

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**INFERÊNCIA DE VARIÁVEIS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO
DE PENICILINA G ACILASE POR *Bacillus megaterium*
ATCC 14945**

Rosineide Gomes da Silva

São Carlos - SP

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**INFERÊNCIA DE VARIÁVEIS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO
DE PENICILINA G ACILASE POR *Bacillus megaterium*
ATCC 14945**

Rosineide Gomes da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

Co-orientador:

Profª. Dr. Raquel de Lima Camargo Giordano

São Carlos - SP

2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586ti

Silva, Rosineide Gomes da.

Inferência de variáveis do processo de produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC-14945 / Rosineide Gomes da Silva . -- São Carlos : UFSCar, 2003. 238 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Engenharia bioquímica. 2. Técnicas de inferência. 3. Penicilina G Acilase. 4. Modelagem matemática. 5. Redes neurais. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ROSINEIDE GOMES DA SILVA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE JUNHO DE 2003.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano
PPG-EQ/UFSCar (Orientador)

Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano
PPG-EQ/UFSCar (Co-orientador)

Profa. Dra. Liliane Maria Ferrarezo Lona
FEQ-UNICAMP

Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella
IPT-SP

Prof. Dr. Ossamu Hojo
Depto. Tecnologia – Instituto de Química UNESP

Profa. Teresa Cristina Zangirolami
PPG-EQ/UFSCar

Com todo amor:

*A minha querida mãe
Alzira Ferreira da Silva (in memoriam)*

*Ao marido mais que especial
Antonio José Gonçalves da Cruz*

Agradecimentos

Aos professores Roberto de Campos Giordano e Raquel de Lima Camargo Giordano pela amizade, estímulo e orientação dedicados ao longo desta trajetória os quais tornaram possível a elaboração e a conclusão deste trabalho.

Ao professor e marido Antonio José Gonçalves da Cruz por sua grande colaboração, valiosas dicas de programação e principalmente por sua compreensão e paciência.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSCar que participaram dos seminários e discussões realizados ao longo deste período.

A todos os colegas de laboratório que com vontade e perseverança ajudaram nos ensaios de fermentação entre eles Edson, Vanessa, Laura e Álvaro.

Aos demais colegas de pós-graduação pelo trabalho, amizade e momentos de descontração, em especial Célia e Charles, Marcelo Viana e Angélica, Renata, Andrea, Paulo Waldir, Marcelo Ribeiro, Anny, Laura, Rui, Edson e Vanessa. VALEU GALERA!!!

Ao casal Célia e Charles pela amizade.

Aos colegas Tony, Charles e Gilson pela colaboração e ajuda nos algoritmos.

Aos meus irmãos e irmãs e queridos sobrinhos Matheus, Thaís e Gabriel por simplesmente fazerem parte da minha vida.

A toda família e queridos agregados que sempre torceram pelo sucesso deste trabalho.

As amigas Mônica, Elizabete, Roseli, Mariângela, Celma, Nice e Ana Lúcia que mesmo distante me fazem acreditar que amizade verdadeira existe.

Aos técnicos de laboratório Francisco (“Espanhol”) e Amadeus, pela colaboração na execução de análises.

A FAPESP pelo apoio financeiro e ao DEQ/UFSCar pela infra estrutura, os quais tornaram possível a realização deste trabalho.

Resumo

A grande importância da enzima penicilina G acilase (E.C.3.5.1.11), usada para a produção dos ácidos 6-aminopenicilânico (6-APA) e 7-aminocefalosporânico (7-ACA), compostos-chave na produção industrial de antibióticos β -lactâmicos, foi a principal motivação deste trabalho. Através de realização de experimentos de produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em reator convencional, utilizando sistema de aquisição de dados, foi possível monitorar em tempo real variáveis como, por exemplo, fração molar de oxigênio e dióxido de carbono nos gases de saída, pH, oxigênio dissolvido.

Foram realizados cultivos em batelada e batelada alimentada tendo como substratos limitantes tanto caseína hidrolisada enzimaticamente como aminoácidos livres. Obtiveram-se informações relacionadas ao tempo de cultivo, à estocagem do microrganismo e à adição e exclusão de nutrientes. Fontes usuais de carbono, como glicose, lactose e glicerol, quando utilizadas, promoviam o crescimento da massa celular sem, no entanto, aumentar a produção de PGA. O uso de aminoácidos como principal substrato elevou em 2,5 vezes a produtividade. Observou-se, ainda, que a adição de ácido fenilacético (AFA) desde o início do cultivo não inibiu o crescimento do microrganismo.

As informações experimentais permitiram a proposição e validação de três modelos cinéticos não-estruturados deste processo, com um ou mais substrato(s) limitante(s). Como essas propostas se mostraram demasiadamente simplificadas, optou-se pelo uso de redes neurais como sensores baseados em “software”, já que não se chegou a um modelo fenomenológico satisfatório.

Para implementação do algoritmo de inferência baseado em rede neural, mostrou-se necessário filtrar os ruídos das medidas provenientes do sistema de aquisição de forma a minimizar erros aleatórios da instrumentação. Propõe-se para isso filtro que utiliza redes recorrentes, combinadas a média móvel. As variáveis filtradas foram utilizadas numa segunda rede de identificação de padrões, que dividia o cultivo nas três principais fases do crescimento microbiano. O principal objetivo desta foi identificar a fase de crescimento exponencial, que seria a enfocada pelo algoritmo de inferência. Para essa inferência, com base nas variáveis medidas em tempo real,

treinaram-se redes com várias topologias e entradas, de modo a escolher as variáveis que possibilitassem o aprendizado dos aspectos essenciais da dinâmica do processo.

Por fim, a concentração de produto (atividade de PGA no meio de cultura) foi estimada através de enfoque híbrido, usando a velocidade de crescimento inferida por rede “feedforward”, acoplada ao fator de rendimento célula-produto estimado no ajuste dos modelos não-estruturados. Outra informação importante utilizada neste último algoritmo foi o fato da produção ser associada ao crescimento, mas com atraso de 2h. Novamente, os resultados quantitativos do algoritmo de inferência do produto foram muito satisfatórios.

Abstract

The enzyme penicillin G acylase (E.C.3.5.1.11) is used in the production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and 7-aminocephalosporinic acid (7-ACA), which are key intermediates for the production of β -lactam antibiotics. Its industrial importance was one of the motivations for this thesis. On-line measurement and monitoring of cultivations of *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in a agitated and aerated bioreactor allowed the acquisition of variables such as mol fraction of CO₂ and O₂ in the exhaust gases, pH, dissolved oxygen.

Batch and fed-batch runs, using either enzymatically hydrolyzed casein or a pool of free amino acids provided information concerning the extend of the cultivation, preservation of the microorganism and addition/exclusion of nutrients. Usual carbon sources as glucose, fructose and glycerol increased the cellular mass, but did not improve the productivity of PGA. The use of amino acids resulted in a 2.5-fold increase of productivity. Adding phenyl acetic acid at the beginning of the experiments did not inhibit cell growth.

Three non-structured models of microbial growth were put forth, assuming one, two and three limiting substrates. However, these models were too simple for our purposes. Another approach was then followed, using neural networks (NN) as softensors. Before implementing the inference algorithm, the blank noise of the instrumentation had to be reduced. A non-conventional filter was developed, combining a recursive NN, a moving average and a second recursive NN. The smoothed variables were the input for a second NN, for pattern recognition, which classified the run in one of the main growth phases: lag, exponential and stationary. The main purpose of this NN was to identify the exponential phase, which would be the domain of the next NN, a multilayer perceptron (MLP) for inference of the cellular mass. Several NN, with different topologies, were tested for this purpose.

Finally, the product concentration (PGA activity in the medium) was estimated through a hybrid approach, using the growth rate inferred by the MLP NN, coupled to the cell-product yield, obtained from the fitting of the non-structured models. Another important information for this last algorithm was the knowledge that production of PGA was growth-associated, but with a 2hr-delay. The algorithm for inference was robust and accurate.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1: Representação esquemática da interação da Biotecnologia Industrial com outros ramos do conhecimento, Schmidell <i>et al.</i> , 2001. | 2 |
| Figura 2.1: Estrutura química do 6-APA | 8 |
| Figura 2.2: Algumas penicilinas naturais. Ao núcleo básico ligam-se diferentes cadeias laterais que conferem propriedades especiais (Fonseca, 1992). | 8 |
| Figura 2.3: Algumas penicilinas semi-sintéticas (Hojo, 1997). | 9 |
| Figura 2.4: Hidrólise enzimática da penicilina G. | 11 |
| Figura 2.5: Neurônio genérico (adaptado de Anderson, 1995). | 20 |
| Figura 2.6: Idealização dos neurônios em redes neurais (adaptado de Hilton, 1992). | 21 |
| Figura 2.7: Estruturas de redes neurais. | 24 |
| Figura 2.8: Função de ativação sigmoidal. | 27 |
| Figura 2.9: Modelo de modelo neural híbrido. A rede estima os parâmetros do processo P , que são usados como entrada para as equações de balanço (Psichogios e Ungar, 1992). | 30 |
| Figura 2.10: Ilustração de uma generalização boa e ruim de uma rede neural treinada (adaptado de Baughman e Liu, 1995). | 30 |
| Figura 2.11: Desenho esquemático das três diferentes estratégias na hidrólise da PenG. (a) caixa-branca, (b) caixa-preta e (c) caixa-cinza (VanCan <i>et al.</i> , 1997). | 35 |
| Figura 2.12: (a) Rede neural caixa preta e (b) modelo híbrido para estimar as variáveis de estado da fermentação de <i>Zymomonas mobilis</i> CP4, dados o tempo presente e as condições operacionais do processo (adaptado de Shene <i>et al.</i> , 1999). | 36 |
| Figura 2.13: Curva de crescimento típico para cultivo de células em batelada (adaptado de Blanch e Clark, 1997). | 44 |
| Figura 2.14: Perfis de concentração do microrganismo (X), do substrato (S) e do produto (P) para os três tipos de formação do produto. (1) cinética associada ao crescimento, (2) cinética mista, (3) cinética não associada ao crescimento. | 53 |
| Figura 3.1: Procedimento para o preparo dos criotubos | 66 |
| Figura 3.2: Esquema do aparato experimental com o sistema de aquisição de dados. | 69 |
| Figura 3.3: CLP da GE Fanuc Automation, modelo 90 TM -30 | 70 |
| Figura 3.4: Tela de inicialização implementada no sistema supervisorio. | 72 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3.5: Tela de processo implementada no sistema supervisório. | 73 |
| Figura 3.6: Tela de engenharia implementada no sistema supervisório. | 73 |
| Figura 3.7: Tela de gráficos implementada no sistema supervisório. | 74 |
| Figura 3.8: Desenho esquemático da nova arquitetura do sistema de aquisição de dados montada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (DEQ/UFSCar), ilustrando a rede "Intranet" local implementada, à qual encontram-se conectados: CLP, servidor e segundo microcomputador. | 75 |
| Figura 3.9: Esquema do aparato experimental ilustrando os novos equipamentos adicionados ao sistema: bomba peristáltica; "Hub"; microcomputador tipo PC (onde roda programa FORTRAN, acoplado ou não como dll a programa em Visual Basic). | 76 |
| Figura 4.1: Procedimento experimental utilizado nos ensaios de produção de PGA. | 79 |
| Figura 4.2: Procedimento experimental utilizado nos ensaios de verificação da pureza da cultura. | 81 |
| Figura 4.3: Placas após o aparecimento de colônias em ordem crescente para as três diluições. | 81 |
| Figura 4.4: Foto da placa de petri após o surgimento das colônias A e B. | 82 |
| Figura 4.5: Métodos de conservação do microrganismo, utilizados nos ensaios 9-12. | 85 |
| Figura 4.6: Procedimento experimental dos ensaios utilizando criotubos. | 88 |
| Figura 4.7: Esquema dos ensaios refeitos com a adição de sais no meio de produção. | 90 |
| Figura 4.8: Procedimento experimental para verificação da quantidade de esporos e tempo de germinação. | 92 |
| Figura 4.9: Procedimento experimental para padronização do meio de crescimento. | 95 |
| Figura 4.10: Esquema dos meios sintéticos utilizados nos ensaios de produção de PGA. | 98 |
| Figura 4.11: Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , anotados a cada retirada de amostra. | 110 |
| Figura 4.12: Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 112 |
| Figura 4.13: Fração molar de CO ₂ e O ₂ nos gases de saída do processo, ensaio 1. | 113 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.14: Resultados experimentais do segundo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 115 |
| Figura 4.15: Dados experimentais do oxigênio dissolvido monitorados pelo sistema de aquisição de dados. (A) primeiro ensaio; (B) segundo ensaio. | 116 |
| Figura 4.16: Resultados experimentais do terceiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 118 |
| Figura 4.17: Dados experimentais de oxigênio dissolvido e agitação (3 ^o ensaio). | 120 |
| Figura 4.18: Resultados experimentais do quarto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 122 |
| Figura 4.19: Dados experimentais do oxigênio dissolvido e agitação (4 ^o ensaio). | 122 |
| Figura 4.20: Resultados experimentais do quinto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA obtidas em análises de laboratório; (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída; (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 125 |
| Figura 4.21: Dados experimentais do oxigênio dissolvido adquiridos pelo sistema de aquisição de dados (5 ^o ensaio). | 125 |
| Figura 4.22: Resultados experimentais do sexto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 129 |
| Figura 4.23: Concentração celular, atividade enzimática, pH e fração molar de CO ₂ | 129 |
| Figura 4.24: Concentração celular, atividade enzimática, fração molar de O ₂ e agitação. | 130 |
| Figura 4.25: Resultados experimentais do sétimo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA obtidas em análises de laboratório; (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída; (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 132 |
| Figura 4.26: Concentração celular, atividade enzimática, pH e fração molar de CO ₂ . | 132 |
| Figura 4.27: Oxigênio dissolvido, agitação, concentração celular e atividade enzimática. | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.28: Esquema dos meios contendo aminoácidos utilizados nos ensaios de produção de PGA. | 135 |
| Figura 4.29: Resultados experimentais do oitavo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 145 |
| Figura 4.30: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 8). | 147 |
| Figura 4.31: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 8). | 147 |
| Figura 4.32: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 8). | 148 |
| Figura 4.33: Resultados experimentais do nono ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 150 |
| Figura 4.34: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 9). | 152 |
| Figura 4.35: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 9). | 152 |
| Figura 4.36: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 9). | 153 |
| Figura 4.37: Resultados experimentais do décimo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 156 |
| Figura 4.38: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 10). | 157 |
| Figura 4.39: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 10). | 158 |
| Figura 4.40: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 10). | 158 |
| Figura 4.41: Resultados experimentais do décimo primeiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 161 |
| Figura 4.42: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 11). | 161 |
| Figura 4.43: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 11). | 162 |
| Figura 4.44: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 11). | 162 |
| Figura 4.45: Resultados experimentais do décimo segundo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e AFA (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 165 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.46: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 12). | 166 |
| Figura 4.47: Resultados experimentais do décimo terceiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório) e (B) pH do meio reacional. | 168 |
| Figura 4.48: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 13). | 168 |
| Figura 4.49: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 13). | 169 |
| Figura 4.50: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 13). | 169 |
| Figura 4.51: Resultados experimentais do décimo quarto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO ₂ nos gases de saída e (D) concentração de O ₂ , obtidos pelo sistema de aquisição de dados. | 172 |
| Figura 4.52: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 14). | 172 |
| Figura 4.53: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 14). | 173 |
| Figura 4.54: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 14). | 173 |
| Figura 4.55: Resultados experimentais do décimo quinto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório). (B) pH do meio reacional. | 175 |
| Figura 4.56: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 15). | 176 |
| Figura 4.57: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 15). | 177 |
| Figura 4.58: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 15). | 177 |
| Figura 4.59: Concentração celular de todos os ensaios em biorreator na primeira etapa. | 181 |
| Figura 4.60: Atividade enzimática de todos os ensaios em biorreator na primeira etapa. | 181 |
| Figura 4.61: Evolução do PH de todos os ensaios em biorreator. | 182 |
| Figura 4.62: Concentração celular de todos os ensaios em biorreator na segunda etapa. | 184 |
| Figura 4.63: Atividade enzimática de todos os ensaios em biorreator na segunda etapa. | 184 |
| Figura 4.64: pH de todos os ensaios em biorreator na segunda etapa. | 185 |
| Figura 5.1: Primeira hipótese, AFA + aminoácidos representando apenas um substrato. (A) ensaio 8, (B) ensaio 13, (C) ensaio 14 e (D) ensaio 15 (validação). | 191 |
| Figura 5.2: Segunda hipótese, AFA e aatotais representando dois substratos limitantes. (A) ensaio 8, (B) ensaio 13, (C) ensaio 14 e (D) ensaio 15 (validação). | 194 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.3: Terceira hipótese, aa+, aa- e AFA representando três substratos limitantes. (A) ensaio 8, (B) ensaio 13, (C) ensaio 14 e (D) ensaio 15 (validação). | 196 |
| Figura 5.4: Primeira hipótese, AFA + aminoácidos representando apenas um substrato. (A) ensaio 9, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11 (batelada alimentada). | 199 |
| Figura 5.5: Segunda hipótese, AFA e aatotais representando dois substratos limitantes. (A) ensaio 9, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11 (batelada alimentada). | 200 |
| Figura 5.6: Terceira hipótese, aa+, aa- e AFA representando três substratos limitantes. (A) ensaio 9, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11 (batelada alimentada). | 200 |
| Figura 6.1: (A) Rede neural autoassociativa de três camadas. (B) Determinação da taxa de compressão ótima (adaptado de Baughman e Liu, 1995). | 206 |
| Figura 6.2: Estruturas das redes testadas. (A) Rede neural autoassociativa “feedforward”(RAF) e (B) Rede recorrente externa (RRE). | 207 |
| Figura 6.3: Comparação do desempenho do filtro MM, da rede RRE e da rede RAF. (A) Desvio médio relativo e (B) Variância do desvio médio relativo. | 209 |
| Figura 6.4: Comparação do desempenho do filtro MM, da rede RRE e da rede RAF. (A) Desvio médio relativo e (B) Variância do desvio médio relativo. | 209 |
| Figura 6.5: Filtro RRE-MM-RRE. | 210 |
| Figura 6.6: Resultados da validação da rede RRE+MM+RRE para filtragem das variáveis (A) YCO ₂ , (B) velocidade de agitação do ensaio 9. | 210 |
| Figura 6.7: Resultados da validação da rede RRE+MM+RRE para filtragem da variável pH. | 211 |
| Figura 6.8: Resultados ampliados da validação da rede RRE+MM+RRE (A) YCO ₂ , (B) velocidade de agitação do ensaio 9. | 211 |
| Figura 6.9: Estrutura da rede de identificação de fases do cultivo de <i>B. megaterium</i> . | 212 |
| Figura 6.10: Resultado do treinamento da rede de identificação de fases de crescimento (A-ensaio 8 e B-ensaios 11, parte do conjunto de treinamento). Saída: 0 → fase lag; 1 → fase exponencial; 2 → fase estacionária. | 213 |
| Figura 6.11: Resultado da validação da rede de identificação de fases de crescimento (ensaio 9). Saída: 0 → fase lag; 1 → fase exponencial; 2 → fase estacionária. | 214 |
| Figura 6.12: Resultado da validação da rede de identificação (ensaio 14). Saída: 0 → fase lag; 1 → fase exponencial; 2 → fase estacionária. | 214 |
| Figura 6.13: Estrutura da rede de inferência. | 215 |
| Figura 6.14: Erro quadrado médio para os ensaio de treinamento e de validação (dados ruidosos). | 216 |

| | |
|--|-----|
| Figura 6.15: Resultado do treinamento para Nh=2. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11. | 217 |
| Figura 6.16: Resultado da validação para Nh=2. (A) ensaio 9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14. | 218 |
| Figura 6.17: Resultado do treinamento para Nh=10. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11. | 219 |
| Figura 6.18: Resultado da validação para Nh=10. (A) ensaio 9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14. | 220 |
| Figura 6.19: Erro quadrado médio para os ensaio de treinamento e de validação (dados de entrada filtrados). | 221 |
| Figura 6.20: Resultado do treinamento para a rede de inferência. (A) ensaio8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11. | 222 |
| Figura 6.21: Resultado da validação para a rede de inferência. (A) ensaio9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14. | 223 |
| Figura 6.22: Resultado da validação para a rede de inferência da fase exponencial. (A) ensaio9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14. | 224 |
| Figura 6.23: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11. | 225 |
| Figura 6.24: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática (equação 6.8). Concentração celular obtida por rede MLP (item 6.3.2). Vetor de entrada: tempo presente, Y_{CO_2} e velocidade de agitação (ambos no instante presente). Medidas filtradas pelo algoritmo RRE+MM+RRE. Início e término da inferência indicados pela rede de identificação de fases de crescimento. Dados do ensaio 9. | 226 |
| Figura 6.25: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática (equação 6.8). Concentração celular obtida por rede MLP (item 6.3.2). Vetor de entrada: tempo presente, Y_{CO_2} e velocidade de agitação (ambos no instante presente). Medidas filtradas pelo algoritmo RRE+MM+RRE. Início e término da inferência indicados pela rede de identificação de fases de crescimento. Dados do ensaio 12. | 226 |
| Figura 6.26: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática (equação 6.8). Concentração celular obtida por rede MLP (item 6.3.2). Vetor de entrada: tempo presente, Y_{CO_2} e velocidade de agitação (ambos no instante presente). Medidas filtradas pelo algoritmo RRE+MM+RRE. Início e término da inferência indicados pela rede de identificação de fases de crescimento. Dados do ensaio 14. | 227 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1: Algumas empresas que utilizam PGA imobilizada, e ses respectivos microrganismos produtores (Savidge, 1984). | 12 |
| Tabela 2.2: Comparação dos valores de Km da hidrólise de penicilina por penicilinas acilases (Savidge e Cole, 1975). | 12 |
| Tabela 2.3: Comparação das constantes cinéticas das penicilinas acilases produzidas por <i>E. coli</i> e <i>B. megaterium</i> . Os dados para <i>E. coli</i> foram obtidos a pH 8,0 e 37° C e para <i>B. megaterium</i> a pH 8,7 e 37° C (Savidge e Cole, 1975). | 13 |
| Tabela 3.1: Composição do meio sólido empregado para preservação do microrganismo. | 57 |
| Tabela 3.2: Composição dos meios empregados no preparo do inóculo. | 58 |
| Tabela 3.3: Composição do meio sólido utilizado nos ensaios de seleção. | 59 |
| Tabela 3.4: Composição dos meios de produção em câmara rotativa e biorreator. | 60 |
| Tabela 4.1: Ensaio de estabilidade que reproduziu condições operacionais de Pinotti, 1999. | 80 |
| Tabela 4.2: Ensaio original (num. 11) realizado por Pinotti, 1999. | 80 |
| Tabela 4.3: Produção de PGA utilizando as colônias A e B. | 30 |
| Tabela 4.4: Produção de PGA utilizando novo “slant” de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945. | 83 |
| Tabela 4.5: Produção de PGA utilizando soro de queijo líquido e em pó. | 84 |
| Tabela 4.6: Produção de PGA utilizando diferentes lotes de caseína e após prévia ativação do microrganismo. | 84 |
| Tabela 4.7: Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes lotes da mesma linhagem de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945. | 86 |
| Tabela 4.8: Parâmetros calculados a partir de dados obtidos na produção de PGA. | 87 |
| Tabela 4.9: Produção de PGA utilizando criotubos. | 89 |
| Tabela 4.10: Produção de PGA, <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 com adição de sais. | 90 |
| Tabela 4.11: Produção de PGA com 1,7 mL de esporos em 75mL de meio de germinação. | 93 |
| Tabela 4.12: Produção de PGA com 5,0 mL de esporos em 75mL de meio de germinação | 93 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 4.13: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945, utilizando o meio padrão para a etapa de produção, a partir de diferentes meios de crescimento. | 95 |
| Tabela 4.14: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945, utilizando o meio padrão para a etapa de produção, a partir de diferentes meios de crescimento. | 97 |
| Tabela 4.15: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 com diferentes meios de produção. | 99 |
| Tabela 4.16: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 com diferentes tempos de adição de AFA. | 101 |
| Tabela 4.17: Concentração celular e consumo de nutrientes após 24 horas de cultivo de <i>B. megaterium</i> com meios complexos na etapa de germinação. | 103 |
| Tabela 4.18: Produção de PGA utilizando diferentes meios complexos. | 104 |
| Tabela 4.19: Produção de PGA utilizando diferentes meios complexos. | 107 |
| Tabela 4.20: Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes meios complexos. | 108 |
| Tabela 4.21: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator.(1º ensaio) | 111 |
| Tabela 4.22: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (2º ensaio). | 114 |
| Tabela 4.23: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (3º ensaio). | 117 |
| Tabela 4.24: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (4º ensaio). | 121 |
| Tabela 4.25: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (5º ensaio). | 124 |
| Tabela 4.26: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (ensaio realizado em paralelo com o 5º ensaio no biorreator). | 126 |
| Tabela 4.27: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (6º ensaio). | 128 |
| Tabela 4.28: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (7º ensaio). | 131 |
| Tabela 4.29: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 em meios contendo aminoácidos. | 136 |
| Tabela 4.30: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 em meios contendo aminoácidos. | 137 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4.31: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 em meios contendo aminoácidos. | 138 |
| Tabela 4.32: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 em câmara rotativa: efeito da substituição do soro por seus componentes. | 139 |
| Tabela 4.33: Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 em câmara rotativa: efeito da substituição do soro por seus componentes. | 140 |
| Tabela 4.34: Condições operacionais adotadas no ensaio 8 (ensaio batelada - novo padrão). | 143 |
| Tabela 4.35: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (8º ensaio). | 144 |
| Tabela 4.36: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (8º ensaio). | 144 |
| Tabela 4.37: Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 8. | 146 |
| Tabela 4.38: Condições operacionais adotadas no ensaio 9 (batelada alimentada). Meio suplementar com aminoácidos (40g/L) a uma vazão de alimentação de 1,76mL/mim iniciada após 8 horas de cultivo. | 149 |
| Tabela 4.39: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (9º ensaio – batelada alimentada). | 149 |
| Tabela 4.40: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (9º ensaio). | 150 |
| Tabela 4.41: Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 9 (batelada alimentada). | 151 |
| Tabela 4.42: Condições operacionais adotadas no ensaio 10 (batelada alimentada). Meio suplementar com aminoácidos baseado na velocidade de consumo (40g/L) a uma vazão de alimentação de 1,76mL/mim iniciada após 5 horas de cultivo. | 154 |
| Tabela 4.43: Concentração de aminoácidos no meio inicial e no meio suplementar. | 154 |
| Tabela 4.44: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (10º ensaio – batelada alimentada). | 155 |
| Tabela 4.45: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (10º ensaio). | 155 |
| Tabela 4.46: Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 10 (batelada alimentada). | 157 |
| Tabela 4.47: Condições operacionais adotadas no ensaio 11 (batelada alimentada). Meio suplementar com aminoácidos baseado na velocidade de consumo (40g/L) a uma vazão de alimentação de 1,76mL/mim iniciada após 5 horas de cultivo e soro (176,8g/L) após 8 horas. | 159 |
| Tabela 4.48: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (11º ensaio – batelada alimentada). | 160 |
| Tabela 4.49: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (11º ensaio). | 160 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4.50: Condições operacionais adotadas no ensaio 12 (batelada). | 163 |
| Tabela 4.51: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (12º ensaio). | 164 |
| Tabela 4.52: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (12º e 13º ensaios). | 164 |
| Tabela 4.53: Condições operacionais adotadas no ensaio 13 (batelada/sem aquisição). | 167 |
| Tabela 4.54: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (13º ensaio). | 167 |
| Tabela 4.55: Condições operacionais adotadas no ensaio 14 (batelada). | 170 |
| Tabela 4.56: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (14º ensaio). | 171 |
| Tabela 4.57: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (14º e 15º ensaios). | 171 |
| Tabela 4.58: Condições operacionais adotadas no ensaio 15 (batelada). | 174 |
| Tabela 4.59: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (15º ensaio). | 175 |
| Tabela 4.60: Resumo dos ensaios realizados em biorreator – Primeira etapa. | 180 |
| Tabela 4.61: Resumo dos ensaios realizados em biorreator – segunda etapa. | 183 |
| Tabela 5.1: Parâmetros estimados (95% de intervalo de confiança) para a primeira proposta de modelo. | 190 |
| Tabela 5.2: Matriz de correlação dos parâmetros. | 191 |
| Tabela 5.3: Parâmetros estimados (95% de intervalo de confiança) para a segunda proposta de modelo. | 193 |
| Tabela 5.4: Matriz de correlação dos parâmetros. | 193 |
| Tabela 5.5: Parâmetros estimados (95% de intervalo de confiança) para a segunda proposta de modelo. | 196 |
| Tabela 5.6: Matriz de correlação dos parâmetros. | 197 |
| Tabela 5.7: Condições experimentais das correntes de meio suplementar adotadas nos ensaios 9, 10 e 11. | 198 |
| Tabela 6.1: Ensaios utilizados para treinamento e validação dos algoritmos. | 204 |
| Tabela 6.2: Tempo de início de cada fase de crescimento do <i>Bacillus megaterium</i> . | 213 |

Nomenclatura

| | |
|-----------------|---|
| AA: | Aminoácidos |
| AA+: | Aminoácidos mais rapidamente consumidos |
| AA-: | Aminoácidos mais lentamente consumidos |
| AFA: | Ácido fenilacético |
| 6-APA: | Ácido 6-aminopenicilânico |
| CHE: | Caseína hidrolisada enzimaticamente |
| CLP: | Controlador lógico programável |
| C_{MS} : | Concentração de meio suplementar |
| C_X : | Concentração de células |
| HPLC: | “High Pressure Liquid Cromatograph” |
| K_i : | Constante de inibição pelo substrato (g/L) (equação 2.21) |
| K_i : | Constante de Monod do substrato i (g/L) (equações 5.1, 5.2 e 5.3) |
| K_P : | Constante de inibição pelo produto (g/L) |
| K_s : | Constante de saturação de Monod |
| K'_d : | Constante cinética de morte (h^{-1}) |
| MG: | Meio de germinação |
| MP: | Meio de produção |
| P: | Concentração de produto |
| PDAB: | p-dimetilaminobenzaldeído |
| PGA: | Penicilina G Acilase |
| PID: | Controlador Proporcional, Integral e Derivativo |
| Q_{MS} : | Vazão de meio suplementar |
| RNA: | Redes neurais artificiais |
| r_P : | Velocidade de formação de produto (equação 2.25) |
| S: | Concentração de substrato limitante (g/L) |
| SQS: | Soro de queijo seco em atomizador |
| SQP: | Soro de queijo em pó |
| SQL: | Soro de queijo líquido |
| UI: | Unidade internacional de atividade |
| W_1 e W_2 : | Vetores pesos da rede neural |

| | |
|--------------|--|
| $Y_{X/S}$: | Fator de conversão células/substrato ($g_{células}/g_{substrato}$) |
| $Y_{X/P}$: | Fator de conversão células/produto ($g_{células}/g_{produto}$) |
| $Y_{P/S}$: | Fator de conversão produto/substrato ($g_{produto}/g_{substrato}$) |
| Y_{CO_2} : | Fração molar de CO_2 (%) |
| Y_{O_2} : | Fração molar de O_2 (%) |

Letras Gregas

| | |
|-----------------|--|
| α : | coeficiente dos termos associado e não-associado ao crescimento |
| β : | coeficiente dos termos associado e não-associado ao crescimento |
| ε : | Diferença entre o valor desejado e o previsto pela rede |
| ϕ : | Função objetivo a ser minimizada |
| η : | Taxa de aprendizado para o algoritmo da retropropagação |
| μ : | Velocidade de crescimento específico (h^{-1}) |
| μ_{max} : | Velocidade máxima específica de crescimento celular (h^{-1}) |
| τ_d : | Tempo de geração |

Simbolos

| | |
|------------|-----------|
| ∇ : | Gradiente |
|------------|-----------|

Sumário

| | |
|------------------|-----|
| Resumo | i |
| Abstract | iii |
| Lista de Figuras | iv |
| Lista de Tabela | xi |
| Nomenclatura | xv |

Capítulo 1. **Introdução**

| | |
|---------------|---|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Objetivos | 5 |

Capítulo 2. **Revisão Bibliográfica**

| | |
|--|----|
| 2. Revisão Bibliográfica | 7 |
| 2.1 Breve Histórico das Penicilinas | 7 |
| 2.1.1 Penicilinas Biossintéticas | 8 |
| 2.1.2 Penicilinas Semi Sintéticas | 9 |
| 2.2 Penicilina G Acilase | 10 |
| 2.3 Produção de Penicilina G Acilase por <i>Bacillus megaterium</i> | 13 |
| 2.3.1 <i>Bacillus megaterium</i> | 13 |
| 2.3.2 Efeito da Composição do Meio | 14 |
| 2.3.3 Mutantes e Clonagem de Genes | 16 |
| 2.3.4 PGA de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 no DEQ/UFSCar | 17 |
| 2.4 Redes Neurais Artificiais | 19 |
| 2.4.1 Introdução | 19 |
| 2.4.1.1 Analogia de Redes Neurais Artificiais com o Sistema Nervoso Humano | 19 |
| 2.4.2 Estrutura Comum aos Modelos de Redes Neurais | 21 |
| 2.4.3 Modelos de Redes Neurais | 24 |
| 2.4.3.1 Perceptron multicamadas | 25 |
| 2.4.3.1.1 Algoritmos de treinamento | 26 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.4.3.2 | Enfoque híbrido de modelagem de sistemas | 29 |
| 2.4.4 | Avaliação do Desempenho de uma Rede Neural | 30 |
| 2.4.5 | Utilização de Redes Neurais em Processos Bioquímicos | 31 |
| 2.5 | Monitoração e Controle de Bioprocessos | 37 |
| 2.5.1 | Técnicas de Inferência em Bioprocessos | 40 |
| 2.5.2 | Modelagem, Simulação e Controle de Processos Fermentativos no DEQ/UFSCar | 42 |
| 2.6 | Cinética de Processos Fermentativos | 43 |
| 2.6.1 | Fases do Crescimento Microbiano em Culturas em Batelada | 43 |
| 2.6.2 | Os Fatores de Conversão: Rendimentos em Biomassa e Produto | 46 |
| 2.6.3 | Influência das Condições Ambientais no Crescimento Microbiano | 47 |
| 2.6.4 | Modos de Operação de Processos de Fermentação | 48 |
| 2.6.5 | Modelos cinéticos de bioprocessos | 49 |
| 2.6.5.1 | Modelos Não Estruturados | 51 |

Capítulo 3.

Materiais e Métodos

| | | |
|---------|---|----|
| 3. | Materiais e Métodos | 55 |
| 3.1 | Materiais | 55 |
| 3.1.1 | Microrganismo | 55 |
| 3.1.2 | Fontes de Carbono | 55 |
| 3.1.3 | Fontes de Nitrogênio e Vitaminas | 55 |
| 3.1.4 | Equipamentos | 55 |
| 3.1.4.1 | Câmara Asséptica | 55 |
| 3.1.4.2 | Autoclaves | 55 |
| 3.1.4.3 | Câmara incubadora rotativa ("shaker") | 56 |
| 3.1.4.4 | Centrífuga Refrigerada | 56 |
| 3.1.4.5 | Estufas | 56 |
| 3.1.4.6 | Cromatógrafo Líquido de Alta Performance ("High Pressure Liquid Chromatograph") | 56 |
| 3.1.4.7 | Outros Equipamentos | 56 |
| 3.2 | Meios de Cultura | 57 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1 Meio de Esporulação | 57 |
| 3.2.2 Meio para Obtenção do Inoculo | 57 |
| 3.2.3 Preparo do Meio de Seleção para Verificação da Pureza da Cultura de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945 | 59 |
| 3.2.4 Produção da Enzima em Câmara Rotativa | 59 |
| 3.2.5 Produção da Enzima em Biorreator Agitado e Aerado | 60 |
| 3.3 Análise das Amostras para Acompanhamento da Produção | 60 |
| 3.3.1 Análise da Concentração Celular | 60 |
| 3.3.2 Determinação da Atividade Enzimática | 61 |
| 3.3.2.1 Método Colorimétrico PDAB | 61 |
| 3.3.3 Método para Determinação de Proteínas | 61 |
| 3.3.3.1 Método de Bradford | 61 |
| 3.3.3.2 Método de Lowry | 62 |
| 3.3.4 Concentração de Açúcares | 62 |
| 3.3.4.1 Determinação da Concentração de Lactose | 62 |
| 3.3.4.2 Concentração de Glicose | 64 |
| 3.3.5 Concentração de Aminoácidos | 64 |
| 3.3.6 Concentração de AFA | 64 |
| 3.3.7 Hidrólise da Caseína | 64 |
| 3.3.8 Atividade Proteolítica | 65 |
| 3.3.9 Preparo dos Criotubos | 65 |
| 3.4 Descrição Geral da Instrumentação do Biorreator Convencional e do Sistema de Aquisição de Dados | 66 |
| 3.4.1 Descrição do Sistema de Controle de Temperatura | 68 |
| 3.4.2 Descrição do Sistema de Controle de Oxigênio Dissolvido | 68 |
| 3.4.3 Descrição do Sistema de Controle de pH | 68 |
| 3.4.4 Descrição do Sistema de Controle de Formação de Espuma | 69 |
| 3.4.5 Descrição do Sistema de Controle de Vazão do Meio Suplementar | 69 |
| 3.5 Descrição dos Acessórios Incorporados ao Sistema | 69 |
| 3.5.1 Medidor de Vazão | 69 |
| 3.5.2 Analisador dos Gases de Saída | 69 |
| 3.5.2.1 Dióxido de Carbono (CO ₂) | 69 |

| | |
|---|----|
| 3.5.2.2 Oxigênio (O ₂) | 69 |
| 3.5.3 O Controlador Lógico Programável (CLP) | 70 |
| 3.5.3.1 O Sistema Supervisório | 70 |
| 3.6 Descrição das Telas do Sistema Supervisório | 71 |
| 3.7 O Sistema de Comunicação | 74 |

Capítulo 4. **Resultados Experimentais**

| | |
|--|-----|
| 4. Resultados Experimentais | 78 |
| 4.1 Ensaio em Câmara Rotativa – Primeira Etapa | 78 |
| 4.1.1 Verificação da Estabilidade | 79 |
| 4.1.2 Seleção e Verificação da Pureza do <i>Bacillus megaterium</i> | 80 |
| 4.1.3 Ensaio em Câmara Rotativa Utilizando Criotubos | 87 |
| 4.1.4 Ensaio para Verificação da Quantidade de Esporos e Tempo de Germinação | 91 |
| 4.1.5 Meio de Germinação (crescimento) Sintético | 94 |
| 4.1.6 Meio de Produção Sintético | 97 |
| 4.1.7 Influência da Adição de AFA no meio de produção | 100 |
| 4.1.8 Meios de Germinação e Produção Complexos | 102 |
| 4.1.9 Influência de Outros Componentes do Meio de Produção | 105 |
| 4.2 Ensaio em Biorreator – Primeira Etapa | 109 |
| 4.2.1 Ensaio em Biorreator Utilizando Criotubos – Ensaio 2 | 113 |
| 4.2.2 Ensaio 3 | 116 |
| 4.2.3 Ensaio 4 | 120 |
| 4.2.4 Ensaio 5 | 123 |
| 4.2.5 Ensaio 6 | 126 |
| 4.2.6 Ensaio 7 | 130 |
| 4.3 Ensaio em Câmara Rotativa – Segunda Etapa | 133 |
| 4.3.1 Ensaio com aminoácidos | 133 |
| 4.3.2 Ensaio com Substituição do Soro de Queijo | 138 |
| 4.4 Ensaio em Biorreator – Segunda Etapa | 142 |
| 4.4.1 Ensaio 8 | 142 |
| 4.4.2 Ensaio 9 | 148 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.3 Ensaio 10 | 153 |
| 4.4.4 Ensaio 11 | 159 |
| 4.4.5 Ensaio 12 | 163 |
| 4.4.6 Ensaio 13 | 166 |
| 4.4.7 Ensaio 14 | 170 |
| 4.4.8 Ensaio 15 | 174 |
| 4.5 Considerações Finais Sobre o Capítulo | 178 |
| 4.5.1 Ensaio da Primeira Etapa | 178 |
| 4.5.2 Ensaio da Segunda Etapa | 182 |

Capítulo 5. Modelo Cinético

| | |
|--|-----|
| 5. Modelo Cinético do cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> para Produção de PGA | 186 |
| 5.1 Primeira Proposta | 189 |
| 5.2 Segunda Proposta | 191 |
| 5.3 Terceira Proposta | 195 |
| 5.4 Simulação dos Ensaio em Batelada Alimentada | 197 |
| 5.5 Considerações Finais Sobre o Capítulo | 201 |

Capítulo 6. Inferência

| | |
|---|-----|
| 6. Inferência de Estado do Processo de Produção de PGA | 203 |
| 6.1 Filtragem dos Dados Usados no Algoritmo de Inferência | 205 |
| 6.2 Rede para Identificação de Fases | 211 |
| 6.3 Redes de Inferência da Concentração Celular | 215 |
| 6.3.1 Dados Ruidosos | 215 |
| 6.3.2 Dados de Entrada Filtrados | 221 |
| 6.4 Inferência da Concentração de Enzima | 225 |
| 6.5 Considerações Finais Sobre o Capítulo | 227 |

Capítulo 7. _____ Conclusões

7. Conclusões 229

Referências Bibliográficas 232

1. Introdução

A partir do desenvolvimento da indústria de antibióticos, nas décadas de quarenta e cinquenta, os processos biotecnológicos industriais apresentaram rápido progresso. Inúmeras substâncias de alto valor como enzimas, peptídeos e aminoácidos, ácidos orgânicos, fármacos, vitaminas, dentre muitas outras, são produzidas hoje em dia por processos bioquímicos, que muitas vezes são a única alternativa para sua obtenção – ou se mostram extremamente vantajosos quando comparados a rotas envolvendo sínteses químicas.

A biotecnologia passa por contínua evolução, com a aplicação de conhecimentos e metodologias provenientes de diferentes campos: engenharia genética, biologia molecular, química combinatorial, engenharia bioquímica, entre outros. A Figura 1.1, adaptada de um artigo publicado pelo Prof. Rainer Jonas, é uma boa representação gráfica da “localização” da Biotecnologia Industrial e de sua interação com outros ramos do conhecimento (Schmidell *et al.*, 2001). Ao mesmo tempo, a disponibilidade de recursos computacionais cada vez mais baratos e velozes está alterando radicalmente a prática das engenharias, possibilitando desde um melhor entendimento da estrutura de biomoléculas até a automação e conseqüente incremento da produtividade dos bioprocessos. Essa evolução nos coloca diante da chamada “revolução biotecnológica”: por exemplo, o surgimento de 2 milhões de postos de trabalho relacionados à biotecnologia até o ano 2000 na Comunidade Européia (previsto por Nielsen, 1994).

Em sua obra amplamente conhecida, Bailey e Ollis, 1986, já citavam o número de vantagens que podem ser obtidas ao se aliar instrumentos de medida mais sofisticados a computadores digitais. Dentre elas, o aumento do número e precisão das análises necessárias para identificar o estado do sistema sob supervisão e controle.

A generalidade dos processos biotecnológicos se divide em duas categorias: reações de crescimento microbiano (reações microbiológicas), e reações catalisadas por enzimas (reações bioquímicas ou biotransformações). Esses processos são usados para a produção de uma gama de produtos de diferentes valores comerciais. Um processo biotecnológico de maneira geral pode ser definido como aquele em que há a utilização de microrganismos (leveduras, bactérias, etc) e/ou enzimas, podendo ter como objetivo a síntese de compostos químicos intracelulares (proteínas) ou extracelulares (antibióticos, álcool), a produção de biomassa (caso do fermento biológico), de

alimentos (bebidas), de energia (biogás, etanol) ou ainda tratamento de efluentes (Ferreira, 1995).

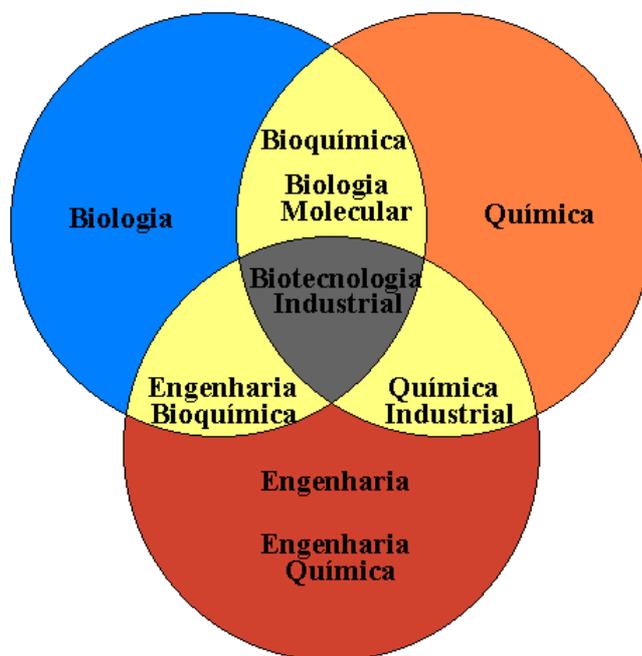


Figura 1.1: Representação esquemática da interação da Biotecnologia Industrial com outros ramos do conhecimento, Schmidell *et al.*, 2001.

O rápido desenvolvimento no campo da tecnologia digital, já mencionado anteriormente, vem provocando modificações nos modos de produção das indústrias, através da automação em todos os seus setores. Para processos industriais de cultivo microbiano, particularmente, este advento tem possibilitado a instalação de acessórios de aquisição de dados que permitem o acompanhamento da evolução do processo em tempo real, bem como o tratamento e análise simultânea dos dados assim obtidos. A detecção precoce e confiável de falhas (por exemplo, uma possível contaminação da cultura) é uma aplicação imediata dessa tecnologia. Por outro lado, a disponibilidade de medidas consistentes é etapa essencial para o controle moderno (baseado em computador) desse tipo de processo.

O desafio posto pelo caráter intrinsecamente multidisciplinar da pesquisa neste campo foi encarado como um estímulo ao trabalho integrado entre as áreas de pesquisa em Engenharia Bioquímica e em Simulação e Controle de Processos do Departamento

de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar). Esta tese de doutorado se insere, assim, em linha de pesquisa articulada entre os grupos de automação de bioprocessos, engenharia das reações enzimáticas e engenharia das fermentações do DEQ/UFSCar.

