.0, pH de tampão 5.0, pH de tampão 6.0, e finalmente no pH de

tampão 7.0 (Padrões certificados de Beckman, Cole Parmer). A Figura 6.38 apresenta os dados coletados pelo sistema de aquisição para a resposta da sonda de pH Ingold para as soluções de pH padrão 5. A Figura 6.39 é a curva de calibração de sonda de pH plotando o valor do pH atual versus a voltagem de sinal medida. A curva de calibração melhor ajustada para este sistema (coeficiente de correlação de 0.9996) foi definida pela seguinte equação:

$$\text{pH} = 3.68 * \text{Voltagem} - 3.53$$

10 (6.1)

Os dados de mistura coltados foram transformados usando-se a equação 6.1 para refletir os valores de pH atuais conforme medidos dentro do bioreator de elevação de gás.

15 O tempo de resposta da sonda de pH para uma mudança no pH foi também medido. As Figuras 6.40 a 6.43 representam a resposta típica da sonda de pH para quatro etapas de mudança diferentes no pH, a saber, 0.6, 1.2, 2.3 e 3.4 unidades. Os dados originais foram assentados em uma função de pulso usando-se as capacidades de composição dos dados de plotagem da Curva de Tabela 2D (Jandel Scientific) e software de análise. Os ajustes da curva resultante tinham coeficientes de correlação maiores do que 0.994. A partir destas curvas, o tempo para a sonda responder a 98 % da mudança de etapa (tempo de resposta) 20 foi calculado e, em seguida, plotado versus a mudança de etapa de pH (Figura 6.44). O tempo de resposta declinado com a mudança 25

de etapa de pH nas faixas testadas. Para a mudança de etapa menor de 0.6, o tempo de resposta da sonda de pH foi ~ 6,4 segundos. O tempo de resposta diminuiu para cerca de 4.2 segundos para uma mudança de etapa de pH de 3.4.

5 Este tipo de caracterização de sonda é importante, especialmente quando o sistema está sendo usado para a avaliação do tempo de mistura e taxa de circulação. A sonda deve ter um baixo tempo de resposta para ela refletir mudanças no meio que está medindo. Em particular, o tempo de
10 resposta da sonda de pH deve ser mais baixo do que a taxa de circulação dentro do reator se ele é para ser precisamente usado em tal arranjo. Uma resposta quase instantânea não é, contudo, necessária, visto que um leve retardo na resposta simplesmente será refletido nas medições de taxa de circulação consecutivas e,
15 portanto, anuladas.

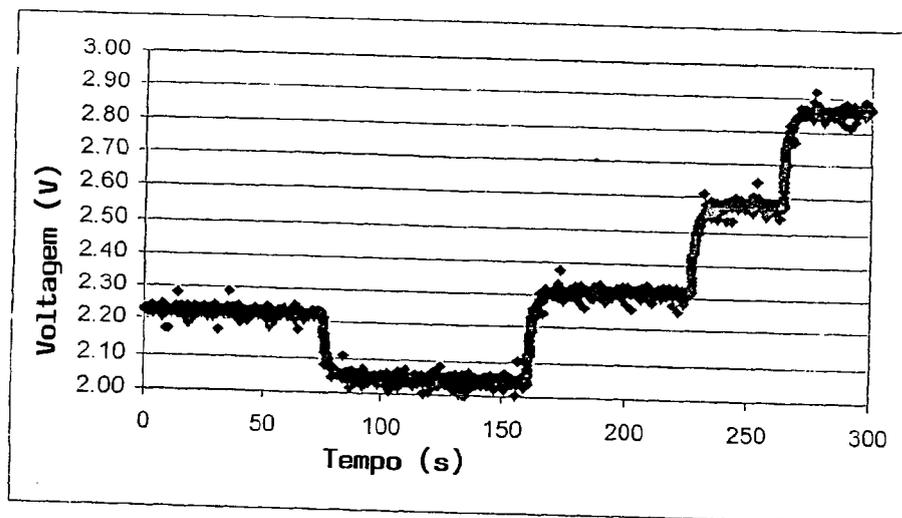


FIGURA 6.38 DADOS ORIGINAIS ADQUIRIDOS PELO SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS PARA A RESPOSTA DA SONDA DE PH INGOLD PARA VÁRIAS SOLUÇÕES TAMPÃO VERSUS TEMPO. A FREQUÊNCIA DE AQUISIÇÃO FOI 50 HZ PARA UM TOTAL DE 15000 PONTOS.

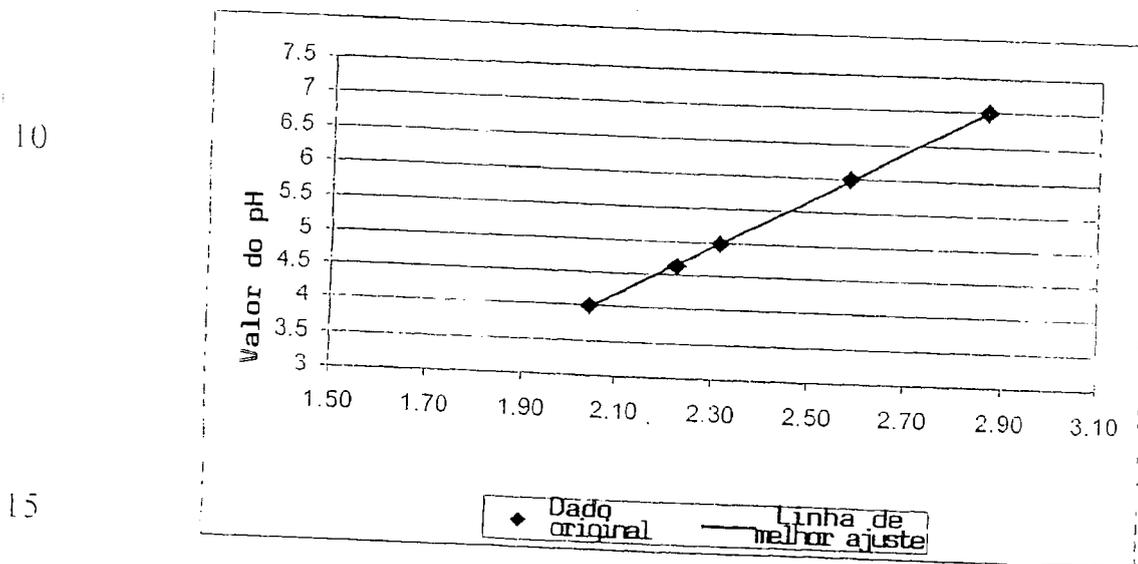
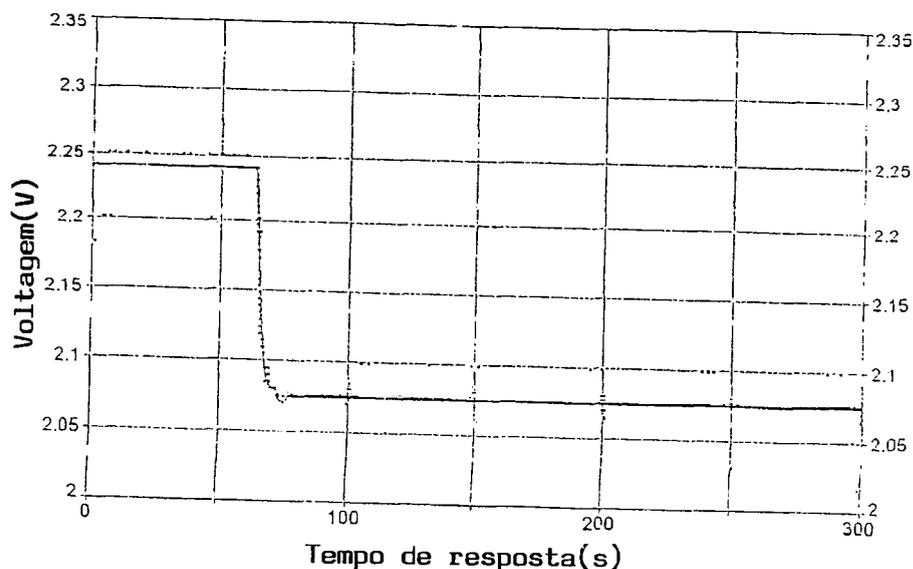


FIGURA 6.39 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SONDA DE PH COM PLOTAGEM DE PH VERSUS VOLTAGEM MEDIDA (V). A LINHA DE MELHOR AJUSTE OU LINHA DE CALIBRAÇÃO TEM A SEGUINTE EQUAÇÃO: $\text{PH} = 3.68 * \text{VONTAGEM} - 3.53$ COM UM COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE 0.9996. (N=2500)

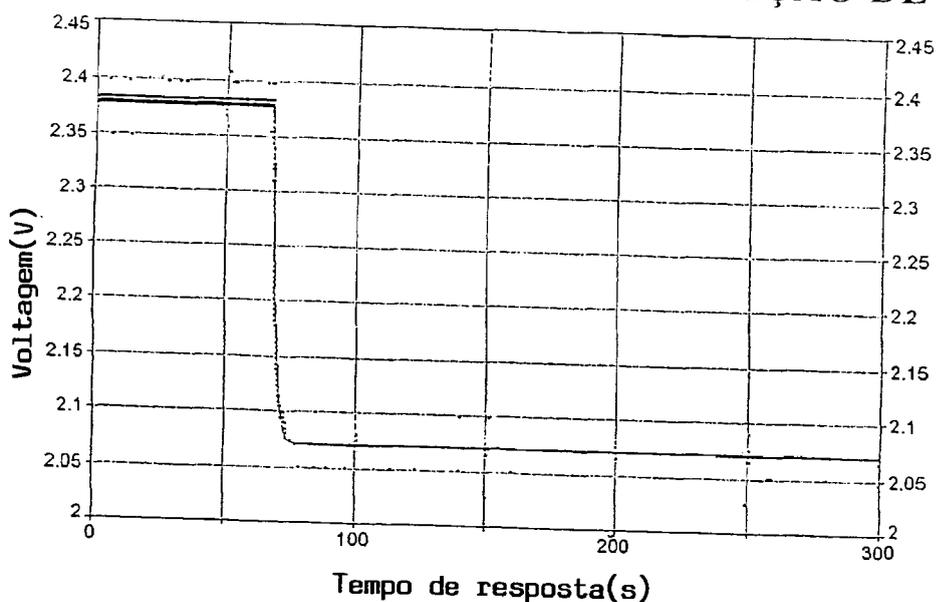


10

FIGURA 6.40 DADOS TÍPICOS DE TEMPO DE RESPOSTA DE SONDA DE PH PARA UMA MUDANÇA DE ETAPA DE PH DE ~ 0.6 . A RESPOSTA FOI AJUSTADA USANDO-SE O SOFTWARE DE CURVA DE TABELA. A FUNÇÃO DE PULSO MELHOR AJUSTADA

15

TINHA UM COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE 0.995.

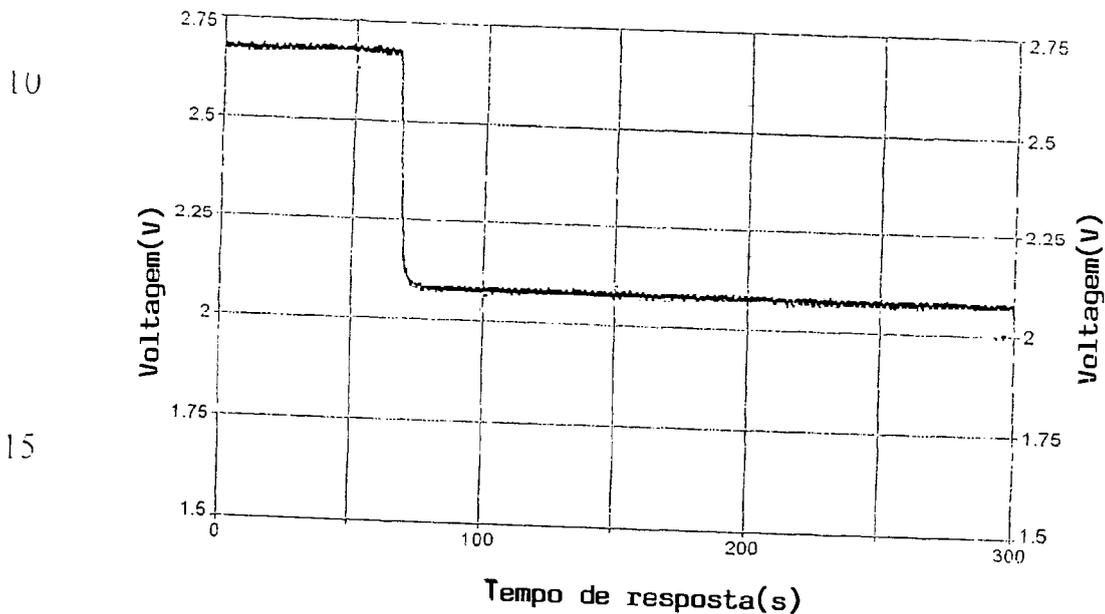


25

FIGURA 6.41 DADOS TÍPICOS DE TEMPO DE RESPOSTA DE SONDA DE PH PARA UMA

MUDANÇA DE ETAPA DE PH DE ~ 1.2 . A RESPOSTA FOI AJUSTADA USANDO-SE O SOFTWARE DE CURVA DE TABELA. A FUNÇÃO DE PULSO MELHOR AJUSTADA TINHA UM COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE 0.999.

5



10

15

20

FIGURA 6.42 DADOS TÍPICOS DE TEMPO DE RESPOSTA DE SONDA DE PH PARA UMA MUDANÇA DE ETAPA DE PH DE ~ 2.3 . A RESPOSTA FOI AJUSTADA USANDO-SE SOFTWARE DE CURVA DE TABELA. A FUNÇÃO DE PULSO MELHOR AJUSTADA TINHA UM COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE 0.999.

25

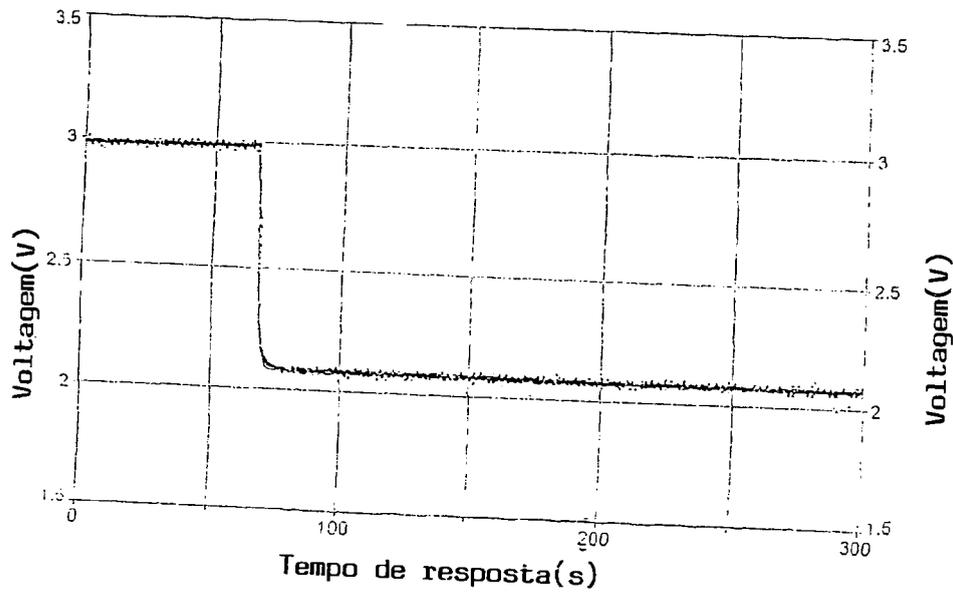


FIGURA 6.43 DADOS TÍPICOS DE TEMPO DE RESPOSTA DE SONDA DE pH PARA UMA MUDANÇA DE ETAPA DE pH DE $\sim 3,4$. A RESPOSTA FOI AJUSTADA USANDO-SE SOFTWARE DE CURVA DE TABELA. A FUNÇÃO DE PULSO MELHOR AJUSTADA TINHA UM COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE 0.999.

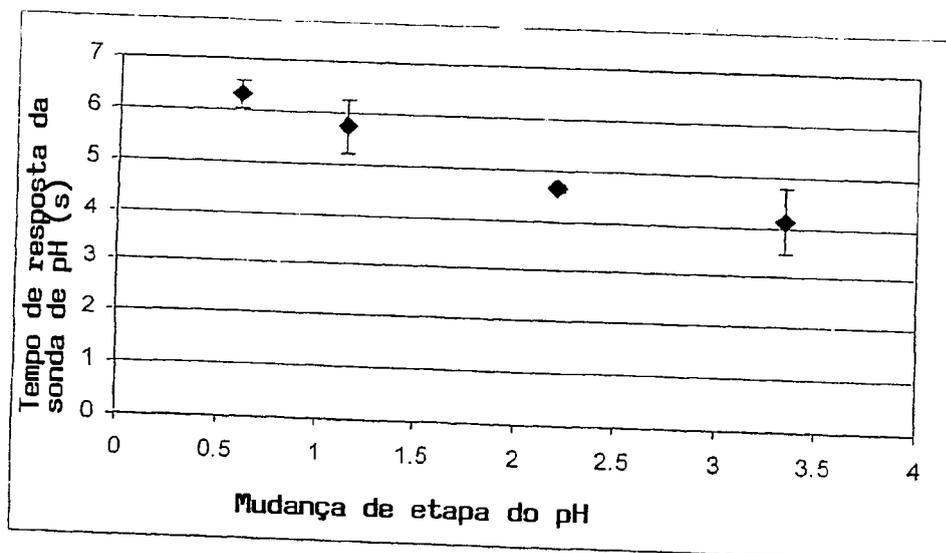


FIGURA 6.44 TEMPO DE RESPOSTA DE SONDA DE pH INGOLD PARA UMA MUDANÇA DE ETAPA (N = 3). AS SONDAS FORAM IMERSAS NO TAMPÃO DE pH MAIS ALTO, EM SEGUIDA IMEDIATAMENTE SUBMETIDAS AO TAMPÃO DE pH MAIS BAIXO DE 4.0. A LINHA DE MEHOR AJUSTE PARA CADA CURVA DE RESPOSTA FOI UTILIZADA PARA CALCULAR O TEMPO NECESSÁRIO PARA A SONDA ALCANÇAR 98% DA MUDANÇA DE ETAPA.

6.4.2 Tempo de Mistura e Taxas de Circulação

Experimentos de tempo de mistura e taxa de circulação foram realizados em três tipos de fermentações de célula imobilizada. A experimentação foi efetuada dentro do bioreator de tubo de tiragem de ar de escala piloto de 50-L em uma solução de água modelo não contendo sólido e, em seguida, no caldo de fermentação com uma gravidade específica de 2.7 °P contendo ou gotas de gel de κ -carrageenan, levedura superflocosa LCC290, ou levedura flocosa média LCC3021. As Figuras 6.45 e 6.46 são representações de amostra dos dados de matéria coletados usando-se o sistema de sonda de pH após a injeção de um pulso ácido (método descrito na seção 4.8). A Figura 6.45 ilustra a resposta da sonda de pH a uma injeção de ácido em uma solução de água não contendo sólidos, enquanto a Figura 6.46 é a resposta a injeção de ácido em um caldo de fermentação contendo a levedura altamente flocosa LCC290. Os sinais foram ajustados para uma curva senoidal decadente e

coeficientes de correlação de 0.96 e 0.90, respectivamente, e foram calculados para as equações correspondentes. Os parâmetros de ajuste “b” e “c” nos gráficos correspondem aos valores “a” e “ τ ” descritos na equação senoidal decadente (3.1).

5 Estes valores numéricos foram usados nas equações 3.2 e 3.3 para calcular a taxa de circulação e o tempo de mistura para o dado sistema. O Apêndice B contém os dados de mistura remanescentes e ajustes de curva para todas as experimentações.

As Figuras 6.47 e 6.48 são gráficos de tempo de
10 mistura e taxa de circulação para uma injeção de ácido em uma solução de água não contendo sólidos. As Figuras 6.49 e 6.50 são os gráficos correspondentes para os experimentos de mistura usando-se levedura altamente flocosa LCC290, enquanto os resultados a partir dos testes de mistura de κ -carrageenan são
15 apresentados nas Figuras 6.51 e 6.52. Finalmente, o tempo de mistura e tempo de circulação da levedura flocosa média LCC3021 são mostrados nas Figuras 6.53 e 6.54. Indiferente do tipo de sólidos testado, ambos o tempo de mistura e a taxa de circulação diminuem com os aumentos correspondentes na
20 velocidade de gás superficial. O relacionamento entre a taxa de circulação e velocidade de líquido superficial segue a equação 3.11 proposta por Kennard e Janekah (1991) para todos os quatro sistemas testados. O tempo de mistura segue o relacionamento nas equações 3.11 para o sistema água/sem sólidos e o sistema de
25 gota de gel de κ -carrageenan. Ambos os sistemas com levedura flocosa como a matrix de imobilização não mostram uma forte

correlação ao modelo teórico de Kennard e Janekah. Os sistemas de LCC290 e LCC3021 têm tempos de mistura iniciais (até que a velocidade de gás superficial exceda 4 mm/s) menores do que prognosticados pelo modelo. A taxa de diminuição no tempo de
5 mistura, contudo, diminui em velocidades de gás superficial maiores do que 4 mm/s, enquanto o modelo abaixa os valores. A Tabela 6.1 proporciona as equações derivadas para tempo de circulação e tempo de mistura, conforme eles se relacionam a velocidade de gás superficial.

10 A Figura 6.55 ilustra o tempo de mistura versus o relacionamento da velocidade de gás superficial para todos os quatro sistemas. O cenário de água/sem sólidos demonstra o tempo mais alto para 98 % de mistura de um pulso de pH (~220 segundos em V_{sg} de 3 mm/s), e o sistema de LCC290 mostrou a
15 melhor capacidade de minimizar o efeito de um pulso de ácido no sistema (~110 segundos em V_{sg} de 3 mm/s). Os valores para a LCC3021 e o sistema de α -carrageenan estavam entre os sistemas de água/sem sólidos e o LCC290. Os sólidos no interior do bioreator de elevação de gás ajudam a dispersão de elementos de
20 fluido de fase líquida pela estimulação da formação de turbilhões e promoção de mistura co-axial. A levedura super-flocosa LCC290, embora no mesmo carregamento de sólidos (16 % peso/volume) como a levedura flocosa média LCC3021, permite
25 tempos de mistura mais rápidos em todas as velocidades de gás superficial testadas.

A Figura 6.56 representa o tempo de circulação versus velocidade de gás superficial para todos os sistemas testados. Em uma velocidade de gás superficial de 2 mm/s, o tempo de circulação variou entre 28 segundos e 35 segundos, com o sistema de água/sem sólidos tendo a taxa de circulação mais rápida, e o sistema de LCC290 revelou a taxa de circulação mais rápida. Em velocidades de gás mais altas, a diferença entre os quatro sistemas foi reduzida para aproximadamente 3 segundos. Em todas as velocidades testadas, contudo, o sistema de LCC290 demonstrou taxas de circulação levemente mais baixas, enquanto o sistema água/sem sólidos tem taxas de circulação mais rápida.

A Figura 6.57 ilustra o relacionamento entre a velocidade de gás superficial e a velocidade de líquido superficial. A Equação 3.7 proposta por Livingston e Zhang (1993) foi utilizada para calcular a velocidade de líquido superficial para uma dada taxa de circulação e tipo de sólido. A velocidade de líquido superficial aumenta com aumentos correspondentes na velocidade de gás superficial. Os sistemas de LCC3021 e de água/sem sólidos têm tendências similares, enquanto os sistemas de LCC290 e de k-carrageenan mostraram algumas similaridades. A equação modelo sugerida por Kennard e Jenekah foi ajustada às curvas de velocidade de líquido superficial versus velocidade de gás superficial na Figura 6.57. A Figura 6.58 plota a velocidade de líquido superficial calculada experimentalmente versus a velocidade de líquido superficial teoricamente calculada usando-se a equação 3.10. Todos os quatro sistemas se ajustam à equação

proposta conforme indicado pela função linear com inclinação de 1 e origem em $y = 0$. A Tabela 6.1 lista as correlações que foram derivadas para os sistemas que foram testados neste trabalho de pesquisa.

5

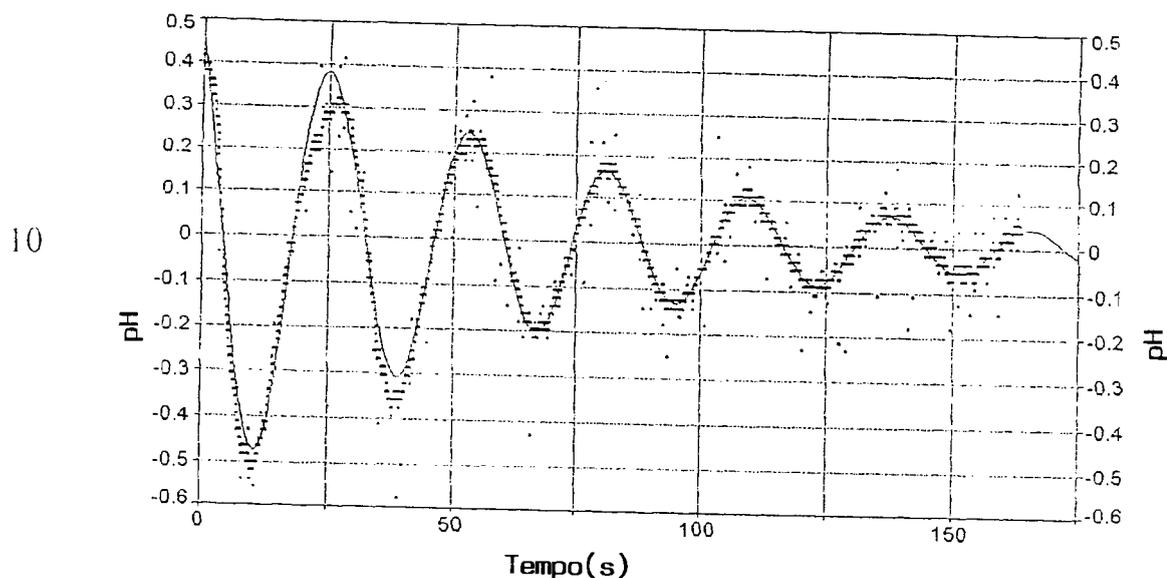
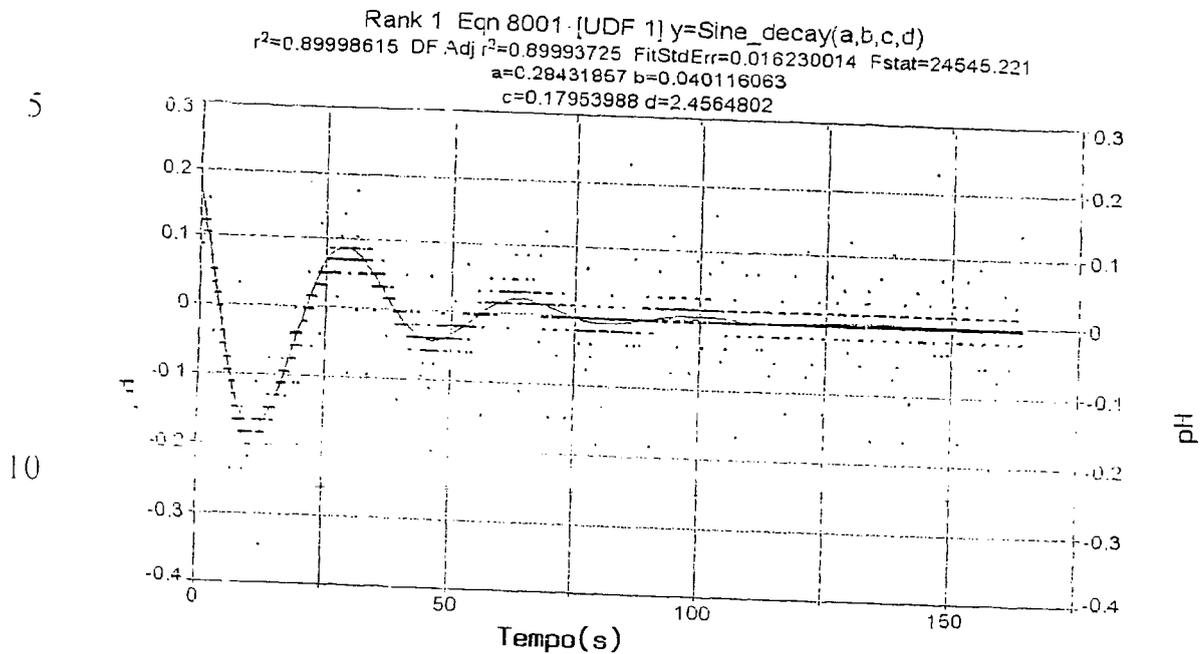


FIGURA 6.45 DADOS DE RESPOSTA DE SONDA DE PH DENTRO DE UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA NÃO CONTENDO SÓLIDOS. A VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL FOI AJUSTADA EM 1.94 MM/S. O DADO ORIGINAL FOI AJUSTADO PARA UMA CURVA SENOIDAL DECADENTE. O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO FOI 0.96.

20

25

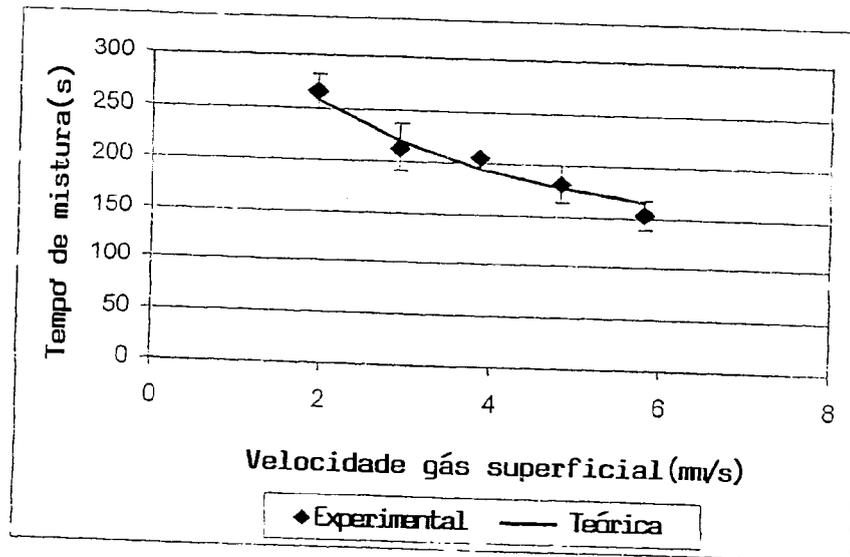


15

FIGURA 6.46 DADOS DE RESPOSTA DE SONDA DE pH DENTRO DE UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO LEVEDURA ALTAMENTE FLOCOSA LCC290. A VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL FOI AJUSTADA EM 1.94 MM/S. O DADO ORIGINAL FOI AJUSTADO PARA UMA CURVA SENOIDAL DECADENTE. O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO FOI 0.90.

25

5

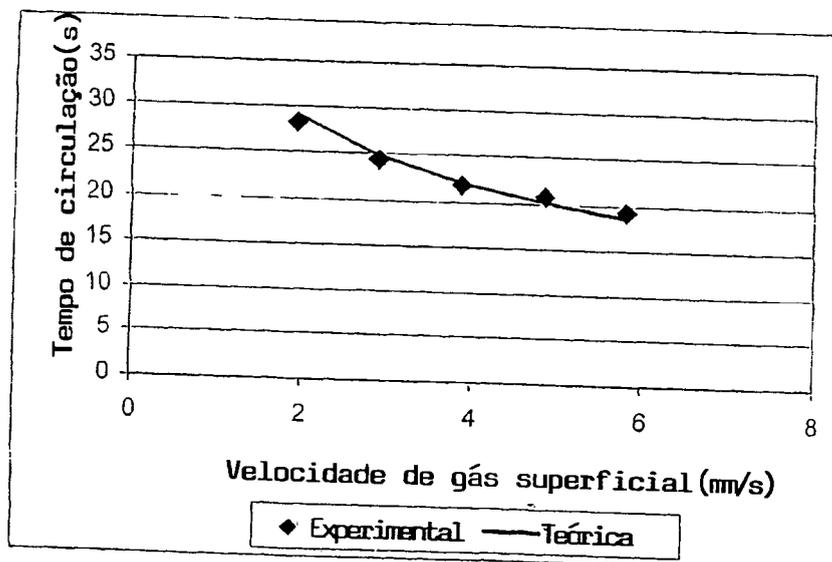


10

FIGURA 6.47 TEMPO DE MISTURA VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA NÃO

15 CONTENDO SÓLIDOS. O TEMPO DE MISTURA CORRESPONDE AO TEMPO NECESSÁRIO PARA 98% DA MUDANÇA DE ETAPA SER ANULADA. (N = 3)

20



25

FIGURA 6.48 TEMPO DE CIRCULAÇÃO
 VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM
 BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE
 ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM TUBO DE ÁCIDO FOI
 5 INJETADO EM UMA SOLUÇÃO NÃO CONTENDO
 SÓLIDOS. (N = 3)

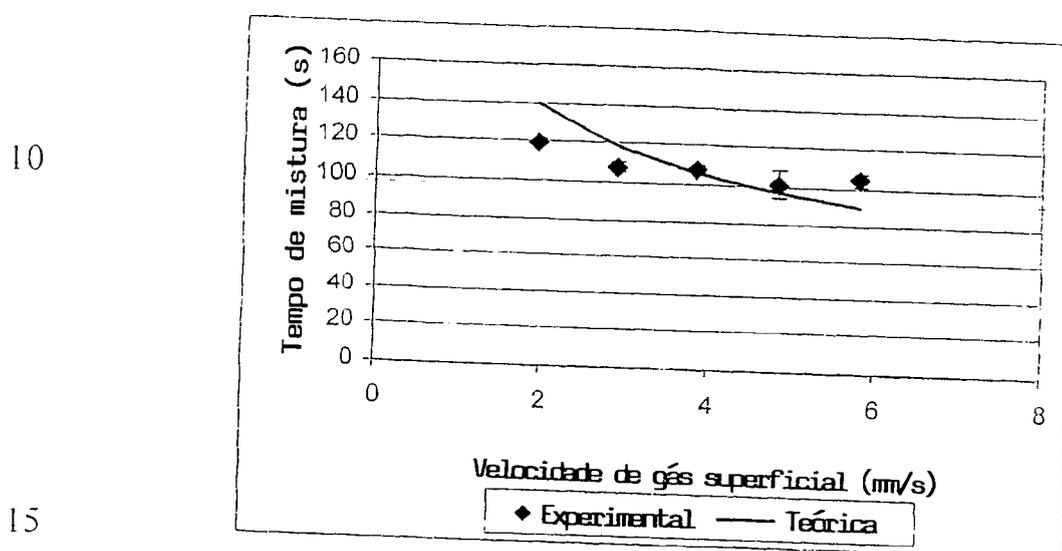
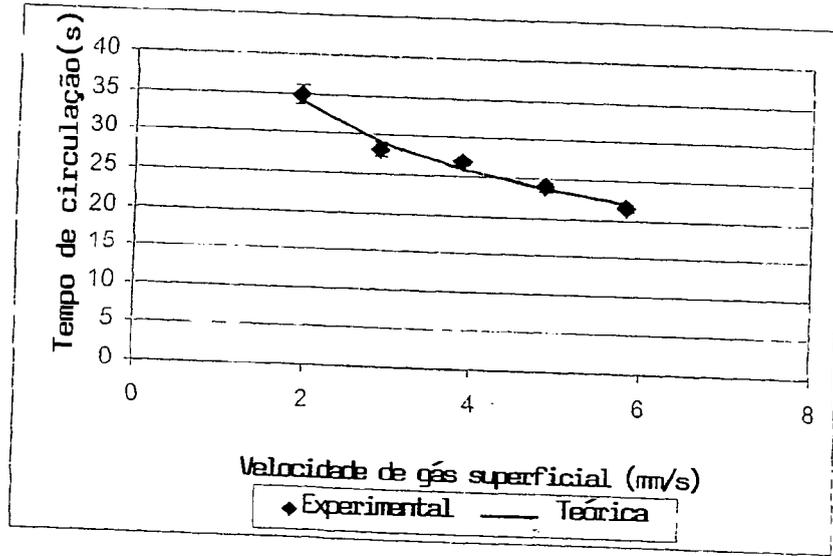


FIGURA 6.49 TEMPO DE MISTURA
 VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM
 BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE
 20 ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI
 INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO
 CONTENDO A LEVEDURA ALTAMENTE FLOCOSA
 LCC290 (TAMANHO DE FOCO > 1.0 MM). O TEMPO
 DE MISTURA CORRESPONDE AO TEMPO
 25 NECESSÁRIO PARA 98% DA MUDANÇA DE ETAPA A
 SER ANULADA (N = 3)



10 **FIGURA 6.50 TEMPO DE CIRCULAÇÃO**
VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM
BIOREATOR DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE
GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM
UM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO A
 15 **LEVEDURA ALTAMENTE FLOCOSA LCC290**
(TAMANHO DE FLOCO > 1.0 MM). (N = 3)

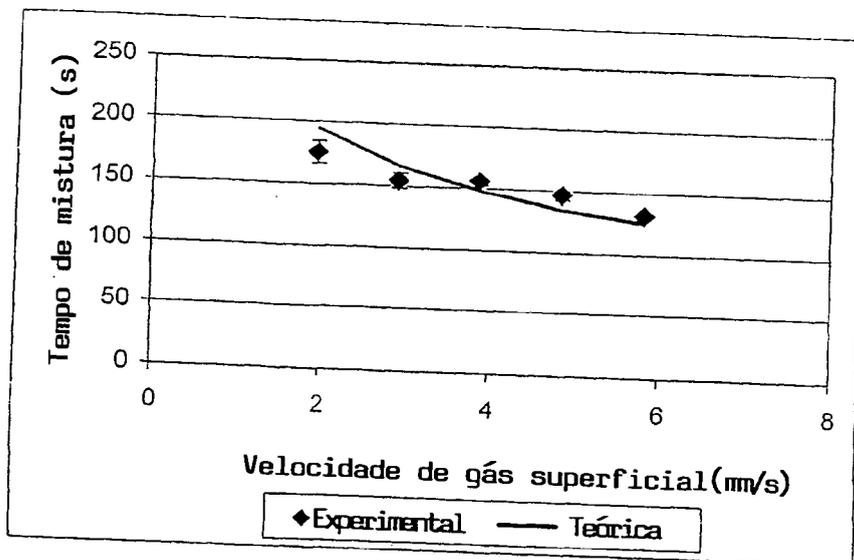
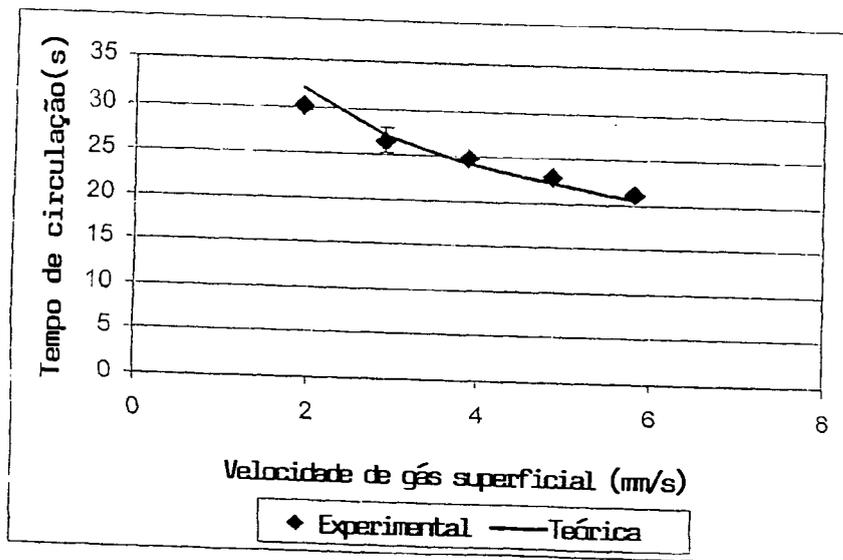


FIGURA 6.51 TEMPO DE MISTURA
 VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM
 BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE
 ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI
 5 INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO
 CONTENDO LEVEDURA LCC3021 IMOBILIZADA COM
 GOTAS DE GEL DE \square -CARRAGEENAN (TAMANHO DE
 GOTA 1-2 MM). O TEMPO DE MISTURA
 CORRESPONDE AO TEMPO NECESSÁRIO PARA 98%
 10 DA MUDANÇA DE ETAPA A SER ANULADA. (N = 3)



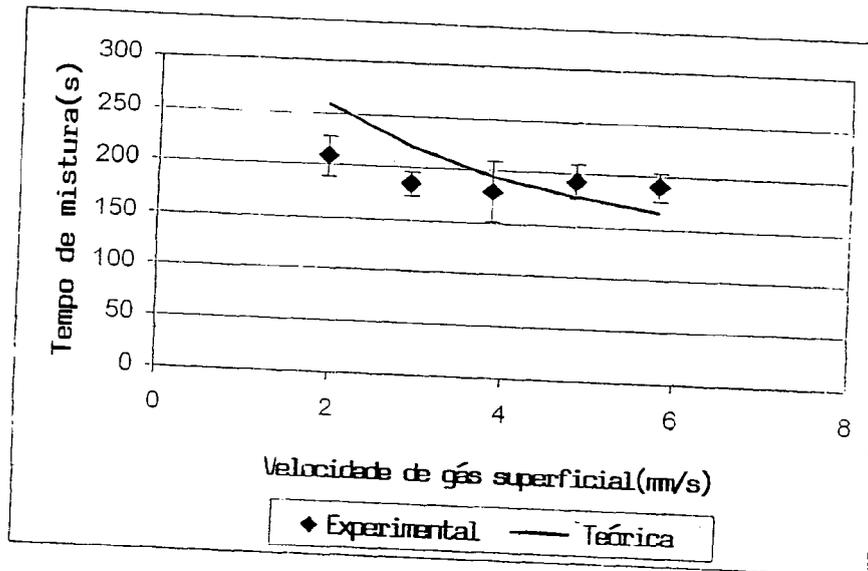
20

FIGURA 6.52 TEMPO DE CIRCULAÇÃO
 VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM
 BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE
 25 ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI
 INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO

CONTENDO LEVEDURA LCC3021 IMOBILIZADA COM GOTAS DE GEL DE κ -CARRAGEENAN (TAMANHO DE GOTA 1-2 MM). (N = 3)

5

10

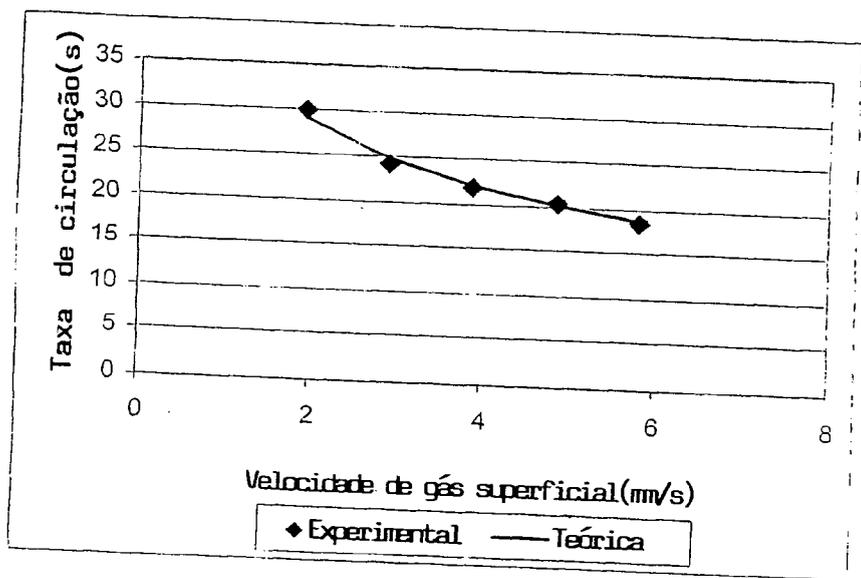


15

FIGURA 6.53 TEMPO DE MISTURA VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO A LEVEDURA FLOCOSA MÉDIA LCC3021 (TAMANHO DE FLOCO < 0.5 MM). O TEMPO DE MISTURA CORRESPONDE AO TEMPO NECESSÁRIO PARA 98% DA MUDANÇA DE ETAPA SER ANULADA. (N = 3)

25

5

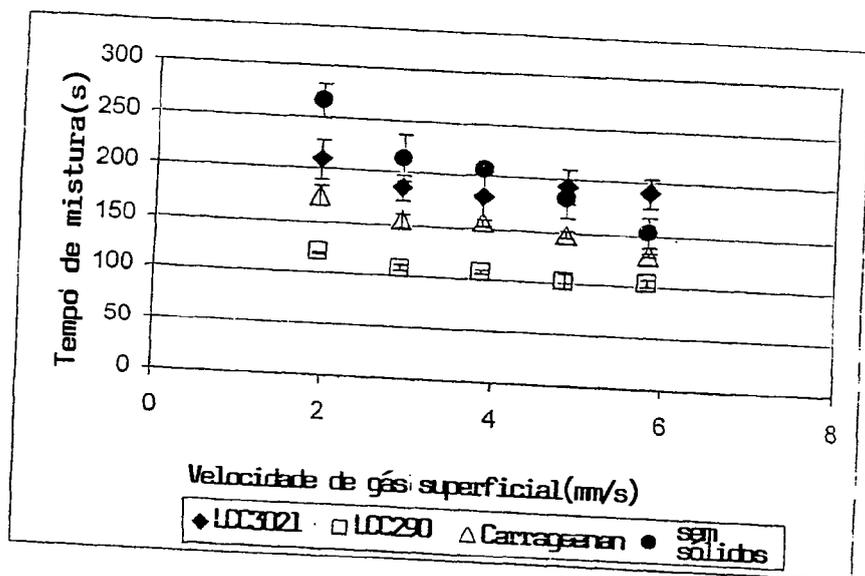


10

FIGURA 6.54 TEMPO DE CIRCULAÇÃO VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO A LEVEDURA FLOCOSA MÉDIA LCC3021 (TAMANHO DE FLOCO < 0.5 MM). (N = 3)

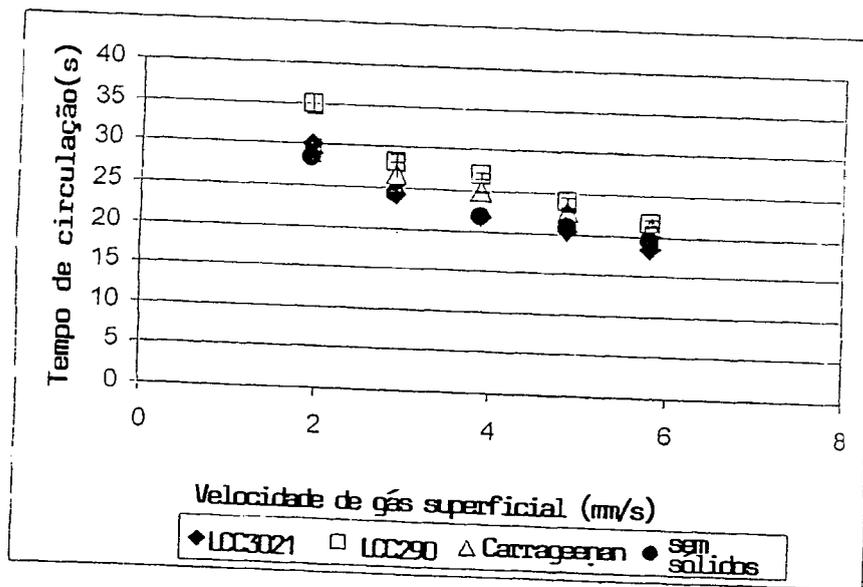
15

20



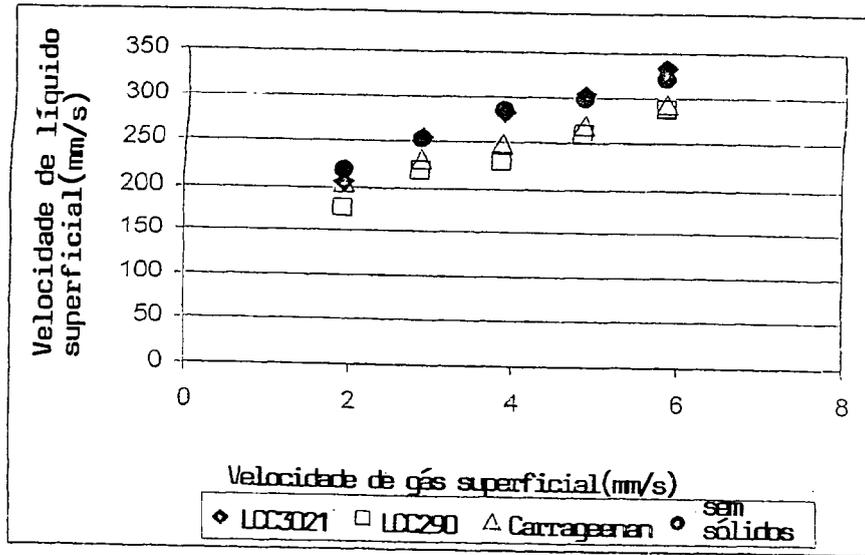
25

FIGURA 6.55 TEMPO DE MISTURA VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO SÓLIDOS DIFERENTES. O TEMPO DE MISTURA CORRESPONDE AO TEMPO NECESSÁRIO PARA 98% DA MUDANÇA DE ETAPA SER ANULADA. (N = 3)



20

FIGURA 6.56 TEMPO DE CIRCULAÇÃO VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL EM UM BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE 50 L. UM PULSO DE ÁCIDO FOI INJETADO EM UM MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO SÓLIDOS DIFERENTES. (N = 3)

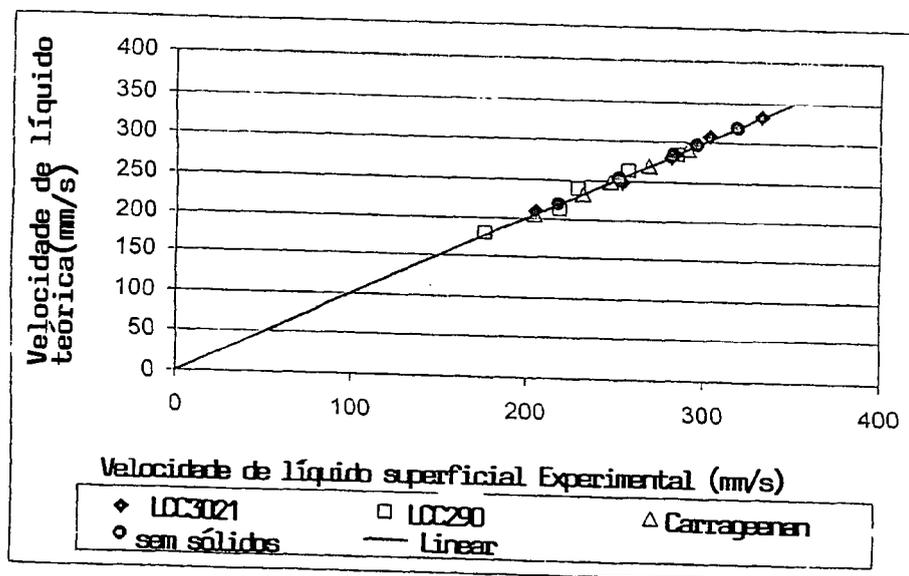


5

10

15

FIGURA 6.57 VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL (MM/S) VERSUS VELOCIDADE DE GÁS SUPERFICIAL (MM/S) PARA OS QUATRO SISTEMAS TESTADOS – SISTEMA DE LEVEDURA LCC3021, DE LEVEDURA LCC290, DE GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN E DE ÁGUA/SEM SÓLIDOS. O TESTE FOI CONDUZIDO DENTRO DO BIOREATOR DE TUBO DE TIRAGEM DE AR DE ELEVAÇÃO DE GÁS DE ESCALA PILOTO DE 50-L.



20

25

FIGURA 6.58 VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL TEÓRICA (MM/S) VERSUS VELOCIDADE DE LÍQUIDO SUPERFICIAL EXPERIMENTAL (MM/S) PARA OS QUATRO SISTEMAS TESTADOS. O VALOR TEÓRICO FOI CALCULADO USANDO-SE O SEGUINTE RELACIONAMENTO CONFORME PROPOSTO POR KENNARD E JANEKAH (1991): $V_{SL} \propto V_{SG}^M$. A LINHA LINEAR TEM UMA INCLINAÇÃO DE 1 E UMA INTERCEPTAÇÃO Y DE 0.

Tabela 6.1 Resumo de Correlações Calculadas para Tempo de Mistura, Taxa de Circulação e Velocidade de Líquido Superficial para os Quatro Sistemas Testados

	Tempo de Mistura	Taxas de Circulação	Velocidade de Líquido Superficial
Água/sem sólidos	$t_m = 336,04 V_{SG}^{-0,4}$	$t_o = 37,94 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 189,06 V_{SG}^{0,283}$
Levedura LCC290	$t_m = 181,55 V_{SG}^{-0,4}$	$t_o = 44,67 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 134,75 V_{SG}^{0,419}$
Gel de k-Carrageenan	$t_m = 254,68 V_{SG}^{-0,4}$	$t_o = 41,73 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 171,92 V_{SG}^{0,283}$
Levedura LCC3021	$t_m = 322,07 V_{SG}^{-0,4}$	$t_o = 37,90 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 158,12 V_{SG}^{0,427}$

Para a correlação de líquido superficial, Kennard e Janekah (1991) propuseram um expoente de 0.41 em água destilada, e 0.64 quando a solução continha carboximetil celulose e etanol. Os sistemas de LCC290 e LCC3021 têm
5 expoentes de 0.419 e 0.427 respectivamente, enquanto o sistema de β -carrageenan e os sistemas de água/sem sólidos têm um expoente de 0.283.

Uma suposição básica de tecnologia de tubo de tiragem de ar de elevação de gás é que o sistema pode distribuir
10 mistura adequada de modo que o elemento de fluido que sai do reator é completamente misturado. Na operação dos sistemas de escala piloto de 50-L como fermentadores contínuos, meio nutriente fresco foi injetado no fundo do reator a uma taxa de fluxo de 36 mL por minuto em um volume de reator total de 50 L.
15 Isto representa aproximadamente uma diluição de 100 vezes nos componentes de alimentação. Com as características de mistura calculada para o sistema de levedura LCC290, um elemento de fluido é misturado em cerca de 3 voltas de circulação de reator, enquanto 10 voltas de circulação de reator são necessárias para o
20 cenário de água/sem sólidos. Em adição, o tempo de residência (24 horas) é aproximadamente 1000 maior do que o tempo de mistura (180 segundos). A mistura rápida acoplada com a diluição de nutrientes dentro do sistema e a grande diferença no tempo de mistura versus tempo de residência, sugere fortemente um sistema
25 adequadamente misturado. A premissa original de usar um bioreator de elevação de gás foi que é provido de ambiente

idealmente misturado para fermentação de cerveja. Os resultados dos estudos de mistura realizados em todos os três veículos de fermentação suportam esta premissa.

6.5 AVALIAÇÃO DE VÁRIOS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA NO INTERIOR DE UM SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS

Fermentações contínuas foram realizadas no bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás em escala piloto de 50-L utilizando três tipos de veículo de imobilização – gotas de κ -carrageenan, levedura super-flocosa LCC290 e levedura LCC3021 flocosa média. Todas as fermentações foram inicialmente providas com o mesmo nível de inoculum de levedura (4 g/L), e mosto lager industrial foi usado como o meio de nutriente. As fermentações foram iniciadas em dosagem para a redução rápida de açúcares de mosto, bem como para promover crescimento de levedura dentro do fermentador. No caso da levedura flocosa, esta fase de dosagem permitiu a formação de flocos de levedura, que podem, então, serem retidos dentro do bioreator uma vez que uma alimentação contínua foi começada. Uma vez que o nível de diacetil no líquido de fermentação tenha caído para abaixo de 30 μ g/L, a alimentação de mosto contínuo foi iniciada. A seção seguinte foi iniciada. As seções seguintes descrevem em maiores detalhes a análise de fermentação resultante destes três tipos de matrizes de imobilização.

6.5.1 Uso de Gotas de Gel de κ -carrageenan: Predimento

O uso de gotas de gel de κ -carrageenan como uma matrix de imobilização alcançado no assessor de segurança de tecnologia de elevação de gás para fermentação primária de 5 cerveja (seção 6.3). Foi necessário assessor se tal sistema podia ser operado por períodos estendidos de tempo (até 2 meses) sem experimentar maiores dificuldades operacionais, incluindo ins.abilidade de fermentação e contaminação. Os parâmetros 10 operacionais para este ensaio de fermentação são representados na Figura 6.59. A velocidade de gás superficial de dióxido de carbono foi ajustada em 5.5 mm/s, enquanto 0.9 mm/s de ar foram introduzidos no reator neste gás de aspergimento. A taxa de oxigenação foi, portanto, ajustada em 3 % do gás de aspergimento 15 total para coincidir com os resultados na seção 6.3, que indicou a produção da cerveja preferida quando 2-5 % de oxigênio foi introduzido ao sistema. A temperatura de fermentação foi controlada em 15 °C. Algumas flutuações podem ser vistas nos dados, e elas se referem a natureza da volta de controle que foi 20 utilizada.

A Figura 6.60 representa a evolução da população de célula de levedura livre com o tempo, bem como a viabilidade da levedura. A viabilidade permanece relativamente alta através da fermentação de 2 meses com uma diminuição 25 temporária medida ao redor de 200 horas. Isto corresponde ao ponto imediatamente antes do início da alimentação de mosto

contínua. Na fermentação de dosagem, é comum a viabilidade diminuir no final da fermentação, visto que as células são desprovidas de nutrientes. Uma vez que a alimentação de mosto contínua foi iniciada, a viabilidade cresce acima de 90 %. A população de célula de levedura livre foi baixa durante as primeiras 400 horas de fermentação e, em seguida, sobre as próximas 300 horas, é aumentada cerca de 10 vezes de ~ 100 milhões de células por mL para ~ 1.5 bilhões de células por mL. Uma vez nesta concentração máxima, a população de levedura de célula livre manteve este valor de estado pseudo-constante para o restante do período de fermentação.

O aumento súbito na concentração de levedura livre está provavelmente ligado à população de célula de levedura imobilizada. No início da fermentação, a levedura presa no gel se desenvolverá dentro do gel até que espaço disponível tenha sido tomado. Uma vez que as gotas de gel são preenchidas com levedura, a população de expansão inundará no meio líquido. Nossos resultados indicam que durante as primeiras 400 horas, a levedura imobilizada desenvolvida dentro do gel e, em ~700 horas, a levedura não tinha mais ambiente para crescer dentro da gota, portanto, começando a liberar grandes quantidades de células no caldo de fermentação.

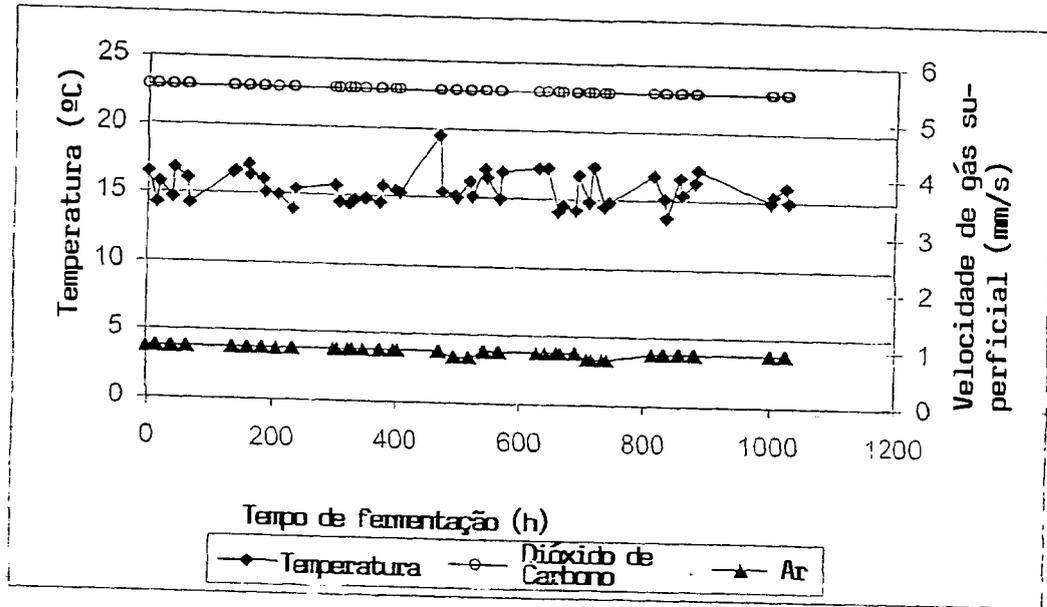
Esta instabilidade na população de levedura é refletida no etanol, e nos perfis de gravidade específica (Figura 6.61). Durante as 200 horas iniciais de fermentação, foi esperado que o etanol aumentaria com o tempo, e que a gravidade

específica diminuiria seguindo cinéticas de dosagem tradicionais. Entre 200 e 600 hours, o etanol alcançou um patamar de 45 g/L e a gravidade específica permaneceu em ~ 6 °P. Este resultado não foi esperado como um líquido de fermentação final tem uma gravidade específica de ~ 2.5 to 2.7 °P. Em cerca de 600 horas, quando a população de levedura livre tem imediatamente alcançado cerca de seu máximo, o nível de etanol aumenta para cerca de 70 g/L e a gravidade específica do mosto cai para cerca de 2.2 °P. Uma observação mais próxima nos perfis de carboidratos específicos com o tempo (Figura 6.62) indica que a concentração de maltose não se nivela até aproximadamente 600 horas no processo. Os outros açúcares foram reduzidos conforme esperado.

Duas outras análises chaves – diacetil e 2,3-pentanodiona – foram monitoradas através do curso contínuo de 2 meses (Figura 6.63). Os pontos baixos em aproximadamente 180 horas correspondem ao final da fase de partida de dosagem. Uma vez que a alimentação contínua foi iniciada, ambos o diacetil e 2,3-pentanodiona aumentou rapidamente para cerca de $500 \mu\text{g/L}$ e $400 \mu\text{g/L}$ respectivamente. Este aumento inicial foi esperado desde que o suprimento de nutriente fresco estimularia o crescimento de levedura e, portanto, aumenta os níveis de metabólitos de sobre-fluxo, produzindo diacetil e 2,3-pentanodiona. Através de todo curso de fermentação, os níveis de 2,3-pentanodiona permaneceram acima de $400 \mu\text{g/L}$, enquanto as concentrações de diacetil caíram de $500 \mu\text{g/L}$ para $275 \mu\text{g/L}$

através do curso de fermentação contínua. Este ponto também coincide com o nível de diacetilo caindo abaixo do nível de 2,3-pentanodiona, conforme foi observado no asseso de segurança reportado na seção 6.3.

5

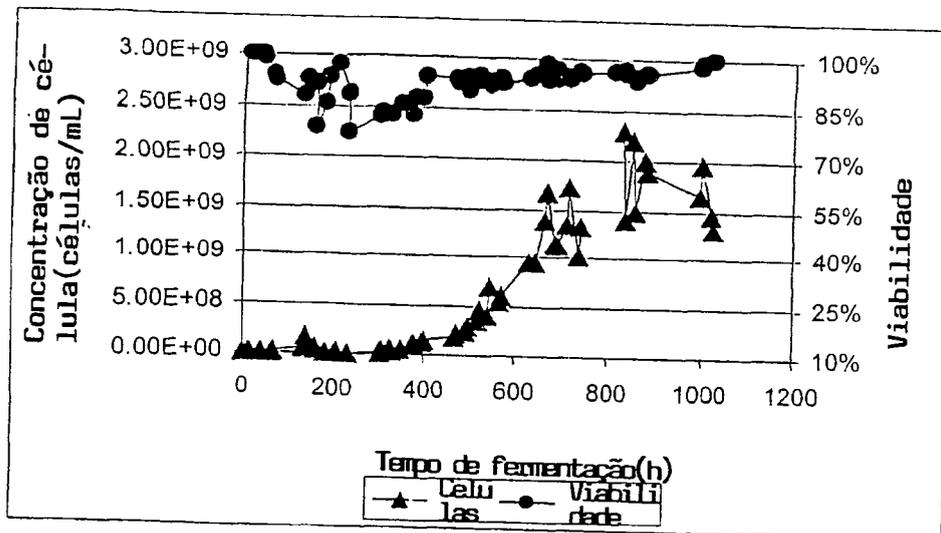


10

FIGURA 6.59 PARÂMETRO DE OPERAÇÃO PARA A FERMENTAÇÃO IMOBILIZADA DE CARRAGEENAN VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

15

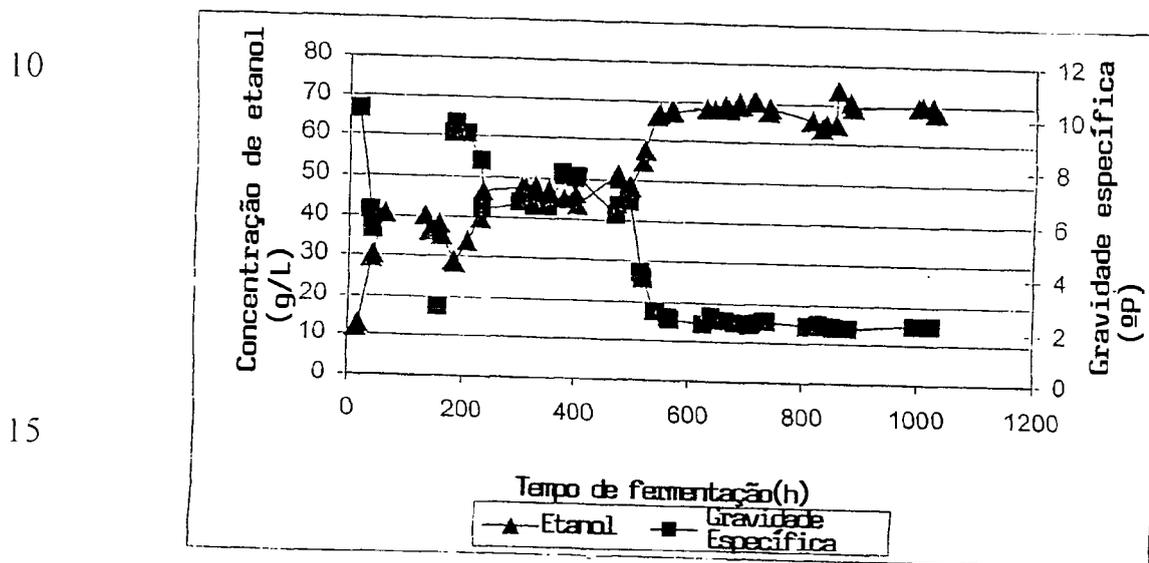
20



25

FIGURA 6.60 CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA DE LEVEDURA TOTAL E VIABILIDADE DA LEVEDURA IMOBILIZADA DE κ -CARRAGEENAN VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

5

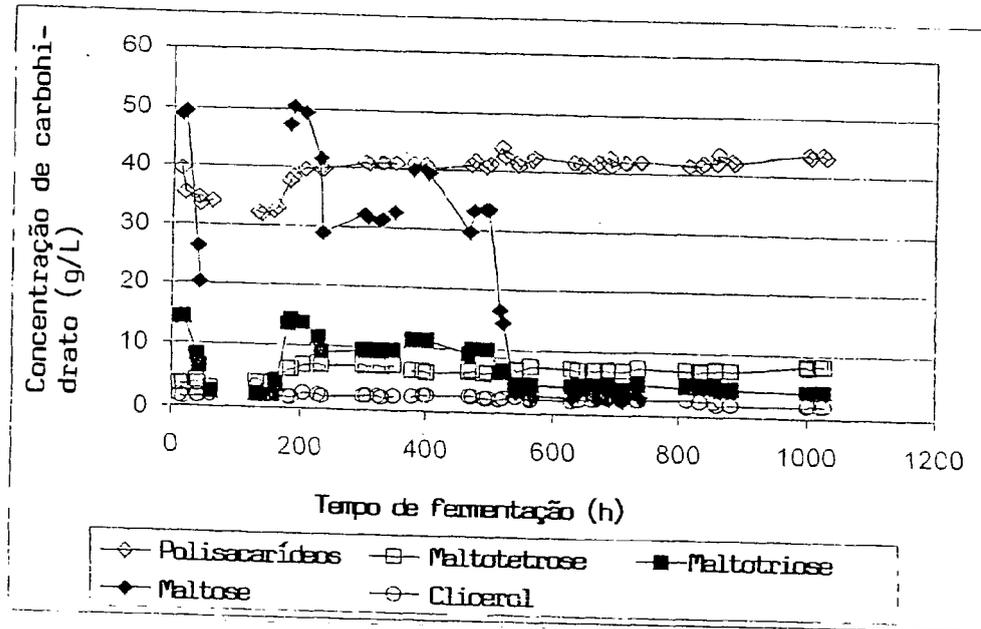


20

FIGURA 6.61 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E GRAVIDADE ESPECÍFICA DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA IMOBILIZADA DE CARRAGEENAN VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

25

5

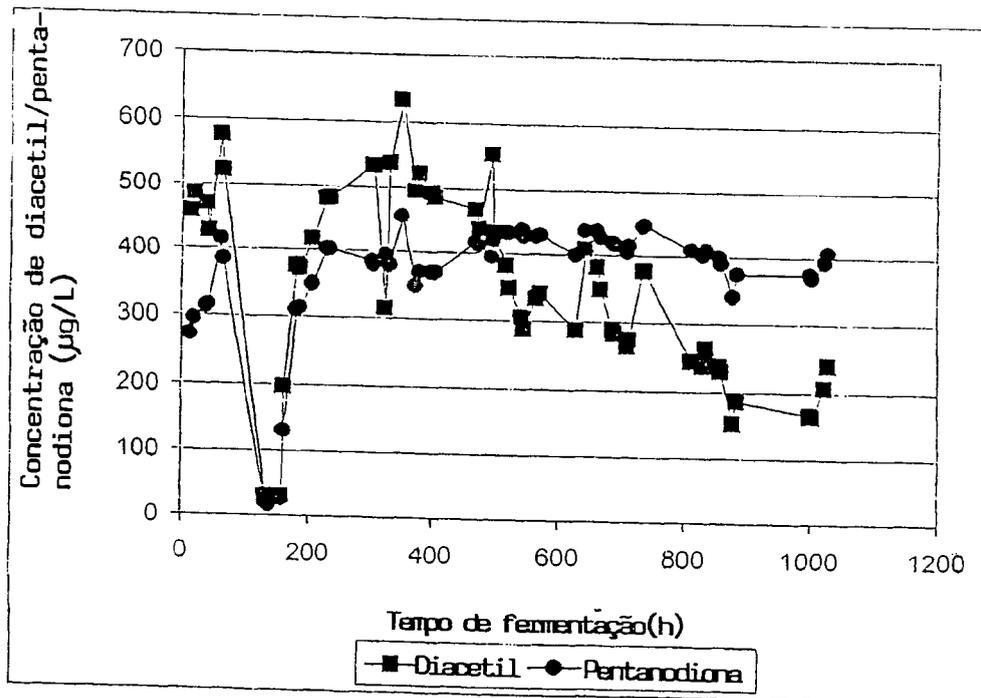


10

FIGURA 6.62 PERFIL DE CARBOHIDRATO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA IMOBILIZADA DE CARRAGEENAN VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

15

20



25

FIGURA 6.63 CONCENTRAÇÃO DE DICETONAS VICINAIS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA IMOBILIZADA DE CARRAGEENAN VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

5 6.5.2 Uso de uma Linhagem de Levedura Super-Flocosa: Auto-Floculação

Fermentações contínuas usando o bioreator de elevação de gás de escala piloto de 50-L carregado com levedura super-flocosa LCC290 foram realizadas sobre um período de 3
10 meses. O gás de aspergimento CO₂ foi ajustado em ~2.5 mm/s enquanto ar foi introduzido em ~0.4 mm/s de modo a promover algum crescimento de levedura (isto corresponde a um total de 1.51 L de gás por minuto sendo introduzido com 3 % sendo oxigênio). A temperatura de fermentação no reator foi mantida
15 em ~15 °C através do curso total. Uma interrupção no suprimento de energia forçou-nos a reduzir a temperatura do fermentador para 4 °C por um período de três dias (cerca de 1700 horas na fermentação) (Figura 6.64). Este arrefecimento do reator foi realizado de modo a diminuir o metabolismo da levedura, e
20 manter a viabilidade da levedura durante a interrupção da energia. Este evento inesperado proporcionou uma oportunidade de avaliar a resiliência do sistema a eventos que podiam ser comuns em situações industriais. Uma vez que a eletricidade foi restaurada, a temperatura do reator foi reajustada para 15 °C, e a
25 fermentação procede por outros 30 dias.

Uma vez que a fase de partida de dosagem foi completada (~180 horas), mosto foi continuamente suprido ao sistema em uma taxa de fluxo de 2.16 L por hora, proporcionando, desse modo, um tempo de residência de 24 horas baseado em um volume de operação de reator de 50 L. Após o período de dosagem inicial, a concentração de célula aumentou, alcançando 3 bilhões de células/mL em cerca de 750 horas na fermentação (Figura 6.65). Esta massa de levedura, em seguida, diminui para aproximadamente 1 bilhão de células por mL em ao redor de 1000 horas, e permanece neste nível até o final da fermentação. A viabilidade da levedura estava em acima de 90 % através de todo o curso de fermentação (Figura 6.65).

A concentração de etanol e a gravidade específica do caldo de fermentação alcançaram estado pseudo-constante curtamente após a alimentação contínua ter começado (Figura 6.66). A concentração de etanol se elevou para aproximadamente 70 g/L, e a gravidade específica de líquido foi ~2.3 °P para o restante da fermentação. Os perfis de carboidrato na Figura 6.67 confirmam este estado pseudo-constante em aproximadamente 270 horas no curso de fermentação contínua. A concentração de polissacarídeo caiu de ~42 g/L para ~33 g/L em cerca de 1400 horas na fermentação. Este resultado foi devido a uma variação nas dosagens de mosto. Desde que a levedura lager não pode consumir estes polissacarídeos, esta anomalia no nutriente de mosto não tem efeito marcado na performance do vaso de fermentação primária. Esta diferença na porção de açúcar

não-fermentável seria detectada pelos panelistas de sabor treinado que noticiariam que o produto tem um corpo “delgado”.

As concentrações de diacetil e 2,3-pentanodiona com o tempo são apresentadas na Figura 6.68. Como com as fermentações contínuas de κ -carrageenan, os níveis de diacetil e 2,3-pentanodiona se elevam logo que a alimentação de mosto contínua foi começada. O diacetil alcançou aproximadamente 375 g/L, enquanto a concentração de 2,3-pentanodiona foi aproximadamente 600 μ g/L. Estes níveis de concentração foram mantidos através de todo curso de fermentação até a interrupção na energia em ~1700 horas. Desde que a saturação de líquido na dosagem por 3 dias sem metabolismo de levedura adicional (devido a falta de suprimento de nutriente), os níveis de dicetonas vicinais foram reduzidos. Uma vez que a alimentação de mosto foi reiniciada, ambos o diacetil e 2,3-pentanodiona retornaram aos seus valores de estado pseudo-constante.

20

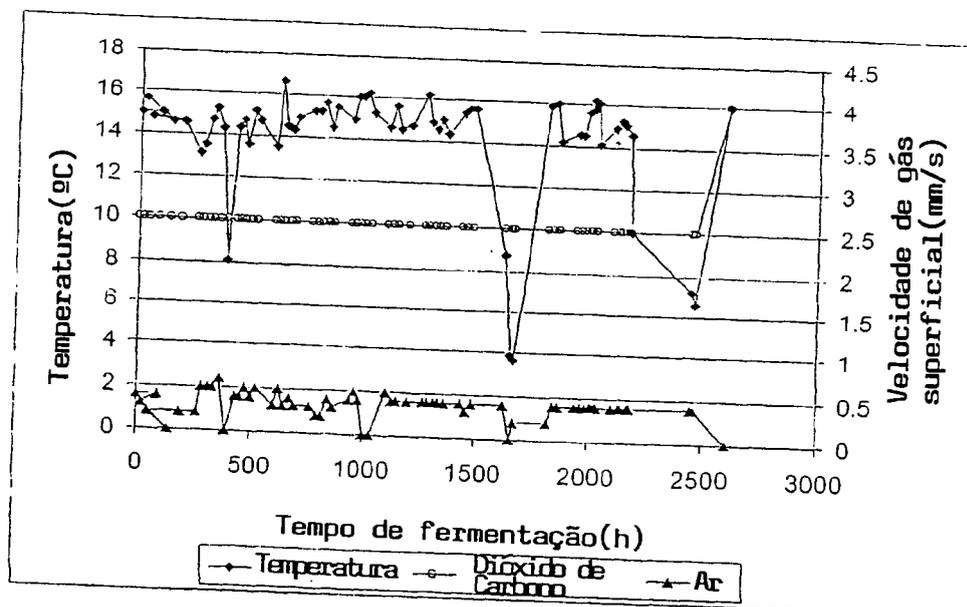
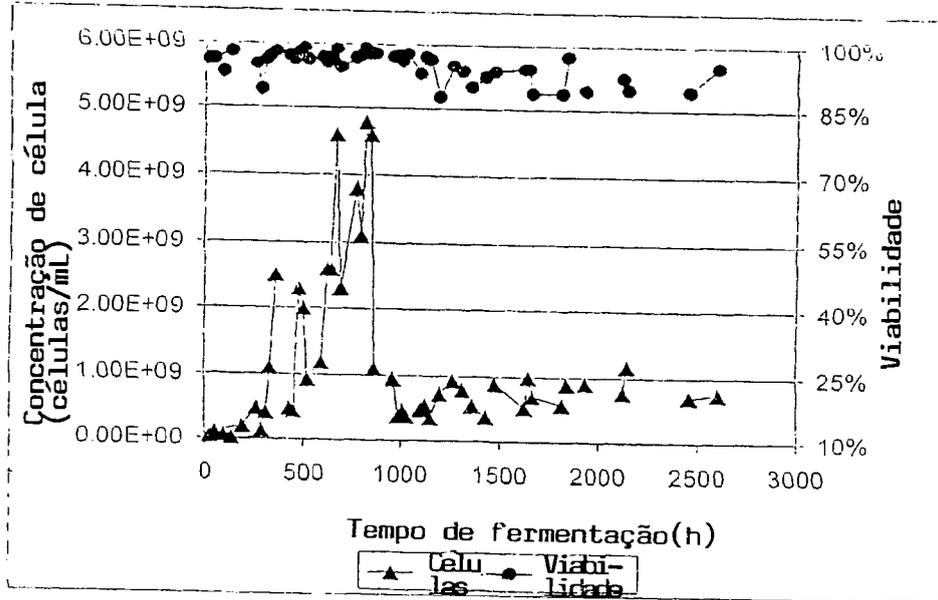


FIGURA 6.64 PARÂMETRO DE OPERAÇÃO PARA A FERMENTAÇÃO DE LCC290 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

5

10



15

FIGURA 6.65 CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA DE LEVEDURA TOTAL E VIABILIDADE DE LEVEDURA LCC290 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO

20

25

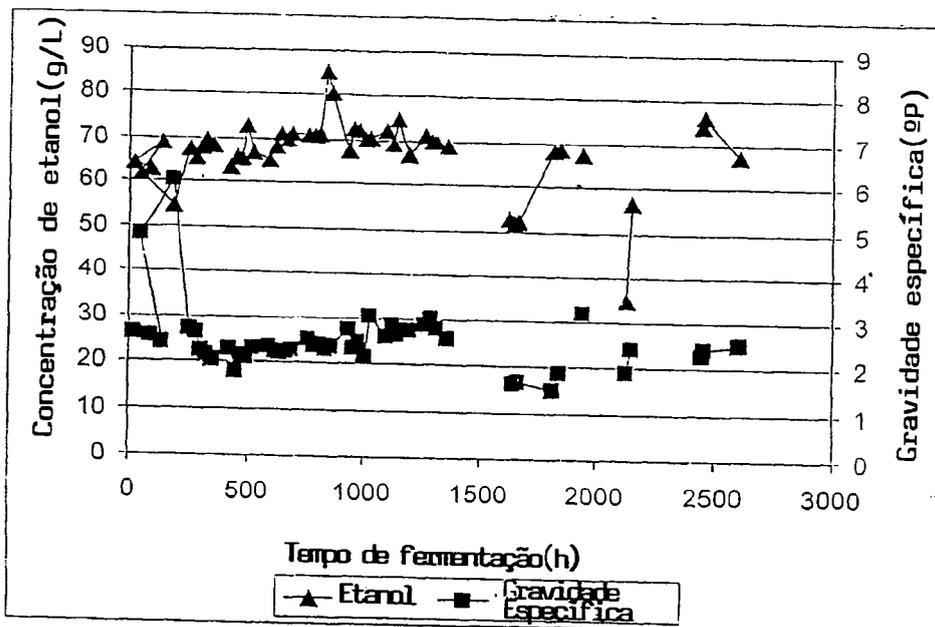
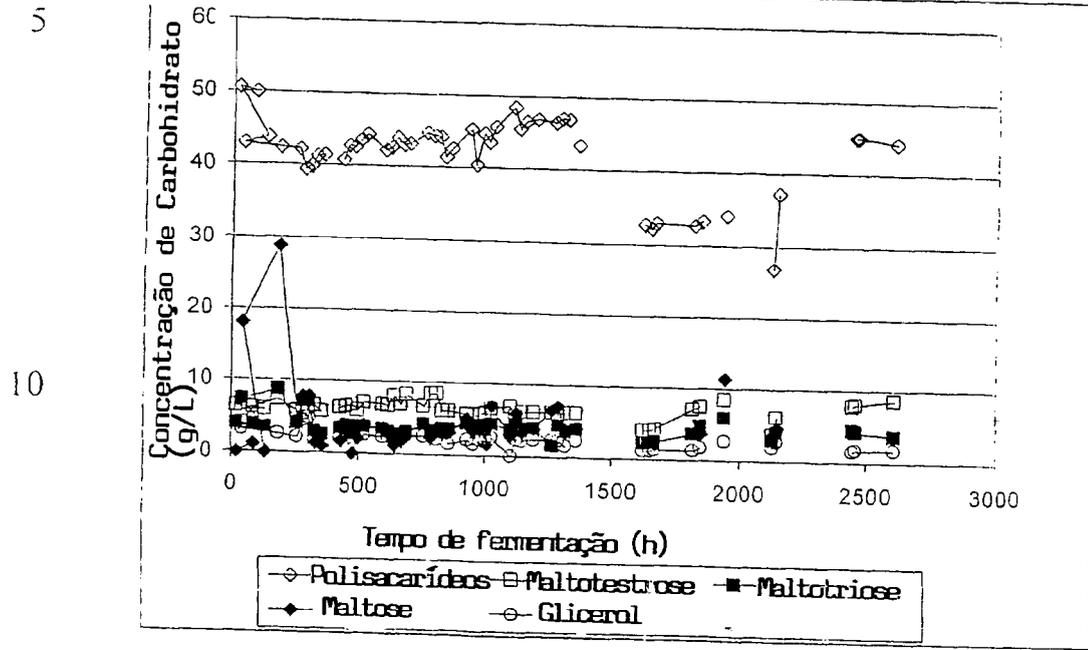


FIGURA 6.66 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E GRAVIDADE ESPECÍFICA DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LEVEDURA LCC290 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.



15 FIGURA 6.67 PERFIL DE CARBOHIDRATOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LEVEDURA LCC290 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

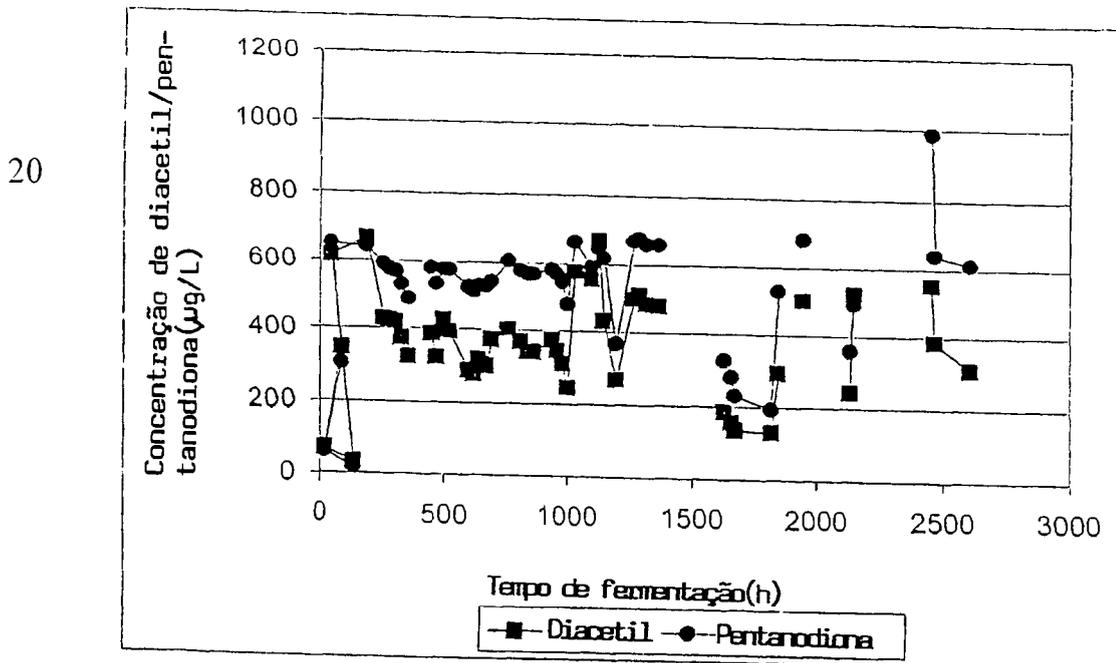


FIGURA 6.68 CONCENTRAÇÃO DE DICETONAS VICINAIS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LCC290 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

6.5.3 Uso de uma Levedura Flocosa Média:

5 Auto-Floculação

Vários cursos de fermentação foram realizados usando-se a linhagem de levedura flocosa média LLC3021, como a matriz de imobilização dentro do bioreator de elevação de gás de escala piloto de 50-L. Como com os dois modos prévios de imobilização, a concentração de levedura inicial foi ajustada em 4 g/L. Esta levedura foi provida no mosto lager industrial (descrito na seção 4.2), e seguida para fermentar na dosagem até que todos os açúcares fermentáveis foram consumidos e o nível de diacetil tenha caído para abaixo de 30 μ g/L. A temperatura de fermentação foi controlada em 15 °C e a taxa de gás de aspergimento foi a controlada no mesmo nível como a fermentação de LCC290 (velocidade de gás dióxido de carbono superficial de ~2.5 mm/s e ~0.4 mm/s de ar, resultando em aproximadamente 3 % de oxigênio no gás de aspergimento total) (Figura 6.69).

Este estágio de dosagem inicial permitiu que as células de levedura floculassem e, portanto, fossem mais facilmente retidas dentro do sistema de elevação de gás. No final na partida de dosagem, a taxa de alimentação de mosto foi ajustada em 2.16 L por hora, que corresponde a um tempo de residência de ~24 horas baseado em um volume de operação de

reator de 50 litros. A população de levedura (Figura 6.70) aumentou para cerca de 1 bilhão de células por mililitro, e permaneceu neste nível por mais de 1000 horas (entre 500 e 1500 horas no curso de fermentação contínua). A população de levedura dobrou subitamente em ~1500 horas na fermentação e, em seguida, nivelada em 2 bilhões de células/mL. Esta mudança na população de levedura foi inesperada. A viabilidade de levedura através de todo o curso de fermentação foi mantida em acima de 90 % (Figura 6.70).

10 A Figura 6.71 apresenta os dados para a concentração de etanol e gravidade específica de caldo de fermentação em curso contínuo de 3 meses. Curtamente após a partida de dosagem (180 horas), a concentração de etanol nivelada em 70 g/L e a gravidade específica alcançaram um
15 mínimo de ~ 2.2 °P. O aumento súbito na população de levedura discutida acima não foi refletida em uma diminuição na concentração de etanol. A explanação mais lógica para este aumento na população de levedura é que uma porção maior da população de levedura total entrou na fase de crescimento,
20 produzindo este dobramento na concentração de levedura. Uma diminuição na concentração de etanol teria sido esperada para coincidir com o aumento na concentração de levedura, mas isto não foi claramente o caso, visto que o etanol permaneceu em seu valor de estado pseudo-constante de 70 g/L através de todo curso
25 contínuo. Os perfis de concentração de carboidrato versus tempo de fermentação (Figura 6.72) revelou a mesma conclusão como as

curvas de etanol e de gravidade específica. Este curso alcançou seu estado pseudo-constante em aproximadamente 250 horas na fermentação contínua.

A Figura 6.73 proporciona as curvas de concentração de diacetil e 2,3-pentanodiona versus o tempo de frementação. Similar aos resultados do gel de -carrageenan e dicetonas vicinais de LCC290, a concentração de diacetil e 2,3-pentanodiona aumentou seguindo a fase de partida de dosagem para alcançar os valores de estado pseudo-constante de ~225 g/L e 400 g/L, respectivamente.

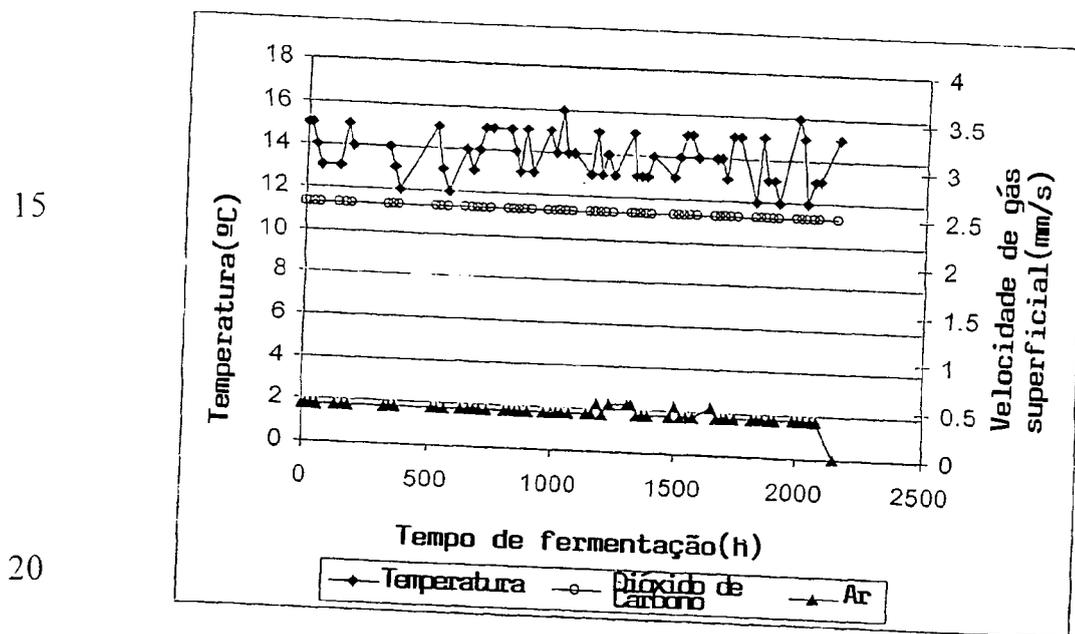
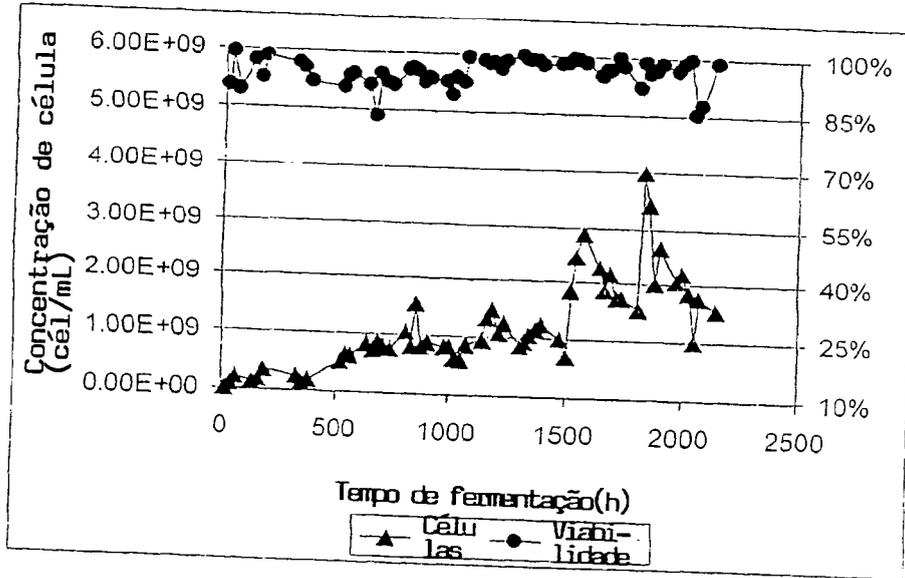


FIGURA 6.69 PARÂMETRO DE OPERAÇÃO PARA A FERMENTAÇÃO DE LCC3021 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

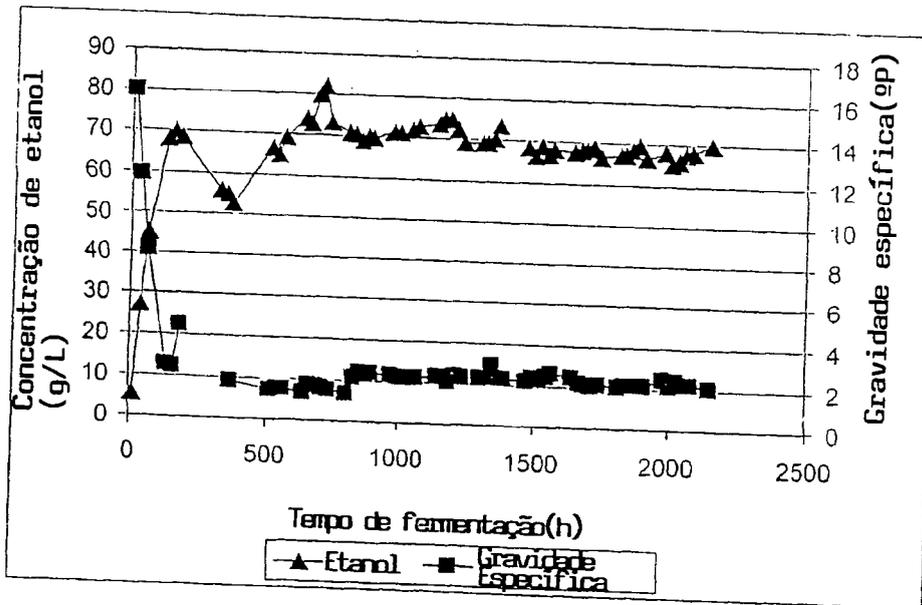
5



10

FIGURA 6.70 CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA DE LEVEDURA TOTAL E VIABILIDADE DE LCC3021 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

15



20

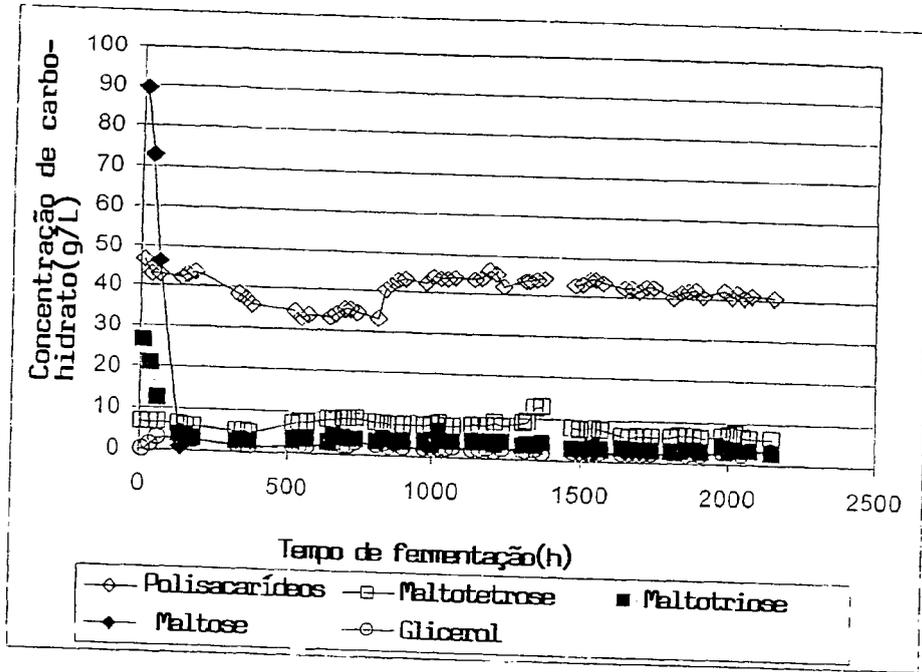
25

FIGURA 6.71 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E GRAVIDADE ESPECÍFICA DE

FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LEVEDURA LCC3021
VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

5

10



15

FIGURA 6.72 PERFIL DE CARBOHIDRATOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LEVEDURA LCC3021 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

20

25

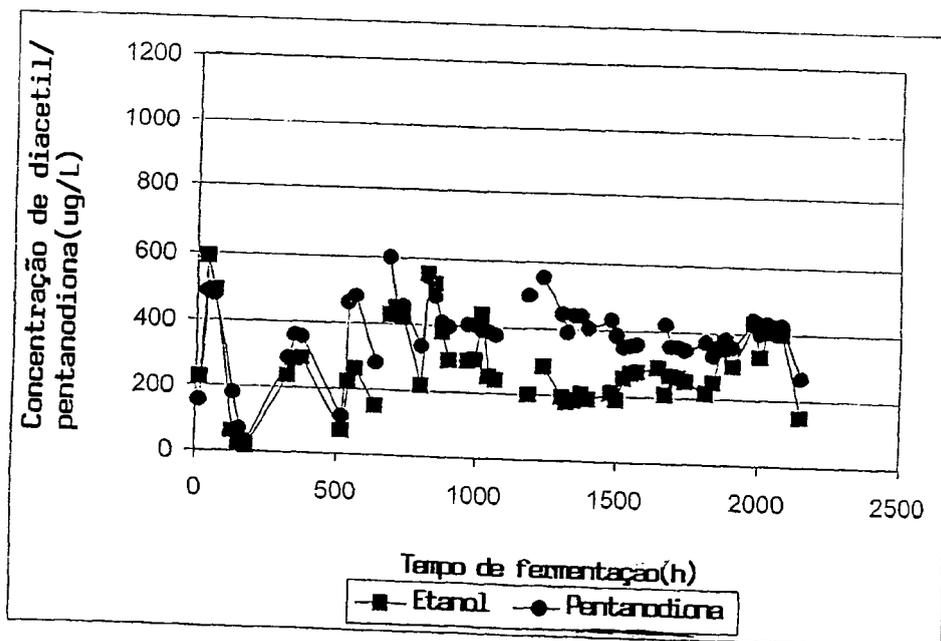


FIGURA 6.73 CONCENTRAÇÃO DE DICETONAS VICINAIS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA DE LCC3021 VERSUS TEMPO DE FERMENTAÇÃO.

6.5.4 Comparação dos vários veículos

5 Nas seções 6.5.1 a 6.5.3, as performances de fermentação de gotas de gel de κ -carrageenan, levedura super-flocosa LCC290 e levedura flocosa média LCC3021, como matrizes de imobilização, foram apresentadas. Todos os três veículos pareceram adequados para fermentação primária

10 contínua dentro do bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto de 50-L. Os tempos de residência de líquido de 24 horas foram alcançados em todos os três casos. Os cursos de fermentação usando levedura super-flocosa LCC290 alcançaram um estado pseudo-constante muito mais rápido do que

15 a levedura flocosa média LCC3021 e os sistemas de célula imobilizada de κ -carrageenan. A fermentação de LCC290 alcançou sua concentração de etanol máxima de 70 g/L em cerca de 250 horas no curso. O curso de LCC3021 alcançou sua concentração de etanol de estado constante de 70 g/L em ~600

20 horas. Durante a fermentação contínua de κ -carrageenan, o etanol nivelou em dois pontos separados sobre o correr do curso. Primeiro o etanol alcançou 45 g/L entre 200 e 500 horas e, em seguida, elevou para 70 g/L em cerca de 575 horas, e permaneceu na concentração até o final do ensaio.

25 Os três sistemas de fermentação pareceram alcançar uma concentração de levedura livre máxima de ~1 bilhão

de células por mililitro. A inconsistência na concentração de levedura concedida negativamente na produtividade de etanol do sistema de κ -carrageenan (concentração de etanol de estado pseudo-constante inicial inferior, conforme comparado ao sistema de levedura LCC290). A concentração de levedura alcançou o pico em intervalos de tempo diferentes em cada sistema. Para o curso de LCC290, o etanol alcançou seu máximo entre 500 e 1000 horas na fermentação contínua, enquanto a fermentação de LCC3021 tem uma contagem de célula máxima entre 1500 e 2000 horas em seu curso contínuo. O sistema imobilizado de κ -carrageenan alcançou uma concentração de célula máxima entre 700 e 1000 horas de operação contínua.

As concentrações de estado pseudo-constante de diacetil e 2,3-pentanodiona nos três tipos de fermentação de célula imobilizada – levedura super-flocosa LCC290, levedura flocosa média LCC3021 e levedura imobilizada κ -carrageenan – foram similares. Para a fermentação de LCC290, o diacetil assentou em 375 $\mu\text{g/L}$, enquanto o nível na fermentação de LCC3021 foi nivelado em cerca de 225 $\mu\text{g/L}$. No caso da fermentação de κ -carrageenan, a concentração de diacetil alcançou 500 $\mu\text{g/L}$, e a meio caminho do curso contínuo, o nível diminuiu gradualmente para cerca de 200 $\mu\text{g/L}$ em uma estrutura de tempo de 500 horas. A concentração de 2,3-pentanodiona espelhou a concentração de diacetil em três cursos com concentrações de 2,3-pentanodiona mais altas do que diacetil através de todas as fermentações de LCC290 e LCC3021. O curso

de β -carrageenan exibiu um modelo diferente, com níveis de diacetil mais altos do que 2,3-pentanodiona durante seu primeiro estado pseudo-constante, após cujo tempo a concentração de diacetil caiu abaixo da concentração de 2,3-pentanodiona. Os dados de concentração de levedura e os dados de produção de etanol também sugerem que dois estados separados e pseudo-constante único foram alcançados durante as fermentações de β -carrageenan.

A tarefa de comparar sistemas de fermentação diferentes e assessá-los ter se realizado melhor pode tornar-se complexa quando os méritos do sistema são baseados em mais do que um critério. Por exemplo, se toda produtividade de etanol somente foi usada como a medida de sucesso, todos os três sistemas testados se classificariam igualmente bem, visto que a produção de 70 g/L de etanol por 50 L de volume de reator sobre um tempo de residência de 24 horas foi alcançado em todos os casos.

A produção de uma cerveja vendável requer mais do que produção de etanol simples. O sistema de fermentação proposto deve ser avaliado em sua capacidade de produzir uma cerveja aceitável (produtividade de etanol e níveis de diacetil entre outras coisas), nos custos incrementais potenciais do veículo, na disponibilidade do veículo, na facilidade de operação do sistema, nas emissões ambientais tal como disposição do veículo, na estabilidade do veículo, bem como a flexibilidade provida pelo sistema de veículo. De modo a avaliar tal cenário de

múltiplas facetas, o mundo dos negócios utiliza um processo de análise adimensional denominado “Balanced Scorecard” (Kaplan e Norton, 1996). A primeira etapa envolve a identificação do critério para o qual o sistema deve ser avaliado. Cada critério é, em seguida, dado uma classificação em uma escala de 1 a 5, com 1 sendo menos favorável e 5 sendo mais favorável. No final da análise, a classificação para cada opção é totalizada e a alternativa com classificação mais alta é a melhor escolha dadas as circunstâncias.

A Tabela 6.2 apresenta os resultados da análise de Balanced Scorecard realizada nos veículos de imobilização que foram vistos como alternativas potenciais para uso no bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto de 50-L para fermentação. Um total de 6 veículos – gotas de chitosan Chitopearl[®], gotas de terra diatomácea Celite[®], gotas de vidro Siran[®], gotas de gel de κ -carrageenan, levedura flocosa média LCC3021 e levedura super-flocosa LCC290 – foram avaliados com o objetivo principal de produzir uma cerveja vendável. Cada sistema de veículo foi classificado usando-se a escala antes mencionada. No total, a levedura super-flocosa LCC290 se saiu melhor, seguida proximamente pela levedura flocosa média LCC3021. Os quatro outros veículos recebem classificações entre 16 e 20. A terceira preferência foi dada ao sistema de κ -carrageenan porque um líquido vendável foi produzido na unidade piloto.

Este assessor de veículo sugere fortemente que foco futuro no desenvolvimento de sistemas de fermentação contínua deve ser dado em direção a auto-agregação conforme o modo de imobilização. A disponibilidade (prontamente disponível), custo (custo baixo, visto que nenhum equipamento adicional é necessário para operar), facilidade de operação (ajustes dentro das operações de planta existentes) provida por tal alternativa excede a instabilidade potencial dos flocos de levedura em um sistema agitado. Pode ser possível usar-se a sensibilidade de cisalhamento de auto-agregação para controlar o tamanho do floco durante o processo de fermentação, e possível alcançar aumento de transferência de massa e, portanto, alcançar aumentos adicionais na produtividade volumétrica do bioreator.

Tabela 6.2 Comparação de vários veículos de imobilização para fermentação primária de cerveja no interior de um sistema de bioreator de elevação de gás

	Chitopearl	Celi-te	Si-ran	Carrageenan	LCC3021	LCC290
Boa cerveja	3	1	1	4	5	4
Custo	2	3	1	3	5	5
Disponibilidade	1	5	5	2	5	5
Facilidade de operação	3	1	1	3	4	5

Disposi- ção/ Ambiente	4	3	4	2	3	3
Estabili- dade	4	1	1	3	2	3
Flexibili- dade	3	3	3	1	2	5
TOTAL	20	17	16	18	26	30

6.6 Produção de um tipo de cerveja lager norte americana usando-se tecnologia de tubo de tiragem de ar de elevação de gás

5 A produção de uma cerveja norte americana (NA) de sabor limpo tipo lager traz muitos problemas aos produtores de cerveja. As cervejas tipo lager norte americanas são caracterizadas por uma cor clara e um perfil de sabor com baixo amargor, baixo açúcar residual (fina), nenhum aroma dominante e, portanto, nenhum sabor posterior. Por causa destas

10 propriedades inerentes, o produtor de cerveja podia mascarar muito pouco os defeitos do aroma. Altos níveis de diacetil (manteiga), acetaldeído (maçã verde), bem como notas fora de enxôfre (borracha queimada, ovos podres, vegetais cozidos) são

15 os problemas mais comuns de aroma que atormentam os produtores de cerveja dos dias modernos. Embora a contaminação bacteriana do meio de fermentação possa ser uma causa destes aromas na cerveja, o controle incorreto do processo de

fermentação mais freqüentemente produz níveis de aroma mais altos do que os esperados.

Através de todos os ensaios de fermentação contínua conduzidos como parte desta tese, os níveis de
5 contaminação em ambos o mosto e os vasos de fermentação foram controlados através de prática diligente de técnicas assépticas. Os ensaios de fermentação com todos os três tipos de
veículos, que duram por vários meses, não mostraram níveis detectáveis de contaminantes (monitorados pelos métodos
10 reportados no Capítulo 4). Níveis mais altos do que os desejados de diacetil (alvo menor do que 30 mg/L) e acetaldeído (alvo menor do que 10 mg/L), artomentam os produtos a partir das fermentações primárias contínuas, mas estes níveis não foram
devido a infecção bacteriana. Estes achados não diferem daqueles
15 reportados na literatura (Pajunen e outros., 2000; Kronlof e outros., 2000). Uma cervejaria belga virou seus altos níveis de acetaldeído na cerveja de um processo de fermentação contínua em uma característica de venda, e comercializou o produto como
uma ale com sabor de maçã (Andries e outros., 1996b).

20 Altos níveis de diacetil seguindo fermentação primária são também normais na indústria de fabricação de bebida fermentada. Alguns fabricantes de cerveja têm adotado uma prática denominada “elevação livre de temperatura”, seguindo a
completação de sua fermentação primária de modo a auxiliar na
25 redução de diacetil. Outros têm adotado simplesmente manter seus produtos por períodos mais longos de tempo durante o

processo de envelhecimento para alcançar a redução de dicetonas vicinais (diacetil e 2,3-pentanodiona) aos níveis desejados. Em outra aproximação, vários grupos de pesquisa desenvolveram a tecnologia de envelhecimento rápido discutida no Capítulo 2 para negociar com altos níveis de diacetil. Embora esta aproximação seja muito efetiva, ela acrescenta outro nível de complexidade ao processo de fabrico de bebida fermentada que alguns podem encontrar dificuldade de aceitar.

As economias do processo de envelhecimento rápido são muito claras, contudo, nestes dias de hoje de processamento contínuo na indústria de fabrico de bebida fermentada, podendo ser aconselhável minimizar a complexidade tecnológica de modo a facilitar a transição de fermentação de dosagem tradicional para produção contínua. Por esta razão, foi decidido investigar o uso de uma retenção de dosagem seguindo fermentação primária contínua no interior de sistemas de elevação de gás de escala piloto de 50 L para controlar os altos níveis de diacetil na cerveja acabada. Esta etapa de processamento adicional não estava prevista no começo deste programa de Ph.D.; contudo, não é necessário implementar tal medida de modo a comparar as cervejas produzidas continuamente às cervejas de controle de dosagem.

6.6.1 Uso de Retenção de Dosagem Seguindo Fermentação Primária Contínua

Um parâmetro crítico na determinação da completção de fermentação primária é o nível de diacetil no

líquido fermentado final. A conversão do precursor de diacetil, a-acetolactato, em diacetil, é a etapa de limitação de taxa na trajetória de diacetil (Figura 3.5). A primeira reação é química na natureza, e é altamente dependente da temperatura. Se a cerveja “verde” entra no processo de envelhecimento frio antes que a conversão química de a-acetolactato em diacetil tenha ocorrido, a cerveja resultante pode ter níveis de diacetil acima do limite de sabor de mg/L, a menos que os períodos de envelhecimento frio estendido sejam usados para permitir que a conversão baixa do precursor ocorra. Em todas as três fermentações contínuas descritas na seção 6.5, o nível de diacetil que sai do reator estava acima do valor alvo desejado de 30 mg/L na cervaja não-diluída. Se o líquido foi filtrado neste estágio para remover a levedura, o diacetil permaneceria alto; conseqüentemente, um período de dosagem quente foi empregado para reduzir o valor de diacetil para abaixo do limite aceitável.

A cerveja continuamente fermentada foi coletada e mantida em vasos de cerveja de aço inoxidável de 40-L a 21 °C. Pequenas amostras (100 mL) foram retiradas regularmente a partir do líquido, e analisadas para diacetil, etanol, gravidade específica, ésteres e álcoois fundidos. A Figura 6.74 mostra a redução de diacetil versus tempo de retenção quente para uma dosagem de cerveja continuamente fermentada com levedura LCC290 como a matrix de imobilização. O período de retenção quente foi efetivo na redução do nível de diacetil de ~600 mg/L

para abaixo de 30 mg/L, o que é considerado na indústria de fabrico de bebida fermentada como o limite de “pré-gota”.

Em outro teste, o efeito de agitação na redução de diacetil durante o período de retenção foi investigado. Um gás de aspergimento de dióxido de carbono ($0.14 \text{ m}^3/\text{h}$) foi introduzido através de um revestimento de aço inoxidável de 1.27 cm no fundo do vaso de coleta de cerveja para manter o líquido agitado durante o período de retenção. A Figura 6.75 apresenta os resultados deste experimento. Parece que a agitação provida pelo aspergimento de CO_2 tem muito pouco impacto na taxa de redução de diacetil neste segundo tanque de retenção. Este resultado pode ser indicativo de mistura inadequada provida pelo gás de mistura de CO_2 , portanto, não aumentando a taxa de redução da 1ª reação química (conversão de a-acetolactato em diacetil), ou não aumentando a taxa de transferência de massa para a 2ª reação ocorrer mais rapidamente (conversão de diacetil em acetoína por levedura). Pode também ser possível que o vaso não-agitado tenha células o bastante em suspensão para redução adicional de diacetil na acetoína inativa de aroma, uma vez que a conversão química de limitação de taxa (1ª etapa) tenha ocorrido.

Os efeitos desta retenção de dosagem quente seguindo fermentação primária contínua nas concentrações de ésteres e álcoois fundidos, e na concentração de etanol, e a gravidade específica do líquido, são apresentados nas Figuras 6.76 e 6.77, respectivamente. A partir destes resultados, parece que o período de retenção quente tinha pouco efeito nas

concentrações de acetaldeído, etil acetato, propanol, isobutanol, isoamil álcool, e isoamil acetato (Figura 6.76). A gravidade específica do líquido no vaso de retenção diminuiu de 2.7 °P para 2.0 °P nas primeiras 12 horas do período de retenção, e, em seguida, se nivela neste valor inferior. A concentração de etanol foi constante em 70 mg/L através do período de teste de 65 horas. Estes resultados indicam que o período de retenção afetaria principalmente a concentração de diacetil e 2,3-pentanodiona, enquanto o impacto nos ésteres, álcoois fundidos e etanol seria mínimo.

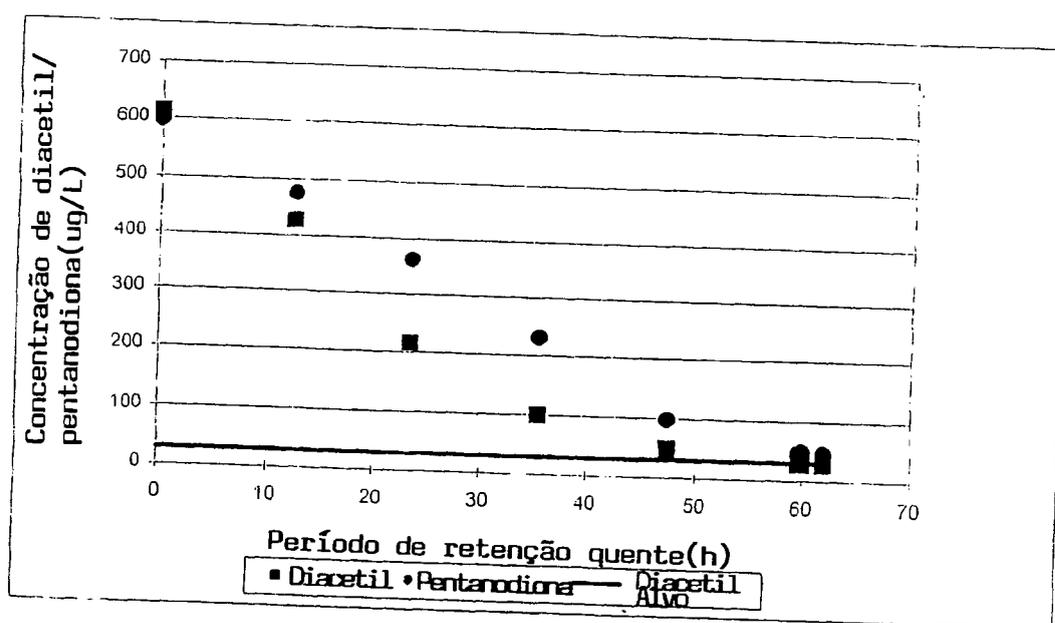
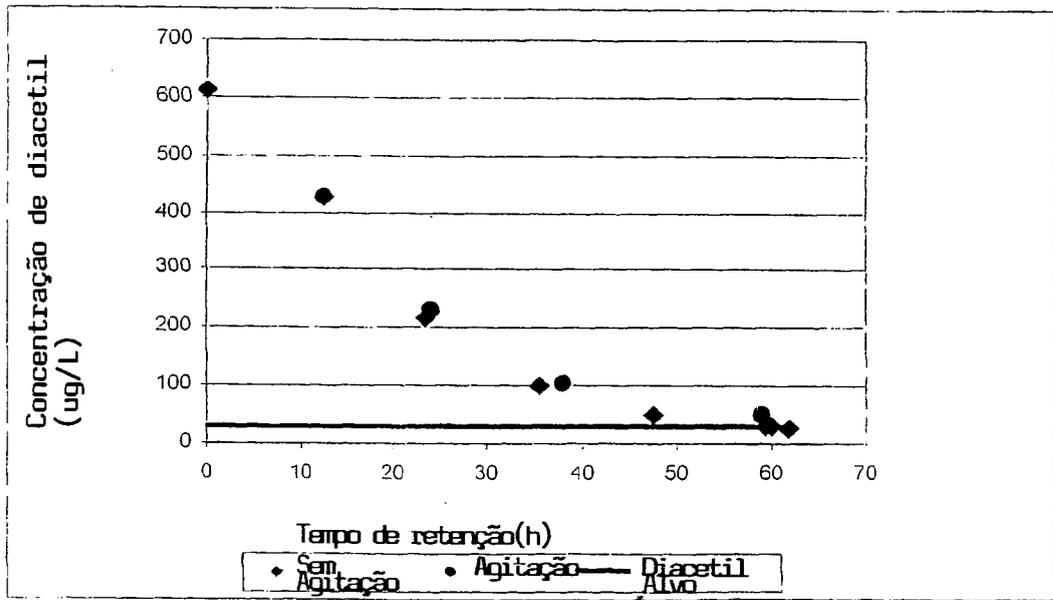
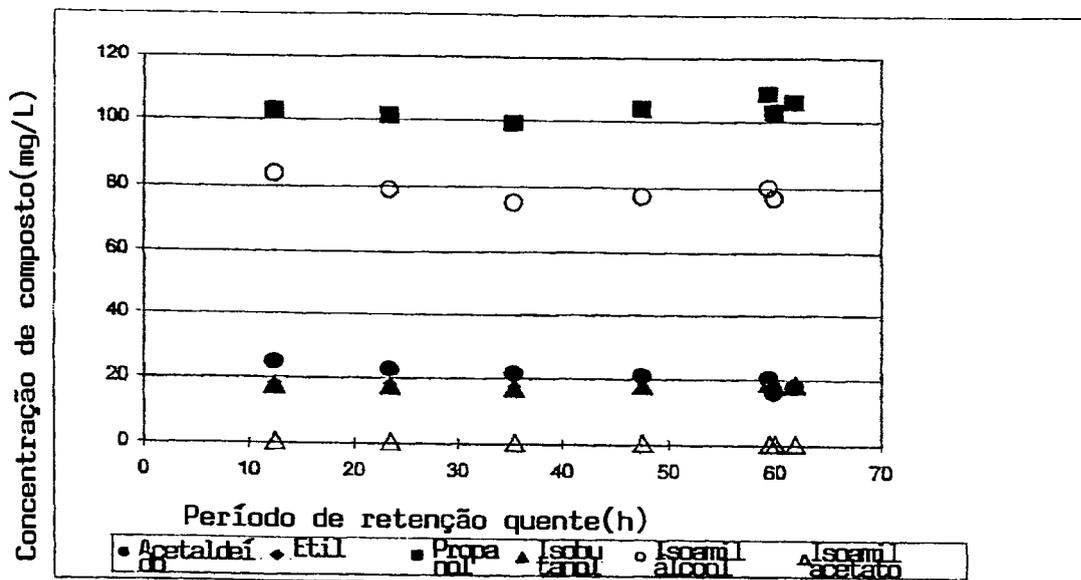


FIGURA 6.74 CONCENTRAÇÃO DE DICETONAS VICINAIS VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290 NOS SISTEMAS DE ELEVAÇÃO DE GÁS.



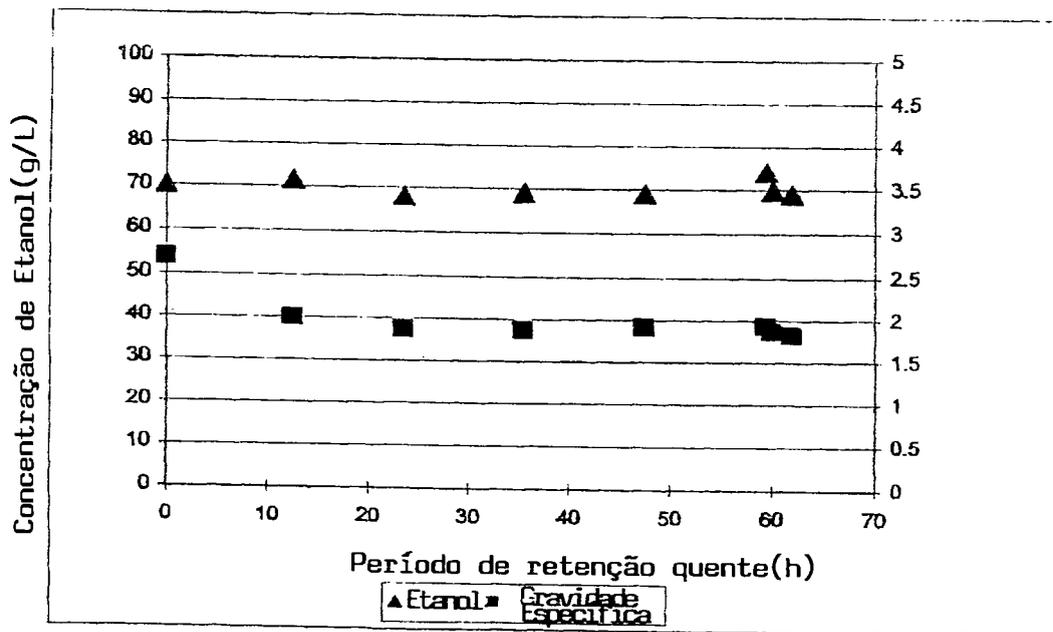
10 **FIGURA 6.75 CONCENTRAÇÃO DE DIACETIL VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290 NO SISTEMA DE ELEVÇÃO DE GÁS. UMA AMOSTRA FOI AGITADA**
 15 **PELO ASPERGIMENTO DE GÁS DE DIÓXIDO DE CARBONO NA MESMA, ENQUANTO A OUTRA AMOSTRA FOI DEIXADA ESTÁTICA.**



20

25

FIGURA 6.76 CONCENTRAÇÕES DE ÉSTER E ÁLCOOIS FUNDIDOS VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290 NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS.



15

FIGURA 6.77 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E GRAVIDADE ESPECÍFICA VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290 NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS.

O protocolo de retenção de dosagem foi realizado no líquido produzido a partir das fermentações contínuas no bioreator de elevação de gás de 50 L usando levedura super-flocosa LCC290, levedura flocosa média LCC3021, ou levedura imobilizada de k-carrageenan. Os perfis de

25

redução de diacetil destes três cursos de teste são apresentados na Figura 6.78. O diacetil foi bem sucedidamente reduzido para seu valor alvo de 30 mg/L nos três casos. O tempo que foi necessário para alcançar esta redução, contudo, variou em todos os três 5 casos. Na situação do LCC290, a redução de 600 mg/L para 30 mg/L foi efetuada em aproximadamente 48 horas, pelo que a fermentação de LCC3021 e a fermentação de k-carrageenan somente requer ~24 horas e ~40 horas para alcançar este valor alvo. Foi postulado que esta discrepância estava relacionada ao 10 valor de partida inicial de diacetil, e não no tipo de matrix de imobilização utilizada.

A Figura 6.79 ilustra os mesmos resultados de diacetil da Figura 6.78 com um ajuste de tempo realizado nos resultados das fermentações de LCC3021 e k-carrageenan. As 15 curvas de redução de diacetil originais a partir das duas últimas fermentações foram alteradas de modo que seus valores iniciais caíram na curva de redução de diacetil gerada pela levedura super-flocosa LCC290. Com esta transformação, o perfil de redução de diacetil para todos os três sistemas parece cair na 20 mesma linha. Usando-se o software da Curva de Tabela 2D, estes resultados foram curva ajustada para uma equação cinética de primeira ordem (Levenspiel, 1972) (Figura 6.80). Foi calculado que os dados experimentais ajustados a partir da Figura 6.79 se ajustaram à seguinte equação:

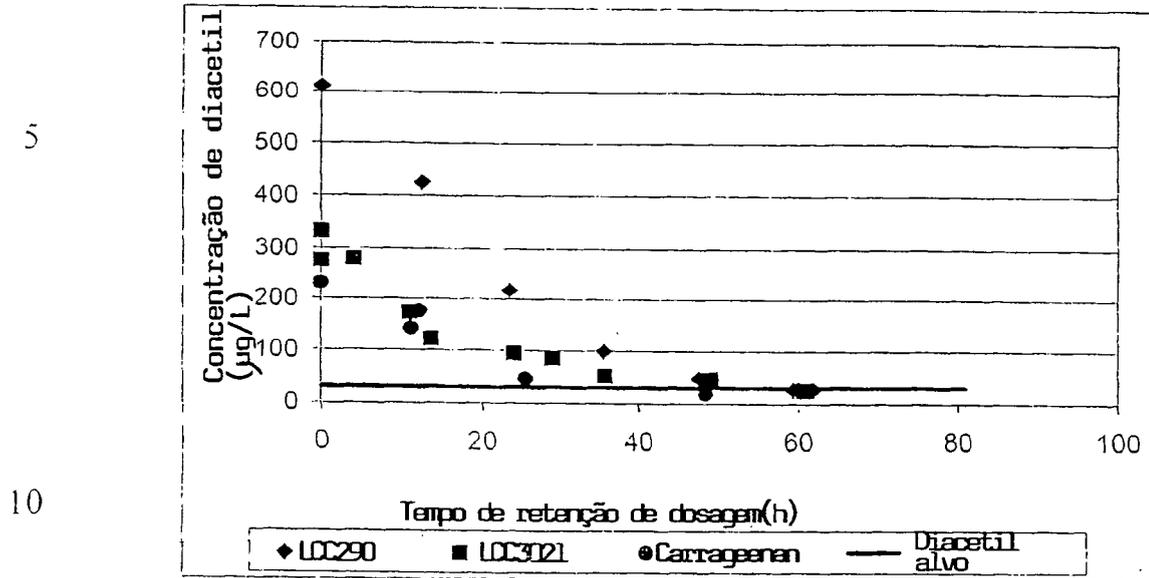
$$25 \quad [\text{Diacetil}] = 648.54 e^{(-0.0426 t)}$$

(6.1)

com uma correlação de coeficiente de 0.96. Este resultado suporta fortemente a teoria que todos os três sistemas de imobilização exibiram o mesmo potencial de redução de diacetil. Os resultados não deviam ser surpreendentes, visto que a
5 redução de diacetil está freqüentemente ligada à linhagem de levedura (Nakatani e outros., 1984). O sistema k-carrageenan imobilizou a levedura LCC3021 dentro de sua estrutura de gel, e a levedura LCC290 era uma variante selecionada da linhagem de LCC3021.

10 Uma vez que o nível de diacetil estava abaixo do nível alvo de 30 mg/L, as cervejas resultantes eram envelhecidas em armazenagem fria (2 °C) por 7 dias antes de suportar a preparação de produto final (filtração, diluição, carbonação e acondicionamento). A Tabela 6.3 resume a análise
15 das cervejas produzidas nos sistemas de escala piloto de 50-L com, ou levedura LCC290, levedura LCC3021, ou levedura imobilizada de k-carrageenan como as matrizes de imobilização. A Figura 6.81 é um gráfico radar dos ésteres e álcoois fundidos das três cervejas produzidas continuamente e de uma cerveja de
20 controle produzida industrialmente na dosagem. Conforme comparados ao líquido de dosagem produzido industrialmente (controle), os líquidos contínuos têm ésteres baixos (etil acetato, isoamil acetato) e propanol mais alto e isobutanol mais baixo, amil álcool primário, e isoamil álcool. Os níveis de acetaldeído
25 nos produtos de fermentação contínuos foram mais altos do que o líquido de controle. O nível de espumamento, névoa fria inicial,

névoa quente, dimetil sulfeto, dióxido de enxofre, dióxido de carbono, e níveis de ar, estavam dentro das especificações.



15

FIGURA 6.78 CONCENTRAÇÃO DE DIACETIL VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290, LEVEDURA LCC3021 E LEVEDURA IMOBILIZADA DE GEL DE CARRAGEENAN NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS.