Esta tese se insere em linha de pesquisa voltada à síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos. Enfoca-se aqui a produção da enzima penicilina G acilase (PGA) por *Bacillus megaterium*. O primeiro trabalho dessa linha (Hojo, 1997), realizou estudos preliminares tais como: definição do tempo de incubação, concentrações iniciais do meio de cultura, armazenamento da enzima e padronização dos métodos analíticos. Trabalhos subsequentes estudaram o uso do soro de queijo como principal fonte de carbono (Berazaín, 1997), e a influência da concentração de oxigênio dissolvido (Visnard, 1997) para a produção da enzima. Estes trabalhos fizeram parte de projeto integrado ao programa PADCT II-94, quando se iniciou o estudo da engenharia dos processos relacionados à penicilina G acilase. O trabalho mais recente desta linha estudou a produção da enzima para fins de imobilização e comparação dos derivados obtidos com os constituídos a partir de enzima produzida por *Escherichia coli* (Pinotti, 1999). Todos estes trabalhos utilizaram o microrganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14945 que, do ponto de vista da facilidade de separação e purificação da enzima, apresenta a característica vantajosa de produzi-la extracelularmente.

Atualmente encontra-se montado nos laboratórios do DEQ/UFSCar sistema de aquisição de dados e controle via controlador lógico programável (CLP), acoplado a diferentes bioreatores instrumentados. Um sistema supervisor, implementado em microcomputador, monitora em tempo real temperatura, pH, vazão de aeração, velocidade e torque de agitação, oxigênio dissolvido, frações molares de oxigênio e dióxido de carbono nos gases efluentes. Esse tipo de configuração segue o padrão industrial, o que pode tornar mais factível possíveis transferências de tecnologia ao setor produtivo.

Segundo Lim e Lee, 1991, para melhor controle e otimização de processos fermentativos seria necessário medir em linha um número de parâmetros fisiológicos chave. Medidas em tempo real de alguns desses parâmetros são muito difíceis ou até mesmo impossíveis. Dois importantes obstáculos no monitoramento de bioprocessos são a falta de medidas confiáveis em linha de variáveis de processo (como, por

exemplo, a massa e viabilidade celular) e a dificuldade em se definir relações quantitativas entre o crescimento microbiano e as variáveis de estado disponíveis. Muitas vezes, informações cruciais poderiam ser obtidas a partir de metabólitos intermediários, mas esses são de mensuração muito difícil em tempo real. Por outro lado, devido à alta não linearidade da dinâmica dos bioprocessos, modelos de aproximação linear não são indicados para descrevê-los. Portanto, os estimadores de bioprocessos têm que utilizar técnicas de estimativa não linear, baseadas ou não em modelos.

A experiência acumulada através de estudos já desenvolvidos por estas duas áreas de pesquisa motivou a realização desta tese. Do ponto de vista da tecnologia de fermentação, deu-se continuidade aos estudos experimentais para produção da enzima PGA, envolvendo não só otimização do meio de produção, mas também de temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação. Por outro lado, a filosofia deste trabalho associou um enfoque aplicado, estudando processo real de cultivo, à pesquisa de algoritmos e técnicas avançadas de tratamento de sinais, identificação e inferência de variáveis ("softsensors") e tendências do processo. Desta maneira, desenvolveu-se e implementou-se algoritmo de inferência de estado no processo fermentativo.

A penicilina G acilase (E.C.3.5.1.11), que é a enzima em estudo nesta tese, é uma enzima de grande importância comercial, usada para a produção dos ácidos 6-aminopenicilânico (6-APA) e 7-aminocefalosporânico (7-ACA), que são compostos-chave na produção industrial de antibióticos β -lactâmicos, principalmente penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas. Esta enzima é a segunda mais utilizada no mundo, após a glicose isomerase, e o Brasil não detém tecnologia operacional em nível industrial para sua produção, purificação ou imobilização. Este fato em si mostra a grande importância do estudo envolvendo a sua produção e uso. O grande interesse na penicilina G acilase (PGA) deve-se principalmente à sua capacidade de hidrolisar a penicilina G para produzir 6-APA, que tinha em 1989 uma produção mundial anual de 5.500 toneladas, com uma projeção de 7.000 toneladas para o ano 2000 – sendo a maior parte produzida por via enzimática (Shewale e Sivaraman, 1989). Esta projeção deve-se principalmente ao fato de antibióticos tais como ampicilina, amoxicilina, cefalexina, cefadroxil e outros terem ampla aplicação como agentes terapêuticos.

Este trabalho se insere em um projeto maior, onde vários aspectos do processo de produção de PGA são estudados. Estão sendo desenvolvidos dentro deste projeto maior alguns trabalhos de doutorado, mestrado e iniciação científica. Souza, 2003, em seu mestrado, estudou os requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium* com vistas à produção de PGA. Pinotti, em seu doutorado em fase de finalização (FAPESP 99/01326-8), estuda a produção e purificação da enzima. Gomes, 2002, em sua iniciação científica desenvolveu uma interface computacional dinâmica empregando Visual Basic[®] que permitiu a troca de informações em tempo real na produção de PGA. Inocêncio, 2002, também em projeto de iniciação científica, estudou a influência da concentração de soro de queijo e da caseína no crescimento do *Bacillus megaterium*. Nucci, em seu mestrado, estuda a aplicação da lógica nebulosa “Fuzzy” ao processo de produção de PGA.

Para o melhor entendimento de todo trabalho desenvolvido, a tese foi organizada de forma a facilitar a leitura. No final de cada capítulo de resultados foi incluído um item denominado “considerações finais”. Neste se abordam os tópicos relevantes e as principais conclusões obtidas no capítulo em questão.

A tese se encontra organizada da seguinte forma:

- Capítulo 1 – Introdução: apresenta uma visão geral de bioprocessos e do processo em estudo, além dos objetivos do presente trabalho;
- Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica: começa apresentando um breve histórico da descoberta das penicilinas, passando pela penicilina G acilase e monitorização de bioprocessos além de demais tópicos relacionados ao presente estudo;
- Capítulo 3 – Materiais e Métodos: descreve todos os materiais e equipamentos utilizados e toda metodologia experimental dos ensaios em câmara rotativa e biorreator. Apresenta também a instrumentação do biorreator, o sistema de aquisição de dados e o sistema de monitoração e inferência;
- Capítulo 4 – Resultados Experimentais: apresenta e discute os resultados experimentais de cultivos de *Bacillus megaterium*;
- Capítulo 5 – Modelos Cinéticos: mostra os resultados do ajuste de três diferentes modelos cinéticos não-estruturados do cultivo;
- Capítulo 6 – Inferência de Estado do Processo de Produção de PGA: este capítulo se divide em três tópicos relacionados com inferência do processo em tempo real:

filtragem de ruídos, identificação de fases do cultivo e inferência de variáveis primárias. Os algoritmos utilizados em todos tópicos se baseiam em redes neurais artificiais;

- Capítulo 7 – Conclusões: apresenta as principais conclusões extraídas durante o desenvolvimento do trabalho e as sugestões para a continuidade do mesmo.

1.1 Objetivos

Dentro deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e implementar algoritmos de inferência de estado a partir de variáveis disponíveis em linha no processo de produção de PGA por *Bacillus megaterium*. Na primeira etapa do trabalho vários ensaios de produção de PGA foram realizados tanto em câmara rotativa termostaticada como em biorreator para se definir condições no mínimo sub-ótimas de operação, tais como a composição de meio, de modo a se obter maior crescimento celular e produção da enzima. As informações levantadas nos ensaios em biorreator permitiram a proposição e validação de um modelo não-estruturado do processo, com múltiplos substratos limitantes. Posteriormente, numa segunda etapa, os dados dos experimentos foram utilizados para o treinamento do algoritmo de inferência baseado em redes neurais. Com base nas variáveis medidas em tempo real, treinaram-se redes com várias topologias e entradas, de modo a escolher as variáveis que possibilitassem à rede o aprendizado dos aspectos essenciais da dinâmica do processo. Testaram-se, também, diferentes filtros das medidas, de forma a minimizar erros aleatórios da instrumentação, que podem interferir nos algoritmos de inferência de estado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Breve Histórico das Penicilinas

Os antibióticos são tipos específicos de substâncias químicas extraídos de microrganismos, que são administrados para combater infecções usualmente bacterianas em seres humanos e animais. Eles interferem no metabolismo celular e por mecanismos diversos levam à interrupção da atividade celular, seja eliminando os microrganismos patogênicos ou inibindo o seu crescimento.

Em 1929 Alexander Fleming descobriu a penicilina, que mais tarde revolucionaria o tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas, além de induzir a descoberta de novos compostos de atividade farmacológica produzidos através de bioprocessos (Swartz, 1985). Essa descoberta representou para a biotecnologia a introdução de um novo produto comercial, de uso terapêutico, além dos tradicionais alimentos e bebidas para o consumo de homens e animais. Iniciava-se, a partir de então, uma revolução no tratamento de infecções bacterianas, que serviu de modelo para o surgimento de numerosos compostos produzidos por via fermentativa. Neste contexto, a palavra fermentação não se refere a cultivos anaeróbios, mas sim ao cultivo em geral de microrganismos em meio sólido ou líquido, quer sejam aeróbios ou anaeróbios.

O início da produção industrial das penicilinas ocorreu nos Estados Unidos, em 1941, treze anos após sua descoberta. Naquela época o cultivo era realizado empregando meio sólido, onde crescia o fungo *Penicillium notatum*, atingindo uma produção de 10 a 20 unidades Oxford/mL (equivalente a 0,006-0,012 mg de benzil penicilina, sal de sódio/mL) (Swartz, 1985).

As várias penicilinas existentes apresentam estruturas químicas semelhantes com propriedades e atividades ligeiramente diferentes. Diferenciam-se entre si pela cadeia lateral ligada a um núcleo comum, um anel β -lactâmico denominado ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). A estrutura química do 6-APA é mostrada na Figura 2.1. As diversas cadeias laterais ligadas ao 6-APA conferem propriedades especiais a cada derivado. Dependendo da forma de obtenção, as penicilinas podem ser classificadas em biossintéticas e semi-sintéticas.

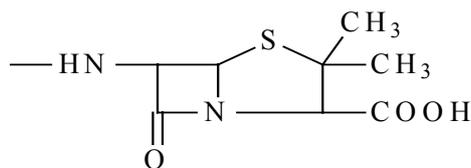


Figura 2.1: Estrutura química do 6-APA

2.1.1 Penicilinas Biossintéticas

As penicilinas biossintéticas, também chamadas de penicilinas naturais, são obtidas a partir do cultivo de microrganismos. As de maior interesse, por apresentarem importância terapêutica, são as penicilinas G e V. A diferença estrutural entre elas está na cadeia lateral ligada ao ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Na penicilina G, esse radical ligado é um fenilacetila e na penicilina V é um radical fenóxiacetila (Swartz, 1985). Algumas estruturas de penicilinas naturais, entre elas as penicilinas G e V podem ser vistas na Figura 2.2.

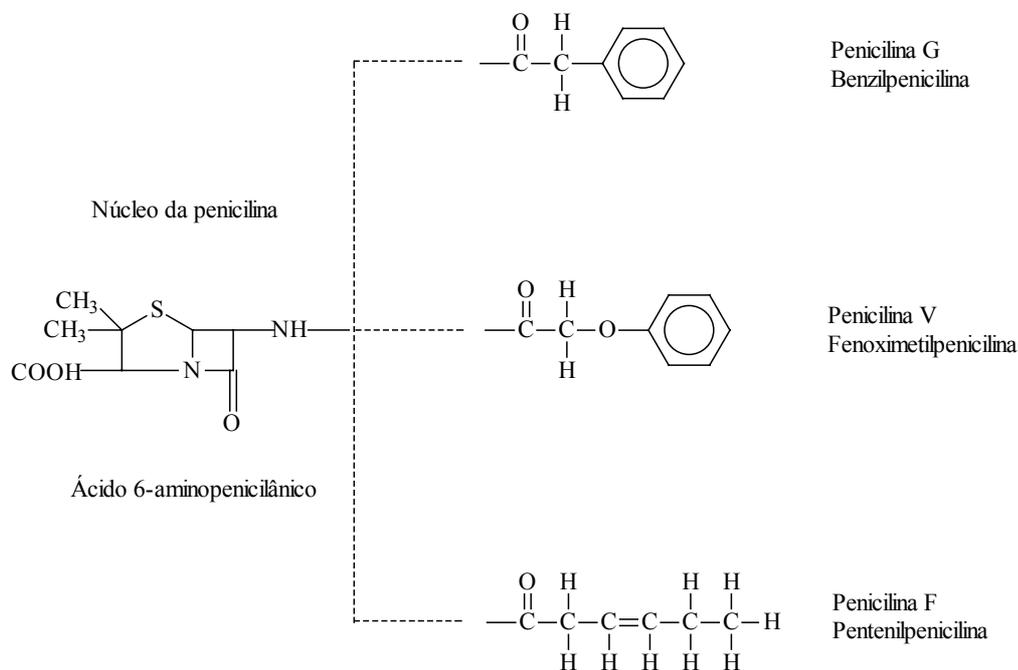


Figura 2.2: Algumas penicilinas naturais. Ao núcleo básico ligam-se diferentes cadeias laterais que conferem propriedades especiais (Fonseca, 1992).

2.1.2 Penicilinas Semi Sintéticas

O desenvolvimento de penicilinas semi-sintéticas passa pela produção do precursor 6-APA, que pode ser obtido a partir da desacilação de penicilinas biossintéticas, principalmente as penicilinas G ou V. As penicilinas semi-sintéticas apresentam maior estabilidade, melhor absorção, além de apresentarem também menor número de efeitos colaterais que as penicilinas naturais. As estruturas de alguns antibióticos semi-sintéticos são mostradas na Figura 2.3.

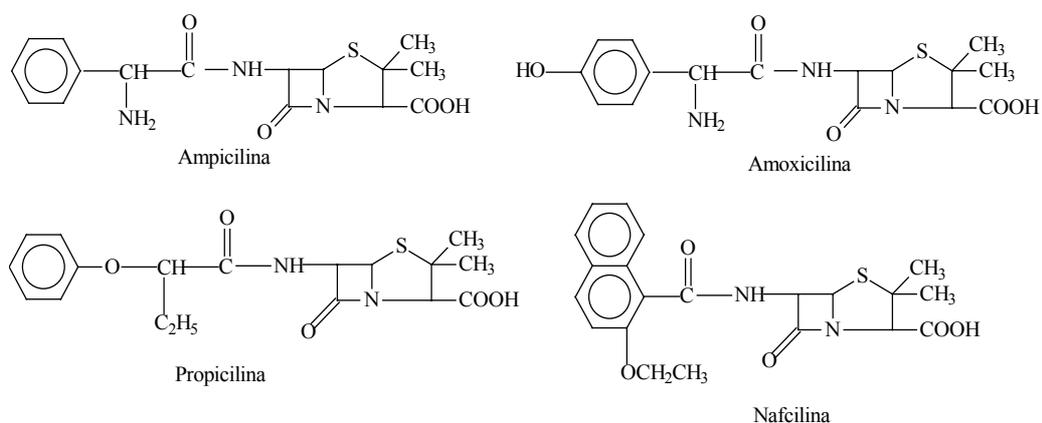


Figura 2.3: Algumas penicilinas semi-sintéticas (Hojo, 1997).

A desacilação de penicilinas biossintéticas pode ser feita por via química ou enzimática. A via enzimática oferece melhores resultados devido à estereoespecificidade das enzimas e vem sendo intensamente estudada para substituir a cara e poluente rota química atualmente em operação nas indústrias. As vantagens econômicas, ambientais e operacionais do processo enzimático sobre a rota química vêm estimulando sua aplicação industrial, principalmente com o uso de enzimas imobilizadas. A maior parte do 6-APA produzido atualmente é por desacilação enzimática das penicilinas G ou V (Shewale e Sivaraman, 1989). Comparações econômicas da manufatura do 6-APA pelos processos químico e enzimático indicam que o processo enzimático é pelo menos 9% mais barato (Anon, 1992 apud Parmar *et al.*, 2000). Esta economia pode ser até maior (20%) se a manufatura do 6-APA pela rota enzimática for integrada com a produção de penicilina G por fermentação, pois a hidrólise enzimática da penicilina é inibida pelo produto (a cadeia lateral, ácido fenilacético neste caso), o qual, por sua vez, é indutor da produção microbiana do

antibiótico. Uma grande quantidade de microrganismos pode produzir enzimas para hidrolisar a ligação amida da penicilina, para se obter o 6-APA e sua respectiva cadeia lateral.

As enzimas envolvidas nesse processo foram denominadas inicialmente como penicilinas amidases e, posteriormente, penicilinas acilases ou penicilinas amidohidrolases. Existem em diferentes formas, devido à procedência de diferentes microrganismos, e apresentam um considerável grau de especificidade de substrato (Vandamme e Voets, 1974).

Enzimas são catalisadores de alta especificidade, alta eficiência na conversão substrato-produto e elevada atividade em condições ambientais moderadas (fisiológicas). Estas características explicam sua grande utilização em processos industriais (Illanes, 1994). O número de aplicações industriais utilizando enzimas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. O mercado mundial de enzimas excedeu a casa dos 1,6 bilhões de dólares em 1997, com crescimento anual estimado de aproximadamente 6,5%, excluindo enzimas terapêuticas e enzimas empregadas em engenharia genética, que tendem a ter um crescimento muito maior (Linko *et al.*, 1999).

2.2 Penicilina G Acilase

Penicilina acilase foi primeiramente isolada a partir de *Penicillium chrysogenum* Q176 (Parmar *et al.*, 2000). As penicilinas acilases mais importantes são as penicilinas G e V acilase. De acordo com a fonte a partir da qual a enzima penicilina acilase foi isolada, esta pode ser classificada em dois tipos: as penicilinas acilases provenientes de bactérias têm maior afinidade para hidrolisar a penicilina G, enquanto as penicilinas acilases provenientes de actinomicetos e fungos têm maior afinidade para hidrolisar penicilina V (Chiang e Bennett, 1967; Vandamme e Voets, 1974; Shewale e Sivaraman, 1989). A penicilina G acilase (PGA), é a mais comumente encontrada em aplicações industriais.

A importância comercial das penicilinas acilases se mantém por anos após sua descoberta. Os avanços simultâneos nas áreas de automação de processos fermentativos, purificação e imobilização de enzimas, projeto de reatores, etc, vêm contribuindo para a viabilidade econômica do processo de produção. Vários trabalhos gerais sobre penicilinas acilases são encontrados na literatura mostrando, por exemplo, a produção

da enzima e sua aplicação na manufatura do 6-APA (Harrison e Gibson, 1984; Shewale e Siravaman, 1989), a sua importância na produção industrial de antibióticos β -lactâmicos (Bruggink *et al.*, 1998) e investigações sobre a sua estrutura (Duggleby *et al.*, 1995; Done *et al.*, 1998).

O nome oficial da penicilina G acilase (PGA) é penicilina amido hidrolase (E.C.3.5.1.11) e sua importância reside na utilização como catalisador na hidrólise da penicilina G para a obtenção de 6-APA e ácido fenilacético (AFA), em processo com enzimas imobilizadas (Savidge, 1984). A Figura 2.4 mostra a hidrólise da penicilina G catalisada pela PGA para a produção de 6-APA.

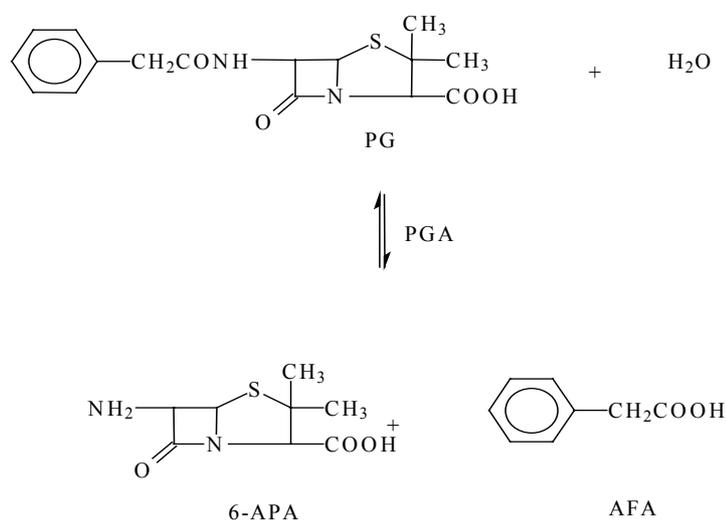


Figura 2.4: Hidrólise enzimática da penicilina G.

A enzima pode provir de vários microrganismos, apresentando diferentes características e propriedades, como diferentes pesos moleculares e afinidades pelos substratos. A PGA de *E. coli*, uma das mais estudadas, é um heterodímero com peso molecular de 19.500 e 60.000 para as subunidades α e β respectivamente (Valle *et al.*, 1991; Novella *et al.*, 1994 apud Parmar *et al.*, 2000). O ponto isoelétrico tem sido reportado a pH 6.8.

A Tabela 2.1 mostra um resumo das diversas empresas no mundo que utilizam PGA na forma imobilizada, obtida de diferentes microrganismos.

Tabela 2.1: Algumas empresas que utilizam PGA imobilizada, e seus respectivos microrganismos produtores (Savidge, 1984).

| Empresa | Microrganismo | Tipo de Enzima |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|
| BAYER | <i>Escherichia coli</i> | Intracelular |
| SQUIBB | <i>Bacillus megaterium</i> | Extracelular |
| PFIZER | <i>Proteus rettgeri</i> | Intracelular |
| KYOWA HAKKO | <i>Kluyvera citrofila</i> | Intracelular |
| | * <i>Arthrobacter viscosus</i> | extracelular |

* Syu e Chang, 1997.

Diferentes valores de Km são encontrados para penicilina acilase, como pode ser observado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Comparação dos valores de Km da hidrólise de penicilina por penicilinas acilases (Savidge e Cole, 1975).

| Microrganismo | Km (mM) |
|---|----------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 9637 | 7,7 |
| <i>E. coli</i> NCIB 8743 ^A | 0,67 |
| Enzima cristalina de <i>E. coli</i> | 0,02 |
| <i>E. coli</i> NCIB 8743 ^A imobilizada | 30,0 |
| <i>B. megaterium</i> | 4,5 |

As penicilinas acilases provenientes de *B. megaterium* e *E. coli* são inibidas pelos produtos da hidrólise da penicilina G, competitivamente pelo ácido fenilacético e não competitivamente pelo 6-APA (Tabela 2.3). Observa-se também que a penicilina G inibe a enzima produzida por *E. coli*.

Tabela 2.3: Comparação das constantes cinéticas das penicilinas acilases produzidas por *E. coli* e *B. megaterium*. Os dados para *E. coli* foram obtidos a pH 8,0 e 37° C e para *B. megaterium* a pH 8,7 e 37° C (Savidge e Cole, 1975).

| Parâmetro | <i>E. coli</i> NCIB 8743A | <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 |
|--|---------------------------|---------------------------------|
| V _{máx} (μmols 6-APA/min/mg) | 7,1 | 1,1 |
| K _m (mM) | 0,67 | 4,5 |
| K _i , 6-APA (mM) | 7,1 | 26 |
| K _i , ácido fenilacético (mM) | 4,8 | 450 |
| K _i , penicilina G (mM) | 270 | não inibe |

Pesquisa e desenvolvimento na produção e uso de PGA têm sido realizados principalmente com a enzima obtida de *Escherichia coli* (Alvaro *et al.*, 1990; Guan *et al.*, 1992; Robas *et al.*, 1993), apesar da produção da enzima ser intracelular (no espaço periplasmático). A purificação da enzima intracelular passa pela ruptura das células, o que origina custos mais elevados para sua recuperação. Esta ruptura pode ser feita por sonda de ultra-som em escala de laboratório, em larga escala pela passagem das células em um homogeneizador industrial de alta pressão (Savidge & Cole, 1975).

Uma alternativa é a utilização de microrganismo que produza a enzima e a excrete para o meio de cultura, ou seja, extracelularmente. Dentre os microrganismos produtores de PGA extracelular, tem-se o *Bacillus megaterium*. A PGA de *Bacillus megaterium* é uma enzima utilizada na produção industrial de antibióticos β-lactâmicos, porém as informações são dispersas e principalmente protegidas por segredo industrial (Illanes *et al.*, 1994). O modo de produção extracelular do *Bacillus megaterium* torna particularmente interessante o estudo do processo de produção, pois os procedimentos de purificação tornam-se sobremaneira simplificados e conseqüentemente menos caros, uma vez que a enzima é excretada das células e mais facilmente separada e purificada.

2.3 Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium*

2.3.1 *Bacillus megaterium*

Segundo Vary, 1994, *Bacillus megaterium* tem fascinado microbiologistas desde a sua primeira descrição há mais de cem anos atrás. Este é particularmente interessante por causa da sua fisiologia e da ampla extensão de seu habitat ecológico. Apesar de ser considerado um microrganismo do solo, pode ser encontrado em diversos ambientes,

tais como alimentos desidratados, água do mar, sedimentos, peixes e até mesmo em mel de abelha. Diferentes linhagens são frequentemente isoladas juntamente com pseudomonas e actinomicetos em substratos incomuns, tais como herbicidas.

Uma boa revisão introduzindo *Bacillus megaterium*, enfocando sua genética, estrutura celular, esporulação e germinação pode ser vista em Vary (1994). Nesta revisão, Vary relaciona ainda a importância econômica deste microrganismo à sua capacidade de produzir penicilina acilase, amilases, glicosedesidrogenase, antibióticos (emimicina, oxitanocina), esteróides, hidrolases, além de ser o microrganismo aeróbio maior produtor de vitamina B₁₂. Além disso, é um microrganismo promissor para manipulação genética, seja como hospedeiro ou como fornecedor de genes (Kang *et al.*, 1991).

Bergey (1974) cita que o *Bacillus megaterium* pode ser encontrado nas formas oval ou cilíndrica unidas em pequenas cadeias, podendo apresentar diferentes dimensões dependendo do meio de cultura. Em ágar tem diâmetro em torno de 1,5µm, e em meio contendo carboidratos pode assumir dimensões a partir de 3,0µm. Bergey descreve também que em ágar nutriente *Bacillus megaterium* cresce de forma ordenada, podendo apresentar rugosidades e, quando cultivado em meio de cultura por tempo prolongado, sua coloração pode variar de uma tonalidade marrom até preta. Além disso, segundo o autor, *Bacillus megaterium* digere a caseína e pode se reproduzir em meios sem fatores de crescimento, tendo sais de amônio ou nitratos e glicose como únicas fontes de nitrogênio e de carbono.

Sabe-se que a temperatura ótima de crescimento está entre 28° e 35°C, não ocorrendo crescimento algum a temperaturas acima de 45°C. O pH ótimo de crescimento é em torno de 7,0 a 8,5, não ocorrendo crescimento a pH 5,0 ou menor. Possui forte capacidade para reduzir nitrato em nitrito, produzir amônia, formar ácidos (Murao *et al.*, 1964).

2.3.2 Efeito da Composição do Meio

As condições ótimas e os meios utilizados na produção de PGA diferem bastante e dependem fundamentalmente do microrganismo produtor. Em nível industrial o que se procura é o condicionamento do microrganismo de modo a aumentar a produtividade da enzima, pela formulação adequada de meio e condições de fermentação. A

formulação correta do meio de cultura é fundamental para a obtenção de um rendimento maior e por isso a composição dos meios de fermentações industriais não é usualmente publicada, devido ao seu enorme valor comercial.

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que utilizam *Bacillus megaterium*, linhagem ATCC 14945, usada neste trabalho. Chiang e Bennett, 1967, realizaram um estudo sobre a purificação e propriedades da PGA deste microrganismo, entre elas, estabilidade, pH e temperatura ótimos, especificidade, etc, utilizando meios baseados em caseína hidrolisada enzimaticamente. Verificaram que a enzima é específica para benzilpenicilina (penicilina G), mostrando menor atividade com relação a penicilinas que contêm outros grupos químicos no lugar do fenil acetato e que esta tem pH ótimo entre 8 e 9. Observaram também em experimentos preliminares que a velocidade inicial de hidrólise é estimulada pelo aumento da concentração de substrato, indicando assim que a relação entre a velocidade inicial e a concentração de substrato obedece a clássica equação de Michaelis Mentem. O crescimento máximo das células foi verificado após um período de incubação de 20 a 24 horas, ao mesmo tempo em que a concentração de enzima começa a aumentar, continuando até um período de observação de 96 horas.

A quantificação da enzima penicilina G acilase é realizada com base na unidade internacional de atividade (UI), definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido 6-aminopenicilânico a partir da benzil penicilina por minuto em tampão borato em pH 8,7 a 37 °C (Savidge e Cole, 1975).

A produção extracelular da enzima é dependente da composição do meio. Sendo assim, a maioria dos autores examina o efeito dos diversos componentes e condições de ensaio, para a obtenção da máxima produção da enzima. Acevedo e Cooney, 1973, estudaram o efeito da limitação das fontes de nitrogênio, enxofre e fósforo na produção da enzima em cultura contínua, utilizando histidina como única fonte de nitrogênio. Resultados mostraram que a produção da enzima é controlada por diversos mecanismos regulatórios que dependem das condições ambientais do meio de cultura e da concentração do indutor, o ácido fenilacético, sendo que baixas concentrações do indutor estimulam o crescimento e altas concentrações de indutor inibem o crescimento.

Já Illanes *et al.*, 1994, apresentaram resultados para a produção da enzima utilizando meios complexos e definidos onde foram observados os efeitos do fósforo

inorgânico na produção e excreção da enzima, a cinética de indução por ácido fenilacético e o efeito da glicose na produção da enzima. Experimentos indicaram que a excreção da enzima é dependente do meio, sendo que um elevado nível de fósforo favoreceu a produção. Para altos níveis de fósforo, a maior parte da enzima produzida foi excretada e somente uma pequena porção permaneceu associada à célula. Entretanto, em baixas concentrações de fósforo inorgânico, houve um aumento da atividade enzimática associada às células e diminuição da atividade total. Com relação à indução por AFA, ambos os meios apresentaram melhores resultados, para produção e produtividade, utilizando concentração de 1,5g/L do ácido, quando adicionado ao meio após 8 horas de fermentação. Os autores verificaram ainda que a produção da enzima foi reprimida por glicose, e a produção da penicilina acilase em meio complexo ocorreu principalmente após a exaustão desta.

Caseína hidrolisada tem sido amplamente utilizada como fonte de nitrogênio, mas uma ampla variedade de outras fontes está disponível a preços razoáveis. Gentina *et al.*, 1997, estudaram o uso dessas diferentes fontes de nitrogênio na síntese e excreção da enzima. Os resultados mostraram que a baixa produção de enzima em alguns destes substratos é devida à natureza protéica da fonte de nitrogênio.

2.3.3 Mutantes e Clonagem de Genes

Desde a descoberta da tecnologia do DNA recombinante, em 1973, os cientistas têm desenvolvido técnicas que possibilitam transferir os genes de um tipo celular para outro. Por meio dos conhecimentos atuais, é possível mudar a composição genética das células vivas de tal modo que estas possam produzir novas substâncias. Esse processo é denominado engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante (Pelczar Jr., 1997).

O aumento na procura por 6-APA para a produção de penicilinas semi-sintéticas incentivou pesquisas sobre a produção de PGA, abrangendo técnicas de seleção, mutação e modificação genética de microrganismos produtores.

Son *et al.*, 1982, obtiveram, a partir da linhagem mãe *Bacillus megaterium* ATCC 14945, linhagem mutante denominada *Bacillus megaterium* KFCC 10029, com mudanças no modo de produção e no tamanho da cadeia de células. Enquanto a linhagem mãe produz PGA somente na presença de indutor, a mutante produziu a

enzima sem essa presença e, quando na presença de AFA, apresentou produtividade de três a quatro vezes maior. Após crescimento dos microrganismos em ágar nutriente a 30°C por 18-24 horas, o mutante apareceu como células isoladas ou cadeias pequenas, e a linhagem mãe apareceu como longas cadeias de células.

Vários outros trabalhos, utilizando tecnologia de DNA recombinante em clonagens, foram sendo realizados com *Bacillus megaterium* ATCC 14945, como por exemplo, Kang *et al.*, 1991 e Martín *et al.*, 1995.

Trabalhos sobre PGA utilizando outras linhagens de *Bacillus megaterium* enfocaram efeitos de inibição (Lawrence, 1974), separação (Chase *et al.*, 1977), clonagem (McCullough, 1983; Meevootisom e Saunders, 1987), cinética (Suga *et al.*, 1990), purificação (Senthilvel e Pai, 1996) e outros.

2.3.4 PGA de *Bacillus megaterium* ATCC 14945 no DEQ/UFSCar

Há algum tempo, a área de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar possui linha de pesquisa voltada para a produção da enzima penicilina G acilase por *Bacillus megaterium*, visando tanto ao entendimento do processo como à formação de pessoal qualificado.

Hojo, 1997, estudou a influência da composição do meio para a produção de PGA de *Bacillus megaterium*, bem como as condições operacionais de fermentação. Utilizando planejamento composto central, encontrou como melhores concentrações de meio: 2,0 a 2,4 g/L de AFA, 5,0 a 8,0 g/L de glicose, 30 a 50 g/L de caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) e 7,3 a 8,0 g/L de carbonato de cálcio. E como condições operacionais ótimas: concentração de oxigênio dissolvido de 20% na fase de produção e 10% na fase de crescimento, adição de AFA após 10 horas da inoculação, 30°C. Obtiveram-se, assim, valores semelhantes ao obtido por Illanes *et al.*, 1994, em torno de 250 UI/L de caldo.

Berazaín, 1997, utilizou soro de queijo como principal fonte de carbono na produção de PGA pelo mesmo microrganismo. Um dos objetivos era aliar a redução do custo de produção da enzima à diminuição da carga poluente nos rios, porque apenas 60% dos rejeitos de laticínios são aplicados para a fabricação de produtos para consumo humano e animal, sendo o restante descartado, em que pese sua carga poluente, com quantias importantes de proteínas, lactose, gordura e vitaminas. Nesse trabalho o autor

estudou o aproveitamento do soro de queijo para compor um meio de cultura para a produção de PGA. Realizou experimentos planejados, visando à obtenção de relações empíricas entre as variáveis estudadas e construiu superfícies de resposta para determinar a composição de meio ótimo para a produção da enzima.

Visnard, 1997, estudou a influência da concentração de oxigênio dissolvido no processo de produção de PGA, mostrando haver uma forte correlação entre concentração de O₂, concentração celular e produção da enzima. O autor ajustou correlação do crescimento celular em função da velocidade de produção de CO₂ durante a fermentação e propôs modelo matemático para o crescimento celular.

Dando continuidade a esses estudos, Pinotti, 1999, comparou a produção da enzima nos meios de Illanes *et al.*, 1994, Hojo, 1997 e Berazaín, 1997. Observou maior repressão por glicose da cepa produtora em relação à utilizada por Hojo, 1997. Foi constatada que a produção de PGA é fortemente dependente da fonte de nitrogênio e carbono, atingindo maiores concentrações de enzima (138 UI/L) quando se utilizou caseína hidrolisada com Alcalase® e soro de queijo "in natura" como fontes de carbono e nitrogênio. O soro de queijo contribui ainda com micronutrientes que se mostram importantes na produção da enzima.

Souza, 2003, estudou os requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium* na produção de PGA. Na otimização do meio de cultivo, estudou os efeitos de diferentes concentrações de aminoácidos e da sua composição na produção da enzima em frascos agitados. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos aminoácidos que compõem o meio é essencial nem ao crescimento nem à produção da enzima. Mostraram também que concentrações iniciais acima de 10,0g/L de aminoácidos inibem a síntese da enzima. Foi testada, também em frascos agitados, a influência dos diferentes componentes do soro de queijo na produção de PGA por *B. megaterium*, verificando-se que a substituição do soro pelos aminoácidos individuais que compõem, em média, suas proteínas, embora permita crescimento celular, não favorece a síntese de enzima.

2.4 Redes Neurais Artificiais

2.4.1 Introdução

Redes neurais artificiais (RNA) são modelos computacionais inspirados na estrutura e no comportamento dos neurônios reais, as unidades básicas responsáveis pelo processamento cerebral (Anderson, 1995). O termo rede neural é resultado de pesquisas no campo da Inteligência Artificial (IA) que originalmente tentaram entender e modelar o comportamento do cérebro.

Entre as características que são desejáveis em redes neurais, tem-se: robustez e tolerância a falhas, flexibilidade, alto grau de paralelismo, tamanho compacto, alta velocidade de processamento, capacidade de aprendizado e habilidade para lidar com informação difusa, ruidosa ou inconsistente. Portanto, RNAs podem reconhecer padrões, reorganizar dados e, o que é mais interessante, aprender. São empregadas para mapear padrões de entrada nos correspondentes padrões de saída de um dado sistema. Para isto, quando trabalhando com aprendizado supervisionado, primeiro uma série de vetores de entrada e saída adequados são apresentados à rede (etapa de treinamento), que a seguir predirá a saída apropriada para uma nova entrada.

Foi aproximadamente na década de quarenta que surgiram os primeiros estudos neste campo. McCulloch e Pitts foram pesquisadores pioneiros, mostrando que um neurônio podia ser modelado por uma função degrau para realizar uma função lógica (Lau, 1990). Outros modelos surgiram no decorrer dos anos, mas foi no início da década de setenta que Paul J. Werbos desenvolveu o algoritmo backpropagation. Este foi ignorado por anos após a sua invenção. Mas, na metade dos anos oitenta, as pesquisas neste campo sofreram um forte impulso com a publicação de livro por David E. Rumelhart e seus colaboradores, descrevendo e popularizando o algoritmo (Hilton, 1992). Desde então, esse algoritmo se tornou uma importante ferramenta no treinamento de redes com múltiplas camadas para desempenho de uma ampla variedade de tarefas. Uma boa descrição sobre a evolução das redes neurais é feita por Lau e Widrow, 1990 e por Widrow e Lehr, 1990.

2.4.1.1 Analogia de Redes Neurais Artificiais com o Sistema Nervoso Humano

Os vários tipos de neurônios encontrados no cérebro possuem os mesmos genes, a mesma organização geral e o mesmo aparato bioquímico das demais células. Eles

diferem basicamente na sua forma, na membrana externa, capaz de gerar impulsos nervosos, e na presença de uma estrutura única para transferir informações entre neurônios. O desenho esquemático de um neurônio é mostrado na Figura 2.5. Tipicamente, este é composto por dentritos, corpo celular, axônio e sinapses.

Os dentritos são um número de estruturas finas localizadas no terminal de entrada dos neurônios. Estes constituem a superfície física através da qual um neurônio recebe sinais de entradas de muitas outras células. O corpo celular contém o núcleo da célula e os mecanismos necessários para executar a síntese de moléculas essenciais à sobrevivência. Desse núcleo projetam-se vários dentritos e um único axônio.

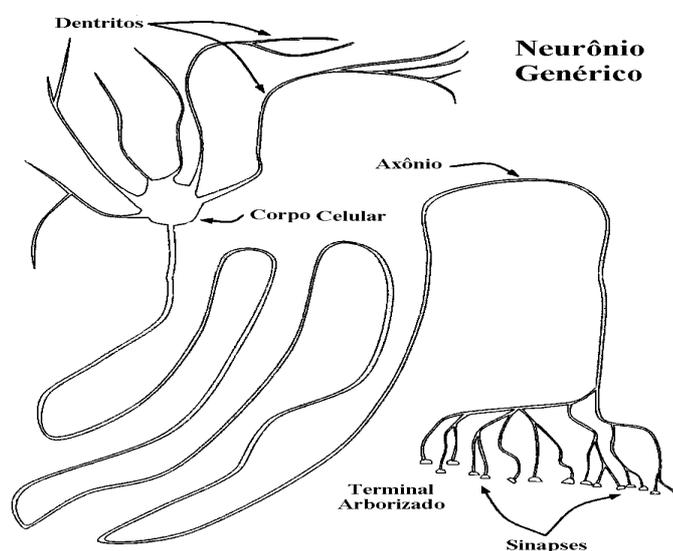


Figura 2.5: Neurônio genérico (adaptado de Anderson, 1995).

O axônio é a “linha de transmissão” do neurônio. É mais longo e fino que os dentritos e se ramifica apenas na parte terminal, permitindo que a informação de uma célula atinja muitas outras. A sua membrana externa propaga impulsos elétricos e libera neurotransmissores em seus terminais.

As sinapses são pontos de contato especializados nos quais a informação é transferida de uma célula para outra. Podem ocorrer entre axônio e dentrito, axônio e axônio, dentrito e dentrito e axônio e corpo celular, permitindo a uma célula influenciar outras.

Uma rede neural artificial (RN) pode ser vista como um conjunto de elementos processadores simples baseados nos neurônios biológicos, conhecidos como neurônios ou nodos, que são ligados uns aos outros através de conexões, análogas às sinapses. Estas conexões guardam o conhecimento da rede e seus padrões de atividade expressam os vários objetos representados por esta. O conhecimento da rede é adquirido por meio de um processo de treinamento no qual, em suas versões mais básicas, apenas as conexões entre as unidades são variadas através de mudanças em seus pesos relativos. A Figura 2.6 mostra a idealização do processo de ativação dos neurônios utilizado pelas redes neurais.

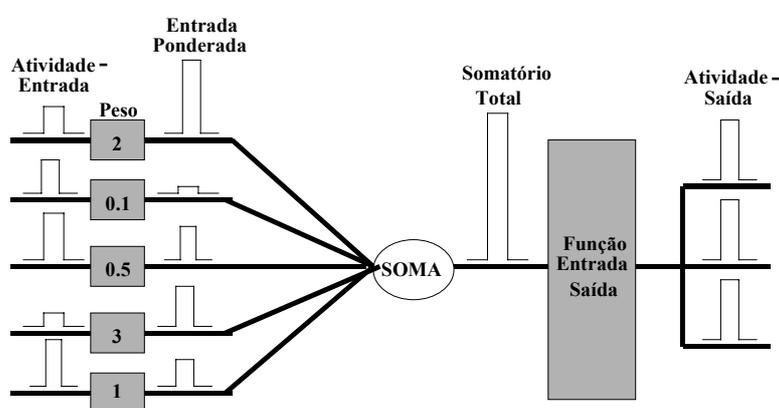


Figura 2.6: Idealização dos neurônios em redes neurais (adaptado de Hilton, 1992).

2.4.2 Estrutura Comum aos Modelos de Redes Neurais

Rumelhart *et al.*, 1986 apontaram um número de componentes comuns a muitos modelos de redes neurais:

- Um conjunto de unidades de processamento: este é o primeiro estágio da elaboração de um modelo de redes neurais. Determina o grau de semelhança entre uma unidade de processamento artificial e um conjunto real de neurônios. Em geral são utilizadas abstrações dos neurônios, de sua arquitetura quando ligados em rede e das funções desempenhadas por esta.
- O estado de ativação: é o padrão de ativação de um conjunto de unidades, que captura o objeto ou evento que a rede representa. O estado de ativação pode ser especificado por

um vetor de ativação que estabelece a ativação de todas as unidades em um dado grupo. A ativação da unidade u_i no tempo t é designado por $a_i(t)$.

– Uma função de saída (ou de transferência): os sinais que fazem com que as unidades interajam são transmitidos por uma função de saída [$o_i(t)=f_i(a_i(t))$, para a unidade i]. A intensidade com que uma unidade interage sobre outra depende do nível de ativação da unidade em questão. A função de saída transforma o estado de ativação de uma unidade em um sinal de saída desta unidade de processamento.

– Um padrão de conectividade entre as unidades: constituído pelo conjunto de ligações entre nodos, determina como a rede responde a uma dada entrada. Tal padrão é codificado em um conjunto de pesos que representam as conexões excitatórias (para pesos positivos) ou inibitórias (para pesos negativos) entre as unidades de processamento. Se o peso for positivo este excitará o nodo aumentando sua ativação, se for negativo inibirá o nodo diminuindo a sua ativação. Em geral os diversos valores das conexões são reunidos em uma matriz de pesos ou matriz de conectividade (W). Nesta matriz cada componente w_{ij} representa a força da conexão entre uma unidade u_i e uma unidade u_j .

– Uma regra de propagação: combina os sinais de entrada de uma unidade de processamento com os valores da matriz de conexões para produzir o efeito total sentido por esta unidade. O valor propagado para a unidade j é denotado como net_j . Em geral, utiliza-se a somatória simples dos sinais de entrada, $net_j = \sum_{i=1}^n w_{ij}i_i$, onde i_i é a entrada j vinda da unidade i .

– Uma regra de ativação: produz um novo estado de ativação da unidade de processamento. Representa o nível de atividade de uma unidade de processamento.

– Uma regra de aprendizagem: representa a mudança dos valores das conexões como função da experiência. As conexões podem ser modificadas através do aparecimento de novas conexões, através da perda ou da modificação das conexões existentes. Este é o aspecto mais explorado em redes neurais adaptativas.

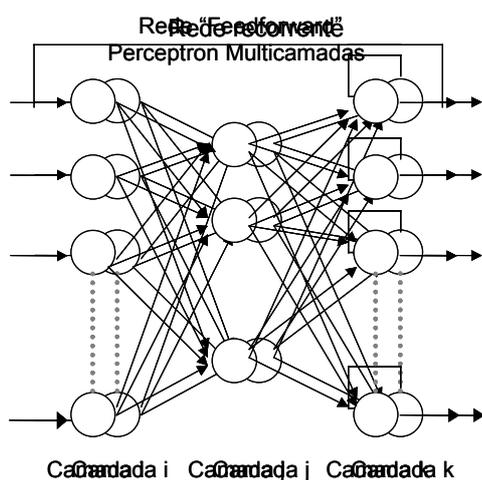
– Uma representação do ambiente: esta representação precisa ser correta e apropriadamente modelada.

Para se propor e implementar um sistema utilizando redes neurais alguns passos são recomendados (Bailey e Thompson, 1990; Stein, 1993):

- 1) Levantamento do conjunto de dados: levantamento das informações que serão empregadas no treinamento e teste do sistema. É conveniente utilizar a maior quantidade de informação disponível, coerentemente com a disponibilidade, recursos e tipo de problema. A qualidade dos dados é mais importante que a quantidade; portanto, além de serem significativos e cobrirem todo o domínio do sistema, os dados selecionados devem ter erros e ambigüidades minimizadas.
- 2) Pré-processamento dos padrões selecionados: preparação da representação dos padrões envolvidos no processo para que a rede os entenda e processe. Os padrões dão origem às variáveis que alimentarão a rede. O pré-processamento pode tratar por exemplo da filtragem de dados para a redução de ruídos, avaliação dos valores médios para utilização posterior, complementação de informações ausentes nos padrões de treinamento e aproximação e arredondamento de valores.
- 3) Organização dos padrões escolhidos: os dados selecionados e tratados são em geral separados em conjuntos de treinamento, validação e/ou teste. Os dados de treinamento são empregados para ajustar os pesos da rede durante a fase de aprendizagem. Na validação, os dados não utilizados no treinamento são empregados para verificar a capacidade de generalização da rede.
- 4) Definição da rede neural: seleção do paradigma neural, determinação da topologia da rede e estabelecimento das funções de rede. O paradigma neural é selecionado de acordo com o problema que se está atacando. Em geral, a escolha se baseia nas soluções utilizadas em problemas similares ou numa mesma família de problemas daquele em questão. A determinação da topologia inclui a especificação do número de unidades e do número de camadas da rede. As funções de rede compreendem regras de propagação, ativação, saída e treinamento e os respectivos parâmetros.
- 5) Treinamento da rede: consiste no ajuste de variáveis tais como pesos, limites de ativação, etc. Os pesos são ajustados até que a saída calculada pela rede se aproxime da saída desejada. Nesta etapa, deve-se focar a inicialização da rede, sua estratégia de treinamento e o tempo de treinamento.
- 6) Teste da rede: visa avaliar o desempenho da rede utilizando padrões não empregados na fase de treinamento.