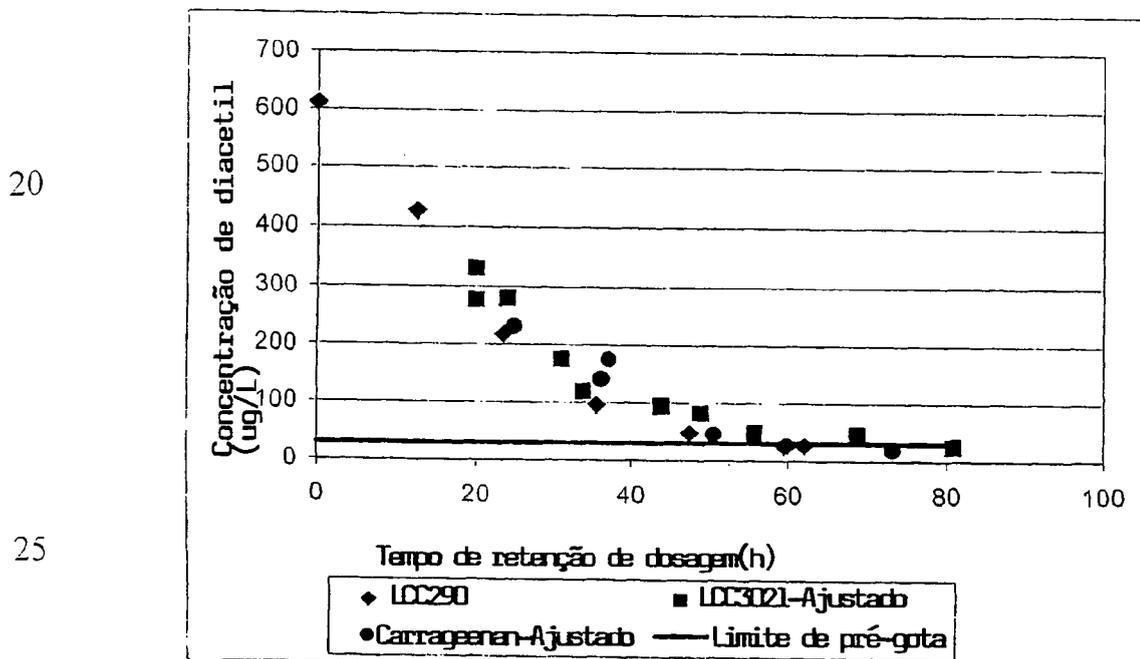


FIGURA 6.79 CONCENTRAÇÃO DE DIACETIL VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290, LEVEDURA LCC3021 E LEVEDURA IMOBILIZADA DE GEL DE CARRAGEENAN NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS. OS VALORES PARA FERMENTAÇÃO DE LCC3021 E PARA FERMENTAÇÃO DE CARRAGEENAN FORAM AJUSTADOS NO TEMPO PARA TER O MESMO PONTO DE PARTIDA COMO A FERMENTAÇÃO DE LCC290.

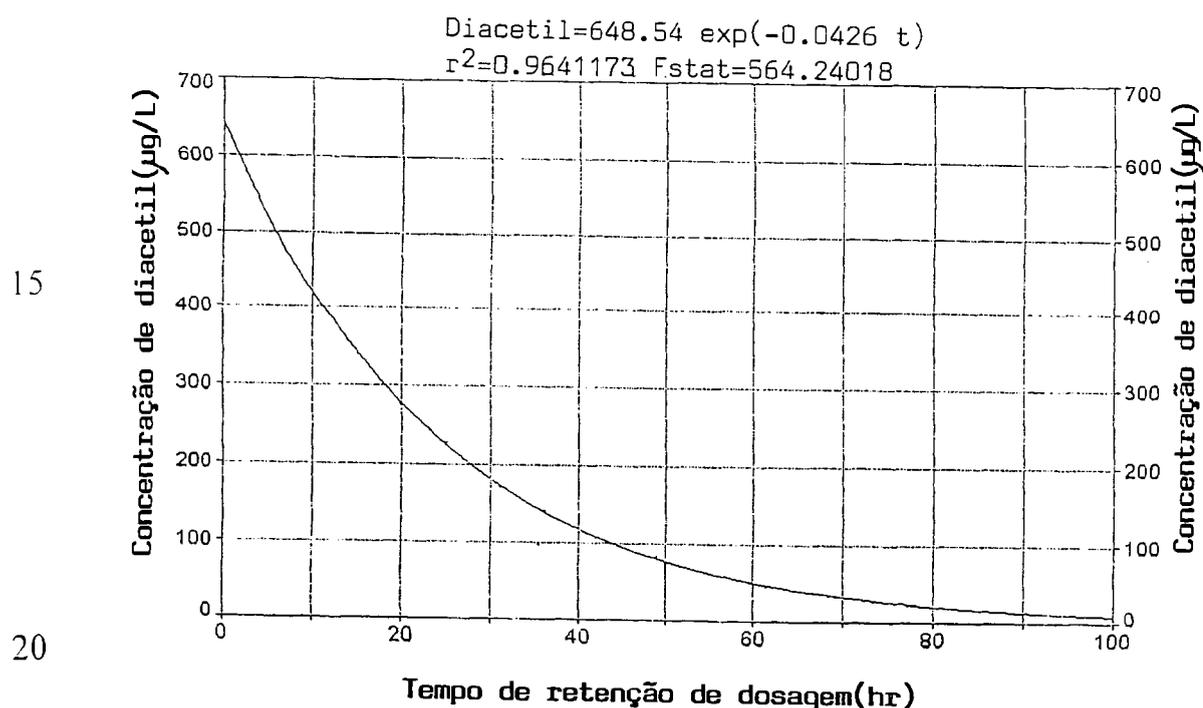


FIGURA 6.80 CONCENTRAÇÃO DE DIACETIL VERSUS RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA CONTÍNUA COM LEVEDURA LCC290, LEVEDURA LCC3021 E LEVEDURA IMOBILIZADA DE GEL DE

CARRAGEENAN NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS. OS VALORES PARA FERMENTAÇÃO DE LCC3021 E PARA FERMENTAÇÃO DE CARRAGEENAN FORAM AJUSTADOS NO TEMPO PARA TER O MESMO PONTO DE PARTIDA COMO A FERMENTAÇÃO DE LCC290.

Vários outros parâmetros (extrato aparente, extrato real, extrato original calculado, cor, amargor) que são intimamente afetados pela diluição do produto de sua concentração de etanol original ao valor final de 5,0 % v/v, foram diferentes do controle porque os produtos contínuos requerem diluição mais alta com água para alcançar o valor de etanol desejado devido a concentrações de etanol original mais altas (70 g/L versus 60 g/L na dosagem). A Figura 6.82 é um gráfico radar de álcool, diacetil, pH, cor e amargor dos mesmos líquidos descritos acima. O nível de álcool, diacetil e pH estão bem dentro do objetivo, pelo que a cor e amargor estão fora da especificação. A cor mais clara está relacionada à diluição mais alta que os líquidos contínuos suportam, e isto pode ser ajustado pelo aumento da cor na alimentação de mosto de nutriente. Os valores de amargor estão também sujeitos a este mesmo erro de diluição, e seria bem ajustado na alimentação de mosto.

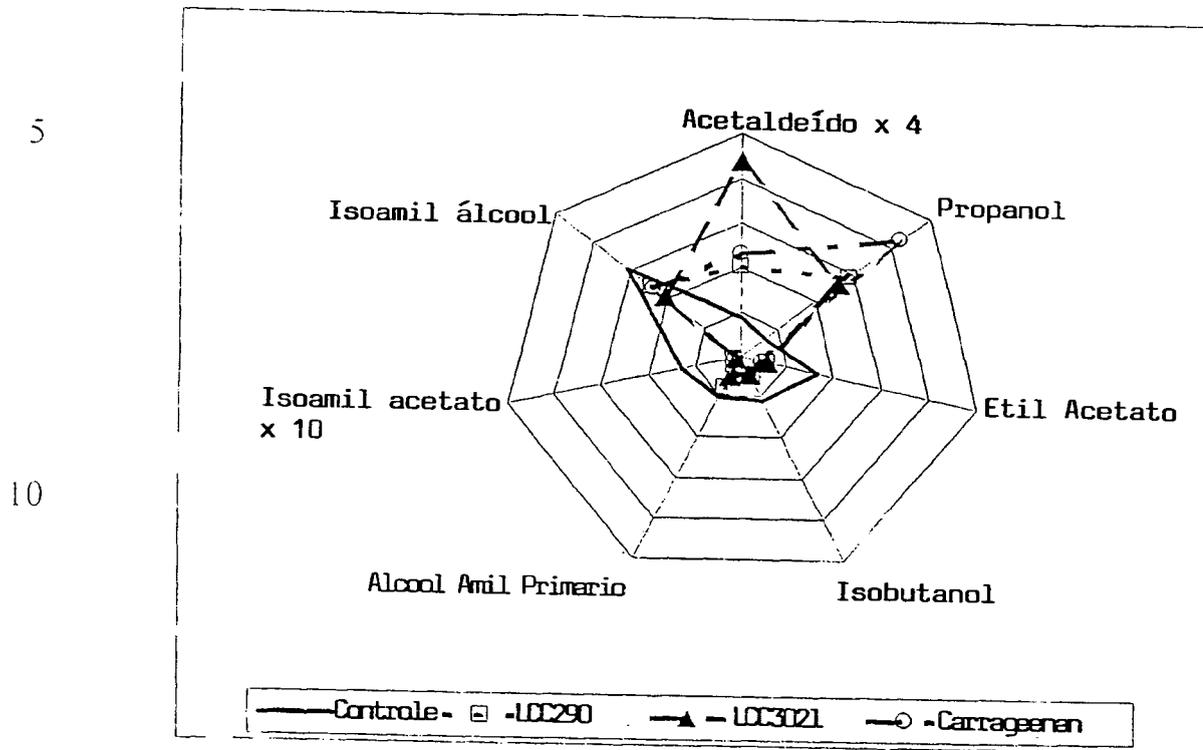
Tabela 6.3 Resumo da análise nas cervejas produzidas usando-se o sistema de elevação de gás.

Especificação	Líquido de dosagem fermentado industrialmente	Líquido fermentado continuamente de LCC290
Ar (mL)	<1	0,40
Dióxido de carbono (%)	2,75	2,90
Dióxido de enxofre (mg/L)	<10	0
Dimetil sulfeto (µg/L)	<70	59
Amargor (BU)	12,00	11,30
Cor (SEM)	3,20	2,20
pH	4,10	4,15
Diacetil (µg/L)	<20	12
Álcool (%v/v)	5,00	4,99
Álcool (%peso/peso)	3,93	3,93
Extrato Aparente (°P)	1,55	1,02
Extrato Real (°P)	3,36	2,84
Extrato Original de Calc. (°P)	11,0	10,5
Névoa Quente (FTU)	<200	45
Névoa Fria Inicial (FTU)	<100	43
Espuma (s)	>170	167

Acetaldeído (mg/L)	4,4±1,3	10,0
Propanol (mg/L)	12,8±6,8	57,6
Etil acetato (mg/L)	32,4±4,3	11,0
Isobutanol (mg/L)	21,6±3,4	10,6
Álcool Amil Primário (mg/L)	20,0±2,3	15,2
Álcool isoamil (mg/L)	60,9±8,6	48,0
Isoamil acetato (mg/L)	2,5±0,7	0,32

Especificação	Líquido fermentado continuamente de LCC3021	Líquido fermentado continuamente de carrageenan
Ar (mL)	0,35	0,35
Dióxido de carbono (%)	2,81	2,73
Dióxido de enxofre (mg/L)	0	0
Dimetil sulfeto (□g/L)	30	30
Amargor (BU)	13,74	13,18
Cor (SEM)	2,10	2,30
pH	4,10	4,09

Diacetil (\square g/L)	12	9
Álcool (%v/v)	5,03	5,04
Álcool (%peso/peso)	3,96	3,96
Extrato Aparente ($^{\circ}$ P)	1,40	1,44
Extrato Real ($^{\circ}$ P)	3,24	3,27
Extrato Original de Calc. ($^{\circ}$ P)	11,0	11,0
Névoa Quente (FTU)	50	47
Névoa Fria Inicial (FTU)	51	54
Espuma (s)	187	175
Acetaldeído (mg/L)	21,9	11,6
Propanol (mg/L)	51,7	84,3
Etil acetato (mg/L)	10,6	8,7
Isobutanol (mg/L)	8,3	8,9
Álcool Amil Primário (mg/L)	9,4	6,4
Álcool isoamil (mg/L)	40,9	46,5
Isoamil acetato (mg/L)	0,25	0,18



15

FIGURA 6.81 GRÁFICO RADAR DE CERVEJAS CONTINUAMENTE FERMENTADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS USANDO-SE OU LEVEDURA LCC290, LEVEDURA LCC3021 OU LEVEDURA LCC3021 IMOBILIZADA EM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN. OS ÉSTERES E ÁLCOOIS FUNDIDOS DAS CERVEJAS ACABADAS SÃO REPRESENTADOS NESTE GRÁFICO. TODOS OS PRODUTOS FORAM SUBMETIDOS A UMA RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO O ESTÁGIO DE FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA.

20

25

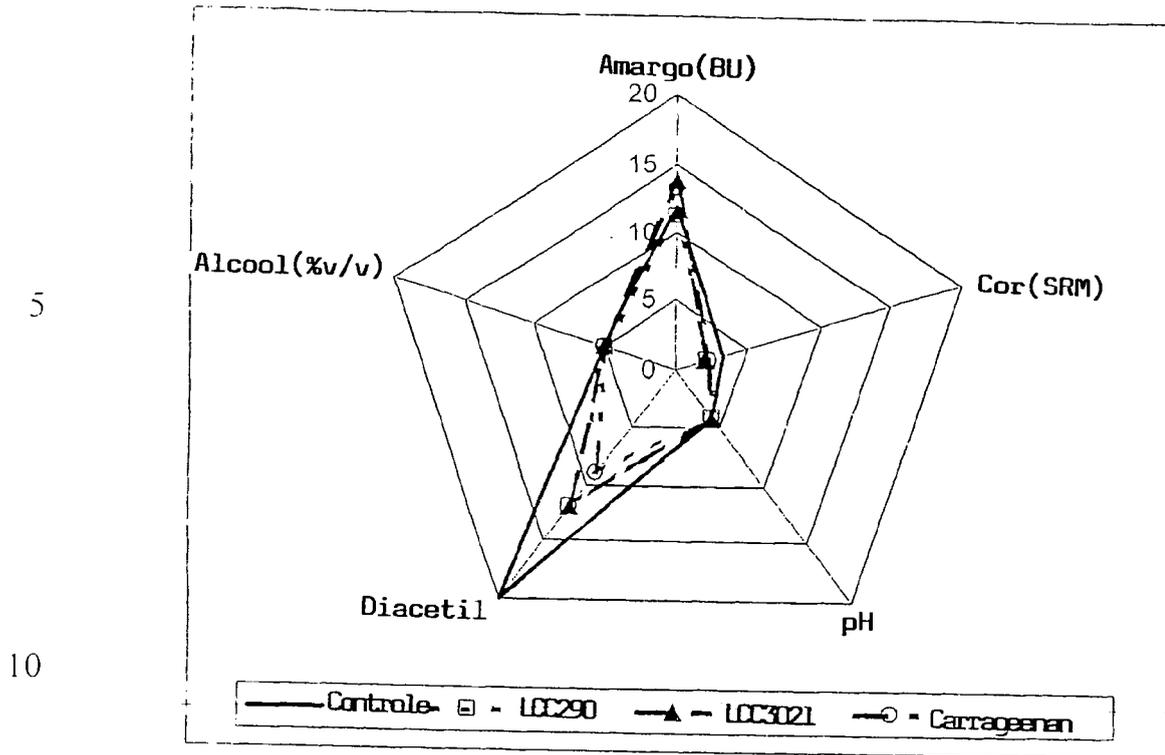


FIGURA 6.82 GRÁFICO RADAR DE CERVEJAS CONTINUAMENTE FERMENTADAS NO SISTEMA DE ELEVAÇÃO DE GÁS USANDO-SE OU LEVEDURA LCC290, LEVEDURA LCC3021 OU LEVEDURA LCC3021 IMOBILIZADA EM GOTAS DE GEL DE CARRAGEENAN. OS ÉSTERES E ÁLCOOIS FUNDIDOS DAS CERVEJAS ACABADAS SÃO REPRESENTADOS NESTE GRÁFICO. TODOS OS PRODUTOS FORAM SUBMETIDOS A UMA RETENÇÃO DE DOSAGEM QUENTE SEGUINDO O ESTÁGIO DE FERMENTAÇÃO PRIMÁRIA.

6.6.2 Seleção do melhor gás de aspergimento

O dióxido de carbono é prontamente disponível em muitas cervejarias, visto que é um sub-produto natural de fermentação de cerveja. As cervejarias coletam o CO₂ envolvido

e, em seguida, lavam a corrente de gás para remover impurezas leves que podem ter sido transportadas na corrente de coleta (tipicamente compostos sulfurosos). Esta corrente purificada é, em seguida, comprimida e armazenada como um líquido para uso futuro na cervejaria (99.95 % pura). O uso de dióxido de carbono como um gás de aspergimento na fermentação contínua parece similar a uma escolha lógica de um ponto de vista de operações. A instalação seria capaz de utilizar seu sistema de coleta e recuperar o CO₂ que sai do fermentador contínuo. O uso de outros gases somente adicionaria outro nível de complexidade às operações de instalações existentes.

Contudo, para a fermentação contínua tornar-se uma alternativa viável para as operações de dosagem existentes, é necessário produzir-se um produto que seja uma equiparação próxima às marcas existentes. Acredita-se que pela minimização dos impactos biológicos/bioquímicos que a levedura é exposta durante fermentação contínua, pode ser possível alcançar tal equiparação de produto. O dióxido de carbono é conhecido por afetar adversamente o metabolismo da levedura durante a fermentação primária. Este efeito é ampliado nos vasos cilindro-cônicos de calda, onde a pressão superior inerente ao sistema suprime a liberação livre de CO₂ a partir do meio líquido. Estas condições tendem a produzir cervejas com ésteres inferiores e álcoois fundidos superiores. Tentativas bem sucedidas têm sido feitas para remover algum deste CO₂ a partir da fermentação pela injeção periodicamente de uma corrente de gás auxiliar no fundo

do vaso cilindro-cônico. Os efeitos de inibição de CO₂ parecem ter sido reduzidos com os produtos resultantes contendo menos álcoois fundidos e níveis de éster mais altos.

Pautado neste conhecimento, o uso de gás nitrogênio ao invés de dióxido de carbono como o gás de aspergimento no interior do sistema de elevação de gás, foi investigado. Tais líquidos fermentados nos reatores de elevação de 50-L foram coletados e processados na Cervejaria Experimental da Labatt utilizando as seguintes etapas. Após 14 horas de coleta a partir do reator (tempo de residência de 24 horas), a “cerveja verde” foi decantada a partir da levedura. Este líquido foi, em seguida, submetido à um período de retenção de temperatura ambiente (21°C) por 48 horas, que segue ambos diacetil e acetaldeído para alcançar as especificações Labatt (diacetil <30 mg/L e acetaldeído <10 mg/L). Este líquido foi, em seguida, envelhecido à frio por 7 dias, e processado usando-se práticas industriais padrões.

A Tabela 6.4 compara os resultados de cervejas acabadas obtidas de fermentação continua com levedura LCC290 sob sistemas aspergido com CO₂ e aspergido com N₂ para um líquido padrão industrialmente produzido (controle). O líquido aspergido de nitrogênio se compara favoravelmente ao líquido industrialmente produzido. A análise indicou que existem duas vezes mais 1-propanol no líquido, enquanto que a concentração de dimetil sulfeto era aproximadamente três vezes mais baixa. Ambos os valores de cor e amargor pareceram ser mais altos do

que o líquido industrial conforme o potencial de espumamento conforme medido pelo teste de NIBEM. A cerveja aspergida com CO₂ tinha ésteres inferiores (etil acetato, isoamil acetato), e 1-propanol mais alto do que o líquido aspergido com nitrogênio. As razões de ésteres (etil acetato, isoamil acetato, etil hexanoato, etil octanoato, etil decanoato) para álcool (1-propanol, isobutanol, isoamil álcool) foram calculadas para o líquido de controle, o líquido aspergido com nitrogênio e o líquido aspergido com CO₂, e foram encontradas para serem 0.30, 0.27, 0.15 respectivamente.

10

Tabela 6.4 Resumo da análise química para vários produtos fermentados continuamente usando-se o sistema de elevação de gás carregado com levedura super-flocosa LCC290.

<u>Análise</u>	Líquido de dosagem industrialmente fermentado	Líquido fermentado continuamente aspergido com nitrogênio	Líquido fermentado continuamente aspergido com CO ₂
Acetaldeído (mg/L)	2,53	3,68	4,80
Etil acetato (mg/L)	28,08	30,90	14,14
1-propanol (mg/L)	13,03	28,45	40,03
Isobutanol (mg/L)	17,15	17,89	7,01
Isoamil acetato (mg/L)	2,57	2,06	0,69
Isoamil álcool (mg/L)	74,54	78,45	51,35
Etil hexanoato (mg/L)	0,140	0,180	0,074

Etil octanoato (mg/L)	0,110	0,280	0,059
Etil decanoato (mg/L)	0,0079	0,0630	0,0081
Diacetil (μ g/L)	6	9	10
2,3-pentanodiona (μ g/L)	4	5	14
Dióxido de enxôfre (mg/L)	1,3	1	0
Dimetil sulfeto (mg/L)	79	24	64
Amargor (BU)	11,5	20,6	15,5
Cor (SRM)	3,1	4,1	3,7
Espuma (s)	176	210	195
Ventoinha (mg/L)		92	84
PH	4,13	4,10	4,19
RE ($^{\circ}$ P)	3,38	4,08	3,601
COE ($^{\circ}$ P)	10,97	12,77	11,50
Álcool (%v/v)	4,93	5,74	5,17

A Figura 6.83 é o gráfico radar representando as concentrações de éster, álcoois fundidos e acetaldeído para os três líquidos. O perfil do líquido aspergido com nitrogênio segue proximoamente aquele da cerveja de controle, exceto para um nível de propanol mais alto. A fermentação aspergida com CO₂ exibiu ésteres e álcool fundido que não se equiparam ao controle. Em ambos os líquidos de fermentação contínua, os níveis de diacetil e acetaldeído foram abaixo das especificações da Labatt.

As descobertas sugeriram que o aspergimento com nitrogênio aumentou a produção de ésteres para níveis similares conforme aqueles das cervejas comerciais, pelo que o aspergimento com dióxido de carbono produziu líquidos com concentrações de éster relativamente mais baixas. Estes resultados sugeriram um metabolismo de levedura alterado sob o ambiente aspergido com CO₂. Os níveis de propanol, indiferente do gás de aspergimento, eram muito mais altos nas cervejas continuamente fermentadas do que aqueles medidos nas cervejas de controle continuamente fermentadas. Embora as concentrações de propanol estejam bem abaixo do limite de sabor de 100 mg/L, as diferenças notadas podem ser um indicador de metabolismo levemente alterado que ocorre na fermentação contínua conforme comparado à fermentação de dosagem. É também possível que o nível mais alto de propanol seja devido ao suprimento contínuo do amino ácido treonina, através do qual a trajetória de degradação oxo-ácido produzirá propanol.

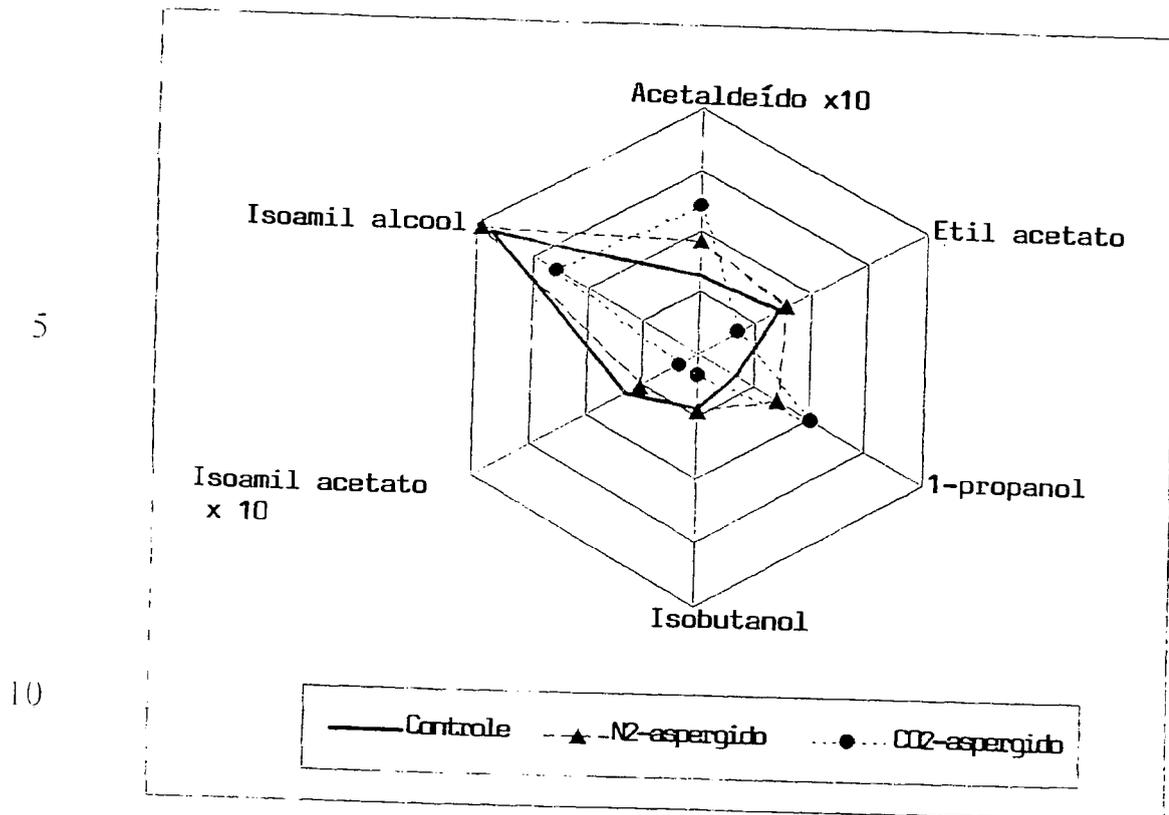


FIGURA 6.83 GRÁFICO RADAR COMPARANDO ÉSTERES E ÁLCOOIS FUNDIDOS DE LÍQUIDOS DE FERMENTAÇÃO DE ELEVAÇÃO DE GÁS CONTÍNUA ASPERGIDOS COM NITROGÊNIO E DIÓXIDO DE CARBONO PARA LÍQUIDO INDUSTRIALMENTE PRODUZIDO.

CAPÍTULO 7.0 CONCLUSÕES

As conclusões seguintes podem ser tiradas a partir da pesquisa realizada através desta tese. Uma cerveja aceitável sem maiores defeitos no aroma pode ser produzida usando-se um bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto de 50-L como o fermentador contínuo quando seguido por uma retenção de dosagem de 2 dias para o controle de diacetil. Um tempo de residência mínimo de 24 horas ou 1 volume de reator de giro por dia é alcançável para a fermentação

de mosto de alta gravidade (17.5 °P) em um caldo fermentado final (2.5 °P). O uso de levedura super-flocosa LCC290, levedura flocosa média LCC3021 e levedura imobilizada k-carrageenan são todas veículos seguros no interior do sistema de elevação de gás. O uso de veículos pré-formados mais pesados tais como gotas de vidro Siran[®] e gotas de terra diatomácea Celite[®] não são alternativas práticas no interior do sistema de tubo de tiragem de ar de elevação de gás. Um mínimo de 2 meses de operação continua no caso de gotas de gel de k-carrageenan, e um mínimo de 3 meses de operação contínua no caso de fermentações de LCC290 e LCC3021 são alcançáveis sem experimentar qualquer contaminação microbial ou instabilidades de performance do reator. Em adição, o sistema contínuo foi capaz de manuseio potencial e assumiu variações no suprimento de mosto industrial e durante os períodos de curso estendidos.

A fermentação continua usando a levedura super-flocosa LCC290 com nitrogênio como o gás de aspergimento, seguida por uma retenção de dosagem de 2 dias, produziu equiparações de aroma mais próximas a uma cerveja de controle industrial. A retenção de dosagem de 2 dias aconselhando tratar com as altas concentrações de diacetil no líquido de descarga do fermentador primário contínuo foi um mecanismo de controle efetivo, embora não ótimo. A capacidade de redução de diacetil dos três sistemas de fermentação testados foi muito similar e, conforme anteriormente suspeitado, este traço pode ser atribuído ao tipo de linhagem. O período de retenção de

dosagem não afeta as concentrações de ésteres e álcoois fundidos na cerveja durante o estágio de retenção.

A utilização de 3% de oxigênio no gás aspergido proporciona níveis de nutriente de oxigênio adequados no mosto, resultando na manutenção de uma população de levedura viável (acima de 90 %) através dos cursos de fermentação, enquanto produz cervejas com um perfil de aroma aceitável. As fermentações contínuas usando levedura LCC290 e levedura LCC3021 como as matrizes de imobilização, alcançaram um estado pseudo-constante mais rapidamente do que o sistema de gota de gel de k-carrageenan. A instabilidade das fermentações imobilizadas de k-carrageenan, possivelmente resultante de um aumento na população de levedura imobilizada, causou a fermentação de produto abaixo dos níveis alvos. Para produção contínua ideal, este fenômeno é altamente indesejável a medida que a partida prolongada aumenta o tempo necessário para reagir e recomeçar, seguindo uma falha catastrófica. Uma fase de partida mais longa também requererá uma fase de curso contínuo mais longo de modo a tornar-se atrativa.

O processo de produção de gota de gel contínuo produz as quantidades requeridas de gotas para teste dentro das unidades de escala piloto. É, contudo, necessário, otimizar adicionalmente o processo de produção de gota de modo a produzir gotas com uma distribuição de tamanho mais ajustada. O processo também requer investigação particular para determinar sua adequabilidade em uma escala industrial. Preferivelmente do

que o tipo de cinética investigado nesta pesquisa, um novo tipo de misturador estático para esta escala pode ser alcançado pelo aumento do diâmetro, preferivelmente do que somente no número de misturadores estáticos deve ser encontrado e testado para esta opção tornar-se viável.

A técnica de traçador de pulso de ácido utilizada nesta tese permite-nos assessorar o tempo de mistura e taxa de circulação dentro do bioreator de escala piloto de 50-L durante fermentações atuais envolvendo levedura super-flocosa LCC290, levedura flocosa média LCC3021 e levedura imobilizada de k-carrageenan. Os dados de mistura foram ajustados em uma função senoidal de queda da qual o tempo de mistura e taxa de circulação foram calculados.

Mistura rápida é provida dentro do sistema de tubo de tiragem de ar de elevação de gás com tempos de mistura calculados em menos do que 200 segundos para todos os três tipos de veículos de imobilização. O tempo de mistura diminuiu levemente com o aumento na velocidade de gás superficial em todos os três cenários testados. Em todas as velocidades de gás superficial (2 mm/s a 6 mm/s), o sistema de LCC290 mostrou os tempos de mistura mais rápidos (entre 100 s e 120 s). Os tempos de circulação de líquido foram muitos similares para todos os três tipos de veículo, indiferente da velocidade de gás superficial. Eles também diminuem linearmente com aumentos correspondentes na velocidade de gás. A mistura completa de líquido (98% de resposta a um pulso) ocorreu com três a seis ciclos de circulação

de reator para todos os veículos de imobilização testados. Estes resultados confirmaram que o sistema de escala piloto de 50-L proporcionou mistura adequada para fermentação contínua. Tempos de mistura pobres teriam sido indicativos de zonas mortas possíveis que teriam sido indesejáveis para fermentação de
5 cerveja.

O trabalho de pesquisa de Ph.D. demonstrou claramente a confiança de obter-se uma escala adicional do sistema de produção designado, construído e operado na
10 Cervejaria Experimental da Labatt. O uso de um bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás com levedura super-flocosa LCC290 e nitrogênio como o gás de aspergimento, seguido por uma retenção de dosagem de 2 dias a 21 °C, é recomendado como o sistema de escolha.

15 **Descrição Detalhada - Parte 2:**

CAPÍTULO 4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem de Levedura e Características

Uma linhagem de fabrico de bebida fermentada lager de *Saccharomyces cerevisiae*, Labatt Culture Collection
20 (LCC) 3021, foi usada através de todo este trabalho. *Saccharomyces cerevisiae* é sinônimo de *Saccharomyces uvarum* Beijerinck var. *carlsbergensis* Kudryavtsev, 1960 (Kurtzman, 1998). Á 37°C, LCC3021 não se desenvolverá. Isto ajuda a distinguir a levedura lager LCC 3021 de mais levedura ale, que se
25 desenvolverá a 37°C e temperaturas mais altas. A LCC 3021 é uma linhagem de fermentação de fundo, como são muitas

leveduras lager, mas existem exceções. Ainda, esta linhagem fermentará glucose, galactose, sucrose, maltose, rafinose, e melibiose, mas não amidos. A capacidade de fermentar melibiose é uma ferramenta usada pelos taxonomistas para distinguir a mesma da levedura ale.

Como muitas linhagens de fabrico de bebida fermentada, a LCC 3021 é poliplóide e se reproduz por divisão mitótica. Sob condições de fabrico de bebida fermentada normais, a levedura não se reproduz por meiose. Isto tem a vantagem de produzir-se a linhagem de fabrico de bebida fermentada geneticamente estável porque a reticulação de material genético é menor similarmente (Kreger-van Rij, 1984).

4.2 Preparação de Inóculum de Levedura

A levedura foi tomada de um frasco criogenicamente preservado em um freezer a -80°C e riscada em meio de crescimento de Nutriente de Levedura de Peptona (PYN) agar (peptona, 3.5 g/L; extrato de levedura, 3.0 g/L; KH_2PO_4 , 2.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/L; glucose, 20.0 g/L; agar, 20.0 g/L em dH_2O), para obter-se colônias bem separadas. Um círculo estéril consistindo de várias colônias foi tomado da placa de ouro de 3-4 dias de levedura de crescimento, e estas colônias foram inoculadas em um volume de 10 mL de mosto em um tubo teste. Este foi permitido crescer a 21°C durante a noite; desse modo, o termo “cultura durante a noite”, e, em seguida, foi adicionado a um volume maior de mosto, usualmente 200 mL, para aumentar a biomassa de levedura. Nos

dias consecutivos, esta mistura foi adicionada a outro volume maior de mosto, e assim por diante, até que a quantidade desejada de biomassa de levedura fosse propagada. Geralmente espera-se produzir aproximadamente 20 g de levedura lager por litro de mosto. Para preparar a inoculação de levedura, a cultura foi centrifugada a 4°C e 1.0×10^4 rpm (raio = 0.06 m) por 10 minutos. Após centrifugação, o líquido foi decantado e peso molhado apropriado de levedura foi obtido a partir da pélete.

4.3 Meio de Fermentação de Mosto

As cervejarias Labatt do Canada supriram mosto de fabrico de bebida fermentada com uma gravidade específica de 17.5°P. A concentração de carboidratos fermentáveis, gravidade específica e amino nitrogênio livre no mosto usado para as fermentações através deste trabalho é dada no Apêndice A2.1. O detalhe adicional na composição do mosto é dado por Dale e outros., 1986, Hoekstra, 1975, Hough e outro., 1982, Klopper, 1974, e Taylor, 1989.

Fermentações de Dosagem: O mosto foi aquecido em um autoclave por 45 minutos a 100°C e, em seguida, arrefecido, antes da inoculação com gotas de célula imobilizada ou levedura livremente suspensa.

Fermentações Contínuas: O mosto usado para as fermentações contínuas foi pasteurizado (Trocador de Calor de Placa Fisher, combi-flow Type Eurocal 5FH) antes da alimentação no bioreator de elevação de gás, e este mosto foi monitorado regularmente para contaminantes microbiais,

conforme descrito na seção 4.6. Se contaminação foi detectada no mosto, ele foi imediatamente descartado, e novo mosto foi coletado a partir da instalação.

O pasteurizador foi operado a uma taxa de fluxo volumétrica de $0.8 \text{ m}^3 / \text{hora}$. A unidade tem uma seção de retenção tubular onde o mosto foi mantido a uma temperatura média de 85°C com uma temperatura mínima de 80°C . O volume da seção de retenção foi $1.13 \times 10^{-2} \text{ m}^3$, dando um tempo de residência na seção de retenção de 51 segundos. Seguinte à etapa de aquecimento, o mosto foi rapidamente arrefecido a uma temperatura de 2°C após saída da unidade.

4.4 Metodologia de Imobilização

Gel de Kappa-carrageenan X-0909 foi uma doação generosa de Copenhagen Pectin A/S. Gotas de gel de Kappa-carrageenan contendo células de levedura lager presas foram produzidas usando-se o processo de misturador estático, conforme descrito em detalhes por Neufeld e outros. (1996), com carregamentos de célula iniciais de $10^7 - 10^8$ células/mL de gel, que são especificadas para cada experimento. Conforme ilustrado na FIG. 15, o processo de misturador estático é baseado na formação de uma emulsão entre uma fase contínua não-aquosa, óleo vegetal (Mazola Corn Oil), e uma fase dispersa aquosa, kappa-carrageenan (3% w/v) em solução de KCl (0.2% peso/volume), inoculada com levedura, usando-se misturadores estáticos de poliacetal em linha (Cole-Parmer Instrument Co., USA). Na seção de aquecimento do esquema, onde a levedura foi

rapidamente misturada com a solução de carrageenan, e a emulsão foi formada, a temperatura foi 37°C. A gelação das gotículas de kappa-carrageenan no interior da emulsão foi induzida com arrefecimento rápido em um banho de gelo e endurecimento subsequente em um banho de cloreto (22 g/L). Um misturador estático de 25 elementos de 6.4 mm de diâmetro foi usado para criar a mistura de levedura e carrageenan. Um segundo misturador de 42 elementos de 12.7 mm de diâmetro foi usado para criar a emulsão. As gotas usadas para os experimentos neste trabalho eram de $0.5 \text{ mm} < (\text{diâmetro de gota}) < 2.0 \text{ mm}$.

4.5 Distribuição de Tamanho de Partícula Cumulativa de Gotas de Gel de Kappa-Carrageenan

Contendo Células de Levedura Imobilizada

Gotas de gel de Kappa-carrageenan foram aleatoriamente amostradas de um curso de produção de 30-L de gotas de gel, de modo a calcular uma distribuição de tamanho de partícula em uma base de peso molhado de massa. Cada amostra foi de aproximadamente 500 g de peso molhado. Peneiramento foi usado para determinar a distribuição de tamanho de partícula de gota. As gotas foram passadas através de uma série de peneiras com tamanhos de grade de 2.0, 1.7, 1.4, 1.18, 1.0, e 0.5 mm. Um volume de 4.5 L de 22 g/L solução de KCl foi usado para facilitar o peneiramento de cada amostra de gota. As gotas de gel de kappa-carrageenan foram assumidas para serem perfeitamente esféricas, de modo que o diâmetro de peneira foi tomado como o

diâmetro de partícula. Foi também assumido que a densidade de partícula foi uniforme e independente do tamanho de partícula.

4.6 Enumeração de Célula e Viabilidade

Viabilidade de Levedura Livrementemente Suspensa

5 *e Concentração de Célula:* A técnica de tingimento de azul de metileno da Sociedade de Químicos de Produção de Bebida Fermentada Internacional (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992) foi usada para medir a viabilidade da célula de levedura. O tingimento mede se uma população de
10 levedura é viável ou não-viável, baseado na capacidade de células viáveis para oxidar o corante para sua forma incolor. As células não-viáveis carecem da capacidade de oxidar o tingimento e, portanto, o azul de tingimento. O azul de metileno tamponado Fink-Kuhles foi preparado pela mistura de 500 mL de Solução A
15 (0.1 g de azul de metileno / 500 mL dH₂O) com 500 mL de Solução B (498.65 mL de 13.6 g KH₂PO₄ / 500 mL d H₂O misturado com 1.25 mL de 2.5 g Na₂HPO₄·12H₂O / 100 mL d H₂O) para dar uma solução de azul de metileno tamponado final com um pH of 4.6.

20 A solução de levedura diluída foi misturada com a solução de azul de metileno em um tubo teste, a uma suspensão de aproximadamente 100 células de levedura em um campo microscópico. Uma pequena gota da suspensão misturada foi colocada em uma lâmina de microscópio e coberta com uma
25 tampa de deslizar. Seguindo um a cinco minutos de contato com o tingimento, as células tingidas de azul e as células que

permaneceram incolores foram enumeradas. A percentagem de células viáveis foi reportada como uma percentagem do número total de células enumeradas. A concentração da célula foi determinada usando-se um microscópio leve e um Hemacitômetro
5 (Hauser Scientific Company).

Viabilidade de Célula Imobilizada e Concentração de Célula: Gotas de gel foram separadas do líquido de fermentação pela passagem da mistura através de uma peneira estéril (tamanho de malha de poro de 500 μ m), e
10 elevando com 10 mL de água destilada. Gotas de gel, 1 mL, contendo levedura presa, foram adicionadas a um recipiente de espécime estéril de 50 mL contendo 19 mL de água destilada. As gotas foram então rompidas usando-se um aparelho Polytron® (Brinkmann Instruments), para liberar as células do gel. A
15 viabilidade da célula e concentração foram então medidas conforme descrito para as células livremente suspensas.

4.7 Análise Microbiológica

Análise da Fase Líquida: Amostras foram tomadas de fermentações contínuas pelo menos uma vez por
20 semana para análise microbiológica. O mosto que foi usado para fermentações contínuas foi também testado para contaminação antes de transferi-lo no bioreator. Para testar a presença de ambas a bactéria aeróbica e anaeróbica, as amostras foram colocadas na Agar Cerveja Universal (UBA, Difco Laboratories), com a adição
25 de 10 mg/L de cicloheximida, e incubada a 28°C por 10 dias. As placas que foram testadas para contaminação bacteriana anaeróbica

foram colocadas em um jarro anaeróbico com um acondicionamento AnaeroGen[®] (Oxoid), que leva qualquer oxigênio remanescente no jarro, criando um ambiente anaeróbico. Um indicador anaeróbico (Oxoid), que vira rosa na presença de oxigênio, foi usado para verificar as condições anaeróbicas no interior do jarro. Contaminação de levedura selvagem foi testada pelas amostras no meio de levedura (YM agar, Difco Laboratories) mais CuSO₄ (0.4 g/L), incubada a 25°C por 7 dias. Agar de Nutriente de Extrato de Levedura de Peptona (PYN), descrito anteriormente, foi usado para amostras de peneira para contaminantes de levedura não-lager a 37°C por 7 dias. A ausência de crescimento de levedura no PYN a 37°C indicou que levedura não-ale ou contaminantes que se desenvolveram a 37°C estavam presentes.

Análise da Fase Gel: Um ensaio foi desenvolvido em nosso laboratório para assegurar que as gotas de célula imobilizada a serem usadas para fermentações estivessem livres de contaminação de bactéria antes sendo providas no bioreator. O objetivo principal era evitar contaminação com organismos de refugio de cerveja tais como *Pediococcus sp.* e *Lactobacillus sp.* ou levedura selvagem. Um volume de 3 mL de gotas de gel de carrageenan foi inoculado em 100 mL de vários meios líquidos seletivos diferentes descritos abaixo, e colocado em frascos de 250 mL a 25°C, e agitado a 100 rpm em um agitador incubador. Caldo NBB (Nachweis von Bierschädlichen

Bacterien) (BBL cat # 98139, NBB Broth Base, 0.02 g/L de cicloheximida) é um meio semi-seletivo que é usado para teste para bactéria de refugio de cerveja, tal como *Pediococcus sp.* e *Lactobacillus sp.* Caldo de sulfato de cobre (16 g/L caldo YM, Difco; 0.4 g/L CuSO₄) é um meio semi-seletivo para teste para contaminantes de levedura selvagem. Finalmente, Métodos Padrões (STA) + caldo de cicloheximida (16 g/L “Métodos Padrões” caldo, Difco; 0.02 g/L de cicloheximida) é usado para teste para bactéria encontrada na água, água de despejo, produtos diários, e alimentos (Power e McCuen, 1988). Os meios seletivos foram escolhidos para detectar e identificar organismos de refugio de cerveja potenciais dentro de três dias. As amostras contaminadas foram indicadas por turbidez dentro da amostra, e uma identificação presumível dos contaminantes foi feita.

15 ***Metodologia de Detecção de Célula de Levedura Deficiente Respiratória (DR): Técnica de Sobreposição de Cloreto de Trifeniltetrazolium (TTC):*** Este método foi usado para distinguir levedura deficiente respiratória do resto da população, e é baseado no princípio que o TTC é um
20 sal incolor que forma um precipitado vermelho sob redução. Quando o TTC é sobreposto nas colônias de levedura que se desenvolvem na agar Levedura-Peptona-Dextrose (YPD) (extrato de levedura, 10 g/L; Peptona, 20 g/L; Dextrose, 20 g/L; Agar, 20 g/L em dH₂O), a levedura suficiente respiratória reduzirá o TTC,
25 e estas colônias tornar-se-ão rosas claras para vermelhas.

Contudo, a levedura deficiente respiratória não reduz o corante, e retém sua cor original.

As culturas foram seriamente diluídas a uma concentração adequada de microorganismos, ~100 células/ 0.2 mL, para revestimento. As placas de YPD foram, em seguida, incubadas por aproximadamente 3 dias a 21°C até que as colônias de levedura fossem visíveis em um ambiente anaeróbico. Cada placa foi, em seguida, sobreposta com 20 mL de de Agar de sobreposição a 50°C de TTC. Após arrefecimento das soluções individuais a 50°C, o agar de sobreposição de TTC foi produzido pela mistura 1:1 Solução A (12.6 g/L de NaH₂PO₄; 11.6 g/L de Na₂HPO₄; 30.0 g/L agar em dH₂O, autoclavada a 121°C, 15 min) com Solução B (2.0 g/L 2,3,5-trifeniltetrazolium cloreto em dH₂O, autoclavada a 121°C, 15 min). As placas estavam prontas após 3 horas de incubação à temperatura ambiente. A percentagem de RD foi reportada como uma percentagem de colônias não manchadas do número total observado.

4.8 Microscópio de Elétron de Varredura (SEM) de Levedura Imobilizada em Gotas de Gel de Kappa-Carrageenan

Gotas de gel de Kappa-carrageenan contendo levedura imobilizada foram removidas do bioreator através do orifício de amostra, e colocadas em um frasco de vidro de tampa roscada de 10 mL, com as gotas submersas em um pequeno volume de caldo de fermentação. O frasco foi imediatamente coberto em gelo e transportado em um recipiente isolado para a facilidade de SEM. As gotas de gel de Kappa-carrageenan

contendo levedura imobilizada foram fixadas em 2% (v/v) de glutaraldeído preparado em tampão de fosfato de Sorensen, 0.07 M, pH 6.8 (Hayat, 1972). Isto foi seguido pela pós-fixação em 1% (peso/volume) de tetróxido de ósmio, preparado no mesmo
5 tampão, e desidratação através de uma série graduada de soluções de álcool 50, 70, 80, 90, 95, 100% (v/v), em 15 minutos para cada, e, em seguida, 3 mudanças a 100%. Antes do ponto de secagem crítico (Ladd Research Industries, Burlington, VT) através de dióxido de carbono, algumas gotas foram congeladas
10 em nitrogênio líquido, fraturadas e coletadas em álcool 100%. O fraturamento congelado permite que a face interna das gotas seja exposta com distorção mínima. Seguinte ao ponto de secagem crítico, as amostras foram revestidas por difusão (revestidor por difusão Polaron SC500, Fison Instruments, England) com 30 nm
15 de ouro/paládio e, em seguida, varridas com um microscópio de elétron de varredura de emissão de campo Hitachi S-4500 (Nissei Sangyo, Tokyo, Japão).

4.9 Protocolo de Amostragem do Bioreator

**O reservatório de orifício de amostra do
20 bioreator (Válvula de Amostra de Membrana Tipo Scandi-Brew T) foi preenchido com 70% (v/v) de solução de etanol para manter condições assépticas ao redor da abertura entre as amostragens. De modo a tomar uma amostra, o obturador foi removido a partir da base do reservatório de etanol,
25 drenado e mergulhado com etanol, antes da abertura do orifício. As amostras foram coletadas em um frasco ou em um**

jarro de tampa com rosca e volumes variados de 5-60 mL, dependendo da análise requerida. De modo a testar a contaminação microbiológica, 10 mL do líquido de fermentação foi bombeado à vácuo através de uma unidade
 5 de filtro de membrana estéril. A membrana, de tamanho de poro de 0.45 µm, foi colocada no meio seletivo apropriado, conforme descrito na Seção 4.6.

Para análise química, 60 mL de amostra foi retirada através do septo do frasco vedado de 100 mL e
 10 seringa filtrada através de um sistema de filtro de seringa de camada dupla Schleicher e Schull, FP-050, com tamanhos de poro de 5 µm e 0.45 µm. O volume requerido de amostra foi, em seguida, dispensado em um frasco de espaço superior de
 20 mL, e vedado com um septo de Teflon e tampa de
 15 alumínio. Os volumes de amostra requeridos estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Requerimentos de volume de amostra para várias análises químicas.

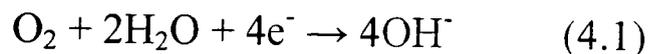
Amostra	Volume (mL)
Etanol	5
dióis de cadeia curta	10
cerveja volátil	12
dicetonas vicinais	5
carboidratos/gravidade específica	12

amino nitrogênio livre	12
------------------------	----

4.10 Medição de Oxigênio Dissolvido

O analisador de oxigênio dissolvido Dr. Thiedig Digox 5 mede o oxigênio dissolvido na faixa de 0.001 - 19.99 mg/L no mosto, mosto de fermentação e cerveja (Anon, 1998). Vilachá e Uhlig, (1985) testaram muitos instrumentos para medição de oxigênio dissolvido em cerveja, e encontraram o analisador Digox para dar valores precisos de mosto verdadeiro.

O método de medição eletromecânico usado por Digox 5 é baseado em um arranjo de três eletrodos amperométricos com um potenciômetro. A célula de medição consiste de um eletrodo de medição (catodo) e eletrodo contador (anodo). Estes eletrodos são expostos ao líquido no qual a concentração de oxigênio é para ser medida. Uma reação no eletrodo de medição ocorre após fixação de um potencial de medição definido. No eletrodo de medição de prata grande, as moléculas de oxigênio são reduzidas em íons hidroxila. Duas moléculas de água reagem na equação 4.1, com uma molécula de oxigênio, enquanto absorvem quatro elétrons, dando quatro íons hidroxila.



O anodo de aço inoxidável absorve os quatro electrons liberados no catodo de modo a assegurar o fluxo de corrente. Na equação 4.2, a corrente de medição I é diretamente proporcional à concentração de oxigênio $C_{L,O}$:

$$I = K \times C_{L,O} \quad (4.2)$$

onde a constante K é influenciada pela constante de Faraday, o número de elétrons convertido por molécula, a área superficial do catodo, e a largura da camada limítrofe na superfície do eletrodo de medição.

Um potencial de medição característico constante é crítico para a seletividade (para oxigênio) e precisão da medição. A voltagem de medição é estabilizada pelo eletrodo de referência, que não é carregado pela corrente. Isto, junto com o potencioestado, que proporciona retro-alimentação eletrônica, proporciona um potencial de medição constante. A superfície do eletrodo de medição é eletroliticamente ligada ao eletrodo de referência via um diafragma.

O erro, baseado na faixa de medição da concentração de oxigênio dissolvido final, foi $\pm 3\%$ (Anon, 1998). O analisador de oxigênio dissolvido foi calibrado usando-se a Calibração Ativa de Thiedig, em que o Digox 5 produziu uma quantidade de oxigênio definida baseada na Lei de Faraday (0.500 mg/L) e, em seguida, cruzado com este com os valores medidos na matriz. Isto permite que o instrumento a ser calibrado sob a pressão, temperatura e condições de fluxo, corresponda àquele da medição, dentro de um minuto. Devido a troca de moléculas no sensor ser um processo de difusão, ela é influenciada pela temperatura, resultando em taxas de reação mais rápidas e aumentos na corrente medida. Portanto, o Digox 5 é também

equipado com um sensor, que mede a temperatura e compensa automaticamente as flutuações.

O Digox 5 tem algumas vantagens sobre os sensores de oxigênio baseados em membrana. Devido ao Digox não usar eletrólito, a perda de sensibilidade é relativamente baixa, e somente depósitos menores no eletrodo de medição ocorrem. Também, a sensibilidade pode ser determinada em qualquer tempo, pela realização de uma calibração ativa. É um procedimento simples limpar o eletrodo e re-calibrar o instrumento. Em muitos sensores de membrana, cloreto de prata é depositado no catodo, e as soluções de eletrólito mudam, resultando em leituras progressivamente inferiores. Por esta razão, as membranas e eletrólitos são recomendados que sejam mudados em poucas semanas e, em seguida, re-calibrados, uma tarefa longa e problemática. A calibração dos sensores baseados em membrana é usualmente conduzida no laboratório em níveis de saturação de oxigênio, que pode causar erros apreciáveis, especialmente no mosto e matriz de cerveja em níveis de oxigênio muito baixos. A temperatura terá uma influência de três dobras nos sensores de oxigênio baseados em membrana: a permeabilidade da membrana mudará, a pressão parcial de oxigênio mudará, e a solubilidade de oxigênio no eletrólito mudará. A compensação de temperatura para estes três fatores nos sensores baseados em membrana é difícil.

25 *Medição de Oxigênio Dissolvido no Mosto*
Durante Armazenamento: Revestimento de grau de alimento

flexível Tygon[®] ($\frac{1}{4}$ de polegada de diâmetro interno) foi assepticamente conectado a um orifício de amostra localizado perto do topo da base cônica dos tanques de armazenamento de mosto T-1 e T-2 (ver seção 4.2.1). Uma bomba peristáltica de
5 velocidade variável proporciona taxa de fluxo volumétrico de 11 L/hora através do bloco de analisador de oxigênio dissolvido. ((Masterflex[®] L/S[™] Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50)). As medições de oxigênio dissolvido no mosto foram, em seguida, registradas após 4-5 minutos.

10 ***Medição de Oxigênio Dissolvido no Bioreator:***

Antes da realização das medições de oxigênio dissolvido no bioreator, o bloco de analisador Digox 5 foi sanitizado. A admissão do sensor foi conectada ao revestimento de Grau de Alimento estéril Tygon[®] ($\frac{1}{4}$ de polegada de diâmetro interno).
15 Uma solução de etanol 70% (v/v) foi bombeada através do analisador à uma taxa de fluxo volumétrico de aproximadamente 10 L/hora por 15 minutos. O analisador de oxigênio dissolvido foi conectado a uma torneira de água de laboratório, e água quente (70°C) foi passada através do sensor por um mínimo de 2 horas.
20 Esta metodologia foi usada preferivelmente do que esterilização de vapor, porque os materiais do bloco do analisador não podem tolerar temperaturas de acima de 70°C. Seguente ao período de sanitização de duas horas, o revestimento na admissão e descarga da unidade foi preso para manter esterilidade no interior
25 do analisador. Em uma cobertura de fluxo laminar, o revestimento

recentemente esterilizado foi conectado à admissão e descarga do analisador. As extremidades livres do revestimento foram, em seguida, presas assepticamente aos orifícios de aço inoxidável de 1/4" de diâmetro interno na placa superior do bioreator, e medições foram tomadas. Quando os orifícios no bioreator não estavam em uso, eles foram vedados usando-se um pequeno comprimento de revestimento de grau de alimento esterilizado Tygon®.

Oxigênio dissolvido foi medido no bioreator de elevação de gás em linha pela retirada do líquido a partir da fermentação através de um orifício situado na placa superior do bioreator. O líquido de fermentação que sai do bioreator através de um filtro de aço inoxidável (ver seção 4.1.2), conectado a um tubo de aço inoxidável de 1/4 de polegada que penetra a placa superior do bioreator. O líquido, em seguida, escoado através do revestimento de grau de alimento flexível Tygon® (1/4 de polegada de diâmetro interno), que foi conectado a uma bomba peristáltica de velocidade variável (Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50), proporcionando uma taxa de fluxo volumétrico de 11 L/hora através do bloco do analisador de oxigênio dissolvido. O líquido de fermentação foi, em seguida, reciclado através de um segundo orifício de aço inoxidável de um quarto de polegada, que penetrou a placa superior do bioreator. O revestimento de grau de alimento Tygon® (Cole-Parmer, 1999) foi usado para conectar o sensor ao bioreator por causa de sua permeabilidade de oxigênio baixa supridor de

30 cm³mm/(s·cm²·cmHg) x 10⁻¹⁰. A medição foi tomada após 4-5 minutos de circulação.

4.11 Análise Química

Calibrações foram realizadas usando-se os reagentes padrões apropriados. Todos os reagentes usados para a análise foram >99% puros. Onde necessário, purificação subsequente via destilação foi realizada.

4.11.1 Etanol

A concentração de etanol foi determinada usando-se o método de cromatografia de gás de padrão interno (GC) do Comitê Técnico e Comitê Editorial da Sociedade Americana de Químicas de Fabrico de Bebida Fermentada (1992). As amostras desgaseificadas foram tratadas diretamente com padrão interno de isopropanol 5% (v/v), injetadas em um Cromatógrafo de Gás Perkin Elmer 8500 equipado com um detector de ionização de chama (FID) e um auto-amostrador Dynatech. Um Cromo-absorsor 102 de coluna de malha 80-100 foi usado com hélio como o gás transportador. Condições cromatográficas: taxa de fluxo de 20 mL/min, temperatura do injetor de 175°C, temperatura do detector de 250°C, e temperatura de coluna de 185°C.

4.11.2 Resumo do Carbohidrato

As concentrações de glucose, frutose, maltose, DP3 (maltotriose), DP4 (maltotetraose), poli-1 (polisacarídeo de pico 1) e glicerol nas amostras de fermentação foram quantificadas usando-se um cromatógrafo de líquido de alta

performance Spectra-Physics (SP8100XR) (HPLC), equipado com uma coluna de troca de cátion (Bio-Rad Aminex, HPX-87K) e um detector de índice de refração (Spectra-Physics, SP6040XR). A fase móvel era fosfato de potássio dibásico 0.01 M, e o sistema era equipado com um auto-amostrador Spectra-Physics (SP8110). O instrumento foi operado com uma pressão de retorno de 800 psi. A taxa de fluxo da amostra e eluente através da coluna foi 0.6 mL/minuto, com uma temperatura de coluna de 85 °C e uma temperatura de detector de 40°C. O volume de injeção foi 10 mL.

4.11.3 Gravidade Específica

A gravidade específica do mosto e meio de fermentação é descrita no estudo em termos de Extrato Real (grau Plato, °P), que é a unidade aceita usada na indústria de fabrico de bebida fermentada.

As amostras de fermentação foram filtradas conforme descrito na seção 4.8, e colocadas em rotação antes da análise com um medidor de densidade digitalizado (Densitômetro de Anton Paar DMA-58) para medir a gravidade específica do mosto (grau Plato). As amostras de fermentação foram inseridas em um tubo U de vidro, que oscila eletronicamente para determinar a gravidade específica, dando, desse modo, grau Plato indiretamente.

O grau Plato se refere ao valor numérico de uma percentagem (peso/volume) de solução de sucrose na água a 20°C, cuja gravidade específica é a mesma conforme o mosto em

questão. Devido a escala de grau Plato e tabelas resultantes relacionadas a gravidade específica da solução para concentrações de soluto serem baseadas na solução aquosa de sucrose, ela é somente uma aproximação da quantidade de extrato. O extrato é um termo referente a massa solúvel disponível total em um material de fabrico de bebida fermentada “como é”, e /ou potencialmente através de processamento (Hardwick, 1995) tal como carboidratos, proteínas, taninas. O extrato é ainda correntemente expresso na indústria de fabrico de bebida fermentada como gravidade específica no grau Plato devido a falta de uma referência mais apropriada melhor relacionada a variabilidade nas composições de mosto de origens diferentes.

4.11.4 Diacetil Total

Diacetil total (2,3-butanodiona) na cerveja e amostras de fermentação foi medida usando-se uma técnica de amostragem de análise de espaço superior, seguido por separação GC de capilaridade (Hewlett-Packard 5890) e detecção de captura de elétron (ECD) baseada no método do Comitê Técnico e Comitê Editorial da Sociedade Americana de Química de Fabrico de Bebida Fermentada (1992). O método se refere ao “diacetil total” porque o método mede a quantidade de diacetil e seu precursor, alfa-acetolactato. O gás transportador foi 5% de metano em argônio a 1.0 mL/minuto, e uma coluna de J & W DB-Wax foi usada. A razão de divisão foi 2:1, e o gás auxiliar foi hélio em

60 mL/minuto. A temperatura do injetor foi 105°C, e a temperatura do detector foi 120°C.

O sistema foi equipado com um auto-amostrador de espaço superior Hewlett Packard 7694E, e 2,3-hexanodiona foi usada como um padrão interno. O tempo de ciclo de amostra foi 40 minutos, com um tempo de equilíbrio de frasco de 30 minutos a 65°C, um tempo de pressurização de 2 minutos a 4.8 psig, um tempo de enchimento de círculo de 0.2 minuto, um tempo de equilíbrio de círculo de 0.1 minuto, e um tempo de injeção de 0.27 minuto. A pressão de transporte foi 18.8 psig, a temperatura da linha de transferência foi 95°C, e a temperatura do círculo foi 65°C.

4.11.5 Voláteis da Cerveja

Voláteis da cerveja incluindo acetaldeído, etil acetato, isobutanol, 1-propanol, isoamil acetato, isoamil álcool, etil hexanoato, e etil octanoato foram medidos usando-se um método de espaço superior de padrão interno (n-butanol) GC (Hewlett Packard 5890), e um detector de ionização de chama (FID). O gás transportador foi hélio a 6.0 mL/min, e GC foi equipado com um auto-amostrador de espaço superior Hewlett Packard 7694.

A temperatura do injetor GC foi 200°C, e a temperatura do detector foi 220°C. O perfil da temperatura do forno: 40°C (5 min), 40 - 200°C (10°C/min), 200 - 220°C (50°C/min), 220°C (5 min). Os gases de FID incluem o veículo a

6.0 mL/min, composição de hélio a 30 mL/min e 28 psig, H₂ a 50 mL/min e 25 psig, e ar a 300 mL/min e 35 psig.

O septo foi purgado a uma taxa de fluxo de 0.8 mL /min. A pressão superior foi 4.0 psig. Quando o auto-
5 amostrador foi conectado via uma agulha no orifício de injeção, a pressão do frasco foi 15.9 psig, a pressão do veículo foi 7.1 psig, a pressão superior de coluna foi 4 psig, o fluxo de divisão foi 18 mL/min, e o fluxo de coluna foi 6 mL/min. As temperaturas da zona: frasco a 70°C, círculo a 80°C, linha de transferência a
10 150°C.

O tempo de ciclo de GC foi 40 min, com um tempo de equilíbrio de frasco de 35 min, um tempo de pressurização de 0.25 min, um tempo de enchimento de círculo de 0.1 min, um tempo de equilíbrio de círculo de 0.1 min, um tempo
15 de injeção de 3 min, e um volume de círculo de amostra de mL.

4.11.6 Amino Nitrogênio Livre (FAN)

O Método Internacional de Amino Nitrogênio Livre do Comitê Técnico e Comitê Editorial da Sociedade Americana de Químicas de Fabrico de Bebida Fermentada (1992)
20 foi usado para determinar a concentração de amino nitrogênio livre em uma amostra de fermentação, usando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer LS50B. Este método espectrofotométrico revela uma reação de cor entre ninhidrina e o nitrogênio presente na amostra. A quantidade de absorvância está
25 diretamente relacionada à quantidade de amino nitrogênio livre presente.

a) Reagente de Cor: 19.83 g de di-sódio hidrogênio fosfato (Na_2HPO_4)

30.00 potássio di-hidrogênio fosfato (KH_2PO_4)

2.78 g de ninhidrina monohidrato

5 1.50 g de frutose

b) Reagente de Diluição: 2.00 g de iodato de potássio (KIO_3)

596 mL de água deionizada destilada

404 mL 95% (v/v) de etanol

10 Armazenado no refrigerador e usado à temperatura ambiente.

c) Solução de Estoque de Glicina: 0.1072 g/100 mL de água deionizada destilada

d) Solução Padrão de Glicina: solução de
15 estoque foi diluída 1:100 (v/v) com água deionizada destilada.
Este padrão contém 2 mg/L de FAN.

As amostras foram diluídas a uma razão de 100:1 com água destilada, e 2 mL da amostra diluída foram introduzidos em cada um dos 3 tubos testes. A peça bruta foi preparada pela introdução de 2 mL de água deionizada destilada em cada um dos 3 tubos testes. Três tubos testes contendo 2 mL de cada da solução padrão de glicina foram também preparados.

Para todas as amostras, 1 mL de reagente de cor foi adicionado e, em seguida, elas foram colocadas em um banho de água a 100°C por exatamente 16 minutos. Os tubos testes foram, em seguida, arrefecidos em um banho de água a 20°C por

20 minutos. Cinco mL do reagente de diluição foi, em seguida, adicionado a cada tubo teste e misturado. As amostras foram, em seguida, permitidas assentar por 10-15 minutos. A absorvância a 570 nm foi, em seguida, medida usando-se um espectrofotômetro, e a quantidade de FAN em uma amostra foi calculada usando-se a equação 4.3.

$$\text{FAN (mg/L)} = (A_P - A_B - A_F) 2d / A_S \quad (4.3)$$

onde FAN é a quantidade de amino nitrogênio livre na amostra em mg/L, A_P é a media das absorvâncias das soluções testes, A_B é a media das absorvâncias para as peças brutas, A_F é a media das absorvâncias para a correção para mostos escuros e cervejas, 2 é a quantidade de FAN na solução padrão de glicina, d é o fator de diluição da amostra, e A_S é a média das absorvâncias para a solução padrão de glicina.

CAPÍTULO 5. FERMENTAÇÃO CONTÍNUA USANDO SISTEMA DE BIOREATOR DE ELEVAÇÃO DE GÁS

Um sistema de bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás foi escolhido para fermentação de cerveja contínua de transferência de massa excelente publicada (líquido-sólido), e características de mistura. A transferência de massa de líquido-sólido é especialmente importante, visto que ela envolve a transferência de nutrientes a partir da fase líquida para o biocatalisador de célula imobilizada sólida, proporcionando substratos para a levedura encapsulada. Estes bioreatores também proporcionam boa aeração, baixo consumo de energia, e são

simples de construir. Isto tem produzido sistemas de bioreator de elevação de gás muito atrativos para operações de grande escala, tal como aquele usado comercialmente para tratamento de água de despejo (Driessen e outros ., 1997; Heijnen, 1993).

5 5.1 Descrição do Bioreator de Tubo de Tiragem de Ar de Elevação de Gás

Esta seção dá uma descrição detalhada do bioreator de elevação de gás usado neste trabalho.

5.1.1 Corpo do Bioreator

10 O bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de 13 L (volume de operação de 8 L) designado para este trabalho foi um leito fluidizado de três fases (líquido/sólido/gás), onde as células imobilizadas foram mantidas em suspensão pela circulação de líquido interno acionada por gás dióxido de carbono
5 (Heijnen, 1996), conforme mostrado na FIG. 16. Uma fotografia do vaso do bioreator é dada na FIG. 17, e um desenho detalhado com dimensões detalhadas é dado na FIG. 18. Dióxido de carbono e ar fluem no cone de fundo do bioreator através de um aspergidor de aço inoxidável (bocal purgador de CO₂, Part #9222,
20 Hagedorn & Gannon, USA), 0.11m de comprimento, 0.013 de diâmetro externo. Dióxido de carbono foi usado como o gás de fluidização, e ar foi usado para suprir oxigênio para as células de levedura.

Um tubo de tiragem de ar, concentricamente
25 localizado dentro do bioreator, funciona como o elevador neste sistema de leito fluidizado, enquanto o anular externo serve como

a entrada descendente. O tubo de tiragem de ar interno foi suspenso de um separador de partícula cilíndrico, assentado em três abas de aço inoxidável na região superior expandida do bioreator. Mantendo-se o tubo de tiragem e separador de particular assentando dentro do bioreator, minimiza-se o risco de contaminação microbiana a partir do ambiente externo.

Originalmente, o bioreator tem uma peneira de malha para separar as células imobilizadas a partir do líquido na descarga. Contudo, a peneira era propensa a obturar, de modo que um cilindro de aço inoxidável foi usado para separar as gotas de célula imobilizada a partir da fase líquida a medida que elas se movem sobre o topo do tubo de tiragem, e seguem para baixo no anular. As partículas colidiriam com o cilindro e cairiam na fase líquida de massa preferivelmente do que deixando o bioreator como inundação. Desse modo, existe uma região pequena perto da descarga do bioreator que estava livre de partículas de célula imobilizada. A região superior expandida do bioreator também aumenta a área superficial para desengatamento de bolha de gás.

5.1.2 Placa Superior do Bioreator

Na FIG. 19 um esquema da placa superior do bioreator é dado. Os orifícios da placa superior foram mantidos em um mínimo para reduzir o risco de contaminação. Os orifícios foram ou soldados diretamente na placa superior, ou ajustes de compressão (Swagelok[®]) foram usados. A placa superior incorpora um orifício de inoculação, um poço térmico, termômetro, um septo para amostragem de gás e retirada de

líquido, e orifícios de retorno para medição de oxigênio dissolvido. Um sensor de temperatura foi inserido no poço térmico, que retorna para o sistema controlador de temperatura. O controlador de temperatura dá uma retro-alimentação a uma
5 válvula solenóide, que abre e fecha o suprimento de glicol para a jaqueta térmica do bioreator. A temperatura foi monitorada usando-se um termômetro (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple thermometer, #90610-20) e por uma sonda tipo T, que foi soldada na placa superior do bioreator. O oxigênio
10 dissolvido foi medido usando-se um analisador de oxigênio dissolvido (Dr. Theidig, Digox 5), que requer um fluxo de 9-11 L/hora de caldo de líquido através do bloco analisador para leituras precisas de oxigênio. O líquido foi retirado do bioreator para medição de oxigênio através de um tubo interno de $\frac{1}{4}$ de
15 diâmetro interno que vai através da placa superior no líquido de fermentação. Conforme mostrado na FIG. 20, a ponta do tubo foi assentada com um filtro para remover partículas grandes do líquido a medida que ele foi bombeado através do analisador de oxigênio dissolvido. O líquido foi então retornado de volta para o
20 bioreator através de outro orifício de $\frac{1}{4}$ " na placa superior.

5.1.3 Válvulas Sanitárias para Amostragem Asséptica

O bioreator foi equipado com uma válvula de amostra de membrana (Scandi-Brew[®]) soldada na parede do
25 bioreator. A válvula foi designada para amostragem sob condições assépticas. A membrana vedada diretamente contra o

líquido de fermentação permite que a válvula seja totalmente esterilizável com vapor e álcool através de duas descargas (FIG. 18). Um pequeno reservatório externo de etanol circunda a membrana para manter esterilidade entre a amostragem. Esta
5 válvula foi usada para toda amostragem do bioreator, e foi assumido que a composição do líquido no ponto de amostragem não foi significativamente diferente do que a composição do líquido que sai da descarga do bioreator. Conforme mencionado no capítulo de Materiais e Método deste trabalho, o bioreator foi
10 amostrado de uma válvula localizada na parede externa do bioreator. De modo a validar a suposição que a composição do líquido que sai da descarga do bioreator foi a mesma conforme o líquido amostrado a partir do corpo do reator, estudos de tempo de mistura foram realizados

15 Um método de traçador de pulso foi usado para determinar o tempo de mistura no bioreator de elevação de gás. (Chistie, 1989). Um volume de 1 mL de 10 N HCl foi rapidamente injetado no anular do bioreator, e a mudança no pH foi registrada com o tempo, com tempo, $t = 0$ segundos no tempo
20 da injeção. O pH foi retornado para seu valor original pela injeção de 10 N NaOH. O eletrodo de pH (Cole-Parmer, cat. #P-05990-90) era de 277 mm de comprimento e 3.5 mm de diâmetro. Um Transmisspr de pH de Processo Modelo Ingold 2300 foi usado para monitorar o pH. Uma calibração de pH de dois pontos foi
25 realizada com tampões padrões certificados, tampão verde Beckman pH 7.0, Parte #566002 e tampão vermelho Beckman pH

4.0, Parte #566000. Os dados foram registrados em uma frequência de 3750 Hz por 300 segundos usando-se um programa de software designado por Cheryl Hudson e John Beltrano em 1994, e modificados por Norm Mensour em 1999 (Universidade
5 de Western Ontairo, London, Ontario).

Os dados de pH foram, em seguida, alinhados usando-se o algoritmo Savitsky-Golay na Curva da Tabela 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Guelph, Ontario). O algoritmo de Savitzky-Golay é um método de domínio de tempo
10 de registro baseado no ajuste polinomial quártico de quadrados mínimos através de uma janela em movimento dentro dos dados do pH (Anon, 1996). Os dados registrados foram, em seguida, normalizados, e um gráfico de ΔpH versus tempo foi gerado. O tempo de mistura foi tomado para o minuto mais próximo,
15 quando o pH tiver alcançado ~95% do valor de equilíbrio. O tempo de mistura foi medido usando-se três taxas de fluxo volumétrico diferentes de dióxido de carbono: 283 cm^3/min , 472 cm^3/min (taxa de fluxo volumétrico usada através de todo este trabalho), e 661 cm^3/min . Em todos os três casos o pH no bireator
20 se equilibra (~95% de corte) em menos do que 2 minutos, conforme visto no Apêndice 1. O tempo de mistura foi considerado para ser suficientemente curto para validar nossa suposição original que o bioreator foi bem misturado. Isto permitiu-nos assumir que a composição do líquido amostrado a
25 partir da parede do bioreator não era significativamente diferente daquela que fluiu a partir da descarga, com um tempo de

residência de líquido médio de 24 horas no bioreator. A partir das figuras em anexo, uma recirculação de líquido definitiva superimposta na mistura pela dispersão foi vista, que é típica de bioreatores de elevação de gás (Chisti, 1989).

5.2 Diagrama de Fluxo do Sistema de Fermentação de Cerveja Contínua

Um diagrama de fluxo para o sistema de fermentação de cerveja contínuo, que foi alojado na Instalação Piloto de Micro-cervejaria da Companhia Cervejaria Labatt Limited de London, Ontario, é dado na FIG. 21, com uma descrição de partes detalhadas na Tabela 5.1. No resumo, o mosto da cervejaria foi coletado na Instalação da Labatt London, esterilizado usando-se um pasteurizador (Fisher Plate Heat Exchanger , combi-flow Type Eurocal 5FH), e armazenado em tanques de retenção grandes (T-1 e T-2). Durante fermentação contínua, o mosto foi transferido a uma taxa de fluxo controlada para o bioreator de elevação de gás (BR-1) contendo células de levedura imobilizada. O líquido fermentado deixa o bioreator como sobre-fluxo, e foi coletado em um vaso de recebimento (T-3). Nas seções seguintes, a operação do sistema de fermentação de cerveja contínuo dada na FIG. 21 é detalhada.

5.2.1 Coleta e Armazenamento de Mosto

Mosto não-oxinado para fermentação contínua foi coletado a partir da instalação Labatt London, via tubulação, em um tanque de armazenamento cilindro-cônico de 1600 L, pré-purgado com dióxido de carbono para minimizar a captação de

oxigênio pelo mosto. Todos os tanques desta escala, incluindo os tanques de retenção de mosto, T-1 e T-2, foram limpos e sanitizados pelas Melhores Práticas da Labatt antes de seu uso. O mosto foi, em seguida, pasteurizado e transferido a 2°C no tanque de retenção de mosto disponível, T-1 ou T-2 (também pré-purgado com dióxido de carbono). O mosto foi mantido nestes tanques a 2°C por até 2 semanas, suprindo líquido ao bioreator de fermentação contínua BR-1. No final do período de duas semanas, a alimentação do bioreator foi mudada de modo que o mosto foi suprido a partir do segundo tanque de mosto, que continha mosto fresco. Dois tanques de armazenamento de mosto T-1 e T-2 foram empregados para minimizar o tempo de parada durante a mudança para mosto fresco. Em todos os casos, o mosto foi testado para contaminação um mínimo de dois dias antes de ser introduzido no bioreator (BR-1). Se o mosto foi contaminado, ele foi descartado, e o mosto fresco foi imediatamente coletado e pasteurizado.

Concentração de Oxigênio Dissolvido de Mosto Mínima Durante Armazenamento: O objetivo foi armazenar o mosto com oxigênio mínimo, em um nível constante, e a uma baixa temperatura, sem congelar o mosto. Isto foi requerido para impedir reações indesejáveis no mosto a partir das reações químicas com oxigênio (Narziß e outros., 1993), para proporcionar um suprimento consistente de mosto para o bioreator, e para minimizar o risco de contaminação do mosto com micróbios durante armazenamento. Os vasos cilindro-cônicos grandes de 1.600 L (capacidade) (T-1 e T-2) usados para

armazenar o mosto para as fermentações contínuas, foram originalmente designados como fermentadores de dosagem, não tanques de armazenamento de mosto. Devido a isto, o arrefecimento para estes vasos não foi adequado para manter o mosto a 2°C. Após três dias de retenção do mosto, a temperatura variou muito mais de 15°C de uma região do tanque para outra (Tabela 5.2).

Estas regiões quentes nos tanques aumentaram o risco de crescimento microbial. Desse modo, alguma agitação foi necessária nestes tanques para assegurar uma temperatura baixa uniforme.

Por estas razões, um aspersor de tubo foi instalado no cone base de cada tanque de armazenamento de mosto (T-1 e T-2). Experimentos foram realizados para determinar o melhor protocolo para enchimento do tanque com mosto, e manter níveis baixos constantes de oxigênio dissolvido. No primeiro experimento, o tanque de armazenamento foi preenchido com mosto que foi coletado sem oxigenação e pasteurizado. Uma vez que o tanque foi preenchido com 1.600 L de mosto, 0.113 m³/hora de dióxido de carbono foi aspergido na base do tanque. Durante o segundo experimento, o mosto foi novamente coletado sem oxigenação e pasteurizado. Neste momento, o tanque de armazenamento foi purgado com dióxido de carbono (0.85 m³/hora) por 3 horas antes de enchimento, e uma pequena quantidade de dióxido de carbono (0.113 m³/hora) foi continuamente aspergida no vaso de armazenamento conforme o

mosto foi sendo transferido no tanque. Este fluxo baixo de dióxido de carbono foi continuamente borbulhado através do mosto armazenado no tanque, enquanto se supre o mosto para a fermentação contínua. Para ambos os experimentos, a
5 concentração de oxigênio dissolvido no mosto foi monitorada em uma base regular durante uma semana de armazenamento.

Na Figura 5.7, a concentração de oxigênio dissolvido versus tempo de armazenamento de mosto é dada. Quando o tanque de retenção não foi pré-purgado com dióxido de
10 carbono, o ar no espaço superior do tanque permitiu alguma captação de oxigênio pelo mosto. Desse modo, sem pré-purgar-se o tanque, ele leva um período de tempo significativamente mais longo para a concentração de oxigênio dissolvido no mosto alcançar um nível constante e mínimo. Quando o tanque foi pré-
15 purgado, a concentração de oxigênio dissolvido no mosto permaneceu a um nível baixo constante através de todo o período de armazenamento. Desse modo, pré-purga dos tanques de armazenamento de mosto (T-1 e T-2), e continuação da provisão de um fluxo pequeno de dióxido de carbono através do mosto
20 durante armazenamento de modo a manter uma pressão positiva leve nos tanques, foram adotados como parte do procedimento de armazenamento de mosto para todas as fermentações contínuas.

O perfil de temperatura nos vasos de armazenamento foi também comparado com e sem $0.113 \text{ m}^3/\text{hora}$ de aspergimento de dióxido de carbono. Isto foi realizado na água preferivelmente do que no mosto usando-se um sonda de
25

temperatura Tipo T conectada a um termômetro (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple Thermometer, cat. #90610-20). Água da cidade (1.600 L) foi coletada em um tanque de armazenamento de mosto, e equilibrada por três dias, e a temperatura da água foi registrada em regiões diferentes do tanque de armazenamento. A água no tanque foi, em seguida, aspergida por 24 horas com 0.113 m³/hora de dióxido de carbono, e a temperatura foi novamente registrada. A temperatura ambiente foi registrada em cada caso, e o ponto de ajuste da temperatura dentro do tanque de armazenamento foi 2.0°C.

Conforme visto na Tabela 5.2, com aspergimento de dióxido de carbono, a temperatura nos tanques de armazenamento foi mais uniforme, com a temperatura variando entre 0.1 e 4.1°C nas regiões medidas, e os conteúdos dos tanques não congelaram. Esta temperatura mais baixa ajudou a impedir crescimento indesejado de micróbios no mosto durante armazenamento.

O gás foi liberado a partir dos tanques de armazenamento de mosto através de um filtro de gás estéril situado no topo do tanque. O mosto foi, em seguida, transferido usando-se uma bomba peristáltica de velocidade variável (P-1) (Masterflex[®] L/S[™] Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50) para a admissão do bioreator de 8 L (BR-1) usando-se tubo flexível Norprene[®] Food Grade L/S 16.

5.2.2 Fermentação Contínua usando-se Sistema de Bioreator de Tubo de Tiragem de Ar de Elevação de Gás

O mosto foi introduzido perto do cone de fundo do bioreator BR-1 através de um orifício de ¼". Uma mistura de ar esterilizado por filtro (Millipore, Millex[®]-FG₅₀, 0.2 mm Filter Unit), e dióxido de carbono (pureza de 99.99%), seguida no bioreator através no aspersor de aço inoxidável sinterizado. Um rotômetro (R-3) foi usado para controlar a taxa de fluxo de dióxido de carbono em STP, e um controlador de fluxo de massa pré-calibrado (M-1) foi usado para controlar a taxa de fluxo de ar no STP. O líquido fermentado deixa o bioreator como sobre-fluxo e flui através do tubo de PVC reforçado de 1" de diâmetro interno em um vaso de coleta de aço inoxidável de 30 L (T-3) que foi arrefecido com uma espira de glicol externa, e mantido à uma temperatura de 4°C.

5.2.3 Coleta do Produto

O vaso de coleta do produto (T-3) tem um orifício de admissão maior (1" de diâmetro interno) que foi designado de modo que o líquido fermentado fluiria para baixo da parede do vaso de coleta para minimizar o espumamento. Este vaso também tem filtro de gás estéril, (Millipore, Millex[®]-FG₅₀, 0.2 mm Filter Unit), para liberar gás a partir do bioreator (BR-1) e o vaso de coleta (T-3). O vaso de coleta foi periodicamente esvaziado usando-se uma válvula de ¼" (V-12) situada 2" acima da base do tanque.

5.2.4 Círculo de Arrefecimento de Glicol

Glicol foi transferido da Cervejaria London para a Planta Piloto de Micro-Cervejaria à uma temperatura de -23°C e pressão de 45 psig, e circulado através de jaquetas de arrefecimento para os tanques de retenção de mosto (T-1 e T-2), para o bioreator de elevação de gás (BR-1), e para o vaso de coleta de produto (T-3). Os dois tanque de retenção e o bioreator foram equipados com sondas de temperatura de fase líquida que proporcionam realimentação para os controladores de temperatura, que, por sua vez, controlam o fluxo de glicol frio para as jaquetas do vaso. Os tanques de retenção de mosto armazenam o mosto a 2°C , enquanto a temperatura dentro do bioreator foi controlada em temperaturas de 12°C a 22°C , dependendo do experimento específico. O vaso de coleta de produto não tem controle de temperatura automático, mas, preferivelmente, o fluxo de glicol foi manualmente controlado para manter o vaso a aproximadamente 4°C . Não foi necessário controlar precisamente a temperatura do vaso de coleta de produto (T-3) porque o líquido no vaso foi simplesmente descartado e não analisado ou adicionalmente processado.

O glicol foi usado na jaqueta e para arrefecer as linhas de transferência de mosto a partir dos tanques de mosto (T-1 e T-2) para o bioreator (BR-1). Uma vez que o glicol tenha circulado através de uma dada jaqueta, ele foi retornado para uma linha principal no interior da Instalação Piloto e, em seguida, foi retornado para a Instalação London, geralmente à uma temperatura de -15°C e pressão de 40 psig.

5.3 Protocolo de Esterilização do Bioreator

O bioreator (BR-1) foi preenchido com uma solução 2% (v/v) de Diversol[®] CX/A (DiverseyLever, Canada), um detergente de sanitização, e mergulhado durante a noite com gás de aspergimento. O reator foi, em seguida, drenado e inundado com água fria. Este ciclo de solução de limpeza e água de inundação foi repetido duas vezes. De modo a preparar o bioreator para esterilização de vapor, as linhas de mosto e gás foram desconectadas. A linha de vapor foi conectada à admissão do bioreator e as válvulas seguintes foram abertas: a admissão do bioreator e válvulas de purga (V-7, V-6), a admissão de gás (V-17), as válvulas de descarga de produto (V-9, V-11), as válvulas de amostragem de membrana (V-8, V-10), e orifício de dreno do vaso de coleta (V12). A válvula de vapor da instalação foi, em seguida, aberta vagarosamente, e as válvulas do bioreator foram ajustadas de modo que um gotejamento de vapor foi observado na saída de cada abertura externa. Após 60 minutos de exposição ao vapor, todas as válvulas externas no bioreator foram fechadas (V-17, V-8, V-10, V-12), exceto a válvula de derivação de mosto (V-6). Quando a válvula de mosto foi fechada, a válvula de derivação de mosto foi fechada, e um filtro estéril foi conectado ao vaso de coleta para impedir contaminação pelo ar não-estéril que entra no sistema a medida que ele é arrefecido. A linha de gás do bioreator foi também re-conectada a V-17 a medida que a linha de vapor da instalação foi fechada, de modo a manter uma pressão positiva, enquanto o sistema arrefece.

5.4 Partida do Sistema de Fermentação

O mosto de cervejaria foi coletado a partir da instalação em um vaso de pressão de aço inoxidável de 20 L, e aquecido em um autoclave por 45 minutos a 100°C. As células
5 imobilizadas foram assepticamente transferidas no mosto arrefecido (40% v/v). O vaso vedado foi transportado para a Instalação Piloto da Micro-Cervejaria onde o sistema de bioreator foi alojado. O vaso de 20 L foi conectado a um ajuste de conexão rápida (Cornelius Anoka, MN, USA), que foi preso ao tubo
10 reforçado de 3/8" de PVC (Cole-Parmer, USA). A outra extremidade do tubo de PVC foi presa à válvula de amostragem de membrana (V-8) na parede do bioreator. Dióxido de carbono esterilizado por filtro foi aplicado como 10 psig ao vaso de 20 L, e o orifício de amostra de membrana foi aberto de modo que a
15 mistura de célula imobilizada foi transferida a partir do vaso no bioreator, sem expor o inóculo ao ambiente de ar externo. Os componentes internos dos ajustes de "conexão rápida" do vaso de 20 L foram removidos para impedir tamponamento com células imobilizadas após transferência no bioreator. A distribuição de
20 tamanho de particular cumulativa (menor do que a normal) para as gotas de gel de kappa-carrageenan é mostrada na Figura 5.8. O diâmetro de particular médio aritmético D_{pam} , foi calculado para ser 1.252 mm, e o diâmetro de partícula médio de Sauter D_{psm} , foi 1.17 mm. O diâmetro de partícula médio foi 1.255 mm. Os dados
25 experimentais e cálculos do diâmetro de partícula médio são dados no Apêndice 1.

Seguinte a inoculação com células imobilizadas, o bioreator foi operado em modo de dosagem até que as concentrações de açúcar e diacetil alçassem alvos objetivados de menos do que 3° Plato em termos de gravidade específica, e
5 menos do que 100 mg/L de diacetil. O sistema foi, em seguida, preparado para operação contínua. De modo a enxaguar com água quente e esterilizar com vapor a linha de transferência de mosto, as válvulas V-2 (ou V-4 para T-2), V-5, e V-6 foram abertas, enquanto V-1 (ou V-3 para T-2) e V-7 foram fechadas, isolando-
10 se a linha de mosto. A linha de transferência de mosto foi enxaguada com água quente a aproximadamente 80°C, que foi suprida através de V-2 (ou V-4 para T-2). Seguinte ao ciclo de enxaguamento com água quente, a linha de vapor da instalação foi conectada na mesma localização, e a linha de transferência de
15 mosto foi esterilizada com vapor por um mínimo de 30 minutos. Ao mesmo tempo que a linha de vapor foi fechada, a válvula de derivação (V-6) foi também fechada. Uma vez que o sistema arrefeceu, V-2 (ou V-4 para T-2) foi fechada, e a linha de vapor foi desconectada. A válvula do tanque de mosto V-1 (ou V-3 para
20 T-2), e a válvula de derivação (V-6), foram abertas, e a bomba de transferência de mosto (P-1) foi iniciada. O mosto foi enviado para o dreno via a válvula de derivação (V-6) até que o condensado na linha foi substituído com mosto frio fresco. Neste ponto a válvula de derivação foi fechada, e a válvula de admissão
25 do bioreator (V-6) no reator foi aberta, começando o processo de fermentação contínua.

De duas em duas semanas, o tanque que supria mosto foi alternado entre os tanques de armazenamento (T-1 e T-2). Após duas semanas de suprimento de mosto de T-1, a bomba de alimentação contínua P-1 foi cessada, e a válvula (V-5) na admissão do bioreator foi fechada. A linha de transferência de mosto foi, em seguida, conectada ao segundo tanque de armazenamento (T-2), e a linha foi inundada e esterilizada conforme descrito no parágrafo anterior. A fermentação continua então se resume após somente um tempo de parada curto de menos do que uma hora.

Tabela 5.1. Descrição das partes detalhadas para o diagrama de fluxo mostrado na Figura 5.6; PTFE, politetrafluoretileno; SS; aço inoxidável

Descrição	Tamanho
BR-1 Bioreator	8 L
T-1 Tanque de armazenamento para mosto	1600L
T-2 Tanque de armazenamento para mosto	1600 L
T-3 Tanque de armazenamento para cerveja	30 L
P-1 Bomba (peristáltica, velocidade variável) para transferência de mosto de T-1 para BR-1	<0,08

F-1 Filtro para gás na descarga de T-1	< 4 bar
F-2 Filtro de gás na admissão de T-1	< 2 bar
F-3 Filtro para gás na descarga de T-2	< 4 bar
F-4 Filtro para gás na descarga de T-2	< 2 bar
F-5 Filtro para gás na admissão de BR-1	< 2 bar
F-6 Filtro para gás na descarga de T-3	< 2 bar
M-1 Controlador de fluxo de massa para ar para BR-1	< 500 sccm
R-1 Rotômetro para dióxido de carbono para T-1	< 10 scfh
R-2 Rotômetro para dióxido de carbono para T-2	< 10 scfh
R-3 Rotômetro para dióxido de carbono para BR-1	< 2,5 scfh
PR-1 Regulador de pressão para dióxido de carbono para T-1 & T-2	< 100 psi
PR-2 Regulador de pressão para dióxido de carbono para BR-1	< 100 psi

PR-3 Regulador de pressão para ar para BR-1	< 100 psi
V-1 Válvula (borboleta) para mosto em T-1	1"
V-2 Válvula (borboleta) para mosto em círculo de CIP em T-1	1"
V-3 Válvula (borboleta) para mosto em T-2	1"
V-4 Válvula (borboleta) para mosto em círculo de CIP em T-2	1"
V-5 Válvula (esfera) para mosto no cabeçote	1/4"
V-6 Válvula (esfera) para derivação na admissão de mosto de BR-1	1/4"
V-7 Válvula (esfera) para admissão de mosto em BR-1	1/4"
V-8 Válvula (amostra de membrana) na parede de BR-1	12 mm
V-9 Válvula (borboleta) na descarga de cerveja de BR-1	1"
V-10 Válvula (amostra de membrana) para descarga mosto	12 mm

de BR-1	
V-11 Válvula (borboleta) secundária, em descarga de cerveja de BR-1	1"
V-12 Válvula (esfera) para enchimento de líquido de T-3	¼"
V-13 Válvula (esfera) para linha de dióxido de carbono para T-1 & T-2	¼"
V-14 Válvula (borboleta) para admissão de dióxido de carbono em T-1	½"
V-15 Válvula (borboleta) para admissão de dióxido de carbono em T-2	½"
V-16 Válvula (esfera) para linha de dióxido de carbono para BR-1	¼"
V-17 Válvula (liberação rápida) para admissão de gás em BR-1	¼"
V-18 Válvula (esfera) para linha de ar para BR-1	¼"

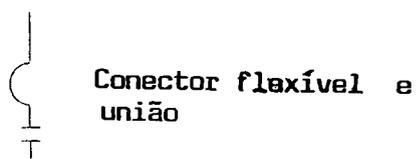
Descrição	Constante de Mat'l
BR-1 Bioreator	316 SS

T-1 Tanque de armazenamento para mosto	316 SS
T-2 Tanque de armazenamento para mosto	316 SS
T-3 Tanque de armazenamento para cerveja	316 SS
P-1 Bomba (peristáltica, velocidade variável) para transferência de mosto de T-1 para BR-1	Rolos SS em Norprene® Tubo flexível de alimentação
F-1 Filtro para gás na descarga de T-1	poliprop., 0,2 micrômetro membrana de PTFE
F-2 Filtro para gás na descarga de T-1	poliprop., 0,2 micrômetro membrana de PTFE
F-3 Filtro para gás na descarga de T-2	poliprop., 0,2 micrômetro membrana de PTFE
F-4 Filtro para gás na descarga de T-2	poliprop., 0,2 micrômetro membrana de PTFE
F-5 Filtro para gás na admissão de BR-1	poliprop., 0,2 micrômetro membrana de PTFE
F-6 Filtro para gás na descarga de T-3	poliprop., 0,2 micrômetro membrana de PTFE
M-1 Controlador de fluxo de massa para ar para BR-1	316 SS, nylon, Viton® Anéis “O”
R-1 Rotômetro para dióxido de	316 SS, bloco acrílico

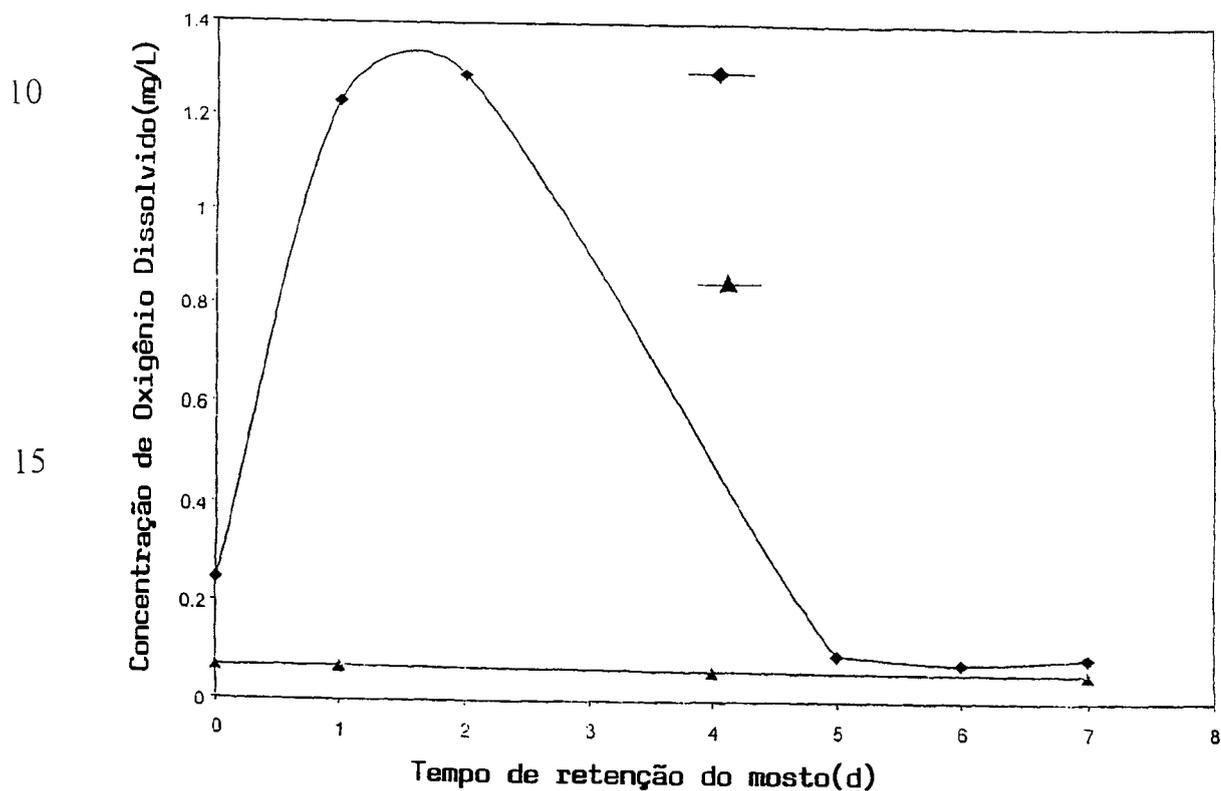
carbono para T-1	
R-2 Rotômetro para dióxido de carbono para T-2	316 SS, bloco acrílico
R-3 Rotômetro para dióxido de carbono para BR-1	316 SS, bloco acrílico
PR-1 Regulador de pressão para dióxido de carbono para T-1 & T-2	316 SS
PR-2 Regulador de pressão para dióxido de carbono para BR-1	316 SS
PR-3 Regulador de pressão para ar para BR-1	316 SS
V-1 Válvula (borboleta) para mosto em T-1	316 sede Viton®
V-2 Válvula (borboleta) para mosto em círculo de CIP em T-1	316 sede Viton®
V-3 Válvula (borboleta) para mosto em T-2	316 sede Viton®
V-4 Válvula (borboleta) para mosto em círculo de CIP em T-2	316 sede Viton®
V-5 Válvula (esfera) para mosto no cabeçote	316 sede Viton®
V-6 Válvula (esfera) para	316 sede Viton®

derivação na admissão de mosto de BR-1	
V-7 Válvula (esfera) para admissão de mosto em BR-1	316 sede Viton®
V-8 Válvula (amostra de membrana) na parede de BR-1	316 sede Viton®
V-9 Válvula (borboleta) na descarga de cerveja de BR-1	316 sede Viton®
V-10 Válvula (amostra de membrana) para descarga mosto de BR-1	316 sede Viton®
V-11 Válvula (borboleta) secundária, em descarga de cerveja de BR-1	316 sede Viton®
V-12 Válvula (esfera) para enchimento de líquido de T-3	316 sede Viton®
V-13 Válvula (esfera) para linha de dióxido de carbono para T-1 & T-2	316 sede Viton®
V-14 Válvula (borboleta) para admissão de dióxido de carbono em T-1	316 sede Viton®
V-15 Válvula (borboleta) para admissão de dióxido de carbono em T-2	316 sede Viton®

V-16 Válvula (esfera) para linha de dióxido de carbono para BR-1	316 sede Viton®
V-17 Válvula (liberação rápida) para admissão de gás em BR-1	316 sede Viton®
V-18 Válvula (esfera) para linha de ar para BR-1	316 sede Viton®



5



◇ – Mosto aspergido com $0,113 \text{ m}^3/\text{hora}$ (4 scfh) de dióxido de carbono após o tanque de armazenamento (T1 ou T2) ser preenchido. Devido a aeração superficial, a concentração de oxigênio dissolvido alcançou um máximo após $\sim 1,5$ dias, quando o tanque não foi pré-purgado com dióxido de carbono.

Δ – Tanque de mosto (T1 ou T2) purgado por 3 horas @ $0,85 \text{ m}^3/\text{hora}$ (30 scfh) com dióxido de carbono para enchimento e aspergido com $0,0113 \text{ m}^3/\text{hora}$ (4 scfh) de dióxido de carbono durante enchimento de mosto e armazenamento

10 Figura 5.7. Concentração de oxigênio dissolvido no mosto versus tempo de retenção no vaso de armazenamento de mosto (T-1 or T-2) sob condições de enchimento de tanque diferentes.

15 Tabela 5.2. Perfil de temperatura de água no vaso de armazenamento de mosto (T-1 ou T-2) após equilíbrio por três dias sem aspergimento de dióxido de carbono, e após 24 horas de aspergimento de dióxido de carbono a $0.113 \text{ cm}^3/\text{h}$.

Localização de Medição Dentro do Vaso Cilindro-cônico	Temperatura	
	Sem aspergimento de dióxido de carbono	Com aspergimento de dióxido de carbono
10 cm abaixo da superfície de líquido e 10 cm acima da parede do vaso	20,6	0,4

10 cm abaixo da superfície de líquido e no centro do vaso	20,1	0,1
fundo da seção cilíndrica e 10 cm da parede do vaso	3,8	3,7
Fundo da seção cilíndrica e no centro do vaso	3,7	4,1
Ambiente da Instalação Piloto	21,4	19,8

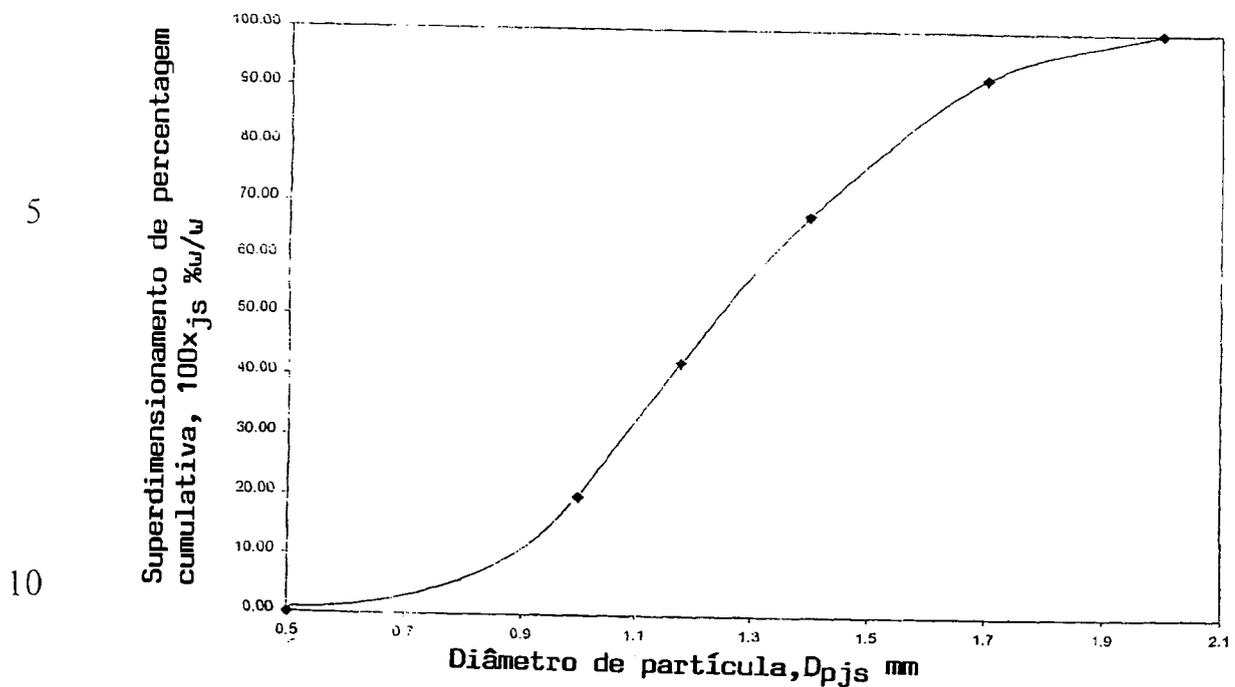


Figura 5.8. Distribuição de tamanho de particular cumulativa de gotas de gel de kappa-carrageenan contendo células de levedura imobilizada (n = 5)

¹CAPÍTULO 6. Imobilização de Gel de Kappa-Carrageenan de

LEVEDURA DE FABRICO DE BEBIDA FERMENTADA LAGER

5 Os cientistas estudaram uma variedade de matrizes para o prendimento físico de todas as células incluindo alginato de cálcio (Bejar e outros., 1992; Curin e outros., 1987; Masschelein e Ramos-Jeunehomme, 1985; Nedovic e outros., 1996; Shindo e outros., 1994; White e Portno, 1978), agarose
10 (Hooijmans e outros., 1990; Lundberg e Kuchel, 1997), e géis de carrageenan (Norton e outros., 1995; Wang e outros., 1982). Carrageenan é um material de grau de alimentação, e tem sido favorecido para encapsulamento de célula devido a sua resistência mecânica superior comparada a outros géis (Büyükgüngör, 1992).

15 Na primeira parte deste capítulo, a colonização de célula de levedura dentro das gotas de gel de kappa-carrageenan, foi monitorada sobre três ciclos de fermentação de dosagem repetida. A viabilidade das células imobilizadas e das células liberadas no líquido foi examinada. Os parâmetros da
20 fermentação incluindo etanol, maltose, maltotriose, frutose, e glucose, foram seguidos através de todas as fermentações de dosagem repetidas e, em seguida, comparadas com fermentações de controle usando células de levedura suspensas livremente sob as mesmas condições de nutriente.

¹ Uma versão da seção 6,0 foi publicada (Pilkington e outros., 1999).

Existe pouca informação publicada até esta data nos efeitos físicos nas células após longo prazo de imobilização (Virkaajärvi e Kronlöf, 1998) e exposição contínua às tensões externas e produtos de fermentação. A segunda parte deste capítulo examina a viabilidade, distribuição da população de célula e aparência física de células de levedura imobilizadas dentro das gotas de gel de carrageenan sob um período estendido de fermentação contínua em um bioreator de elevação de gás. Também examinada sob períodos estendidos de tempo foi a percentagem relativa de levedura deficiente respiratória na população de célula imobilizada e livremente suspensa do bioreator.

A carrageenan é composta de unidades de repetição de 3-6-anidrogactose e carrageenans agrupadas diferem pelo número e posição dos grupos de sulfato de éster nas unidades de gactose de repetição. Um esquema do mecanismo de gelação pode ser visto na FIG. 22. Quando a carrageenan está no estado sólido, suas cadeias de polisacarídeos estão em uma configuração de espira aleatória. Quando hélices o bastante tiverem se formado para proporcionar reticulações para uma rede de operação contínua, a gelação ocorre. Quanto mais hélices são formadas, ou, conforme as hélices formam agregados, o gel torna-se mais forte e mais rígido (Rees, 1972).

Os três tipos comuns de carrageenan são lâmbda, iota e kappa. Conforme ilustrado na Figura 6.2, elas diferem no teor de sulfato de éster, e a quantidade de sulfato de

éster afetará a solubilidade da cadeia de polisacarídeo. A lâmbda-carrageenan é altamente sulfatada, e carece de capacidade de formar um gel (Marrs, 1998). A iota-carrageenan forma um gel fraco altamente elástico na presença de íons cálcio, e não mostram sinérese significativa. A sinérese ocorre quando a tendência do gel de formar hélices adicionais ou agregados é tão forte que a rede de operação se contrai, causando “gotejamento” de líquido (Rees, 1972). A kappa-carrageenan é moderadamente sulfatada e, desse modo, forma um gel mais forte e mais rígido na presença de íons potássio, e suportará alguma sinérese. A resistência do gel aumentada proporcionada pela kappa-carrageenan torna-a desejável para a imobilização de todas as células de levedura.

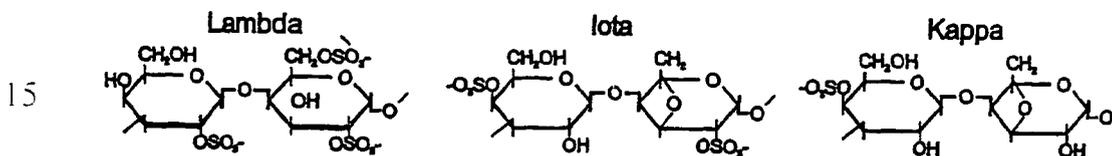


Figura 6.2. Estruturas químicas de lâmbda, iota e kappa-carrageenans.

20 Uma característica importante da carrageenan é suas propriedades reversíveis de termo-gelação. A medida que a solução de carrageenan é arrefecida, a viscosidade aumenta e gelação ocorre. A medida que a solução é aquecida, a viscosidade diminui e a carrageenan reverte de volta ao estado sol. Pelo controle da composição da solução de cátion de gelação, a temperatura na qual a carrageenan é transformada de um sol em

25

um gel pode ser alterada. A temperatura de gelação da kappa-carrageenan aumenta com o aumento da concentração de cloreto de potássio na solução. Este fenômeno foi usado para maquinar um processo para imobilização de célula, visto que flutuações
5 severas de temperatura podem ser evitadas (Neufeld e outros., 1996). A temperatura de gelação da carrageenan pode ser controlada tal que ela é alta o bastante para ser um gel sob condições de fermentação, ainda baixa o bastante que as células de levedura podem ser misturadas com a carrageenan em seu
10 estado sol sem efeitos perniciosos na viabilidade antes da gelificação da gota.

Existem um número de fatores, não obstante, que indicam a necessidade de estudo adicional nos efeitos de imobilização dentro das matrizes de gel no metabolismo e
15 fisiologia da célula de levedura. As células imobilizadas não são submetidas ao mesmo micro-ambiente como as células livres na fase líquida, porque existem barreiras adicionais a partir da matriz de gel, e outras células de levedura presas que devem ser sobre-
montadas antes dos substratos poderem ser transportados para
20 suas superfícies (FIG. 23). Existem muitos estudos nas taxas de transferência de massa dentro das matrizes de gel (Etapé e outros., 1992; Hannoun e Stephanopoulos, 1986; Korgel e outros., 1992; Kurosawa e outros., 1989; Merchant e outros., 1987; Øyaas e outros., 1995; Venâncio e Tiexiera, 1997) para ganhar uma
25 melhor compreensão dos efeitos negativos potenciais que a limitação de nutriente em células imobilizadas pode ter na

performance de fermentação. As difusidades efetivas de pequenas moléculas dentro do gel de carrageenan são comparáveis com as difusidades das mesmas moléculas em água apenas, e o gel permite a difusão molecular de pequenas moléculas, tais como
5 glucose e etanol. Contudo, em uma fermentação de célula imobilizada típica, os nutrientes são rapidamente transportados para as gotas de célula imobilizada principalmente pelo transporte convectivo em adição à difusão molecular (Hannoun e Stejhanopoulos, 1986). Uma vez que os nutrientes entram nas
10 gotas, o transporte é relativamente baixo porque a difusão molecular domina. Isto significa que as células de levedura na periferia das gotas de gel podem ter uma vantagem nutricional distinta sobre aquelas no centro das gotas.

A idade da levedura imobilizada deve também
15 ser considerada. A idade das células presas como uma fermentação contínua procede sobre o curso de meses, e elas fermentam sobre um conjunto definido de condições de estado pseudo-constante. Contudo, durante fermentação de dosagem, as células de levedura são expostas a um ambiente que muda com o
20 tempo, e as células são somente re-utilizadas para um número limitado de fermentação antes da disposição. Mais pesquisa é necessária para estudar os efeitos de longo suporte de fermentação contínua na vitalidade da célula de levedura em relação à performance de fermentação.

25 Na parte A deste capítulo, as cinéticas de colonização de levedura nas gotas de gel de kappa-carrageenan

foram examinadas durante três ciclos de fermentação de dosagem repetida. A viabilidade e concentrações de célula de levedura imobilizada e livremente suspensa foram monitoradas, junto com etanol, grau Plato, e concentração de açúcar.

5 Na parte B, os efeitos de tempo de fermentação na posição e distribuição da célula dentro da gota de gel e morfologia de célula de levedura foram examinados. Microscopia de elétron de varredura (SEM) foi usada para examinar as células de levedura imobilizada de kappa-carrageenan em regiões
10 diferentes da gota de gel em quatro tempos diferentes: 1) imediatamente após produção de gota; 2) após dois dias de fermentação de dosagem; 3) após dois meses de fermentação contínua em um bioreator de elevação de gás de escala piloto; 4) após seis meses de fermentação contínua em um bioreator de
15 elevação de gás de escala piloto. A viabilidade da levedura e concentração em ambas as células imobilizada e de fase líquida foram também medidas. Também examinada foi a percentagem relativa de levedura deficiente respiratória (células imobilizadas e livres na fase líquida) após cinco meses de fermentação contínua
20 no bioreator de elevação de gás, e esta foi comparada com as percentagens encontradas nas fermentações de cerveja de dosagem tradicional. Uma linhagem de levedura lager de produção foi usada através de todo o estudo.

6.1 Procedimento Experimental

25 ***Produção de Gota de Gel de Kappa-Carrageenan:*** gel de kappa-carrageenan X-0909 foi uma doação

generosa da Copenhagen Pectin A/S. Gotas de gel de kappa-carrageenan contendo células de levedura lager presa foram produzidas usando-se o processo de misturador estático com um carregamento de célula inicial de 2.6×10^7 células/mL de gel
5 (Pedido de Patente 2133789 (Neufeld e outros., 1996) e um diâmetro de gota de 0.5 a 2.0 mm.

Meio de Fermentação: As cervejarias Labatt do Canadá supre mosto de fabrico de bebida fermentada com uma gravidade específica de 17.5°P conforme descrito em detalhes na
10 seção de Materiais e Métodos.

Parte A: Cinéticas de Dosagem Repetida de Levedura Imobilizada em Gotas de Gel de Kappa-Carrageenan Gel Beads

As fermentações foram conduzidas em frascos
15 Erlenmeyer de 2L a 21°C, com agitação a 150 rpm. O carregamento do veículo foi 40% (v/v) de gotas de célula imobilizada, e o volume de fermentação total foi 1 L. Cada fermentação foi de sete dias de duração. Gotas de célula imobilizada fresca em R1 foram providas no mosto, e no final da
20 fermentação estas gotas foram separadas a partir do líquido fermentado pela passagem da mistura através de uma peneira de aço inoxidável estéril (tamanho de malha de 500). As gotas foram, em seguida, providas novamente na mesma proporção no mosto estéril fresco para uma segunda (R2) e, em seguida,
25 terceira (R3) fermentação de dosagem. A amostragem foi realizada duas vez por dia para os primeiros três dias, e, em

seguida, uma vez por dia para os quarto e quinto dias de cada fermentação. As fermentações foram efetuadas em duplicata ou triplicata. Todas as fermentações foram conduzidas com fermentações de controle de célula livremente suspensa, que foram conduzidas sob as mesmas condições, exceto que somente células livres foram providas nas fermentações a uma taxa de 4 g/L. As amostras foram analisadas para viabilidade de célula imobilizada e concentração de célula, e concentrações de carboidrato de fase líquida e etanol.

Fatores de produção $Y_{P/S}$, de etanol produto, a partir da glucose fermentável total de substrato, foram calculados usando-se a equação 3.20 para os três ciclos de fermentação de célula imobilizada e o controle de célula livre. Para todas as fermentações os fatores de produção foram calculados a partir da partida da fermentação para o tempo que o consumo de maltose foi completado.

A produtividade do etanol V_{ethanol} , a quantidade de etanol produzido por volume de operação do bioreator total por unidade de tempo de fermentação, foi calculada usando-se a equação 3.25 para R1, R2 e R3, e o controle de célula livre a partir da partida de fermentação para o tempo que o consumo de maltose foi completado. No caso dos fatores de produção e produtividade de etanol, as contribuições das células de levedura imobilizada e livremente suspensa não foram distinguidas uma da outra.

A taxa de crescimento específica máxima local m_{\max} , e o tempo de dobramento da célula foi calculado para o controle de célula livre média usando-se as equações 3.3 e 3.4.

Parte B: Viabilidade e Características de
5 *Morfologia de Levedura Imobilizada sobre Tempo de*
Fermentação Estendido

Condições de Fermentação de Dosagem: As fermentações de dosagem foram conduzidas em frascos Erle meyer de 2L a 21°C, com agitação a 150 rpm. O
10 carregamento de veículo foi 40% (v/v) com um volume de fermentação total de 1 L.

Condições de Fermentação Contínua:
Bioreatores de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto foram usados para fermentações contínuas. Todos os dados
15 coletados foram de um bioreator de volume de operação de 8 L, exceto que as micrografias de elétron de varredura de 2 meses que foram coletadas de um bioreator de 50 L usando-se o mesmo meio de fermentação e método de imobilização. As gotas de célula imobilizada a 40% (v/v) foram fluidizadas dentro dos
20 bioreatores usando-se uma mistura de ar e dióxido de carbono. Os bioreatores foram operados sob condições variantes com temperaturas de fermentação controladas a 12, 17 e 22°C, e tempos de residência mantidos entre 0.9 e 1.8 dias. O reator de elevação de gás alcançou uma concentração de etanol mínima de
25 73 kg/m³ durante o experimento de seis meses, com uma concentração média de 58 kg/m³.

Análise Microbiológica: Amostras foram tomadas a partir da fase líquida do bioreator de elevação de gás pelo menos uma vez por semana para testar os contaminantes incluindo levedura selvagem, levedura não-lager, e bactéria de refugo de cerveja aeróbica e anaeróbica. Após cinco meses, as células de levedura de fase líquida foram ensaiadas em duplicata para mutação deficiente respiratória.

Microscopia de Elétron de Varredura (SEM): Gotas de gel de kappa-carrageenan (diâmetro de 1.0 – 1.5 mm) contendo células de levedura lager imobilizada, foram amostradas para exame de SEM em quatro tempos diferentes: 1) após produção de gota de célula imobilizada e antes da inoculação de gotas no meio de fermentação; 2) após 2 dias em fermentação de dosagem; 3) após 2 meses de fermentação contínua em um bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto; 4) após 6 meses de fermentação contínua em um bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de escala piloto. A metodologia para uso para SEMs e a preparação de amostra relacionada são descritas na seção 4.7.

Usando-se os métodos descritos na seção 4.6, a concentração e viabilidade de célula (imobilizada e livremente suspensa) foram acessadas nos mesmos tempos como as SEMs.

6.2 Resultados e Discussões

Parte A: Cinéticas de Dosagem Repetida de Levedura Imobilizada em Gotas de Gel de Kappa-Carrageenan

O tempo de fermentação foi grandemente reduzido cada hora que as células imobilizadas foram providas no mosto fresco, conforme visto nas Figuras 6.4 (a), (b), e (c) ilustrando maltose, maltotriose, glucose, frutose e etanol vs. tempo de fermentação para os três tipos de fermentação de dosagem repetida. A partir destas figuras pode ser visto que o tempo para consumo de açúcar completo foi 64 horas para R1, 44 horas para R2, e 26 horas para R3. A fermentação de controle de célula livremente suspensa que contém gotas de células não-imobilizadas, mostrada na Figura 6.5, leva 82 horas para consumo de açúcar completo. Pode também ser visto a partir dos gráficos na Figura 6.4 que concentrações de etanol finais foram mais altas na terceira das fermentações de célula imobilizada de dosagem repetida. Devido a kappa-carrageenan ser um hidro-gel, algum etanol é transportado nas gotas quando elas foram providas no mosto fresco. Conseqüentemente, no tempo zero para R2 e R3, algum etanol estava presente no líquido de fermentação, e a concentração inicial de glucose, maltose, maltotriose, e frutose foi mais baixa nas fermentações de célula imobilizada (Figura 6.4) comparada com a fermentação de controle de célula livre, conforme visto na Figura 6.5. Desse modo, os fatores de produção foram calculados para as fermentações, de modo que o rendimento, g de produção de etanol por g de açúcar consumido, pode ser examinado em uma base completa.

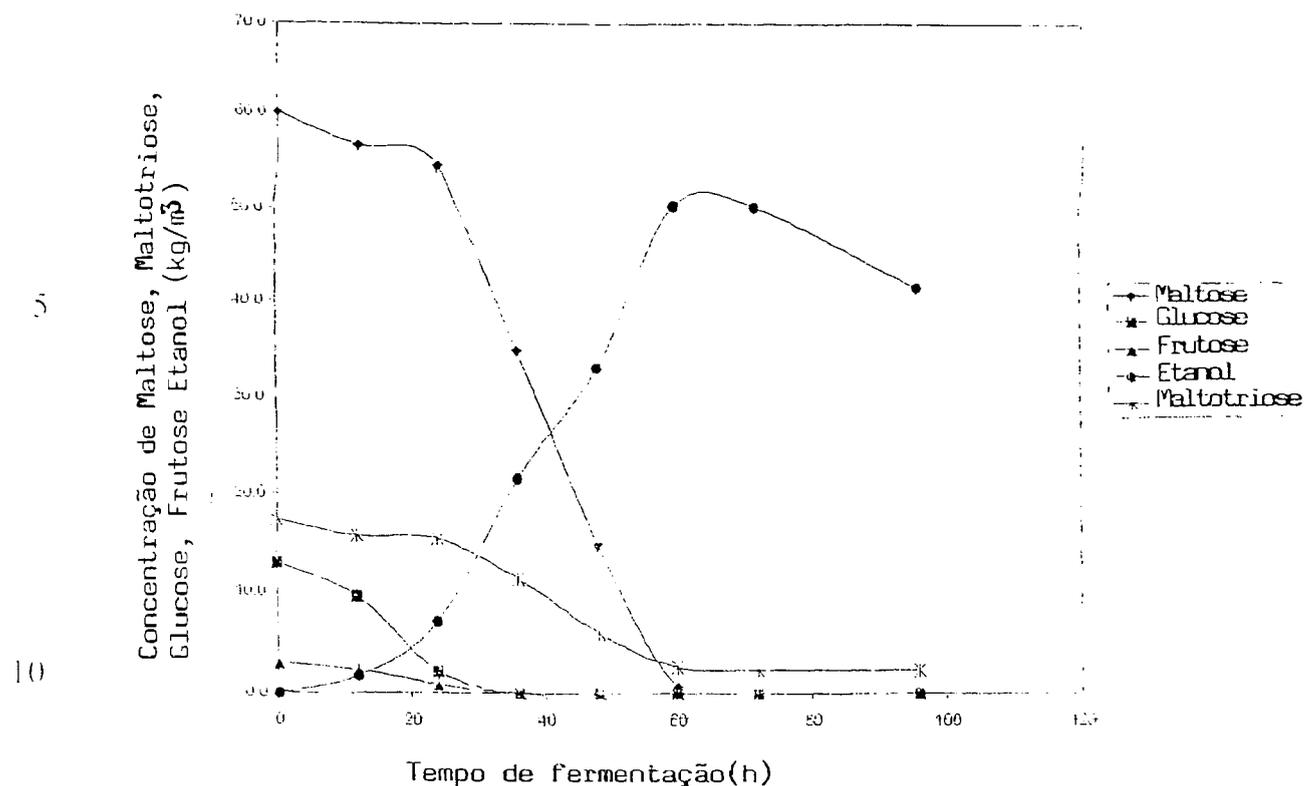


Figura 6.4. a) concentração de R1, maltose, maltotriose, glucose, frutose, e etanol versus tempo de fermentação para fermentação de dosagem repetida usando células de levedura lager imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan

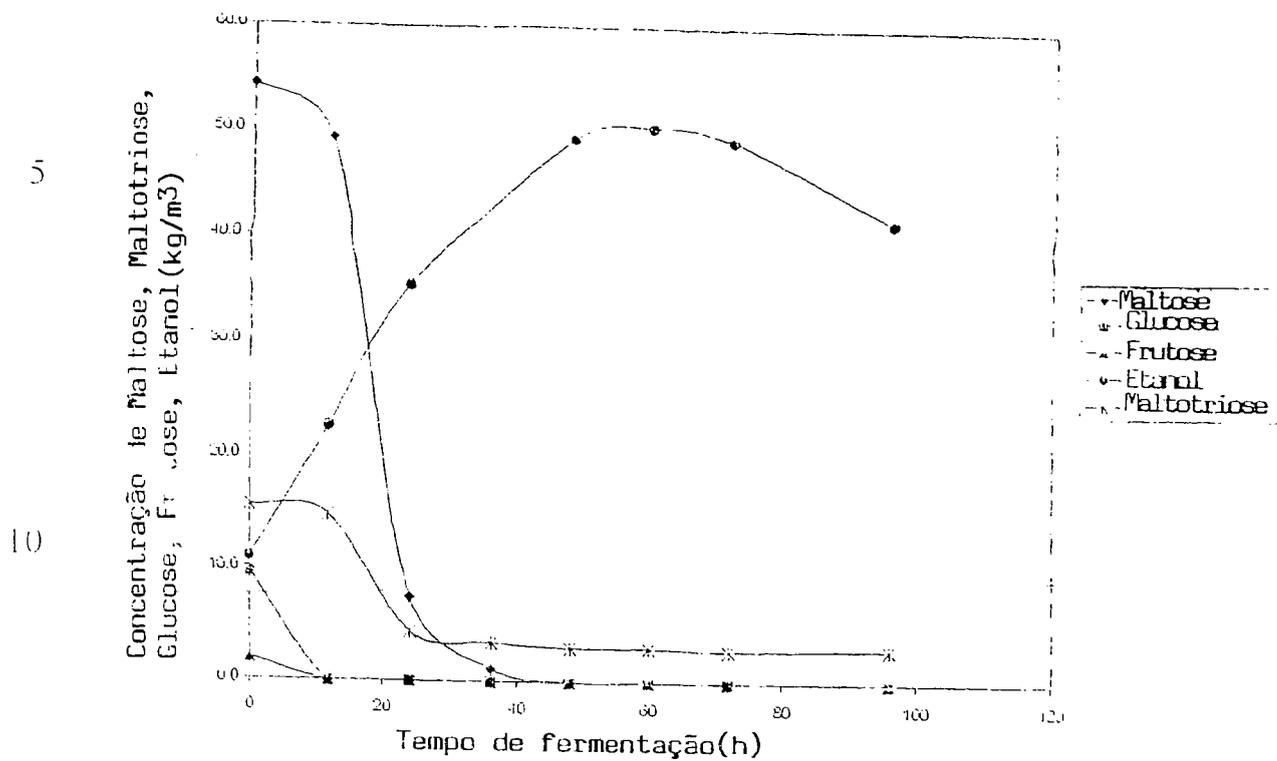


Figura 6.4. b) concentração de R2, maltose, maltotriose, glucose, frutose, e etanol versus tempo de fermentação para fermentações de dosagem repetida usando-se células de levedura lager imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan.

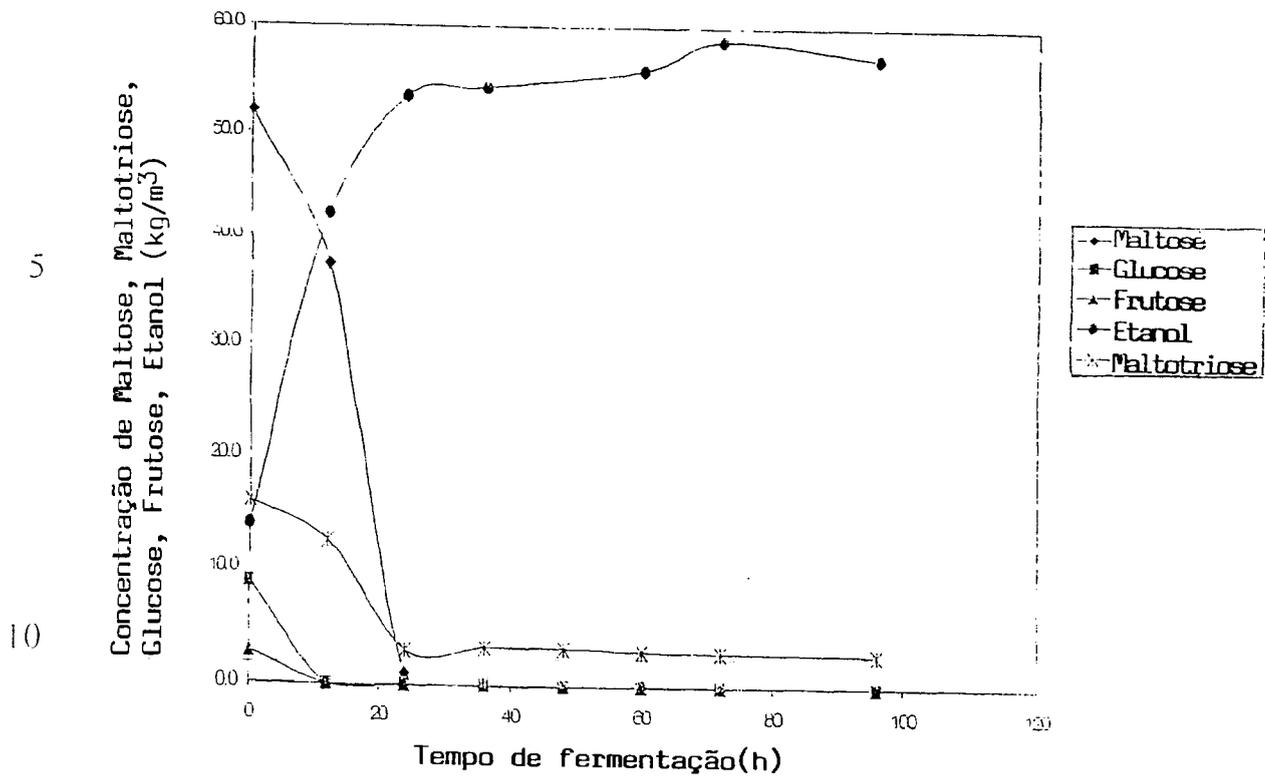


Figura 6.4.c) concentração de R3, maltose, maltotriose, glucose, fructose, e etanol versus tempo de fermentação para fermentações de dosagem repetida usando-se células de levedura lager imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan.