2.4.3 Modelos de Redes Neurais

RNs podem ser classificadas de acordo com sua estrutura e algoritmos de aprendizagem (Pham, 1995). A estrutura de uma rede neural é determinada pelas conexões entre os seus neurônios e a natureza destas conexões. O ajuste ou treinamento das forças entre as conexões é feito pelo algoritmo de aprendizagem.



Em termos de sua estrutura, redes neurais podem ser divididas em dois tipos: redes “feedforward” e redes recorrentes. A Figura 2.7 ilustra um modelo geral dos dois tipos de redes. Nas redes “feedforward” os neurônios geralmente são agrupados em camadas e o fluxo de informações de uma camada a outra é unidirecional, da entrada para a saída. Os neurônios são conectados entre as camadas e não dentro de uma mesma camada. Nas redes recorrentes as conexões permitem o fluxo de informação em ambos os sentidos entre um par de unidades, e mesmo de uma unidade para ela mesma. O treinamento de tais redes converge mais lentamente.

(A)

(B)

Figura 2.7: Estruturas de redes neurais.

Como já mencionado, o treinamento de uma rede neural envolve a alimentação de um grupo de padrões de entrada-saída conhecidos e o ajuste dos parâmetros da RN até que cada entrada produza a saída apropriada. Em geral, para treinar a rede há o ajuste dos fatores pesos até que o padrão de saída, calculado a partir de uma dada entrada, reflita as relações desejadas.

Com relação ao treinamento, redes neurais podem ser treinadas por dois tipos de algoritmos de aprendizagem: supervisionado e não supervisionado. No algoritmo de aprendizagem supervisionada, os pesos são ajustados de acordo com a diferença entre a saída desejada e a saída obtida pela rede em treinamento. Sendo assim, a aprendizagem supervisionada requer um “professor” para fornecer a saída desejada. Os algoritmos supervisionados são normalmente mais usados em engenharia, pois eles podem garantir uma resposta desejada. O exemplo mais expressivo que faz uso desta aprendizagem é o algoritmo “backpropagation” ou retropropagação. O algoritmo de aprendizagem não supervisionada não requer que a saída desejada seja conhecida. Durante o treinamento, somente padrões de entrada são apresentados à rede que automaticamente se encarrega de mapear um espaço de entrada e um espaço de saída adaptando os pesos das suas conexões e agrupando os padrões de entrada em grupos com características similares. Alguns exemplos das redes que utilizam esta aprendizagem são os modelos Hebbianos, os modelos competitivos e os modelos auto-organizáveis (Hassoun, 1995). Essas redes têm maior aplicação em tarefas de classificação e agrupamento de dados.

2.4.3.1 Perceptron multicamadas

Embora existam vários modelos de redes neurais, enfocaremos aqui o perceptron multicamadas, com os algoritmos de treinamento da retropropagação e de Levenberg-Marquardt, que são utilizados neste trabalho.

O perceptron multicamadas é uma evolução do perceptron de Roseblatt, que surgiu no final dos anos 50 (Lau, 1990). Hoje, o termo perceptron geralmente se refere a entradas conectadas a uma camada única de nodos. As limitações de um perceptron simples desaparecem quando se utilizam camadas intermediárias ou ocultas entre as unidades de entrada e saída. O termo perceptron multicamadas se refere a mais de uma camada de unidades inteiramente interconectadas (Ruck *et al.*, 1992).

A Figura 2.7 (a) mostra o modelo de um perceptron multicamadas. Este é um dos tipos mais comuns de redes neurais artificiais, geralmente consistindo de três camadas: uma de entrada, uma oculta e uma de saída. A informação segue um fluxo unidirecional e a camada de entrada apenas as redistribui. Para a rede desempenhar uma tarefa específica, deve-se escolher como as unidades são conectadas umas às outras e dar valores aos pesos das conexões apropriadamente. As conexões determinam a

influência de uma unidade sobre a outra e os pesos especificam a força desta influência (Hilton, 1992).

A atividade das unidades de entrada representa a informação bruta que é alimentada à rede. A atividade em cada unidade da camada oculta é determinada pela atividade das unidades de entrada e dos pesos das conexões entre as unidades da camada de entrada e oculta. Da mesma maneira, o comportamento das unidades de saída depende da atividade das unidades ocultas e dos pesos das conexões entre estas e as unidades de saída.

Há dois algoritmos muito utilizados para perceptrons multicamada. Em redes pequenas, emprega-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e, para sistemas maiores, o da retropropagação. Ambos são algoritmos de otimização que buscam reduzir a norma dos erros entre valores preditos e as saídas desejadas, utilizadas no treinamento. A função-objetivo, nesse caso, é a soma dos quadrados dos erros, ou o erro quadrático médio.

A escolha da arquitetura a ser utilizada depende do tipo de problema a ser tratado e da experiência do programador. Para escolher a arquitetura mais adequada, é importante lembrar que o tempo de treinamento aumenta geometricamente com o número de unidades e de camadas (Caudil, 1991).

2.4.3.1.1 Algoritmos de treinamento

Há muitos algoritmos de treinamento disponíveis para perceptrons multicamadas. Entretanto, um dos mais populares é o algoritmo da retropropagação. Retropropagação é uma classe particular de algoritmos que emprega aprendizagem supervisionada. Como dito anteriormente, na aprendizagem supervisionada usa-se um erro, que é a diferença entre a saída desejada e a resposta obtida pela rede, para orientação do ajuste dos pesos. Neste algoritmo, os pesos são ajustados de maneira que a saída real se aproxime da saída desejada, através de uma modificação da técnica do gradiente descendente.

Durante o treinamento, a RN processa os padrões de entrada em dois passos. Primeiro aplica-se um padrão de entrada à rede e permite-se que a atividade resultante passe através desta para a camada de saída. Esta saída é certamente errada a princípio, então a rede compara este padrão de saída atual com um desejado para aquela entrada.

Este processo resulta em um erro para cada neurônio na camada de saída. O somatório do erro gerado é então retropropagado, determinando a mudança dos pesos em cada camada (Caudil, 1991). Portanto, são processadas duas operações básicas. A primeira consiste de um somatório dos sinais de entrada ponderados pelos pesos associados a cada um deles, e a segunda operação corresponde à aplicação de uma função de ativação ao resultado obtido na primeira etapa. A função de ativação mais amplamente utilizada é a do tipo sigmoidal, mostrada na Figura 2.8. E a função mais comumente utilizada para realizar o ajuste dos pesos da rede é a Soma dos Quadrados dos Erros (SQE).

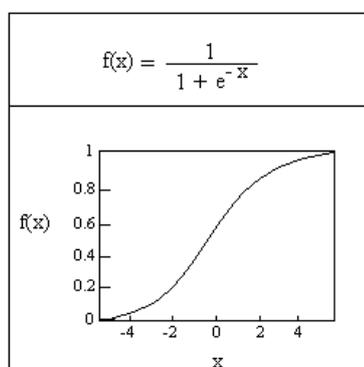


Figura 2.8: Função de ativação sigmoidal.

Como já mencionado, a retropropagação é baseada em uma modificação da técnica do gradiente descendente. A adaptação dos pesos da rede inicia-se com um valor arbitrário para os vetores pesos, W_1 e W_2 . O gradiente de parte da função SQE é aproximado e o vetor peso é alterado em sua direção e no sentido negativo deste. Este procedimento é repetido sucessivamente, até que um mínimo, local ou global, seja alcançado.

A função a ser minimizada é definida por:

$$\phi_p = \sum_{k=1}^{mx} \epsilon_{k,p}^2 \quad (2.1)$$

onde, p indica o número de apresentação de um par entrada-saída. A função SQE muda a cada apresentação e tem o valor ϕ_p na apresentação p . mx é o número de vetores entrada-saída.

Define-se ainda:

$$\Phi_p = \left[\sum_{k=1}^m \varepsilon_{k,p}^2 \right] \quad (2.2)$$

onde, m é a dimensão dos vetores x e y e $\varepsilon_{k,p}$ é definido como:

$$\varepsilon_{k,p} = d_{k,p} - y_{k,p} \quad (2.3)$$

Assim, Φ representa o erro associado a apenas um vetor de saída (o último que foi apresentado), enquanto ϕ é a SQE para todos os vetores.

No método clássico do gradiente descendente, os pesos seriam corrigidos por:

$$W_{p+1} = W_p + (-\nabla\phi_p) \quad (2.4)$$

onde:

$$\nabla\phi_p = \left(\frac{\partial\phi_p}{\partial W_1}, \frac{\partial\phi_p}{\partial W_2}, \dots \right) \quad (2.5)$$

No algoritmo da retropropagação temos, no entanto:

$$W_{p+1} = W_p + \eta(-\nabla\Phi_p) \quad (2.6)$$

onde η é um parâmetro que controla a estabilidade e a taxa de convergência, aqui denominada de taxa de aprendizado, $\nabla\Phi_p$ é o valor do gradiente da função Φ calculado por aproximação na apresentação p , correspondente a $W=W_p$.

Existem ainda variantes do algoritmo da retropropagação. Algumas vezes, o valor de η é reduzido durante o treinamento, para diminuir os efeitos de ruídos sobre a correção dos pesos. Outras vezes pode ter seu valor aumentado, para acelerar o processo de treinamento, ou na tentativa de escapar de mínimos locais. Esta alternativa é chamada de variação do termo de ganho ou algoritmo retropropagação com passo variável (Widrow e Lehr, 1990).

Uma outra abordagem é a técnica do momento, a qual inclui na atualização do vetor peso, ΔW_p , um termo proporcional à mudança dos pesos na iteração anterior, ΔW_{p-1} (Rumelhart *et al.*, 1986).

$$\Delta W_p = (1-\alpha)\Delta W_p - \alpha\Delta W_{p-1} \quad (2.7)$$

onde, α é o termo de momento ($0 < \alpha < 1$).

Já o algoritmo de Levenberg-Marquardt busca minimizar (2.2) combinando os algoritmos de Newton com o do gradiente descende (Himmelblau, 1970). É enfoque clássico para resolver problemas de otimização sem restrições. No entanto, o gradiente

da função objetivo deve ser estimado a cada passo, o que significa que as derivadas das saídas calculadas com relação a todos os pesos, para todos os dados entrada-saída, devem ser aproximadas. Com isso, aumenta-se consideravelmente a demanda de processamento. Essa é a razão por que se emprega o algoritmo de Levenberg-Marquardt para RNs menores, pois sua convergência é, em geral, mais rápida que o de retropropagação. No entanto, para RNs com elevado número de neurônios, o problema pode tornar-se intratável pelo método de Levenberg-Marquardt. Nesse caso, para redes “feedforward”, prefere-se empregar o método da retropropagação.

2.4.3.2 Enfoque híbrido de modelagem de sistemas

A utilização de redes neurais pode seguir enfoques distintos (Psichogios e Ungar, 1992; van Can *et al.*, 1996; van Can *et al.*, 1997). Na abordagem caixa-preta, o desenvolvimento do modelo é dirigido principalmente pelos dados experimentais medidos, ou seja, o modelo do processo é baseado somente nas observações do comportamento de suas entradas e saídas, sem nenhuma preocupação causal fenomenológica. Este método é o único possível quando nenhum conhecimento do processo é disponível. Uma das maiores vantagens desta técnica é que ela consegue gerar um modelo matemático de um sistema sem o conhecimento dos fenômenos que estão ocorrendo no processo. Mas uma grande desvantagem é a sua inabilidade para extrapolações.

No modelo caixa-cinza, também denominado modelo híbrido, combinam-se equações de conservação, que incorporam um certo conhecimento do processo que está sendo modelado, com uma ou mais redes neurais que servem como estimadoras de parâmetros ou variáveis não conhecidos. Neste caso, a rede pode ser treinada para prever parâmetros do modelo fenomenológico, ou para substituir equações constitutivas deste, tais como velocidades de reação (Psichogios e Ungar, 1992; Van Can *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1999; Henriques *et al.*, 1999). Uma representação esquemática de uma rede híbrida é mostrada na Figura 2.9.

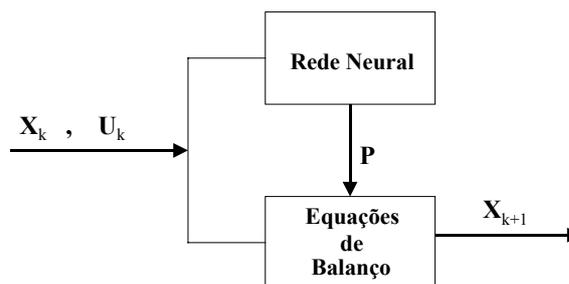


Figura 2.9: Modelo de modelo neural híbrido. A rede estima os parâmetros do processo P , que são usados como entrada para as equações de balanço (Psychogios e Ungar, 1992).

2.4.4 Avaliação do Desempenho de uma Rede Neural

Um dos aspectos mais importantes em redes neurais é a avaliação do desempenho da rede, uma vez que esta tenha sido treinada. Avaliar o desempenho da rede treinada envolve dois aspectos principais, a saber (Baughman e Liu, 1995):

- 1) Como a rede reproduz a resposta predita (vetor de saída) a partir do grupo de dados utilizado no treinamento;
- 2) Como a rede prediz a resposta a partir de um grupo de dados que não foi utilizado no treinamento (verifica a capacidade de generalização da rede).

Diz-se que uma rede generaliza bem quando esta interpola de maneira razoável os padrões que não foram utilizados no treinamento. Como ilustração considere o exemplo em que a rede foi treinada com os padrões de entrada I_1 a I_5 (Figura 2.10). A figura mostra exemplos de uma boa generalização e de uma generalização ruim entre os dados treinados e os dados usados na validação. Uma rede bem treinada deve portanto fornecer um mapeamento entrada-saída com boa capacidade de generalização.

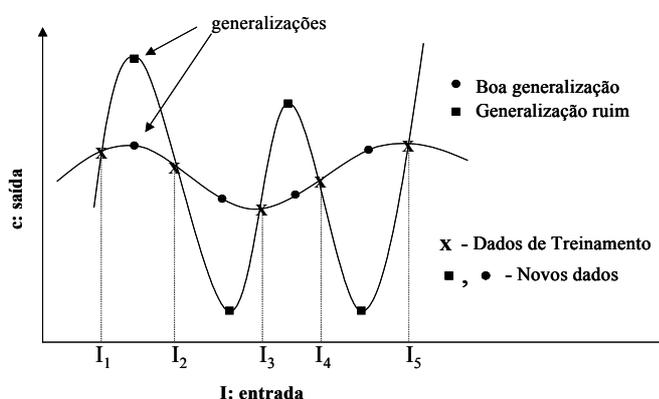


Figura 2.10: Ilustração de uma generalização boa e ruim de uma rede neural treinada (adaptado de Baughman e Liu, 1995).

2.4.5 Utilização de Redes Neurais em Processos Bioquímicos

Uma das principais barreiras em se difundir o uso de modelos e técnicas de controle não lineares nas indústrias químicas e de bioprocessos é o custo do desenvolvimento do modelo e da sua validação. Normalmente custos com modelagem representam mais que 75% dos gastos no desenvolvimento de um projeto de controle avançado (Hussain, 1999). Em bioprocessos, especialmente, a modelagem matemática de culturas microbianas é uma tarefa complexa. Modelos não estruturados desses processos, que descrevem o sistema através de equações de balanço de massa para um número reduzido de variáveis, são relativamente fáceis de formular. Porém, sua solução torna-se complexa por causa da dificuldade de ajuste de suas relações cinéticas que, quando são conhecidas, podem envolver um grande número de parâmetros que têm que ser estimados usando técnicas de otimização não linear.

Como citado anteriormente, bioprocessos são sistemas químicos complexos e não lineares por natureza. O mecanismo global de reação, entendido no arcabouço de uma pseudo-estequiometria do tipo *reagentes (substratos) → produtos*, é muito mais intrincado que o de reações químicas convencionais, por causa dos complexos mecanismos de regulação gênica e dos mecanismos de controle enzimático envolvidos. As dificuldades presentes no uso de técnicas convencionais para modelar tais sistemas complexos fazem das redes neurais uma boa ferramenta para sua modelagem (Baughman e Liu, 1995).

Por ser uma das áreas de maior crescimento dentro do campo da Inteligência Artificial e uma das mais promissoras por sua habilidade em aprender relações não lineares, redes neurais apresentam uma ampla aplicabilidade em processos químicos e bioquímicos, tais como detecção de falhas, identificação de processos não lineares, estimação de estado e “soft sensing” (ou sensoriamento virtual). Hoskins e Himmelblau, 1988, publicaram o primeiro artigo de redes neurais aplicadas em engenharia química, para detecção de falhas em um reator. Desde então, o número de publicações utilizando redes neurais nessa área (aí incluídos os processos bioquímicos) tem aumentado significativamente.

Thibault *et al.*, 1990, utilizaram a técnica de redes neurais na modelagem dinâmica de bioprocessos. A rede neural dinâmica foi empregada para prever as variáveis-chave do processo. Para avaliação de seu desempenho, o método foi

comparado com um filtro de Kalman estendido, algoritmo baseado em modelo fenomenológico do sistema. A rede foi utilizada na simulação de fermentador contínuo perfeitamente agitado e os estudos mostraram que esta foi capaz de generalizar a dinâmica do processo com precisão e relativa imunidade aos ruídos.

Di Massimo *et al.*, 1992, utilizaram redes neurais para modelar bioprocessos de produção da penicilina, destacando a vantagem do uso de redes para inferência de importantes variáveis, em relação às técnicas de inferência baseadas em modelo. Esse trabalho investigou a construção de biossensores para estimativa de biomassa e da concentração de penicilina a partir de dados disponíveis "on-line", em bioprocessos industriais.

A capacidade de redes neurais na modelagem do crescimento em batelada de uma cultura de *Klebsiella oxytoca* ATCC 13882 foi investigada por Syu e Tsao, 1993. Uma função de transferência tipo saturação foi testada. A rede utilizada foi "feedforward" multicamadas com algoritmo da retropropagação e esta se mostrou capaz de simular e prever várias situações.

Um exemplo de uso de redes neurais para controle de pH na produção da penicilina G acilase (enzima estudada neste projeto), por *Arthrobacter viscosus*, microrganismo que, da mesma forma que o *Bacillus megaterium*, expressa a enzima extracelularmente, é descrito por Syu e Chang, 1997. Estes autores usaram uma rede neural recorrente, obtendo bons resultados.

Linko *et al.*, 1997, utilizaram redes neurais como "software sensors" na produção das enzimas glucoamilase (E.C. 3.2.1.3) por *Aspergillus niger*, e lipase (E.C. 3.1.1.3) produzida por *Candida rugosa*. Para isso testaram várias topologias de rede para estimação e predição da atividade enzimática e da concentração de biomassa. As variáveis medidas em linha como pH, agitação, velocidade de consumo de O₂, evolução de CO₂, consumo total de O₂, CO₂ total produzido e consumo de amônia foram usadas como entradas. O número de neurônios na camada oculta e diferentes funções de ativação (tangente hiperbólica, sigmoide e sigmoide bipolar) foram testadas de modo a obter o melhor desempenho. A tangente hiperbólica foi escolhida como melhor função de ativação e para cada enzima foi escolhida uma topologia de rede que melhor estimou a atividade enzimática: lipase (4-7-1) e glucoamilase (4-10-6).

Acuña *et al.*, 1998, utilizaram redes neurais para elaborar modelos estáticos e dinâmicos para estimação "on-line" da concentração de biomassa durante ensaio com culturas batelada de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398, conduzidas com controle de temperatura e pH. Redes neurais recorrentes foram usadas para modelar as fermentações. Os modelos dinâmicos, quando agindo como estimadores, ofereceram respostas mais estáveis que as de modelos estáticos.

Hussain, 1999, apresentou uma extensa revisão das aplicações de redes neurais em controle de processos químicos tanto em simulações como em inferência em linha. Segundo o autor, embora apresentem uma ampla gama de aplicação, redes neurais só tiveram seu uso difundido para controle de processos recentemente. Este trabalho cita seu uso nas três maiores categorias de controle: controle preditivo, controle baseado em modelo inverso e controle adaptativo. Em geral, o controle preditivo tem a vantagem de ser estável, com ações de controle menos bruscas, mas com maior tempo computacional. Técnicas de controle baseado no modelo inverso têm a vantagem da rápida implementação mas requerem ações de controle mais bruscas, o que leva a problemas de instabilidade. As técnicas de controle adaptativo são apropriadas para modelos com variações de parâmetros mas esta estratégia também está propensa a problemas de instabilidade, especialmente em sistemas não lineares. Esta revisão revelou uma grande perspectiva de aplicação de redes neurais em controle de processos, além do uso de redes neurais multicamadas com função de ativação sigmoideal ou hiperbólica como as mais populares.

Uma boa discussão do uso de redes neurais como sensores virtuais em processos de produção de enzimas foi realizada por Linko *et al.*, 1999. Vários fatores que podem afetar o desempenho de uma rede neural foram abordados neste artigo, como sua arquitetura, topologia e função de ativação, além da seleção das variáveis de entrada no treinamento e validação. Foram tratados com exemplos de aplicação em processos a produção de α -amilase, β -galactosidase, gluco-amilase, lipase e xilase.

Além do uso de redes neurais como caixa-preta, onde o processo é representado somente com base em observações das entradas e saídas do sistema, estas têm sido bastante utilizadas juntamente com modelos matemáticos mecanísticos do processo, num enfoque conhecido como caixa-cinza.

Psichogios e Ungar, 1992, apresentaram uma rede neural híbrida e a usaram na modelagem de um biorreator batelada alimentada. O modelo neural híbrido combinava equações de balanço, que incorporam um certo conhecimento do processo modelado, com uma rede neural que serve com estimador dos parâmetros não medidos do processo. A avaliação da rede neural híbrida é feita através da comparação com uma rede padrão e com outros algoritmos estimadores, como o filtro de Kalman estendido e a programação não linear. Uma representação esquemática da rede neural híbrida utilizada pode ser vista na Figura 2.9. A rede recebe como entrada as variáveis do processo e fornece um valor do parâmetro estimado, neste caso, a velocidade de crescimento celular. A saída da rede serve como entrada para as equações de balanço, as quais produzem como saída as variáveis do processo no próximo instante. A combinação dos dois blocos produz a rede neural híbrida completa do sistema bioquímico.

Van Can *et al.*, 1997, utilizaram modelo de rede neural caixa-cinza na modelagem da conversão enzimática (hidrólise) da penicilina G (PenG) a ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e ácido fenilacético (AFA) por penicilina acilase. Os autores apresentaram três diferentes estratégias, que se diferenciam pela quantidade de conhecimento usada no desenvolvimento do modelo: caixa-branca, caixa-preta e caixa-cinza. Na estratégia de modelagem caixa-branca o desenvolvimento do modelo é principalmente dirigido pelo conhecimento dos mecanismos relevantes, os chamados balanços macroscópicos ou equações de balanço. Na estratégia de modelagem caixa-preta o desenvolvimento do modelo é dirigido principalmente pelos dados medidos a partir do sistema real que está sendo modelado. E finalmente a estratégia de modelagem caixa-cinza pode ser definida como a combinação das duas estratégias anteriores, que leva o modelo a boas propriedades de interpolação e extrapolação. O desenho esquemático das três estratégias pode ser visto na Figura 2.11. Os resultados mostraram que a estratégia caixa-cinza teve o melhor desempenho global.

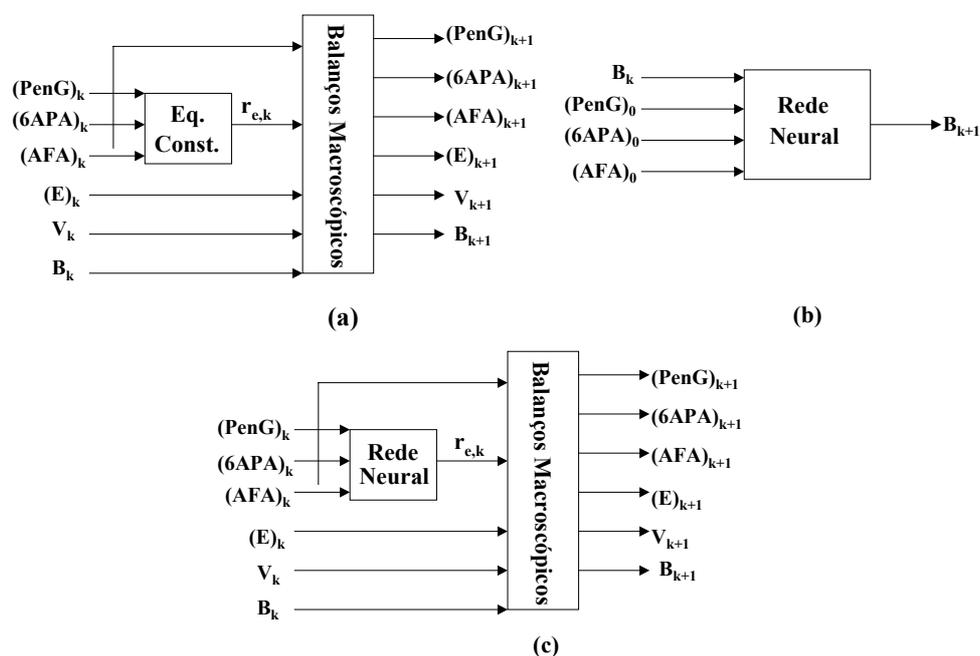


Figura 2.11: Desenho esquemático das três diferentes estratégias na hidrólise da PenG. (a) caixa-branca, (b) caixa-preta e (c) caixa-cinza (Van Can *et al.*, 1997).

Shene *et al.*, 1999, utilizaram os dois enfoques de redes neurais para prever variáveis de estado, tais como concentrações de biomassa, substrato e etanol num processo em batelada alimentada usando *Zymomonas mobilis* CP4, em diferentes condições de composição de meio e temperatura. A primeira estratégia testada foi uma rede “feedforward” caixa-preta e a segunda um modelo híbrido, com uma rede que estimava as velocidades usadas no modelo mecanístico. A Figura 2.12 mostra as duas redes utilizadas. Bons resultados foram obtidos em ambos os casos, mostrando que as redes neurais artificiais podem ser estimadores eficientes para fermentações em batelada alimentada. Esta boa capacidade de predição pode inclusive servir como base para tomadas de decisão, como por exemplo o momento de parada da fermentação.

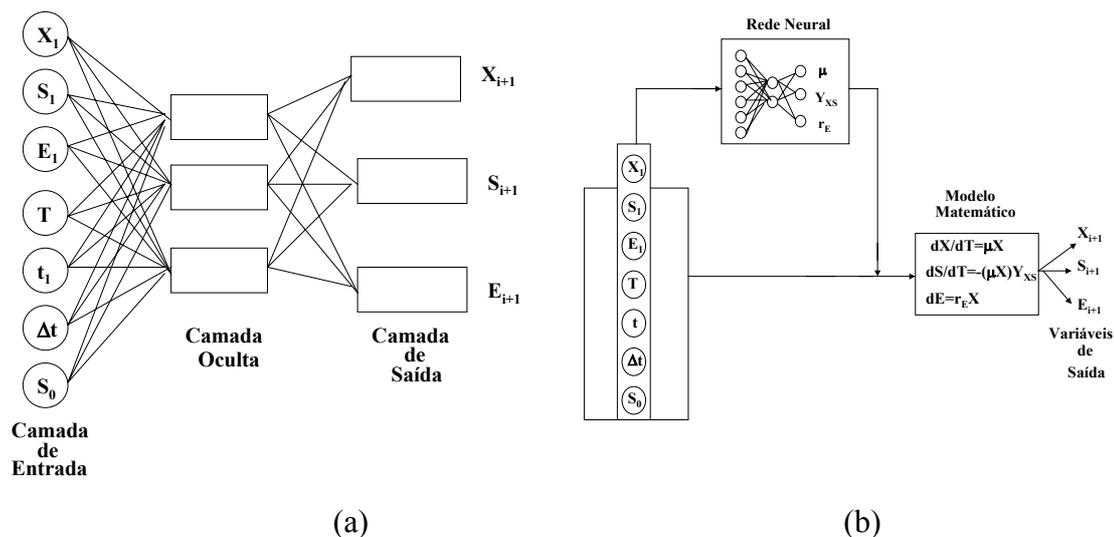


Figura 2.12: (a) Rede neural caixa preta e (b) modelo híbrido para estimar as variáveis de estado da fermentação de *Zymomonas mobilis* CP4, dados o tempo presente e as condições operacionais do processo (adaptado de Shene *et al.*, 1999).

Chen *et al.*, 2000, também utilizaram redes neurais com enfoque híbrido, combinando rede neural que obtinha as velocidades de reação com equações de balanço de massa global. Função de base radial foi a escolha para a função de transferência. As redes foram usadas como modelos não lineares caixa preta para representação das velocidades de reação.

Redes neurais também podem ser utilizadas para controle de bioprocessos. Patnaik, 1999, utilizou controle neural em biorreator batelada alimentada na produção de β -galactosidase por uma linhagem recombinante de *Escherichia coli*. A maioria das aplicações utilizando redes neurais para controle é dirigida a pequenos reatores, onde problemas com agitação e perturbações são muitas vezes desprezíveis. Sendo assim, para simular uma situação industrial, foram adicionados ruídos aos dados gerados pelo modelo determinístico. Para mostrar a eficácia do controlador, este foi comparado a controlador PID, que se mostrou inferior para esta aplicação.

Várias outras aplicações de redes neurais em bioprocessos são reportadas na literatura; entre elas pode-se citar: a utilização para detecção de falhas (Shimizu *et al.*, 1998) e o seu uso em otimização de biorreatores (Lednický e Mészáros, 1998; Chaudhuri e Modak, 1998).

2.5 Monitoração e Controle de Bioprocessos

O aumento da competição global tem exercido considerável pressão no sentido de se operar com as plantas existentes de forma mais eficiente. Em paralelo, cresce a importância de instalações multipropósito de maior flexibilidade. Essas estratégias só podem realizar-se com apoio intensivo de recursos computacionais que permitem melhor monitoração e controle do processo e conseqüentemente, operação mais eficiente dessas plantas (Seborg *et al.*, 1989).

Em relação aos processos biotecnológicos, a pressão econômica para melhorar rendimentos, aumentar produtividade e aprimorar o controle de qualidade dos produtos fez com que esses processos fossem pouco a pouco automatizados. Dessa forma, os sistemas de monitoração, além de gerarem os tradicionais bancos de dados contendo informações do processo, realizam também tarefas de identificação em linha e controle adaptativo, otimizando o processo fermentativo.

Segundo Soroush, 1998, há diversos processos onde muitas variáveis essenciais, que especificam a qualidade do produto, não podem ser medidas ou suas medidas apresentam considerável atraso devido à natureza dos sensores. Embora enfocando reatores de polimerização, as observações desse autor se aplicam perfeitamente aos reatores bioquímicos. Em ambos os casos, aplicações de técnicas de estimação de estado e parâmetro são essenciais. Embora a qualidade dos produtos não possa ser medida facilmente, esta pode ser estimada em tempo real a partir de medidas disponíveis. Sendo assim, há atualmente considerável esforço de pesquisa em duas direções: o desenvolvimento de novos sensores e o desenvolvimento de estimadores de estado que sejam capazes de inferir as variáveis não medidas (Parsons, 1987, apud Meleiro, 1998; Konstantinov, 1996).

Vários estimadores têm sido estudados para processos químicos de maneira geral. Entre estes, estão estimadores baseados em modelos do processo, que devem fornecer uma estimativa segura das variáveis desconhecidas mesmo na presença de erros no modelo e de perturbações não medidas. O filtro de Kalman é uma técnica de estimação de estado, em que inferências são obtidas pelo balanceamento das contribuições de um modelo determinístico do processo dinâmico com os dados mensurados. Se o processo e o modelo medido são perfeitos, então as duas fontes de

informação serão consistentes e ambas individualmente levarão ao mesmo estado estimado (Grewal e Andrews, 1993).

Em reatores batelada alguns parâmetros do modelo são freqüentemente desconhecidos e variantes no tempo devido a mudanças na concentração, temperatura, viscosidade, etc. Portanto torna-se necessário estimá-los junto com as variáveis de estado do reator. Bonvin *et al.*, 1989 e Vallière e Bonvin, 1989, aplicaram o filtro de Kalman estendido na investigação experimental dos efeitos térmicos em um reator de bancada, tratando de vários aspectos da modelagem do reator do ponto de vista experimental e teórico. No primeiro artigo os autores apresentaram o desenvolvimento do modelo, as análises dinâmicas e a validação do modelo para estimação em linha dos estados e parâmetros do reator. No segundo apresentaram as equações para a implementação do filtro de Kalman e a aplicabilidade deste como estimador em processos batelada.

Técnicas de estimação baseadas em modelos, quando aplicadas em escala industrial, apresentam muitas dificuldades que não são observadas em estudos de simulação apenas. Wilson *et al.*, 1998, avaliaram vantagens e deficiências do uso do filtro de Kalman estendido como estimador em um reator batelada industrial. Suas conclusões servem como recomendações e alerta para aplicações industriais futuras.

Soroush, 1998, apresentou uma revisão de diversos métodos atuais de estimação de estado e parâmetros e suas aplicações em controle inferencial e controle adaptativo. Apresentou os limites e possibilidades de cada método, tanto lineares como não lineares, entre eles, filtro de Kalman e observadores de Luenberger. Trabalhos utilizando filtro de Kalman estendido adaptativo (Lee *et al.*, 1991) e observador de Luenberger estendido adaptativo (Shimizu *et al.*, 1988) também são encontrados na literatura.

O uso de computadores para controle de processos fermentativos tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas: o advento de microprocessadores velozes e de baixo custo tem causado um enorme impacto nas aplicações em tempo real em biorreatores. Trabalhos integrados entre microbiologistas, bioquímicos, técnicos de bioprocessamento, engenheiros de controle, engenheiros químicos e matemáticos vêm permitindo viabilizar a implementação, em processos reais, de algoritmos modernos

para identificação de tendências, inferência de variáveis (“soft sensors”), estimativas de parâmetros e controle dos processos biológicos.

Além do rápido desenvolvimento na área de controle de processos, os computadores têm sido úteis na modelagem dos processos de fermentação visando à otimização do processo, diminuição de custos com matéria prima e do tempo de produção.

Mesmo assim, a indústria de fermentação apresentou um certo atraso na implementação de tecnologia de controle e otimização, com relação aos outros processos industriais, por inúmeras razões (Lim e Lee, 1991). Processos fermentativos são muito mais difíceis de entender pois envolvem um grande número de reações bioquímicas complexas e processos de transporte, apresentando assim uma dinâmica altamente não linear. A falta de medidas confiáveis em linha de variáveis de processo e a dificuldade de se definir relações quantitativas entre crescimento microbiano e produção, fazem com que informações cruciais não possam ser obtidas através de mensuração em tempo real.

As variáveis físicas mais importantes, que influenciam na função celular e no custo operacional de bioprocessos, são: temperatura, pH, pressão, agitação, viscosidade do caldo, vazões de gases e líquidos e conteúdos em massa e volume do reator (Schügerl, 1991). Para algumas dessas variáveis, infelizmente não se dispõem de instrumentos de medida eficazes para monitoramento contínuo durante o processo de fermentação.

Segundo Lim e Lee, 1991, para melhor controle e otimização de processos fermentativos seria necessário medir em linha um número de parâmetros fisiológicos chave. Medidas em tempo real de alguns desses parâmetros são muito difíceis. Embora exista um esforço para desenvolver tais sensores, a disponibilidade e a confiabilidade dos instrumentos ainda são muito limitadas, pois alguns apresentam problemas de convergência e lentidão de resposta. Sendo assim, há a necessidade de se estimar esses parâmetros a partir de variáveis mensuráveis. Por exemplo, a concentração celular é uma das variáveis fundamentais num processo de fermentação e simultaneamente uma das mais difíceis de medir. Sem a monitoração desta não é possível obter variáveis derivadas como a velocidade específica de crescimento, nem estabelecer relações entre parâmetros característicos da atividade metabólica da cultura. Nesse caso, a

implementação de algoritmos eficientes de inferência é essencial para o controle e/ou otimização baseados em computador.

Sensores baseados em "software" são alternativa viável neste caso. Baseiam-se em algoritmos para estimativa "on-line" de variáveis do sistema bioquímico, que partindo de variáveis disponíveis em linha, denominadas variáveis secundárias do processo (como a concentração dos gases na saída do sistema, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido no meio), estimam as variáveis primárias (como concentração celular, por exemplo). Um "software sensor" é descrito por Farza *et al.*, 1999, como a associação entre um sensor ("hardware") e um estimador ("software").

2.5.1 Técnicas de Inferência em Bioprocessos

O reconhecimento da necessidade de medidas em linha tem estimulado o desenvolvimento de novos sensores para variáveis de interesse na operação de reatores bioquímicos. Como foi dito anteriormente, a maioria destes sensores apresentam problemas de convergência e resposta lenta, além de alguns deles não estarem comercialmente disponíveis. Sendo assim, segundo Stephanopoulos e San, 1984, a maioria dos estudos de estimativa em linha são baseados nas medidas das concentrações de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) nos gases de saída, pois seus respectivos sensores, analisadores infra-vermelho e analisadores paramagnéticos, estão comercialmente disponíveis, além de apresentarem rápida resposta e alta confiabilidade. Portanto, estes instrumentos de medidas têm se tornado parte integrante na instrumentação dos biorreatores. Nesses processos, o estado do sistema não pode ser medido, mas este é observável através de medida das variáveis secundárias.

As medidas de concentração de O_2 e CO_2 nos gases de saída podem ser usadas em conjunto com modelos matemáticos do processo para deduzir os valores das variáveis e parâmetros não medidos. Balanços dos elementos C, H, N, O e outros, podem também ser usados em conjunto com as medidas dos gases de saída para estimar algumas quantidades não diretamente medidas, tais como concentração de biomassa e produto. Medidas de vazão dos gases de entrada e saída e respectivas composições podem ser usadas para calcular por exemplo, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$). O fato é que uma grande quantidade de informações adicionais pode ser obtida a partir das medidas disponíveis.

As ferramentas computacionais hoje disponíveis são também aplicadas como suporte para a validação e ajuste paramétrico de modelos (estruturados ou não) do processo fermentativo. Coeficientes de transporte de massa e constantes cinéticas são estimados desta forma, permitindo aprofundar o conhecimento dos fenômenos bioquímicos, e físico-químicos que ocorrem durante a fermentação.

Devido à alta não linearidade da dinâmica dos bioprocessos, modelos de aproximação linear não são indicados para descrevê-los. Portanto, os estimadores de bioprocessos têm que utilizar técnicas de estimativa não linear, baseadas ou não em modelos, como por exemplo: filtro de Kalman estendido e redes neurais artificiais.

Dentre as diversas estratégias usadas para identificação e inferência do estado de reatores químicos e bioquímicos, destaca-se a clássica estratégia do filtro de Kalman, que é uma técnica baseada em modelos de processo num enfoque conhecido como caixa branca.

San e Stephanopoulos, 1984, apresentaram resultados numéricos e experimentais da metodologia generalizada de estimação de estado apresentada no primeiro artigo da série (vide Stephanopoulos e San, 1984). A técnica utilizada foi o filtro de Kalman, que foi escolhida entre outros estimadores na etapa de simulação, por apresentar rápida detecção nas variações dos parâmetros, rápida convergência e concordância entre os valores estimados e os valores reais. Segundo os autores, a principal característica de um bom estimador é a sua habilidade de detectar mudanças ou variações nos valores de importantes parâmetros de cultura, uma vez que estas podem ocorrer durante o curso de uma fermentação. A metodologia foi empregada na estimação de variáveis de estado e parâmetros na fermentação da *S. cerevisiae* para produção de etanol, apresentando bons resultados.

Os resultados da inferência estão sempre sujeitos aos erros de predição do modelo – que nunca será intrinsecamente correto. Para diminuir esse efeito, é possível projetar estimadores adaptativos, que estimem simultaneamente o estado e alguns parâmetros do processo. Ramirez, 1987, apresentou a simulação de um processo específico, a fermentação de cerveja, que requer a identificação simultânea de estado e parâmetros. Um filtro de Kalman foi empregado na identificação de parâmetros e de estado. O algoritmo combinado mostrou ser capaz de estimar corretamente o estado do processo, mesmo quando parâmetros do modelo são incertos.

2.5.2 Modelagem, Simulação e Controle de Processos Fermentativos no DEQ/UFSCar

A área de pesquisa de Simulação e Controle de Processos do DEQ/UFSCar, em colaboração com a área de pesquisa em Engenharia Bioquímica, tem desenvolvido trabalhos que tratam de modelagem do cultivo de microrganismos em biorreatores (Cruz *et al.*, 1995; Cruz *et al.*, 1998).

Cruz, 1996, em seu trabalho de mestrado, desenvolveu um modelo matemático não estruturado para descrever o bioprocesso de produção da penicilina G pelo microrganismo *Penicillium chrysogenum* IFO 8644, em reator convencional operado no modo batelada alimentada. Neste mesmo trabalho, utilizaram-se redes neurais para a simulação deste bioprocesso. Três técnicas de treinamento foram estudadas: Retropropagação, Busca Direta Aleatória e uma terceira que associava as duas abordagens. A base de dados foi construída com o auxílio do modelo fenomenológico. As simulações realizadas mostraram excelente ajuste dos dados em situações de interpolação, mesmo na presença de ruídos aleatórios simulados nas variáveis de operação.

Em seu trabalho de doutoramento Cruz, 2000, instalou nos laboratórios sistema de aquisição de dados e controle via controlador lógico programável para a produção do antibiótico β -lactâmico cefalosporina C por fungo filamentosso *Cephalosporium acremonium*, num biorreator Bioflo II-C, New Brunswick. Este sistema permite monitorar em tempo real variáveis como temperatura, pH, vazão de aeração, velocidade e torque de agitação, oxigênio dissolvido, fração molar de O₂ e CO₂ nos gases de escape, azoes de gases, de adição de base/ácido para controle de pH e de meio suplementar, em processo tipo batelada alimentada.

Meleiro, 1998, estabeleceu uma metodologia para tratamento e análise de sinais no processo de produção de cefalosporina C, utilizando o sistema de aquisição de dados citado acima. A metodologia empregada para tratar e extrair tendências dos sinais do processo foi baseada na análise de sinais em múltiplas escalas utilizando "wavelets". Para tal, utilizou-se o aplicativo correspondente do "software" MATLAB 5.0.

Sousa Jr., 1999, implementou sistema de controle nebuloso ("fuzzy") para a determinação do momento em que deveria ser iniciada a adição de sacarose ao sistema fermentativo de produção de cefalosporina C em regime batelada alimentada. O

programa foi desenvolvido em linguagem C. Foram realizados três experimentos, monitorados em tempo real. Os dados coletados durante os dois primeiros ensaios, além dos já disponíveis, permitiram estabelecer as funções de pertinência e a base de regras do controlador. O terceiro experimento, por sua vez, foi realizado com o objetivo de se testar desempenho e robustez do algoritmo e eventualmente permitir melhor ajuste dos parâmetros do sistema. Os resultados indicaram que o algoritmo foi robusto nas condições testadas, possibilitando uma atuação segura e automática.

2.6 Cinética de Processos Fermentativos

Microorganismos são sistemas complexos, que podem adaptar seu metabolismo a um grande número de condições ambientais (físicas, químicas e nutricionais) e conseqüentemente mostram vários comportamentos. Sendo assim, o crescimento microbiano pode ser visto a partir de várias perspectivas e com variado grau de complexidade, dependendo da distinção entre células individuais dentro do reator ou do exame das reações metabólicas individuais ocorrendo dentro da célula (Blanch e Clark, 1997). Cada microorganismo tem necessidades nutricionais específicas. Em todas as culturas microbianas é preciso que o meio de cultura contenha água, fontes de energia, carbono, nitrogênio, sais minerais, vitaminas e oxigênio (no caso de fermentação aeróbia). Esses requisitos são essenciais para que as células sintetizem todos os componentes necessários à manutenção e divisão celular. O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores das concentrações de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Esses componentes são: o microorganismo, os produtos do metabolismo e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura (Hiss, 2001).

2.6.1 Fases do Crescimento Microbiano em Culturas em Batelada

Em um processo batelada típico, quando as células são inoculadas no reator contendo meio de cultura fresco, os microorganismos consomem os nutrientes dissolvidos no meio e os convertem em biomassa. Tanto na natureza como em laboratórios, o crescimento de populações microbianas se torna limitado, seja pela exaustão de nutrientes disponíveis, seja pelo acúmulo de substâncias tóxicas. Como essas mudanças no ambiente decorrem do crescimento do próprio microorganismo, o

desenvolvimento deles é auto-limitado, ou seja, as culturas crescem exponencialmente por um curto período de tempo até que o crescimento cessa seguido da morte da população microbiana. Quando esse processo é monitorado, diversas fases de crescimento podem ser observadas. A Figura 2.13 mostra estas etapas de crescimento das culturas batelada.

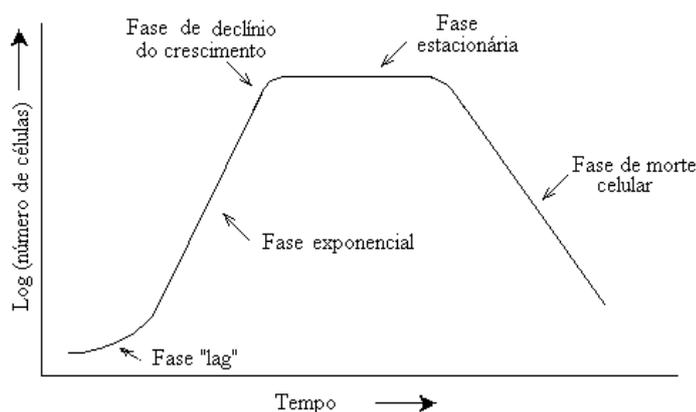


Figura 2.13: Curva de crescimento típica para cultivo de células em batelada (adaptado de Blanch e Clark, 1997).

Após a inoculação, há um período no qual pouco ou nenhum crescimento ocorre. Este é considerado como uma fase de adaptação (fase “lag”). Nesta fase a biomassa inoculada dentro do biorreator se adapta a novas condições químicas e físicas, reorganizando seus constituintes moleculares quando é transferida para um novo meio. Quando a quantidade de inóculo é pequena ou contém poucas células que são viáveis, pode ocorrer uma pseudo-fase “lag” que não é devida à adaptação mas sim resultado da pequena quantidade de inóculo ou das precárias condições deste (Shuler e Kargi, 1992). A fase de adaptação pode resultar de diversos fatores. Se o inóculo cresce em um meio contendo uma fonte de carbono diferente da anterior, novas enzimas podem ser induzidas para o catabolismo do novo substrato, contribuindo assim para uma maior duração da fase “lag”. Baixas concentrações de alguns nutrientes e de fatores de crescimento também contribuem para a ocorrência desta fase. A idade do inóculo tem um forte efeito na duração da fase “lag”, que tende a aumentar com o aumento dessa idade. Em alguns casos há uma idade ótima, que resulta numa fase “lag” mínima.

Múltiplas fases “lag” podem ser observadas quando as células são inoculadas num meio com várias fontes de carbono. Este fenômeno é conhecido como efeito diáuxico, onde as células preferencialmente utilizam a fonte de carbono mais facilmente assimilável para então adaptar o seu metabolismo para utilizar a segunda fonte. Isto ocorre devido à repressão catabólica das enzimas necessárias para o metabolismo do segundo substrato.

No fim da fase “lag” a população de microrganismos está bem adaptada ao novo ambiente. Depois deste período de adaptação, as células podem se multiplicar rapidamente e a massa celular aumentar exponencialmente com o tempo sem nenhum indício de inibição. Esta fase é chamada de fase de crescimento exponencial. Este é um período de crescimento balanceado, no qual todos os componentes de uma célula crescem com a mesma taxa, ou seja, a composição média de uma célula simples permanece aproximadamente constante. Assim permite-se concluir que a velocidade de crescimento é proporcional à concentração celular X . A fase exponencial pode ser escrita pela equação de primeira ordem:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{ou} \quad \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu \quad (2.8)$$

com $X=X_0$ a $t = t_{lag}$,

que descreve o aumento do número de células neste período, e onde μ é a velocidade de crescimento específico das células. Integrando a equação (2.8), tem-se:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu(t - t_{lag}) \quad \text{ou} \quad X = X_0 e^{\mu(t - t_{lag})} \quad (2.9)$$

onde $t > t_{lag}$.

Juntamente com a velocidade específica μ , a fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração τ_d , que é o intervalo de tempo necessário para a massa celular dobrar:

$$\tau_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.10)$$

Seguindo a fase de crescimento exponencial tem-se a fase de declínio, onde há a diminuição de um ou mais nutrientes essenciais (fonte de carbono ou nitrogênio) ou o

acúmulo de algum produto tóxico do metabolismo ou inibidor. Para uma cultura típica de bactéria, esta fase ocorre num período muito curto de tempo, caracterizando um crescimento desbalanceado.

A fase estacionária é aquela fase onde a taxa de crescimento é zero (sem divisão celular) ou a velocidade de crescimento é igual à velocidade de morte. Mesmo com taxa de crescimento igual a zero durante esta fase, as células ainda estão metabolicamente ativas e metabólitos secundários (não associados ao crescimento) são produzidos. Na maioria dos casos, a cultura permanece na fase estacionária durante horas, ou mesmo dias, antes que a morte das células se torne perceptível.

Finalmente a fase de morte, onde não há mais crescimento e ocorre a lise celular com uma redução significativa das células viáveis. Algumas células morrem durante a fase estacionária e uma clara demarcação entre essas duas fases nem sempre é possível. A velocidade de morte geralmente segue uma cinética de primeira ordem:

$$\frac{dX}{dt} = -K'_d X \quad \text{ou} \quad X = X_s e^{-K'_d t} \quad (2.11)$$

onde X_s é a concentração das células no fim da fase estacionária e K'_d é a constante cinética de morte, de primeira ordem.

2.6.2 Os Fatores de Conversão: Rendimentos em Biomassa e Produto

O crescimento celular e a formação de produto são resultantes da bioconversão, pelos microrganismos, dos nutrientes presentes no meio de fermentação. Em um determinado tempo t de fermentação, os correspondentes valores de X , S e P podem ser relacionados pelos fatores de conversão (ou pseudo-estequiométricos) globais, expressos matematicamente por:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2.12)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad (2.13)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2.14)$$

2.6.3 Influência das Condições Ambientais no Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano e a formação de produto são resultantes da atividade fisiológica dos microrganismos e são fortemente influenciados pelas condições ambientais, tais como, temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido (Shuler e Kargi, 1992). Por isso a importância do monitoramento em linha dessas variáveis através de sistemas de aquisição de dados.

Temperatura é uma importante variável, que pode afetar o desempenho das células. De acordo com sua temperatura ótima os microrganismos podem ser classificados em três grupos: psicrófilos ($T_{opt} < 20^{\circ}\text{C}$), mesófilos (T_{opt} entre 20° e 50°C) e termófilos ($T_{opt} > 50^{\circ}\text{C}$). Conforme a temperatura vai aumentando em direção à temperatura de crescimento ótima, a velocidade de crescimento dobra aproximadamente para cada 10°C . Porém, acima da temperatura ótima, a velocidade de crescimento diminui e morte térmica pode ocorrer. A temperatura pode afetar também a formação de produtos e o coeficiente de rendimento.

A concentração de íons hidrogênio (pH) afeta as atividades das enzimas e portanto a velocidade de crescimento microbiano. O seu valor pode afetar o crescimento, a formação do produto de interesse, o metabolismo de vários nutrientes e algumas atividades fisiológicas celulares. O pH ótimo para crescimento necessariamente não é o mesmo de formação de produtos. Diferentes microrganismos apresentam diferentes faixas de pH; por exemplo, para a maioria das bactérias a faixa de pH ótima é de 3 a 8. Muitos microrganismos têm mecanismos para manter o pH intracelular relativamente constante na presença de flutuações do meio. O pH do meio de fermentação, durante o desenvolvimento do microrganismo, depende dos constituintes do meio de cultura e do próprio microrganismo. Pode variar por causa da produção ou consumo de ácidos ou bases orgânicos. A evolução do CO_2 dissolvido pode alterar significativamente o pH em alguns sistemas, por isso seu controle por meio de tampão ou de um sistema de controle ativo são de extrema importância.

Microrganismos aeróbios são dependentes do mecanismo da respiração para a geração de energia, por isso necessitam de oxigênio molecular como receptor de hidrogênio e elétrons. Devido à baixa solubilidade do oxigênio na água, é essencial a transferência contínua deste para o meio líquido de crescimento. Essa transferência se dá pela aeração do meio de cultura. Oxigênio dissolvido é um importante substrato em

fermentações aeróbias e pode também ser um substrato limitante. O estudo desta variável é de suma importância para que se tenha uma boa produtividade e deve ser considerada como um reagente indispensável, semelhante a outros presentes no meio reacional. A altas concentrações celulares, a velocidade de consumo de oxigênio pode exceder a velocidade de fornecimento, levando a limitações deste. Quando o oxigênio é a variável limitante, a velocidade de crescimento específico varia com sua concentração. Abaixo de uma concentração crítica, a velocidade de crescimento é dependente da concentração de oxigênio dissolvido (Stanbury *et al.*, 1999).

2.6.4 Modos de Operação de Processos de Fermentação

Na proposição de um modelo matemático deve-se considerar ainda o modo de operação do processo fermentativo. Cultivos em batelada, contínuo e em batelada alimentada são os modos de operação mais utilizados em processos de produção de uma grande variedade de metabólitos (Modak e Lim, 1992).

A operação em batelada é amplamente usada em cultivos comerciais. Em um processo em batelada convencional, todos os nutrientes, exceto o oxigênio molecular, são adicionados ao meio antes do início do processo e o(s) produto(s) final (is) são removidos somente no fim do cultivo. No início do processo em batelada os nutrientes são carregados e o biorreator é inoculado com certa quantidade de biomassa viável. A biomassa cresce exponencialmente, até que o substrato limitante seja praticamente esgotado. Há uma variação contínua das concentrações de nutrientes e produtos, que dependem das concentrações iniciais e de outros parâmetros, tais como temperatura, pH, etc.

Em um processo contínuo todos os nutrientes são continuamente adicionados ao biorreator e com a mesma vazão, frações do meio são removidas com a finalidade de se manter o volume do meio constante. A fermentação contínua é uma modalidade de fermentação submersa na qual é possível manter uma população microbiana num estado fisiológico definido (Bailey e Ollis, 1986). Partindo-se de uma cultura em batelada até que seja atingida a fase de crescimento exponencial, inicia-se a adição contínua de meio de cultivo fresco, com retirada simultânea de meio e biomassa. O biorreator contínuo é também denominado quimostato.

No processo em batelada alimentada um ou mais nutrientes são adicionados durante o cultivo e os produtos aí permanecem até o término da fermentação. O êxito na utilização de processos em batelada alimentada se deu principalmente pelo melhor controle do processo e mais eficiente utilização dos componentes do meio (Whitaker, 1980). Nos casos em que mudanças nas concentrações de nutriente(s) afetam o produto ou a produtividade do metabólito desejado, a batelada alimentada mostrou-se superior à batelada convencional (Yamane e Shimizu, 1984). Vários objetivos justificam empregar processos em batelada alimentada, a saber (Yamane e Shimizu, 1984; Schmidell *et al.*, 2001): (1) minimização dos efeitos do controle do metabolismo celular, como repressão catabólica, quando glicose ou outras fontes de carbono rapidamente metabolizáveis reprimem a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono; (2) prevenção da inibição por substratos ou precursores; qualquer fonte de nutriente pode se tornar inibitória, dependendo da concentração do meio, do microrganismo e das condições de fermentação; (3) minimização da formação de produtos tóxicos de metabolismo; a produção destes produtos é particularmente crítica em processos de alta densidade celular. Processos em batelada alimentada têm sido utilizados na produção de uma ampla variedade de produtos, com a perspectiva de se aumentar produtividades. Entre eles estão antibióticos, vitaminas, aminoácidos, enzimas e outros.

2.6.5 Modelos cinéticos de bioprocessos

De um modo geral a escolha do modelo cinético do processo depende do nível de complexidade com que se deseja caracterizar a população de células do sistema e deve atender a pelo menos um dos seguintes requisitos: discriminar possíveis mecanismos de controle do metabolismo celular; auxiliar no projeto do biorreator e na otimização das condições de operação; ou permitir um posterior desenvolvimento de técnicas de controle do processo (Araújo, 1996). Ao se propor um modelo de fermentação, pretende-se descrever o processo de crescimento do microrganismo, a síntese de determinado produto e se possível, prever os efeitos observados ao se variar composição do meio e condições operacionais do cultivo. Para isso, o modelo estabelecerá relações de causa e efeito entre as variáveis, tais como concentrações de substratos, biomassa e produto.

Uma descrição completa da cinética de crescimento de uma cultura envolve o reconhecimento da natureza estruturada de cada célula e a segregação da cultura em células individuais que podem diferir uma da outra. Modelos de crescimento microbiano podem ter estes mesmos atributos. Quando a população é segregada em células individuais que são diferentes uma das outras em termos de algumas características, o modelo é denominado segregado. Este modelo é matematicamente complexo. Por outro lado, no modelo não segregado a população celular é representada por suas propriedades médias e pode ser descrito por uma variável somente (Bailey e Ollis, 1986; Blanch e Clark, 1997). Modelos não segregados têm a vantagem de serem matematicamente simples.

Quando se consideram os detalhes das reações ocorrendo dentro de uma célula tem-se o conceito de estrutura. Modelos estruturados consideram reações individuais ou grupos de reações ocorrendo dentro da célula. Esses modelos, ao nível de componentes moleculares e macromoleculares, que levam em conta mecanismos metabólicos de síntese de proteínas, enzimas e outros bioprodutos, são mais difíceis de se aplicar, principalmente em função da dificuldade de mensurar metabólitos intracelulares. A biomassa é subdividida em vários componentes e as reações que ocorrem entre estes componentes são descritas, caracterizando representações celulares multicomponentes. Apesar de sua natureza ainda simplificada, modelos estruturados são geralmente baseados em alguns mecanismos celulares bem conhecidos e portanto têm a habilidade de simular bem certas características experimentais.

O modelo não estruturado assume fixa a composição celular. Sendo assim, o crescimento de biomassa, a formação de metabólitos e o consumo de substrato são descritos em termos de somente uma variável celular – e a escolha natural recai na concentração de biomassa, X . Esse modelo considera apenas algumas propriedades das células, não levando em conta diferenças individuais, desprezando assim detalhes de sua estrutura e diferenças biológicas. O desenvolvimento de um modelo não estruturado exige essencialmente a aplicação de três relações básicas ao volume de controle do fermentador, a saber: (1) os balanços envolvendo massa total, componentes individuais e, eventualmente, energia; (2) as velocidades de consumo de substrato, formação de produtos e ainda de transferência de massa e energia; (3) relações termodinâmicas e de

equilíbrio. Respostas da cultura frente a rápidas e fortes perturbações não podem ser descritas satisfatoriamente por este modelo (Nielsen e Villadsen, 1993).

2.6.5.1 Modelos Não Estruturados

Balanços de massa e energia, além de cinéticas tradicionais de crescimento celular, de consumo de substratos e formação de produtos são muito utilizadas em modelos não estruturados. Assim, os parâmetros são representados respectivamente por coeficientes estequiométricos e/ou rendimentos, constantes de velocidades de consumo de substratos e/ou formação de produtos, constantes de saturação, inibição e outras.

Um dos modelos não estruturados mais simples e mais conhecidos e que inclui o efeito da concentração de nutriente, desenvolvido por Jacques Monod em 1942, foi baseado nas observações do crescimento da *E. coli* a várias concentrações de glicose (Bailey e Ollis, 1986; Shuler e Kargi, 1992; Blanch e Clark, 1997). Neste modelo propôs-se uma relação entre a velocidade específica de crescimento celular (μ) e a concentração de substrato limitante (S). A cinética de crescimento celular de Monod pode ser expressa pela equação (2.15):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (2.15)$$

onde μ_{\max} é a velocidade máxima específica de crescimento celular, S é a concentração de substrato limitante e K_s é a constante de saturação de Monod, que representa o valor da concentração do nutriente limitante para a qual a velocidade específica de crescimento é a metade de seu valor máximo. Uma baixa constante de saturação implica uma maior duração da fase exponencial. A forma da equação de Monod é similar à equação de cinética enzimática de Michaelis-Menten.

Para crescimento em batelada a volume constante tem-se, a partir da equação (2.8):

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} SX}{K_s + S} \quad (2.16)$$

A altas concentrações de substrato, ou seja, $S \gg K_s \rightarrow \mu = \mu_{\max}$. A baixas concentrações de substrato, ou seja, $S \ll K_s \rightarrow \mu = \frac{\mu_{\max}}{K_s} S$.

Valores de μ_{\max} variam com o tipo de microrganismo e os valores de K_s dependem da natureza do substrato.

Quando se examina bem o complexo sistema bioquímico das células, torna-se claro que a equação de Monod é uma grande simplificação. No entanto, ela descreve muito bem o comportamento da fase exponencial do crescimento de um grande número de microrganismos.

Outras equações foram propostas para descrever a relação entre a velocidade específica de crescimento e a concentração do substrato limitante que, para casos particulares, ajustam-se melhor aos dados experimentais.

– Equação de Blackman: $\mu = \mu_{\max}$, se $S \geq 2K_s$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{2K_s}, \text{ se } S < 2K_s \quad (2.17)$$

– Equação de Tessier: $\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-S/K_s})$ (2.18)

– Equação de Moser: $\mu = \frac{\mu_{\max} S^n}{K_s + S^n} = \mu_{\max} (1 + K_s S^{-n})^{-1}$ (2.19)

– Equação de Contois: $\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_x X + S}$ (2.20)

A equação de Moser tem três constantes (μ_{\max} , K_s , n) e é a mais geral delas, sendo equivalente a equação de Monod para $n=1$.

A velocidade específica de crescimento (μ) pode ser inibida pelos constituintes do meio, tais como substratos e produtos. A inibição causada por excesso desses constituintes pode ser explicada por modificações físico-químicas e metabólicas, tais como força iônica, variação da pressão osmótica, redução da atividade enzimática, etc. Exemplos de inibição pelo substrato e pelo produto são representados pelas equações de Moser (2.21) e Jerusalimsky e Neronova (2.22) (Bailey e Ollis, 1986; Schmidell *et al.*, 2001):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.21)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \frac{K_p}{K_p + P} \quad (2.22)$$

Com relação à cinética de formação de produto, os modelos não estruturados mais simples referem-se a processos cujos balanços estequiométricos entre as reações permitem a obtenção de fatores de rendimento que relacionam a velocidade de produção com a velocidade de consumo de substrato ou crescimento celular (Bailey e Ollis, 1986):

$$r_p = -Y_{p/S} \cdot r_s \quad (2.23)$$

$$r_p = -Y_{p/X} \cdot r_x \quad (2.24)$$

Estas equações referem-se a processos cuja produção está associada ao crescimento, como na produção de metabólitos primários. Para metabólitos secundários, um balanço estequiométrico simples resulta em expressões de velocidade de produto relacionadas com a concentração celular e não com a velocidade de crescimento. Um modelo misto utilizado por diversos pesquisadores para representar a velocidade de produção de vários metabólitos foi proposto em 1959 por Leudedking e Piret (*apud* Bailey e Ollis, 1986):

$$r_p = \alpha' \cdot r_x + \beta' \cdot X \quad (2.25)$$

onde α' e β' são os coeficientes dos termos associado e não-associado ao crescimento. Essa equação permite distinguir três tipos de formação de produto (Figura 2.14):

- 1) Cinética associada ao crescimento: $\alpha' > 0$ e $\beta' = 0$, então $r_p = \alpha' \cdot r_x$.
- 2) Cinética mista: $\alpha' > 0$ e $\beta' > 0$, então $r_p = \alpha' \cdot r_x + \beta' \cdot X$.
- 3) Cinética não associada ao crescimento: $\alpha' = 0$ e $\beta' > 0$, então $r_p = \beta' \cdot X$.

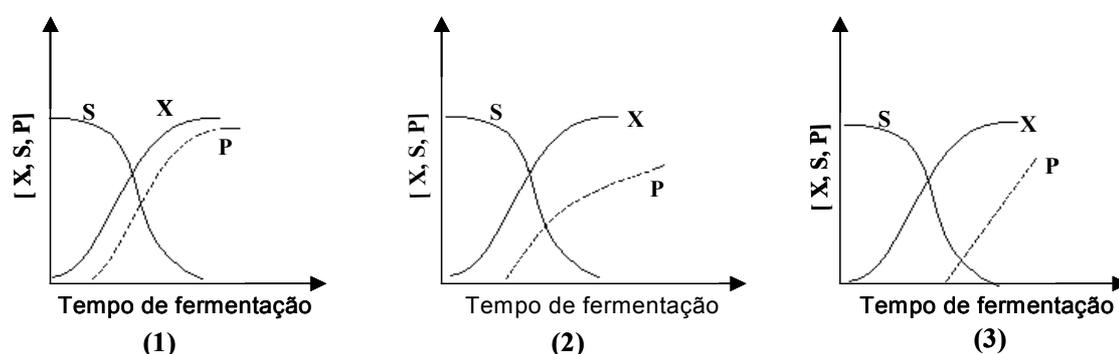


Figura 2.14: Perfis de concentração do microrganismo (X), do substrato (S) e do produto (P) para os três tipos de formação do produto. (1) cinética associada ao crescimento, (2) cinética mista, (3) cinética não associada ao crescimento.

Villadsen, 1989, fez um apanhado geral da simulação das reações bioquímicas, mostrando o rápido crescimento de bioprocessos, apontando os modelos cinéticos não estruturados mais comuns.

Como dito anteriormente, crescimento microbiano é um fenômeno complexo. A modelagem matemática surge como uma valiosa ferramenta para a sua descrição, simplificando a representação do processo, através de pequeno número de expressões cinéticas relativamente simples. Uma vez que os modelos matemáticos fornecem uma relação funcional entre as variáveis do processo, eles são idealmente convenientes para muitas tarefas no projeto de processos, como por exemplo:

- otimização da estrutura da planta e de parâmetros de operação;
- cálculos de perfis de tempo ótimos para adição de substratos e outros nutrientes;
- planejamento de experimentos com o objetivo de obter máxima informação com um mínimo de tempo e gastos;
- projeto de sistemas de controle;
- estimativa de variáveis ou parâmetros que não podem ser medidos, e métodos indiretos de medidas.

Embora possa ser virtualmente impossível simular o sistema bioquímico em sua totalidade, uma compreensão de seus mecanismos básicos ou essenciais pode permitir a construção de um modelo que reflita, pelo menos, os principais aspectos do bioprocessos. Usando a modelagem é possível simplificar as complexas interações do sistema bioquímico qualitativamente e quantitativamente (Brass *et al.*, 1997).

3. Materiais e Métodos

Os materiais e métodos citados a seguir se referem aos ensaios de produção de PGA tanto em câmara rotativa como em fermentador, às análises das amostras para acompanhamento das variáveis de interesse e ao sistema de inferência.

3.1 Materiais

3.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a produção de PGA foi o *Bacillus megaterium* ATCC 14945, da Fundação Tropical de Campinas, em tubos contendo ágar nutriente.

3.1.2 Fontes de Carbono

Nos ensaios em câmara rotativa foram testadas várias fontes de carbono, a saber: (1) lactose proveniente do soro de queijo seco em atomizador (Sigma), (2) lactose PA (Synth); (3) glicose PA (Synth); (4) glicerol.

3.1.3 Fontes de Nitrogênio e Vitaminas

Entre as fontes de nitrogênio e vitaminas testadas estão: (1) caseína das marcas Riedel-de Haen (Alemanha) e J.T.Baker (Phillipsburg, EUA) hidrolisadas com Alcalase®; (2) aminoácidos (Synth e Sigma); (3) samprosoy (gentilmente cedido por Bunge Alimentos); (4) extrato de levedura (Acumedia Manufacturers, Maryland EUA).

3.1.4 Equipamentos

Durante a realização deste trabalho foram utilizados vários equipamentos que normalmente fazem parte de um laboratório bioquímico. Foram eles:

3.1.4.1 Câmara Asséptica

Nas etapas de manipulação de microrganismos e do material em contato direto com os mesmos, utilizou-se câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO (Campinas, SP, Brasil), contendo bico de Bunsen e lâmpada germicida UV.

3.1.4.2 Autoclaves

Empregada para esterilização dos meios de cultura, soluções e suspensões de várias naturezas, e todo material que estaria em contato com o microrganismo

(vidrarias, biorreator e demais utensílios de usos diversos envolvidos na realização dos ensaios). Foram utilizadas autoclaves da marca FABBE Primar Industrial (São Paulo, SP, Brasil), e todo material era esterilizado a 120 °C por 15 minutos.

3.1.4.3 Câmara incubadora rotativa ("shaker")

As etapas de crescimento do microrganismo e produção da enzima foram realizadas em frascos agitados (erlenmeyers) em mesa rotativa (NEW BRUNSWICK Co., Inc., Edison, NJ, EUA) com controles de temperatura e velocidade de agitação.

3.1.4.4 Centrífuga Refrigerada

Para separar as células do sobrenadante nas amostras coletadas durante os ensaios, como parte do procedimento para determinação da massa seca, utilizou-se centrífuga refrigerada da marca EPPENDORF (modelo 5403, Netherler-Hinz GMBH-Hamburg) com capacidade para seis tubos.

3.1.4.5 Estufas

Para secagem de vidrarias e procedimento de determinação da massa seca foi utilizada estufa da marca FANEM (São Paulo, SP, Brasil) (60°C). Para esterilização de alguns utensílios foi utilizado estufa de circulação mecânica também da marca FANEM (100°C).

3.1.4.6 Cromatógrafo Líquido de Alta Performance ("High Pressure Liquid Chromatograph")

As análises das concentrações de caseína, aminoácidos e AFA foram realizadas em HPLC Shimadzu.

3.1.4.7 Outros Equipamentos

- Balança Analítica marca METTLER modelo PB 3002
- Balança de precisão marca KERN modelo 410
- Ultrafreezer marca FORMA SCIENTIFIC
- pHmetro marca ORION modelo 420 A
- Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultraspec 2000

- Banho termostático marca BROOKFIELD modelo EX – 200
- Banho termostático marca NESLAB modelo RTE – 111
- Bomba de vácuo marca FABBE modelo 341
- Reator de vidro com camisa de água
- Agitador mecânico marca FISATOM modelo 710
- Vidrarias em geral

3.2 Meios de Cultura

A enzima foi produzida em câmara rotativa e em fermentador, seguindo-se os seguintes procedimentos e composições de meios:

3.2.1 Meio de Esporulação

A composição do meio sólido empregado para o cultivo e preservação da linhagem em tubos inclinados ("slants") e frascos de Roux é descrita na Tabela 3.1. O microrganismo foi repicado dentro de tubos de ensaio, deixados em câmara rotativa por sete dias a 30°C, sendo retirado do tubo por meio de uma solução salina 0,9% p/v e transferido para o frasco de produção do inóculo.

| Nutriente | Concentração (g/L) |
|------------------|--------------------|
| Extrato de carne | 3,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Glicose | 1,5 |
| Agar | 20,0 |

3.2.2 Meio para Obtenção do Inóculo

A produção do inóculo para germinação do microrganismo foi realizada em erlenmeyers dentro da câmara rotativa por 24h, 300 rpm, a 30°C. Decorrido esse tempo o inóculo foi transferido para o erlenmeyer de produção da enzima (10% do volume total). A Tabela 3.2 mostra a composição dos meios utilizados na primeira etapa dos trabalhos, quando a fonte de nitrogênio foi caseína hidrolisada (MG1), e na segunda

etapa, com aminoácidos livres (MG2). Como será visto, nos ensaios iniciais em câmara rotativa e biorreator não foi utilizada a solução de sais.

Tabela 3.2: Composição dos meios empregados no preparo do inóculo.

| Nutriente | MG1 (g/L) | MG2 (g/L) |
|---|-----------|-----------|
| Caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) | 40,0 | - |
| Solução de aminoácidos livres* | - | 10,0 |
| Soro de queijo | 7,0 | 7,0 |
| Solução de sais** | 0,9 | 0,9 |
| Antiespumante | 1 gota | - |

| * Solução de aminoácidos livres | | | |
|---------------------------------|---------|----------------|--------|
| Aminoácido | Símbolo | Peso Molecular | C(g/L) |
| L-Alanina | Ala | 89,09 | 1,16 |
| L-arginina | Arg | 174,20 | 1,64 |
| L-Ácido aspártico | Asp | 133,1 | 2,53 |
| L-Cistina | Cst | 240,3 | 0,13 |
| L-ácido glutâmico | Glu | 147,13 | 4,47 |
| Glicina | Gly | 75,07 | 0,44 |
| L-histidina. HCl | His | 191,7 | 0,98 |
| L-leucina | Leu | 131,2 | 4,18 |
| L-isoleucina | Ile | 131,2 | 2,13 |
| L-Lisina.HCl | Lys | 182,6 | 3,02 |
| DL-metionina | Met | 149,21 | 2,49 |
| L-Fenilalanina | Phe | 165,2 | 2,44 |
| L-prolina | Pro | 115,13 | 4,3 |
| L-serina | Ser | 105,1 | 2,5 |
| L-treonina | Thr | 119,1 | 1,91 |
| L-tirosina | Tyr | 181,19 | 1,96 |
| L-triptofano | Trp | 204,2 | 0,53 |
| L-valina | Val | 117,1 | 2,76 |

| ** Solução de sais | |
|---|---------------------|
| Composto | Concentração (mg/L) |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 75,3 |
| CaCl ₂ .6H ₂ O | 55,1 |
| Na ₂ SO ₄ | 53,3 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 14,5 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 1,21 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 1,07 |
| CuCl ₂ .2H ₂ O | 0,8 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,68 |
| ZnCl ₂ | 0,063 |

3.2.3 Preparo do Meio de Seleção para Verificação da Pureza da Cultura de *Bacillus megaterium* ATCC 14945

Inicialmente era obtido o inóculo como descrito no item 3.2.2. Este foi diluído 10.000, 100.000 e 1.000.000 vezes. A partir dessas soluções pipetaram-se amostras que foram adicionadas em placas de petri contendo meio de seleção descrito na Tabela 3.3. As placas de petri eram mantidas dentro da câmara rotativa apenas com controle de temperatura (30°C) por 48 horas ou mais, até se observar o aparecimento de colônias. Quando se observou o aparecimento de colônias aparentemente diferentes, estas foram retiradas por meio de alça de platina e repicadas em tubos com ágar nutriente para subseqüentes ensaios de produção de PGA. Estes ensaios foram realizados somente na primeira etapa, com o meio MG1.

Tabela 3.3: Composição do meio sólido utilizado nos ensaios de seleção.

| Nutriente | Composição (g/L) |
|---------------------|------------------|
| Extrato de malte | 10,0 |
| Extrato de levedura | 4,0 |
| Glicose | 4,0 |
| Agar | 12,0 |

3.2.4 Produção da Enzima em Câmara Rotativa

A produção da enzima em câmara rotativa foi realizada em meio de cultura cuja composição foi baseada no trabalho de Berazaín, 1997. Após a adição do inóculo este é mantido por 48 horas a 300 rpm e 30°C. A Tabela 3.4 mostra a composição dos meios utilizados na primeira etapa, com caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio (MP1) e na segunda etapa, com aminoácidos livres (MP2). Como será visto, nos ensaios iniciais em câmara rotativa e biorreator não foi utilizada a solução de sais.

Tabela 3.4: Composição dos meios de produção em câmara rotativa e biorreator.

| Nutriente | MP1 (g/L) | MP2 (g/L) |
|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Caseína hidrolisada enzimaticamente | 51,3 | - |
| Solução de aminoácidos livres* | - | 10,0 |
| Soro de queijo | 19,6 | 19,6 |
| Solução de sais** | 0,4 | 0,4 |
| Ácido fenilacético | 2,7 | 2,7 |
| Carbonato de cálcio | 4,13 | - |
| Antiespumante | 1 gota | 1 gota |

* e ** composição citada no item 3.2.2

3.2.5 Produção da Enzima em Biorreator Agitado e Aerado

Os procedimentos utilizados até a obtenção do inóculo são os mesmos descritos para os ensaios em câmara rotativa. Após esterilização do reator, o meio de produção é adicionado ao seu interior por sifonamento, utilizando-se 10% em volume de inóculo por volume de meio de produção. Ácido fenilacético foi adicionado após 10 horas do início da fermentação para os ensaios iniciais e logo no início da fermentação em ensaios posteriores. A concentração de oxigênio dissolvido, a vazão de ar e a agitação variaram entre um ensaio e outro. A temperatura foi mantida a 30°C e o reator foi operado por um período de 50h, aproximadamente. A composição do meio é a mesma para a produção em câmara rotativa e está descrita na Tabela 3.4.

3.3 Análise das Amostras para Acompanhamento da Produção

A análise das amostras para acompanhamento da produção iniciou-se pela separação do microrganismo do meio de cultura. A separação foi feita por centrifugação ou filtração. A centrifugação foi realizada a 4°C a 11000g por 20 minutos e a filtração realizada em membrana Millipore com porosidade de 0,2 µm. O sobrenadante foi utilizado para análise da atividade enzimática.

3.3.1 Análise da Concentração Celular

A análise da concentração celular foi feita pela pesagem da massa seca. Antes de fazer a filtração ou centrifugação, o tubo de centrífuga ou a membrana do filtro foram

previamente secos a 60°C por 24h, colocados em dessecador e posteriormente pesados. Filtrou-se ou centrifugou-se uma alíquota de 10 mL da amostra. Após filtração ou centrifugação o sobrenadante era utilizado para análises e as membranas ou tubos eram novamente secos a 60°C por 24h e pesados. Pela diferença de massa determinou-se a concentração celular. Nos meios com presença de CaCO₃ retirou-se o carbonato de cálcio lavando-se o filtro ou o tubo de ensaio contendo as células, já sem o meio de cultura, com um volume de 20 mL de solução de ácido acético 5%.

3.3.2 Determinação da Atividade Enzimática

3.3.2.1 Método Colorimétrico PDAB

Este método determina a atividade amidase da penicilina G acilase utilizando p-dimetilaminobenzaldeído (PDAB). O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G reage com o PDAB, gerando um produto colorido que foi acompanhado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 415nm. A leitura foi relacionada à concentração de 6-APA por meio de uma curva de calibração obtida com soluções padrões de 6-APA na faixa de 200-1000µg/mL, cujo coeficiente angular da foi de $6,66 \cdot 10^{-4}$ (Balashingham *et al.*, 1972).

Em um reator aquecido por meio de uma camisa de água, ajustado para 37°C, colocou-se 5 mL de PG 5% (p/v) em tampão fosfato 10mM pH 8,0 e esperou-se estabilizar a temperatura, após o que se adicionou 1 mL da solução de enzima sob agitação. Tomaram-se alíquotas em diferentes tempos de reação, que foram colocadas em cubetas preparadas com reagente PDAB (mistura de 0,5 mL de PDAB 0,5% (p/v) em metanol, 2,0 mL de ácido acético 20% (v/v) e 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05M) deixando-se reagir por 2,5 minutos.

3.3.3 Método para Determinação de Proteínas

3.3.3.1 Método de Bradford

O procedimento utilizado corresponde ao método padrão descrito no artigo de Bradford, 1976.

O reativo foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 (BioRad Laboratories, CA, EUA) em 50mL de etanol a 95% (v/v) – sob vigorosa agitação. A essa solução adicionou-se 100mL de ácido fosfórico a 85% (p/v), diluindo-

- 144g de Na_2SO_4 ;
- 800 mL de água destilada q.s.q.

Os sais foram dissolvidos separadamente e as soluções foram misturadas e diluídas a 800mL. O NaHCO_3 não deve ser aquecido.

Solução II: Pesou-se 36g de NaSO_4 e dissolveu-se a frio em 100 mL de solução aquosa 40g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Completou-se o volume com 200 mL com água destilada.

Solução III: Pesou-se 25g de molibdato de amômio - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - e dissolveu-se em 450 mL de água destilada. Adicionou-se 21 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Dissolveu-se, separadamente, 3g de arseniato de sódio monohidrogênio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em 25 mL de água destilada. Misturaram-se as duas soluções, homogeneizou-se e deixou-se em estufa a 37°C por 24-48 horas. Deve-se obedecer a ordem de diluição dos reagentes. Todas as soluções devem ser armazenadas em frascos escuros e guardadas em estufa a 37°C .

Procedimento:

- Dilua-se a amostra de maneira que a concentração de açúcar redutor estivesse entre 100 e 500mg/L;
- Preparava-se a mistura das soluções I e II, na razão 4:1 no momento do uso;
- Em tubos de Follin-Wu pipetava-se 1mL de amostra e 1mL da mistura de soluções I e II;
- Tapavam-se os tubos com rolhas fendidas e aquecia-se em banho fervente por 10 min cronometrados. O banho deve ser aquecido diretamente no bico de Bunsen para que a água permaneça em ebulição ao se colocar os tubos de Follin-Wu;
- Resfriava-se rapidamente em banho de gelo;
- Adicionavam-se 2mL da solução III e agitava-se até ocorrer o total desprendimento das bolhas;
- Adicionavam-se 20mL de água destilada e homogeneizava-se;
- Preparava-se branco, substituindo por água destilada a quantidade de amostra a ser dosada;

- Mediam-se as absorvâncias em espectrofotômetro a 540nm.

A concentração da amostra era calculada utilizando uma curva de calibração previamente preparada.

3.3.4.2 Concentração de Glicose

A concentração de glicose nas amostras foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico da glicose oxidase (GOD-PAP).

3.3.5 Concentração de Aminoácidos

A concentração dos aminoácidos era obtida utilizando cromatografia líquida de alta definição (HPLC-Shimadzu); coluna Amino NA e ISC-30/S0504 NA Shim-pack (Shimadzu). As fases móveis usadas foram citrato de sódio 0,2N pH 3,2 em etanol 7%, citrato de sódio 0,6N + ácido bórico pH 10, hidróxido de sódio 0,2M. Uma bomba modelo LC-10AD era usada para adição pós-coluna de solução reagente consistindo de OPA (o-phthalaldehyde - Reagente B) e solução tampão alcalino (Reagente A). A detecção em fluorescência (excitação a 360nm e emissão a 450nm) era realizada por detector RF-10A.

3.3.6 Concentração de AFA

A concentração de AFA era obtida utilizando cromatografia líquida de alta definição (HPLC); coluna C18 Waters: Nova-Pak, 60Å, 4µm de diâmetro, 3,9x150mm. A fase móvel utilizada consistia de 25% acetonitrila, 10mM de H₃PO₄, 5mM de K₂H₂PO₄, pH 4,6 e 25°C. Usava-se comprimento de onda de 225nm e vazão de 1mL/min.

3.3.7 Hidrólise da Caseína

Hidrólise da caseína 8% foi realizada em pH-stato Metrohn modelo 718 Titrino (Suíça), usando adição de solução 0,5M de NaOH para manter o pH constante. Temperatura de 50°C e pH=8 usados nos ensaios utilizando Alcalase[®] 0,6L, são os valores ótimos recomendados pela Novo Nordisk do Brasil. A relação mássica entre a enzima e a caseína usada nos experimentos foi 1/50.

3.3.8 Atividade Proteolítica

A existência de atividade proteolítica no caldo de fermentação foi verificada de acordo com o procedimento descrito a seguir. Solução constituída de caldo de fermentação em diferentes diluições, com solução concentrada de gelatina, é mantida a 40°C por uma hora e a seguir colocada em geladeira. A observação de não gelificação da solução indica a presença de proteases no meio.

3.3.9 Preparo dos Criotubos

Dentre os métodos mais usuais de preservação de microrganismo, o congelamento a baixas temperaturas torna-se mais vantajoso em relação aos demais, por preservar a cultura por longos períodos. O preparo dos criotubos com *Bacillus megaterium* ATCC 14945 passou por várias etapas descritas a seguir (Figura 3.1):

- a linhagem primeiro era repicada em tubos inclinados com meio sólido, mantidos por sete dias a 30°C.
- após sete dias, os esporos eram suspensos em 5mL de solução salina 0,9% e repassados aos frascos de Roux, previamente preparados com meio sólido de esporulação. Os frascos de Roux eram então mantidos por sete dias a 30°C.
- após este período, era adicionada aos frascos contendo o meio esporulado uma solução crioprotetora estéril (glicerol 20% v/v), precedida de uma vigorosa agitação e raspagem dos esporos.
- as suspensões de esporos de todos os frascos eram transferidas para um erlenmeyer previamente esterilizado.
- Era retirada uma alíquota para contagem dos esporos em câmara de Neubauer e finalmente utilizavam-se os criotubos para acondicionar os volumes de suspensão de esporos referentes à concentração desejada.
- Os criotubos eram armazenados em ultrafreezer a (-50°C).

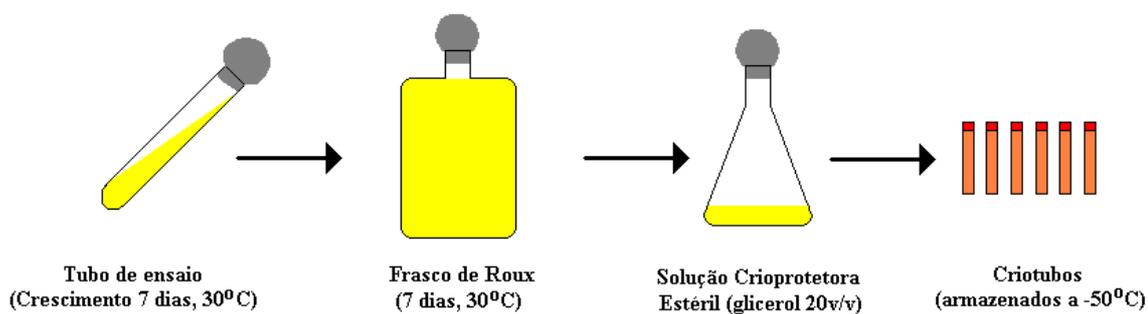


Figura 3.1: Procedimento para o preparo dos criotubos.

3.4 Descrição Geral da Instrumentação do Biorreator Convencional e do Sistema de Aquisição de Dados

O sistema de aquisição de dados implementado no Laboratório de Fermentações do DEQ-UFSCar é composto por um Controlador Lógico Programável (CLP – GE Fanuc, série 90-30), Sistema Supervisório (Unisoft, versão 1.85) operado em microcomputador tipo PC. O CLP tem suas entradas e saídas conectadas ao biorreator tipo tanque agitado e aerado (Bioflo II-C, News Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, EUA). O biorreator convencional é o utilizado nos experimentos em batelada e batelada alimentada. A comunicação entre o CLP e o Sistema Supervisório é realizada por meio de interface serial RS-232. Um esquema do aparato experimental juntamente com o sistema de aquisição de dados é mostrado na Figura 3.2. Toda a instrumentação foi baseada nas normas da "American National Standard".

Os seguintes equipamentos fazem parte da instrumentação utilizada no biorreator:

- I) Eletrodo de pH, tipo 465-90 (Mettler Toledo, NJ, EUA) conectado ao Medidor e Transmissor de pH, modelo TH-41 (Digimed);
- II) Eletrodo de oxigênio dissolvido, tipo 12/320T (Mettler Toledo) conectado ao Medidor e Transmissor de Oxigênio Dissolvido, O₂ 4500 (Mettler Toledo);
- III) Bombas peristálticas BVP (Ismatec, Zürich, Suíça) para adição de meio suplementar, ácido e/ou base;

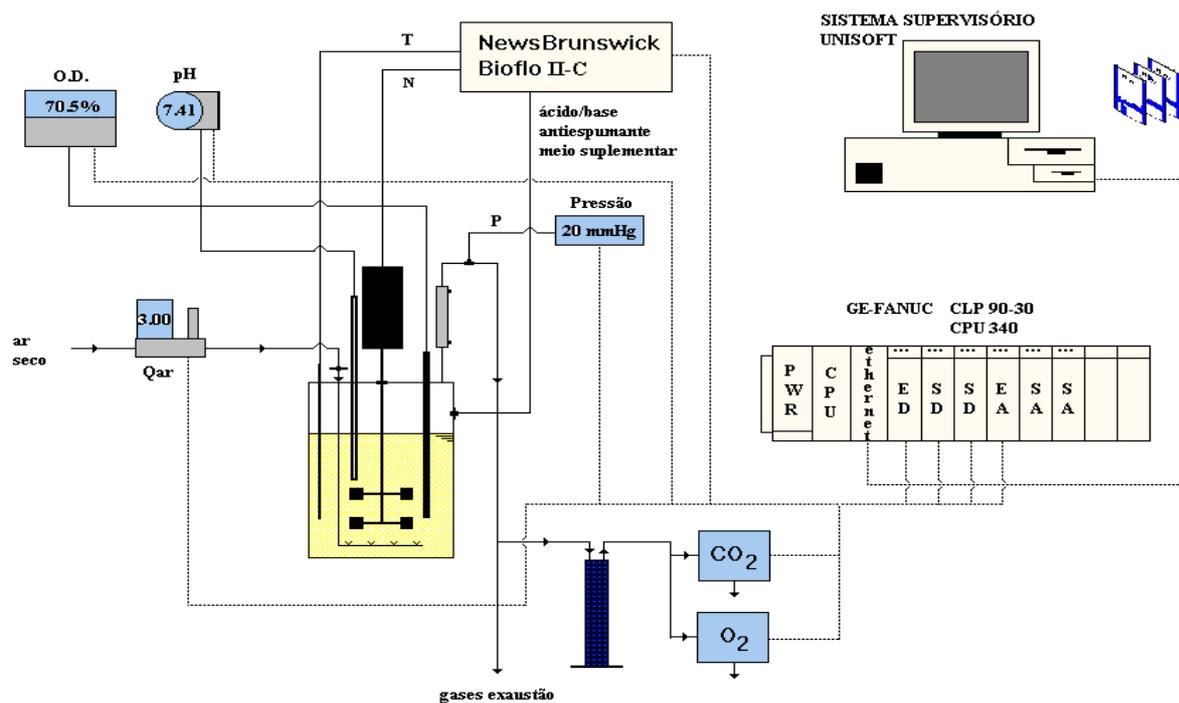


Figura 3.2: Esquema do aparato experimental com o sistema de aquisição de dados.
 (— sinais dos sensores; ----- sinais de 4 a 20 mA)

- IV) Fluxômetro de massa, modelo 33116-20, 0 a 5 SLPM, Cole Parmer® (Venon Hills) para monitoração da vazão de ar no sistema;
- V) Transdutor de pressão (modelo 560, T&S Equipamentos) para monitorar a sobrepressão no interior do biorreator;
- VI) Sensor de temperatura (Pt-100), inserido em um poço dentro do reator;
- VII) Analisadores de oxigênio (modelo 755, Rosemount Analytical) e dióxido de carbono (modelo 880A, Rosemount Analytical) acoplados para análise dos gases de saída do fermentador. Os analisadores são calibrados com gases padrões (N_2 99,99% e CO_2 5,0%/95% N_2).

O CLP varre periodicamente todas as suas entradas e, em seguida, fornece os valores para o Sistema Supervisório.

3.4.1 Descrição do Sistema de Controle de Temperatura

A temperatura do meio de cultura pode ser selecionada na faixa de 20 a 60 °C ($\pm 0,1$ °C) e é controlada por um microprocessador baseado em controlador PID (Proporcional, Integral e Derivativo). A temperatura média é medida por um sensor RTD ("Resistance Temperature Sensor"), imerso no biorreator. Quando a temperatura do sistema está abaixo do "set-point", o controlador atua abrindo uma válvula solenóide e ligando o aquecedor. O sistema dispõe ainda de um dispositivo de proteção que impede que o aquecedor entre em funcionamento na ausência da vazão do fluido de refrigeração (falta de água).

3.4.2 Descrição do Sistema de Controle de Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido é controlado na faixa de 5 a 95% ($\pm 1\%$) da saturação. É medido através de um eletrodo imerso no interior do biorreator e o controle é realizado através de controlador PID, que atua sobre a velocidade de agitação, mantendo-se constante a vazão de alimentação de ar.

3.4.3 Descrição do Sistema de Controle de pH

O pH é controlado na faixa de 2,00 a 12,00 ($\pm 0,01$). Utiliza-se um sensor amperométrico imerso no meio de cultura, o qual é conectado a um transmissor. Emprega-se um controlador PID no acionamento de duas bombas peristálticas para a

adição do ácido ou base, dependendo do pH do meio e do "set-point" determinado por função lógica programável.

3.4.4 Descrição do Sistema de Controle de Formação de Espuma

A formação de espuma durante o bioprocessamento é controlada pela adição de antiespumante. O sensor colocado na parte superior do Bioflo II-C detecta a formação de espuma. A este sensor está conectado um controlador "on-off", que aciona uma bomba peristáltica que adiciona antiespumante ao sistema.

3.4.5 Descrição do Sistema de Controle de Vazão do Meio Suplementar

Uma bomba peristáltica foi incorporada ao sistema para a realização de experimentos em batelada alimentada. Um controlador está conectado a esta bomba e é manipulado por função lógica programável. A vazão máxima que se pode operar com este sistema é de 10mL/min.