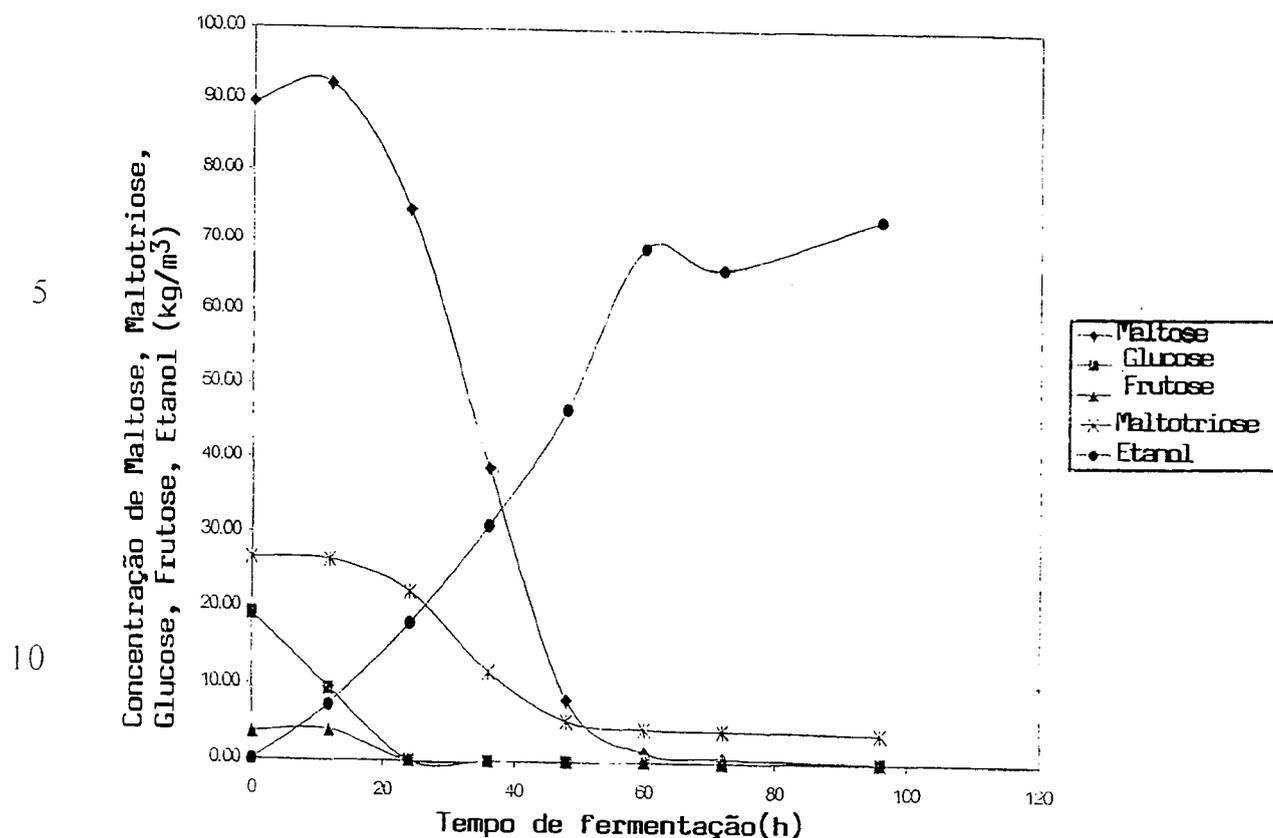


Figura 6.5. concentração de maltose, maltotriose, glucose, frutose, e etanol versus tempo de fermentação para fermentações de controle de levedura lager livremente suspensa (células não-imobilizadas).

As Figuras 6.6 (a) e (b) comparam concentrações de maltose e etanol, respectivamente, versus tempo de fermentação de R1, R2, e R3. Durante R1 repetido, a maltose foi levada pelas células de levedura quase imediatamente após provisão no mosto fresco. As concentrações de etanol alcançam seu pico mais cedo no R1 repetido, e também alcança concentrações mais altas do que as primeiras duas fermentações de dosagem. Conforme mostrado na Figura 6.6 (b), o retardo inicial na produção de etanol em R1 foi reduzida drasticamente

quando estas células imobilizadas foram providas em R2, e adicionalmente reduzidas após provisão para R3.

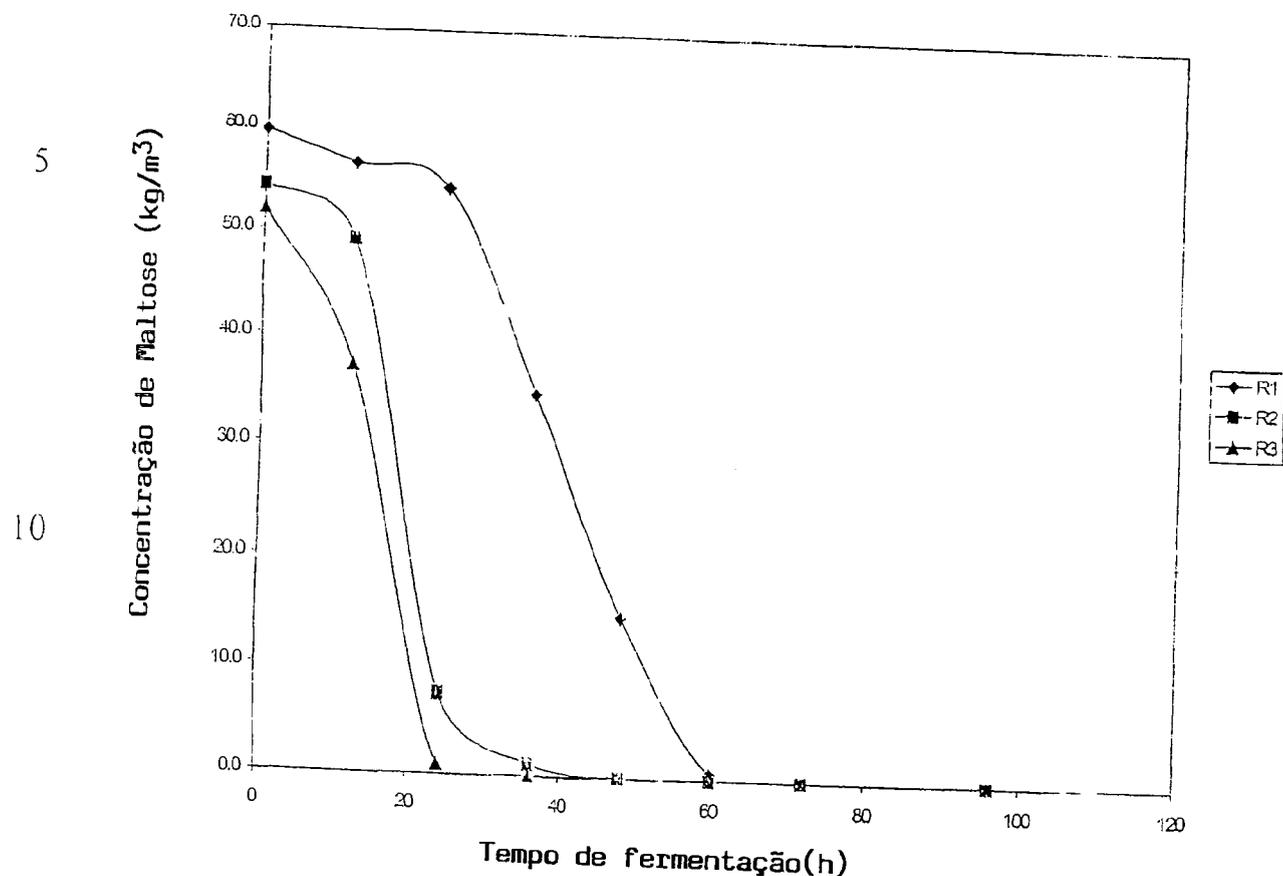


Figura 6.6. a) concentração de maltose versus tempo de fermentação para fermentações de dosagem repetida, R1, R2, e R3, usando-se células de levedura lager imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan.

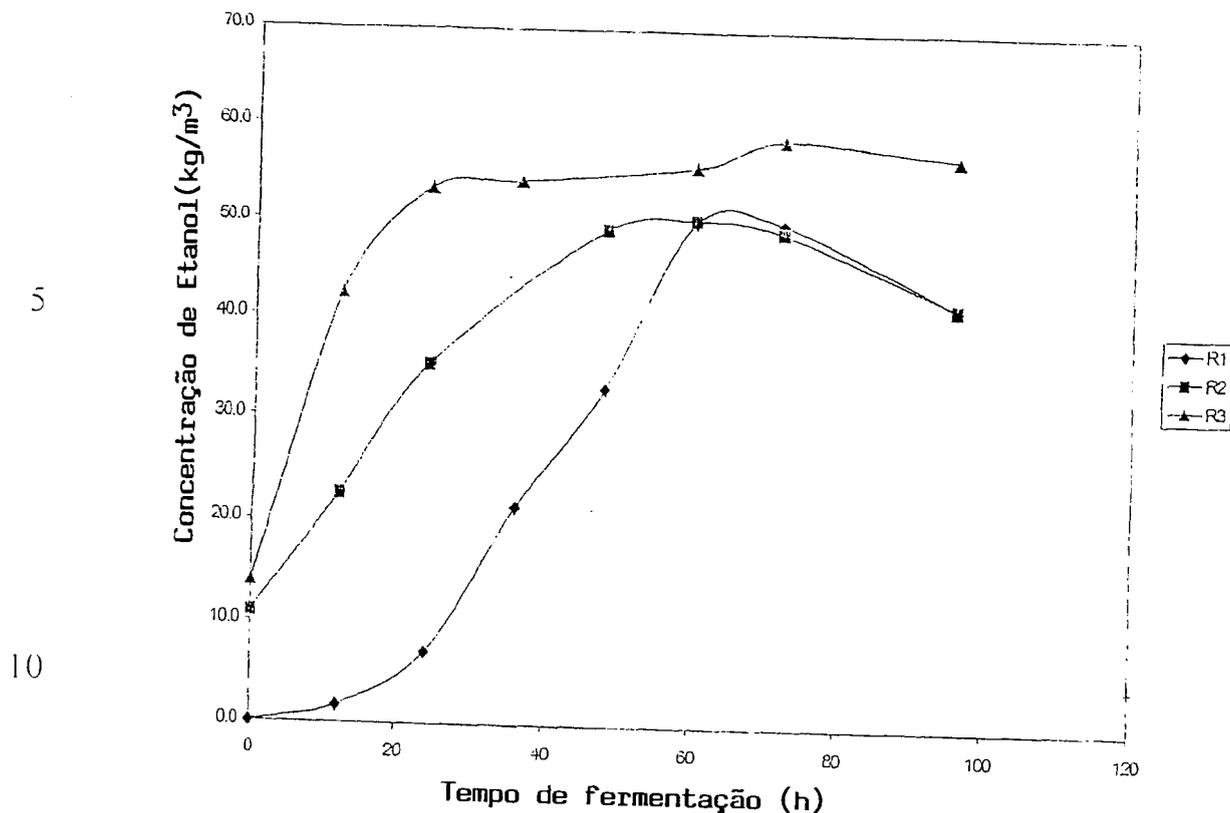
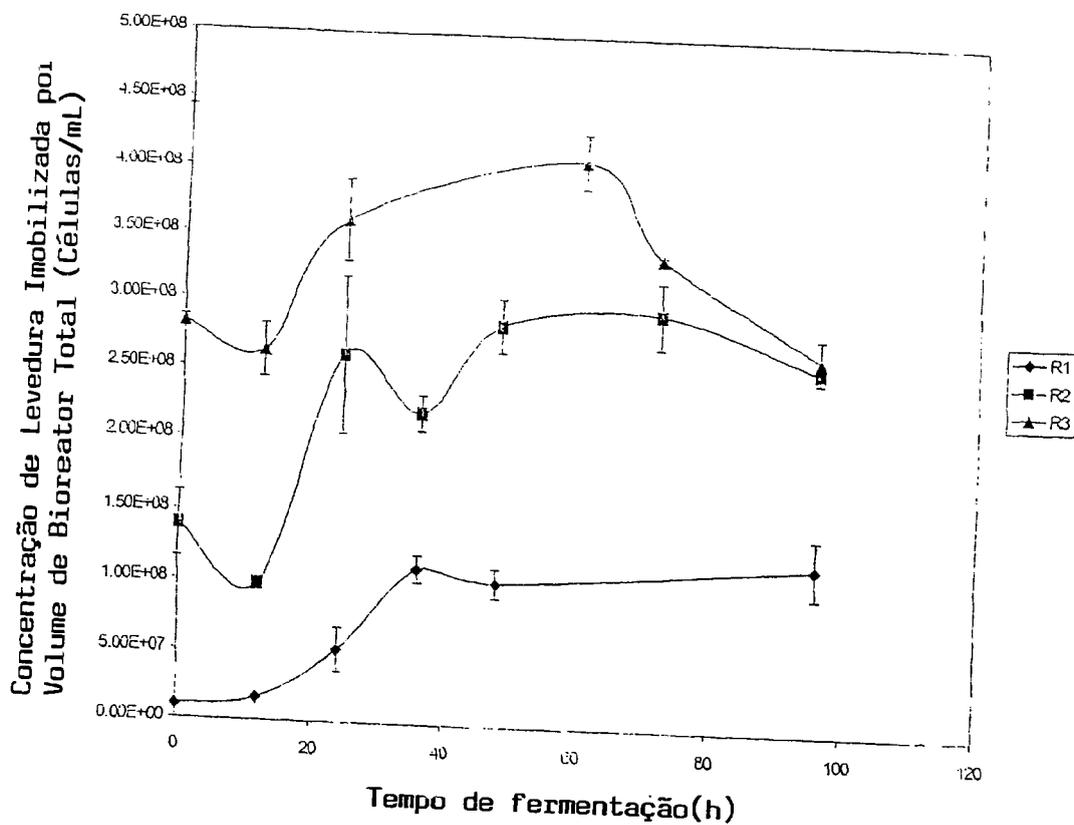


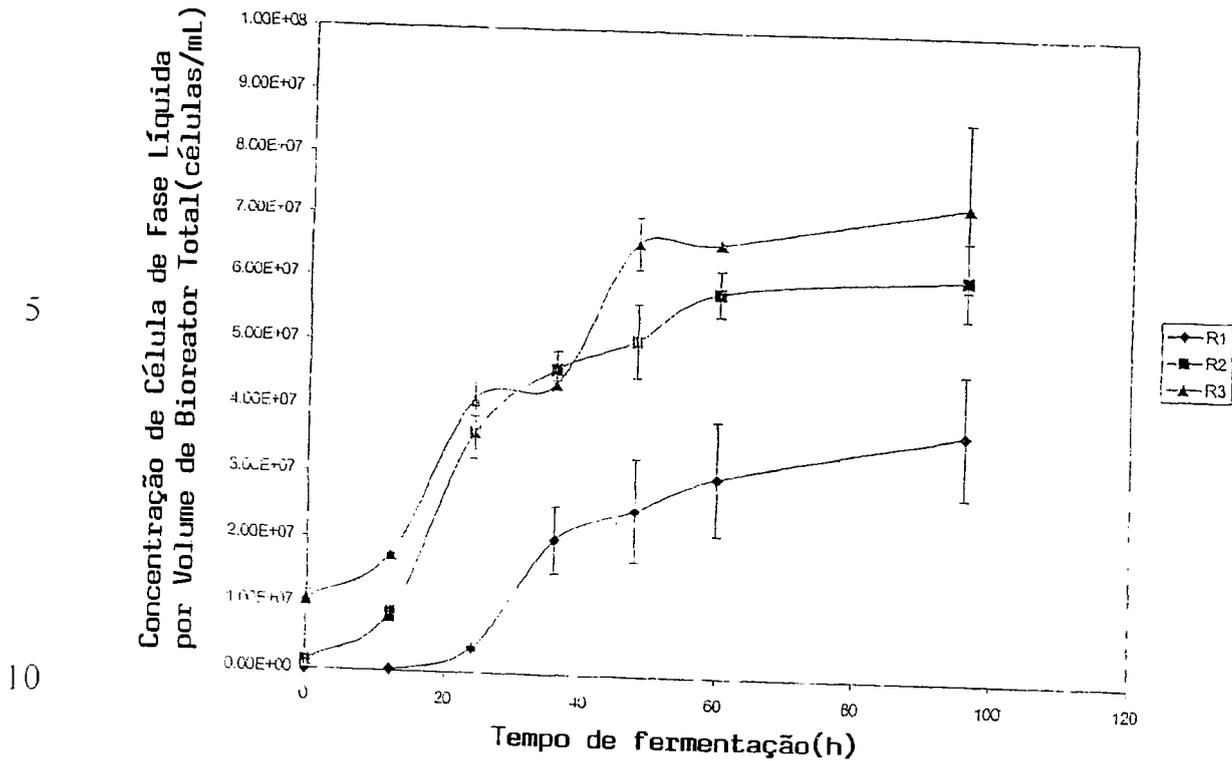
Figura 6.6. b) concentração de etanol versus tempo de fermentação para fermentações de dosagem repetida, R1, R2, e R3 usando-se células de levedura lager imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan.

Figura 6.7 (a) mostra a concentração de célula imobilizada por volume de bioreator total vs. tempo de fermentação para R1, R2 e R3. As células livres liberadas a partir da matriz de células liberada na fase líquida de massa nestas fermentações vs. tempo são mostradas na Figura 6.7 (b). Na Figura 6.7 (c) o total de células de levedura imobilizada e livre por volume de reator total são mostrados para as três dosagens. A Figura 6.7 (a) mostra que a concentração de células imobilizadas dentro do gel de kappa-carrageenan gel continua a aumentar seguindo sua inoculação inicial no mosto para R1. Quando as

gotas foram providas no mosto fresco para R2 repetido, o crescimento continua a ocorrer dentro das gotas de gel. A terceira vez que as células encapsuladas foram providas no mosto, a taxa de aumento na concentração de célula imobilizada abaixou. O perfil de concentração de três células liberadas a partir da matriz de gel de kappa-carrageenan na fase líquida de massa, células imobilizadas e células totais na fermentação para R1, é mostrado na Figura 6.8.



20
25
Figura 6.7. a) Concentração média de célula de levedura lager imobilizada por volume de bioreator total versus tempo de fermentação para fermentações de R1, R2, e R3. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).



15

Figura 6.7. b) Concentração por volume de bioreator total de células de levedura lager liberada na fase líquida de massa versus tempo de fermentação para fermentações de R1, R2, e R3. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).

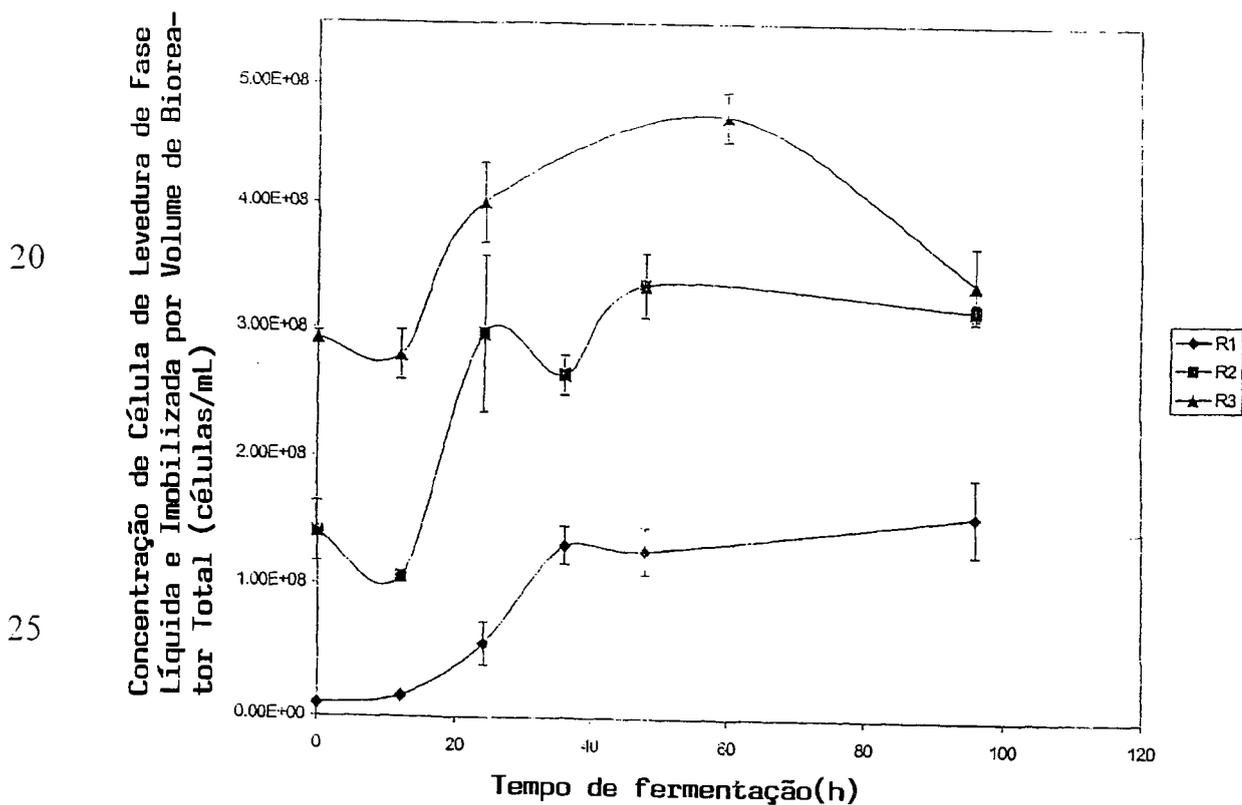


Figura 6.7. c) Concentração de célula de levedura lager total (imobilizada e de fase líquida) por volume de bioreator total versus tempo de fermentação para fermentações de R1, R2, e R3. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais (n = 2).

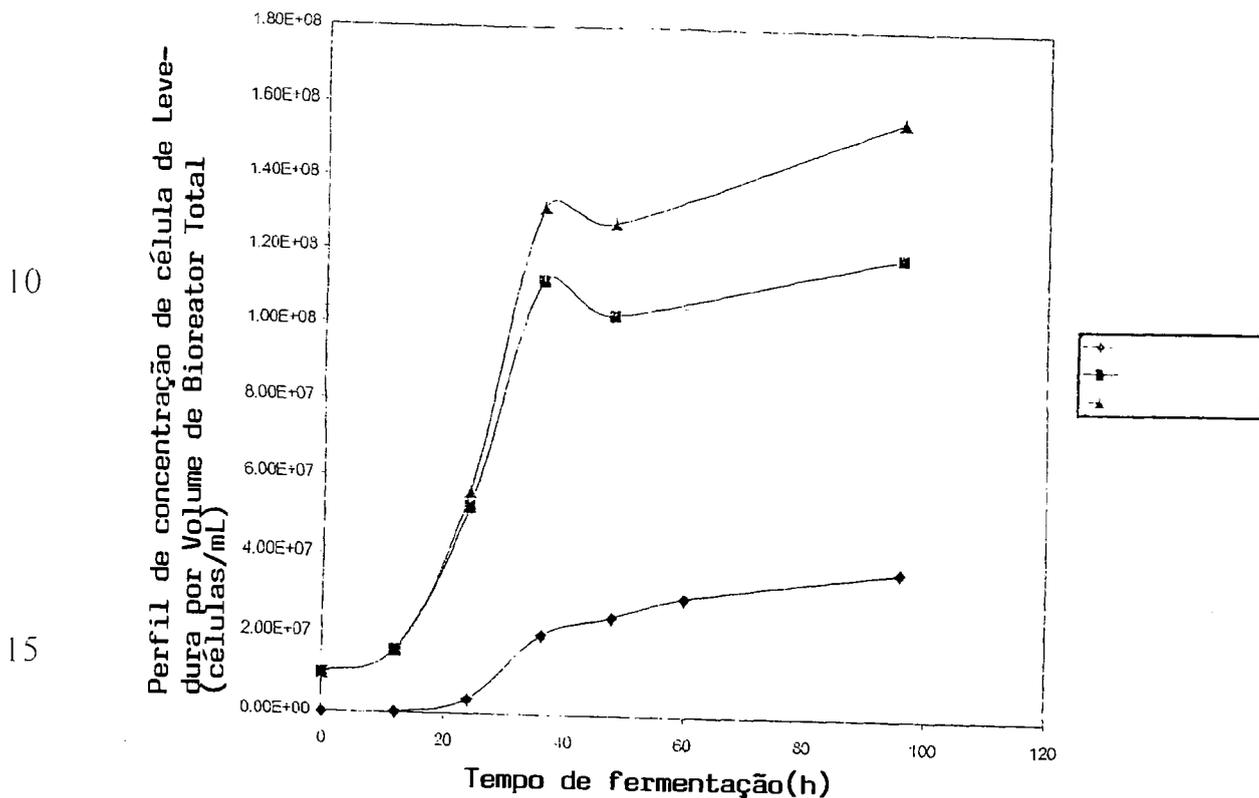


Figura 6.8. Perfil de concentração de célula de fase líquida e total imobilizada (imobilizada e de fase líquida) versus tempo de fermentação para R1, a primeira das três fermentações de dosagem repetida usando células de levedura lager imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan gel beads.

No R1, a concentração de célula imobilizada no interior da gota de gel de kappa-carrageenan foi aumentando a uma taxa similar para a fermentação de controle, que contém

somente células de fase líquida. Isto foi confirmado pela comparação da curva de crescimento médio das fermentações de controle de célula livre na Figura 6.9 para a curva de crescimento similar de células imobilizadas no carrageenan em R1 na Figura 6.10. Durante R1, as gotas de gel não foram ainda totalmente colonizadas, e a matriz de gel não parece ter um efeito inibitório no crescimento de célula de levedura no interior das gotas. Por R2, a matriz parece estar restringida ao crescimento das células no interior da gota de gel, conforme indicado por um aumento menor do número de célula durante este ciclo de fermentação. Isto pode ser devido a natureza do gel, ou aglomeração das células de levedura no interior das gotas, ou a uma falta de suprimento de nutrientes para as células.

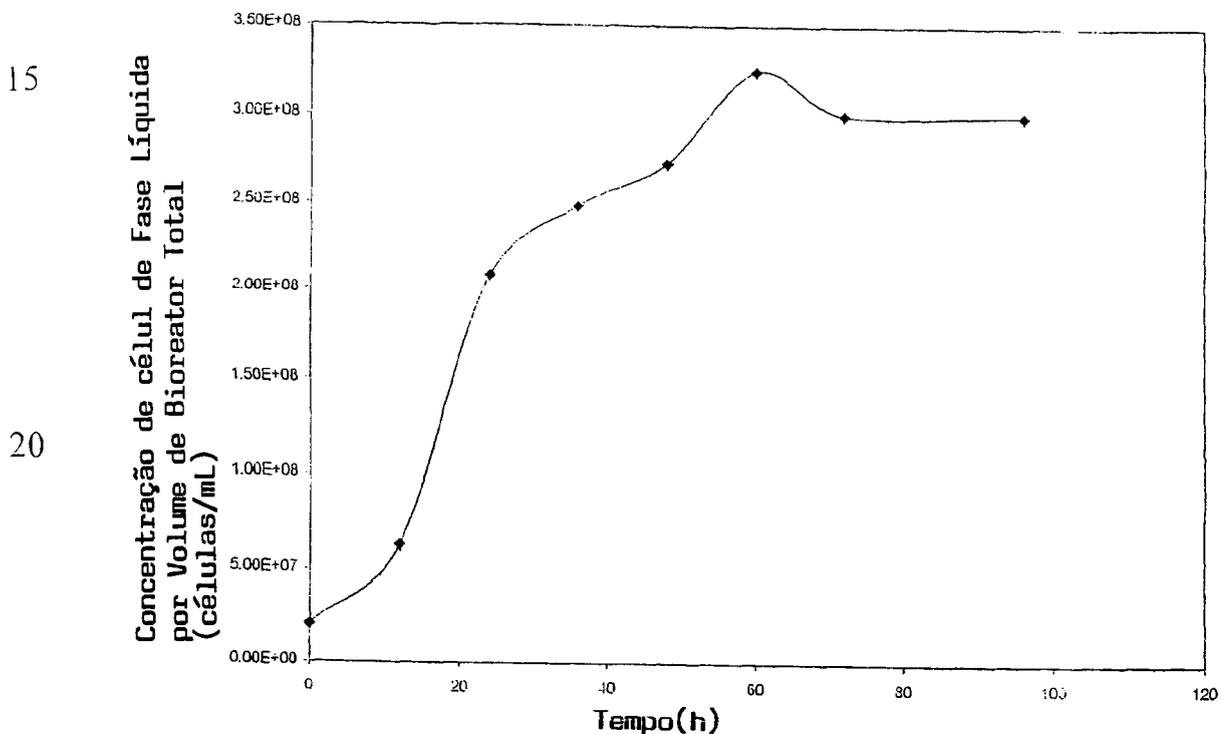
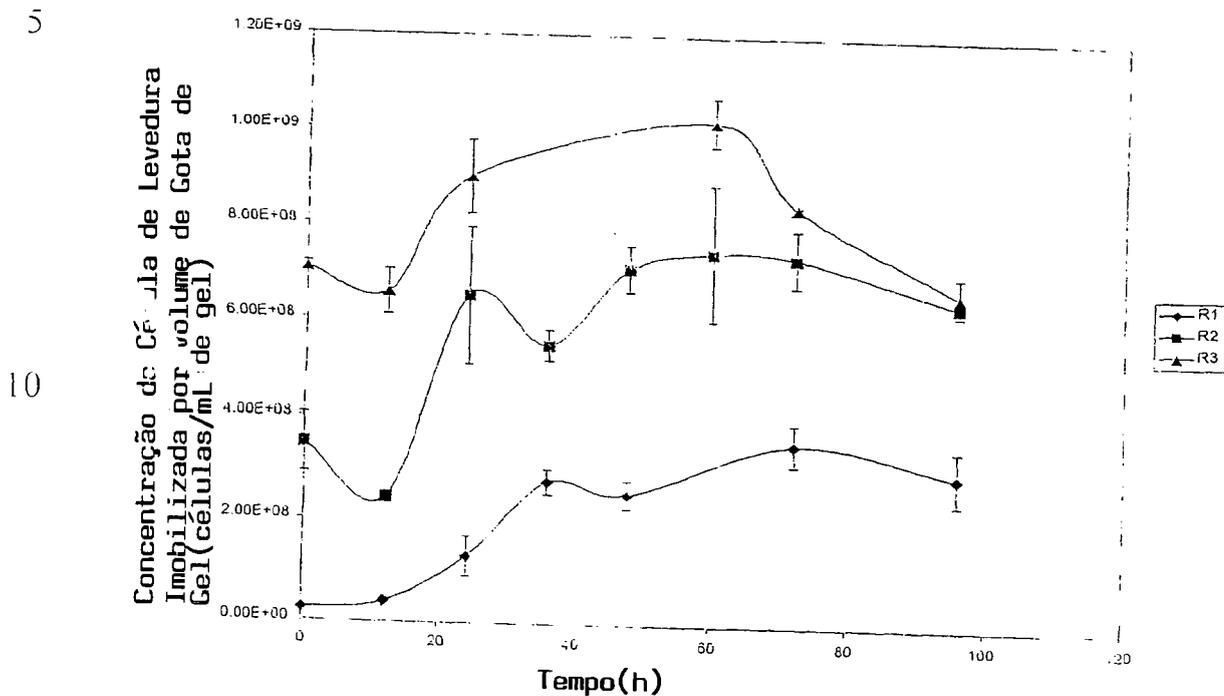


Figura 6.9. Concentração média de célula de levedura lager livremente suspensa de fermentação de controle (n)

= 3) por volume de bioreactor total versus tempo de fermentação. Nenhuma célula imobilizada estava presente durante estas fermentações.



15

Figura 6.10. Concentração de levedura lager imobilizada por mL de gotas de gel versus tempo de fermentação para fermentações de R1, R2, e R3. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).

20

Na Tabela 6.1, os rendimentos de etanol de açúcares fermentáveis de substrato $Y_{P/S}$, são mostrados para as três gerações de dosagem e o controle. Na Tabela 6.2, as produtividades volumétricas do bioreactor de etanol são também dadas, calculadas usando-se os dados constantes da Tabela 6.1.

25

Os rendimentos de etanol de açúcares para as fermentações não foram significativamente diferentes um do outro, ou do controle.

Os rendimentos foram todos acima de 90% do rendimento teórico de 0.51 diagnosticado a partir da equação de Guy-Lussac. Conforme mencionado anteriormente, a produção de biomassa e outros sub-produtos formados pelas células de levedura impedem as eficiências de alcançar mais do que 95% do teórico (Hardwick, 1995). A produtividade do bioreator volumétrico de etanol nas três fermentações de dosagem repetida variou significativamente de dosagem para dosagem repetida. A produtividade de etanol aumentou com cada ciclo de fermentação de dosagem repetida e, por R3, as células imobilizadas eram mais produtivas do que a fermentação de controle. A quantidade total de etanol produzido em R2 não foi significativamente maior do que aquela produzida durante R1, mas o tempo de fermentação foi menor do que metade de R1, e da fermentação de controle. Existem muitos fatores que podem contribuir para esta taxa de fermentação aumentada de células imobilizadas com cada repetição de dosagem, tal como adaptação da célula de levedura às condições de fermentação e a concentração de célula que aumenta progressivamente. O número total de células por volume de bioreator somente torna-se significativamente maior do que aquele do controle por R3. Na Figura 6.7 (b), o gráfico de concentração de célula livremente suspensa (liberada a partir da matriz de gel) no líquido de massa vs. tempo de fermentação demonstrou que o número de células liberadas a partir das gotas de gel aumentou com cada geração de dosagem. Uma vez que as gotas tornam-se totalmente carregadas com células de levedura, elas parecem

liberar mais células na fase líquida de massa. Hüsken e outros (1996) conduziram estudos que examinaram a expansão de colônia de célula bacteriana examinada e erupção/liberação de gotas de gel de kappa-carrageenan. Vives e outros (1993) reportaram que a concentração máxima de células de levedura que eles alcançaram nas gotas de gel em kappa-carrageenan foi 10^9 células por grama de gel, que é a concentração que foi alcançada dentro das partículas de gel por R2. Concentrações de célula máximas similares foram encontradas durante as fermentações contínuas na Parte B. Contudo, os carregamentos de célula máximos na matriz de gel dependerão do carregamento de célula inicial, da composição do gel, e outros fatores.

Tabela 6.1. Rendimento $Y_{P/S}$, de produto P, etanol de substratos, glucose (Glc), frutose (Frc), maltose (Mal) e maltotriose (DP3) para R1, R2, R3, e fermentação de controle de célula livremente suspensa.

Fermentação de Dosagem	t_f^*	t_0	Glc _f
R1	64,0	0,0	0,0
R2	44,0	0,0	0,0
R3	26,0	0,0	0,0
Ctrl de Célula Livre	82,0	0,0	0,0

Fermentação de	Frc _f	Mal _f	DP3 _f
----------------	------------------	------------------	------------------

Dosagem			
R1	0,0	0,0	2,4
R2	0,0	0,0	3,1
R3	0,0	0,0	3,2
Ctrl de Célula Livre	0,0	0,0	4,2

Fermentação de Dosagem	P_f	Glc_0	Frc_0
R1	50,1	13,0	3,0
R2	49,0	9,7	2,0
R3	54,0	8,9	2,8
Ctrl de Célula Livre	66,0	19,5	3,6

Fermentação de Dosagem	Mal_0	$DP3_0$	P_0
R1	60,0	17,4	0,0
R2	54,3	15,7	11,0
R3	52,0	16,0	14,0
Ctrl de Célula Livre	91,2	27,3	0,0

Fermentação de Dosagem	$Y_{P/S}$

R1	0,5
R2	0,5
R3	0,5
Ctrl de Célula Livre	0,5

*O símbolo t_f é o tempo em horas para completar a tomada de maltose e o subscrito f se refere a concentração da análise dada no tempo $t = t_f$.

Tabela 6.2. Produtividade do Bioreator de etanol [$V_{\text{etanol}} = (\text{kg de etanol produzido}) / (\text{m}^3 \text{ volume do bioreator} \cdot \text{h})$] para fermentações de dosagem de célula imobilizada (R1, R2, e R3) comparadas com fermentações de dosagem de célula livremente suspensa.

Fermentação	$V_{\text{etanol}} (\text{kg}/\text{m}^3 \text{ h})^*$
R1	0,470
R2	0,668
R3	1,246
Controle de Célula Livre	0,805

* calculado quando maltose tomada completa.

10 Outro fator que afeta a produtividade volumétrica do bioreator aumentada observada com cada fermentação de dosagem repetida, envolve a adaptação de célula de levedura. Pelo final da primeira fermentação, as células de levedura têm adaptada sua maquinaria metabólica às dadas
15 condições de fermentação. Isto pode resultar em uma diminuição

na fase de retardo no começo das fermentações de dosagem subseqüentes, aumentando a taxa de fermentação. Durante este estudo, todas as fermentações de controle foram efetuadas com levedura lager recentemente preparada. Seria interessante prover-
5 se a levedura de controle livremente suspensa ao longo das células imobilizadas providas para exame adicional deste efeito em relação aos efeitos de concentração de célula.

A Figura 6.11 indica que a viabilidade de célula imobilizada, usando-se o método de azul de metileno como um
10 indicador, foi baixa ($< 50\%$) quando as células imobilizadas foram inicialmente providas no mosto em R1, mas a viabilidade de células imobilizadas foi acima de 90% após 48 horas de fermentação. As células de levedura rapidamente colonizam as gotas, e a viabilidade permanece alta através de todo R3.
15 Contudo, por R3 repetido, a viabilidade se afila levemente em direção ao final da fermentação. Contudo, através de todas as três fermentações de dosagem repetida, as células livres que foram liberadas no meio líquido de massa têm viabilidade mais alta do que suas contra-partes imobilizadas. A matriz de imobilização
20 tem um efeito negativo na viabilidade de célula de levedura (limitações de transferência de massa e/ou limitações espaciais), ou células de levedura viáveis podem ser preferencialmente liberadas a partir da matriz de imobilização no meio líquido de massa sobre células não-viáveis.

25 Usando-se os dados médios a partir das fermentações de controle de levedura livremente suspensa

contidas no Apêndice 1, um gráfico de $\ln(X/X_0)$ versus tempo de fermentação, é dado na Figura 6.12. A inclinação é igual à taxa de crescimento específica máxima local das células a 21°C no mosto de fabrico de bebida fermentada, com agitação a 150 rpm.

- 5 A taxa de crescimento específica máxima local da levedura foi encontrada para ser 0.096 hr^{-1} e o tempo de dobramento de célula foi 7.22 horas. A m_{max} encontrada neste trabalho foi definida como uma local m_{max} porque, conforme mencionado na seção de Teoria, a verdadeira m_{max} usada na equação de Monod é
- 10 alcançável somente quando S é significativamente maior do que a constante de Monod K_s . Mais trabalho é requerido para avaliar a constante de Monod K_s , do substrato de limitação nestas fermentações, de modo a confirmar que a m_{max} máxima local foi uma máxima verdadeira, conforme definido pela equação de de
- 15 Monod.

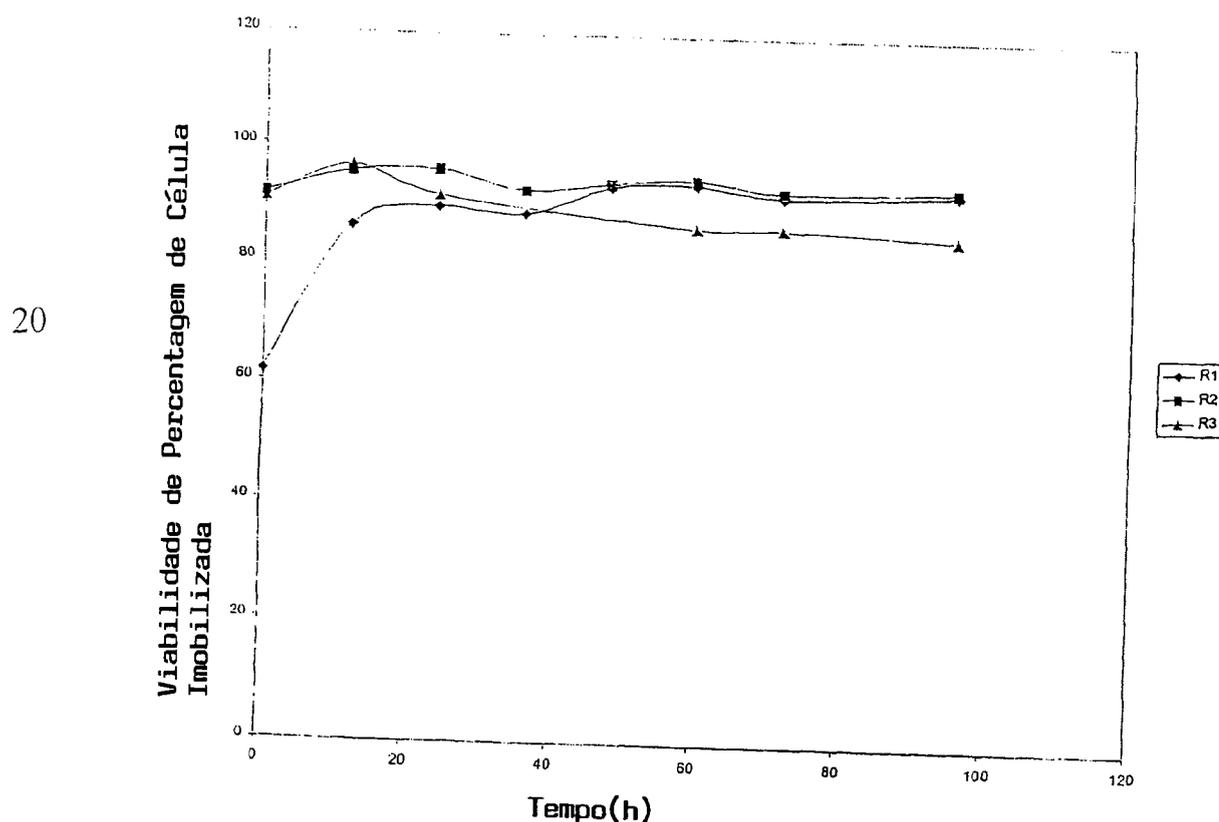
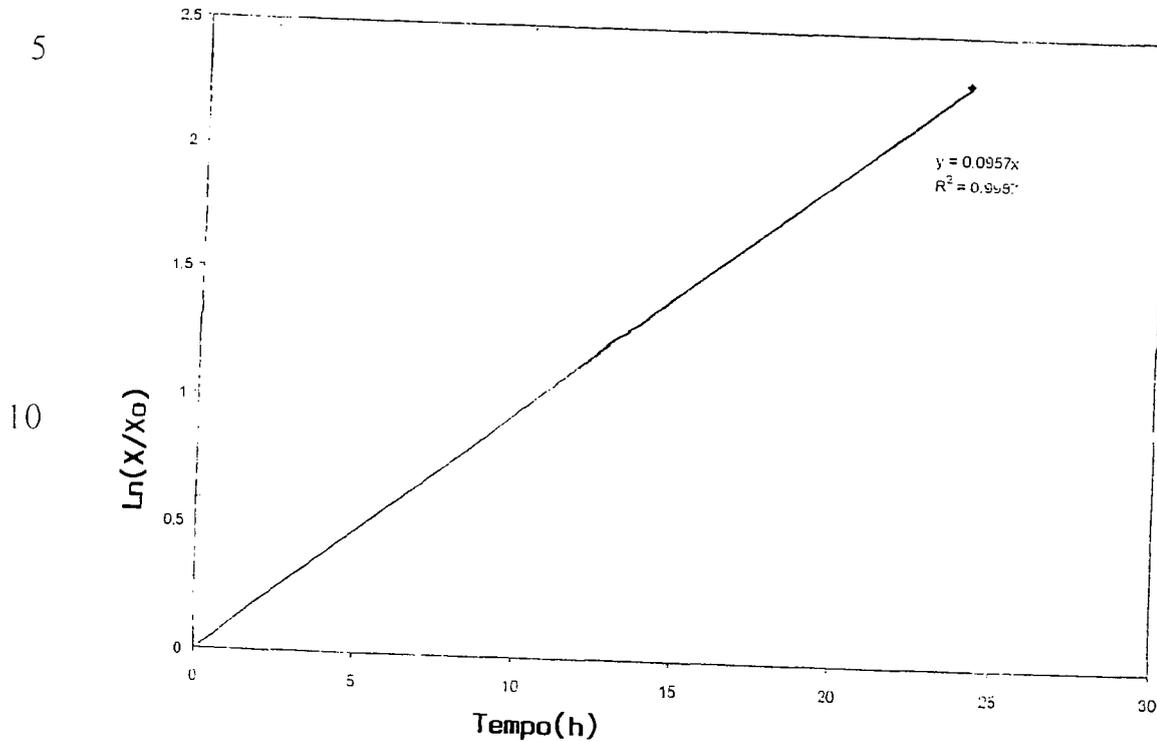


Figura 6.11. Viabilidade de célula de levedura lager immobilizada (azul de metileno) versus tempo de fermentação para fermentações R1, R2, e R3.



15

Figura 6.12. $\ln(X/X_0)$ versus tempo de fermentação de dosagem durante a fase de crescimento exponencial das fermentações de controle de levedura livremente suspensa média, onde X é a concentração de célula no tempo t , e X_0 é a concentração de célula no tempo $t = 0$ ($n = 3$).

Parte B: Características de Viabilidade e Morfologia de Levedura Immobilizada Sobre Tempo de Fermentação Estendido

Antes das gotas de gel serem expostas ao meio de fermentação, e seguindo produção de gota de célula immobilizada usando-se o processo de misturador estático, a

concentração de célula foi $2,6 \times 10^7$ células/mL de gota de gel (Tabela 6.3, onde os valores são as médias de duas amostras). A imagem de SEM mostra as células a serem individual e uniformemente distribuídas através de toda a gota de gel (FIG. 5 24).

Tabela 6.3. Viabilidade (azul de metileno) e concentração de células de levedura lager livremente suspensa e imobilizada presas nas gotas de gel de kappa-carrageenan sobre o tempo de fermentação.

Tempo	Modo de Fermentação	Levedura Livremente Suspensa na Fase Líquida	
		Viabilidade (%)	Concentração de Célula (células/mL em líquido)
0	n/s	N/s	N/s
2 dias	Dosagem	98	$5,5E + 07$
2 meses	Contínuo	93	$2.35E + 08$
6 meses	Contínuo	92	$2.11E + 08$

10

Tempo	Modo de Fermentação	Levedura Imobilizada na Fase Gás	
		Viabilidade (%)	Concentração de Célula

			(células/mL em gel)
0	n/s	n/s	2.6E +07
2 dias	Dosagem	92	2.355E + 08
2 meses	Contínuo	76	8.60E + 08
6 meses	Contínuo	<50*	1.40E+09*

* Baseado na amostra simples.

A viabilidade foi >90% seguindo 2 dias de fermentação de dosagem, e a concentração de célula dentro da gota de gel aumentou dez vezes (Tabela 6.3). As células (>90% viáveis) começaram também a serem liberadas do gel na fase líquida de massa da fermentação, produzindo uma concentração de 10^7 células/mL de líquido. Pequenas colônias de levedura formadas dentro das gotas de gel, com muitas manchas de origem presentes nas células individuais, conforme visto na FIG. 25.

A viabilidade de célula de levedura imobilizada diminuiu após 2 meses de fermentação contínua em um bioreator de elevação de gás (Tabela 6.3), mas as células na fase líquida de massa permaneceram altamente viáveis (>90%), e esta descoberta foi suportada durante várias fermentações contínuas diferentes nos bioreatores de elevação de gás de escala piloto. A SEM na FIG. 26 mostrou que em colônias large de dois meses de levedura tinha se formado em direção à periferia da gota, confirmando os resultados de outros pesquisadores (Bancel e Hu, 1996; Gòdia e outros., 1987; Wada e outros., 1979; Wang e outros., 1982). Uma

comparação da morfologia de levedura posicionada em direção á
borda externa de uma gota de célula imobilizada para a levedura
posicionada no centro de uma gota de gel, foi feita em várias
amostras usando-se imagem de SEM. As células localizadas em
5 direção á periferia das gotas foram evitadas e alisadas com muitas
manchas de origem (FIG. 27), indicativas de multiplicação de
levedura (Smart, 1995). As células que foram imaginadas no
centro da gota (FIG. 28) pareceram mal formadas, e revelaram
pouca evidência de formação de mancha de origem. A falta de
10 mancha de origem pode ser uma indicação de possível limitação
de nutrientes, tal como oxigênio, no centro das gotas. A
irregularidade superficial observada na superfície da levedura na
FIG. 28, pode também ser um indicador de envelhecimento de
célula (Barker e Smart, 1996; Smart, 1999).

15 A viabilidade da levedura imobilizada dentro do
gel de carrageenan caiu para abaixo de 50% após seis meses de
fermentação contínua no bioreator de elevação de gás, (Tabela
6.3). Deve ser notado que enquanto somente um ponto de dado
simples para concentração de célula imobilizada e viabilidade foi
20 coletado em seis meses, dados na marca de cinco meses foram
similares, com uma concentração de célula imobilizada de 1.14×10^9
células/mL de gel, e viabilidade de <50%. Enquanto um
declínio gradual na viabilidade de célula imobilizada foi visto
com o tempo, a viabilidade das células na fase líquida de massa
25 permaneceu seguramente alta. Em adição, mesmo embora as
viabilidades de célula imobilizada fossem baixas nas gotas como

um todo, o bioreator produziu uma cerveja totalmente fermentada durante seus seis meses de operação contínua. As razões possíveis para esta descoberta incluem a contribuição significativa das células de levedura livremente suspensas altamente viáveis para a fermentação. Também, existe a contribuição potencial de células immobilizadas viáveis localizadas na periferia da gota de gel onde existem poucas barreiras para transferência de massa, conforme comparado às células localizadas no centro da gota. Não está claro se as células immobilizadas tem a capacidade de redistribuírem-se dentro da matriz de gel, ou se estas células permaneceram estacionárias onde elas foram primeiro localizadas. Uma concentração de 10^9 células/mL de gota de gel foi a máxima alcançada dentro destas gotas sobre o período de seis meses de fermentação contínua.

Na FIG. 29 uma gota total foi imaginada usando-se SEM. Esta gota tem um centro oco e, das muitas gotas examinadas, aproximadamente metade exibiram esta estrutura. A cavidade oca pode ser um resultado da degradação da estrutura de gel de carrageenan e promovida adicionalmente pela separação de SEM. Esta cavidade oca não foi observada nas preparações de gota recentes. O trabalho anterior por outros (Bancel e outros., 1996) tem mostrado que as células de crescimento induzem enfraquecimento da rede de operação do gel. Audet e outros (1988) reportaram que a adição de goma de vagem de alfarrobeira ao kappa-carrageenan modifica a resistência mecânica das gotas de gel para a imobilização de bactéria.

Sobre o experimento de fermentação de cerveja de seis meses total, o bioreator de elevação de gás foi testado um mínimo de uma vez uma semana para contaminação. Nenhum contaminante bacteriano foi detectado em qualquer tempo durante o experimento. Nos últimos dois meses do ensaio, uma levedura de contaminação foi detectada em concentrações que flutuaram entre 1 e 5 cfu/mL. Esta levedura foi capaz de crescer no meio PYN a 37°C, mas não cresceu aerobicamente ou anaerobicamente no meio DUBA (seletivo para bactéria), não fermentou dextrins, e não mostrou crescimento no meio de CuSO_4 (seletivo para levedura selvagem).

Após cinco meses, a percentagem média de células de levedura deficiente respiratória foi 7%, que é mais alta do a que é normalmente encontrada usando-se esta linhagem durante fermentações de dosagem industrial (média de 2%). Outros pesquisadores reportaram descobertas similares (Norton e D'Amore, 1995). A levedura deficiente respiratória resulta de uma mutação que faz com que a levedura seja incapaz de respirar glucose para dióxido de carbono e água. Estas leveduras têm mitocôndria com atividade permanentemente concedida de DNA mitocondrial, e se eleva usualmente por causa de uma mutação de DNA mitocondrial (Hardwick, 1995).

Os artefatos de preparação de amostra de SEM podem causar confusão. Tecnologias tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (Fernandez, 1996) e microscopia confocal (Bancel e Hu, 1996) têm sido usadas para

examinar células imobilizadas não-invasivamente. As técnicas de imagem de NMR têm permitido que os pesquisadores estudem transporte, fluxo e distribuição espacial de células e bioquímicas em biofilmes. Os pesquisadores (Bancel e Hu, 1996) têm também
5 mostrado que a microscopia de varredura de laser confocal pode ser usada para observar células imobilizadas em micro-transportadores de gelatina porosa através de seccionamento ótico em série.

Embora o azul de metileno seja usado como um
10 indicador padrão de viabilidade de célula na indústria de fabrico de bebida fermentada, o método tem muitos problemas (Mochaba e outros., 1998). Ele mede se uma população de levedura é viável ou não-viável, baseado na capacidade de células viáveis oxidarem o corante para sua forma incolor. As células não-viáveis carecem
15 da capacidade de oxidar a cor e, portanto, permanecem azul (O'Connor-Cox e outros., 1997). As técnicas de contagem de placa e cultura de lâmina são baseadas na capacidade das células crescerem e produzirem macro-colônias nas placas Agar, ou micro-colônias nas lâminas de microscópio coberto médio
20 (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). A operação de exame da viabilidade de levedura nas matrizes imobilizadas sobre períodos estendidos de tempo na Labatt agora usa, não somente azul de metileno, mas também os métodos antes mencionados, bem como desenvolvimento da
25 técnica de microscopia confocal usando manchamento vital. Em adição a medição da viabilidade das células, a publicação de

“vitalidade” das células imobilizadas deve também ser endereçada no trabalho futuro. Onde a viabilidade foi usada para descrever a capacidade das células crescerem e reproduzirem, a vitalidade mede a performance de fermentação, atividade, ou a capacidade da levedura recuperar-se de tensões (Smart e outros., 1999).

CAPÍTULO 7. PRODUÇÃO DE AROMA EM UM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO DE CERVEJA CONTÍNUO DE ELEVAÇÃO DE GÁS

7.1 Procedimento Experimental

O uso de fermentação contínua para produzir cerveja é muito diferente de outras aplicações usando células imobilizadas porque o produto resultante não é medido em termos de um componente de interesse, tal como etanol. Preferivelmente, ele é um equilíbrio de numerosos compostos químicos que devem ser equilibrados para produzir um produto acabado de qualidade. Os efeitos do oxigênio nos metabólitos de aroma de levedura durante fermentação primária contínua e durante um período de retenção de dosagem secundária, foram examinados. O efeito do tempo de residência nos metabólitos de aroma foi também examinado em dois níveis. Por ultimo, uma preparação de enzima comercial de alfa-acetolactato decarboxilase foi adicionada ao suprimento de mosto de fermentação contínua, e a concentração de diacetil total de fase líquida foi monitorada.

7.1.1 Efeito de Quantidades Relativas de Ar no Gás de Fluidização do Bioreator nos Metabólitos de Levedura durante Fermentação Contínua Primária

A quantidade de ar e, conseqüentemente, oxigênio no gás de fluidização do bioreator foi variada enquanto que o tempo de residência, temperatura e outras variáveis de processo controláveis foram mantidas constantes. A taxa de fluxo volumétrico total de gás foi mantida constante a 472 mL/min em STP, a temperatura foi 15°C, e gotas de gel de kappa-carrageenan contendo levedura LCC 3021 imobilizada foram usadas através de todo o ensaio com um carregamento de célula inicial de 1×10^8 células/mL de gel. Quatro taxas de fluxo volumétrico diferentes de ar foram impostas no sistema através de todo o ensaio. (Tabela 7.1), e o tempo de residência do bioreator médio R_t , foi 1.18 dias.

Tabela 7.1. Taxas de fluxo volumétrico de ar supridas ao bioreator através do aspergidor durante fermentação contínua. A taxa de fluxo volumétrico total suprida ao bioreator foi 472 mL/min em STP, com dióxido de carbono compondo o restante do gás.

Taxa de Fluxo Volumétrico de Ar (mL/min)	Percentagem de Ar no Gás de Fluidização (% v/v)	Início (Dia)
94	19,9	10
354	75,0	27
34	7,2	41
0	0	59

Taxa de Fluxo	Percentagem de Ar	Fim (Dia)
---------------	-------------------	-----------

Volumétrico de Ar (mL/min)	no Gás de Fluidização (% v/v)	
94	19,9	26
354	75,0	40
34	7,2	58
0	0	66

Taxa de Fluxo Volumétrico de Ar (mL/min)	Percentagem de Ar no Gás de Fluidização (% v/v)	Tempo Total (Dias)
94	19,9	17
354	75,0	14
34	7,2	18
0	0	8

As análises seguintes foram realizadas repetidamente através de todo o experimento: amino nitrogênio livre (FAN), carboidrato fermentável total (como glucose), etanol, diacetil total, voláteis de cerveja (ésteres e álcoois selecionados), e concentração de célula de levedura de fase líquida e viabilidade. O bioreator foi também testado para contaminação um mínimo de uma vez em uma semana.

10 A concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida de massa do bioreator foi medida quando a fermentação contínua foi assumida para estar em estado pseudo-constante para

cada taxa de fluxo volumétrico de ar (mínimo de três tempos de giro do reator).

7.1.2 Período de Retenção de Dosagem de Pós-Fermentação: Efeitos de Exposição de Oxigênio nos Metabólitos de Levedura

Mesmo quando a quantidade de oxigênio no gás de fluidização do bioreator foi relativamente baixa (34 mL/min em STP), as concentrações de acetaldeído e diacetil total encontradas durante o experimento conduzido na seção 7.1.2, foram inaceitavelmente altas para a cerveja lager da América do Norte. Portanto, uma nova aproximação foi tomada, onde líquido tomado a partir do bioreator primário contínuo, foi mantido na dosagem por 48 horas em uma temperatura levemente elevada de 21°C para reduzir a concentração destes dois compostos. Também, os resultados a partir da seção anterior 7.1.2 indicam o efeito significativo que a quantidade de ar no gás de fluidização tem nos compostos de aroma medidos. Portanto, o efeito nos metabólitos de aroma de levedura de condições aeróbicas versus anaeróbicas à jusante da fermentação primária, onde a retenção de dosagem secundária ocorreu, foi examinado.

A fermentação primária contínua foi realizada em um bioreator de elevação de gás de 50 L usando uma variante altamente flocosa da linhagem de levedura LCC3021 para este ensaio, porque o requerimento de volume de amostra para o estudo foi muito maior em relação ao volume do reator de 8 L. As condições de operação foram 1180 mL/min de CO₂ e 189

mL/min de ar em STP no gás de fluidização, um tempo de residência de bioreator médio R_t de 1.0 dia, uma temperatura de 15 °C, e mosto de cervejaria lager de gravidade alta de 17.5°P.

Um total de 4 amostras foram tomadas (frascos de 100 mL), com dois manuseados sob condições anaeróbicas, e os outros dois foram expostos ao ambiente aeróbico.

O procedimento de amostragem anaeróbica foi conforme se segue: dois frascos de 100 mL e seis frascos de 25 mL foram autoclavados e, em seguida, colocados em uma caixa anaeróbica (Labmaster 100, mbraun, USA) com argônio como o gás de purga. Os frascos de 100 mL foram permitidos equilibrar por 45 minutos e, em seguida, foram vedados usando-se capas de alumínio e septo de Teflon®. Uma seringa de 50 mL, ajustada com uma agulha de medição 16 de 3 polegadas, sanitizada usando-se uma solução de etanol 70% (v/v), foi usada para retirar a amostra do bioreator pelo puncionamento do septo da membrana da válvula de amostra, e a amostra foi injetada nos frascos anaeróbicos pré-purgados de 100 mL. Foi necessário proporcionar-se uma ventilação ao frasco através de uma agulha de seringa estéril adicional, para permitir liberação da pressão dentro do frasco durante enchimento. As amostras aeróbicas foram expostas à atmosfera a medida que elas foram drenadas a partir do bioreator pela abertura totalmente da válvula de amostra de membrana nos frascos de amostra não-vedados de 100 mL, sem usar-se uma seringa e agulha.

O líquido de amostra foi permitido assentar á temperatura ambiente por 2 horas, de modo a permitir que a levedura se separe da solução, deixando uma concentração de célula no líquido de massa de aproximadamente 10^6 células/mL.

5 Uma vez assentado, o líquido de cada frasco de 100 mL foi decantado em três frascos de 25 mL. As amostras anaeróbicas foram manipuladas em uma caixa anaeróbica, de modo a minimizar a captação de oxigênio enquanto as amostras aeróbicas foram processadas sob fluxo laminar. Cada uma das amostras nos

10 frascos de 100 mL foram divididas em 3 frascos pequenos de 25 mL, de modo que a análise da amostra podia ser realizada sem alteração do curso da fermentação devido a remoção da amostra. Uma vez que as amostras aeróbicas foram transferidas para os frascos menores, elas foram incubadas e destampadas a 21°C. As

15 amostras anaeróbicas foram transferidas para os três frascos menores e vedadas usando-se uma capa de alumínio e septo de Teflon®. De modo a evitar aumento de pressão devido a evolução de dióxido de carbono dentro dos frascos, enquanto impede exposição das amostras ao ambiente aeróbico externo, os septos

20 foram puncionados com uma agulha. A extremidade da agulha exposta ao ambiente externo foi submersa em etanol (menos do que 1 cm de pressão), impedindo qualquer retorno de fluxo de ar na amostra. As amostras foram coletadas para análise em 2, 24, e 48 horas. Uma amostra foi tomada também diretamente do

25 bioreator e analisada imediatamente, de modo a acessar o estado da fermentação dentro do bioreator na hora do protocolo. As

amostras foram analisadas para carboidrato fermentável total (como glucose), etanol, diacetil total, e voláteis de cerveja (ésteres e álcool selecionados).

7.1.3 Efeito do Tempo de Residência de Líquido nos Metabólitos de Levedura durante Fermentação de Cerveja Primária Contínua

De modo a examinar o efeito do tempo de residência de líquido na atividade metabólica da levedura, um experimento foi realizado em que uma mudança de etapa na taxa de fluxo volumétrico de mosto para o bioreator foi imposta durante fermentação de cerveja primária contínua usando células de levedura LCC3021 imobilizada em gotas de gel de kappa-carrageenan. A temperatura do bioreator foi mantida constante a 17°C através de todo o ensaio. A taxa de fluxo volumétrico do gás suprida ao bioreator foi também constante a 472 mL/min em STP. O gás era uma mistura de ar (11 mL/min em STP) e dióxido de carbono (461 mL/min em STP). A concentração inicial de células de levedura no gel de kappa-carrageenan foi 2.6×10^7 células/mL de gota de gel, e o bioreator continha 40% (v/v) de gotas.

As análises seguintes foram realizadas repetidamente através do ensaio: carboidratos, amino nitrogênio livre (FAN), carboidrato fermentável total (como glucose), etanol, diacetil total, voláteis de cerveja (ésteres e álcoois selecionados), e concentração e viabilidade de célula de levedura de fase líquida. O bioreator foi também testado para contaminação, um mínimo de uma vez por semana.

7.1.4 Uso de uma Preparação Comercial de Alfa-Acetolactato Decarboxilase para Reduzir Diacetil Total durante Fermentação de Cerveja Primária Contínua

Concentrações altas de diacetil são consideradas
5 por muitas das cervejarias norte americanas como sendo um defeito de aroma indesejável em sua cerveja. Nas fermentações primárias contínuas realizadas até aqui, as concentrações totais de diacetil têm estado consistentemente acima dos níveis limites para fermentações de dosagem tradicionais (70 – 150 mg/L) em uma
10 lager norte americana. Durante a fermentação de dosagem, o diacetil é reduzido durante os últimos estágios de fermentação, quando o oxigênio não está mais presente, e açúcares adicionais não estão sendo introduzidos. No sistema de fermentação contínua, um nível baixo constante de oxigênio é suprido para o
15 bioreator através de um aspergidor, e mosto fresco é continuamente suprido ao bioreator. Portanto, uma nova estratégia de usar uma preparação de enzima comercial foi explorada para controlar a concentração de diacetil no bioreator contínuo.