3.5 Descrição dos Acessórios Incorporados ao Sistema

3.5.1 Medidor de Vazão

Foi incorporado ao aparato experimental um fluxômetro de massa para monitorar a vazão de ar empregada durante o experimento.

3.5.2 Analisador dos Gases de Saída

3.5.2.1 Dióxido de Carbono (CO₂)

Foi incorporado ao sistema um analisador infravermelho para dióxido de carbono, conectado ao controlador lógico programável, que é acessado por função lógica programável para aquisição de dados.

3.5.2.2 Oxigênio (O₂)

Também foi incorporado ao sistema um analisador paramagnético de oxigênio (Rosemount Analytical Model 755) que está conectado ao CLP e é acessado por função lógica programável para a aquisição dos dados.

3.5.3 O Controlador Lógico Programável (CLP)

O CLP é um controlador industrial da GE Fanuc Automation série 90-30. Sua CPU apresenta como características: um módulo de programação de controlador do tipo PID; programação estruturada; palavras de 16 bits; endereçamento indireto e uma grande variedade de funções para o processamento de operações complexas. Outras características são: 32KB de RAM, módulos de posicionamento de eixos, módulo de execução Booleana de alta velocidade (0,2 ms/KB), módulos de co-processamento programável nas linguagens BASIC™ e "C", módulos de comunicação analógicos de entrada (até 1024) e de saída (até 626) e digitais (até 1024 cada). A Figura 3.3 mostra o CLP com todos os módulos acoplados.



Figura 3.3: CLP da GE Fanuc Automation, modelo 90™-30.

3.5.3.1 O Sistema Supervisório

O sistema supervisório é formado por um microcomputador 486 DX4, 100 Mhz, 16 KB RAM e com o "software" de supervisão da UniSoft.

O UniSoft é um "software" para desenvolvimento de interfaces homem-máquina, estações de supervisão local de processos industriais e estações de concentradoras de dados em processos distribuídos. É baseado em um microcomputador interligado a um processo ou máquina através de um controlador lógico programável (CLP) ou outro sistema de aquisição de dados. A interface gráfica do sistema, a utilização de planilhas para configuração e o suporte para o "mouse" geram um

ambiente simples e de rápida assimilação. Abaixo são listadas algumas características do sistema:

- Configuração em tempo real durante a aplicação;
- Suporte em tempo real do "mouse" com linha de "status" definida pelo usuário;
- Recursos de indexação de vetores e criação de classes na configuração;
- Sistema de segurança embutido, tanto para cópia de engenharia como de "Run-Time";
- Dois editores gráficos internos, um de "bitmap" e outro orientado a objeto;
- Funções matemáticas;
- Comunicação de dados sempre em blocos, otimizando a utilização do canal serial;
- A arquitetura permite facilmente o desenvolvimento de novos módulos em linguagem C, FORTRAN ou qualquer outra linguagem que suporte arquivos **.DLL** para serem "linkados" ao sistema.

O sistema UniSoft é voltado para aplicações em *Supervisão e Controle de Processos*, onde se utiliza uma arquitetura distribuída baseada em CLP's e microcomputadores e com flexibilidade para a conexão com qualquer tipo de CLP, fazendo com que o microcomputador que roda o "software" seja utilizado como estação de supervisão local do processo. No trabalho de Cruz, 2000 para a produção de cefalosporina C e neste trabalho para a produção da penicilina G acilase, este sistema foi utilizado como estação de supervisão local do processo, executando as funções de monitoramento do sistema, controle de situações de alarme, geração de gráficos e histórico das variáveis de processo e interface para a entrada de comandos do operador.

Os programas utilizados para simulações "off-line" foram MATLAB® - The Language of Technical Computing.(versão 5.2), The Mathworks Inc; FORTRAN PowerStation (versão 4.0), Microsoft Developer Studio.

3.6 Descrição das Telas do Sistema Supervisório

As telas implementadas no sistema supervisório estão organizadas da seguinte forma (Cruz, 2000):

Primeira: Figura 3.4 mostra a tela de inicialização, onde são ilustradas, em forma de tópicos, as principais etapas (cronologicamente dispostas) necessárias para partida de um experimento. É necessário que os itens sejam executados (um a um e pela ordem)

para o que o sistema inicie a supervisão e a aquisição dos dados (protocolo de inicialização). Durante esta etapa, é necessário definir as condições de operação ("set-points" do processo).

The screenshot shows a software interface for biochemical experiment initialization. The main window is titled 'OPERAÇÃO' and contains a sub-window 'PROCEDIMENTOS P/ INICIALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO BIOQUÍMICO'. It features a list of tasks with checkboxes, such as 'Repouso', 'Calibrar eletrodo de pH', 'Autoclavagem da dorna de fermentação', 'Ajustar "set-points" de operação (pid's)', 'Transferência dos meios de ferment. p/ o interior da dorna', 'Acionar agitação, aeração e controle de temperatura', 'Calibrar eletrodo de O₂ (DO)', 'Definir modo de operação', 'Reduzir agitação / fechar aeração', 'Inocular Biorreator', and 'INÍCIO DO PROCESSO'. Below the tasks, there are two tables under the heading 'CARACTERÍSTICA DO EXPERIMENTO'. The first table, '* BATELADA', has columns for 'TEMPO ATUAL' and 'SP TEMPO', both showing '0 min'. The second table, '* BATELADA ALIMENTADA', has columns for 'TEMPO MORTO' and 'TEMPO ATUAL', both showing '0 min', and a 'TEMPO EXPER.' column showing '0 min'. At the bottom, there are buttons for 'FIM DO PROCESSO' and 'CANCELA'.

Figura 3.4: Tela de inicialização implementada no sistema supervisiório.

Segunda: Figura 3.5 mostra a tela de processo, apresentando uma visualização geral do processo, com as malhas de controle utilizadas e os valores "instantâneos" de todas as variáveis monitoradas.

Terceira: Figura 3.6 mostra a tela de engenharia, onde se encontram presentes os "blocos" de controle (pH, Temperatura, Oxigênio dissolvido e Nutriente). É nesta "tela" que se definem os parâmetros de cada controlador e os "set-points" desejados.

Quarta: Figura 3.7 mostra a tela de gráficos, onde se visualizam as principais variáveis ao longo do experimento, havendo a possibilidade de se acompanhar uma ou mais variáveis, definindo seu intervalo de visualização.

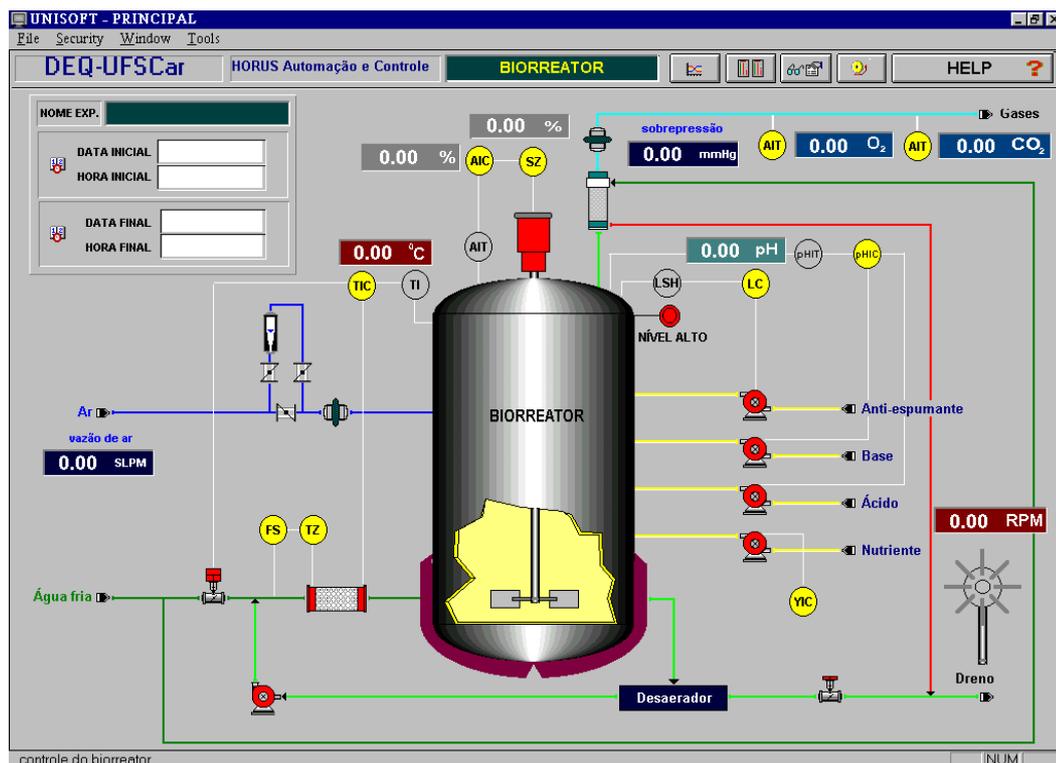


Figura 3.5: Tela de processo implementada no sistema supervisório.

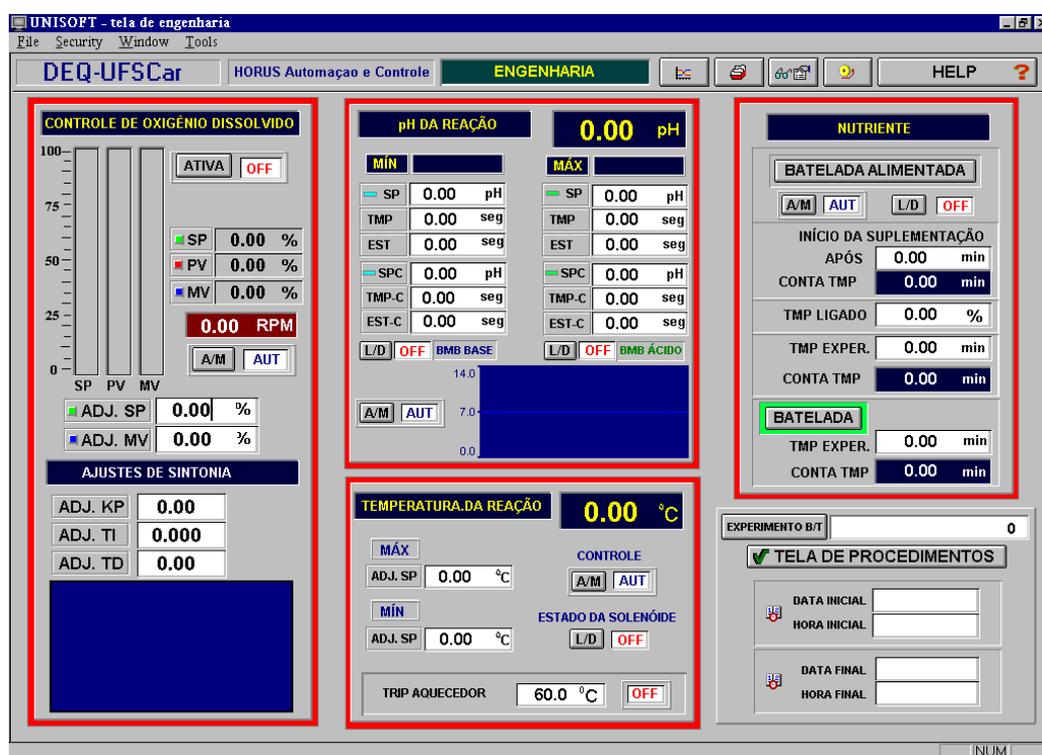


Figura 3.6: Tela de engenharia implementada no sistema supervisório.



Figura 3.7: Tela de gráficos implementada no sistema supervisorio.

A navegação entre as "telas" é realizada por meio de uma barra gráfica, localizada na parte superior das mesmas.

O sistema permite que o usuário defina o período de amostragem das variáveis, gerando arquivos de dados que são facilmente convertidos para o formato "ASCII". Estes arquivos são gravados em um diretório predefinido no disco rígido. Isso possibilita a utilização de programas (como EXCELL, ACCESS, ORIGIN) para o tratamento dos dados obtidos durante um ensaio experimental.

3.7 O Sistema de Comunicação

Para implementação dos algoritmos desenvolvidos em processo real, modificou-se a arquitetura do sistema de aquisição de dados existente no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar. Foi montada uma rede local, intranet, à qual foram conectados o Controlador Lógico Programável (CLP) através de módulo de comunicação ethernet, um servidor Windows-NT, onde está instalado o Sistema Supervisorio e um segundo microcomputador, responsável pelo programa que gera a

estimativa em tempo real a partir dos dados obtidos pela instrumentação. A nova arquitetura é ilustrada na Figura 3.8.

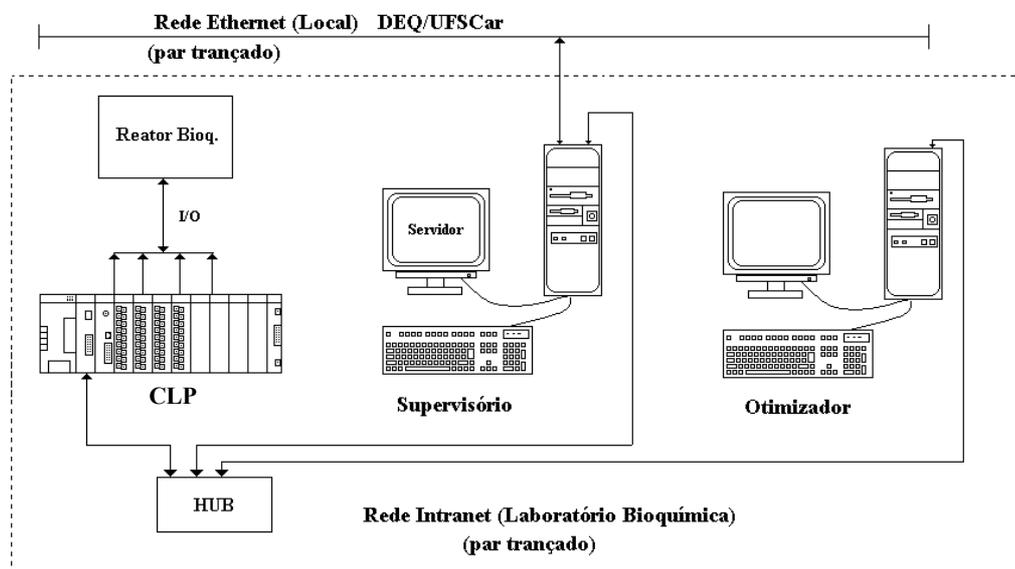


Figura 3.8: Desenho esquemático da nova arquitetura do sistema de aquisição de dados montada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (DEQ/UFSCar), ilustrando a rede "Intranet" local implementada, à qual encontram-se conectados: CLP, servidor e segundo microcomputador.

A comunicação dos dados via rede é realizada por protocolo TCP/IP.

Para permitir a implementação desta metodologia, foi necessário:

- Atualizar o programa responsável pela aquisição dos dados (Sistema Supervisório). Uma cópia da versão mais recente do "software" Indusoft Studio (versão 3) foi gentilmente cedida pelos representantes da Indusoft no Brasil (fabricantes do antigo sistema supervisório utilizado). Toda a configuração anterior teve que ser importada ou refeita, quando necessário, no ambiente do novo Supervisório.
- Atualizar o microcomputador utilizado para processar o programa gerenciador do sistema operacional da rede (Windows NT), além do próprio Indusoft Studio.
- Transferir um segundo computador, de 300 MHz, do laboratório de Simulação de Processos do DEQ/UFSCar, no qual se processa os programas FORTRAN e Visual Basic.

- Montar fisicamente a rede Intranet.
- Habilitar o módulo de comunicação ethernet, TCP/IP, do CLP.
- Desenvolver módulo de receitas ("recipes") no Indusoft Studio, habilitando a comunicação de dados entre o Sistema Supervisório e os programas de inferência/controle/otimização, em FORTRAN/Visual Basic, processados no segundo microcomputador.
- Configurar o CLP (montagem física) e o Sistema Supervisório, acrescentando nova bomba peristáltica (Ismatec, modelo BVP), cuja velocidade é controlada pelo CLP a partir das instruções do Supervisório ou do programa de inferência, processado no segundo micro. Para isso, faz-se uso de módulo conversor freqüência/corrente, que permite monitorar e controlar a rotação da bomba e, portanto, a vazão utilizada para alimentação do fermentador.

Um diagrama ilustrativo da nova configuração é mostrado na Figura 3.9.

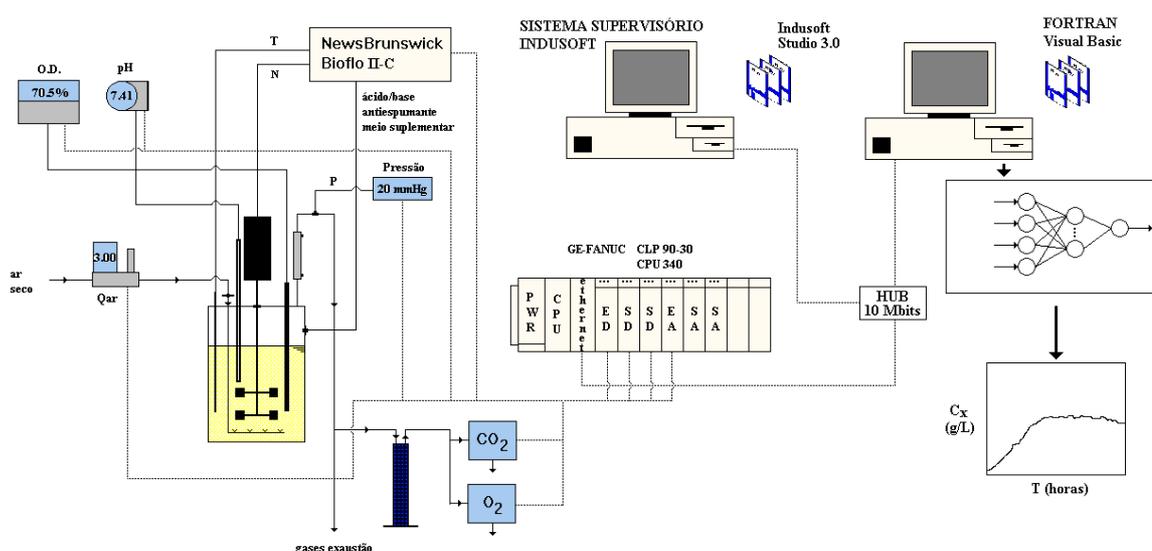


Figura 3.9: Esquema do aparato experimental ilustrando os novos equipamentos adicionados ao sistema: bomba peristáltica; "Hub"; microcomputador tipo PC (onde roda programa FORTRAN, acoplado ou não como dll a programa em Visual Basic).

Esta nova configuração permite o desenvolvimento de rotinas de controle e monitorização que utilizam o protocolo ODBC de comunicação de dados para acessar os diferentes computadores/processadores em tempo real.

Nesta nova arquitetura do sistema de controle/aquisição de dados, toda a comunicação entre o Controlador Lógico Programável e o Sistema Supervisório é realizada através de uma rede local Intranet. Com este sistema obtém-se maior velocidade de transferência dos dados; a rede Intranet está no momento conectada a um "Hub" de 10 Mbps, mas as placas de comunicação já suportam 100 Mbps.

No Servidor Windows NT foi instalada a nova versão do Sistema Supervisório, denominada InduSoft Studio 3.0. Uma das principais vantagens desta versão encontra-se na facilidade de troca de dados entre os microcomputadores e o CLP via rede.

A primeira instalação lógica desta nova arquitetura foi executada pela firma NEXT Automation. Deve-se destacar, entretanto, que todo o procedimento foi detalhadamente acompanhado, o que nos permitiu continuar com o desenvolvimento dos programas de forma autônoma.

4. Resultados Experimentais

Todo o trabalho experimental realizado nesta tese foi dividido em duas etapas. Na primeira, foi utilizada caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) por Alcalase® na composição tanto nos meios de germinação como nos de produção. Esta tinha sido a fonte de nitrogênio utilizada em todos os trabalhos de produção de PGA por *Bacillus megaterium* desenvolvidos até então no DEQ/UFSCar (Hojo, 1997; Berazain, 1997; Visnard, 1997 e Pinotti, 1999).

Segundo Gentina *et al.*, 1997, caseína hidrolisada tem sido a fonte de nitrogênio complexa mais amplamente utilizada e alguns trabalhos na literatura obtiveram maior produção de PGA utilizando esta como parte da composição dos meios (Illanes *et al.*, 1994; Gentina *et al.*, 1997). Não foram objetivos iniciais do trabalho experimental mudanças nas concentrações e nas fontes de nutrientes nos meios, principalmente com relação à fonte de nitrogênio. Sendo assim, nesta primeira etapa a maioria dos ensaios teve como objetivo respectivamente, estudos de viabilidade, verificação da pureza, adição de sais aos meios, verificação da quantidade de esporos e tempo de germinação, etc. Como não houve neste período melhoria significativa na produção da enzima, passou-se a investigar mudanças nas concentrações dos nutrientes e, principalmente, nas fontes de carbono e nitrogênio.

Apesar dos intensos trabalhos experimentais em câmara rotativa não se observou melhoria significativa na concentração de células e nem nos níveis de atividade enzimática. Com o andamento dos ensaios para identificar os requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium*, verificou-se que um meio contendo aminoácidos livres como fonte de nitrogênio em substituição à CHE era mais favorável à produção da enzima. Sendo assim, foi necessária a realização de novos ensaios em câmara rotativa e em biorreator com o novo meio. Esses ensaios, utilizando meio contendo aminoácidos, constituíram então a segunda etapa deste trabalho. Portanto, a primeira etapa abrange os ensaios realizados com caseína hidrolisada e a segunda etapa os ensaios com aminoácidos livres.

4.1 Ensaios em Câmara Rotativa – Primeira Etapa

Um intenso trabalho experimental foi realizado no decorrer desta tese. Na fase inicial, foi necessário verificar a estabilidade e a viabilidade de linhagem de *Bacillus*

megaterium que estava estocada na geladeira por um período de dois anos sem repique. Os ensaios que se seguiram em câmara rotativa e em biorreator tiveram por objetivo aumentar o crescimento celular e conseqüentemente a produção da enzima e, quando possível, obter informações qualitativas das principais variáveis do processo. Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados com caseína hidrolisada enzimaticamente por Alcalase®.

4.1.1 Verificação da Estabilidade

A partir da linhagem de *Bacillus megaterium* mantida em tubo contendo ágar nutriente no DEQ/UFSCar, foram obtidos “slants” dos quais alguns foram utilizados em ensaio preliminar para se verificar a estabilidade do microorganismo. Uma vez verificada a viabilidade, os “slants” restantes foram utilizados nos ensaios de seleção e verificação da pureza da colônia.

O ensaio preliminar teve por objetivo verificar a viabilidade e estabilidade da linhagem de *Bacillus megaterium* que seria utilizada para a seleção/purificação da cultura. Para isso, reproduziu-se um dos ensaios de produção de PGA realizado em equipe com Pinotti (Pinotti, 1999), com adição de soro de queijo. O microorganismo que foi utilizado neste ensaio estava estocado em geladeira por um período de dois anos sem repique, e foi denominado em nosso laboratório de linhagem original. A Figura 4.1 mostra resumidamente o procedimento experimental deste ensaio e de ensaios posteriores de produção da enzima. Os resultados do ensaio de estabilidade são mostrados nas Tabelas 4.1 e 4.2.

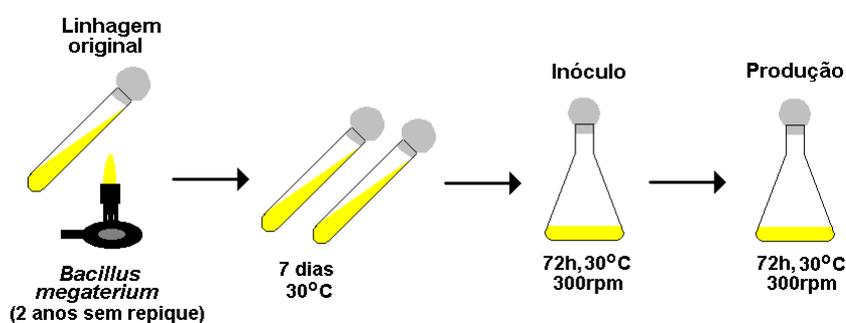


Figura 4.1: Procedimento experimental utilizado nos ensaios de produção de PGA.

Comparando-se os resultados mostrados nessas, observa-se que a enzima produzida pelo microorganismo armazenado apresentou atividade próxima dos valores obtidos por Pinotti, 1999 (Tabela 4.2), indicando a manutenção da viabilidade da cultura.

Tabela 4.1: Ensaio de estabilidade que reproduziu condições operacionais de Pinotti, 1999.

| Ensaio | Tempo (horas) | Concentração celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) |
|--|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| CHE – Alcalase® (SQS) (ensaio 1) | Inoculo | 1,8 | - |
| | 0 | 0,2 | - |
| | 24 | 3,1 | 42 |
| | 48 | 4,0 | 99 |
| | 72 | 4,1 | 97 |

SQS = Soro de queijo seco em atomizador
CHE = Caseína hidrolisada enzimaticamente

Tabela 4.2: Ensaio original (num. 11) realizado por Pinotti, 1999.

| Ensaio | Tempo (horas) | Concentração Celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) |
|--------------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| CHE – Alcalase® (SQS) | Inoculo | 2,0 | - |
| | 0 | 0,2 | - |
| | 24 | - | 35 |
| | 48 | - | 66 |
| | 72 | 3,05 | 102 |

SQS = Soro de queijo seco em atomizador
CHE = Caseína hidrolisada enzimaticamente

4.1.2 Seleção e Verificação da Pureza do *Bacillus megaterium*

Foram realizados ensaios de seleção e verificação da pureza da cepa de *Bacillus megaterium* ATCC 19945 visando a preparação do inoculo padrão. Os procedimentos experimentais de verificação da pureza são mostrados, também resumidamente, na Figura 4.2. Do “slant”, o microorganismo foi inoculado no meio de seleção por 24 horas e após este tempo foram realizadas diluições sucessivas até se obterem as diluições desejadas de 10.000, 100.000 e 1.000.000.

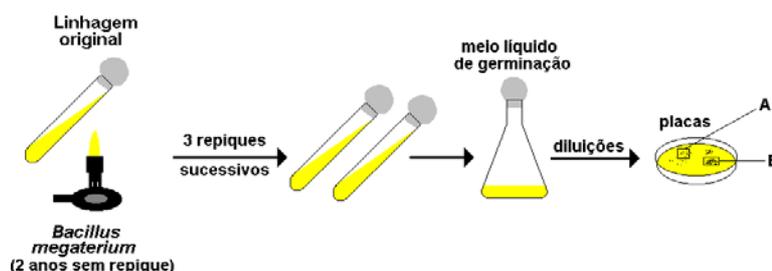


Figura 4.2: Procedimento experimental utilizado nos ensaios de verificação da pureza da cultura.

A foto das placas após o aparecimento das colônias pode ser observada na Figura 4.3. Pode-se observar que uma melhor separação é obtida para a diluição de 1.000.000. Macroscopicamente, observou-se também o surgimento de duas colônias aparentemente diferentes. Diferença esta que é também observada na placas das diluições de 10.000 e 100.000.

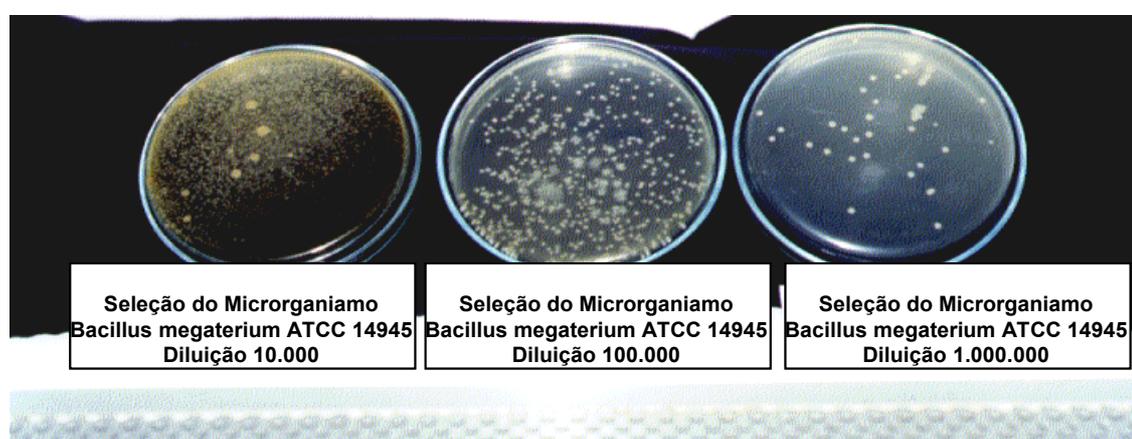


Figura 4.3: Placas após o aparecimento de colônias em ordem crescente para as três diluições.

A Figura 4.4 mostra a placa com diluição de 1.000.000, onde se observa a melhor separação de colônias. Estas colônias foram denominadas de colônia A (aspecto denso e concentrado) e colônia B (aspecto menos denso e espalhado). A partir da diferença observada separaram-se as duas colônias em novos repiques em ágar nutriente e as colônias A e B foram cultivadas separadamente em meio líquido de germinação,

sendo então utilizadas nos ensaios de fermentação para produção da enzima. Os resultados obtidos para o ensaio de produção da enzima com a colônia A (ensaio 2) e com a colônia B (ensaio 3) são mostrados na Tabela 4.3.

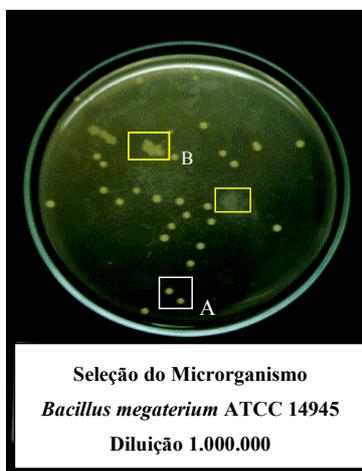


Figura 4.4: Foto da placa de petri após o surgimento das colônias A e B.

Tabela 4.3: Produção de PGA utilizando as colônias A e B.

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Atividade enzimática (UI/L) | Concentração celular (g/L) | Atividade específica (UI/g célula) |
|------------------|-----------|-----|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 2 (colônia A) | Inóculo | - | - | 1,6 | - |
| | 0 | - | - | 0,2 | - |
| | 24 | 8,1 | 38 | 2,6 | 15 |
| | 48 | 8,7 | 43 | 3,0 | 14 |
| | 72 | 9,0 | 46 | 2,3 | 20 |
| 3 (colônia B) | Inóculo | - | - | 1,3 | - |
| | 0 | - | - | 0,2 | - |
| | 24 | 7,7 | 39 | 1,9 | 21 |
| | 48 | 8,5 | 54 | 2,5 | 22 |
| | 72 | 8,9 | 54 | 2,0 | 27 |

Pode-se observar que a atividade enzimática das colônias em separado decresceu aproximadamente 50% em relação ao ensaio 1 (Tabela 4.1). Os valores obtidos para a velocidade específica máxima de crescimento ($0,2h^{-1}$ para a colônia A e $0,03h^{-1}$ para a colônia B) indicam que as duas colônias são formadas por células efetivamente diferentes.

Como o ensaio de produção com colônias em separado não apresentou resultado satisfatório, optou-se por realizar um ensaio de produção de PGA utilizando um “slant” onde as colônias A e B foram repicadas juntas, para verificar se o isolamento interferia na produção. No entanto a atividade enzimática encontrada (39,42 UI/L) foi próxima às obtidas nos ensaios 2 e 3. Os valores encontrados nos levam a crer que houve uma degeneração da população de microrganismo devido à realização de repiques sucessivos de uma população estocada por um longo período de tempo. Outra possível explicação seria a produção de proteases extracelulares simultaneamente à penicilina G acilase. Passou-se, por isso, a se investigar de maneira qualitativa a possível presença de proteases no caldo de fermentação. A metodologia que foi utilizada é muito sensível à presença de protease no meio, sendo possível observar-se a não gelificação da solução mesmo para baixas concentrações de proteases. Porém, este efeito não foi observado.

Adquiriu-se então um novo “slant” de *Bacillus megaterium* ATCC 14945 da Fundação Tropical de Campinas. O microrganismo foi submetido a repique e aos mesmos procedimentos de seleção do anterior, porém não se observou o surgimento de colônias diferenciadas. Os resultados do ensaio de fermentação utilizando este microrganismo são apresentados na Tabela 4.4. Pode se observar que novamente baixos valores de atividade enzimática foram atingidos.

Tabela 4.4: Produção de PGA utilizando novo “slant” de *Bacillus megaterium* ATCC 14945.

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Atividade enzimática (UI/L) | Concentração celular (g/L) | Atividade específica (UI/gcélula) |
|--------|-----------|-----|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| 4 | inóculo | - | - | 1,3 | - |
| | 0 | - | - | 0,2 | - |
| | 24 | 8,1 | 8 | 1,2 | 7 |
| | 48 | 8,3 | 11 | 1,1 | 10 |
| | 72 | 8,4 | 25 | 0,9 | 28 |

Na tentativa de se obter novamente valores desejáveis de atividade enzimática, outros ensaios foram realizados com esse microrganismo, variando-se alguns dos nutrientes. O soro de queijo em pó, utilizado em todos os ensaios anteriores, foi substituído por soro de queijo líquido, e novos lotes de caseína hidrolisada com Alcalase® foram preparados. O objetivo destes ensaios era verificar se poderia ter ocorrido contaminação por alguns dos nutrientes utilizados.

No ensaio 5 utilizou-se soro de queijo líquido. O ensaio 6 é uma réplica do ensaio 4, mas foi realizado novamente em paralelo com o ensaio 5 para efeito comparativo. Nos ensaios 7 e 8 utilizaram-se diferentes lotes de caseína, além da ativação do microrganismo em meio líquido anteriormente ao repique, conforme instruções do banco fornecedor. Os resultados destes ensaios são mostrados nas Tabelas 4.5 e 4.6 respectivamente. Observa-se que a baixa atividade enzimática não está relacionada com a procedência dos nutrientes e, quando realizada uma prévia ativação do microrganismo em meio líquido, observa-se um aumento na atividade enzimática, porém pouco significativo.

Tabela 4.5: Produção de PGA utilizando soro de queijo líquido e em pó.

| Ensaio | Tempo (h) | PH | Atividade enzimática (UI/L) | Concentração celular (g/L) | Atividade específica (UI/g _{celula}) |
|-------------|-----------|-----|-----------------------------|----------------------------|--|
| 5 SQL * | inóculo | - | - | 1,0 | - |
| | 0 | - | - | 0,1 | - |
| | 24 | 8,0 | 12 | 2,5 | 5 |
| | 48 | 8,1 | 14 | 2,6 | 6 |
| | 72 | 8,5 | 17 | 2,2 | 8 |
| 6 SQP ** | inóculo | - | - | 0,5 | - |
| | 0 | - | - | 0,1 | - |
| | 24 | 8,0 | 17 | 1,0 | 17 |
| | 48 | 8,1 | 21 | 1,1 | 19 |
| | 72 | 8,5 | 16 | 0,8 | 20 |

*SQL = Soro de queijo líquido

**SQP = Soro de queijo em pó

Tabela 4.6: Produção de PGA utilizando diferentes lotes de caseína e após prévia ativação do microrganismo.

| Ensaio | Tempo (h) | PH | Atividade enzimática (UI/L) | Concentração celular (g/L) | Atividade específica (UI/g _{celula}) |
|--------|-----------|-----|-----------------------------|----------------------------|--|
| 7 | inóculo | - | - | 1,0 | - |
| | 0 | - | - | 0,1 | - |
| | 24 | 7,9 | 28 | 1,5 | 18 |
| | 48 | 8,3 | 49 | 2,0 | 24 |
| | 72 | 8,8 | 48 | 1,9 | 25 |
| 8 | inóculo | - | - | 1,0 | - |
| | 0 | - | - | 0,1 | - |
| | 24 | 7,8 | 28 | 1,8 | 16 |
| | 48 | 8,3 | 58 | 2,4 | 25 |
| | 72 | 8,9 | 46 | 2,3 | 20 |

Todos estes resultados motivaram a aquisição de diferentes “slants”, encontrados no mesmo banco fornecedor. Os três novos “slants” recebidos são lotes da mesma linhagem liofilizada de *Bacillus megaterium* ATCC 14945, porém conservados de maneiras diferentes e conseqüentemente com características talvez distintas. Estes “slants” do banco fornecedor juntamente com um “slant” que havia sofrido repiques sucessivos em nosso laboratório a partir da linhagem original, foram utilizados em novos ensaios de produção de PGA. O esquema destes ensaios e os equipamentos utilizados na preservação da cultura são mostrados na Figura 4.5.

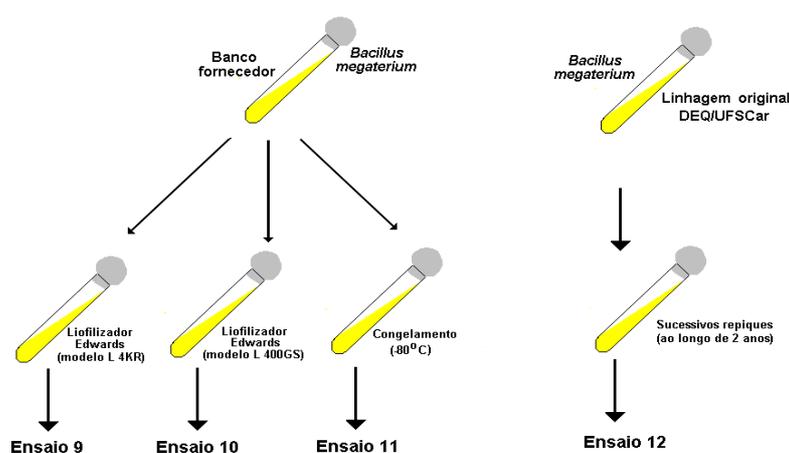


Figura 4.5: Métodos de conservação do microrganismo, utilizados nos ensaios 9-12.

Estes ensaios tinham como objetivo verificar se um dos lotes alcançaria novamente a atividade enzimática encontrada inicialmente. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4.7, observa-se que todas as culturas testadas apresentaram queda na atividade enzimática, levando-nos a crer que o microrganismo desativou mesmo quando não submetido a repiques sucessivos. A evolução dos resultados de dosagem de proteína por Lowry indica consumo dos peptídeos originados pela hidrólise enzimática da caseína. A dosagem por Bradford, que detecta apenas moléculas acima de 5 kDa, permitiria verificar o aparecimento da enzima, mas os resultados se mostraram inconclusivos, em virtude da pequena produção. Por fim, nota-se que, em todos os ensaios, o consumo de lactose foi baixo, em uma indicação de que os peptídeos poderiam ser, também, empregados como fonte de carbono pelo microrganismo.

Tabela 4.7: Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes lotes da mesma linhagem de *Bacillus megaterium* ATCC 14945.

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Proteínas Bradford (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|
| 9 | Inóculo | - | 0,6 | - | 21,1 | 0,2 | 4,9 |
| | 0 | - | 0,1 | - | 40,0 | 1,2 | 15,2 |
| | 24 | 8,0 | 1,0 | 20 | 30,0 | 0,9 | 12,8 |
| | 48 | 8,2 | 0,8 | 12 | 29,2 | 0,9 | 12,4 |
| | 72 | 8,4 | 0,8 | 15 | 34,2 | 0,9 | 11,7 |
| 10 | Inóculo | - | 3,7 | - | 16,7 | 0,3 | 5,4 |
| | 0 | - | 0,4 | - | 38,8 | 1,2 | 15,2 |
| | 24 | 8,2 | 3,1 | 27 | 30,0 | 0,6 | 12,3 |
| | 48 | 8,4 | 3,5 | 34 | 25,7 | 0,6 | 12,3 |
| | 72 | 8,9 | 3,2 | 41 | 24,4 | 0,6 | 12,6 |
| 11 | Inóculo | - | 3,2 | - | 15,5 | 0,3 | 4,9 |
| | 0 | - | 0,3 | - | 39,4 | 1,2 | 15,2 |
| | 24 | 8,2 | 3,5 | 24 | 29,2 | 0,9 | 12,1 |
| | 48 | 8,5 | 4,5 | 33 | 25,4 | 0,9 | 12,6 |
| | 72 | 8,9 | 4,2 | 35 | 23,4 | 0,8 | 11,8 |
| 12 | Inóculo | - | 1,3 | - | 23,4 | 0,4 | 5,2 |
| | 0 | - | 0,1 | - | 39,5 | 1,2 | 15,2 |
| | 24 | 8,0 | 1,7 | 38 | 34,0 | 1,2 | 13,9 |
| | 48 | 8,2 | 1,9 | 36 | 33,1 | 1,2 | 12,4 |
| | 72 | 8,6 | 2,0 | 56 | 33,8 | 1,4 | 12,1 |

Os ensaios 9 e 10 foram realizados com microorganismos oriundos de um mesmo repique mas conservados usando diferentes equipamentos (liofilizador Edwards modelo L 4KR e L 400GS respectivamente) e crioprotetores (skim milk 10% + inositol 5% e sacarose 7% + peptona 7%) no banco fornecedor. Pode-se observar pela Tabela 4.8 que os valores de μ_{\max} foram semelhantes. O microorganismo utilizado no ensaio 9, além de apresentar baixo crescimento, era visivelmente diferente dos demais no exame ao microscópio. Portanto, observa-se que o crioprotetor e/ou equipamento utilizado não foram eficientes na sua conservação. O ensaio 11, com microorganismo conservado congelado a -80°C em glicerol 10%, embora tenha apresentado um maior crescimento celular, resultou na mais baixa atividade específica. Nos ensaios 1 (Tabela 4.1) e 12 foram utilizados microorganismos oriundos do mesmo repique que os usados nos ensaios 9 e 10 mas conservados ambos na forma de “slants” em geladeira no DEQ/UFSCar. O microorganismo utilizado no ensaio 12 passou por sucessivos repiques, enquanto que o utilizado no ensaio 1 foi retirado do “slant” original. Isso

indica que sucessivos repiques podem implicar queda na produtividade do microrganismo. Também não foi identificada, dentro da sensibilidade da metodologia utilizada, presença de atividade proteolítica no caldo fermentado. A partir dos valores dos parâmetros calculados para os ensaios 9 a 12 foi escolhido o microrganismo utilizado no ensaio 12 para padronização, pois foi o que apresentou melhor valor de atividade específica na produção de PGA.

Tabela 4.8: Parâmetros calculados a partir de dados obtidos na produção de PGA.

| Ensaio | μ_{\max} (h ⁻¹) | Atividade específica (UI/gcélula) |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 9 | 4,79*10 ⁻² | 18,8 |
| 10 | 6,73*10 ⁻² | 12,7 |
| 11 | 7,58*10 ⁻² | 8,5 |
| 12 | 6,14*10 ⁻² | 27,3 |

4.1.3 Ensaios em Câmara Rotativa Utilizando Criotubos

Uma das grandes preocupações quando se trabalha com microrganismos é a manutenção da linhagem ao longo do tempo. Dentre os métodos mais utilizados tem-se a liofilização, congelamento a temperaturas baixas (-50°C a -70°C) e tubos inclinados (“slants”) com repiques sucessivos. Uma boa descrição de preservação de microrganismos industrialmente importantes é encontrada em Stanbury *et al.*, 1999. O último método, apesar de mais simples, apresenta um curto tempo de preservação (cerca de um mês) e tem como desvantagem a perda de produtividade do microrganismo ao longo do tempo por repiques sucessivos, como observado nos ensaios realizados. Neste método, as culturas precisam ser transferidas para novos meios a intervalos regulares. As duas primeiras apresentam a vantagem da preservação do microrganismo por longos períodos.

Uma vez escolhido o microrganismo utilizado (do ensaio 12), passou-se à padronização do inóculo através da preparação de criotubos (descrito no item 3.3.9), que foram conservados em glicerol 20% sob congelamento em ultra-freezer a -50°C. Foram realizados então novos ensaios de produção de PGA a partir dos criotubos. Nestes ensaios a etapa de reativação do microrganismo em meio sólido por sete dias a 30°C não se faz necessária. Parte-se direto para o meio de crescimento e em seguida para o meio de produção da enzima, ambos por 72h a 30°C.

Devido aos resultados pouco satisfatórios de produção da enzima com o meio de produção utilizado nos ensaios anteriores, adicionaram-se sais ao meio, segundo a metodologia usada por Illanes *et al.*, 1994, cuja composição é mostrada no item 3.2.2 do capítulo 3. De acordo com Illanes, 1994, os sais cumprem funções metabólicas indispensáveis e devem ser ministrados em baixas concentrações como sais inorgânicos.

Foram realizados quatro ensaios conforme o esquema mostrado na Figura 4.6. Em todos os ensaios foi utilizado o meio de produção baseado no trabalho de Berazaín, 1997, de composição citada anteriormente no item 3.2.4. A diferença entre eles portanto, estava na adição ou não de sais e no ajuste de pH no início do ensaio.

O ajuste de pH do meio no início da fermentação (diferentemente das fermentações anteriores, quando se ajustava o pH em 7 somente para o soro de queijo) teve por objetivo saber se este de alguma forma influenciava na produção de PGA. Nestes ensaios não foram retiradas amostras no tempo zero.

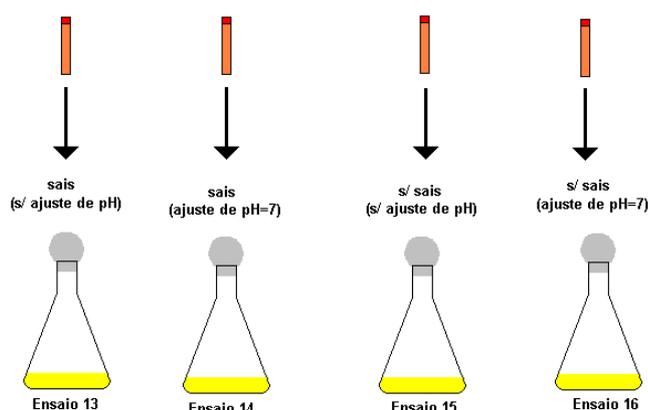


Figura 4.6: Procedimento experimental dos ensaios utilizando criotubos.

Os resultados para esses ensaios são mostrados na Tabela 4.9. Observa-se que bons resultados de atividade enzimática foram obtidos para os ensaios com a adição de sais, porém valor mais significativo foi obtido no ensaio com a adição de sais e sem ajuste de pH (ensaio 13). Pelos valores de pH da Tabela 4.9, observa-se que eles tiveram comportamentos semelhantes no decorrer das quatro fermentações, variando de +/- 7,5 a +/- 8,5, o que nos levaria a acreditar que o ajuste ou não deste não influenciaria a

produção de PGA. Porém o resultado do ensaio 13 nos leva a pensar o contrário, uma vez que este conduziu aos maiores valores de atividade. Sendo assim, optou-se por continuar os ensaios ajustando o pH apenas do soro de queijo e deste ponto em diante a adicionar sais ao meio de produção.

Tabela 4.9: Produção de PGA utilizando criotubos.

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Proteínas Bradford (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|
| 13 | Inóculo | - | 1,9 | - | 27,5 | 0,6 | 5,1 |
| | 0 | 8,3 | 0,2 | - | - | - | - |
| | 24 | 7,9 | 3,2 | 66 | 41,6 | 1,1 | 12,4 |
| | 48 | 8,4 | 5,0 | 128 | 30,2 | 0,9 | 9,7 |
| | 72 | 8,6 | 4,5 | 123 | 33,3 | 1,1 | 11,8 |
| 14 | Inóculo | - | 1,9 | - | 27,5 | 0,6 | 5,1 |
| | 0 | 7,0 | 0,2 | - | - | - | - |
| | 24 | 7,4 | 3,6 | 54 | 38,6 | 1,0 | 14,5 |
| | 48 | 8,2 | 5,2 | 47 | 37,3 | 1,0 | 12,8 |
| | 72 | 8,5 | 5,5 | 52 | 31,9 | 0,9 | 11,9 |
| 15 | Inóculo | - | 1,9 | - | 27,5 | 0,6 | 5,1 |
| | 0 | 8,3 | 0,2 | - | - | - | - |
| | 24 | 7,9 | 1,7 | 30 | 33,3 | 0,8 | 8,4 |
| | 48 | 8,3 | 1,6 | 38 | 40,6 | 1,3 | 11,7 |
| | 72 | 8,5 | 1,7 | 34 | 39,4 | 1,5 | 12,6 |
| 16 | Inóculo | - | 1,9 | - | 27,5 | 0,6 | 5,1 |
| | 0 | 7,0 | 0,2 | - | - | - | - |
| | 24 | 7,3 | 1,4 | 18 | 40,6 | 1,0 | 11,3 |
| | 48 | 7,7 | 1,7 | 23 | 37,8 | 1,2 | 12,6 |
| | 72 | 8,1 | 1,6 | 27 | 37,2 | 1,2 | 12,7 |

Com o bom resultado obtido no ensaio 13, resolveu-se refazer alguns ensaios anteriores adicionando-se sais no meio de produção. O primeiro reproduziu o ensaio 12, utilizando o “slant” que veio sofrendo sucessivos repiques ao longo de dois anos, denominado ensaio 17. O segundo, o próprio ensaio 13 com o microorganismo padronizado (criotubos) para comparação, denominado ensaio 18. O terceiro, reproduzindo o ensaio 11 com microorganismo conservado congelado a -80°C em glicerol 10%, denominado ensaio 19. O esquema dos novos ensaios é mostrado na Figura 4.7. Os resultados dos cultivos são mostrados na Tabela 4.10.

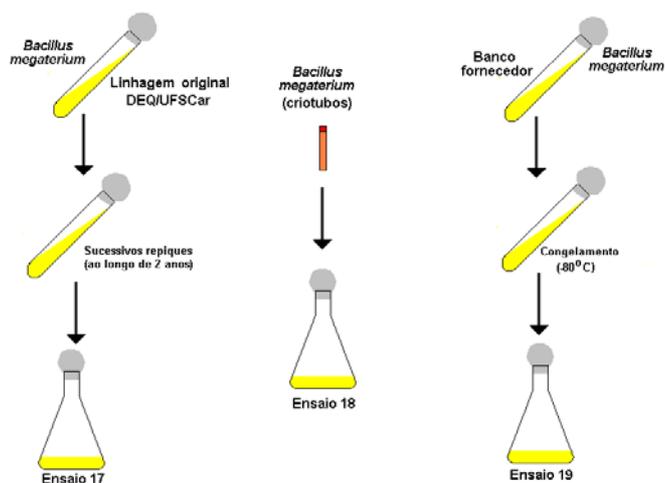


Figura 4.7: Esquema dos ensaios refeitos com a adição de sais no meio de produção.

Tabela 4.10: Produção de PGA, *Bacillus megaterium* ATCC 14945 com adição de sais.

| Ensaio | Tempo (h) | PH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|--------|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| 17 | Inóculo | | 0,9 | - |
| | 0 | | 0,1 | - |
| | 24 | 8,0 | 4,0 | 88 |
| | 48 | 8,4 | 4,5 | 121 |
| | 72 | 8,5 | 5,1 | 93 |
| 18 | Inóculo | | 1,3 | - |
| | 0 | | 0,2 | - |
| | 24 | 8,0 | 4,1 | 75 |
| | 48 | 8,4 | 4,5 | 98 |
| | 72 | 8,6 | 5,1 | 104 |
| 19 | Inóculo | | 3,4 | - |
| | 0 | | 0,4 | - |
| | 24 | 8,5 | 5,4 | 19 |
| | 48 | 8,4 | 5,7 | 9 |
| | 72 | 8,5 | 5,8 | - |

Observa-se pela Tabela 4.10, que bons resultados foram obtidos para os ensaios 17 e 18 refeitos com a adição de sais. Estes resultados indicam que a baixa atividade

enzimática obtida no ensaio 12 pode não estar associada a sucessivos repiques como dito anteriormente, e sim à ausência de sais no meio de produção. O ensaio 18 confirma os resultados obtidos no ensaio 13, apresentando um bom crescimento celular e valores semelhantes de atividade enzimática, em torno de 100UI/L. O ensaio 19 também confirma os resultados obtidos no ensaio 11: mesmo apresentando um maior crescimento de células, resultou em baixa atividade quando comparado aos demais. Sendo assim, confirmando-se o resultado do grupo anterior de ensaios, passou-se a adicionar em todos os ensaios de produção deste ponto em diante a solução de sais de composição citada no item 3.2.2. Além disso, utilizou-se sempre o microorganismo padronizado mantido em criotubos. O meio de produção citado no item 3.2.4, acrescido da solução de sais, foi chamado de meio padrão.

4.1.4 Ensaios para Verificação da Quantidade de Esporos e Tempo de Germinação

Um outro fator importante investigado foi a quantidade de esporos a ser adicionada ao meio de fermentação. Em determinado volume de meio pode estar se adicionando uma quantidade de esporos desnecessária, levando ao desperdício da cultura padronizada.

O tempo de germinação ou crescimento também é uma variável importante. Nos ensaios de produção de PGA usando *Bacillus megaterium* ATCC 14945 realizados no DEQ/UFSCar o tempo utilizado na etapa de crescimento sempre foi de 72 horas (Hojo, 1997; Pinotti, 1999). Sendo assim, passou-se a investigar se 72 horas eram realmente necessárias ou se 24 ou 48 horas seriam suficientes, o que levaria a uma diminuição considerável no tempo total de ensaio. Investigou-se também o tempo utilizado na etapa de produção de PGA, testando-se os mesmos tempos da etapa de crescimento, 24, 48 e 72 horas. Para tanto, foram realizados vários ensaios em paralelo, onde quantidades diferentes de esporos foram mantidas por diferentes tempos em meio de crescimento e produção. Para estes ensaios foram realizadas apenas análises de concentração celular e atividade enzimática. Para melhor entendimento, o procedimento utilizado nos ensaios é mostrado na Figura 4.8.

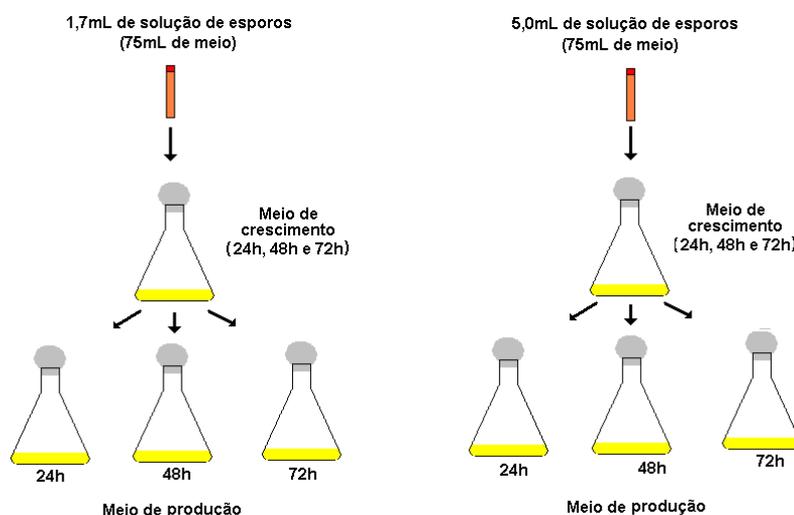


Figura 4.8: Procedimento experimental para verificação da quantidade de esporos e tempo de germinação.

Dois grupos de ensaios diferentes foram realizados. No primeiro, 1,7mL da solução de esporos foram adicionados em meios de crescimento mantidos por 24h, 48h e 72h. Decorrido esses tempos, era adicionado o inóculo ao frasco com o meio de produção, representando 10 % do volume total do meio de fermentação. Cada um destes frascos era mantido por 72h, com retiradas de amostras a cada 24h. O mesmo procedimento foi realizado para o outro grupo, com 5,0mL de solução de esporos, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos no grupo anterior, além de verificar se a utilização de uma quantidade maior de esporos levaria a melhorias significativas na atividade enzimática.

Para cada grupo realizaram-se três ensaios, totalizando seis ensaios. Os valores das concentrações celulares e das atividades enzimáticas encontradas são mostrados nas Tabelas 4.11 e 4.12, para 1,7mL de solução de esporos e 5,0mL de solução de esporos, respectivamente.

Tabela 4.11: Produção de PGA com 1,7 mL de esporos em 75mL de meio de germinação.

| Tempo de crescimento (h) | Tempo de produção (h) | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Conc. cel. | Ativ. enz. | Conc. cel. | Ativ. enz. | Conc. cel. | Ativ. enz. |
| 24 | 4,1 | 46 | 5,2 | 88 | 5,2 | 115 |
| 48 | 4,4 | 52 | 5,2 | 110 | 5,3 | 89 |
| 72 | 3,6 | 47 | 5,7 | 96 | 5,4±0,5 | 106±10 |

Conc. cel. = concentração celular em g/L

Ativ. enz. = atividade enzimática em UI/L

Tabela 4.12: Produção de PGA com 5,0 mL de esporos em 75mL de meio de germinação

| Tempo de crescimento (h) | Tempo de produção (h) | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Conc. cel. | Ativ. enz. | Conc. cel. | Ativ. enz. | Conc. cel. | Ativ. enz. |
| 24 | 4,3 | 65 | 4,8 | 88 | 4,6 | 89 |
| 48 | 4,2 | 61 | 4,8 | 88 | 5,2 | 96 |
| 72 | 3,6 | 59 | 5,3 | 89 | 5,6 | 106 |

Conc. cel. = concentração celular em g/L

Ativ. enz. = atividade enzimática em UI/L

Pelos valores mostrados nas tabelas 4.11 e 4.12, percebe-se que a quantidade de esporos adicionada não influencia significativamente nos valores de atividade enzimática e concentração celular, portanto pode-se utilizar uma solução com menor quantidade de esporos, mantendo sempre a mesma proporção para volumes maiores. Sendo assim, optou-se por trabalhar com 3ml de esporos/75 mL de meio, pois 3mL é o volume de esporos contidos em cada criotubo. Com relação ao tempo de germinação, este parece também não influenciar muito os valores de atividades após as 72h de produção. Este comportamento pode ser observado principalmente na Tabela 4.11, onde o maior valor de atividade é alcançado com meio de crescimento de 24h após 72h de fermentação. Portanto, optou-se por trabalhar com o tempo de 24 horas na etapa de

germinação, mantendo-se a cultura por 72 horas no meio de produção. Com isso, reduziu-se significativamente o tempo total de ensaio.

4.1.5 Meio de Germinação (crescimento) Sintético

Com a finalidade de se obter um meio sintético de crescimento que facilitasse o estudo do metabolismo do microorganismo, foram realizados vários ensaios utilizando diferentes meios de crescimento. Foram testadas formulações sintéticas na etapa de germinação com adição de nutrientes complexos na etapa de produção da enzima. Nesses ensaios, variou-se principalmente a fonte de carbono, com o soro de queijo sendo substituído por lactose e glicose e a fonte de nitrogênio, com a caseína sendo substituída por aminoácidos (AA). A etapa de crescimento foi de 24 horas, como já padronizado anteriormente. Na etapa de produção da enzima foi mantido o meio utilizado nos ensaios anteriores, com a adição de sais, chamado de meio padrão.

Durante a preparação do inóculo, ocorre germinação dos esporos e crescimento de massa celular do microrganismo. Sendo assim, o ideal é encontrar-se meio de germinação sintético que suporte um bom crescimento celular e que favoreça a fase de produção.

Estes novos ensaios foram divididos em dois grupos por causa da variedade de meios de crescimento a serem testados. Um dos objetivos foi investigar a influência de diferentes nutrientes na fase de germinação, visando a aumentar a produção de enzima, que sempre ocorre na segunda fase na presença do indutor, o ácido fenil acético (AFA). O procedimento experimental utilizado nestes ensaios é mostrado na Figura 4.9. Em todos os meios foram utilizados aminoácidos na mesma composição presente na caseína, com exceção dos ensaios 20 e 24, que utilizaram o mesmo meio de crescimento usado nos ensaios anteriores (MG1 - item 3.2.2). Um dos objetivos foi verificar se o microorganismo apresentaria bom crescimento em meio sintético que substituísse a caseína hidrolisada por Alcalase®, fonte complexa usada anteriormente. A lista dos aminoácidos e respectivas composições utilizadas são mostradas no item 3.2.2.

No primeiro grupo, ensaios 20 a 23, um dos principais objetivos foi a substituição da lactose do soro de queijo por outras fontes de carbono como glicose e lactose P.A (sem o soro). Neste primeiro grupo, os aminoácidos (AA) foram usados

como única fonte de nitrogênio. Os resultados dos cultivos desses ensaios são mostrados na Tabela 4.13.

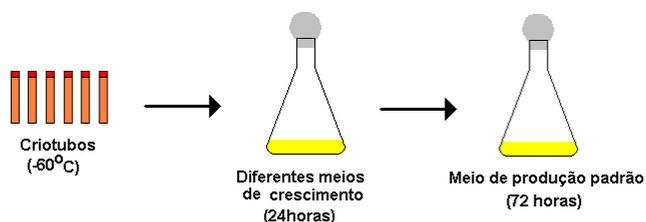


Figura 4.9: Procedimento experimental para padronização do meio de crescimento.

Os compostos utilizados em cada meio de crescimento foram:

20 – CHE + soro de queijo

21 – AA + soro de queijo

22 – AA + lactose

23 – AA + glicose

Tabela 4.13: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945, utilizando o meio padrão para a etapa de produção, a partir de diferentes meios de crescimento.

| Ensaio | Variável | Meio germinação | Meio produção | Tempo (h) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|--------|----------|-----------------|-------------------------------|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| 20 | Padrão | caseína soro | Padrão: caseína soro Sais AFA | Inóculo | | 0,8 | |
| | | | | 0 | | 0,1 | |
| | | | | 24 | 8,2 | 4,5 | 76 |
| | | | | 48 | 8,6 | 5,5 | 133 |
| | | | | 72 | 9,1 | 4,9 | 122 |
| 21 | FONTE | AA soro | Padrão | Inóculo | | 3,44 | |
| | | | | 0 | | - | |
| | | | | 24 | 8,2 | 4,7 | 81 |
| | | | | 48 | 8,6 | 5,2 | 126 |
| | | | | 72 | 9,1 | 5,2 | 134 |
| 22 | DE | AA lactose | Padrão | Inóculo | | 1,52 | |
| | | | | 0 | | 0,1 | |
| | | | | 24 | 8,1 | 4,1 | 89 |
| | | | | 48 | 8,5 | 5,3 | 130 |
| | | | | 72 | 8,9 | 4,3 | 121 |
| 23 | CARBON O | AA glicose | Padrão | Inóculo | | 2,02 | |
| | | | | 0 | | 0,1 | |
| | | | | 24 | 8,0 | 4,1 | 87 |
| | | | | 48 | 8,5 | 5,4 | 128 |
| | | | | 72 | 9,0 | 4,5 | 143 |

Observa-se que o *Bacillus megaterium* apresentou crescimento celular, independentemente das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de crescimento. Além disso, os ensaios finais para a produção de PGA, em todos os casos, também apresentaram resultados equivalentes de atividade enzimática. Ressalte-se que o meio utilizado na etapa de produção foi sempre o mesmo (meio padrão, anteriormente descrito).

No segundo grupo, ensaios 24 a 27, um dos principais objetivos foi substituir a fonte de nitrogênio no meio de crescimento, como a caseína hidrolisada, por aminoácidos e adicionar vitaminas contidas em fontes complexas como samprosoy e extrato de levedura. Substituiu-se ainda a fonte de carbono do soro de queijo por lactose P.A. Os compostos utilizados em cada meio de crescimento foram:

24 – CHE + soro de queijo

25 – AA + samprosoy + lactose + sais

26 – AA + extrato de levedura + lactose + sais

27 – AA + extrato de levedura + lactose

Os resultados dos cultivos e os respectivos compostos utilizados para o segundo grupo de ensaios são mostrados na Tabela 4.14.

Pode se observar que o *Bacillus megaterium* apresentou os mesmos níveis de crescimento celular, independentemente das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas na fase de produção do inóculo. Os ensaios finais para a produção de PGA, em todos os casos, apresentaram resultados de atividade enzimática semelhantes aos já observados nos ensaios 20-23. É importante destacar que para estes ensaios não foram realizadas análises de açúcares, pois o maior interesse estava no crescimento celular e nas atividades enzimáticas detectadas no meio de produção.

Portanto, como os resultados para cada meio de crescimento foram semelhantes, escolheu-se para a padronização o meio utilizado no ensaio 22, composto por aminoácidos e lactose, por ser um meio sintético.

A utilização de um meio sintético, de composição química bem definida, facilita o estudo dos efeitos de alguns componentes, com acompanhamento de possíveis substratos limitantes, além de possibilitar futuros estudos cinéticos do processo. Outro

fator importante é a facilidade da separação do(s) produto(s) de interesse nas etapas subsequentes de purificação. O custo do meio sintético, entretanto, não o recomenda para utilização industrial.

Tabela 4.14: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945, utilizando o meio padrão para a etapa de produção, a partir de diferentes meios de crescimento.

| Ensaio | Variável | Meio Germinação | Meio Produção | Tempo (h) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade enzimática (U/L) |
|--------|------------|---------------------------|---------------|-----------|-----|----------------------------|----------------------------|
| 24 | Padrão | Caseína soro | Padrão | Inóculo | | 3,42 | |
| | | | | 0 | | 1,00 | |
| | | | | 24 | 8,0 | 4,4 | 64 |
| | | | | 48 | 8,4 | 4,4 | 113 |
| | | | | 72 | 8,7 | 4,4 | 125 |
| 25 | VITAMINA S | AA Lactose Samprosoy sais | Padrão | Inóculo | | 2,8 | |
| | | | | 0 | | 0,1 | |
| | | | | 24 | 8,2 | 4,4 | 93 |
| | | | | 48 | 8,5 | 5,1 | 75 |
| | | | | 72 | 9,2 | 5,1 | 136 |
| 26 | & | AA Lactose Levedura sais | Padrão | Inóculo | | 2,92 | |
| | | | | 0 | | 0,1 | |
| | | | | 24 | 8,2 | 4,4 | 76 |
| | | | | 48 | 8,8 | 5,6 | 132 |
| | | | | 72 | 9,2 | 5,5 | 126 |
| 27 | SAIS | AA Lactose Levedura | Padrão | Inóculo | | 2,06 | |
| | | | | 0 | | 0,1 | |
| | | | | 24 | 8,2 | 4,7 | 84 |
| | | | | 48 | 8,7 | 5,3 | 131 |
| | | | | 72 | 9,2 | 4,8 | 135 |

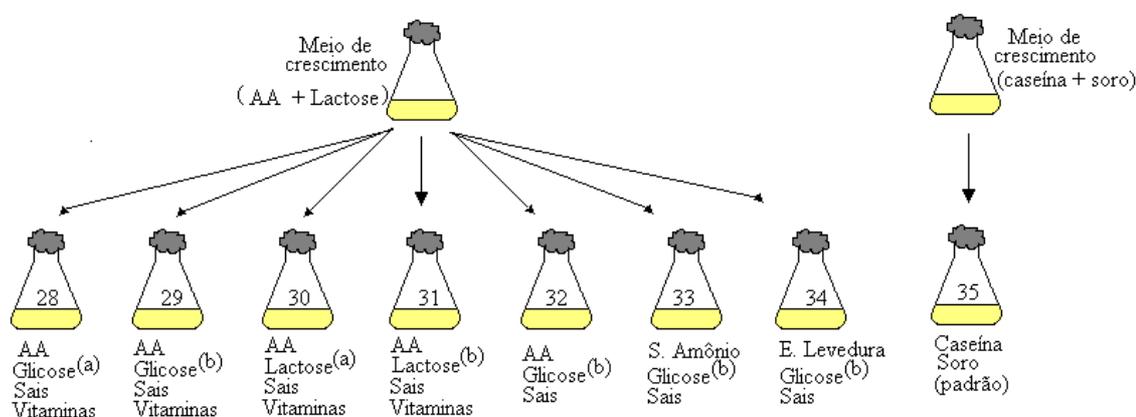
4.1.6 Meio de Produção Sintético

Com base nos bons resultados obtidos com todos os meios de crescimento utilizados anteriormente (item 4.1.5), optou-se por fazer um estudo semelhante variando-se as fontes de carbono e nitrogênio, desta vez no meio de produção. Testou-se a substituição da caseína hidrolisada por aminoácidos (AA), sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes de nitrogênio, além da utilização de lactose e glicose em diferentes concentrações como fontes de carbono. O uso de diferentes concentrações de um mesmo açúcar (concentrações alta e baixa) permitirá verificar se há efeito repressivo por algumas dessas fontes, principalmente a glicose, como já observado na literatura

(Vojtisek e Slezak, 1975; Savidge, 1984; Meevootisom e Saunders, 1987; Shewale e Sivaraman, 1989). Segundo Illanes *et al.*, 1994, a repressão por glicose ocorre principalmente quando se utiliza meio complexo, fato este não observado quando utilizado meio sintético.

A composição de AA no meio de produção também segue a composição da caseína (item 3.2.2). Sua concentração difere da utilizada no meio de crescimento, de acordo com as conclusões do estudo feito por Berazain, 1997.

Em todos os ensaios o meio de germinação/crescimento foi o sintético escolhido no item 4.1.5 (AA + lactose). A única exceção é o ensaio 35, que utiliza o meio complexo durante a etapa de crescimento (MG1), para efeito comparativo. A figura 4.10 mostra os compostos utilizados em cada meio de produção. Nos ensaios 28-31 variaram-se principalmente as concentrações de açúcar, e nos ensaios 32-34 a fonte de nitrogênio. Os resultados após 72 horas de meio de produção são mostrados na Tabela 4.15.



(a) Glicose/lactose = 14,73g/L

(b) Glicose/lactose = 0,7g/L

Figura 4.10: Esquema dos meios sintéticos utilizados nos ensaios de produção de PGA.

Pode-se observar que diferentemente dos ensaios para meios de crescimento, não se obtiveram resultados satisfatórios variando-se o meio de produção. Os valores de concentração celular e de atividade enzimática ficaram abaixo do esperado. Como o crescimento do microrganismo foi pequeno, não houve produção de PGA.

Tabela 4.15: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 com diferentes meios de produção.

| Ensaio | Variável | Tempo (h) | pH | Conc. Celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Lactose (g/L) | Glicose (g/L) |
|---|------------|-----------|-----|---------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|---------------|
| Composição | | | | | | | | |
| 28 AA Glicose ^(a) Sais Vitaminas | FONTE | Inóculo | - | 1,5 | - | 10,1 | | |
| | | 0 | - | 0,2 | - | 10,0 | | 15,2 |
| | | 24 | 7,9 | 0,6 | 16 | 7,9 | | 14,0 |
| | | 48 | 8,0 | 0,3 | 19 | 7,1 | | 14,9 |
| | | 72 | 7,8 | 0,6 | 24 | 7,4 | | 14,7 |
| 29 AA Glicose ^(b) Sais Vitaminas | FONTE | Inóculo | - | 1,5 | - | 10,1 | | |
| | | 0 | - | 0,4 | - | 7,3 | | 0,5 |
| | | 24 | 7,9 | 0,5 | 8 | 6,9 | | 0,6 |
| | | 48 | 8,0 | 0,2 | 24 | 6,6 | | 0,7 |
| | | 72 | 7,5 | 0,5 | 23 | 6,1 | | 0,6 |
| 30 AA Lactose ^(a) Sais Vitaminas | DE | Inóculo | - | 1,5 | - | 10,1 | 4,9 | |
| | | 0 | - | 0,4 | - | 7,8 | 11,6 | |
| | | 24 | 7,8 | 0,6 | 17 | 7,3 | 11,3 | |
| | | 48 | 7,9 | 0,6 | 22 | 7,1 | 11,3 | |
| | | 72 | 7,8 | 0,7 | 22 | 7,4 | 10,1 | |
| 31 AA Lactose ^(b) Sais Vitaminas | CARBONO | Inóculo | - | 1,5 | - | 10,1 | 4,9 | |
| | | 0 | - | 0,3 | - | 7,5 | 0,8 | |
| | | 24 | 7,9 | 0,5 | 17 | 6,6 | 0,8 | |
| | | 48 | 8,1 | 0,5 | 27 | 6,7 | 0,8 | |
| | | 72 | 7,9 | 0,4 | 28 | 6,0 | 0,9 | |
| 32 AA Glicose ^(b) Sais | CARBONO | Inóculo | - | 1,9 | - | 8,0 | | - |
| | | 0 | - | - | - | - | | - |
| | | 24 | 8,2 | 0,6 | 21 | 6,2 | | 0,7 |
| | | 48 | 8,2 | 0,7 | 19 | 6,9 | | 0,6 |
| | | 72 | 8,1 | 1,1 | 16 | 6,3 | | 0,6 |
| 33 S. amônio Glicose ^(b) Sais | FONTE | Inóculo | - | 1,9 | - | - | | - |
| | | 0 | - | 0,1 | - | 1,0 | | 0,7 |
| | | 24 | 7,9 | 2,6 | - | 1,0 | | 0,7 |
| | | 48 | 7,9 | 3,4 | - | 1,0 | | 0,7 |
| | | 72 | 7,8 | 1,9 | - | 1,0 | | 0,7 |
| 34 E. Levedura Glicose ^(b) Sais | DE | Inóculo | - | 1,9 | - | - | | |
| | | 0 | - | - | - | - | | |
| | | 24 | 8,3 | 4,5 | 22 | 17 | | |
| | | 48 | 8,6 | 4,8 | 28 | 15 | | |
| | | 72 | 8,9 | 5,1 | 31 | 15 | | |
| 35 Caseína Soro Sais (padrão) | NITROGÊNIO | Inóculo | - | 3,3 | - | 34 | 5,7 | |
| | | 0 | - | 1,3 | - | 49 | 9,4 | |
| | | 24 | 8,1 | 4,8 | 73 | 45 | 10,4 | |
| | | 48 | 8,6 | 5,5 | 89 | 43 | 10,2 | |
| | | 72 | 8,6 | 6,0 | 87 | 37 | 10,1 | |

(a) Glicose/lactose = 14,73g/L

(b) Glicose/lactose = 0,7g/L

O meio complexo contendo hidrolisado de caseína (ensaio 35) apresentou resultados satisfatórios, porém com produtividade abaixo da esperada. Este fato pode estar relacionado ao uso dos criotubos novos, preparados em datas diferentes dos anteriores.

Com relação à análise da concentração dos açúcares, observa-se que para qualquer uma das fontes e concentrações utilizadas, não ocorreu o consumo destes pelo microorganismo, mesmo quando havia crescimento mensurável. Isto indica que outras fontes de carbono presentes nos meios podem estar sendo consumidas. Com isto, torna-se difícil o cálculo do coeficiente de rendimento célula/substrato – açúcar ($Y_{X/S}$) para este microorganismo.

A partir desses resultados, decidiu-se repetir alguns ensaios e acompanhar o crescimento do microorganismo ao microscópio ao longo das fases de germinação e produção. Verificou-se que os esporos de *Bacillus megaterium* adicionados em meio sintético não são capazes de germinar. Esta observação explica os bons resultados dos ensaios para meio de germinação sintético (item 4.1.5). Como o microorganismo não germinou no meio sintético, a germinação ocorreu na etapa de produção, uma vez que o meio utilizado nessa etapa foi sempre complexo. O mesmo não ocorreu nos ensaios para meio de produção sintético, já que o meio de germinação escolhido foi o meio sintético contendo lactose e AA. O microorganismo não germinou neste meio e nem na etapa subsequente, também em meio sintético. Concluiu-se assim que o microorganismo necessita de algum nutriente contido no meio complexo para germinar.

4.1.7 Influência da Adição de AFA no meio de produção

Devido à diferença obtida nos resultados finais dos ensaios de padronização do meio de crescimento (item 4.1.5) e do meio de produção (item 4.1.6), optou-se por realizar mais um grupo de ensaios. A finalidade destas culturas foi obter respostas para as dúvidas que surgiram com os ensaios anteriores, como por exemplo, o bom resultado em concentração celular e atividade enzimática finais obtidos com meios sintéticos na etapa de germinação/crescimento. Resolveu-se assim estudar o papel do ácido fenilacético, presente no meio de produção (adicionado 8 horas depois do início do cultivo).

Para tanto foram escolhidos dois meios de produção já testados anteriormente, com diferentes tempos de adição do AFA (0 e 8 horas). O primeiro foi meio padrão (complexo) e o segundo o meio sintético contendo lactose e aminoácidos. Um terceiro meio de mesma composição que o segundo também foi utilizado, porém sem adição do ácido. O meio utilizado na etapa de crescimento para todos os ensaios foi o escolhido no item 4.1.5 (AA + lactose). Segundo a literatura (Chiang e Bennett, 1967; Illanes *et al.*, 1994) o AFA é indutor da enzima, mas inibe o crescimento do *Bacillus megaterium* se adicionado no início do cultivo (etapa de produção). A Tabela 4.16 mostra o resultado das cinco fermentações realizadas.

Tabela 4.16: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 com diferentes tempos de adição de AFA.

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|--------------------------------------|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| 36 Padrão AFA (t=0) | 0 | 7,9 | 0,5 | - |
| | 8 | 7,9 | 0,6 | - |
| | 24 | 8,1 | 3,8 | 36 |
| | 48 | 8,3 | 5,2 | 63 |
| | 72 | 9,2 | 5,1 | 75 |
| 37 Padrão AFA (t=8) | 0 | 8,4 | 0,4 | - |
| | 8 | 8,4 | 0,4 | - |
| | 24 | 8,1 | 3,1 | 48 |
| | 48 | 8,4 | 4,9 | 57 |
| | 72 | 9,1 | 5,2 | 66 |
| 38 AA Lactose AFA (t=0) | 0 | 8,2 | 0,2 | - |
| | 8 | 8,2 | 0,2 | - |
| | 24 | 8,2 | 0,4 | 21 |
| | 48 | 8,2 | 0,3 | 25 |
| | 72 | 8,3 | 0,3 | 20 |
| 39 AA Lactose AFA (t=8) | 0 | 8,5 | 0,2 | - |
| | 8 | 8,5 | 0,2 | - |
| | 24 | 8,3 | 0,4 | 22 |
| | 48 | 8,2 | 0,3 | 21 |
| | 72 | 8,3 | 0,3 | 25 |
| 40 AA Lactose Sem AFA | 0 | 8,5 | 0,3 | - |
| | 8 | 8,5 | 0,2 | - |
| | 24 | 8,6 | 0,3 | 17 |
| | 48 | 8,4 | 0,3 | 15 |
| | 72 | 8,6 | 0,4 | 14 |

Massa celular do inóculo = 1,5g/L.

Com relação aos ensaios 36 e 37 os resultados mostraram que a adição de AFA no início da etapa de produção não exerceu influência no crescimento do microorganismo, já que ambos apresentaram concentrações celulares semelhantes às obtidas anteriormente para o meio padrão. O resultado obtido não concorda com a literatura, que cita a inibição do crescimento celular com adição do AFA nas primeiras horas da fermentação.

Observa-se que os ensaios 38-40, com meio sintético, assim como no item 4.1.6, não apresentaram crescimento celular e produção de enzima satisfatórios, independente da presença e do tempo de adição do AFA. Isto mostra que os baixos valores de massa celular e atividade enzimática não estão relacionados à presença de AFA no meio. Estes resultados confirmam que no meio sintético utilizado há falta de algum(s) micronutriente(s) essencial para o metabolismo do microorganismo em sua fase de germinação, ou os aminoácidos inibem alguma enzima associada à germinação. O inverso ocorre com o meio contendo a caseína hidrolisada, que para grande parte dos ensaios realizados apresentou bons resultados. A hidrólise da caseína com Alcalase® produz peptídeos que podem ser essenciais à germinação.

4.1.8 Meios de Germinação e Produção Complexos

Como a utilização de meio sintético nas etapas de germinação e produção não forneceu resultados satisfatórios, resolveu-se estudar meios de germinação e produção complexos. Inicialmente foram testadas várias combinações de nutrientes na etapa de germinação e crescimento do microorganismo, retirando-se ou incluindo-se alguns dos componentes, tais como, soro de queijo, caseína hidrolisada, sais, lactose PA e glicose PA. As amostras foram analisadas no início (0h) e ao final (24h), além da observação microscópica dos esporos no início e das células ao final de 24 horas. Os resultados obtidos para as diferentes combinações são apresentados na Tabela 4.17.

Alguns esclarecimentos importantes foram obtidos comparando-se os resultados dos vários meios de germinação complexos. Comparando-se os meios MG1 e MG2 observa-se que a presença de sais conduz a um aumento expressivo na massa celular, confirmando assim as observações feitas anteriormente. Em ambos os casos, o consumo de lactose é residual ($Y_{X/S}^{-1} \cong 0,1$). O meio MG3, com a adição de glicose, aumentou ainda mais a massa celular e houve o consumo total deste açúcar pelo microorganismo

após 24 horas. Isto indica que o microrganismo a utiliza como fonte preferencial de carbono por ser facilmente metabolizável. A substituição do soro por lactose PA (MG4) conduziu à diminuição significativa da massa celular, confirmando portanto, que o soro de queijo contém algum fator importante ao metabolismo do microrganismo que induz o crescimento da biomassa. Os ensaios MG5, 6 e 7 apresentam resultados semelhantes com relação ao crescimento de células, indicando que o melhor meio complexo a ser utilizado é um meio contendo caseína hidrolisada, soro e sais, pois se observa que a ausência de um destes componentes não conduz a um crescimento celular satisfatório. Este resultado foi confirmado por observações em microscópio ótico: houve germinação do *B. megaterium* em todos os meios testados, mas o número de células vegetativas nos meios MG5, MG6 e MG7 se mostrou bem menor que nos meios MG2 e MG3.

Tabela 4.17: Concentração celular e consumo de nutrientes após 24 horas de cultivo de *B. megaterium* com meios complexos na etapa de germinação.

| Meio de Germinação | Tempo (h) | Concentração celular (g/L) | Lactose (g/L) (HPLC) | Glicose (g/L) (HPLC) | Caseína (g/L) |
|--|-----------|----------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| MG1 Soro/caseína | 0 | 0,1 | 6,0 | | 49,0 |
| | 24 | 1,1 | 5,9 | | 43,0 |
| MG2 Soro/caseína /sais | 0 | 0,1 | 4,9 | | 51,9 |
| | 24 | 6,3 | 4,3 | | 40,0 |
| MG3 Soro/caseína /sais/glicose | 0 | 0,1 | 6,0 | 4,4 | 52,3 |
| | 24 | 7,2 | 4,9 | - | 41,2 |
| MG4 Caseína/sais /lactose | 0 | 0,1 | 5,0 | | 51,1 |
| | 24 | 1,5 | 5,1 | | 39,6 |
| MG5 Soro/sais | 0 | 0,1 | ND | | ND |
| | 24 | 0,4 | ND | | ND |
| MG6 Soro/sais/ glicose | 0 | 0,1 | ND | | ND |
| | 24 | 0,6 | ND | | ND |
| MG7 Caseína | 0 | 0,1 | ND | | ND |
| | 24 | 0,3 | ND | | ND |

A seguir, passou-se a estudar o papel dos componentes presentes no meio complexo padrão na etapa de produção da enzima. Uma vez constatada a importância da

presença dos sais para aumento da massa celular, estes passaram a ser adicionados em todos os meios, tanto de germinação como de produção.

Nos meios de produção testados a seguir foi variada a concentração de sais, para verificar se uma concentração maior aumentaria o crescimento celular e a produção de PGA. Foram realizadas ao todo dez corridas. Nos ensaios 41 a 45 foram utilizados no meio de produção os mesmos componentes do meio de germinação (meios MG2, MG3, MG4, MG5, MG6). Os meios de germinação e produção do ensaio 46 tinham também os mesmos componentes presentes (à exceção de AFA), caseína e sais. Nos ensaios 47 a 50, o meio de germinação foi fixado (MG2), variando-se os meios de produção com a finalidade de se verificar a influência da concentração de sais e de AFA. Vale ressaltar que estudos anteriores verificaram que a adição de AFA no início da etapa de produção não afetava o crescimento celular. Para comprovar essa constatação, realizou-se um novo ensaio com AFA adicionado no tempo zero (ensaio 49). Em todos os outros experimentos, a adição de AFA foi após oito horas de corrida. Os resultados de massa celular e atividade enzimática, após 72 horas, são mostrados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Produção de PGA utilizando diferentes meios complexos.

| Ensaio | Meio de germinação | Meio de Produção | Concentração Celular (72h - g/L) | Atividade Enzimática (72h - UI/L) |
|--------|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 41 | MG2 | Caseína/soro/sais/AFA | 5,0 | 65 |
| 42 | MG3* | Caseína/soro/sais/glicose (14g/L)/AFA | 6,9 | 61 |
| 43 | MG4 | Caseína/lactose/sais/AFA | 3,5 | 55 |
| 44 | MG5 | Soro/sais/AFA | 1,2 | - |
| 45 | MG6 | Soro/glicose/sais | 1,3 | - |
| 46 | Caseína | Caseína/sais/AFA | 3,2 | 55 |
| 47 | MG2 | Caseína/soro/sais(2x)/AFA | 5,5 | 80 |
| 48 | MG2 | Caseína/soro/sais(4x)/AFA | 4,4 | 86 |
| 49 | MG2 | Caseína/soro/sais/AFA(t=0) | 5,1 | 67 |
| 50 | MG2 | Caseína/soro/sais(2x)/sem AFA | 4,2 | 43 |

* Glicose foi totalmente consumida.

Comparando-se os resultados dos ensaios 41 (sem glicose) e 42 (com glicose), observa-se que o ensaio 42 apresentou maior crescimento celular, com consumo total da glicose já nas primeiras 24 horas. O uso preferencial da glicose para crescimento já havia sido observado na etapa de produção do inóculo. Entretanto, percebe-se que o aumento de massa celular não está associado a aumento na produção de enzima. Uma possível explicação seria um efeito repressor da glicose, ou seja, enquanto o microorganismo consome preferencialmente esse açúcar, a síntese da enzima é reprimida. Esgotada a glicose, o microorganismo passa a utilizar outra fonte de carbono, como o hidrolisado de caseína, ajustando o metabolismo para produzir a enzima.

A substituição do soro por lactose na etapa de produção (ensaio 43) diminuiu também a massa celular. O consumo de lactose foi baixo. A importância do soro se deve, portanto, a micronutrientes – e não à lactose nele presente. Sabe-se que este contém quantidades importantes de vitaminas e sais minerais.

A importância do hidrolisado de caseína fica evidenciada com os resultados dos ensaios 44-46. A enzima é produzida somente quando o hidrolisado está presente. No ensaio 46, onde este é utilizado como única fonte de carbono e nitrogênio, a PGA é produzida em níveis similares aos observados quando se utilizou caseína hidrolisada em conjunto com outras fontes de carbono.

No ensaio 47, onde se dobrou a quantidade de sais, confirmou-se a necessidade destes para a produção de PGA. A adição de sais numa concentração duas vezes maior levou a maiores valores de atividade e valores semelhantes de concentração celular. Esta concentração de sais parece ser próxima da necessária, já que a utilização de uma quantidade quatro vezes maior (ensaio 48) não melhorou significativamente a produção.

No ensaio 49, a adição do AFA no tempo zero não afetou a produção da enzima nem o crescimento celular, confirmando o resultado anterior (ensaio 36). Na ausência deste, porém, a atividade enzimática foi reduzida praticamente à metade, confirmando-se, assim, a importância do AFA como indutor na produção de PGA.

4.1.9 Influência de Outros Componentes do Meio de Produção

Após estudos que permitiram a identificação do melhor meio de crescimento e do papel de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no meio de produção, passou-se a estudar a influência de outras substâncias presentes no meio de produção da enzima.

Um dos estudos foi feito para o carbonato de cálcio (CaCO_3). Sabe-se que com a presença de CaCO_3 há liberação de CO_2 para impedir a diminuição do pH do meio, quando da adição de AFA. Sendo assim, a análise da evolução do CO_2 pode induzir a interpretações errôneas, já que este pode não ser proveniente apenas do metabolismo celular. Então, investigou-se a substituição do tampão carbonato por tampão fosfato, que eliminaria falsas interpretações com relação a esta variável.

Foram realizados ensaios onde o tampão carbonato foi substituído por tampão fosfato 50mM pH 7,5. Essa concentração e pH foram utilizados porque eram as mais próximas das condições anteriores para o meio padrão. Em outro ensaio, realizado em paralelo, substituiu-se novamente o tampão, mas incluiu-se também o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para manter quantidades de cálcio semelhantes ao meio padrão. O resultados destes ensaios, juntamente com um padrão realizado em paralelo, podem ser vistos na Tabela 4.19. O ensaio 51 em câmara rotativa foi realizado em paralelo ao 5º ensaio no biorreator e seu resultado será mostrado juntamente com este.

Para melhor acompanhamento dos ensaios, optou-se por analisar um ponto intermediário de 12 horas e em alguns casos (como o meio padrão por exemplo), finalizar o ensaio em 48 horas. Os resultados mais recentes mostraram não haver alterações significativas após 48 horas de ensaio. Em todos esses ensaios, AFA estava presente desde o início da etapa de produção.

A tendência de aumento de pH, associada ao consumo de peptídeos pelo microrganismo, é um padrão de comportamento presente em todas as culturas realizadas. Assim, passou-se a analisar a presença de amônia/amônio no meio – que, como se sabe, resultam do catabolismo de peptídeos e aminoácidos. Para tanto, utilizou-se o método de Kjeldhal sem, entretanto, promover-se a digestão ácida da amostra. Desta forma, todo nitrogênio medido será proveniente dos íons amônio (e de NH_3 em equilíbrio termodinâmico) presentes na solução.

Pode-se observar os bons resultados obtidos para o meio padrão, F52, que em 24 horas atingiu atividade enzimática maior que 100UI/L. Resultados na mesma ordem de grandeza foram obtidos para o meio usando tampão fosfato (ensaio 53). No ensaio 54, embora a concentração celular tenha atingido bons níveis, obteve-se atividade enzimática baixa. Uma provável explicação é que pode ter ocorrido inibição pelo cloreto de cálcio, pois embora este tenha sido adicionado mantendo as mesmas

concentrações de cálcio observadas quando se usa tampão carbonato, deve-se lembrar que o carbonato de cálcio é insolúvel a uma concentração semelhante de cloreto de cálcio (solúvel); os níveis de cálcio serão muito mais altos no meio no caso do ensaio F54.

Tabela 4.19: Produção de PGA utilizando diferentes meios complexos.

| MC | Ensaio | Tempo (h) | pH | C _x (g/L) | A. E. (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Lactose (g/L) | Amônia (g/L) |
|-------------------|---|-----------|-----|----------------------|--------------|-----------------------|---------------|--------------|
| Caseína Soro sais | F52 Caseína Soro Sais (2x) AFA | 0 | 7,7 | 0,7 | - | 42,2 | 11,9 | 0 |
| | | 12 | 7,9 | 3,3 | 56 | 42,0 | 11,3 | 0,3 |
| | | 24 | 8,2 | 4,5 | 102 | 40,7 | 11,7 | 0,7 |
| | | 48 | 8,7 | 5,5 | 108 | 34,4 | 11,7 | 1,6 |
| Caseína Soro sais | F53 Caseína Soro Sais (2x) AFA-Tampão Fostato | 0 | 7,6 | 0,4 | - | 44,9 | 12,2 | 0 |
| | | 12 | 7,9 | 3,0 | 47 | 44,6 | 11,3 | 0,3 |
| | | 24 | 8,2 | 4,0 | 76 | 40,9 | 11,2 | 0,7 |
| | | 48 | 8,7 | 5,1 | 94 | 36,2 | 11,6 | 1,5 |
| Caseína Soro sais | F54 Caseína/soro/ Sais (2X) AFA-Tampão fosfato + CaCl ₂ .2H ₂ O | 0 | 7,3 | 0,7 | - | 42,1 | 14,0 | 0 |
| | | 24 | 8,2 | 4,7 | 26 | 37,2 | 13,0 | 0,8 |
| | | 48 | 8,5 | 5,2 | 29 | 32,9 | 12,9 | 1,4 |
| | | 72 | 8,6 | 5,4 | 32 | 29,9 | 12,5 | 2,0 |

C_x = concentração celular (g/L), A.E.= Atividade enzimática (UI/L)

Outro estudo foi realizado, objetivando principalmente o aumento da massa celular. Os ensaios foram semelhantes ao grupo anterior, porém testou-se glicerol como fonte de carbono. No ensaio F55, adicionou-se glicerol ao meio padrão num estudo semelhante ao realizado com a glicose em ensaios anteriores. No ensaio F56, testou-se a substituição do soro de queijo pelo glicerol. No ensaio F57, da mesma maneira que no ensaio 53, substituiu-se o tampão carbonato pelo tampão fosfato, mas incluindo-se ainda o glicerol. O F58 foi o ensaio padrão realizado em paralelo com os demais para comparação.

Os resultados destes ensaios são mostrados na Tabela 4.20. Observa-se pelos dados que de fato, a adição do glicerol ao meio padrão promove um maior crescimento celular mantendo bons níveis de atividade enzimática. Porém, quando o soro de queijo é omitido (ensaio F56), novamente observa-se que há uma diminuição no crescimento celular e na atividade enzimática. Comparando-se os ensaios F55 com F52 e F57 com

F53, observa-se após 48 horas que o glicerol aumenta a massa celular, mas este aumento não significa aumento de atividade enzimática.