Em uma fermentação de mosto, o diacetil é
20 formado quando alfa-acetolactato, um intermediário na síntese de valina, é oxidavelmente decarboxilado fora da célula de levedura. A célula de levedura, em seguida, re-absorve o diacetil e o converte na acetoína ativa de menos aroma. Esta descarboxilação oxidativa de alfa-acetolactato em diacetil é de
25 limitação de taxa nas fermentações de mosto de dosagem. Durante as fermentações contínuas, o diacetil total sai do

bioreator em concentrações inaceitavelmente altas (300-400 mg/L). A enzima comercial alfa-acetolactato decarboxilase (ALDC), de Novo-Nordisk A/S, pode converter alfa-acetolactato diretamente em acetoína, evitando, desse modo, o intermediário diacetil indesejado (Figura 7.1) (Jepsen, 1993).

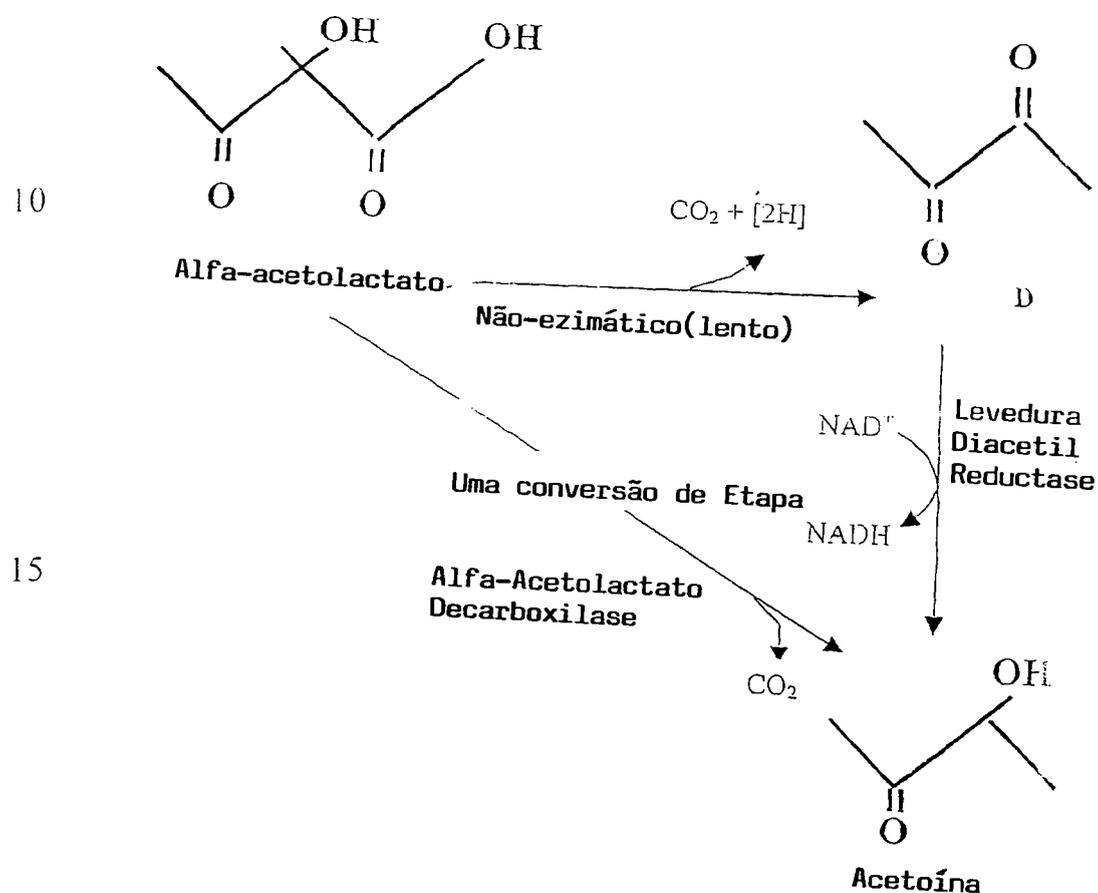


Figura 7.1 A ação de alfa-acetolactato decarboxilase (ALDC).

Alfa-acetolactato decarboxilase foi adicionada ao mosto alimentado no bioreactor de modo a examinar seu efeito na concentração de diacetil total. Outras estratégias para redução de diacetil, incluindo sistemas de pós-fermentação de um período

de retenção quente de dosagem de 48 horas e fermentação secundária imobilizada, tecnologia de Alpha-Laval (Anon, 1997), foram também exploradas. Ambas destas outras estratégias mostraram sucesso na redução da pós-fermentação de níveis de acetil, mas nenhuma tinha como objetivo o nível de diacetil na fonte (i.e. na descarga do bioreator). Pelo uso de ALDC no mosto para reduzir a concentração de diacetil que sai do bioreactor, os períodos de tratamento de pós-fermentação podem ser minimizados ou eliminados.

10 A atividade de ALDC é ótima em pH 6.0 no mosto de lager a 10°C. Em pH 5.0, típico de mostos industriais, a atividade de ALDC é maximizada à uma temperatura de 35°C (Anon, 1994). Desse modo, sob condições de fermentação de cerveja típicas de temperatura e pH reduzidos, a atividade de
15 ALDC é menos do que ótima.

A Health Canada em 1997 emendou as Regulações de Alimento e Droga do Canadá (SOR/97-81) para permitir o uso de ALDC em bebidas alcoólicas, que abriu as portas para seu uso nas cervejarias do Canadá. *Bacillus subtilis*,
20 transportando o gene de codificação para ALDC (E.C. 4.1.1.5) de *Bacillus brevis*, produz a enzima ALDC. Devido ao ALDC ser uma enzima que é produzida por um organismo geneticamente modificado (GMO), existem percepções públicas publicadas que necessitariam de serem endereçadas antes do uso de tal enzima
25 em um produto comercial.

Levedura lager LCC3021 foi usada para estes experimentos. Mosto de cervejaria lager de alta gravidade 17.5°P foi suprido pela cervejaria Labatt London. Etanol, carboidrato fermentável total (como glucose), diacetil total, e concentração de célula de fase líquida foram monitorados. Células de levedura foram imobilizadas em gotas de gel de kappa-carrageenan conforme descrito no Capítulo 4. O bioreator foi permitido três tempo de giro, antes de assumir-se ter-se alcançado estado pseudo-constante. Conforme mencionado anteriormente, o método de diacetil usado neste trabalho é referido como “diacetil total” e seu precursor, alfa-acetolactato. Desse modo, uma redução observada no diacetil total durante este experimento seria devido ao efeito combinado da enzima convertendo alfa-acetolactato diretamente em acetoína, e a concentração mais baixa subsequente de seu derivado de diacetil.

Alfa-acetolactato decarboxilase (ALDC) foi suprida como uma doação generosa para propostas de laboratório de Novo Nordisk A/S, Denmark as Maturex[®] L. A atividade da enzima foi 1500 ADU/g, onde ADU é a quantidade de enzima que sob condições padrões, por descarboxilação de alfa-acetolactato, produz 1 μ mole de acetoína por minuto, conforme descrito no Método Novo Nordisk AF27 (Anon, 1994).

Condições de Fermentação Contínua:

Fermentações contínuas foram realizadas no bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás de 8 L em 40% (v/v) com gotas de gel de kappa-carrageenan contendo células de levedura lager

imobilizada. O bioreator foi aspergido com uma mistura de dióxido de carbono (438 mL/min em STP) e ar (34 mL/min em STP). A temperatura de fermentação foi controlada a 15°C através de todos os ensaios, e o tempo de residência do bioreator R_t foi 1.5 dias. A concentração de diacetil total foi monitorada sob estas condições, e uma concentração de diacetil de controle de estado pseudo-constante médio foi alcançada. ALDC foi então adicionada ao mosto à uma concentração de 72 mg/L (108 ADU/L), e a concentração de diacetil total no bioreator foi monitorada para uma resposta.

Experimento 1: Mosto foi coletado da cervejaria em um vaso de aço inoxidável de 20 L, e aquecido em um autoclave por 45 minutos a 100°C. O mosto foi mantido a 2°C em uma água de dosagem de água de temperatura controlada enquanto alimenta o bioreator. Uma vez que uma concentração de diacetil total de estado pseudo-constante tenha sido alcançada no interior do bioreator, 72 mg/L (108 ADU/L) de ALDC foi adicionada ao mosto dentro do vaso de 20 L. O carregamento de biomassa inicial nas gotas de gel de kappa-carrageenan foi 3×10^7 células/mL de gel.

Experimento 2: De modo a minimizar o risco de contaminação, o sistema foi fechado em círculo na descarga, e outras atualizações foram também feitas ao sistema, conforme descrito no Capítulo 4. Como com o Experimento 1, o mosto foi coletado da cervejaria em um vaso de aço inoxidável de 20 L, e autoclavado por 45 minutos a 100°C. Enquanto se alimenta o

bioreator, o mosto foi mantido a 2°C em um banho de água de temperatura controlada. O carregamento de biomassa inicial nas gotas de gel de kappa-carrageenan foi 3×10^7 células/mL de gel. Uma vez que uma concentração de diacetil total de estado pseudo-constante tenha sido alcançada, 72 mg/L (108 ADU/L) de ALDC foi adicionada ao mosto dentro do vaso de 20 L.

Experimento 3: Mosto de cervejaria não-oxigenado 17.5°P (14 hL) foi coletado em um vaso de armazenamento de mosto large (T-1) na Planta Piloto. Ele foi, em seguida, pasteurizado e armazenado com aspergimento de dióxido de carbono de modo a manter uma concentração de oxigênio dissolvido constante de <0.10 mg/L, conforme descrito no Capítulo 5. O mosto foi alimentado no bioreator a partir deste tanque até que uma concentração de diacetil total pseudo-constante foi alcançada. ALDC (72 mg/L) foi, em seguida, assepticamente adicionada ao mosto para o restante do ensaio. A adição de ALDC foi acompanhada pela medição da quantidade de mosto remanescente no vaso de armazenamento, e calculando-se a quantidade de ALDC necessária para trazer a concentração de enzima até a concentração alvo de 72 mg/L (108 ADU/L). A quantidade apropriada de enzima foi então dissolvida em 10 L de mosto estéril. Esta solução foi transferida para um vaso de pressão de aço inoxidável de 20 L, que foi conectado, via tubo estéril, ao orifício de amostra no vaso de retenção de mosto (T-1). A solução de ALDC foi então impulsionada usando-se pressão de dióxido de carbono estéril no vaso de retenção de mosto. De modo a

assegurar que a solução de ALDC foi adequadamente misturada com o mosto no vaso de retenção, a taxa de fluxo de dióxido de carbono aspergido no tanque foi aumentada para 4720 mL/min em STP por 1 hora e, em seguida, retornada para sua taxa de fluxo normal. O tanque de armazenamento então manteve mosto dosado de ALDC o bastante para completar o ensaio. O carregamento de biomassa inicial nas gotas de gel de kappa-carrageenan foi 10^8 células/mL de gel.

7.2 Resultados e Discussão

7.2.1 Efeito de Quantidades Relativas de Ar no Gás de Fluidização do Bioreator nos Matabólitos de Levedura durante Fermentação Contínua Primária

Nas Figuras 7.2 - 7.11, viabilidade de levedura de fase líquida e concentração de célula, concentrações de amino nitrogênio livre (FAN), carboidrato fermentável total (como glucose), etanol, diacetil total, acetaldeído, etil acetate, 1-propanol, isobutanol, isoamil acetate, isoamil álcool, etil hexanoato, e etil octanoato são plotados versus tempo de fermentação contínua. Todas as condições de operação do bioreactor foram mantidas constantes através de todo protocolo, exceto a percentagem de ar no gás de aspergimento do bioreator, que é marcada diretamente nas figuras. Na Tabela 7.2, as medias para cada análise em estado pseudo-constante (após um mínimo de três tempos de giro) são resumidas.

Tabela 7.2. Resumo do efeito de taxa de fluxo volumétrico de ar para o bioreactor através do aspergidor na

levedura de fase líquida, e concentrações de metabólito de levedura chave no bioreator em um tempo de residência R_t de 1.18 dias, médias em estado pseudo-const

5

Concentração Analítica Média*	Taxa de Fluxo Volumétrica de Ar (mL/min) ^v
Concentração de Célula (células/mL)	94
Ferm. Total de Glucose (g/100 mL)	3.87E+08
FAN (mg/L)	1.36
Etanol (g/100 mL)	196.9
Diacetil total (ug/L)	6.14
Acetaldeído (mg/L)	346
Etil Acetato (mg/L)	75.62
Etil Acetato (mg/L)	22.38
1-Propanol (mg/L)	44.74
Isobutanol (mg/L)	8.73
Isoamil Acetato (mg/L)	0.38
Isoamil Álcool (mg/L)	58.62
Etil Hexanoato (mg/L)	0.060
Etil Octanoato (mg/L)	0.031

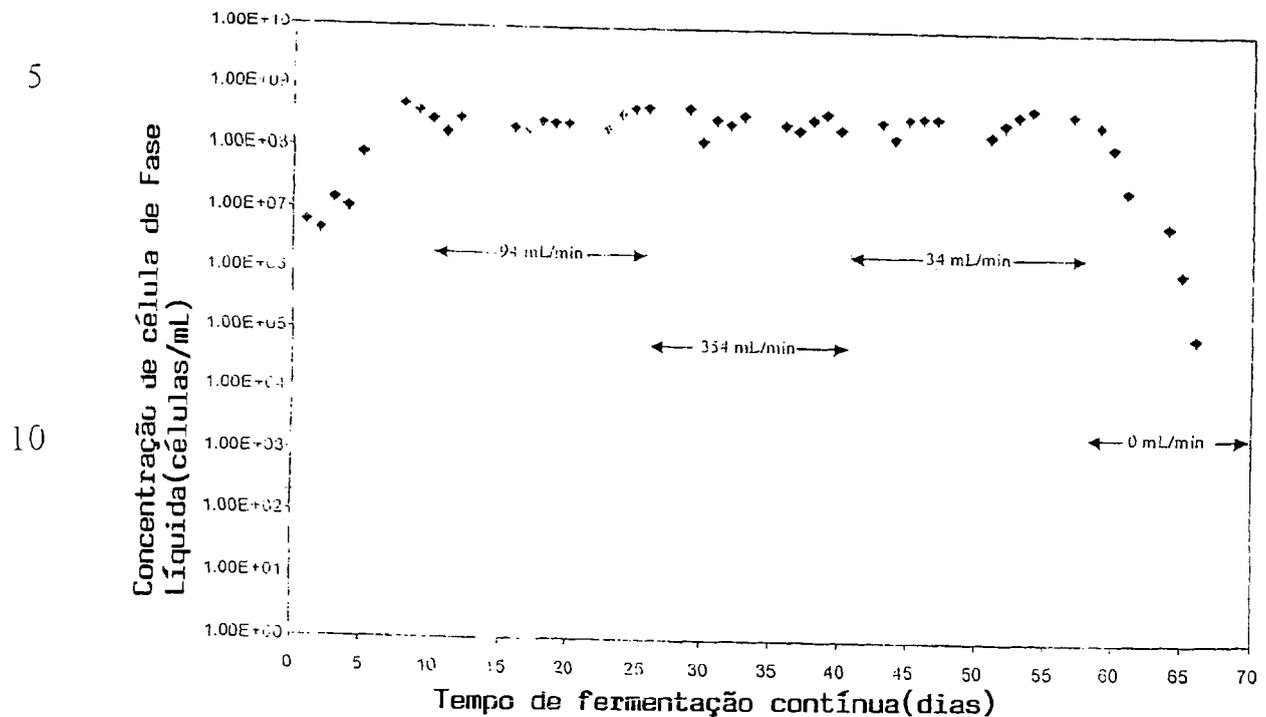
Concentração Analítica Média*	Taxa de Fluxo Volumétrica de Ar (mL/min)v
	354
Concentração de Célula (células/mL)	2.98E+08
Ferm. Total de Glucose (g/100 mL)	1.25
FAN (mg/L)	171.7
Etanol (g/100 mL)	5.46
Diacetil total (ug/L)	1417
Acetaldeído (mg/L)	329.48
Etil Acetato (mg/L)	21.13
1-Propanol (mg/L)	50.89
Isobutanol (mg/L)	16.09
Isoamil Acetato (mg/L)	0.21
Isoamil Álcool (mg/L)	61.64
Etil Hexanoato (mg/L)	0.030
Etil Octanoato (mg/L)	0.013

Concentração Analítica Média*	Taxa de Fluxo Volumétrica de Ar (mL/min)v
	34
Concentração de Célula (células/mL)	4.737E+08
Ferm. Total de Glucose (g/100	2.07

mL)	
FAN (mg/L)	162.8
Etanol (g/100 mL)	5.74
Diacetil total (ug/L)	389
Acetaldeído (mg/L)	28.63
Etil Acetato (mg/L)	18.01
1-Propanol (mg/L)	53.04
Isobutanol (mg/L)	8.05
Isoamil Acetato (mg/L)	0.30
Isoamil Álcool (mg/L)	59.16
Etil Hexanoato (mg/L)	0.053
Etil Octanoato (mg/L)	0.025

As Figuras 7.2 e 7.3 mostram que a população de levedura de fase líquida não alcança zero durante este experimento. Os compostos de aroma que foram estudados neste trabalho foram produzidos por uma combinação de células de levedura imobilizada livre, e contribuições relativas de cada fonte não foram determinadas. Existem mais do que uma fonte de células de levedura livremente suspensas neste trabalho: crescimento de biomassa e células que foram liberadas a partir das gotas de gel no meio líquido de massa. A pesquisa mostrou com modelos de compostos de liberação e crescimento de célula, que quando as células estão sendo liberadas dos biofilmes, mesmo se o bioreactor é operado em taxas de diluição altas, existirá ainda

uma população de células no líquido de admissão (Karamanev, 1991).



15

Figura 7.2. Concentração de levedura de fase líquida versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico de ar em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

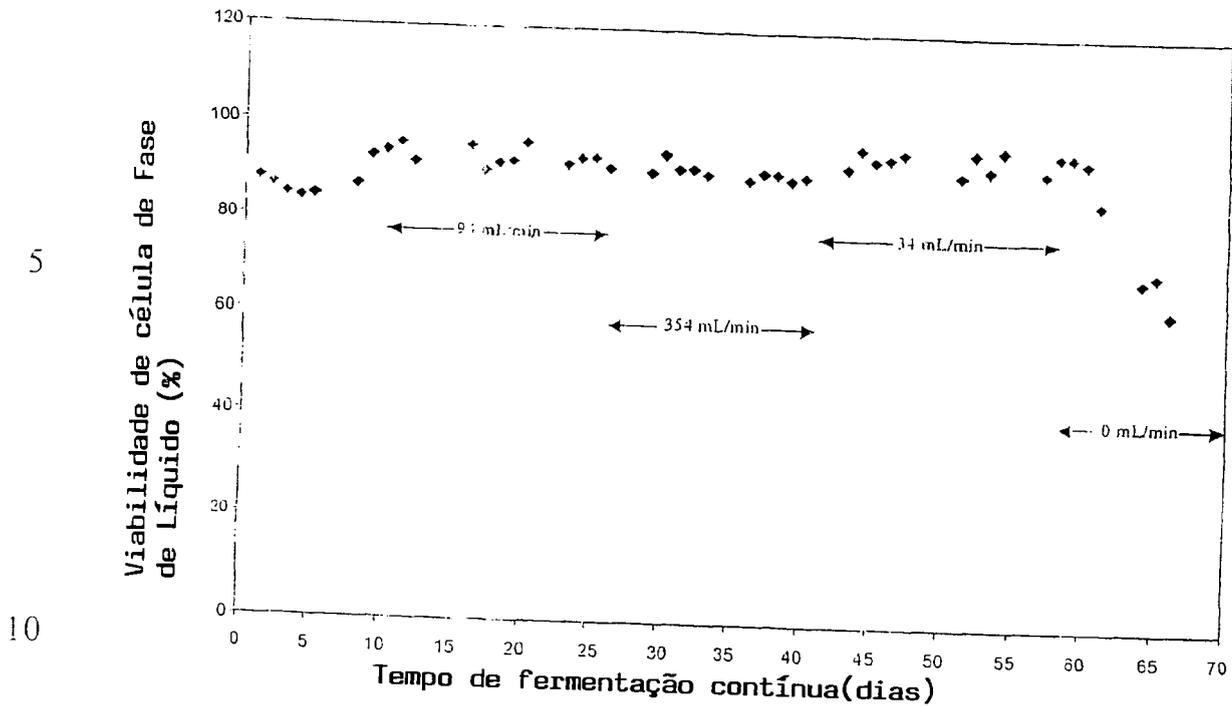


Figura 7.3. Viabilidade de levedura de fase líquida versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrica de ar em STP suprida ao bioreactor através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

Na Figura 7.4, a concentração de fase líquida de amino nitrogênio livre (FAN) foi trilhada. Foi interessante notar que as concentrações de FAN mínimas ocorreram a 34 mL/min em STP de ar. Isto não coincide com a concentração de etanol máxima ou concentrações de carboidrato fermentável total mínimas (como glucose).

A concentração de etanol dentro da fase líquida do bioreator diminui, enquanto o carboidrato fermentável total

(como glucose) aumentou quando a taxa de fluxo volumétrico de ar no gás de aspergimento foi aumentada de 94 para 354 mL/min, conforme visto na Figura 7.5. Isto pode indicar que mais respiração de célula, conforme oposta a respiração, estava ocorrendo para o aumento na disponibilidade do oxigênio. Quando a taxa de fluxo volumétrico foi novamente reduzida de 354 mL/min para 34 mL/min em STP, a concentração de etanol novamente aumentou; contudo, ela não alcança a concentração vista quando a taxa de fluxo estava em 94 mL/min em STP. É difícil comparar em termos precisos as concentrações de etanol em 34 mL/min com aquelas a 94 mL/min em STP, porque existem outros fatores que influenciam o sistema, resultando de envelhecimento de célula, efeitos da exposição contínua em quantidade relativamente alta de oxigênio com o tempo em 354 mL/min em STP, e mudanças na população de célula imobilizada. Na Figura 2.4, White e Portno (1978) notaram mudanças nas concentrações metabólicas de aroma de levedura com tempo de fermentação contínua em seu fermentador de torre.

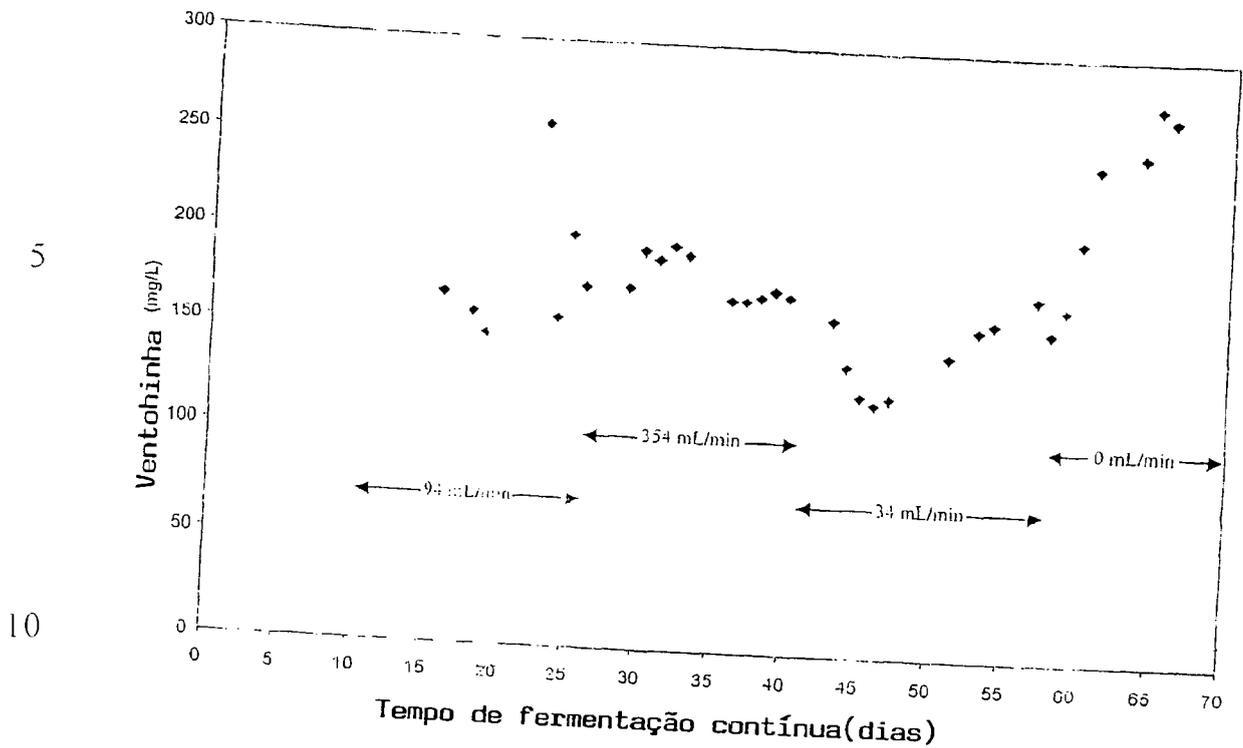


Figura 7.4. Concentração de amino nitrogênio livre remanescente no mosto versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico de ar em STP através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

15

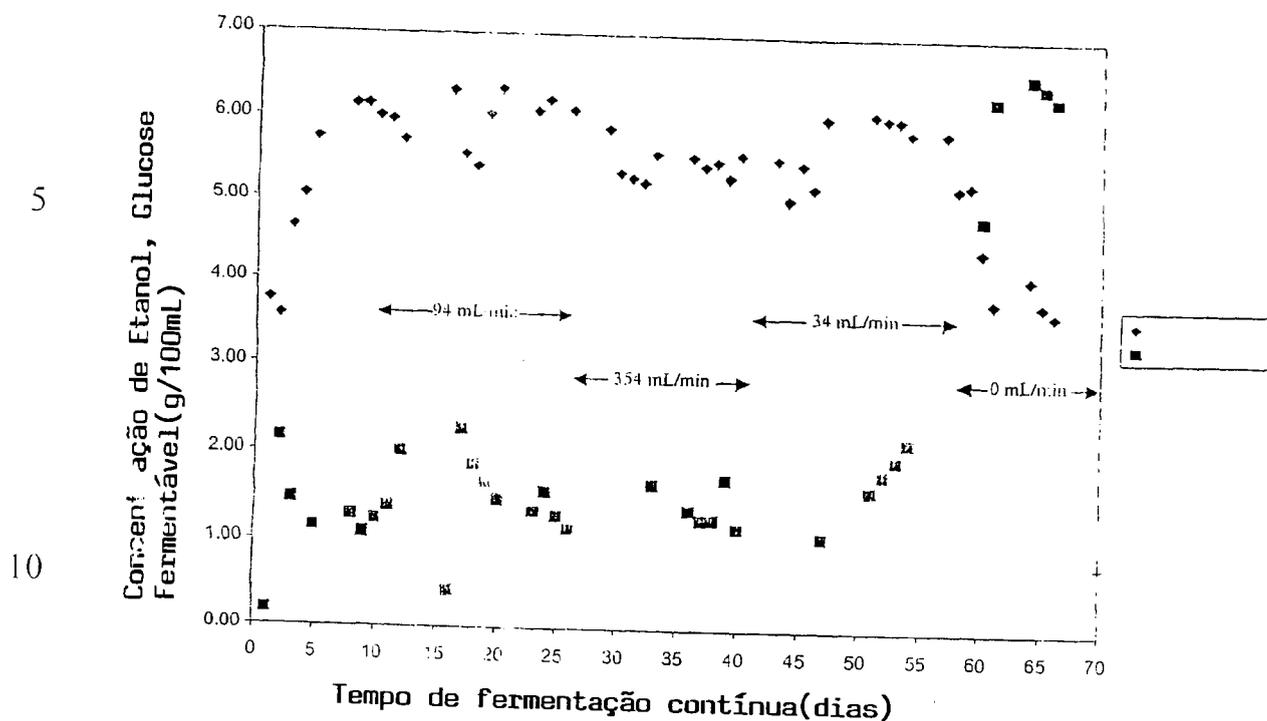


Figura 7.5. Concentração de etanol de fase líquida e carboidrato fermentável total (como glucose) versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico de ar em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

15

Na Figura 7.6, o efeito pronunciado do oxigênio na produção de diacetil total é vista. Desde que o diacetil é geralmente considerado um composto de aroma indesejável na cerveja, uma das razões principais para otimizar a quantidade de oxigênio no bioreator é controlar os níveis deste composto de aroma. Após a fase de ar de 354 mL/min, a taxa de fluxo foi diminuída para 34 mL/min em STP, e o diacetil total aumentou.

20

25

Durante fermentação de dosagem, é sabido que oxigênio aumentado conduz a um aumento na formação de alfa-acetolactato, o precursor de diacetil (Kunze, 1996).

Na Figura 7.7, um relacionamento claro entre a quantidade de ar no gás de aspergimento e concentração de acetaldeído se elevou. A medida que a percentagem de ar no gás de aspergimento aumentou, a quantidade de acetaldeído também aumentou. O acetaldeído concede um caráter de maçã verde à cerveja, e é normalmente presente na cerveja comercial em níveis de menos do que 20 mg/L.

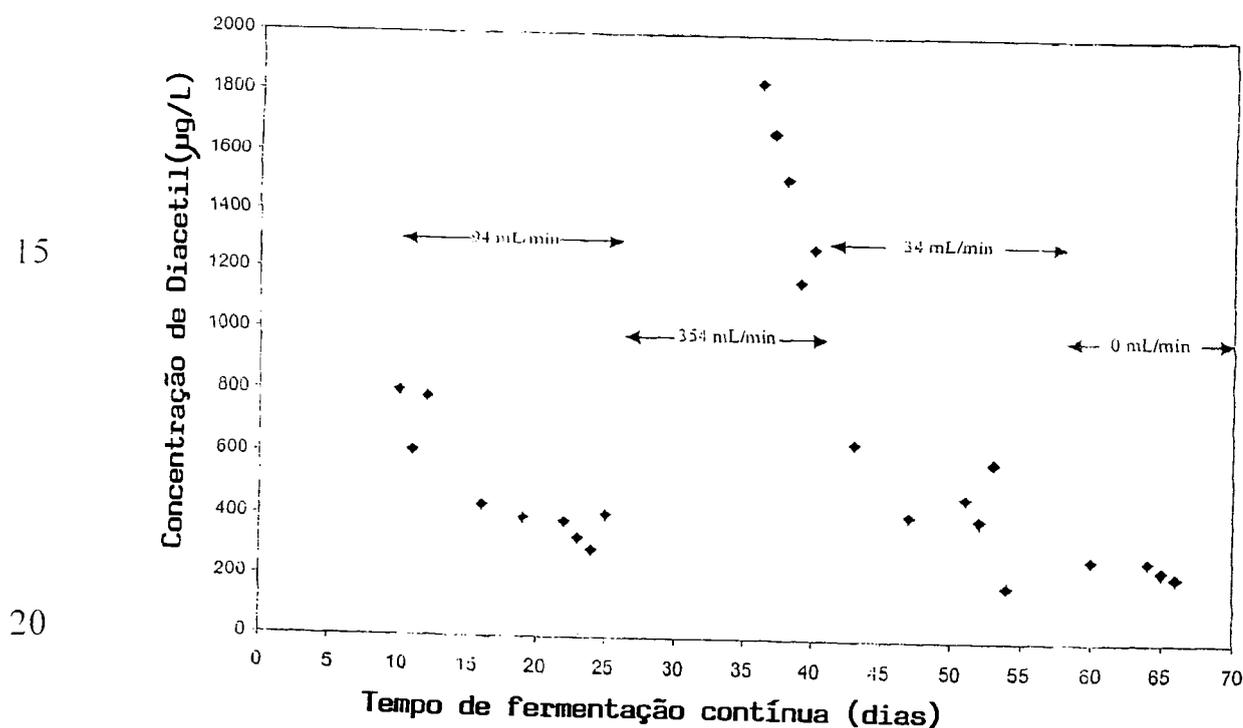
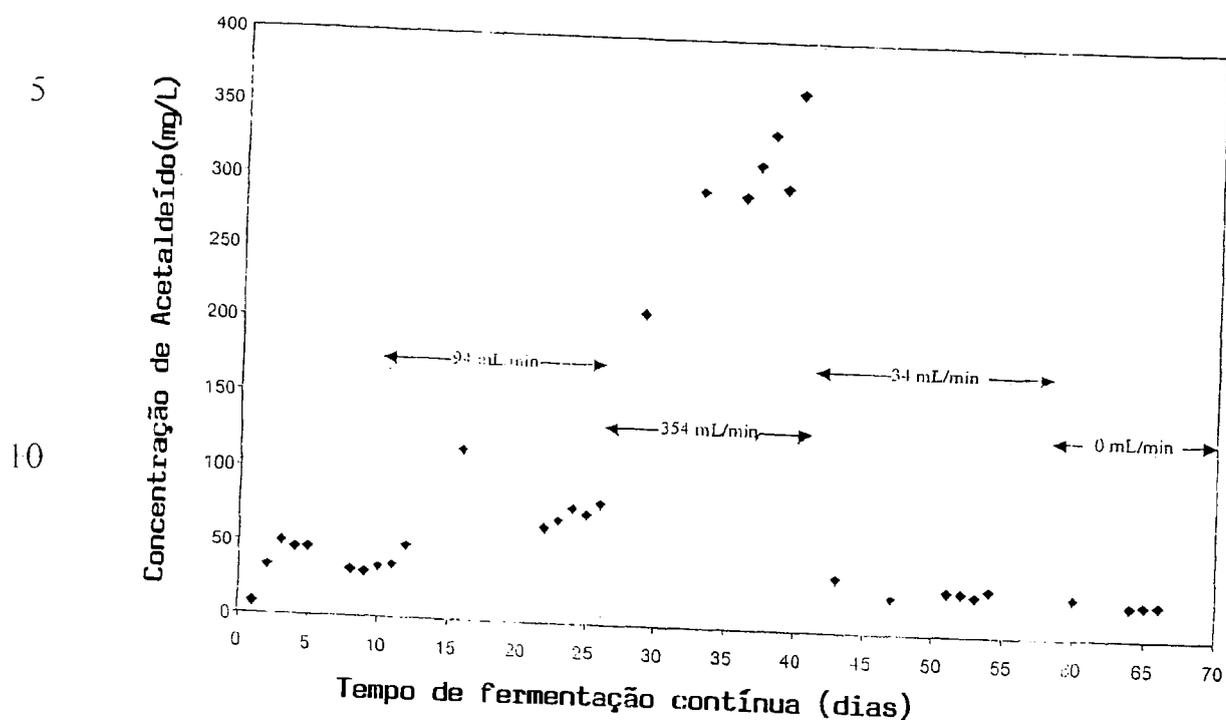


Figura 7.6. Concentração de diacetil total de fase líquida versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de

25

carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

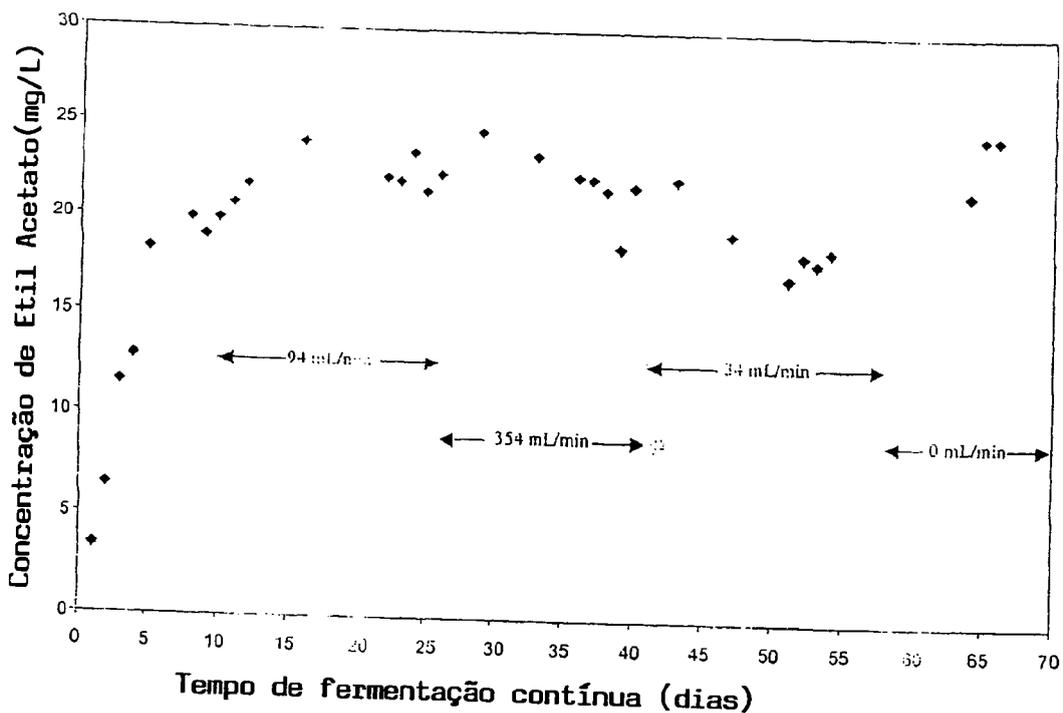


15 Figura 7.7. Concentração de acetaldeído de fase líquida versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

25 Na Tabela 7.2 e Figuras 7.8 - 7.9, as concentrações de estado pseudo-constante de etil acetato, isoamil acetato, etil hexanoato, e etil octanoato são dadas versus tempo de fermentação contínua. Para todos os ésteres medidos, a mudança de etapa na taxa de aeração de 94 para 354 mL/min em STP resultou em uma diminuição na concentração. Quando a taxa de

aeração foi diminuída de 354 mL/min para 34 mL/min em STP, a concentração de isoamil acetato, etil hexanoato, e etil octanoato aumentou. Contudo, elas não aumentaram para os valores vistos na taxa de aeração de 94 mL/min. O modelo de resposta destes compostos se equiparam proximamente uns aos outros, com etil hexanoato e etil octanoato mostrando mais flutuações relativas do que o isoamil acetato. A concentração de etil acetato atualmente aumenta adicionalmente quando a taxa de fluxo volumétrico de ar foi reduzida para 34 mL/min em STP. Para todos os ésteres medidos neste estudo, a concentração mostrou um aumento quando o ar foi completamente eliminado do gás de fluidização. A concentração de cada éster se elevou e, em seguida, diminuiu a medida que a concentração de célula de fase líquida diminuiu rapidamente no bioreator.

15



25

Figura 7.8. Concentração de etil acetato versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico de ar em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

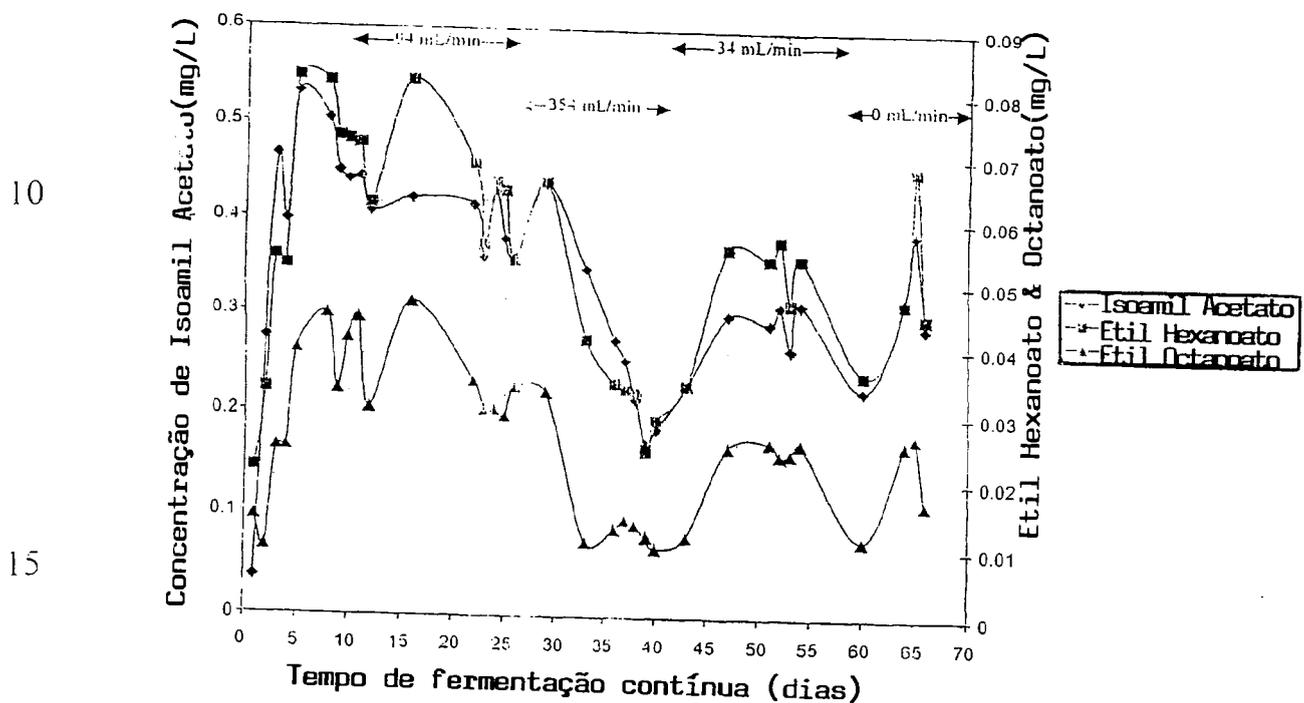


Figura 7.9. Concentração de isoamil acetato de fase líquida, etil hexanoato e etil octanoato versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

Os álcoois isoamil mais altos, isobutanol, e 1-propanol, versus tempo de fermentação contínua, são dados nas Figuras 7.10 e 7.11. Para os álcoois medidos, a concentração aumentou como um resultado do aumento da mudança de etapa na aeração de 94 para 354 mL/min em STP. O isobutanol mostrou as maiores flutuações relativas quando a taxa de aeração foi mudada. As concentrações de 1-propanol foram bem abaixo dos valores limites de aroma de 600 ~800 mg/L; contudo, através de todo o experimento de fermentação contínua, a concentração foi bem acima daquela encontrada nas cervejas produzidas por dosagem comercial típica, onde as concentrações são usualmente abaixo de 16 mg/L. Este não foi o caso para o isoamil álcool ou isobutanol, que estavam dentro das faixas normais. O composto 1-propanol é ensinado para elevar-se a partir da redução do ácido propionato (Gee e Ramirez, 1994). Outros (Hough e outros., 1982; Yamauchi e outros., 1995) têm também se relacionado à formação de 1-propanol para o metabolismo dos amino ácidos a-aminobutírico e treonina, com o oxo-ácido correspondente e aldeído sendo a-oxobutírico ácido e proprionaldeído, respectivamente.

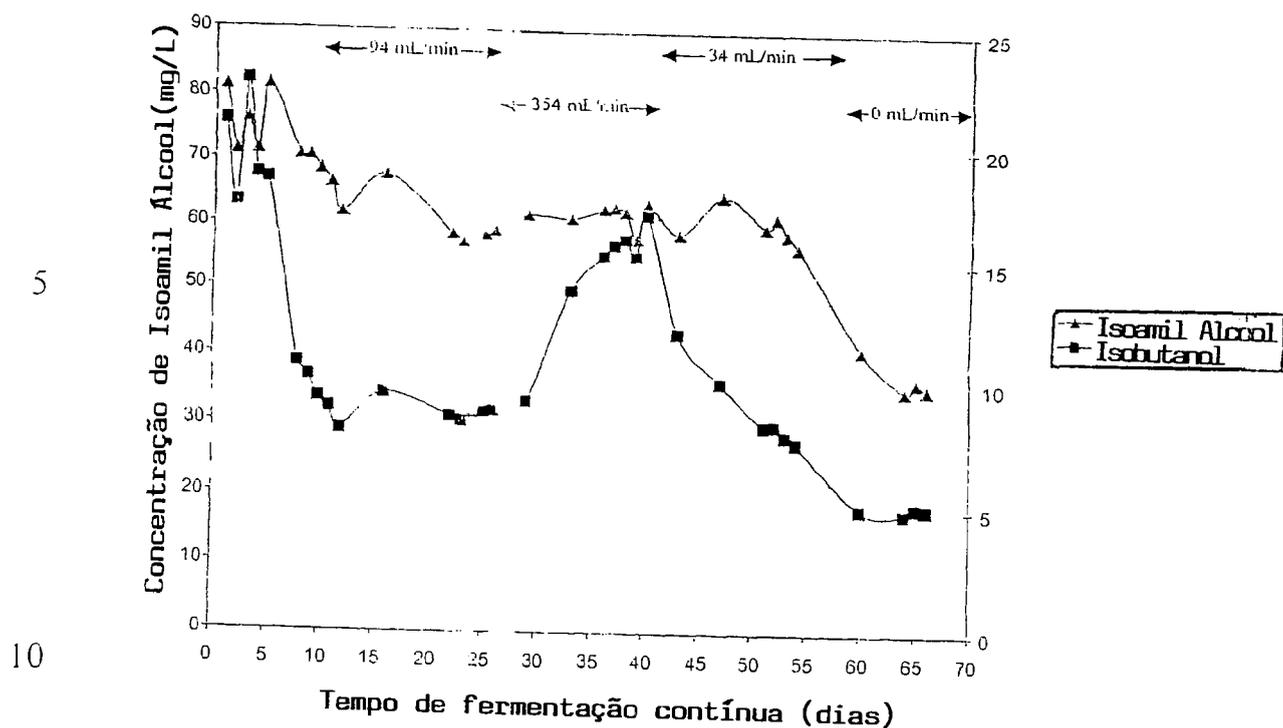


Figura 7.10. Concentração de isoamil álcool de fase líquida e etanol versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

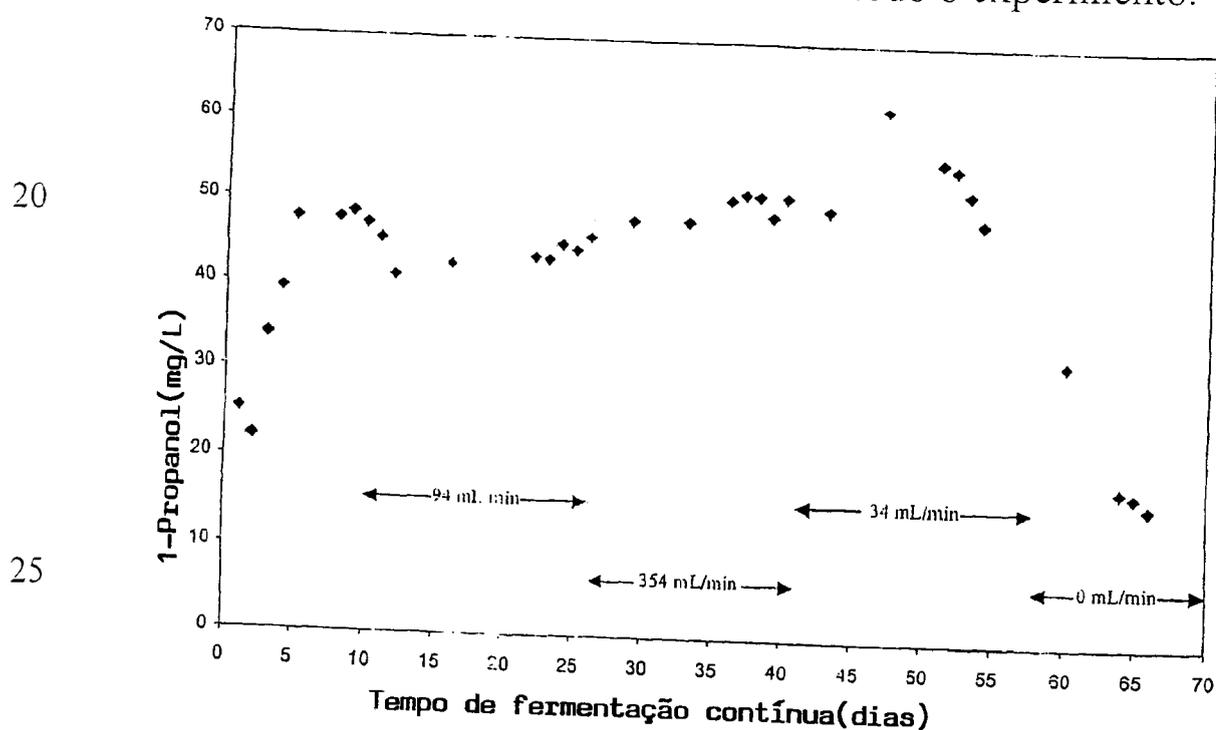


Figura 7.11. Concentração de 1-propanol de fase líquida versus tempo de fermentação contínua relativa. A taxa de fluxo volumétrico em STP suprida ao bioreator através do aspergidor é indicada no gráfico. O restante do gás foi dióxido de carbono e a taxa de fluxo de gás volumétrico total foi constante a 472 mL/min em STP através de todo o experimento.

Devido ao excesso de diacetil, acetaldeído e álcoois fundidos são indesejáveis na cerveja, sendo o controle do oxigênio para limitar sua produção importante. Conforme discutido na revisão da literatura, quando o suprimento de oxigênio para as células de levedura é aumentado, existe formação anabólica aumentada de precursores de amino ácido e, desse modo, sobre-fluxo de álcoois mais altos, oxo-ácidos e diacetil. A concentração de ésteres é conhecida para diminuir com um aumento na disponibilidade de oxigênio porque a formação de éster é catalisada pela transferase de acetil. A transferase de acetil é inibida pelos ácidos graxos insaturados e ergosterol, que, por sua vez, aumenta na presença de oxigênio (Norton and D'Amore, 1994).

Para as condições do bioreactor usado neste experimento, as concentrações de oxigênio dissolvido de estado pseudo-constante (após um mínimo de três tempos de giro do reator) medidas na fase líquida do bioreator, foram próximas a zero (menor do que .03 mg/L).

Este experimento não permite uma comparação direta dos dados a partir de 94 mL/min e 34 mL/min em STP no

gás de fluidização, porque eles foram separados pela taxa de fluxo de ar mais alta (354 mL/min). Isto é porque o estado fisiológico da levedura resultante da exposição às condições do bioreator anteriores, a matriz de imobilização e tempo de fermentação
5 contínua, podem também ter causado outras mudanças na produção de aroma.

Nenhuma contaminação foi detectada no bioreactor em qualquer ponto durante este experimento.

De modo a equilibrar o requerimento de
10 levedura para algum oxigênio para manter viabilidade de levedura e a necessidade de minimizar oxigênio para obter-se uma cerveja com um perfil de aroma desejável, outras estratégias podem ser exploradas, tais como a adição de nutrientes tais como zinco, magnésio, ou provisão de outros compostos exógenos requeridos
15 pela célula de levedura para manter a viabilidade. Tais adições permitiriam um aumento adicional no requerimento de oxigênio da levedura. Outra possibilidade seria operar em concentrações de oxigênio muito baixas muitas das vezes, com pulsos periódicos de oxigênio suprido à levedura em uma base regular para manter a
20 viabilidade da célula.

7.2.2 Período de Retenção de Dosagem de Pós-Fermentação: Efeitos de Exposição de Oxigênio nos Metabólitos de Levedura

Devido ao diacetil total não estar dentro das
25 faixas normais de uma cerveja comercial no final da fermentação primária, várias aproximações foram tomadas para reduzir a

concentração deste composto à níveis aceitáveis. Tal aproximação foi usar um período de retenção quente imediatamente em seguida a fermentação primária contínua.

Nas Figuras 7.12 – 7.21, concentrações de
5 carboidrato fermentável total de fase líquida (como glucose),
etanol, diacetil total, acetaldeído, etil acetato, 1-propanol,
isobutanol, isoamil acetato, isoamil álcool, e etil hexanoato são
plotadas versus tempo de retenção de pós-fermentação. As
amostras coletadas a partir do fermentador primário contínuo no
10 estado pseudo-constante foram mantidas sob condições aeróbicas
e anaeróbicas, conforme indicado na legenda de cada figura.

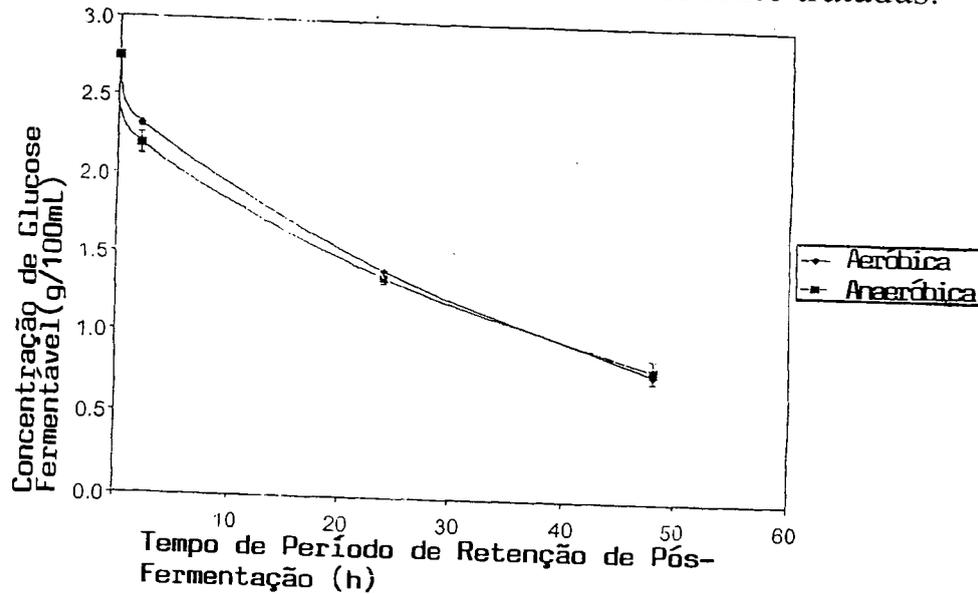
Na Figura 7.12, a concentração de carboidrato
fermentável total (como glucose) declinou rapidamente nas
primeiras duas horas e, em seguida, declinou a uma taxa mais
15 lenta durante o restante do período de retenção em ambas as
amostras aeróbicas e anaeróbicas. As razões possíveis para esta
observação foram que durante as duas primeiras horas, mais
leveduras estavam presentes antes da decantação, e a
concentração de açúcares foi mais alta no início do período de
20 retenção. Esta não foi uma diferença significativa na alimentação
de glucose fermentável entre as amostras aeróbicas e anaeróbicas,
embora algumas diferenças fossem notadas inicialmente.

A concentração de etanol na Figura 7.13 se
elevou rapidamente no começo do período de retenção e, em
25 seguida, as amostras aeróbicas e anaeróbicas aumentaram na
concentração de etanol com o tempo, em um modo quase

paralelo. O aumento inicial no etanol para a amostra anaeróbica coincidiu com o período onde a maior alimentação de açúcar ocorreu. No final do período de retenção, a concentração de etanol foi mais alta nas amostras anaerobicamente tratadas.

5

10



15

Figura 7.12 Concentração de glucose fermentável média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).

20

25

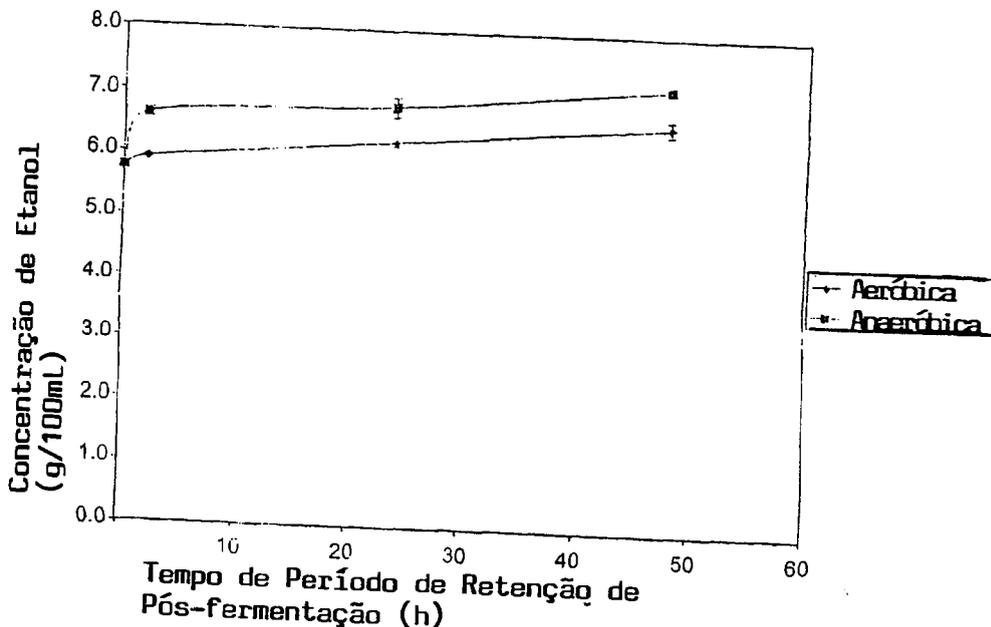


Figura 7.13 Concentração de etanol média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais (n = 2).

Na Figura 7.14, as amostras aeróbicas mostraram um aumento anterior no acetaldeído sob exposição às condições aeróbicas fora do bioreator. A combinação de condições aeróbicas, com consumo de açúcar e produção de etanol, pode contar para este resultado. Pelo final do período de retenção de 48 horas, a concentração de acetaldeído foi diminuída de 17 mg/L para 9 mg/L na amostra anaeróbica, que traz a concentração de líquido para dentro das especificações para uma lager norte americana de qualidade (menos do que 10 mg/L).

A concentração de diacetil total versus tempo de retenção é dada na Figura 7.15. Os resultados mostram que a eliminação de oxigênio a partir do sistema durante este período de retenção proporciona condições mais favoráveis para redução de diacetil. A forma da curva de diacetil total pode estar relacionada ao desdobramento de amino nitrogênio livre, e à subsequente produção intracelular de valina, da qual o diacetil é um subproduto (Nakatani e outros., 1984a; Nakatani e outros., 1984b). A concentração total de diacetil no final da fermentação contínua primária foi 326 mg/L, e no final do período de retenção

anaeróbica estava em uma concentração de 33 mg/L, que é bem abaixo do limite de sabor nas cervejas comerciais.

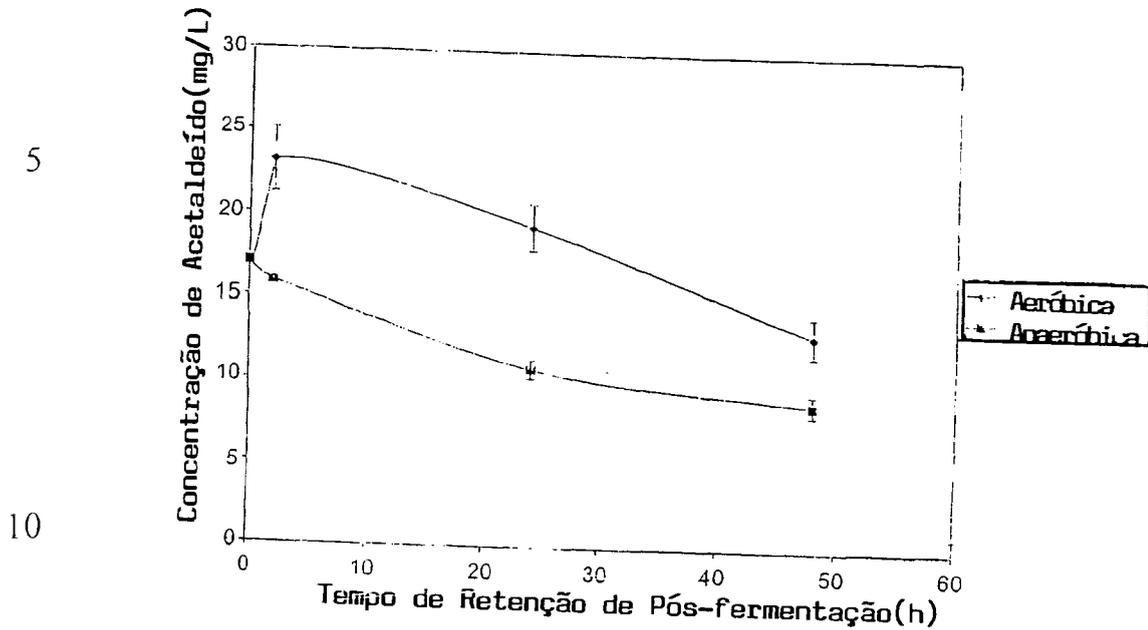


Figura 7.14 Concentração de acetaldeído média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras 15 tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais

(n = 2)

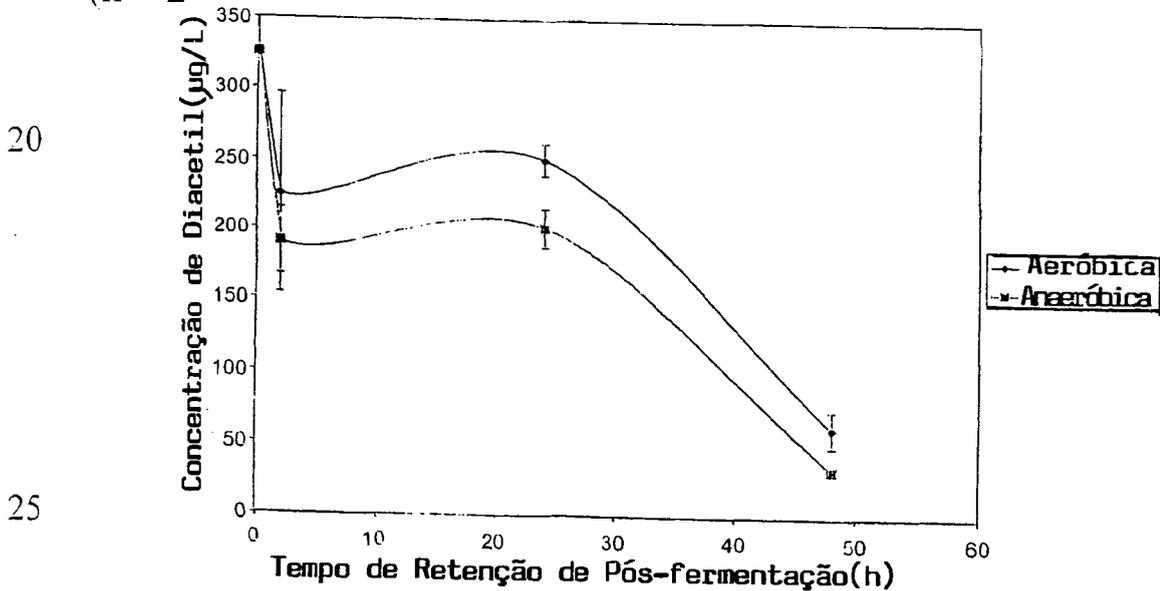


Figura 7.15 Concentração de diacetil total média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais (n = 2).

Nas Figuras 7.16 - 7.18, as concentrações de ésteres de etil acetato, isoamil acetato, e etil hexanoato são plotadas versus tempo de retenção de pós-fermentação. O mesmo modelo para amostras aeróbicas e anaeróbicas foi observado para todos os ésteres. A concentração de ésteres não diverge entre as amostras aeróbicas e anaeróbicas até a última no período de retenção, onde a concentração de ésteres nas amostras aeróbicas declinou, e a concentração nas amostras anaeróbicas aumentou. Devido a concentração de ésteres nas fermentações contínuas ser um tanto baixa comparada com as concentrações de ésteres encontradas na cerveja comercial, é desejável selecionar condições que favoreçam a produção de éster.

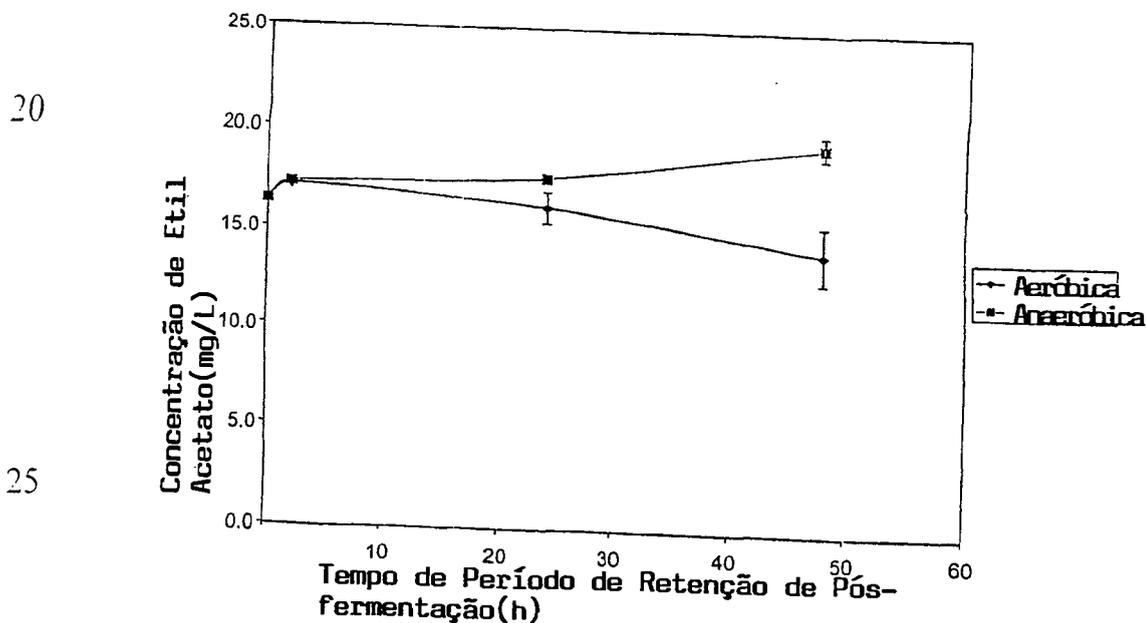


Figura 7.16 Concentração de etil acetato média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais (n = 2).

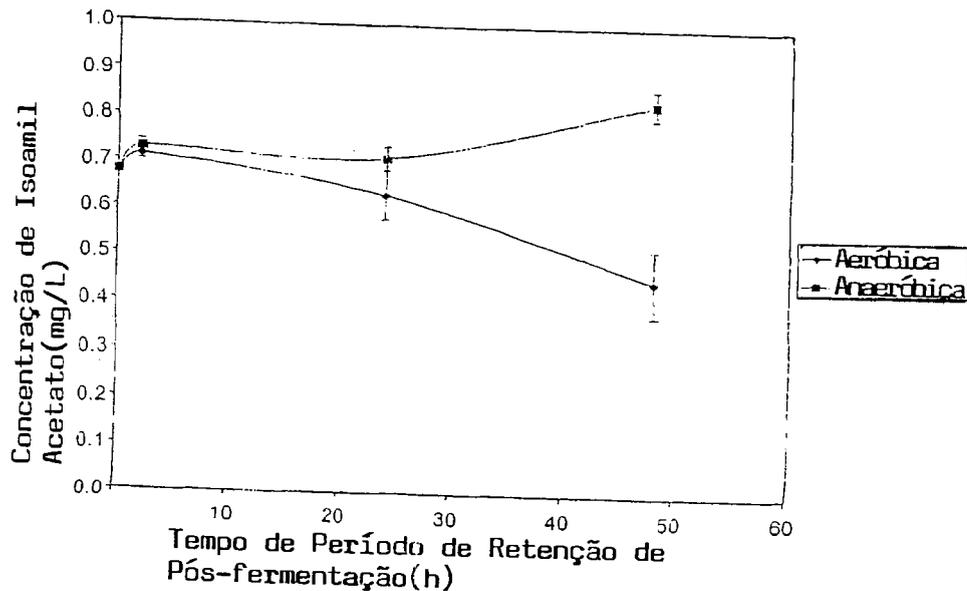
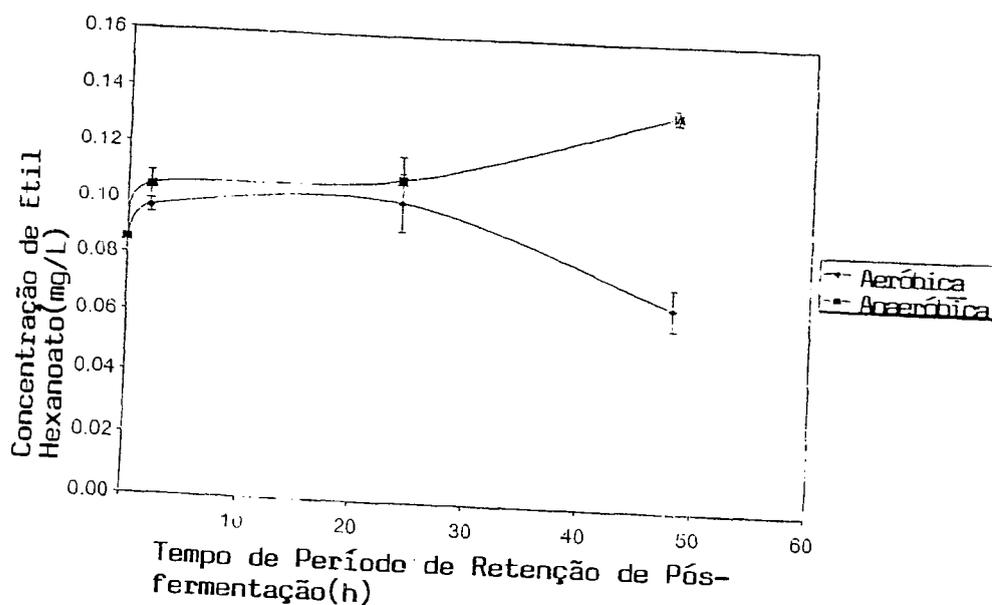


Figura 7.17 Concentração de isoamil acetato média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais (n = 2).



5

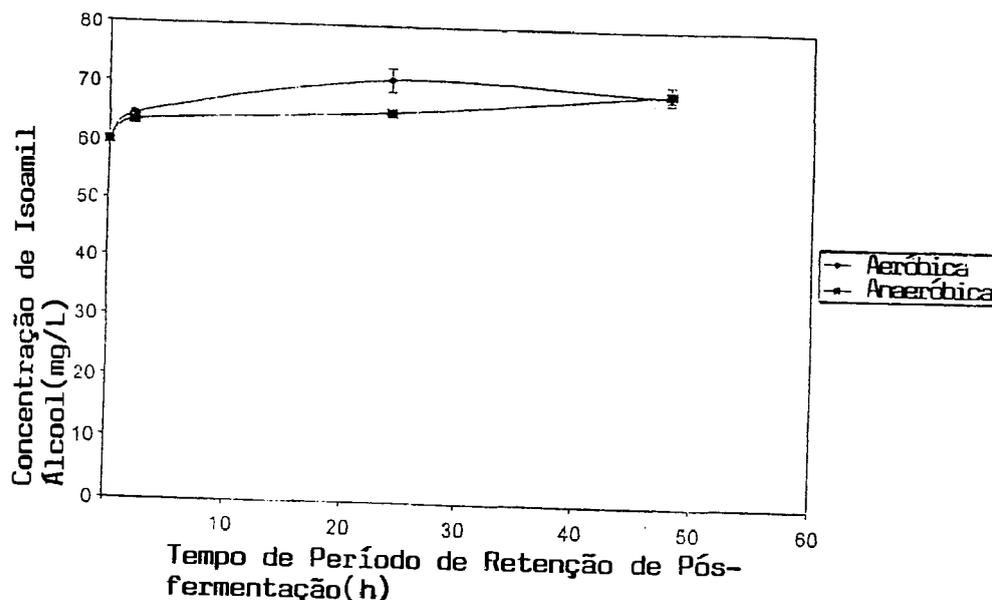
10

15

Figura 7.18 Concentração de etil hexanoato média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).

20

As Figuras 7.19 - 7.21 mostram a concentração de isoamil álcool, 1-propanol, e isobutanol versus tempo de retenção de pós-fermentação. No final do período de retenção de 48 horas, nenhuma diferença significativa nestes álcoois foi observada entre os tratamentos aeróbicos e anaeróbicos. Contudo, as amostras de 24 horas mostraram uma concentração mais alta em todos os casos para os tratamentos aeróbicos.

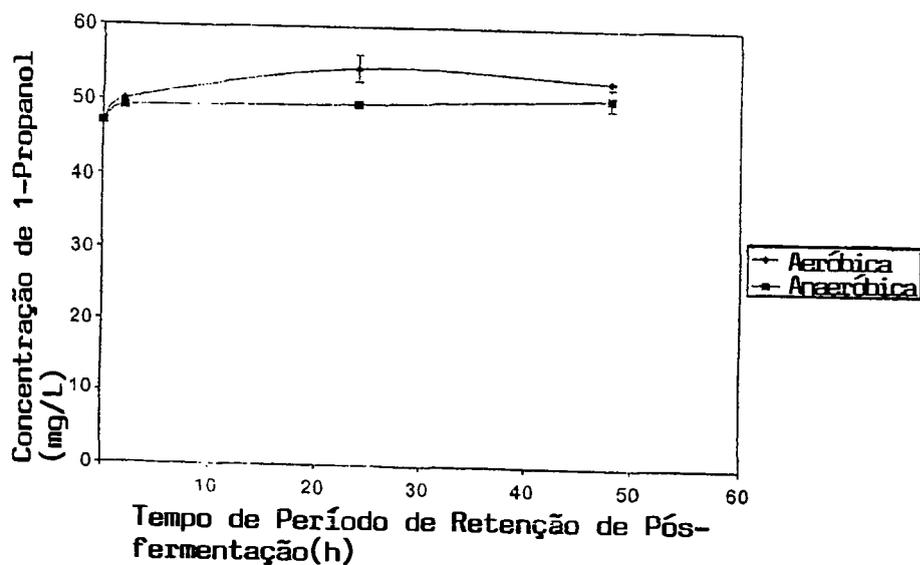


10

Figura 7.19 Concentração de isoamil álcool média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados

15

experimentais ($n = 2$).



25

Figura 7.20 Concentração de 1-propanol média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária

contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).

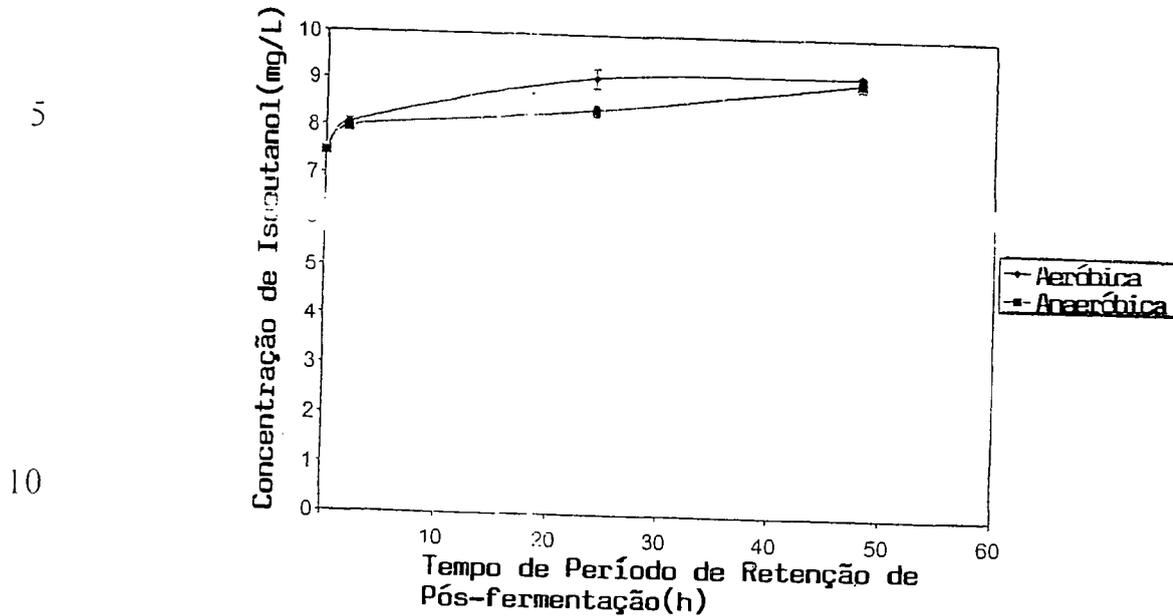


Figura 7.21 Concentração de isobutanol média versus tempo de retenção de pós-fermentação para amostras tratadas aeróbicas e anaeróbicas após fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. As barras de erro representam os limites superior e inferior dos dados experimentais ($n = 2$).

Na Figura 7.22, um gráfico radar é dado para permitir comparação de um número dos compostos de aroma após o período de retenção aeróbica e anaeróbica de 48 horas com um perfil de uma cerveja comercial. Os gráficos radar são comumente usados na indústria de fabrico de bebida fermentada para permitir examinar e comparar uma variedade de características de cerveja diferentes junto com um gráfico (Sharpe, 1988). A partir desta figura, pode ser visto que a cerveja fermentada continuamente

mantida anaerobicamente é a equiparação mais próxima a uma
cerveja comercializada típica. A partir do Apêndice 6, pode ser
visto que o líquido anaeróbico estava dentro das faixas normais
para uma cerveja de mercado, exceto no caso de 1-propanol, que
5 foi significativamente mais alta do que cervejas fermentadas de
dosagem. Esta mais alta do que o 1-propanol normal foi
observada em todos os produtos continuamente fermentados a
partir deste trabalho.

A formação de 1-propanol ocorreu durante o
10 estágio de fermentação primária contínua, e não diminui
significativamente durante o período de retenção, se as condições
eram aeróbicas ou anaeróbicas. Kunze (1996) cita que os fatores
seguintes aumentarão álcoois mais altos tal como 1-propanol
durante fermentação de dosagem: mistura, aeração intensiva do
15 mosto, e adição repetida de mosto fresco à levedura existente.

Ultimamente o cenário ideal será eliminar o
período de retenção secundária totalmente pela otimização das
condições no bioreator contínuo primário. Contudo, ganhos
adicionais podem ser produzidos usando-se o período de retenção,
20 pela otimização da temperatura de retenção (a remoção de diacetil
pela levedura é uma temperatura muito dependente), a quantidade
de açúcares fermentáveis remanescente no líquido no começo do
período de retenção, otimizando a concentração de levedura
presente, as características hidrodinâmicas do vaso de retenção (a
25 remoção de diacetil pode ser aperfeiçoada pelo aperfeiçoamento

do contato entre a levedura e a cerveja), e tomando-se medidas adicionais para eliminar oxigênio a partir deste estágio.

Cálculos de produtividade de cerveja volumétricos são dados no Apêndice 3. O processo descrito nesta
5 seção, com um bioreactor contínuo operando com um tempo de residência de 24 horas, seguido por uma retenção de dosagem de 48 horas, é 1.8 vezes mais produtivo do que um processo de dosagem industrial atual. Um processo de dosagem industrial relativamente rápido, com um tempo de ciclo de 7.5 dias tem uma
10 produtividade de cerveja volumétrica de 0.093 m^3 de cerveja produzida / (volume do vaso $\text{m}^3 \times \text{dia}$), pelo que o processo contínuo aqui descrito tem uma produtividade de 0.165 m^3 de cerveja produzida / (volume do vaso $\text{m}^3 \times \text{dia}$). Se a pesquisa adicional permite que o período de retenção de dosagem seja
15 encurtado para 24 horas, a produtividade da cerveja tornar-se-á 2.3 vezes mais produtiva que o padrão de dosagem industrial. Se o cenário ideal de um processo contínuo de 24 horas sem retenção de dosagem foi alcançado, a produtividade volumétrica da cerveja tornar-se-á 7.5 vezes aquela do padrão de dosagem. Em adição à
20 produtividade volumétrica aumentada, os benefícios adicionais realizados pelo movimento de uma dosagem para um processo contínuo, tal como tempo curto para mercado, diminuição no tamanho da cervejaria, e propagação de levedura menos freqüente, devem ser equilibrados com uma análise cuidadosa dos
25 custos de operação relativos.

Outros pesquisadores (Kronlöf e Virkajärvi, 1996; Nakanishi e outros., 1993; Yamauchi e outros., 1995) se focalizaram no desenvolvimento de fermentações contínuas de estágios múltiplos em que o primeiro estágio de fermentação contínua (aeróbica) resulta em somente um consumo parcial dos açúcares fermentáveis presentes no mosto. Enquanto esta estratégia tem mostrado algum sucesso em termos de produção de aroma, estes sistemas são complexos. Também, o primeiro estágio aeróbico de tais sistemas cria um ambiente que é mais susceptível à contaminação microbiana (i.e. concentração de açúcar mais alta, temperatura e oxigênio, com baixas concentrações de etanol). No sistema de bioreator de elevação de gás apresentado neste trabalho, o bioreator tem uma concentração de açúcar fermentável baixa, baixo pH, alta concentração de etanol, e concentrações baixas de oxigênio, produzindo o ambiente não-hospitalar para contaminantes potenciais.

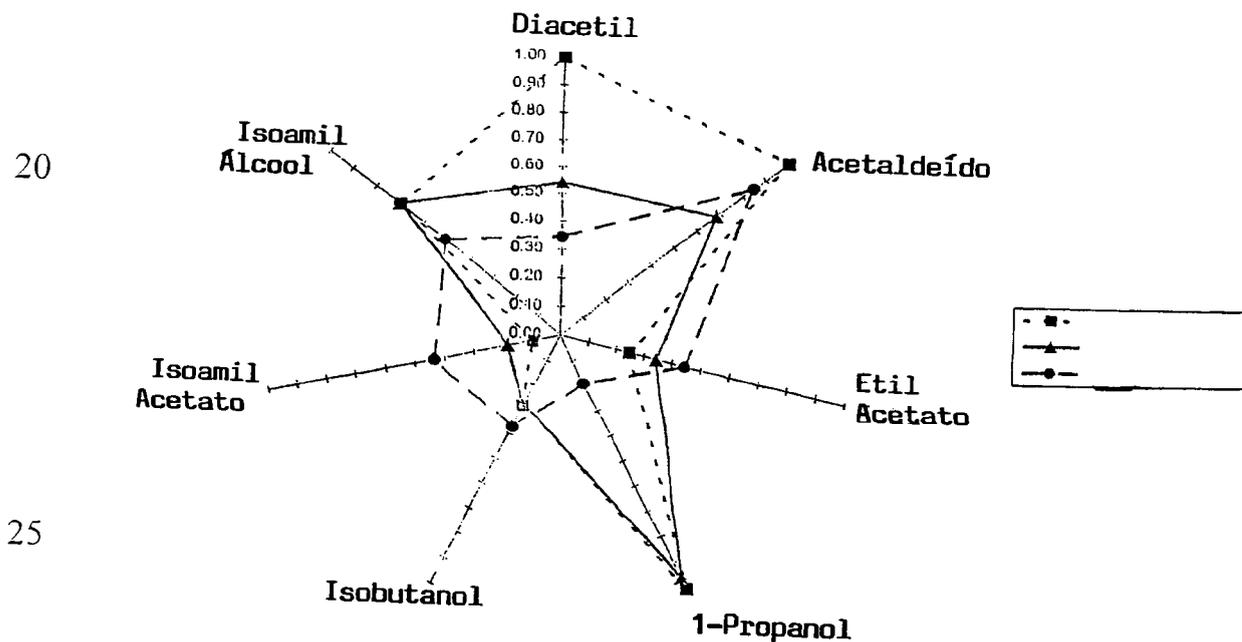


Figura 7.22. Gráfico radar de dados de concentração normalizada obtida após 48 horas de retenção aeróbica e anaeróbica, seguindo fermentação primária contínua em um bioreator de elevação de gás. O dado normalizado é baseado nas medias de amostras duplicadas, e os dados da cerveja comercial foram tomados como o ponto médio dos dados listados no Apêndice 6.

7.2.3 Efeito do Tempo de Residência do Líquido nos Metabólitos de Levedura Chaves durante Fermentação de Cerveja Primária Contínua

As Figuras 7.23 - 7.28 mostram os resultados analíticos obtidos a partir da fase líquida do bioreator. Na Tabela 7.3, as concentrações médias e taxas de fluxo dos analíticos medidos em estado pseudo-constante (após um mínimo de três tempos de giro do bioreator), são listadas nos dois tempos de residência de líquido usados durante este experimento. Enquanto a viabilidade de levedura de fase líquida não muda significativamente quando a taxa de fluxo de mosto para o bioreator foi aumentada, a concentração de células de levedura não muda conforme visto na Figura 7.23.

Tabela 7.3. (a) Tabela resumo de efeito do tempo de residência do bioreactor na levedura de fase líquida e concentrações de metabólite de levedura chave médias em estado pseudo-constante; (b) Tabela resumo do efeito do tempo de residência do bioreator na levedura de fase líquida e taxas de

fluxo de metabólito de levedura chave na descarga do bioreator médias no estado pseudo-constante.

(a) Concentração Analítica Média	Tempo de Residência do Bioreator	
	1,8 dias	0,9 dia
Concentração de Célula (células/mL)	2.38E+08	1.32E+08
Ferm. Total de Glucose (g/100 mL)	0,29	6.09
FAN (mg/L)	106.3	246.4
Etanol (g/100 mL)	5.16	4.80
Diacetil total (ug/L)	292	460
Acetaldeído (mg/L)	19.47	37.07
Etil Acetato (mg/L)	41.00	38.29
1-Propanol (mg/L)	44.95	13.53
Isobutanol (mg/L)	22.78	9.13
Isoamil Acetato (mg/L)	0.90	1.28
Isoamil Alcool (mg/L)	76.67	51.39

(b) Taxa de Fluxo Analítica Média	Tempo de Residência do Bioreator	
	1,8 dias	0,9 dia
Concentração de Célula (células/mL)	7.38E+08	8.22E+08
Ferm. Total de	8.93E-03	3.72E-01

Glucose (g/100 mL)		
FAN (mg/L)	3.65E-04	1.50E-03
Etanol (g/100 mL)	1.60E-01	2.93E-01
Diacetil total (ug/L)	9.06E-07	2.81E-06
Acetaldeído (mg/L)	6.04E-05	2.26E-04
Etil Acetato (mg/L)	1.27E-04	2.34E-04
1-Propanol (mg/L)	1.39E-04	8.25E-05
Isobutanol (mg/L)	7.06E-05	5.57E-05
Isoamil Acetato (mg/L)	2.80E-06	7.30E-06
Isoamil Álcool (mg/L)	2.38E-04	3.13E-04

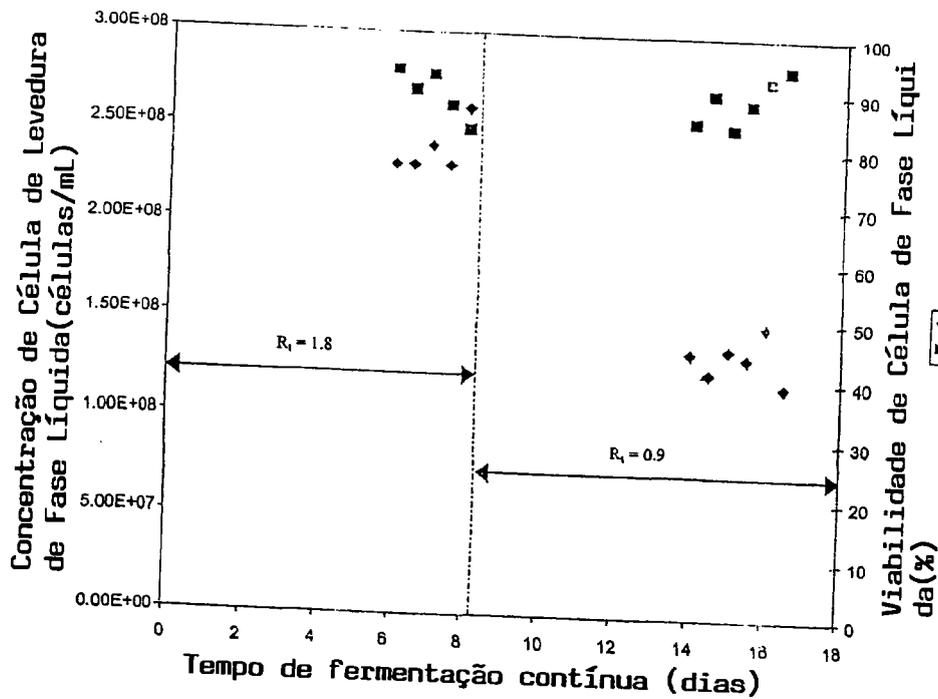
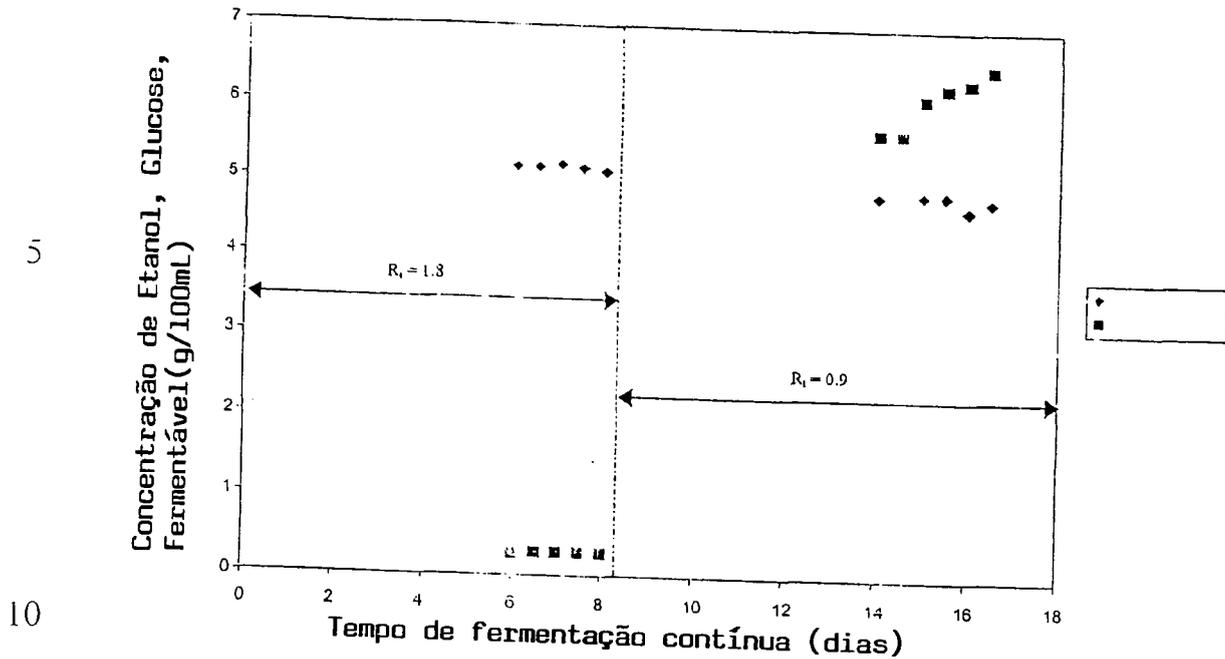


Figura 7.23. Concentração de célula de levedura de fase líquida versus tempo de fermentação contínua relativa, efeito do tempo de residência de líquido no bioreator. R_t é o tempo de residência de líquido do bioreator em dias.

5 Nas Figuras 7.24 e 7.25, as concentrações do amino nitrogênio livre de substratos de mosto (FAN) e carboidrato fermentável total (como glucose) ambas aumentaram quando o tempo de residência de líquido diminuiu de 1.8 a 0.9 dias. A partir dos equilíbrios de massa na Tabela 7.4, a taxa de
10 consume de carboidrato fermentável total (como glucose) aumentou, enquanto a taxa de consumo de amino nitrogênio livre diminuiu, com a diminuição do tempo de residência do bioreator. O fator de rendimento $Y_{P/S}$ do etanol de produto de fermentação a partir do substrato de glucose fermentável aumentou de 0.3 para
15 0.5, com a redução do tempo de residência do líquido. Devido ao sistema ser aspergido com ar e dióxido de carbono, existem provavelmente perdas menores de etanol na fase gás, que teria um impacto no fator de rendimento $Y_{P/S}$ pelo afetamento do equilíbrio no etanol. A pesquisa conduzida em colaboração com Budac e
20 Margaritis (1999) tem demonstrado qualitativamente, usando-se uma técnica de espectroscopia de massa de cromatografia de gás (GC-MS), estes voláteis de aroma de cerveja incluindo etanol, acetaldeído, etil acetato, e isoamil acetato são detectados no espaço superior do bioreator de elevação de gás durante
25 fermentação contínua.



15

Figura 7.24. Concentração de etanol de fase líquida e glucose fermentável versus tempo de fermentação contínua relativa, efeito do tempo de residência de líquido no bioreator. R_t é o tempo de residência de líquido do bioreator em dias.

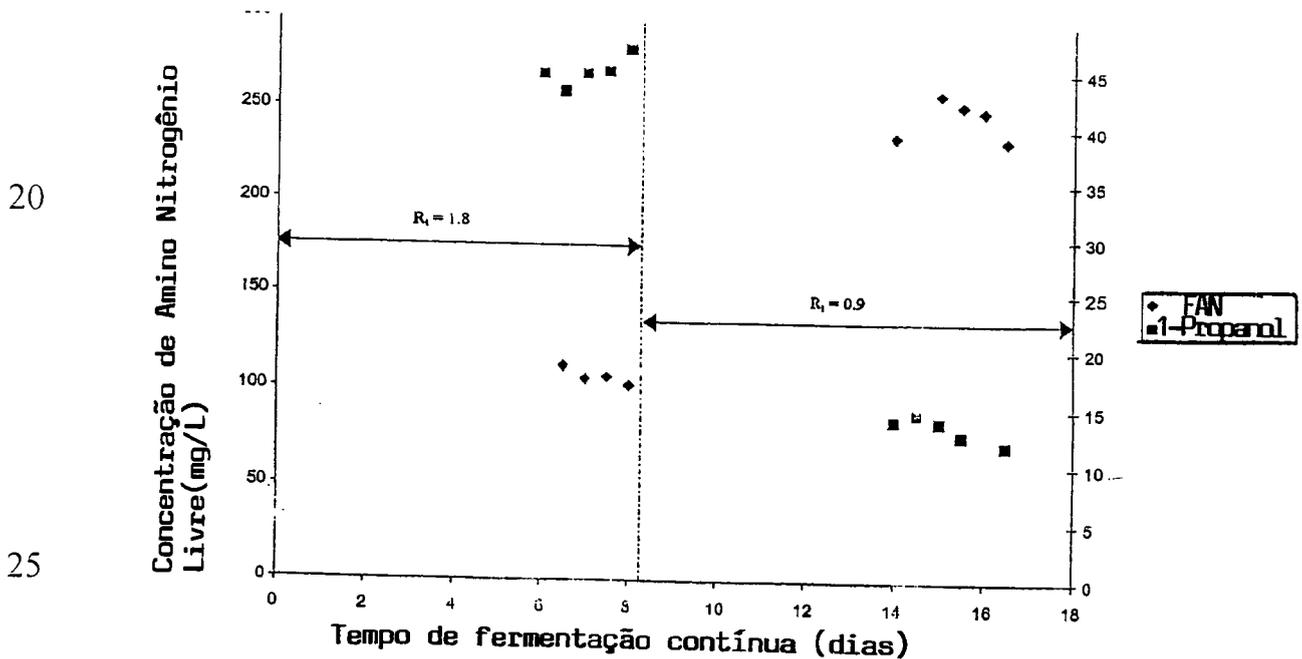


Figura 7.25. Concentração de amino nitrogênio de fase líquida e 1-propanol versus tempo de fermentação contínua relativa, efeito do tempo de residência de líquido no bioreator. R_t é o tempo de residência de líquido do bioreator em dias.

Tabela 7.4. Balanços de massa no amino nitrogênio livre e carboidrato fermentável total (como glucose) baseados nos dados médios na Tabela 7.3, efeito do tempo de residência.

10

Tempo de Residência	1,8 dias	0,9 dias
	Amino Nitrogênio Livre (g/min)	
Admissão*	8.84E-04	1.74E-03
Descarga	3.65E-04	1.50E-03
Consumo (DeltaS)	5.18E-04	2.35E-04
Fator de Rendimento ($Y_{P/S}$)		

Tempo de Residência	1,8 dias	0,9 dias
	Amino Nitrogênio Livre (g/min)	
Admissão*	4.71E-01	9.26E-01
Descarga	8.93E-03	3.72E-01
Consumo (DeltaS)	4.62E-01	5.54E-01
Fator de Rendimento ($Y_{P/S}$)	0.3	0.5

*Concentrações de admissão do Apêndice 1

A concentração de fase líquida do etanol do produto de fermentação diminuiu com a mudança de etapa no tempo de residência de líquido. Contudo, o sistema como um todo foi produzindo mais etanol em uma base de taxa de fluxo de massa no tempo de residência de líquido. Devido ao objetivo desta trabalho não ser somente produzir etanol em isolamento, mas preferivelmente uma cerveja com um equilíbrio de muitos compostos, a maximização da produtividade de etanol deve ser equilibrada com outros fatores. No final de uma fermentação de cerveja primária comercial, a maioria do substrato de glucose fermentável deve ser consumida.

Na Figura 7.26, a resposta da concentração de acetaldeído e diacetil total à mudança de etapa na taxa de fluxo de mosto é dada. Ambos os analíticos aumentam na concentração, e em sua taxa de produção quando o tempo de residência de líquido foi diminuído. Durante as fermentações de cerveja de dosagem, o acetaldeído é excretado pela levedura durante os primeiros poucos dias de fermentação (Kunze, 1996).

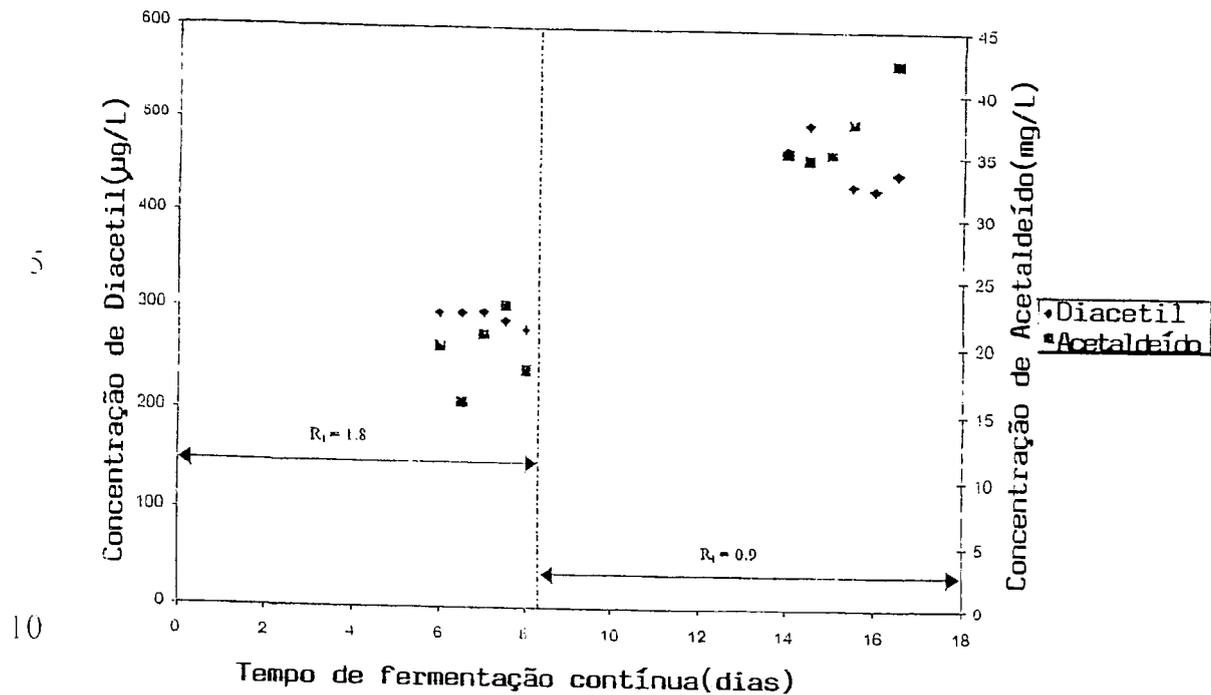


Figura 7.26. Concentração de diacetil total de fase líquida e acetaldeído versus tempo de fermentação contínua relativa, efeito do tempo de residência de líquido no bioreator. R_1 é o tempo de residência de líquido do bioreator em dias.

As Figuras 7.25 e 7.27 mostram o efeito da diminuição do tempo de residência do bioreator nas concentrações de fase líquida dos álcoois mais altos 1-propanol, isobutanol e isoamil álcool. Todos os três álcoois mais altos diminuem em concentração quando o tempo de residência do bioreator foi diminuído.

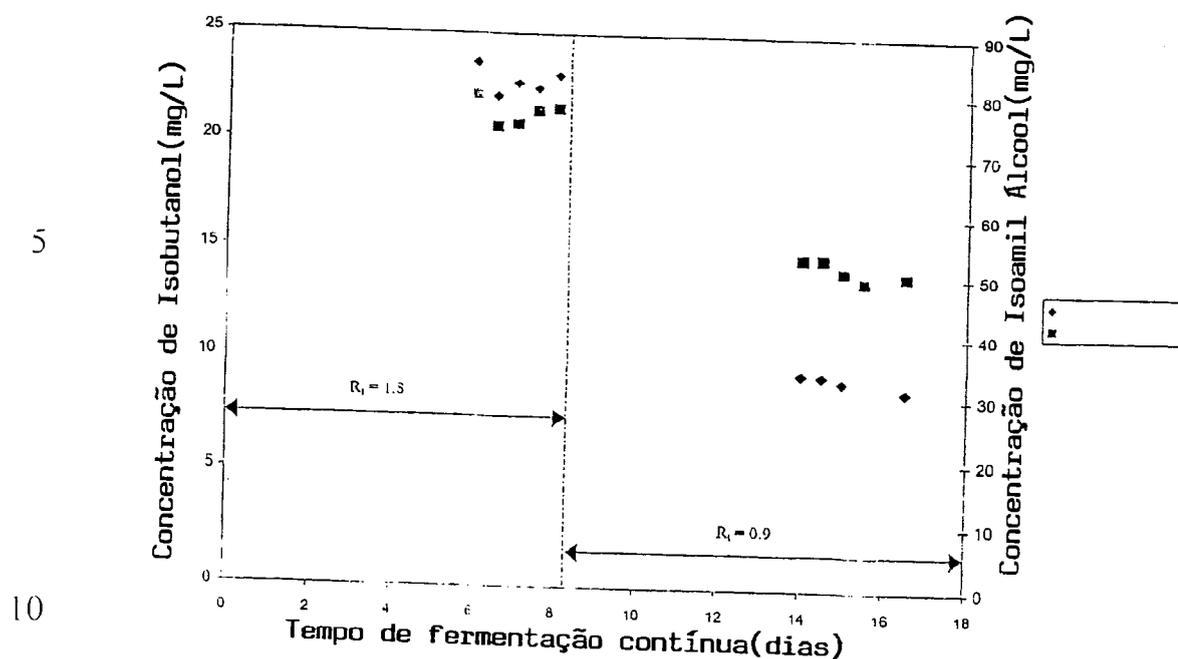


Figura 7.27. Concentração de isobutanol de fase líquida e isoamil álcool versus tempo de fermentação contínua relativa, efeito do tempo de residência de líquido no bioreator. R_t é o tempo de residência de líquido do bioreator em dias.

As taxas de fluxo de massa de etil acetato e isoamil acetato dadas na Tabela 7.3 (b) ambas aumentam em resposta à diminuição no tempo de residência de líquido. Na Figura 7.28, a concentração de fase líquida de etil acetato diminuiu, enquanto isoamil acetato aumentou. Devido a este experimento permitir um aumento no crescimento de célula de fase líquida sem aumentar o suprimento de oxigênio para o sistema, as condições no bioreator promovem produção de éster. Hough e outros., (1982) citaram que o crescimento aumentado e condições de oxigênio diminuídas encorajam a formação de éster.

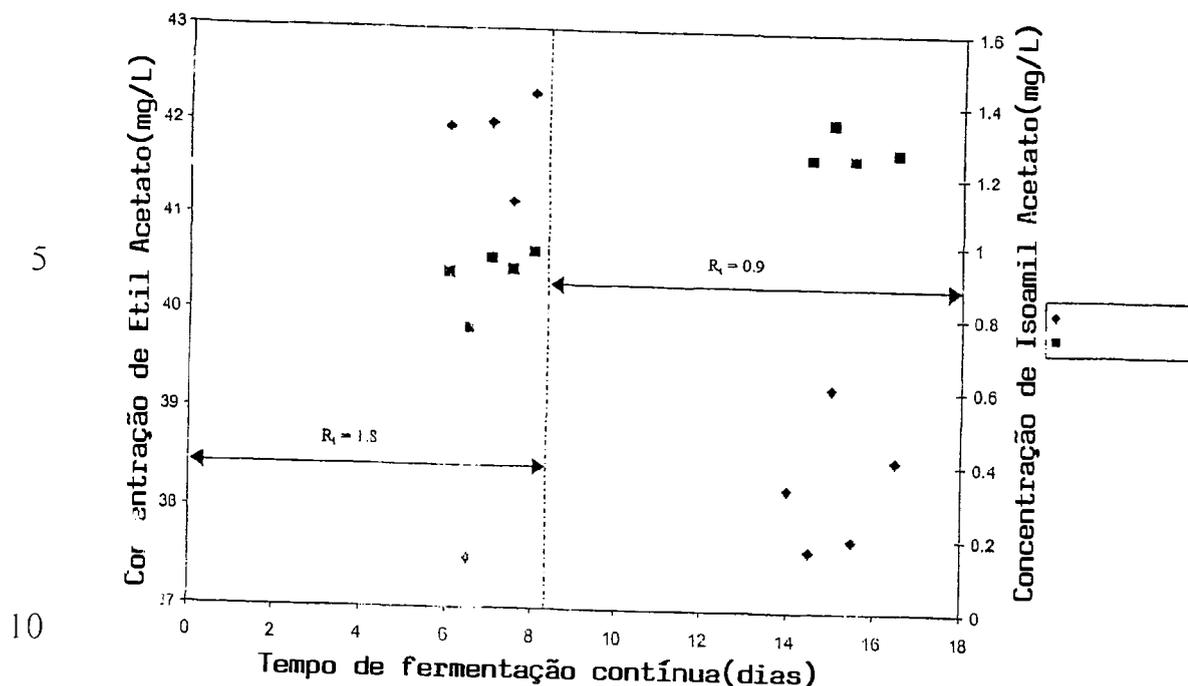


Figura 7.28. Concentração de etil acetato de fase líquida e isoamil acetato versus tempo de fermentação contínua relativa, efeito do tempo de residência de líquido no bioreator. R_t é o tempo de residência de líquido do bioreator em dias.

7.2.4 Uso de uma Preparação Comercial de Alfa-Acetolactato Decarboxilase para Reduzir Diacetil Total durante Fermentação de Cerveja Primária Contínua

Experimento 1: O bioreator foi contaminado com cocci Gram positive que cresce aerobicamente antes do ensaio poder ser completado. Foi determinado que o próprio bioreator foi contaminado, visto que teste microbiológico do suprimento de mosto não mostrou contaminação. Isto apontou a necessidade do bioreator se atualizar com salvaguardas contra contaminação. Contudo, antes do sistema ser parado, uma diminuição na concentração de diacetil total foi observada quando

a ALDC foi adicionada ao suprimento de mosto. Infelizmente não foi possível tirar quaisquer conclusões a partir destes dados devido aos efeitos confusos da contaminação do bioreator.

Experimento 2: Como um resultado de numerosas atualizações, o sistema opera sem contaminação através de toda a duração do Experimento 2. Os dados para este experimento são dados nas Figuras 7.29 – 7.31. Na Tabela 7.5, as concentrações de estado pseudo-constante médio de diacetil total antes e depois da adição de ALDC ao mosto são resumidas. A concentração de diacetil total diminuiu por 47% com a adição de ALDC ao mosto, que produz o uso desta enzima (médias tomadas após três tempos de giro do bioreator). Conforme visto nas Figuras 7.30 e 7.31, o carboidrato fermentável total (como glucose), e concentração de célula, se acumulam levemente durante este ensaio, que pode ter sido causado pelas leves diferenças no mosto suprido ao bioreator antes e após a adição de ALDC.

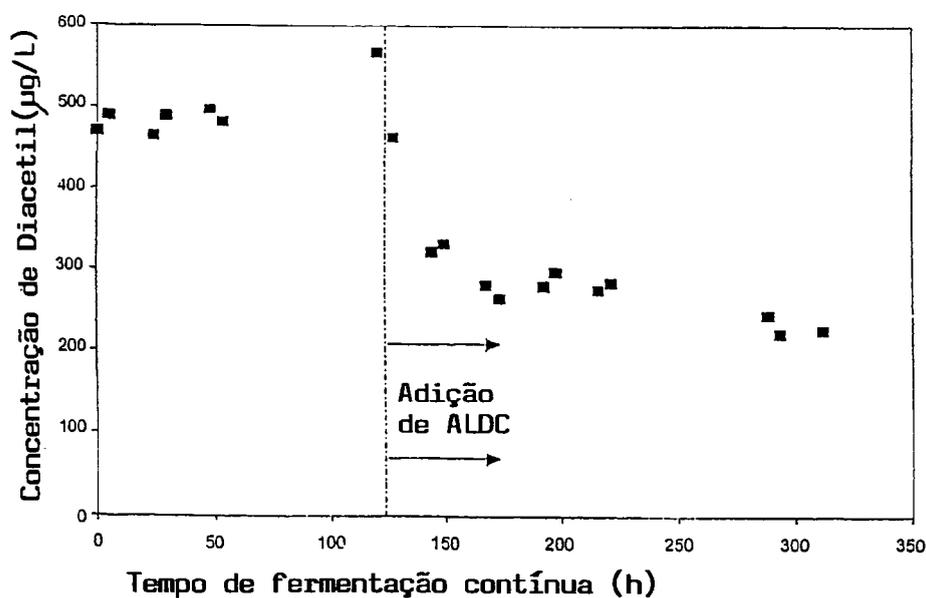


Figura 7.29. Concentração de diacetil total de fase líquida versus tempo de fermentação contínua, efeito de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto, Experimento 2.

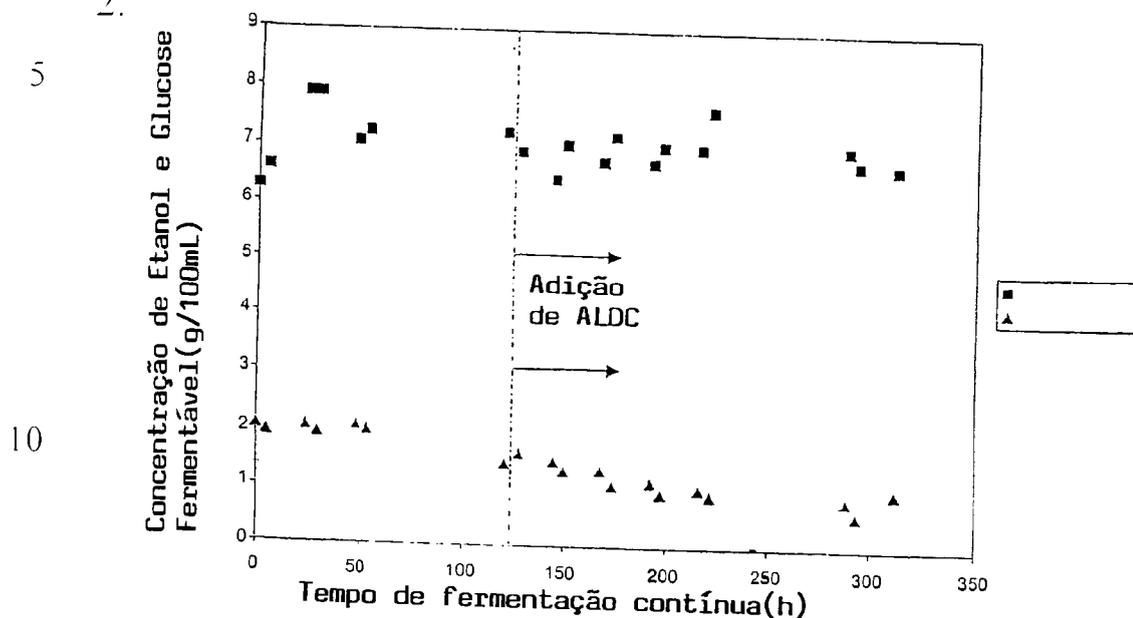


Figura 7.30. Concentração de carboidrato fermentável de fase líquida versus tempo de fermentação contínua, efeito de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto, Experimento 2.

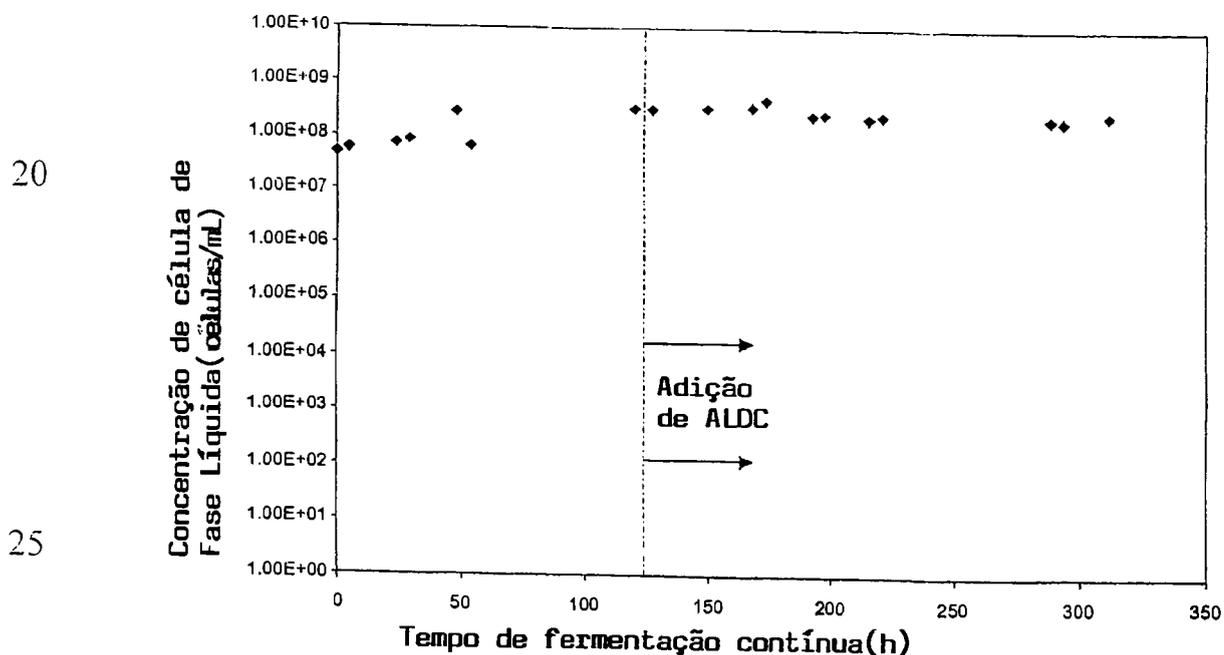


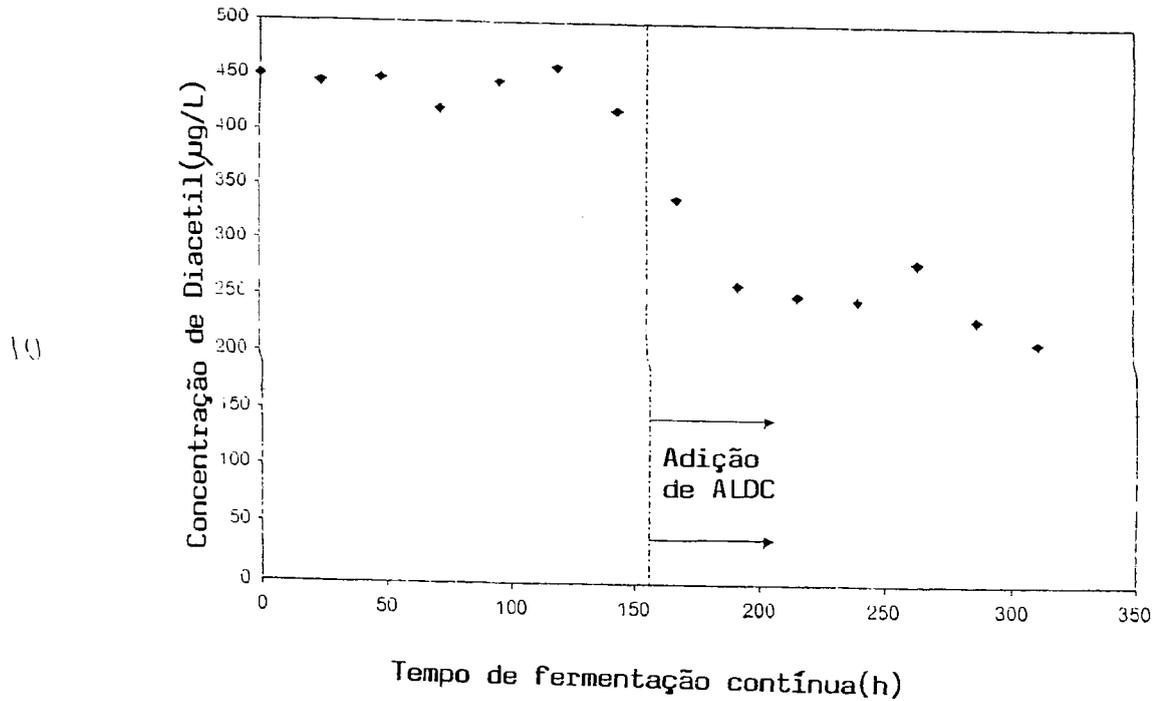
Figura 7.31. Concentração de célula de fase líquida versus tempo de fermentação contínua, efeito de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto, Experimento 2.

De modo a eliminar o efeito de confusão potencial da variabilidade do mosto durante o Experimento 3, uma grande quantidade de mosto a partir da cervejaria (14 hL) foi coletada, e ALDC foi adicionada diretamente ao mosto remanescente neste vaso de retenção, uma vez que a linha base de estado pseudo-constante foi alcançada. Isto elimina adicionalmente quaisquer inconsistências de mosto potenciais que podiam ter afetado a performance de fermentação no Experimento 2. Este vaso de armazenamento de mosto foi também equipado com aspergimento de dióxido de carbono, de modo que níveis de oxigênio dissolvido no suprimento de mosto foram mantidos em um nível consistentemente baixo.

Experimento 3: As Figuras 7.32 – 7.34 ilustram o efeito de adição de ALDC ao suprimento de mosto, na concentração de diacetil total, carboidrato fermentável total (como glucose), etanol, e célula livremente suspensa durante fermentação de cerveja contínua. A Tabela 7.6 também dá a concentração de diacetil total de estado pseudo-constante média antes e após a adição de ALDC ao suprimento de mosto (médias tomadas após três tempos de giro do bioreator). Nenhuma contaminação foi detectada em qualquer ponto durante este experimento. A concentração de diacetil total foi reduzida por 45% após adição de ALDC. Nenhuma diferença significativa na

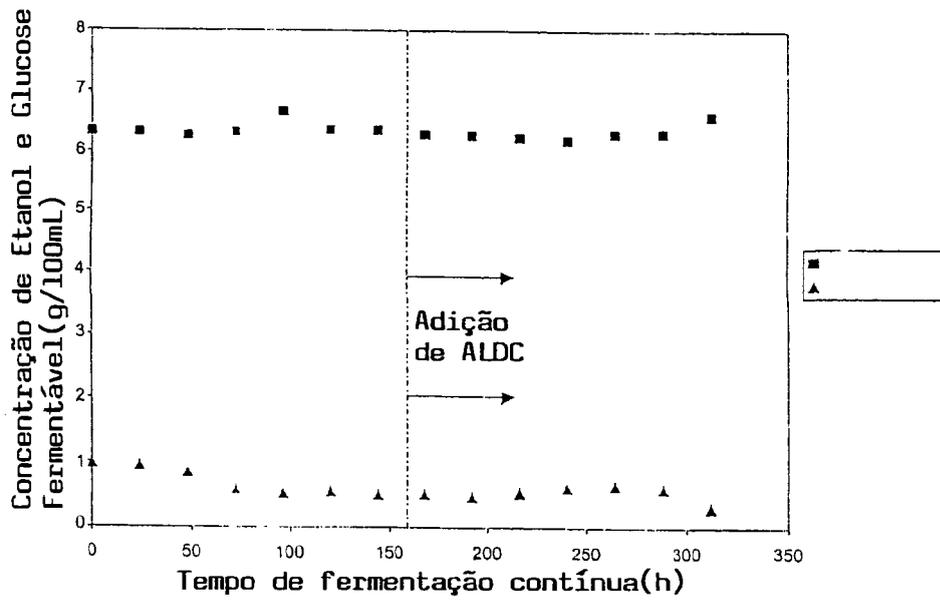
concentração de etanol, carboidrato fermentável total (como glucose) ou célula livremente suspensa foram observadas, que concorda com as descobertas de dosagem de Aschengreen e Jepsen (1992).

5



15

Figura 7.32. Concentração de diacetil total de fase líquida versus tempo de fermentação contínua, efeito de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto, Experimento 3.

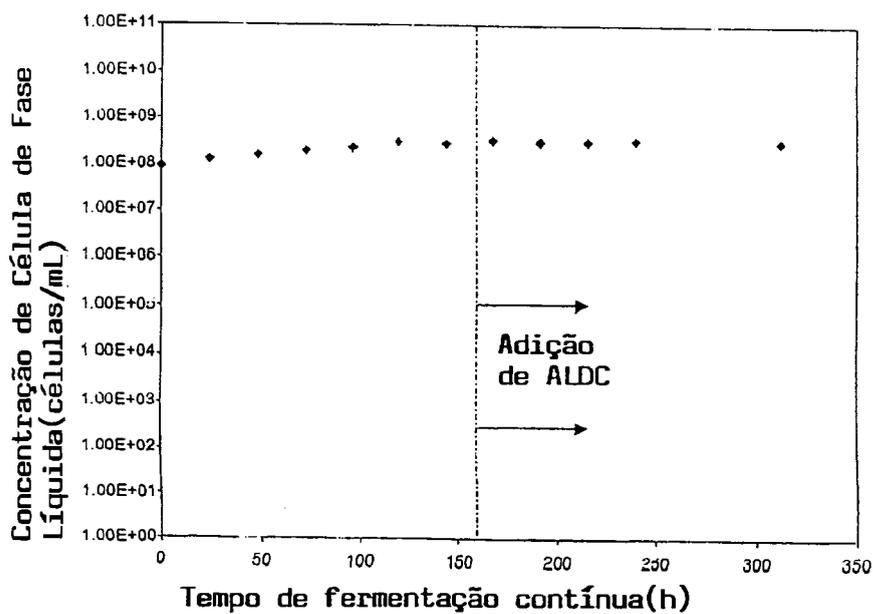


5

10

15

Figura 7.33. Concentração de etanol de fase líquida e açúcar fermentável total (como glucose) versus tempo de fermentação contínua, efeito de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto, Experimento 3.



20

Figura 7.34. Concentração de célula de fase líquida versus tempo de fermentação contínua, efeito de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto, Experimento 3.

Os resultados dos Experimentos 2 e 3 indicam
5 que a ALDC não tem um efeito significativo na concentração de diacetil total durante fermentação contínua em bioreatores de elevação de gás, dando uma redução média na concentração de diacetil total de 46%. Esta tem o potencial de diminuir ou eliminar o processamento secundário para redução de diacetil em
10 sistemas de elevação de gás contínuos. Uma dosagem relativamente alta de ALDC foi usada para estes experimentos iniciais, e seria necessário otimizar a quantidade, método e regulação da dosagem de ALDC no mosto se esta enzima é para ser adotada para o processo. Economias adicionais podem ser
15 realizadas se uma enzima torna-se disponível com níveis de atividade mais altos sob condições de fermentação de cervejaria, ou se a própria enzima foi imobilizada, permitindo sua reutilização (Dulieu e outros., 1996). Outra consideração será a aceitação pública de aditivos de enzima que têm sido produzidos
20 usando-se organismos geneticamente modificados.

Na dosagem recomendada de supridores de 2 kg/1000 hL, e, com custo da preparação da enzima comercial a \$131.05/kg, \$0.26 / hL seria adicionado aos custos de material de fermentação. Conforme usado nos experimentos realizados, a
25 dosagem de enzima foi 72 mg/L (108 ADU/L) ou 7.2 kg/1000 hL de ALDC, dando um custo de material adicional de \$0.94/hL. As

economias de usar-se a ALDC para redução de diacetil durante as fermentações contínuas de elevação de gás dependerão da dosagem de enzima ótima sob condições de bioreator, e da quantidade de tempo economizado por seu uso.

- 5 Tabela 7.5. Resumo de efeito de estado pseudo-constante médio de adição de ALDC ao meio de fermentação de mosto na concentração de diacetil total durante fermentação de cerveja contínua em um bioreator de elevação de gás.

Experimento	Concentração de Diacetil Total Média (mg/L) (ALDC ausente)
Experimento II	495
Experimento III	445

Experimento	Concentração de Diacetil Total Média (mg/L) (ALDC, 60mL/L)
Experimento II	260
Experimento III	245

10

Experimento	Redução de Percentagem de Diacetil
Experimento II	47
Experimento III	45

*médias baseadas nos valores de estado pseudo-constante após três tempos de giro do reator.

O precedente suporta a proposição que fermentação contínua, usando-se levedura imobilizada e as
5 células livres associadas em um sistema de bioreator de tubo de tiragem de ar de elevação de gás, é alternativa viável para fermentação de dosagem para produção baseada nos seguintes critérios:

- equiparação de aroma efetuada
- 10 - produtividade volumétrica de bioreator mais alta
- complexidade mínima
- operação contínua de longo prazo demonstrada
- controle de ar (oxigênio) no gás de fluidização
- 15 para controle de aroma
- adição de enzima α -acetolactato decarboxilase para controle de diacetil como opção
- nenhuma contaminação bacterial
- benefícios financeiros.

20 Existem ainda muitas áreas que necessitam ser estudadas adicionalmente, mas a tecnologia está pronta para ser testada em uma escala maior. Os bioreatores de elevação de gás já são usados em uma escala industrial para tratamento de água de despejo, que produz os prospectos de tornar o sistema de
25 fermentação de cerveja contínua tecnicamente seguro. A cervejaria Grolsch na Holanda foi reportada para usar um

bioreator de elevação de gás de 230 m³ para tratamento de água de despejo (Driessen e outros., 1997). Uma das maiores barreiras à fermentação contínua em escala comercial na indústria de fabrico de bebida fermentada pode ser a aceitação pelos
5 fabricantes de cerveja de um novo processo em uma indústria que é profundamente ligada à tradição.

Dados coletados nos metabólitos de levedura secundária produzidos durante fermentações de cerveja contínuas conduzidas neste trabalho realçam a importância do controle de
10 oxigênio no gás de fluidização para a formação de aroma da cerveja. As descobertas mostraram que sob as dadas condições de operação, ar aumentado no gás de fluidização do bioreator causou um aumento no acetaldeído, diacetil e álcoois mais altos (isoamil álcool e isobutanol), enquanto as concentrações de ésteres
15 (isoamil acetato, etil hexanoato, etil octanoato) e etanol, foram reduzidas. Estes dados sugerem que existe o potencial para o controle do aroma da cerveja através da composição do gás de fluidização do bioreator, permitindo a produção de produtos únicos.

20 Com a exceção de quando ar foi eliminado do gás de fluidização, uma concentração de célula livremente suspensa de mais do que 10⁸ células/mL foi mantida na fase líquida do bioreator. O sistema, desse modo, tem mais do que uma população de células de levedura coexistente no bioreator, a
25 levedura imobilizada e a levedura suspensa de fase líquida. Devido as grandes quantidades de crescimento de levedura viável

na fase líquida do bioreator, existe a possibilidade de usar-se um bioreator contínuo como um propagador de levedura.

Quando um período de retenção de dosagem de 48 horas foi adicionado, seguindo fermentação primária contínua, um perfil de aroma dentro da faixa de cervejas de mercado foi obtido. A temperatura deste período de retenção foi 21°C, e a importância de minimizar a exposição do líquido ao oxigênio durante o período de retenção para formação de aroma foi demonstrada experimentalmente. A adição de um período de retenção adiciona dois dias ao processo, bem como complexidade adicional; contudo, ele é ainda significativamente mais rápido do que fermentações de dosagem comerciais, que levam entre sete e quatorze dias.

Ultimamente o cenário ideal seria eliminar totalmente o período de retenção secundário pela otimização das condições no bioreator contínuo primário. Contudo, reduções adicionais no tempo de retenção secundário podem ser alcançadas em curto prazo pela otimização da temperatura de retenção (remoção de diacetil pela levedura é muito dependente da temperatura), a quantidade de açúcares fermentáveis que permanecem no líquido no começo do período de retenção, a concentração de levedura presente, as características de hidrodinâmica do vaso de retenção (a remoção de diacetil pode ser aperfeiçoada pelo aperfeiçoamento do contato entre a levedura e a cerveja), e pela tomada de medidas adicionais para eliminar oxigênio a partir deste estágio.