Tabela 4.20: Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes meios complexos.

| | Ensaio | Tempo (h) | pH | C _x (g/L) | A. E. (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Lactose (g/L) | Amônia (g/L) |
|----------------------|---|-----------|-----|----------------------|--------------|-----------------------|---------------|--------------|
| MC Caseína Soro sais | F55 Caseína glicerol Soro Sais (2x) AFA | 0 | 7,7 | 0,6 | - | 44,8 | 11,5 | 0 |
| | | 12 | 7,7 | 3,5 | 52 | 42,9 | 11,3 | 0,1 |
| | | 24 | 7,5 | 5,9 | 46 | 42,9 | 11,3 | 0,1 |
| | | 48 | 8,0 | 6,7 | 100 | 40,8 | 11,4 | 0,6 |
| | | 72 | 8,7 | 7,7 | 109 | 37,4 | 11,4 | 1,3 |
| MC Caseína Soro sais | F56 Caseína glicerol Sais (2x) AFA | 0 | 7,8 | 0,5 | - | 41,3 | - | 0 |
| | | 12 | 7,8 | 1,3 | 28 | 41,4 | - | 0,2 |
| | | 24 | 7,7 | 2,0 | 28 | 38,8 | - | 0,4 |
| | | 48 | 7,7 | 2,7 | 30 | 38,7 | - | 0,5 |
| | | 72 | 8,5 | 2,9 | 48 | 39,6 | - | 0,9 |
| MC Caseína Soro sais | F57 Caseína glicerol Soro Sais (2x) AFA-tampão T. Fosfato | 0 | 7,6 | 0,6 | - | 43,8 | 12,6 | 0 |
| | | 12 | 7,8 | 3,4 | 37 | 41,7 | 12,2 | 0,1 |
| | | 24 | 7,6 | 5,4 | 53 | 38,2 | 11,6 | 0,2 |
| | | 48 | 7,6 | 7,1 | 53 | 36,2 | 11,9 | 0,3 |
| | | 72 | 8,2 | 6,0 | 66 | 36,3 | 11,8 | 0,5 |
| MC Caseína Soro sais | F58 Caseína Soro Sais (2x) AFA | 0 | 7,7 | 0,7 | - | 42,2 | 11,7 | 0 |
| | | 12 | 8,1 | 3,4 | 59 | 39,7 | 11,6 | 0,3 |
| | | 24 | 8,4 | 5,1 | 95 | 38,6 | 11,3 | 0,7 |

Por problemas experimentais, o padrão (F58) teve uma duração de apenas 24 horas, mas os resultados indicam que a concentração celular e a atividade enzimática alcançariam os mesmos níveis dos ensaios anteriores.

Em todos os ensaios observa-se o baixo consumo de lactose. O pH apresenta pequenas variações, dependendo do tampão que está sendo utilizado, mas com comportamentos muito semelhantes, alcançando valores acima de 8 ao final dos ensaios.

Como já mencionado, nestes dois grupos de ensaios foi analisada também a concentração de amônia no meio. Em todos os ensaios realizados, principalmente em biorreator, tem-se um expressivo aumento do pH ao longo do experimento, que poderia

estar associado à formação de amônia durante o catabolismo dos aminoácidos. Um efeito de inibição pela amônia poderia estar presente. Porém, com os resultados obtidos em “shaker”, parece não haver nenhuma relação direta entre formação de amônia e produção de PGA, ao menos para a faixa de valores aqui observados (até 1,6 g/L).

4.2 Ensaios em Biorreator – Primeira Etapa

Os ensaios descritos a seguir (1-7) foram realizados em biorreator tipo tanque agitado e aerado (Bioflo II-C de 5L) com sistema de aquisição de dados e controle. Com este sistema foi possível o acompanhamento de variáveis disponíveis em linha, as chamadas variáveis secundárias (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, fração molar de CO₂ e O₂ nos gases de saída).

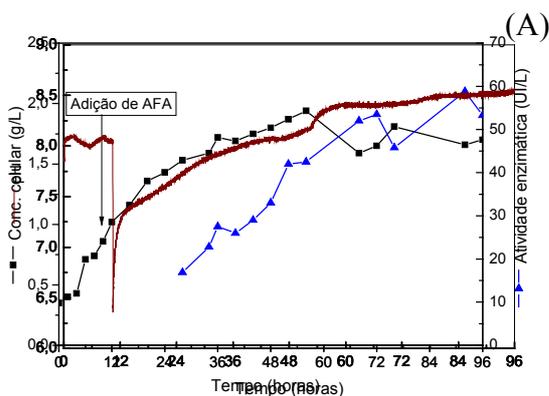
Antes da padronização do inóculo foi realizado um primeiro ensaio em biorreator com o microrganismo utilizado no ensaio 12, que apresentara até então o melhor resultado. Este ensaio teve por objetivo principal testar a instrumentação a ser utilizada nas medidas em tempo real de algumas variáveis como pH, fração molar dos gases de saída (CO₂, O₂), além de verificar a influência da concentração de oxigênio dissolvido no processo, uma vez que nos ensaios em câmara rotativa não era possível medir e controlar esta variável. Utilizou-se o mesmo meio dos ensaios anteriores (MG1 e MP1 sem adição de sais, descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.4) e as condições operacionais adotadas foram baseadas no trabalho de Hojo, 1997:

- aeração na faixa de 1 a 3 L/min;
- temperatura controlada em 30°C;
- oxigênio dissolvido controlado em 20% da saturação no início do ensaio e 10% após 8 horas de inoculação;
- adição de ácido fenilacético após 8-10h de inoculação;
- ausência de controle de pH.

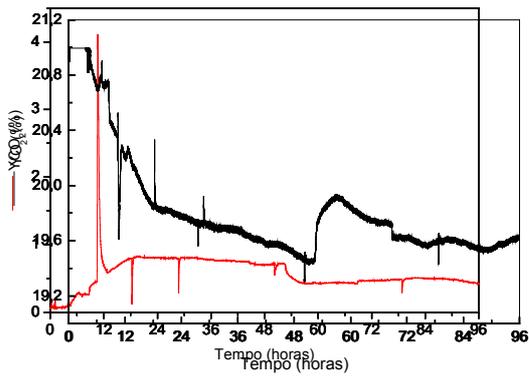
O volume da fermentação foi de 4,45L sendo 4,00L de meio de produção e 0,45L de inóculo. O ensaio teve a duração de 96 horas, com retirada de amostras em intervalos aproximados de 4 horas para análise de lactose, biomassa, concentrações de proteínas (Métodos Lowry e Bradford) e atividade enzimática. A Figura 4.11 mostra a concentração celular e atividade enzimática obtidas após análises de laboratório, além

| | | | | | | | |
|----|---------|-----|-----|-----|------|------|------|
| 1 | Inóculo | - | 1,7 | - | 26,9 | 0,5 | 4,7 |
| | 0 | 8,1 | 0,2 | - | 12,4 | 0,6 | 14,9 |
| | 2 | 8,2 | 0,4 | - | 12,6 | 0,7 | 14,9 |
| | 4 | 8,1 | 0,4 | - | 12,4 | 0,7 | 15,1 |
| | 6 | 8,1 | 0,7 | - | 12,3 | 0,7 | 15,1 |
| | 8 | 8,2 | 0,7 | - | 12,0 | 0,7 | 14,9 |
| | 10 | 8,1 | 0,9 | - | 11,7 | 0,7 | 14,9 |
| | 12 | 7,4 | 1,0 | - | 11,4 | 0,7 | 15,1 |
| | 16 | 7,5 | 1,2 | - | 11,6 | 0,7 | 15,1 |
| | 20 | 7,6 | 1,4 | - | 11,4 | 0,7 | 14,8 |
| | 24 | 7,7 | 1,4 | - | 10,9 | 0,7 | 14,8 |
| | 28 | 7,9 | 1,5 | 17 | 10,8 | 0,7 | 14,7 |
| | 34 | 8,0 | 1,6 | 23 | 10,5 | 0,7 | 14,7 |
| | 36 | 8,0 | 1,7 | 27 | 10,5 | 0,7 | 14,8 |
| | 40 | 8,1 | 1,7 | 26 | 10,6 | 0,7 | 14,7 |
| | 44 | 8,2 | 1,8 | 29 | 9,4 | 0,7 | 14,4 |
| | 48 | 8,2 | 1,8 | 33 | 9,4 | 0,7 | 14,2 |
| | 52 | 8,3 | 1,9 | 42 | 9,6 | 0,7 | 14,2 |
| | 56 | 8,4 | 1,9 | 42 | 8,9 | 0,8 | 14,2 |
| | 68 | 8,5 | 1,6 | 52 | 9,0 | 0,8 | 14,1 |
| 72 | 8,5 | 1,6 | 54 | 8,3 | 0,8 | 14,1 | |
| 76 | 8,5 | 1,8 | 46 | 8,4 | 0,8 | 14,2 | |
| 92 | 8,6 | 1,7 | 59 | 8,2 | 0,8 | 14,2 | |
| 96 | 8,6 | 1,7 | 53 | 7,7 | 0,8 | 14,2 | |

Estas observações também servem para os resultados gráficos de CO₂ das Figuras 4.11-C e 4.12-C. Através da análise destas figuras observa-se um pico de CO₂, nos valores obtidos com o sistema de aquisição de dados (Figura 4.12-C), logo após a adição de AFA, pico este não observado na Figura 4.11-C. Esta evolução é devida à presença do carbonato de cálcio que foi adicionado ao meio para controle do pH. Estes resultados indicam que a monitorização da concentração de CO₂ pode induzir a interpretações errôneas, se a liberação desse gás em decorrência do efeito tampão do carbonato de cálcio não for levada em conta. A evolução dessa variável não é consequência do metabolismo das células, mas sim da adição do AFA.



(B)



(C)

(D)

Figura 4.12: Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO_2 nos gases de saída e (D) concentração de O_2 , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Com o andamento do cultivo, há a estabilização do CO_2 . Em torno de 50-60 horas observa-se uma queda neste, que é acompanhada de uma diminuição da concentração celular (Figura 4.12-A) e de uma diminuição do consumo de O_2 (Figura 4.12-D). Os dois perfis estão sobrepostos na Figura 4.13.

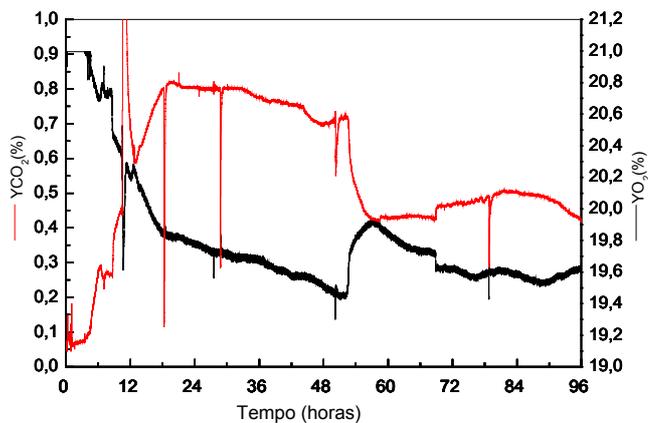


Figura 4.13: Fração molar de CO_2 e O_2 nos gases de saída do processo, ensaio 1.

4.2.1 Ensaios em Biorreator Utilizando Criotubos – Ensaio 2

O segundo ensaio realizado no biorreator convencional utilizou o microorganismo padronizado. As condições operacionais e os meios foram os mesmos do ensaio anterior e baseados no trabalho de Hojo, 1997, com exceção da aeração, que foi fixada desde o início:

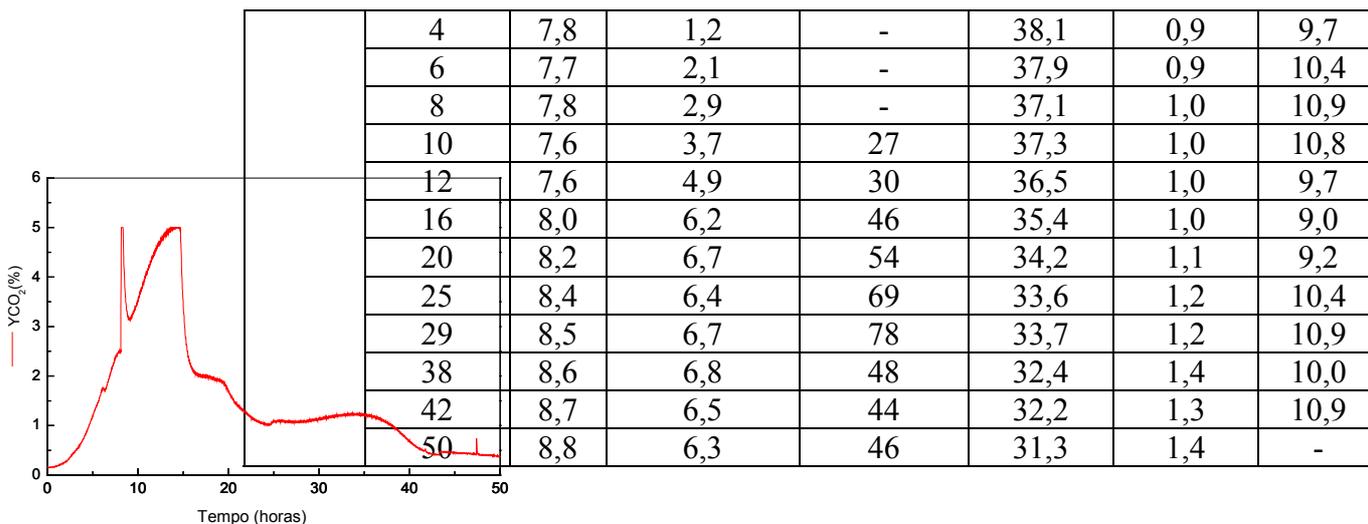
- vazão de aeração de 1 L/min;
- temperatura controlada em 30°C;
- oxigênio dissolvido controlado em 20% da saturação no início do ensaio e 10% após a adição do AFA (8 horas após o início);
- adição de ácido fenilacético após 8-10h de inoculação;
- ausência de controle de pH.

O volume da fermentação foi de 4,45L sendo 4,0L de meio de produção e 0,45L de inóculo. O ensaio teve a duração de 50 horas com retiradas de amostras em intervalos regulares de 2 horas no início e 4 horas após 12 horas de corrida. Os resultados são mostrados na Tabela 4.22.

Observa-se que este ensaio teve duração menor que o primeiro, pois aproximadamente após 20 horas o meio de fermentação escureceu mais que o normal. Este fato pode estar associado a algum tipo de contaminação, uma vez que a manipulação do microorganismo na câmara de fluxo laminar foi realizada em condições precárias de assepsia (ausência de filtro). Para confirmação, foi realizado o plaqueamento do meio onde se verificou o aparecimento de colônias contaminantes. Porém, nada pode ser afirmado conclusivamente, pois o plaqueamento foi realizado nas mesmas condições de assepsia.

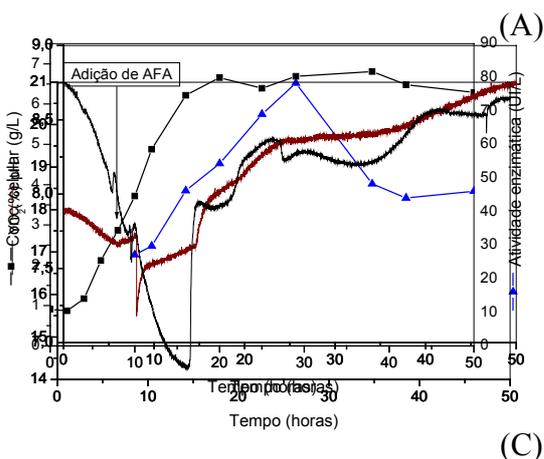
Tabela 4.22: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (2º ensaio).

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Proteínas Bradford (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|
| 2 | Inóculo | - | 1,0 | - | 33,6 | 0,6 | 5,7 |
| | 0 | 7,9 | 0,1 | - | 38,2 | 0,9 | 9,3 |
| | 2 | 7,9 | 0,9 | - | 38,3 | 0,9 | 10,5 |



A Figura 4.14 mostra os valores das variáveis obtidos com o sistema de aquisição de dados.

Através do sistema foi possível acompanhar o pico de CO₂ decorrente da adição do AFA, que logo retorna a faixa normal pela ação do tampão carbonato adicionado para controle de pH. Nota-se que ocorreu uma evolução do CO₂ decorrente do crescimento celular até aproximadamente 15 horas de processo (desconsiderando o pico). Neste momento o CO₂ começou a declinar sensivelmente, quando se encerrava a fase de crescimento celular. A provável contaminação provocou uma queda acentuada do CO₂.



(B)

(D)

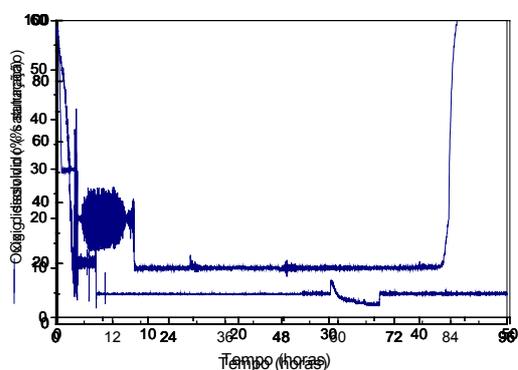
(C)

Figura 4.14: Resultados experimentais do segundo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO₂ nos gases de saída e (D) concentração de O₂, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

O comportamento do pH do meio foi semelhante ao do ensaio anterior, apresentando uma queda acentuada após a adição do AFA e aumentando gradativamente com o decorrer da fermentação, atingindo um valor final de aproximadamente 8,8.

A massa celular obtida, comparada ao ensaio anterior, foi cerca de três vezes maior, mas a possível contaminação deixa dúvidas acerca destes valores.

O oxigênio dissolvido foi controlado em 20% da saturação no início do ensaio e 10% após a adição do AFA. Para isto fixou-se a vazão de ar em 1L/min e utilizou-se o controle automático da agitação. O oxigênio dissolvido de ambos os ensaios é mostrado na Figura 4.15.



(A)

(B)

Figura 4.15: Dados experimentais do oxigênio dissolvido monitorados pelo sistema de aquisição de dados. (A) primeiro ensaio; (B) segundo ensaio.

Os dois ensaios descritos acima foram realizados na etapa inicial deste trabalho, antes dos testes de adição de sais ao meio, com os meios MG1 e MP1 (descritos no capítulo 3 - sem sais). Estes ensaios preliminares foram usados para a programação dos ensaios que se seguiram. Além disso, permitiram um contato direto com toda a

preparação experimental necessária e com a inicialização dos acessórios associados ao sistema.

4.2.2 Ensaio 3

O terceiro ensaio apresentou algumas modificações no meio de cultivo, em relação aos ensaios 1 e 2, sugeridas pelos experimentos realizados em câmara rotativa. Os meios utilizados foram os que forneceram os melhores resultados nos estudos dos requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium*, a saber:

- meio de crescimento: caseína, soro, sais (concentrações, vide item 3.2.2).
- meio de produção: caseína, soro, CaCO_3 e AFA (concentrações, vide item 3.2.5), incluindo-se solução de sais 2 vezes mais concentrada que o padrão inicial (Illanes *et al.*, 1994) e com AFA sendo adicionado desde o início da etapa de produção (ou seja, no tempo zero do ensaio em biorreator).

As condições operacionais foram próximas das utilizadas nos ensaios anteriores, com diferenças no controle de oxigênio dissolvido e na adição do AFA:

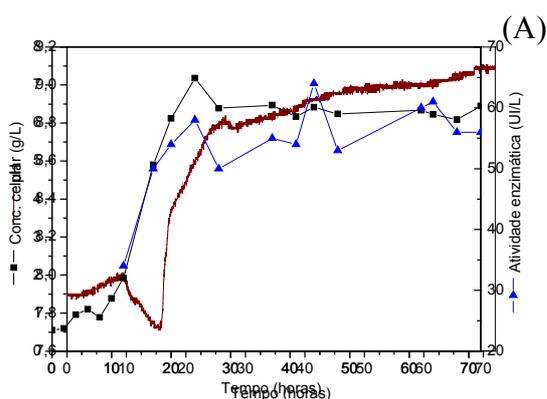
- vazão de aeração de 1 L/min;
- temperatura controlada em 30°C;
- oxigênio dissolvido sem controle nas primeiras horas, controlado em 20% da saturação após 10 horas e em 10% da saturação após 15 horas;
- adição de ácido fenilacético no início do cultivo;
- ausência de controle de pH.

O volume da fermentação foi de 4,45L sendo 4,0L de meio de produção e 0,45L de inóculo. O ensaio teve a duração de 72 horas com retiradas de amostras em intervalos regulares de 2 horas no início e 4 horas após 12 horas de corrida. A Tabela 4.23 apresenta os resultados das análises realizadas em laboratório e a Figura 4.16 mostra os resultados gráficos da atividade enzimática e concentração celular (A), do pH (B) e das concentrações de CO_2 (C) e O_2 (D) nos gases de saída.

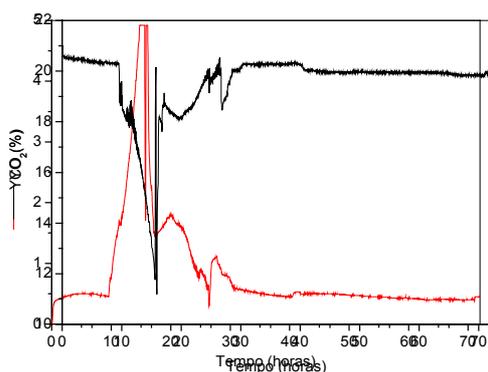
Tabela 4.23: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (3^o ensaio).

| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Proteínas Bradford (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|--------------------|-----|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|
| 3 | Pré-inóculo | - | 6,7 | - | 33,6 | 0,32 | 5,7 |
| | Inóculo | 8,4 | 5,8 | - | 30,8 | 0,52 | 6,0 |
| | 0 | 7,9 | 0,6 | - | 43,9 | 0,98 | 12,3 |
| | 2 | 7,9 | 0,6 | - | 42,7 | 0,98 | 12,4 |
| | 4 | 7,9 | 1,0 | - | 43,4 | 0,98 | 12,5 |
| | 6 | 8,0 | 1,1 | - | 43,8 | 0,94 | 13,5 |
| | 8 | 7,8 | 0,9 | - | 42,2 | 0,95 | 13,0 |
| | 10 | 8,0 | 1,4 | - | 43,1 | 0,95 | 13,2 |
| | 12 | 7,9 | 1,9 | 34 | 43,2 | 0,98 | 13,1 |
| | 17 | 8,3 | 4,9 | 50 | 42,0 | 0,99 | 13,5 |
| | 20 | 8,6 | 6,1 | 54 | 38,0 | 1,03 | 13,2 |
| | 24 | 8,9 | 7,2 | 58 | 36,1 | 1,03 | 12,8 |
| | 28 | 8,9 | 6,4 | 50 | 33,9 | 1,1 | 13,5 |
| | 37 | 9,0 | 6,5 | 55 | 34,1 | 1,13 | 13,0 |
| | 41 | 9,0 | 6,2 | 54 | 34,2 | 1,1 | 12,3 |
| | 44 | 9,0 | 6,4 | 64 | 34,1 | 1,12 | 12,8 |
| | 48 | 9,0 | 6,2 | 53 | 34,4 | 1,09 | 13,0 |
| | 62 | 9,1 | 6,3 | 60 | 33,4 | 1,09 | 13,2 |
| | 64 | 9,1 | 6,2 | 61 | 34,0 | 1,13 | 13,5 |
| | 68 | 9,2 | 6,1 | 56 | 34,0 | 1,17 | 13,4 |
| 72 | 9,2 | 6,5 | 56 | 34,2 | 1,12 | 13,0 | |

Diferentemente dos ensaios anteriores, nestes foi realizada uma etapa adicional de crescimento do microrganismo. Como o volume de meio no fermentador é muito maior que em câmara rotativa, na etapa de germinação é necessário o uso de um volume maior de meio e de solução de esporos. Então, para não se utilizar muitos criotubos nesta etapa, resolveu-se preparar um pré-inóculo com 75mL e 1 criotubo. Após 24 horas eram retirados cerca de 15mL para cada erlenmeyer contendo 150mL de meio de germinação. Estes eram mantidos por mais 24 horas e transferidos ao fermentador para dar início à etapa de produção



(B)



(C)

(D)

Figura 4.16: Resultados experimentais do terceiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO_2 nos gases de saída e (D) concentração de O_2 , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Pela Figura 4.16-A observa-se que nas primeiras horas houve uma limitação do crescimento do microrganismo pelo oxigênio dissolvido (Figura 4.17) que em menos de 10 horas já tinha diminuído para 10% da saturação. Esta condição de agitação implicou um patamar de concentração de CO_2 , decorrente da inibição do crescimento celular. Quando se observou tendência de queda desses variáveis logo no início do ensaio (em torno de 10 horas), retomou-se o controle do oxigênio dissolvido em 20% da saturação (condição utilizada nos ensaios anteriores). Pode-se observar que após a retomada desse controle o microrganismo apresentou um crescimento exponencial até aproximadamente 24 horas. Verificou-se que esta condição no início do ensaio favoreceu o crescimento celular logo nas primeiras horas de cultivo.

No início do ensaio não se utilizou o controle do oxigênio dissolvido e fixou-se a agitação em 300 rpm (Figura 4.17). O objetivo principal desta medida foi manter as condições mais próximas possíveis dos ensaios em câmara rotativa, que haviam apresentado melhor produtividade com relação aos realizados em biorreator. Sendo assim, fixando-se a agitação, tentou-se reproduzir as condições de aeração do “shaker”.

Nos ensaios em fermentador descritos a seguir a adição de AFA e a correção do pH foram feitas no início da corrida. Assim, o pico que se observa aqui na concentração de CO_2 (com o decorrente vale na de O_2) é consequência do metabolismo celular. Nota-

se ainda que a comparação entre os níveis de massa celular e de CO_2 entre o primeiro e o terceiro ensaios no biorreator indicam claramente a importância da adição dos sais minerais ao meio de cultura.

Com a adição de AFA no início do cultivo, observa-se que não há mais a formação de um pico indesejável em torno de 10 horas para as variáveis CO_2 e pH. Sem a influência do AFA, observa-se que durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo ocorre um decréscimo do pH, que coerentemente apresenta menor valor no momento onde a produção de CO_2 é máxima (Figura 4.16).

Após 24 horas houve uma estagnação no crescimento celular (Figura 4.16-A), em torno de 6,0g/L, acompanhada de um patamar na atividade enzimática, que não ultrapassou a faixa de 60UI/L. Observa-se novamente que a atividade obtida em biorreator não alcançou os índices dos ensaios em câmara rotativa (em torno de 100UI/L). Segundo estudos realizados por Visnard, 1997, há uma forte correlação entre a concentração de oxigênio, concentração celular e produção de enzima.

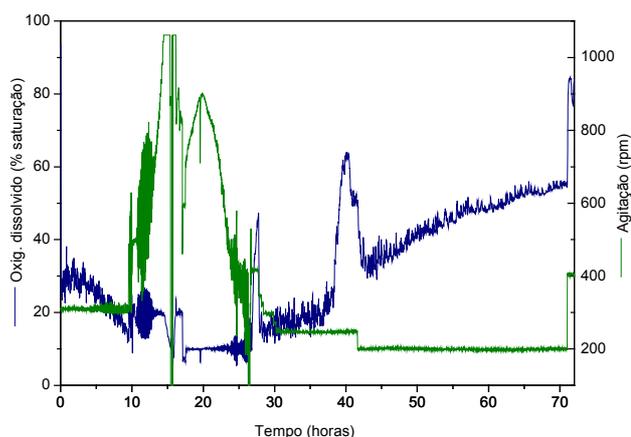


Figura 4.17: Dados experimentais de oxigênio dissolvido e agitação (3^o ensaio).

Outra possível causa para a estagnação do crescimento celular e da atividade enzimática após 30 horas de ensaio poderia ser a inibição do microrganismo pela formação de amônia produzida durante a metabolização dos aminoácidos. Esta formação provocaria o aumento do pH ao longo do cultivo.

Esta possibilidade motivou a realização do quarto ensaio, onde o pH seria controlado após 24 horas do início do cultivo. com HCl 5M.

4.2.3 Ensaio 4

No quarto ensaio o meio de fermentação e as condições experimentais foram iguais ao ensaio anterior, com diferença apenas no controle do oxigênio dissolvido em 20% da saturação desde o início. Como se observou em estudos anteriores em câmara rotativa e no 3º ensaio em biorreator, a adição de AFA em t=0h não inibiu o crescimento celular, e este passou a ser adicionado sempre no início do processo de produção. Os valores das análises realizadas estão apresentados na Tabela 4.24.

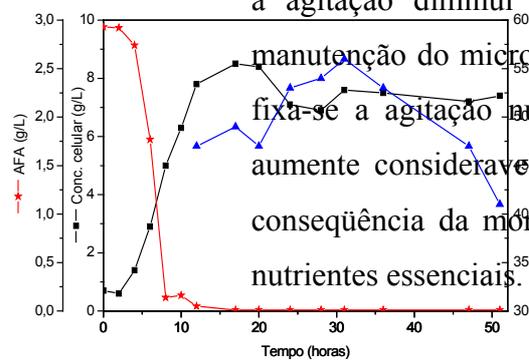
O ensaio teve duração de 51 horas. Da mesma maneira que no caso anterior, a massa celular e a atividade enzimática estacionaram em torno de 24 horas. Além disso, não foi possível o controle do pH devido a imprevistos experimentais. A Figura 4.18 mostra o resultado das principais variáveis de fermentação.

Tabela 4.24: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (4º ensaio).

| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Proteínas Bradford (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|--------------------|-----|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|
| 4 | Pré-inóculo | - | 7,04 | - | 39,0 | 0,53 | 7,0 |
| | Inóculo | 8,4 | 6,8 | - | 36,2 | 0,34 | 6,2 |
| | 0 | 7,9 | 0,7 | - | 48,6 | 0,84 | 15,5 |
| | 2 | 7,9 | 0,6 | - | 49,2 | 0,83 | 15,6 |
| | 4 | 7,9 | 1,4 | - | 47,2 | 0,86 | 15,8 |
| | 6 | 8,0 | 2,9 | - | 45,3 | 0,86 | 15,6 |
| | 8 | 7,8 | 5,0 | - | 44,4 | 0,9 | 15,8 |
| | 10 | 8,0 | 6,3 | - | 43,0 | 0,94 | 14,8 |
| | 12 | 7,9 | 7,8 | 47 | 39,8 | 0,93 | 15,1 |
| | 17 | 8,3 | 8,5 | 49 | 37,7 | 1,01 | 14,6 |
| | 20 | 8,6 | 8,4 | 47 | 38,5 | 1,0 | 14,9 |
| | 24 | 8,9 | 7,1 | 53 | 38,0 | 1,02 | 14,8 |
| | 28 | 8,9 | 6,9 | 54 | 38,7 | 1,08 | 14,6 |
| | 31 | 9,0 | 7,6 | 56 | 38,0 | 1,0 | 14,8 |
| | 36 | 9,0 | 7,5 | 53 | 38,5 | 1,0 | 14,8 |
| 47 | 9,0 | 7,2 | 47 | 38,0 | 1,04 | 14,6 | |
| 51 | 9,0 | 7,4 | 41 | 37,8 | 1,0 | 14,6 | |

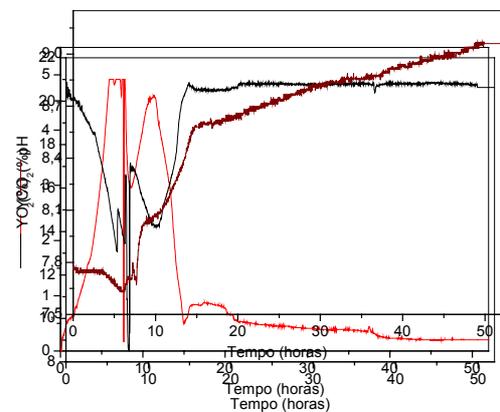
Como a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida inicialmente em 20% da saturação, não se observou fase de adaptação inicial como ocorreu no terceiro ensaio e a massa celular atingiu um crescimento exponencial logo nas primeiras horas. No entanto, a atividade enzimática manteve os mesmos níveis (em torno de 50UI/L) atingindo este valor em aproximadamente 12 horas (Figura 4.18-A).

Após 10 horas do início do cultivo a concentração de oxigênio dissolvido foi diminuída para 10% da saturação (Figura 4.19). Para manter essa condição de saturação, a agitação diminuiu automaticamente e dependendo das condições de crescimento e manutenção do microrganismo, esta pode até parar. Neste caso, o controle é retirado e fixa-se a agitação em um determinado valor; isto faz com que o oxigênio dissolvido aumente consideravelmente após 30 ou 40 horas de cultivo. Este aumento pode ser conseqüência da morte celular causada pela diminuição ou exaustão de um ou mais nutrientes essenciais.



(A)

(B)



(C)

(D)

Figura 4.18: Resultados experimentais do quarto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO₂ nos gases de saída e (D) concentração de O₂, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

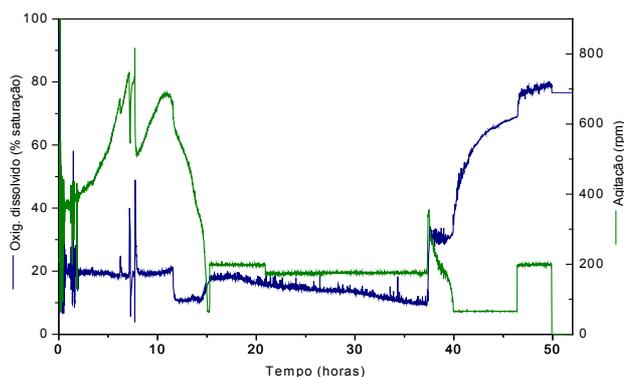


Figura 4.19: Dados experimentais do oxigênio dissolvido e agitação (4^o ensaio).

A partir desse ensaio passou-se a analisar a concentração de AFA via cromatografia por exclusão de tamanho em equipamento HPLC Shimadzu® com coluna Pharmacia Biotech SuperdexTM Peptide HR 10/30 (Figura 4.18-A). Da análise da concentração de AFA ao longo do tempo, observou-se que este é totalmente consumido nas primeiras horas de cultivo. O AFA é, portanto, substrato facilmente metabolizável.

A variável CO₂ (Figura 4.18-C) apresenta nas primeiras horas uma elevação que coincide com o crescimento exponencial do microrganismo e seguida de um decaimento. Uma segunda elevação, menos pronunciada e que coincide com o pico de massa celular, é observada, em decorrência de variações ocorridas na agitação, para manter o controle do oxigênio dissolvido (como já se fazia notar no ensaio 3, vide Figura 4.16-C).

4.2.4 Ensaio 5

Foi realizado um quinto ensaio em biorreator nas mesmas condições do ensaio anterior, com exceção do oxigênio dissolvido, que foi controlado em 20% da saturação em todo o ensaio. Como no ensaio anterior, foi observado que a agitação parou para

manter os 10% da saturação, decidiu-se manter o valor em 20% para evitar essa parada. A Tabela 4.25 mostra os resultados experimentais.

Como no ensaio anterior verificou-se a exaustão do AFA em torno de 8-10 horas através da análise do meio em HPLC, resolveu-se neste 5º ensaio suplementar, após 8 horas, uma pequena vazão de AFA ao meio. Um dos principais objetivos foi o aumento de massa celular e conseqüentemente da atividade, pois o consumo do AFA coincidiu com a fase de crescimento exponencial do microrganismo (Figura 4.18). O outro objetivo seria a manutenção do pH em torno de 8 para evitar um aumento excessivo desta variável que pode acarretar inibição na produção da enzima. O AFA tinha uma concentração 10 vezes maior que o utilizado no início (27g/L) e foram adicionados ao todo cerca de 800 mL de solução de AFA até aproximadamente 48 horas de cultivo com uma velocidade de alimentação de 0,33mL/min. Como não se observou melhora significativa após este tempo, parou-se a adição do AFA. Os resultados são mostrados na Figura 4.20. Observa-se que após 20 horas há um acúmulo considerável de AFA no meio, que coincide com a estagnação da concentração celular e da atividade enzimática.

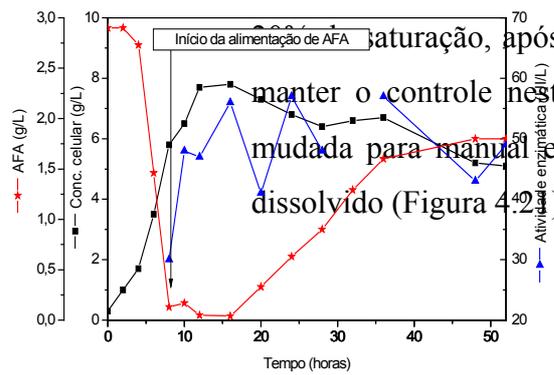
Tabela 4.25: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (5º ensaio).

| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração Celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Proteínas Bradford (g/L) | Lactose (g/L) | Amônia (g/L) |
|--------|--------------------|-----|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| 5 | Pré-inóculo | - | 7,2 | - | | | | |
| | Inóculo | - | 6,3 | - | 32,3 | 0,5 | 6,0 | 1,1 |
| | 0 | 7,7 | 0,3 | - | 45,1 | 0,9 | 13,9 | 0,05 |
| | 2 | 7,8 | 1,0 | - | 45,6 | 0,9 | 13,7 | 0,05 |
| | 4 | 7,9 | 1,7 | - | 44,5 | 1,0 | 13,3 | 0,05 |
| | 6 | 7,8 | 3,5 | - | 42,1 | 1,0 | 13,7 | 0,2 |
| | 8 | 8,1 | 5,8 | 30 | 41,2 | 1,0 | 13,7 | 0,2 |
| | 10 | 8,2 | 6,5 | 48 | 37,7 | 1,0 | 13,8 | 0,6 |
| | 12 | 8,3 | 7,7 | 47 | 35,3 | 1,0 | 13,7 | 0,9 |
| | 16 | 8,6 | 7,8 | 56 | 31,5 | 1,1 | 13,1 | 1,4 |
| | 20 | 8,9 | 7,3 | 41 | 29,5 | 1,0 | 13,5 | 1,4 |
| | 24 | 8,9 | 6,8 | 57 | 29,7 | 1,0 | 13,2 | 1,3 |
| | 28 | 8,9 | 6,4 | 48 | 29,7 | 1,1 | 12,7 | 1,2 |
| | 32 | 9,0 | 6,6 | - | 29,2 | 1,1 | 12,9 | 1,2 |
| | 36 | 9,0 | 6,7 | 57 | 29,4 | 1,1 | 12,8 | 1,1 |
| 48 | 9,1 | 5,2 | 43 | 27,9 | 1,1 | 12,8 | 1,1 | |

| | | | | | | | | |
|--|----|-----|-----|----|------|-----|------|-----|
| | 52 | 9,1 | 5,1 | 49 | 27,7 | 1,1 | 12,6 | 1,2 |
|--|----|-----|-----|----|------|-----|------|-----|

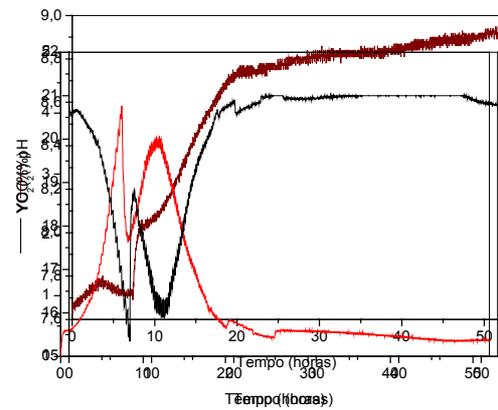
A tentativa de manter o pH em torno de 8 não deu certo, pois além do carbonato que estava presente no meio, a concentração de AFA era muito baixa para manter o pH em determinado valor. Sendo assim, este apresentou comportamento semelhante aos dois ensaios anteriores (Figura 4.20-B). Mesmo controlando o oxigênio dissolvido em

saturação, após o tempo de aproximadamente 25 horas não se conseguiu mais manter o controle neste valor, pois a agitação parou para manter os 20%. Esta foi mudada para manual e após determinado tempo observou-se o aumento do oxigênio dissolvido (Figura 4.21).



(A)

(B)



(C)

(D)

Figura 4.20: Resultados experimentais do quinto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA obtidas em análises de laboratório; (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO₂ nos gases de saída; (D) concentração de O₂, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

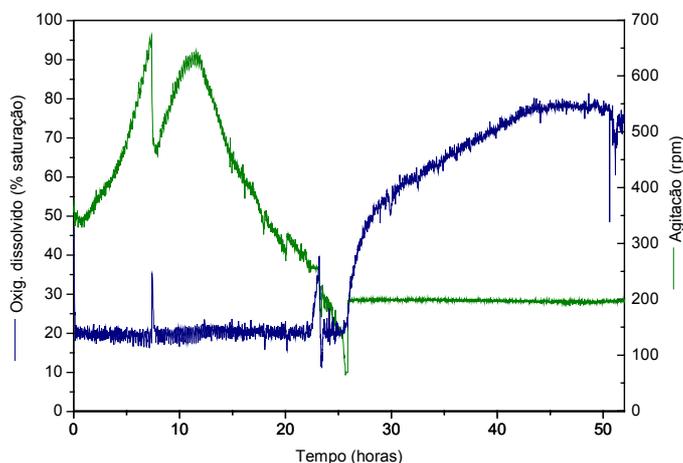


Figura 4.21: Dados experimentais do oxigênio dissolvido adquiridos pelo sistema de aquisição de dados (5^o ensaio).

Paralelamente a este ensaio em biorreator foi realizado um ensaio em câmara rotativa para saber se os baixos índices de atividade enzimática encontrados nos três ensaios seguidos eram por causa das condições operacionais ou a perda da capacidade do último lote de criotubos.

O pré-inóculo para os dois ensaios e os meios utilizados foram os mesmos. Os resultados do ensaio são apresentados na Tabela 4.26. Pode se observar que os valores das atividades enzimáticas estão na faixa dos valores obtidos nos ensaios anteriores em câmara rotativa utilizando-se as mesmas condições. A concentração celular dos ensaios em câmara rotativa é menor que no fermentador, mas a atividade enzimática é maior. Isto confirma que não houve perda da capacidade produtiva deste lote de criotubos, indicando assim que a produção da enzima continua limitada por algum nutriente ou não se obteve ainda a concentração de oxigênio dissolvido ideal para as condições do biorreator.

A análise da amônia confirma que uma concentração maior não significa atividade enzimática mais baixa, o que pode ser visto comparando-se os dois ensaios. O

ensaio em biorreator, embora tenha ao longo do tempo uma concentração menor de amônia, apresentou baixos níveis de atividade.

Tabela 4.26: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (ensaio realizado em paralelo com o 5º ensaio no biorreator).

| | Ensaio | Tempo (h) | pH | Conc. celular (g/L) | Atividade Enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/l) | Proteínas Bradford (g/l) | Lactose (g/L) | Amônia (g/L) |
|----------------------|-----------|-----------|-----|---------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| MC Caseína Soro sais | F51 | 0 | | 0,8 | - | 42,1 | 0,9 | 13,2 | 0,1 |
| | Caseína | 12 | 7,9 | 3,2 | 41 | 41,8 | 1,0 | 13,0 | 0,5 |
| | Soro | 24 | | 4,4 | 71 | 39,1 | 1,0 | 12,8 | 1,0 |
| | Sais (2x) | 48 | | 4,9 | 102 | 36,7 | 1,0 | 12,4 | 1,8 |
| | AFA (t=0) | 72 | | 5,0 | 104 | 35,8 | 1,0 | 12,5 | 1,8 |

4.2.5 Ensaio 6

Como os ensaios em biorreator foram realizados entre um ensaio e outro em câmara rotativa, foi utilizado em cada um o melhor meio obtido até o momento. Sendo assim, nos dois ensaios que se seguiram utilizou-se o mesmo meio padrão dos ensaios anteriores com pequenas diferenças nas condições experimentais. Estas diferenças foram oriundas das análises do comportamento das variáveis obtidas em linha dos ensaios anteriores em biorreator.

As condições adotadas, foram:

- vazão de aeração de 2L/min;
- temperatura controlada em 30°C;
- sem controle de oxigênio dissolvido;
- adição de ácido fenilacético no início do cultivo;
- controle de pH em 8 após 10 horas de cultivo

Problemas no eletrodo impediram o controle de oxigênio dissolvido. Sendo assim, fez-se necessário fixar a agitação e o critério adotado foi baseado nos ensaios anteriores. O controle do pH neste ensaio foi motivado principalmente pela estagnação do crescimento celular e da atividade enzimática dos ensaios anteriores. Um dos motivos desta estagnação poderia ser a inibição do microrganismo pela formação de amônia produzida durante a metabolização dos aminoácidos. Esta formação de amônia provocaria o aumento do pH ao longo do cultivo.

O volume da fermentação foi de 4,45L sendo 4,0L de meio de produção e 0,45L de inóculo. O ensaio teve duração de 48 horas com retiradas de amostras em intervalos regulares de 2 horas no início e 4 horas após 14 horas de corrida. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.27.

O ensaio teve uma duração de 48 horas pois da mesma maneira que os anteriores os níveis de atividade enzimática foram reduzidos, apresentando neste uma queda bem acentuada após 24 horas. Mas entre 10 e 14 horas a atividade atingiu o valor de 95UI/L nunca antes conseguido em biorreator. As variáveis obtidas pelo sistema de aquisição são mostradas na Figura 4.22.

A Figura 4.22-A mostra as concentrações de células e de AFA além da atividade enzimática. Pode-se observar que o AFA é totalmente consumido nas primeiras 15 horas de cultivo. Uma hipótese para a queda acentuada da atividade enzimática poderia ser a produção de proteases pelo microrganismo; as proteínas do soro de queijo e da caseína podem estar induzindo a produção destas para a quebra das proteínas em aminoácidos.

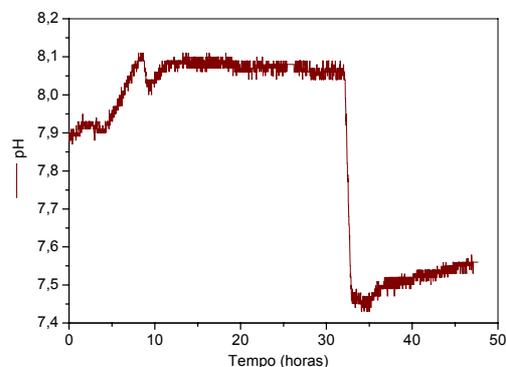
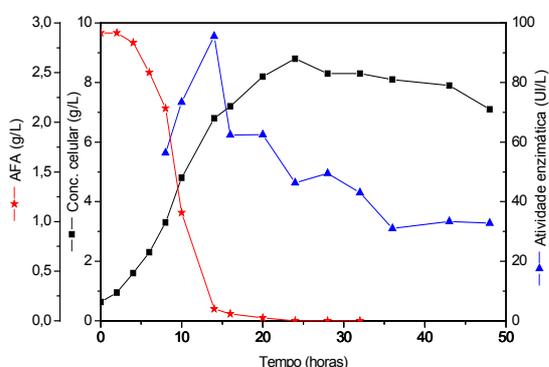
Tabela 4.27: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (6^o ensaio).