Outros pesquisadores (Kronlof e Virkajarvi, 1996; Nakanishi e outros., 1993; Yamauchi e outros., 1995) têm se focado no desenvolvimento de fermentações contínuas de estágios múltiplos em que o primeiro estágio de fermentação
5 contínua (aeróbica) resulta em somente um consumo parcial dos açúcares fermentáveis presentes no mosto. Enquanto esta estratégia tem mostrado algum sucesso em termos de produção de aroma, estes sistemas são complexos. Também, o primeiro estágio aeróbico de tais sistemas cria um ambiente que é mais susceptível
10 à contaminação microbiana (i.e. alta concentração de açúcar, temperatura, e oxigênio, com baixas concentrações de etanol). No bioreator de elevação de gás apresentado neste trabalho, o bioreator tem uma concentração de açúcar fermentável de estado constante baixa, baixo pH, alta concentração de etanol, e baixas
15 concentrações de oxigênio, tornando o ambiente inóspito para contaminantes potenciais. Em uma cervejaria menos desenvolvida, a minimização da complexidade e desenvolvimento de um processo resistente à contaminação robusto é um fator de sucesso importante.

20 A adição de uma preparação comercial de alfa-acetolactato decarboxilase (ALDC) ao mosto que supre a fermentação contínua, mostrou uma redução média de diacetil de 46%. Contudo, devido a ALDC ser uma enzima que é produzida por um organismo geneticamente modificado (GMO), existem
25 percepções públicas publicadas que seriam endereçadas antes de se usar tal enzima em um produto comercial. Em adição, as

enzimas comercialmente disponíveis para controle de diacetil não têm atividade ótima sob condições de fermentação.

Sob seis meses de fermentação contínua usando-se células livremente suspensas de imobilização de gel de kappa-carrageenan na fase líquida, retém-se viabilidades maiores do que 90%, enquanto a viabilidade da célula imobilizada diminuiu para menos do que 60%. As micrografias de elétron de varredura revelaram que células localizadas próximas à periferia da gota de gel têm sinais de origem múltiplos e uma morfologia regular, enquanto aquelas próximas ao núcleo da gota têm uma forma irregular e poucos sinais de origem, sugerindo crescimento concedido. As micrografias também sugerem que a levedura localizada próximas ao núcleo da gota estava mostrando sinais de envelhecimento. Conforme discutido na seção 5, o gel de kappa-carrageenan tem muitas características que o tornam uma matriz de imobilização de levedura desejável. Contudo, não existe atualmente método disponível para manuseio da gota, e, devido a levedura ser presa na matriz como parte do processo de produção de gota, o manuseio da gota em uma planta comercial aumenta a complexidade e custo. Outros métodos de imobilização, tais como auto-agregação ou floculação, devem ser explorados no futuro. Isto eliminaria a complexidade do manuseio da gota em ambiente de instalação, e, se os flocos de levedura fossem rompidos em uma base regular, pode-se assegurar que as células envelhecidas são regularmente removidas a partir do bioreator.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de álcoois potáveis, **caracterizado** pelo fato de que:

5 a) um bioreator de elevação de gás utilizando circulação interna é utilizado para executar um estágio de fermentação contínua, onde mosto contendo açucares fermentáveis é inicialmente fermentado usando células de levedura flocosa, imobilizadas por auto-agregação em um suprimento de oxigênio restrito; e

b) a descarga parcialmente fermentada do processo contínuo é fornecida a um estágio de processamento de dosagem para acabamento.

10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o álcool potável é uma cerveja.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a cerveja é uma cerveja estilo clara.

15 4. Processo de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a cerveja é lager.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a referida cerveja é do estilo norte-americano.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a levedura é uma levedura altamente flocosa ou super flocosa.

20 7. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a fermentação é uma fermentação primária.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o mosto é purgado com dióxido de carbono antes da fermentação.

25 9. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o reator usa aspensão de gás dióxido de carbono contendo cerca de 3% de oxigênio.

10. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a complementação da fermentação primária é a dita executada no estágio de retenção de dosagem.

30 11. Processo de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a redução de concentração de diacetil é efetuada.

12. Processo de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a redução de concentração de acetaldeído é efetuada.

35 13. Processo de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de álcoois fusel permanece não afetada pelo estágio de processamento de retenção de dosagem.

14. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a descarga do estágio de fermentação contínua é distribuída através de uma tubulação a um de uma pluralidade de vasos de retenção de dosagem, onde o referido processo de retenção de dosagem ocorre.

5 15. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o processo contínuo é um processo para fermentação de dosagem subsequente de passo no estágio de retenção de dosagem.

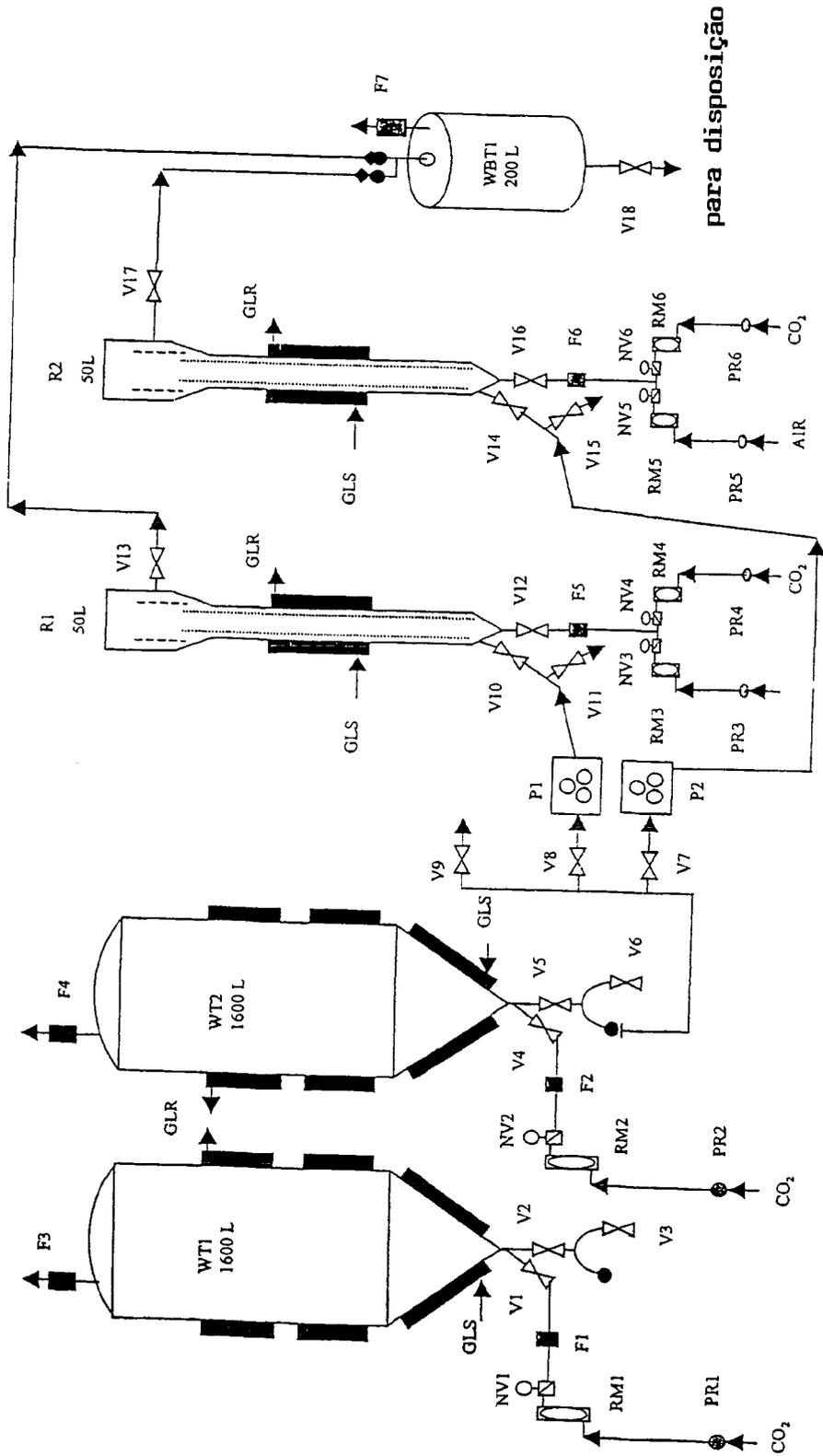


FIG. 1

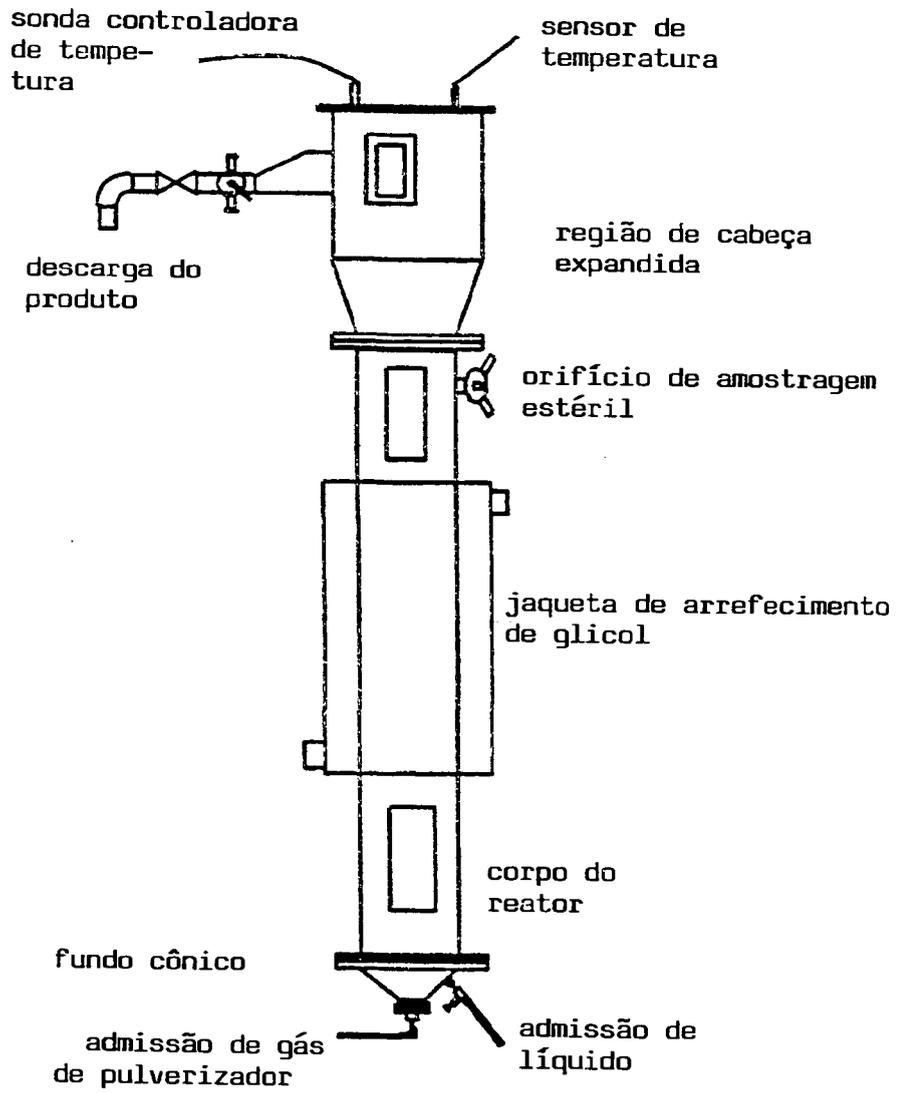


FIG. 2

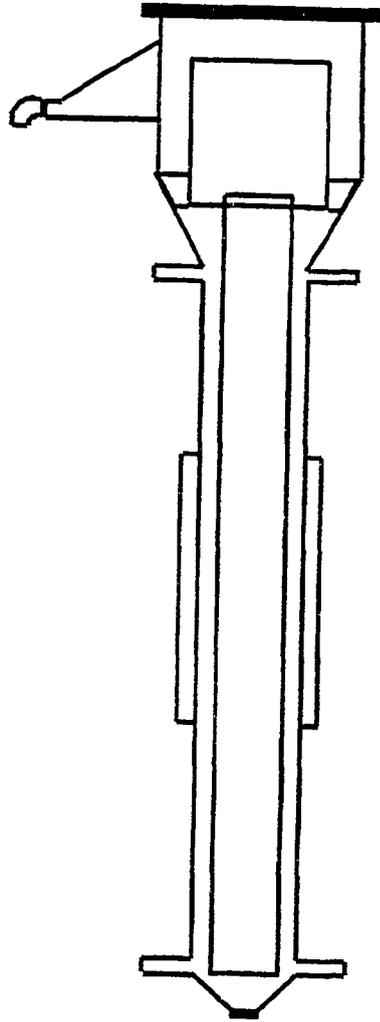


FIG. 3

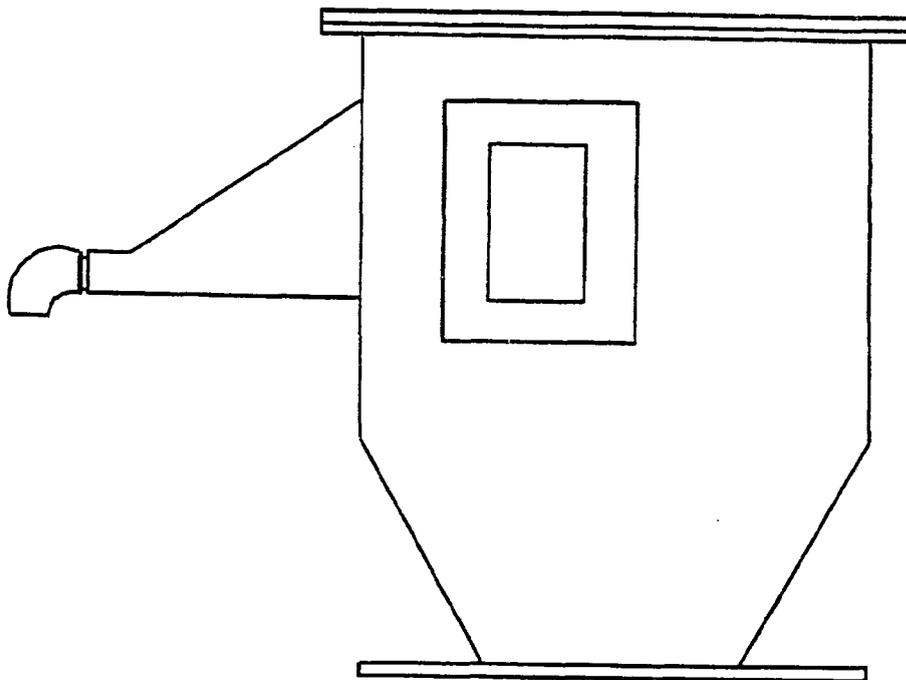


FIG. 4

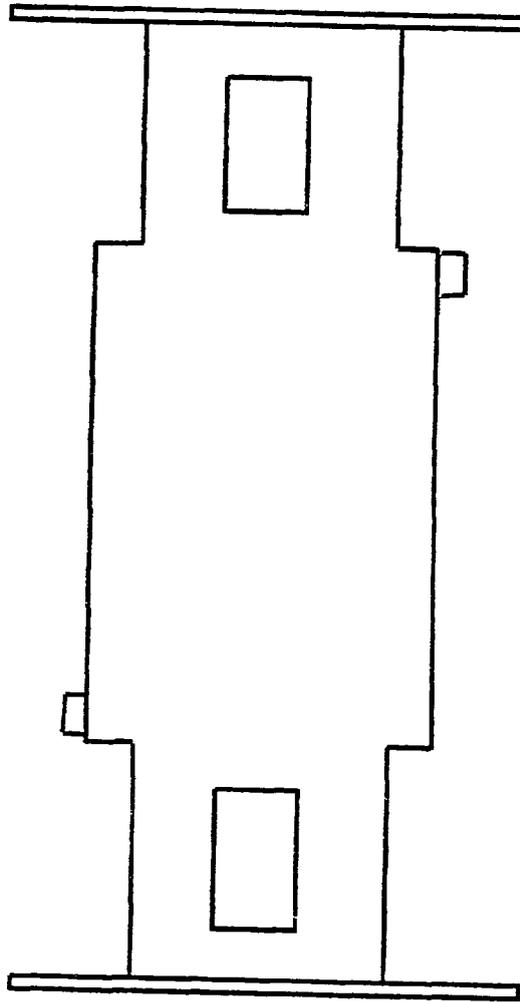


FIG. 5

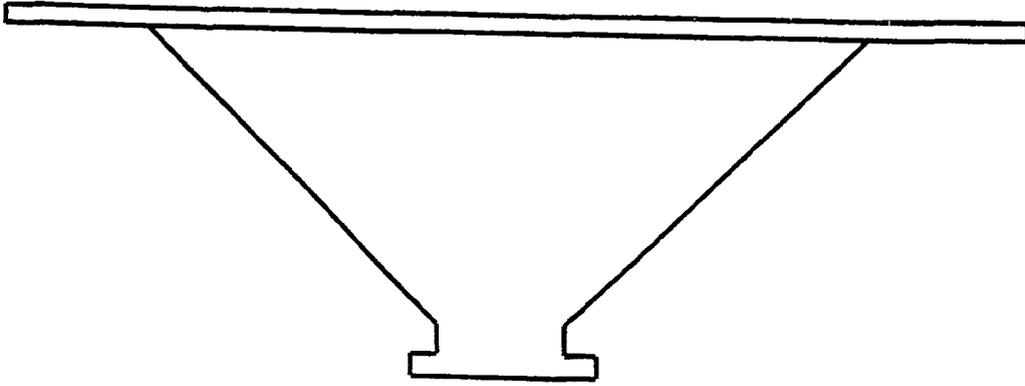


FIG. 6

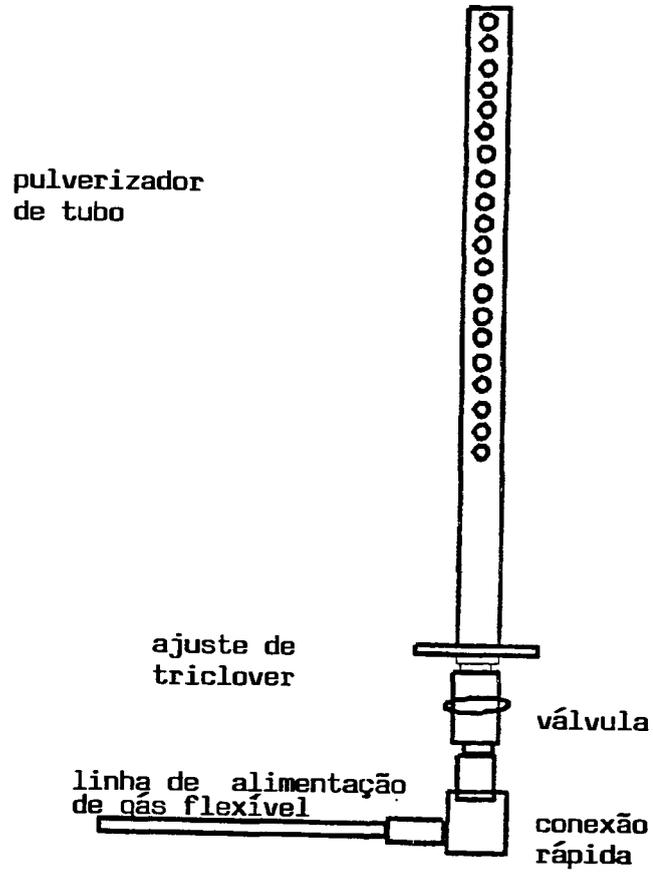


FIG. 7

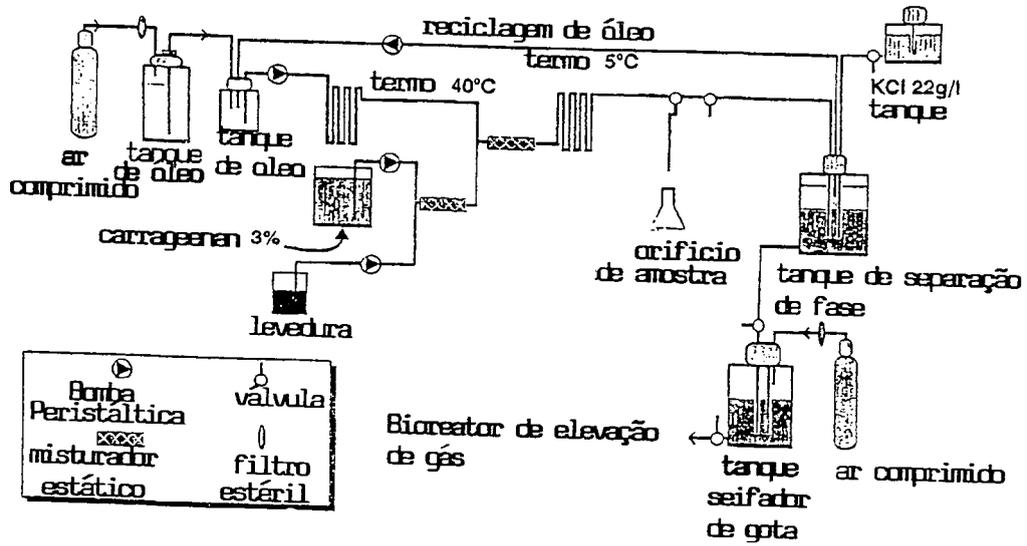


FIG. 8

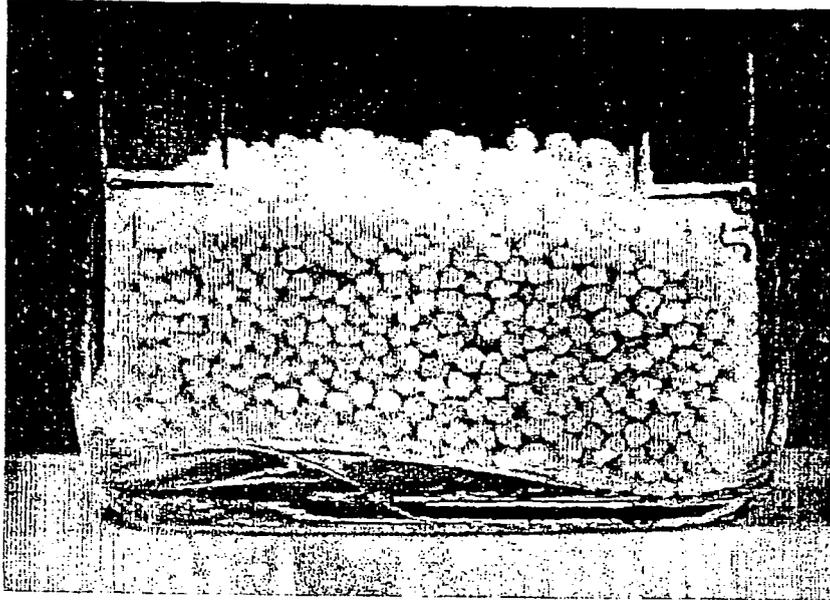


FIG. 9

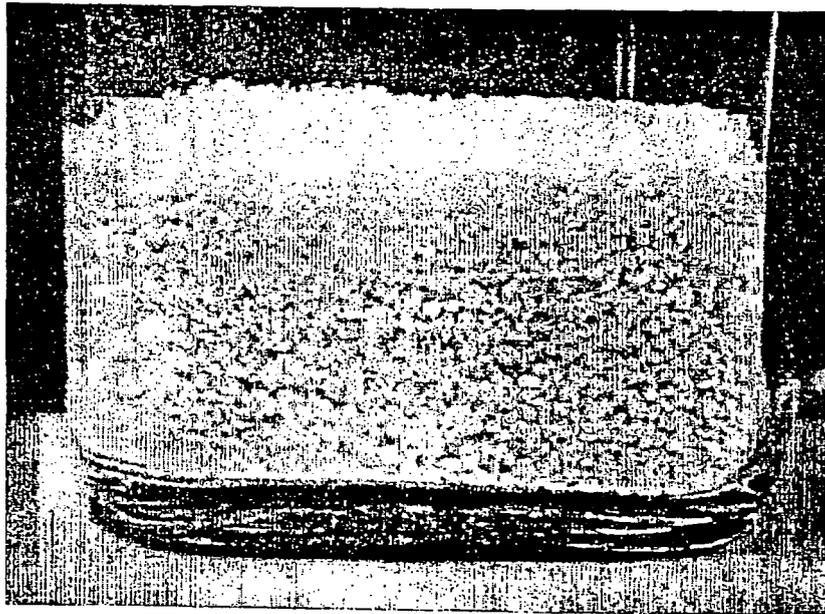


FIG. 10

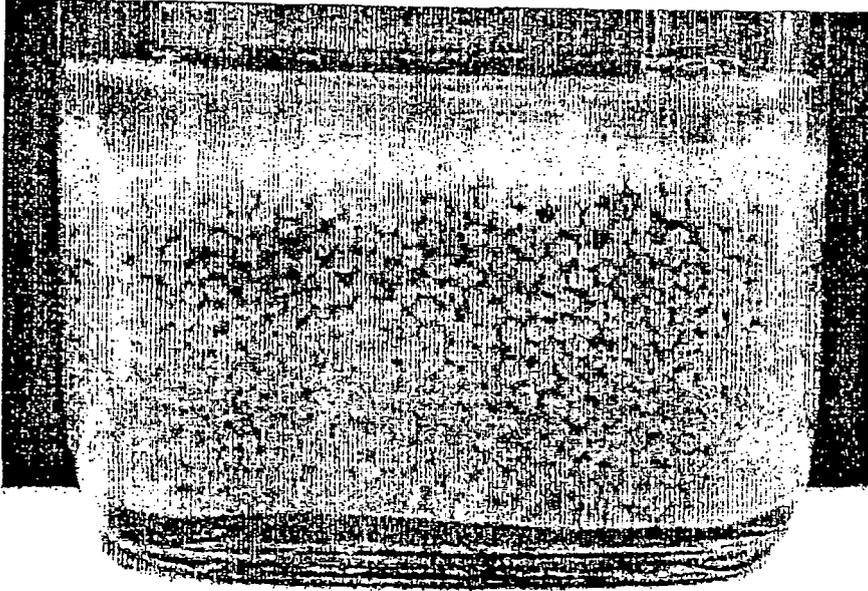


FIG. 11

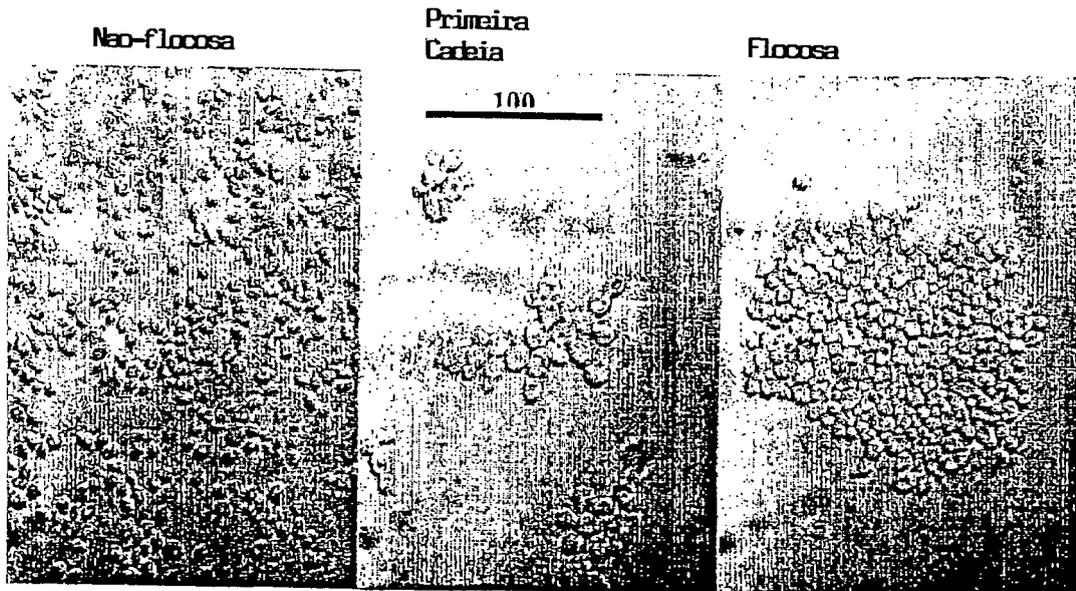
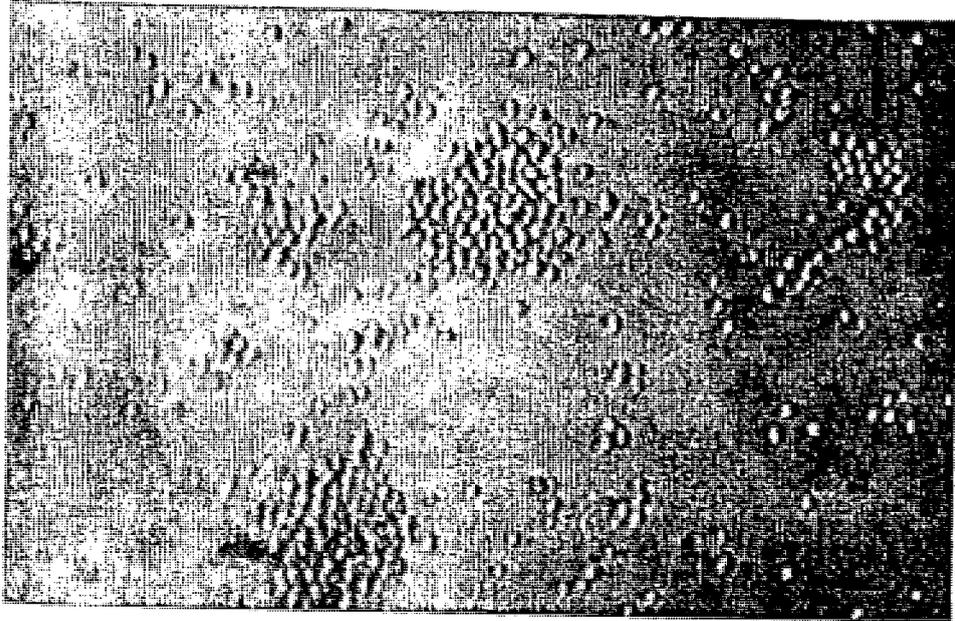
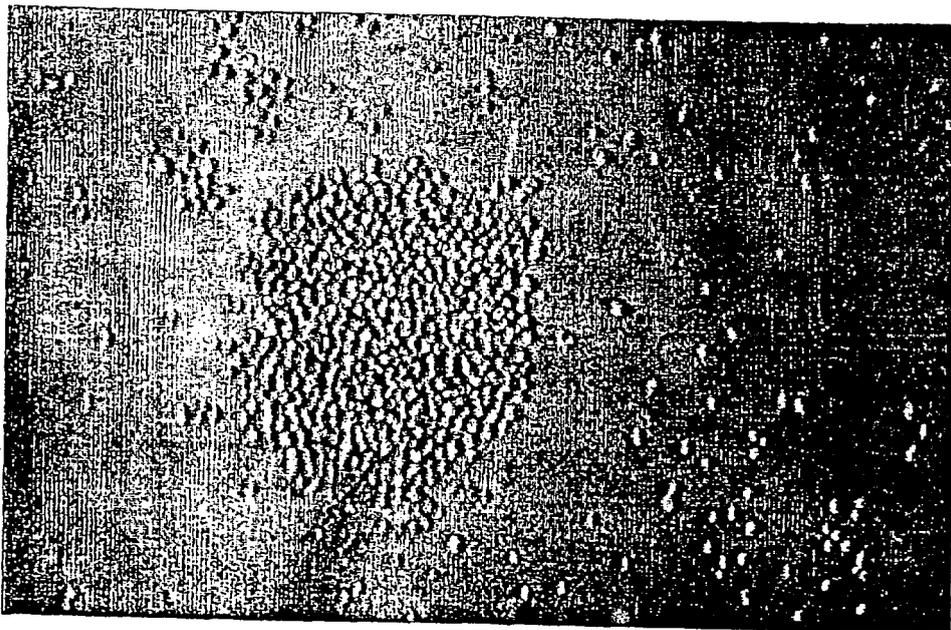


FIG. 12



250 μm

FIG. 13



250 μm

FIG. 14

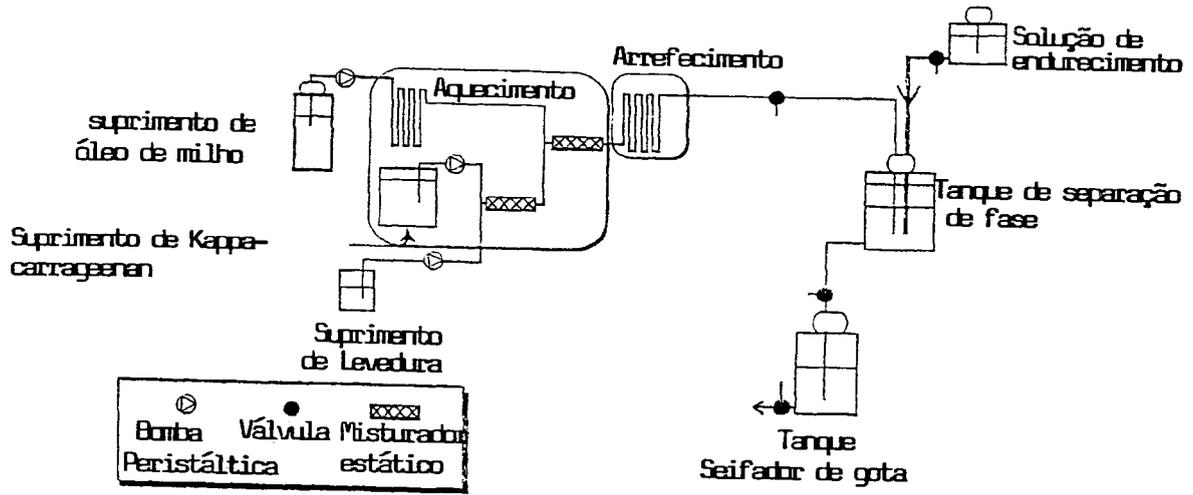


FIG. 15

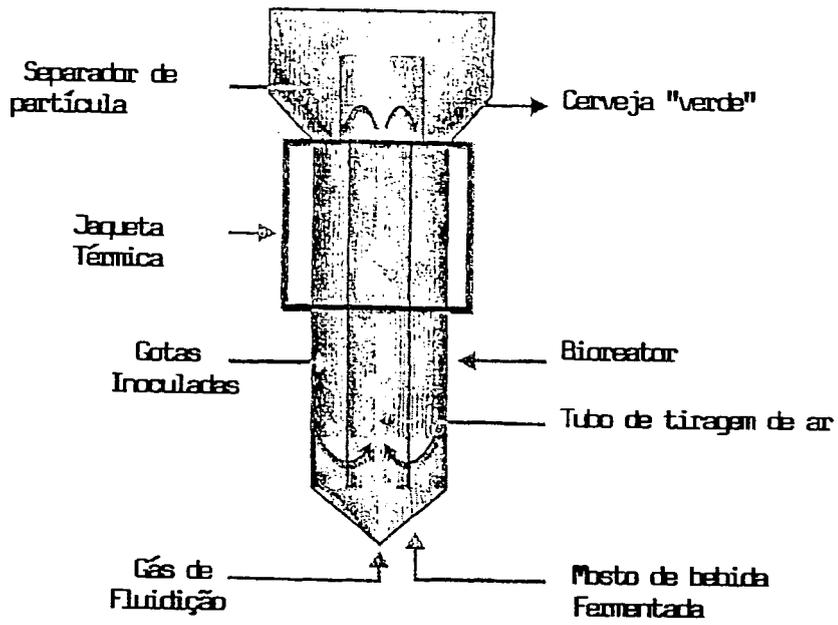
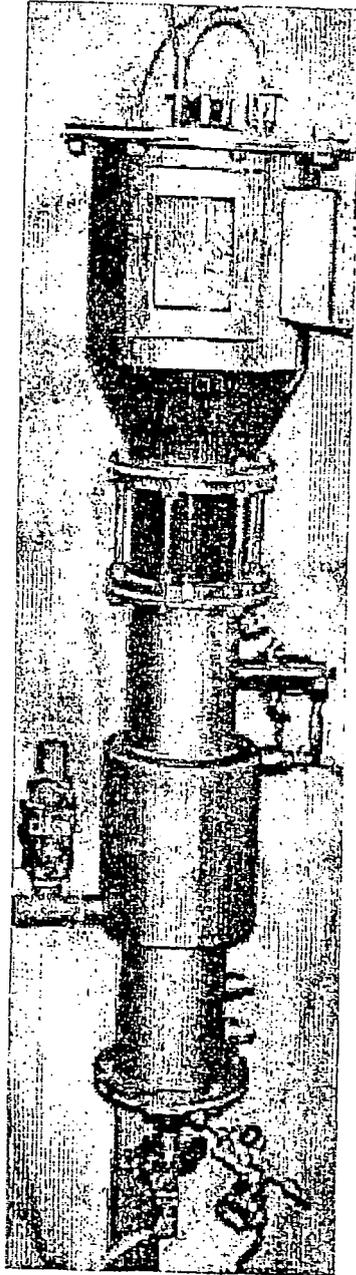


FIG. 16



5 cm

FIG. 17

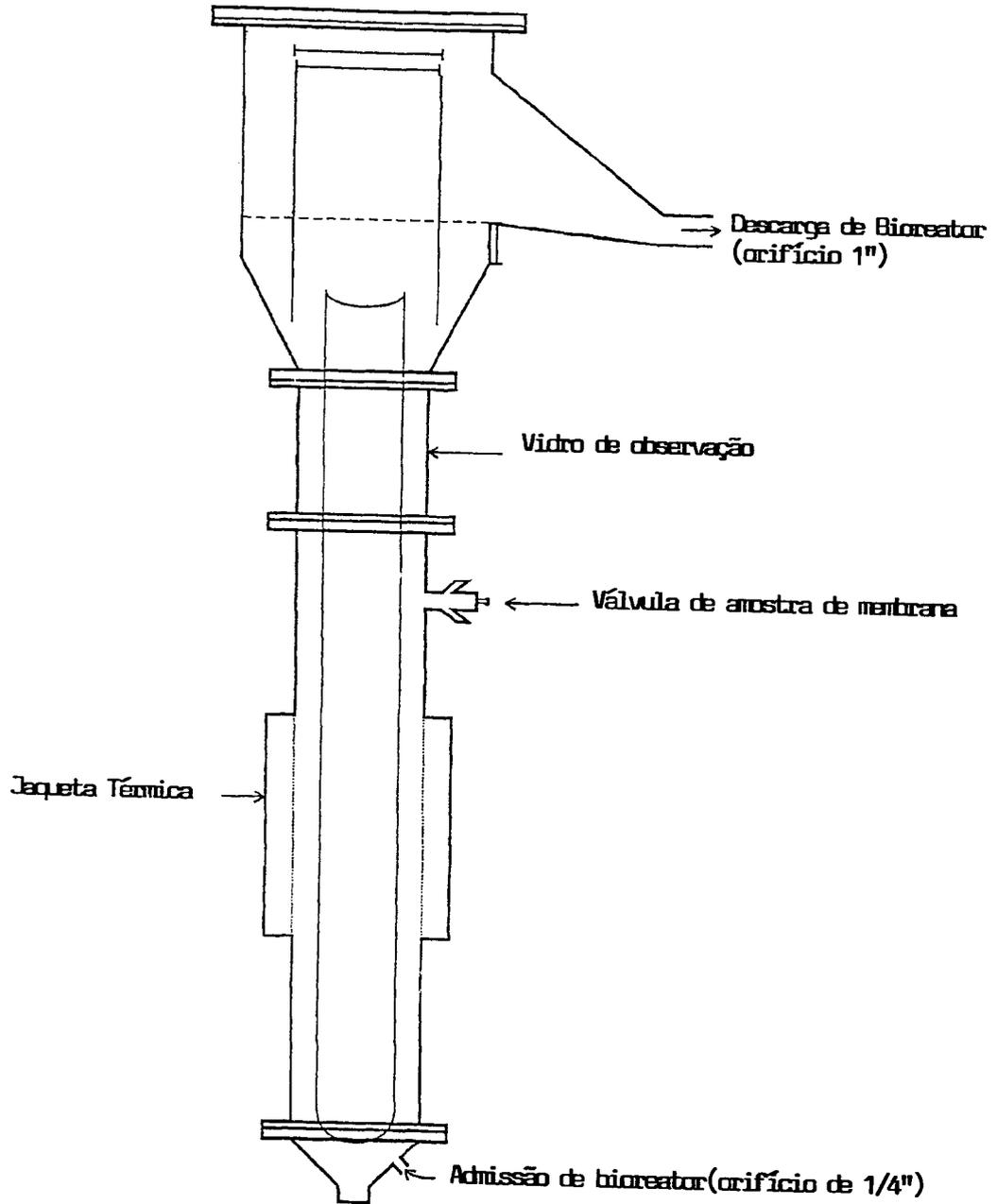


FIG. 18

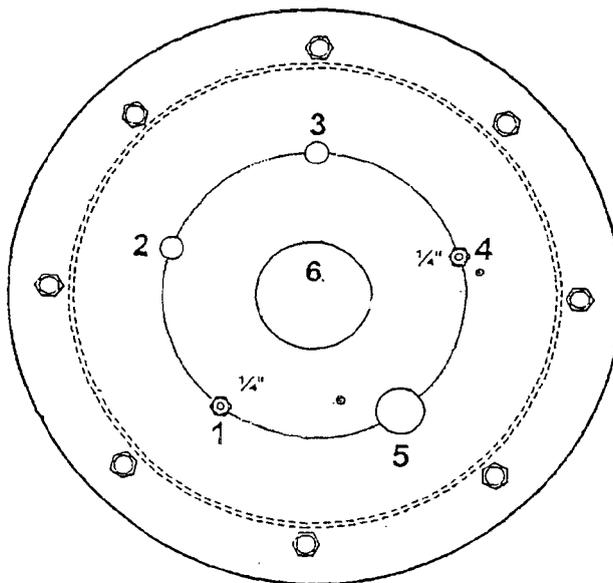


FIG. 19

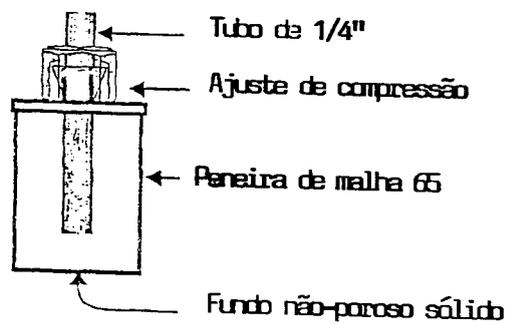


FIG. 20

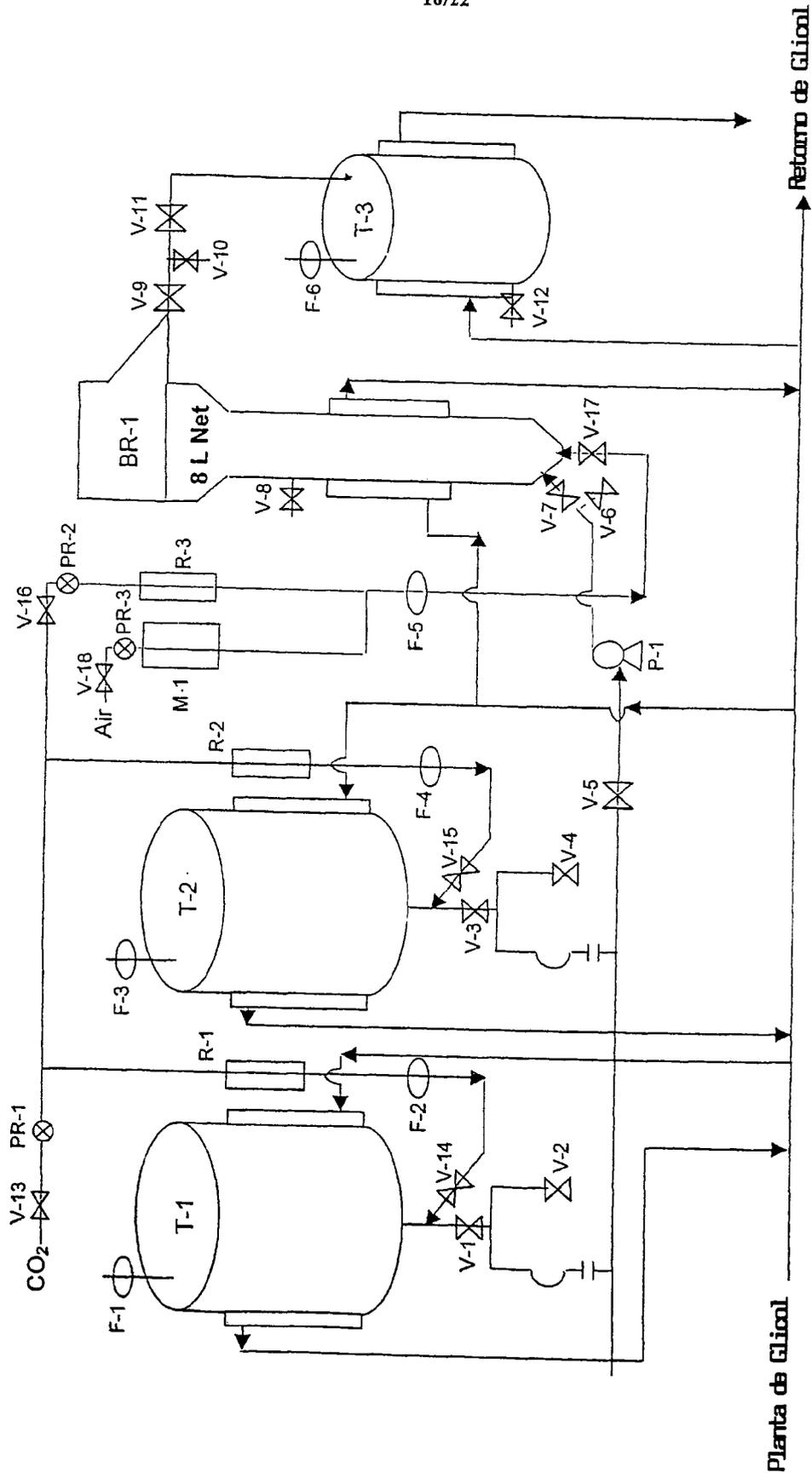


FIG. 21

Planta de Glicol

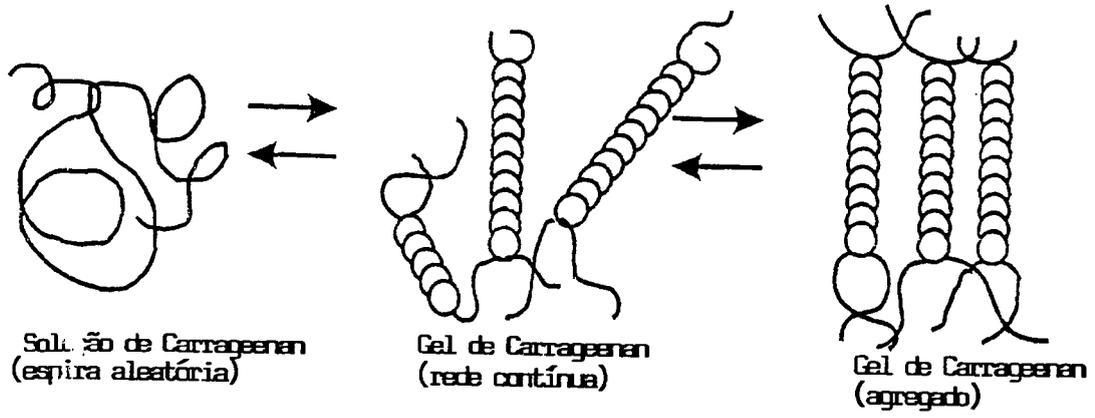


FIG. 22

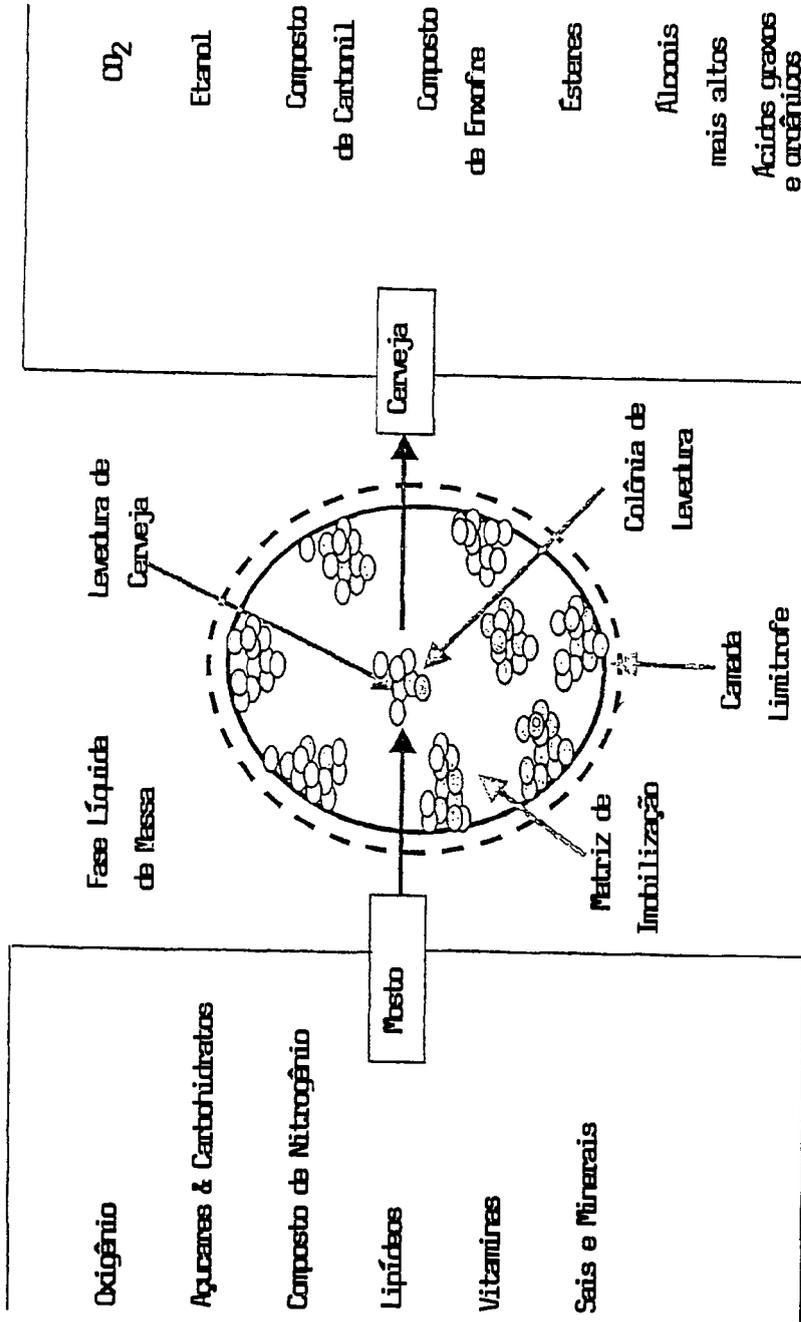


FIG. 23

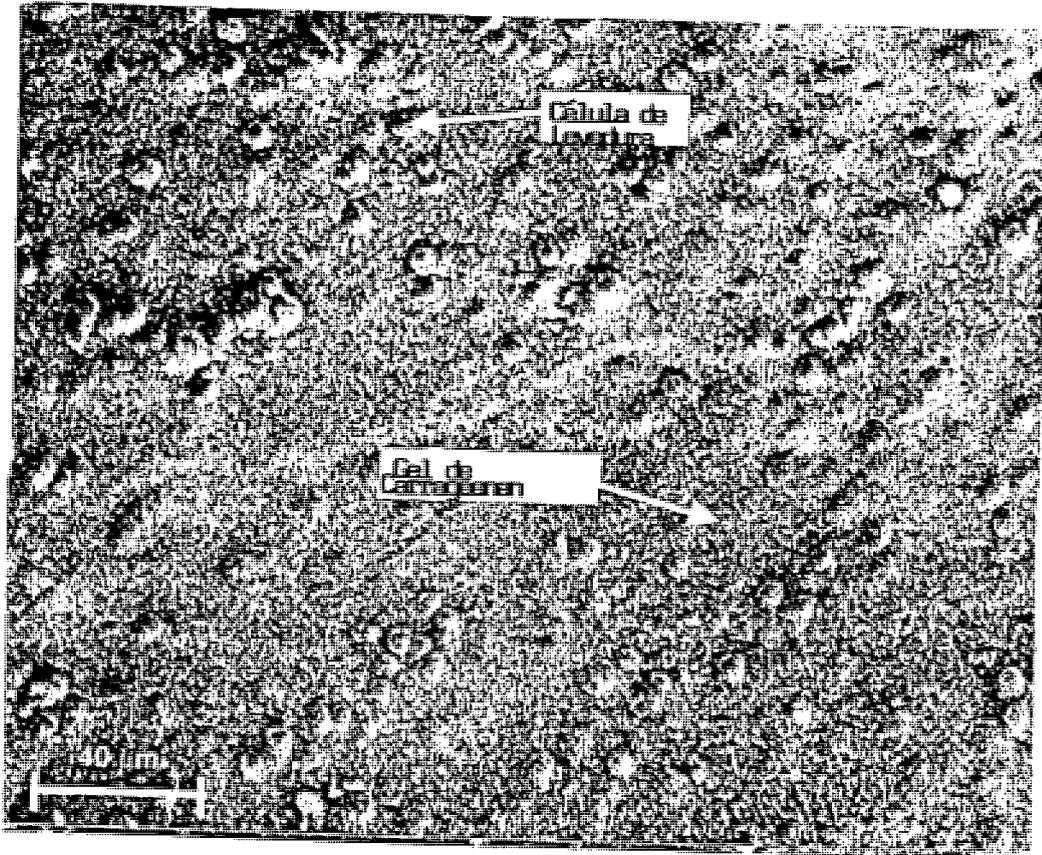


FIG. 24

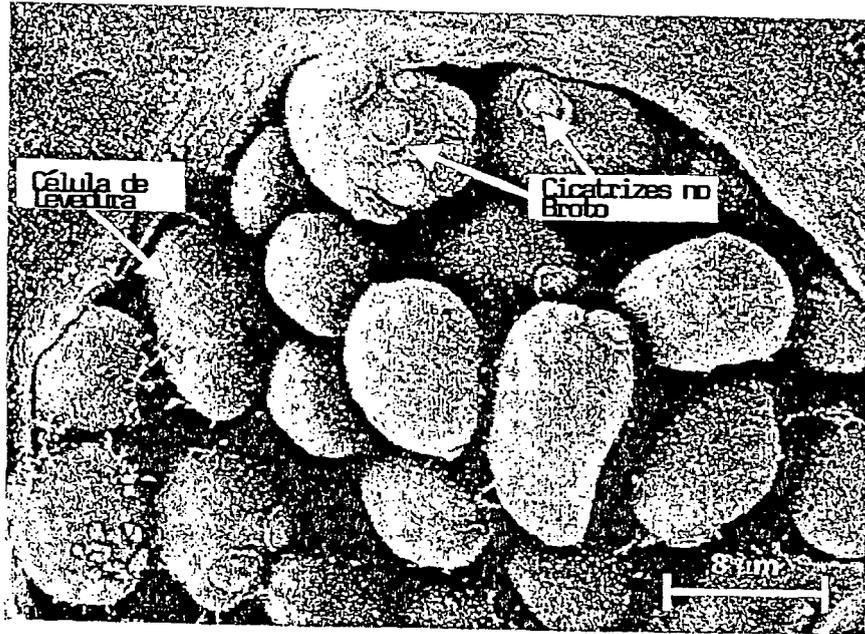


FIG. 25

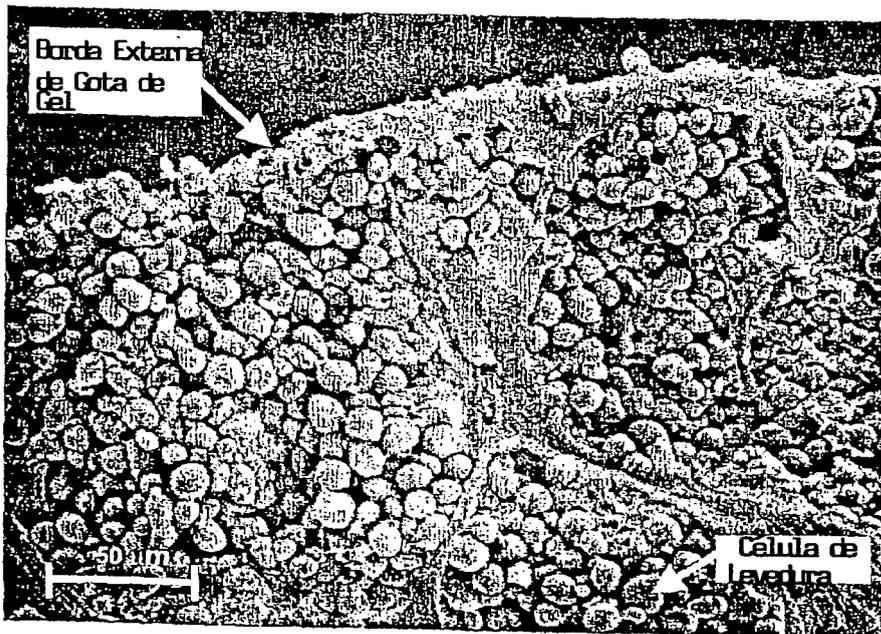


FIG. 26

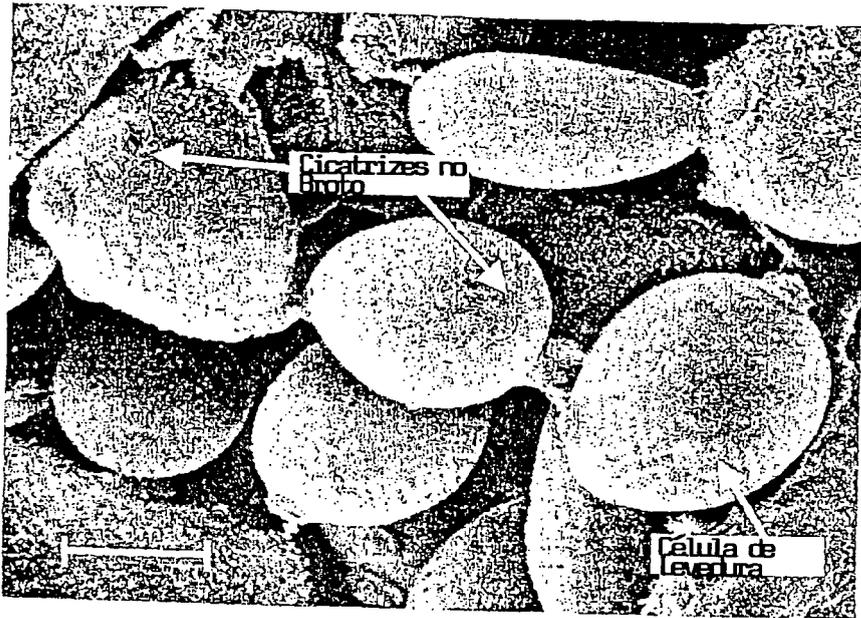


FIG. 27

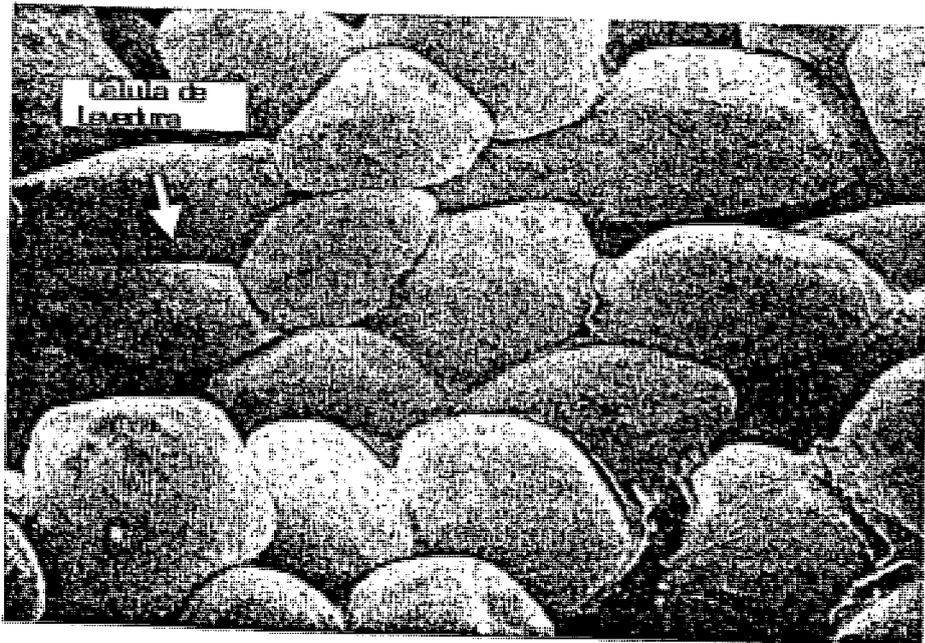


FIG. 28

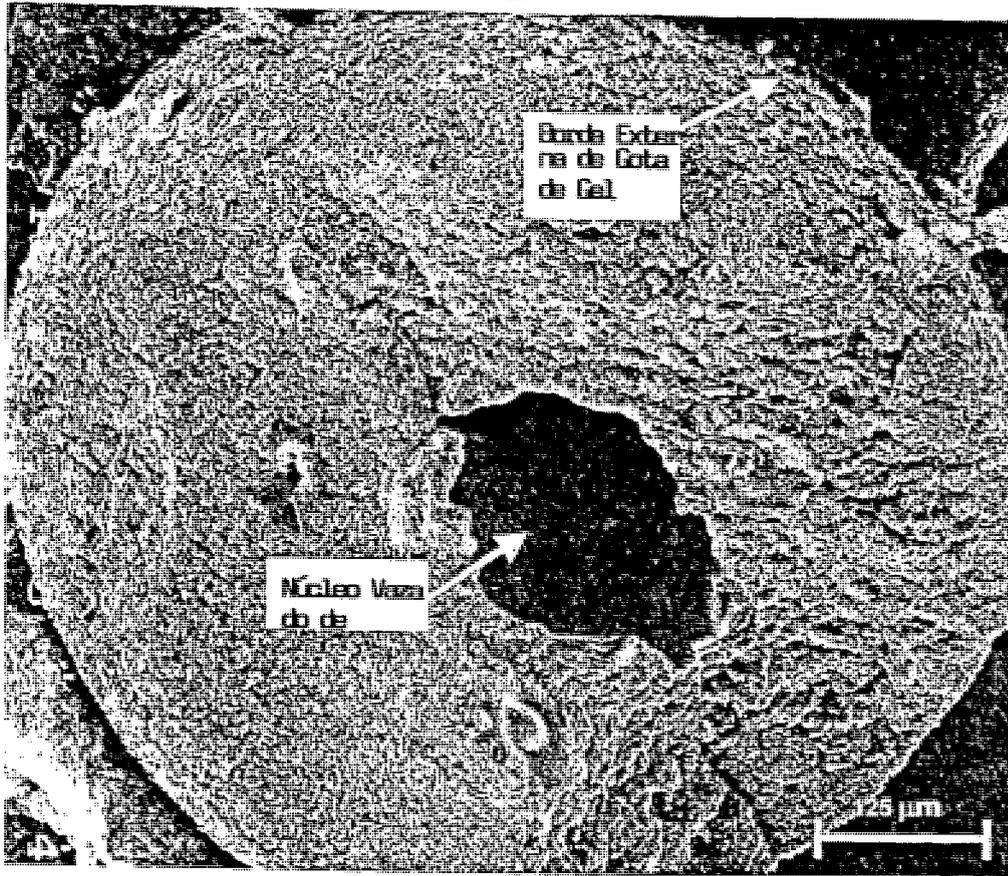


FIG. 29

RESUMO

Patente de Invenção para “**COMBINAÇÃO DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA/INTERMITENTE**”.

- 5 Na produção de álcoois potáveis, um estágio de fermentação contínua é empregado para prover e/ou fermentar inicialmente açúcares fermentáveis contendo mosto. Um estágio contínuo exemplar envolve o uso de bioreator de elevação de gás empregando levedura super-flocosa e controle de oxigênio estrito.
- 10 O estágio contínuo pode, em seguida, ser seguido pelo envio de uma descarga pelo menos parcialmente fermentada a partir do processo contínuo distribuída para um estágio de processamento intermitente para acabamento.