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|-------------|------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|
| 6 | Pré-inóculo | - | 6,8 | - | - | - |
| | Inóculo | - | 6,5 | - | 33,7 | 6,1 |
| | 0 | 7,93 | 0,6 | - | 47,5 | 14,9 |
| | 2 | 7,97 | 1,0 | - | 47,6 | 14,6 |
| | 4 | 7,95 | 1,6 | - | 46,9 | 14,4 |
| | 6 | 8,03 | 2,3 | - | 47,1 | 14,3 |
| | 8 | 8,13 | 3,3 | 56 | 47,4 | 14,4 |
| | 10 | 8,09 | 4,8 | 73 | 43,8 | 13,6 |
| | 14 | 8,16 | 6,8 | 95 | 42,4 | 13,4 |
| | 16 | 8,15 | 7,2 | 62 | 39,5 | 13,6 |
| | 20 | 8,13 | 8,2 | 60 | 37,7 | 13,6 |
| | 24 | 8,1 | 8,8 | 46 | 31,6 | 13,6 |
| | 28 | 8,09 | 8,3 | 50 | 29,1 | 13,5 |
| 32 | 8,11 | 8,3 | 42 | 29,4 | 13,3 | |

| | | | | | | |
|--|----|------|-----|----|------|------|
| | 36 | 7,52 | 8,1 | 31 | 28,7 | 13,5 |
| | 43 | 7,55 | 7,9 | 33 | 28,6 | 13,2 |
| | 48 | 7,57 | 7,1 | 33 | 28,1 | 13,4 |

O controle do pH foi iniciado em torno de 10 horas quando este atingiu o valor de pH 8. A Figura 4.22-B mostra que o controle foi eficiente mantendo este em torno do valor estipulado. Como após as 33 horas a atividade já tinha decaído consideravelmente resolveu-se passar o controle de pH para 7,5 apenas para verificar o efeito desta diminuição no cultivo.

As Figuras 4.23 e 4.24 mostram as várias variáveis num mesmo gráfico para

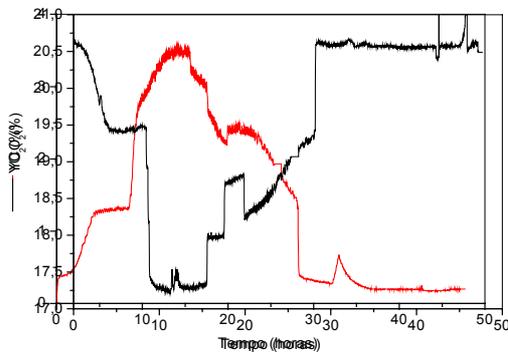


facilitar a análise dos efeitos destas sobre o crescimento celular e a atividade enzimática.

Pela Figura 4.24 é possível acompanhar como a variável agitação foi modificada ao longo do ensaio. Até aproximadamente 8 horas esta foi fixa em 450 rpm. Neste momento se observou estagnação do CO₂ e decidiu-se aumentar a agitação para 600 rpm, que foi o valor máximo atingido nos ensaios 4 e 5 para manter o oxigênio dissolvido em 20% da saturação. Estes valores de agitação podem ter limitado o oxigênio dissolvido favorecendo a produção de PGA nas primeiras 15 horas.

(A)

(B)



(C)

(D)

Figura 4.22: Resultados experimentais do sexto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO_2 nos gases de saída e (D) concentração de O_2 , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

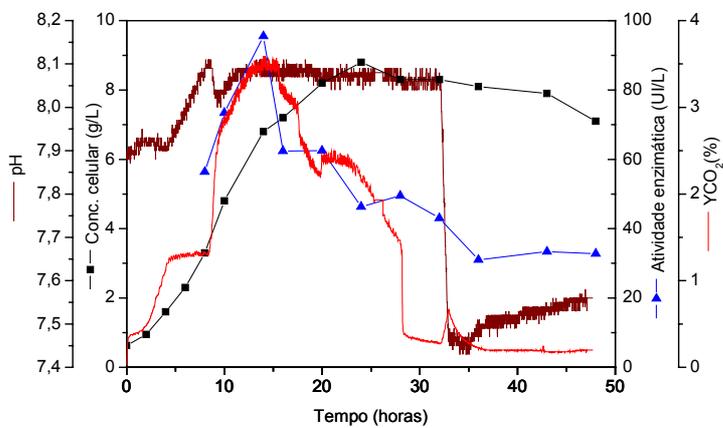


Figura 4.23: Concentração celular, atividade enzimática, pH e fração molar de CO_2 .

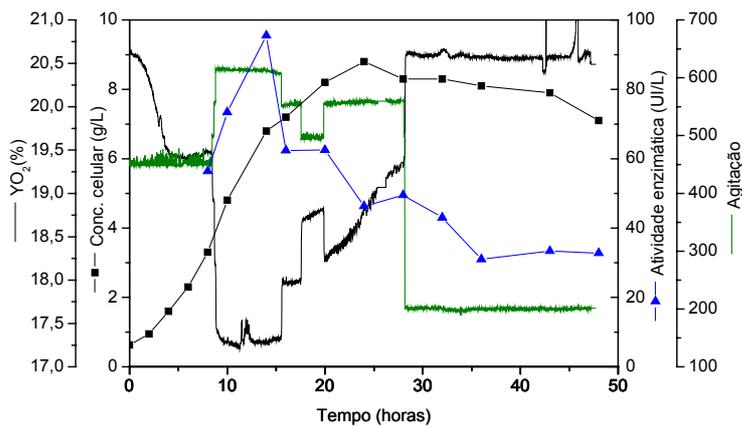


Figura 4.24: Concentração celular, atividade enzimática, fração molar de O_2 e agitação.

4.2.6 Ensaio 7

No sétimo ensaio os meios de fermentação e as condições experimentais foram iguais ao ensaio anterior, com diferença apenas no controle do oxigênio dissolvido. Como citado anteriormente, no sexto ensaio não houve controle do oxigênio dissolvido por problemas no eletrodo. Sendo assim, foi necessário fixar a agitação que foi variada de acordo com o andamento do ensaio. A limitação do oxigênio dissolvido imposta pela agitação pode ter beneficiado a produção de PGA nas primeiras 15 horas. Optou-se assim, mesmo com controle de oxigênio dissolvido disponível, por utilizar as mesmas condições de agitação do sexto ensaio e apenas acompanhar a variação de OD ao longo do tempo.

O volume da fermentação foi de 4,45L sendo 4,0L de meio de produção e 0,45L de inóculo. O ensaio teve a duração de 42 horas com retiradas de amostras em intervalos regulares de 2 horas no início e 4 horas após 14 horas de corrida. A Tabela 4.28 mostra os valores das principais análises realizadas em laboratório.

Comparando-se os resultados das Tabelas 4.27 e 4.28 observa-se que o crescimento celular nos dois ensaios foi semelhante, em torno de 8,5g/L. A atividade enzimática teve também um valor máximo em 14 horas, mas abaixo do ensaio anterior. A Figura 4.25 mostra as variáveis monitoradas durante o cultivo.

O consumo de AFA se dá nas primeiras 12 horas (Figura 4.25-A). Isto indica que o AFA está sendo utilizado também como fonte de carbono pelo microrganismo.

O pH, diferentemente do ensaio anterior, demorou um pouco mais para atingir o valor 8, em torno de 13 horas, quando se iniciou o seu controle (Figura 4.25-B). O efeito conjunto das variáveis sobre a concentração celular e a atividade enzimática é mostrado nas Figuras 4.26 e 4.27.

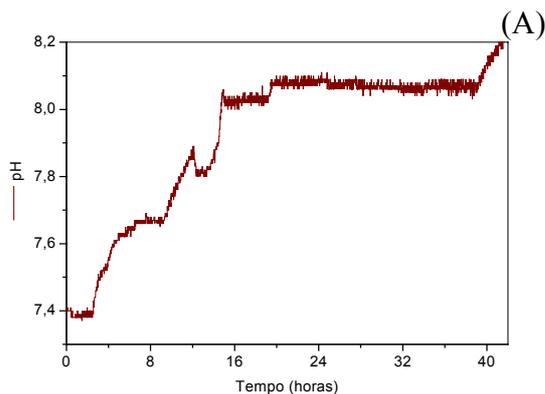
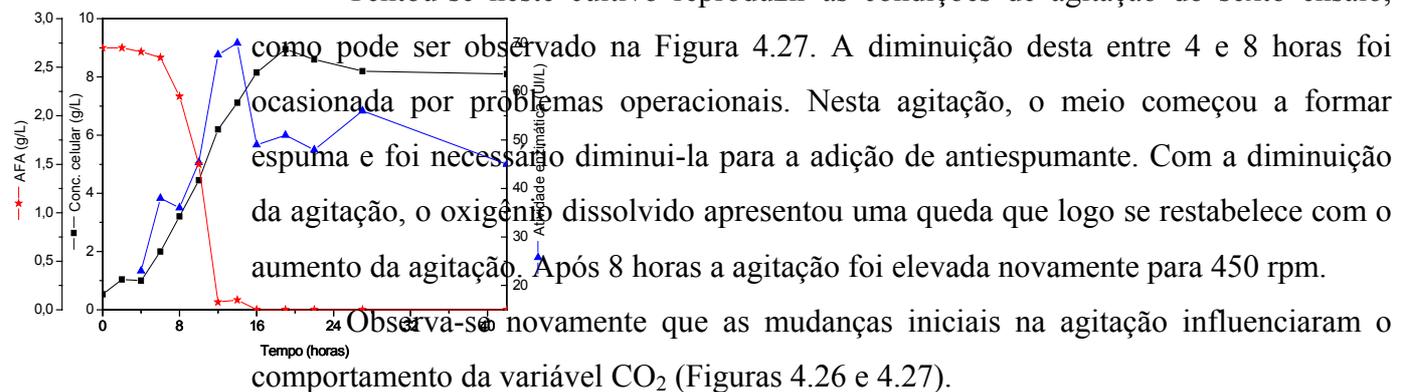
Tabela 4.28: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator utilizando criotubos (7º ensaio).

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Proteínas Lowry (g/L) | Lactose (g/L) |
|--------|-------------|------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|
| 7 | Pré-inóculo | - | 5,9 | - | 29,3 | - |
| | Inóculo | - | 6,4 | - | 25,8 | 7,4 |
| | 0 | 7,4 | 0,53 | - | 45,7 | 15,8 |
| | 2 | 7,63 | 1,0 | - | 45,5 | 15,8 |

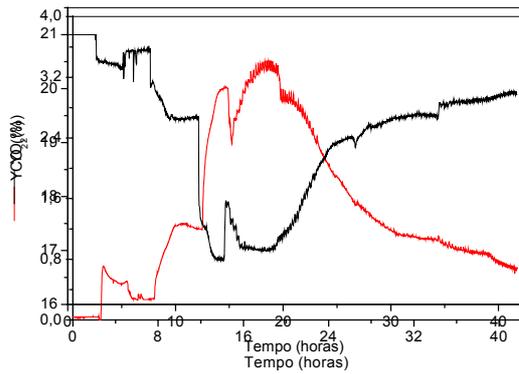
| | | | | | | |
|--|----|------|-----|----|------|------|
| | 4 | 7,68 | 1,0 | 23 | 46,4 | 15,9 |
| | 6 | 7,68 | 2,0 | 38 | 46,2 | 15,9 |
| | 8 | 7,84 | 3,2 | 36 | 45,7 | 15,5 |
| | 10 | 7,84 | 4,5 | 45 | 45,0 | 15,9 |
| | 12 | 8,09 | 6,2 | 68 | 42,5 | 15,8 |
| | 14 | 8,07 | 7,1 | 70 | 37,4 | 15,5 |
| | 16 | 8,09 | 8,2 | 49 | 34,8 | 15,5 |
| | 19 | 8,15 | 9,0 | 51 | 30,2 | 14,3 |
| | 22 | 8,15 | 8,6 | 48 | 26,6 | 13,7 |
| | 27 | 8,12 | 8,2 | 56 | 26,3 | 13,3 |
| | 42 | 8,30 | 8,1 | 45 | 19,6 | 13,4 |

É importante lembrar que nos ensaios 6 e 7 não foi utilizado CaCO_3 para tamponar o meio, pois com o AFA adicionado no início não se tem mais o pico indesejável em 10 horas e portanto não se faz mais necessário o seu uso.

Tentou-se neste cultivo reproduzir as condições de agitação do sexto ensaio,



(B)



(C)

(D)

Figura 4.25: Resultados experimentais do sétimo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e concentração de AFA obtidas em análises de laboratório; (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO_2 nos gases de saída; (D) concentração de O_2 , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

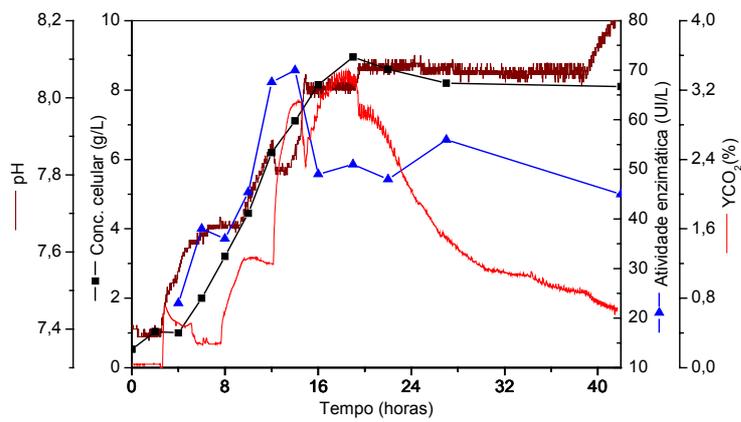


Figura 4.26: Concentração celular, atividade enzimática, pH e fração molar de CO_2 .

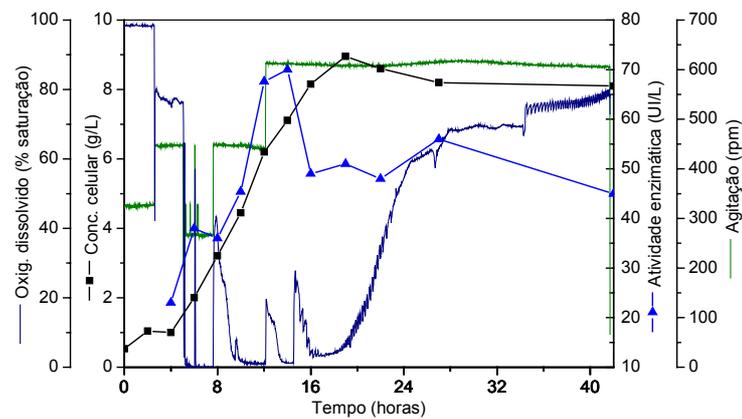


Figura 4.27: Oxigênio dissolvido, agitação, concentração celular e atividade enzimática.

Em todos os ensaios realizados nesta primeira etapa, acreditava-se que os meios contendo caseína hidrolisada enzimaticamente eram melhores para o aumento da concentração celular e da produção da enzima. Porém, como veio a se notar, nos ensaios que serão descritos a seguir, o meio contendo aminoácidos livres beneficiou a produção de PGA apesar do menor crescimento celular. Os resultados desses novos ensaios serão mostrados e analisados nos itens a seguir e um resumo dos resultados obtidos nas duas etapas será mostrado no final do capítulo.

4.3 Ensaios em Câmara Rotativa – Segunda Etapa

4.3.1 Ensaios com aminoácidos

Dando continuidade aos ensaios experimentais para determinar requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium*, foram testadas outras formulações de meio com o objetivo de encontrar aquele que levasse a melhores resultados de atividade enzimática. O meio padrão utilizado antes manteve a atividade enzimática em torno de 100UI/L.

Da análise de resultados anteriores observou-se que a manutenção do tempo do ensaio de produção por 72h não se fazia necessária uma vez que em 48 horas já se obtinha praticamente um patamar de atividade. Após 72h não se observava nenhum aumento significativo desta, que justificasse a continuidade do ensaio. Sendo assim, optou-se por um tempo de ensaio de produção em torno de 48h. Para os ensaios em câmara rotativa foi incluída uma retirada de amostra no tempo de 10h.

Como evidenciado em resultados anteriores, o soro de queijo é importante para o crescimento do microrganismo, apesar do baixo consumo da lactose presente no soro. Sendo assim, novos ensaios de produção de PGA foram realizados usando soro de queijo líquido (um sub-produto das indústrias de laticínios) hidrolisado com Alcalase®. Resultados pouco satisfatórios foram obtidos nestes ensaios. O padrão realizado em paralelo obteve valores acima dos demais, porém na mesma faixa dos anteriores. Esses resultados não são mostrados devido à baixa produtividade alcançada.

Na primeira parte desta tese foram mostrados resultados de alguns ensaios utilizando aminoácidos tanto no meio de germinação como no de produção. Quando

utilizado meio de crescimento sintético com lactose não se observou germinação dos esporos. Quando o inóculo foi transferido para o meio de produção padrão, este apresentou valores de atividade enzimática de acordo com os anteriores para o padrão, mostrando que o microrganismo germinou somente quando transferido para este meio. Isto ficou evidenciado após ensaio realizado com aminoácidos nos dois meios, onde não houve praticamente a germinação dos esporos e conseqüentemente produção da enzima. A partir destas constatações resolveu-se realizar mais uma série de ensaios com aminoácidos, desta vez promovendo a prévia germinação do microrganismo no meio de crescimento complexo e após isso inoculando no meio de produção sintético. Vale ressaltar também que nos ensaios anteriores, em busca de um meio o mais sintético possível, foi utilizada a lactose ou glicose como fonte de carbono. Nestes novos ensaios, no entanto, foi utilizado apenas soro de queijo, que carrega a lactose a ele associada para o meio de cultivo. A composição de AA nos meios de crescimento e produção seguiu a composição da caseína. Os aminoácidos presentes nos meios e as respectivas concentrações são mostrados no item 3.2.2. O esquema desses novos ensaios é mostrado na Figura 4.28. Observe-se que três concentrações diferentes de aminoácidos foram usadas, para se verificar o efeito de inibição.

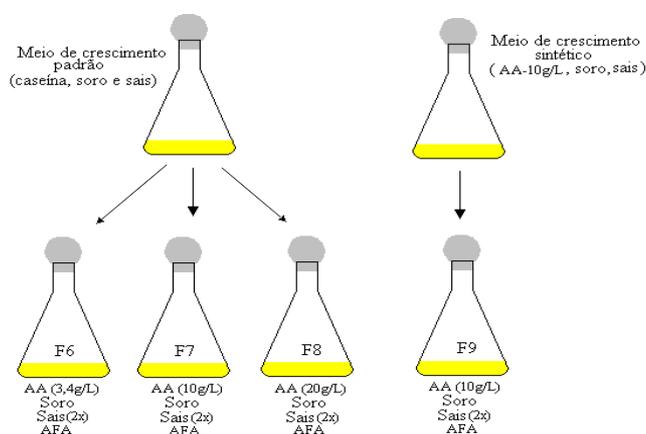


Figura 4.28: Esquema dos meios contendo aminoácidos utilizados nos ensaios de produção de PGA.

A Tabela 4.29 mostra o resultado das fermentações contendo aminoácidos e soro de queijo. As amostras neste grupo foram retiradas nos tempos 0, 24 e 48 horas. Nos três primeiros ensaios, onde o meio de crescimento foi o meio padrão, observa-se um baixo crescimento celular acompanhado de baixa atividade enzimática. Porém no ensaio F9 onde se utilizou meio semi-sintético no crescimento e na produção, observa-se alta atividade enzimática mesmo para um crescimento celular pequeno. Este nível de atividade, nunca alcançado antes, confirma a importância do soro de queijo, já que na sua ausência os resultados sempre ficaram abaixo do esperado.

Outro fator importante a se levar em conta e que pode ter contribuído para a melhoria na produtividade é a concentração de aminoácidos utilizada. Em todos os ensaios anteriores (na presença de aminoácidos) utilizaram-se aminoácidos na mesma concentração da caseína, 50g/L. Nos atuais foram utilizadas concentrações menores, como pode ser visto na Figura 4.28. Provavelmente em todos os ensaios realizados anteriormente houve inibição causada pela alta concentração dos aminoácidos.

Por conta do resultado obtido no ensaio F9 resolveu-se repetir o ensaio para confirmação. Para isso foram realizados mais dois ensaios, utilizando o mesmo meio de crescimento do ensaio F9 e mesmo meio de produção, que se diferenciaram apenas na concentração de aminoácidos utilizada: F10 (10g/L) e F11 (20g/L). Paralelamente a estes foi realizado outro ensaio com o meio padrão (F12). Os resultados destes ensaios são apresentados na Tabela 4.30.

Tabela 4.29: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em meios contendo aminoácidos.

| | Ensaio | Tempo (h) | PH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Lactose (g/L) |
|-------------------------------|--|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|---------------|
| MC Caseína Soro sais | F6 AA (3,4 g/L) Soro Sais (2x) AFA | 0 | 7,7 | - | - | - |
| | | 24 | 8,6 | 2,5 | 21 | 12,0 |
| | | 48 | 9,2 | 2,4 | 30 | 11,6 |
| MC | F7 | 0 | 8,0 | - | - | - |

| | | | | | | |
|---------------------------------|--|----|-----|-----|-----|------|
| Caseína Soro sais | AA (10g/L) soro Sais (2x) AFA | 24 | 8,4 | 3,5 | 70 | 12,8 |
| | | 48 | 9,2 | 3,5 | 50 | 11,0 |
| MC Caseína Soro sais | F8 | 0 | 8,1 | - | - | - |
| | AA (20g/L) soro sais (2x) AFA | 24 | 8,5 | 3,4 | 45 | 11,2 |
| | | 48 | 9,1 | 3,5 | 42 | 10,3 |
| MC AA(10g/L) soro sais | F9 | 0 | 8,1 | - | - | - |
| | AA (10g/L) soro Sais (2x) AFA | 24 | 8,5 | 3,5 | 172 | 13,7 |
| | | 48 | 9,3 | 3,2 | 140 | 13,6 |

MC: meio de crescimento

Para os ensaios F10 e F11 foram realizadas análises para determinação da concentração de AFA ao longo do tempo, bem como da concentração de aminoácidos. Os aminoácidos foram analisados via cromatografia de troca iônica em equipamento HPLC Shimadzu® com coluna Shim-Pac AMINO NA.

Novamente bons resultados de atividade enzimática foram alcançados ultrapassando 200UI/L mas com baixa concentração de células nos meios contendo aminoácidos e soro de queijo. Pode-se observar pela Tabela 4.30 que o AFA é totalmente consumido após 10h, fato este já verificado anteriormente nos ensaios em biorreator. Neste inclusive o AFA é totalmente consumido nas primeiras 10h. O consumo quase total dos aminoácidos é outro fator que talvez tenha contribuído para a melhoria dos resultados. Os aminoácidos, por serem moléculas mais simples e de menor peso molecular, são mais facilmente assimilados e metabolizados.

O valor de atividade do ensaio padrão (F12) permaneceu no mesmo nível dos anteriores, com uma concentração celular maior. Estes resultados motivaram a realização de ensaio utilizando a caseína Difco (caseína hidrolisada ácida) que contém essencialmente aminoácidos, fato confirmado inclusive com análise de aminoácidos em HPLC. Juntamente com este foram repetidos os ensaios F10, F11 e F12. Os resultados dos novos ensaios são mostrados na Tabela 4.31.

Tabela 4.30: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em meios contendo aminoácidos.

| | Ensaio | Tempo | pH | Concentração | Atividade | AFA | AA | Lactose |
|--|--------|-------|----|--------------|-----------|-----|----|---------|
|--|--------|-------|----|--------------|-----------|-----|----|---------|

| | | (h) | | celular (g/L) | enzimática (UI/L) | (g/L) | (g/L) | (g/L) |
|-------------------------------------|--------------------------|-----|-----|------------------|----------------------|-------|-------|-------|
| MC AA (10g/L) Soro sais | F10 | 0 | 8,2 | 0,5 | - | 2,1 | 8,2 | 14,3 |
| | AA | 10 | 8,1 | 2,8 | 71 | 2,0 | 2,98 | 14,3 |
| | (10g/L) | 24 | 8,4 | 4,2 | 298 | 0,14 | 0,73 | 12,9 |
| | Soro sais (2x) AFA | 48 | 9,2 | 3,1 | 265 | 0 | 0,36 | 13,0 |
| MC AA (10g/L) Soro sais | F11 | 0 | 8,3 | 0,5 | - | 2,2 | 15,65 | 14,8 |
| | AA | 10 | 8,1 | 2,5 | 36 | 2,0 | 6,46 | 13,7 |
| | (20g/L) | 24 | 8,4 | 3,6 | 250 | 1,0 | 4,63 | 14,2 |
| | Soro sais (2x) AFA | 48 | 9,0 | 4,8 | 277 | 0 | 1,9 | 12,8 |
| MC Caseína soro sais | F12 | 0 | 7,9 | 0,5 | - | | | 12,0 |
| | caseína | 24 | 8,3 | 4,7 | 70 | | | 11,9 |
| | soro sais (2x) AFA | 48 | 8,6 | 6,0 | 100 | | | 11,4 |

Pode-se observar que os resultados anteriores foram confirmados em todos os cultivos. Os ensaios com aminoácidos apresentaram bons níveis de atividade enzimática com valores maiores no ensaio F13, da mesma maneira que o ensaio F10 (Tabela 4.30). Provavelmente o uso de uma concentração de aminoácidos de 20g/L cause algum tipo de inibição. O ensaio com caseína Difco também apresentou resultados da mesma ordem de grandeza dos ensaios com aminoácidos, confirmando assim o efeito conjunto destes e do soro de queijo.

Tabela 4.31: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em meios contendo aminoácidos.

| | Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | AFA (g/L) | Lactose (g/L) |
|---|------------------|--------------|-----|----------------------------------|-----------------------------------|--------------|------------------|
| MC AA (10g/L) Soro Soro sais | F13 | 0 | 8,1 | 0,5 | - | 2,3 | 14,4 |
| | AA (10g/L) | 10 | - | 2,9 | 65 | 2,1 | 13,6 |
| | Soro | 24 | 8,4 | 4,5 | 232 | 0 | 13,6 |
| | Sais (2x) AFA | 48 | 9,1 | 3,6 | 194 | 0 | 13,1 |
| MC AA (10g/L) Soro Soro sais | F14 | 0 | 8,2 | 0,5 | - | 2,5 | 12,8 |
| | AA (20g/L) | 10 | - | 3,3 | 25 | 2,3 | 11,7 |
| | soro | 24 | 8,4 | 3,6 | 71 | 1,5 | 11,1 |
| | Sais (2x) AFA | 48 | 9,1 | 4,0 | 140 | 0 | 11,2 |
| MC AA (10g/L) | F15 | 0 | 8,2 | 0,5 | - | 2,0 | 12,5 |
| | Caseína | 10 | - | 3,0 | 61 | 1,9 | 12,5 |
| | Difco | 24 | 8,7 | 5,0 | 242 | 0 | 11,1 |

| | | | | | | | |
|-----------|----------------------------|----|-----|-----|-----|---|------|
| Soro saís | (10g/L) soro saís (2x) AFA | 48 | 9,3 | 4,0 | 245 | 0 | 11,7 |
| MC | F16 | 0 | 8,0 | 0,5 | - | - | 13,0 |
| Caseína | caseína | 10 | - | 3,1 | 41 | - | 13,3 |
| Soro saís | soro saís (2x) AFA | 24 | 8,6 | 5,6 | 79 | - | 11,9 |
| | | 48 | 8,8 | 5,3 | 97 | - | 11,5 |

Vale ressaltar que embora a inclusão do soro de queijo tenha melhorado o resultado dos ensaios com aminoácidos, este talvez induza a produção de proteases.

A atividade proteolítica foi medida em ensaios de hidrólise de caseína com o próprio caldo de fermentação. Em pH-stato Metrohn modelo Titrino é feita a hidrólise à temperatura de 50°C e pH=8 de 10mL de caseína. Dependendo do volume de NaOH gasto na hidrólise confirma-se ou não a presença de proteases. Em todos os ensaios de atividade proteolítica nos meios contendo soro de queijo, observou-se a presença de proteases, fato este não observado na sua ausência.

4.3.2 Ensaios com Substituição do Soro de Queijo

Dando continuidade aos estudos com o meio contendo aminoácidos e soro de queijo, foram realizados ensaios onde o soro de queijo foi substituído pelos seus componentes, entre os quais, vitaminas, fósforo e potássio. O objetivo principal foi identificar quais destes nutrientes eram importantes para o microrganismo na produção da enzima. Nestes ensaios não foi incluída lactose, pois já foi observado em estudos anteriores que a ausência de soro de queijo e a presença desta não promoveram germinação do microrganismo.

As vitaminas encontradas no soro e utilizadas nos ensaios foram A, C, B2, B12 e ácido pantotênico. Os sais potássio e fósforo foram fornecidos como cloreto de potássio e fosfato de sódio. Os resultados são mostrados na Tabela 4.32.

No ensaio F18 testou-se meio com todos os componentes citados acima e no ensaio F19 foi verificada somente a influência do fósforo e do potássio. Observou-se que a substituição do soro por alguns de seus componentes não promoveu a produção de enzima. O ensaio F17 representa o meio padrão que passa a ser utilizado, correndo

sempre em paralelo com os demais, em substituição ao padrão anterior, composto de caseína hidrolisada por Alcalase® , soro, sais e AFA.

Tabela 4.32: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em câmara rotativa: efeito da substituição do soro por seus componentes.

| | Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | AA(g/L) |
|--|---|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|---------|
| MC* AA (10g/L) Soro sais | F17 AA (10g/L) soro Sais (2x) AFA | 0 | 8,1 | 0,5 | - | 8,6 |
| | | 10 | 8,1 | 2,9 | 57 | 3,5 |
| | | 24 | 8,3 | 3,8 | 171 | 1,6 |
| | | 48 | 9,2 | 3,1 | 148 | 1,0 |
| MC AA (10g/L) Vitaminas K/P sais | F18 AA (10g/L) Vitaminas K/P Sais (2x) AFA | 0 | 8,7 | 0,5 | - | 8,8 |
| | | 10 | 8,1 | 2,2 | - | 3,8 |
| | | 24 | 8,7 | 2,9 | - | 2,2 |
| | | 48 | 8,7 | 2,6 | - | 2,3 |
| MC AA (10g/L) Vitaminas K/P sais | F19 AA (10g/L) K/P sais (2x) AFA | 0 | 8,6 | 0,5 | - | 8,7 |
| | | 10 | 8,2 | 2,5 | - | 4,9 |
| | | 24 | 8,5 | 2,8 | - | 2,8 |
| | | 48 | 9,2 | 2,5 | - | 1,9 |

*MC= meio de crescimento (inóculo)

Nos ensaios que se seguiram testou-se o fornecimento de fósforo e potássio na forma de sal KH_2PO_4 , além da adição de glicose (ensaio F21). O resultado desse segundo grupo de ensaios é mostrado na Tabela 4.33.

Pelos resultados mostrados na Tabela 4.33 observa-se que, da mesma forma que nos ensaios anteriores, não ocorreu produção de enzima. A adição de glicose e a troca das fontes de fósforo e potássio, comparados aos ensaios F18 e F19 e na ausência do soro, em nada beneficiaram a produção de PGA. Nos ensaios F20 e F22 o microrganismo teve crescimento celular semelhante ao obtido em F19 (com meio que contém soro) e esse crescimento foi maior quando se adicionou glicose. Este resultado confirma assim todos os comentários já feitos para a glicose (ensaios descritos

anteriormente): o seu uso favorece o crescimento celular, mas desfavorece a síntese da enzima.

Tabela 4.33: Produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em câmara rotativa: efeito da substituição do soro por seus componentes.

| | Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|--|---|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| MC AA (10g/L) Vitaminas KH ₂ PO ₄ sais | F20 | 0 | 7,9 | 0,3 | - |
| | AA (10g/L) Vitaminas KH ₂ PO ₄ Sais (2x) AFA | 24 | 8,8 | 3,9 | - |
| | | 48 | 9,3 | 3,7 | 22 |
| MC AA (10g/L) Vitaminas KH ₂ PO ₄ sais | F21 | 0 | 7,9 | 0,3 | - |
| | AA (10g/L) Vitaminas KH ₂ PO ₄ Glicose Sais (2x) AFA | 24 | 6,7 | 3,4 | - |
| | | 48 | 8,4 | 5,5 | - |
| MC AA (10g/L) Vitaminas KH ₂ PO ₄ sais | F22 | 0 | 7,9 | 0,4 | - |
| | AA (10g/L) KH ₂ PO ₄ sais (2x) AFA | 24 | 8,8 | 4,2 | - |
| | | 48 | 9,3 | 4,1 | 23 |

Estes resultados confirmam que o soro de queijo contém algum micronutriente essencial à produção da enzima. No entanto, não se conseguiu esclarecer qual nutriente do soro causa esse efeito. De acordo com Ponsano *et al.*, 1992, a composição e o tipo de soro de leite produzido nas indústrias leiteiras dependem dos tipos de queijos fabricados, dos processos tecnológicos utilizados na produção e também no modo de secagem; portanto seu conteúdo em proteínas, sais minerais, ácidos graxos, lactose e ácido láctico pode variar. Sendo assim, a substituição do soro de queijo pelos componentes de sua composição pode não ter sido satisfatória por diferenças entre as composições da literatura (Berazaín, 1997) e do soro real utilizado.

A partir dos resultados satisfatórios obtidos em câmara rotativa utilizando aminoácidos livres como fonte de nitrogênio, passou-se também a substituir a caseína

hidrolisada nos ensaios em biorreator. A dificuldade de se chegar a este meio foi ocasionada por alguns fatores:

- nos ensaios com hidrolisado enzimático de caseína o acompanhamento da concentração de peptídeos mostrou que havia o consumo deles,
- os ensaios com hidrolisado ácido de caseína (aminoácidos livres) mostraram resultados inferiores aos realizados com hidrolisado enzimático (polipeptídeos),
- os ensaios com meio sintético utilizando aminoácidos livres na ausência do soro de queijo não promoveram a germinação do microrganismo.

Sendo assim, como já citado anteriormente, aparentemente o microrganismo requeria peptídeos ao invés de aminoácidos livres para germinar. Na verdade, como veio a se constatar depois, concentrações de aminoácidos acima de 10g/L inibiam o crescimento celular e a produção da enzima. Após o acompanhamento do consumo de aminoácidos durante o cultivo com meios sintéticos, por meio de análises em HPLC, concluiu-se que serina, alanina, glicina, ácido aspártico, treonina, ácido glutâmico e lisina são os primeiros a se esgotarem. Entretanto, a concentração desses aminoácidos é pequena, tanto no soro de queijo como no hidrolisado enzimático de caseína; entre os principais aminoácidos presentes nesse hidrolisado estão fenilalanina e metionina (que apresentaram menor velocidade de consumo).

Desta forma, pode-se fazer a hipótese de que o esgotamento daqueles primeiros aminoácidos, na presença de peptídeos e proteínas do soro (e/ou do hidrolisado enzimático), induz à produção de protease(s), excretada(s) no meio para suprir os aminoácidos essenciais ao microrganismo. Entretanto, tais enzimas irão hidrolisar também a PGA produzida, diminuindo a produtividade do processo.

4.4 Ensaios em Biorreator – Segunda Etapa

A mudança nos meios de germinação e produção, com a substituição da caseína hidrolisada, que contém preferencialmente peptídeos, por aminoácidos livres, tornou necessária a realização de vários ensaios adicionais no biorreator para que se pudesse propor um modelo cinético consistente e para que se tivesse uma base de dados suficiente para o treinamento e validação de algoritmos de inferência.

Os vários estudos realizados nos mostraram que o crescimento do microrganismo consumindo uma solução de aminoácidos de 10g/L (ao invés do hidrolisado enzimático de caseína) na presença de soro de queijo, sais e AFA levava a

atividades enzimáticas em torno de 200UI/L, nível nunca antes atingido. Os aminoácidos, por serem moléculas mais simples, são mais facilmente assimiláveis e metabolizáveis. Sendo assim, este passou a ser o meio padrão. Todos os ensaios deste ponto em diante passaram a ser realizados com os novos meios de crescimento e produção.

É importante lembrar que a partir do ensaio 8 em biorreator o AFA passou a ser analisado utilizando cromatografia líquida de alta definição com coluna C18 Waters e não mais a coluna de exclusão de tamanho utilizada nos ensaios anteriores. O método anterior apresentava muitas variações entre uma amostra e outra, dificultando assim o cálculo da concentração de AFA. A metodologia utilizada está descrita no capítulo Materiais e Métodos (item 3.3.6).

4.4.1 Ensaio 8

Foi necessário fazer um ensaio padrão com os novos meios, para comparação com os demais. O primeiro ensaio realizado em biorreator com o novo meio foi um ensaio no modo batelada, sem controle de pH e com oxigênio dissolvido igual aos últimos ensaios (20% da saturação).

Para todos os ensaios em câmara rotativa, realizados em paralelo com os ensaios em biorreator, a atividade final em “shaker” foi sempre maior que a obtida no fermentador e a concentração celular menor, provavelmente pela limitação de oxigênio dissolvido. Como a solução de aminoácidos é preparada a cada ensaio a ser realizado, sempre são observadas diferenças nas variáveis analisadas de um ensaio para o outro. Portanto, é aconselhável que se faça ensaio paralelo em câmara rotativa, para observar as diferenças das principais variáveis, ou seja, sabermos o nível máximo de atividade e concentração celular atingidos utilizando a mesma solução de aminoácidos em diferentes métodos de produção (reator tanque agitado e câmara rotativa).

As condições adotadas no ensaio 8 são mostradas na Tabela 4.34.

| Tabela 4.34: Condições operacionais adotadas no ensaio 8 (ensaio batelada - novo padrão). | |
|---|----------------------------|
| Aeração | 2L/min ao longo do cultivo |

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% da saturação ao longo do cultivo |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 41 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

O ensaio teve uma duração de 41 horas. Observou-se que com o novo meio as velocidades de crescimento do microrganismo e de produção da enzima são maiores que nos ensaios anteriores. O máximo de crescimento celular e atividade enzimática se deu em menor tempo e conseqüentemente a fase estacionária principiou antes, fazendo com que não fosse mais necessário prolongar o ensaio. Os valores das análises realizadas são apresentados na Tabela 4.35(biorreator) e Tabela 4.36(câmara rotativa).

Podemos observar pelas tabelas que os resultados foram bem satisfatórios, confirmando assim os anteriores obtidos com o novo meio em câmara rotativa. Os níveis de atividade foram semelhantes em ambos os ensaios, diferenciando-se apenas na velocidade de produção da enzima, onde a máxima atividade em biorreator se deu em 13 horas (175UI/L) e a máxima em “shaker” se deu entre 24 e 48 horas (179UI/L). Nota-se que após a enzima produzida atingir seu patamar houve um pequeno decréscimo da mesma.

Nos ensaios em biorreator foram realizadas análises para o acompanhamento do consumo de aminoácidos. Estes foram analisados via cromatografia de troca iônica em equipamento HPLC Shimadzu® com coluna Shim-Pac AMINO NA por fluorescência após derivatização com OPA. Na Tabela 4.35 é mostrado o consumo total dos aminoácidos, por simplicidade; mas são obtidos os consumos de cada um deles, podendo-se observar o consumo preferencial de uns em relação a outros.

Tabela 4.35: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (8º ensaio).

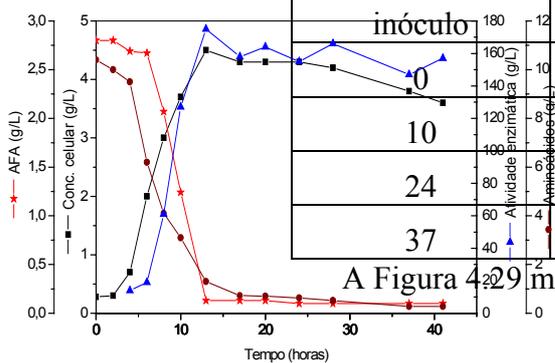
| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Lactose* (g/L) | AA totais (g/L) | AFA (g/L) |
|--------|-----------|----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------|
|--------|-----------|----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------|

| | | | | | | | |
|---|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|
| 8 | Pré-inóculo | - | 5,0 | - | 4,9 | - | |
| | inóculo | - | 3,3 | - | 5,0 | - | |
| | 0 | 7,9 | 0,2 | - | 14,3 | 10,4 | 2,8 |
| | 2 | 8,0 | 0,2 | - | 14,3 | 10,0 | 2,8 |
| | 4 | 7,9 | 0,6 | 14 | 14,0 | 9,5 | 2,69 |
| | 6 | 8,0 | 1,8 | 19 | 14,3 | 6,2 | 2,67 |
| | 8 | 8,1 | 2,8 | 61 | 14,0 | 4,1 | 2,07 |
| | 10 | 8,2 | 3,5 | 127 | 14,1 | 3,1 | 1,24 |
| | 13 | 8,5 | 4,3 | 175 | 13,9 | 1,3 | 0,13 |
| | 17 | 8,7 | 4,1 | 159 | 13,5 | 0,7 | 0,13 |
| | 20 | 8,8 | 4,2 | 164 | 14,2 | 0,69 | 0,1 |
| | 24 | 8,9 | 4,2 | 155 | 14,3 | 0,63 | 0,1 |
| | 28 | 9,1 | 4,1 | 166 | 14,2 | 0,5 | 0,1 |
| | 37 | 9,2 | 3,7 | 147 | 14,5 | 0,28 | 0,1 |
| | 41 | 9,2 | 3,5 | 157 | 14,5 | 0,28 | 0,1 |

*presente no soro de queijo

Tabela 4.36: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (8º ensaio).

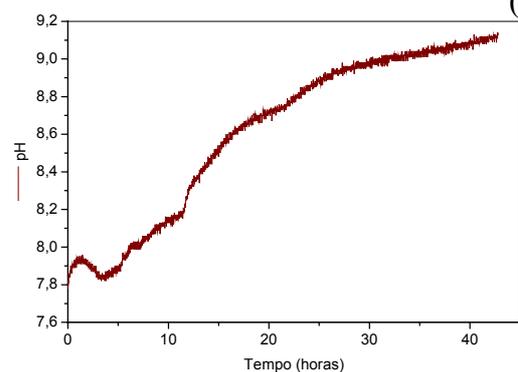
| tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|-------------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| Pré-inóculo | - | 5,0 | - |
| inóculo | 8,1 | 3,3 | - |
| 0 | 7,8 | 0,4 | - |
| 10 | 8,1 | 2,6 | 42 |
| 24 | 8,4 | 3,5 | 171 |
| 37 | 8,9 | 4,0 | 179 |

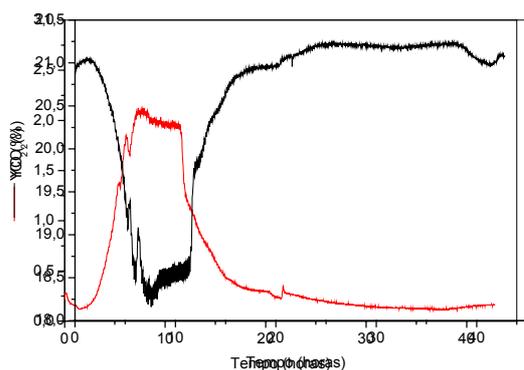


A Figura 4.29 mostra a evolução de algumas variáveis de processo.

(A)

(B)





(C)

(D)

Figura 4.29: Resultados experimentais do oitavo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO₂ nos gases de saída e (D) concentração de O₂, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Em relação a ensaios anteriores, realizados com meio antigo, observou-se que algumas variáveis apresentaram valores menores. A fração molar de CO₂ atingiu valor de 2% em consequência do menor crescimento celular, que não passou de 4,3g/L. Já a variável pH ficou na mesma faixa dos anteriores, atingindo ao final do ensaio valor em torno de 9,0. O consumo de AFA ocorreu nas primeiras 13 horas, indicando sua utilização como fonte de carbono pelo microrganismo.

As concentrações de cada aminoácido ao longo do tempo são mostradas na Tabela 4.37. Observa-se que alguns aminoácidos são consumidos mais rapidamente e outros mais lentamente.

Tabela 4.37: Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 8.

| | 0h | 2h | 4h | 6h | 8h | 10h | 13h | 17h | 20h | 24h | 28h | 37h | 41h |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|
| Asp | 0,76 | 0,67 | 0,64 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Thr | 0,43 | 0,41 | 0,38 | 0,31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ser | 0,47 | 0,42 | 0,41 | 0,22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glu | 1,58 | 1,5 | 1,4 | 0,26 | 0,06 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pro | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,04 | 0,93 | 0,73 | - | - | - | - | - | - | - |
| Gly | 0,13 | 0,12 | 0,11 | 0,07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ala | 0,36 | 0,3 | 0,28 | 0,07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Val | 0,65 | 0,63 | 0,57 | 0,53 | 0,46 | 0,29 | 0,12 | 0,07 | 0,06 | 0,05 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Met | 0,72 | 0,72 | 0,66 | 0,62 | 0,57 | 0,49 | 0,4 | 0,35 | 0,35 | 0,34 | 0,34 | 0,21 | 0,21 |
| Ile | 0,53 | 0,51 | 0,47 | 0,4 | 0,3 | 0,18 | 0,07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Leu | 1,37 | 1,36 | 1,23 | 1,19 | 1,0 | 0,87 | 0,57 | 0,3 | 0,28 | 0,24 | 0,18 | 0,07 | 0,07 |
| Tyr | 0,39 | 0,35 | 0,32 | 0,2 | 0,18 | 0,12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Phe | 0,6 | 0,6 | 0,68 | 0,53 | 0,43 | 0,37 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| His | 0,2 | 0,23 | 0,21 | 0,14 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lys | 0,77 | 0,7 | 0,75 | 0,47 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arg | 0,46 | 0,41 | 0,35 | 0,14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cys | 0,03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Trp | 0,12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Entre os mais rapidamente consumidos estão o ácido aspártico (Asp), treonina (Thr), serina (Ser), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), alanina (Ala), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), triptofano (Trp) e Cistina (Cys). Entre os consumidos mais lentamente estão prolina (Pro), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). A cistina (Cys) e o triptofano (Trp) são colocados em quantidades pequenas e o seu consumo é difícil de quantificar.

Confrontando-se o gráfico do crescimento celular e atividade enzimática (Figura 4.29-A) com a tabela de consumo dos aminoácidos, observa-se que após 10 horas há a estagnação de ambas as variáveis, que coincide com a exaustão tanto do AFA como dos principais aminoácidos. O comportamento das variáveis velocidade de agitação e oxigênio dissolvido é mostrado na Figura 4.30. As curvas com o consumo de alguns aminoácidos são mostradas nas Figuras 4.31 e 4.32. A Figura 4.31 mostra os aminoácidos mais rapidamente consumidos (chegam à exaustão aproximadamente em 10 horas) e a Figura 4.32 os aminoácidos que são consumidos mais lentamente.

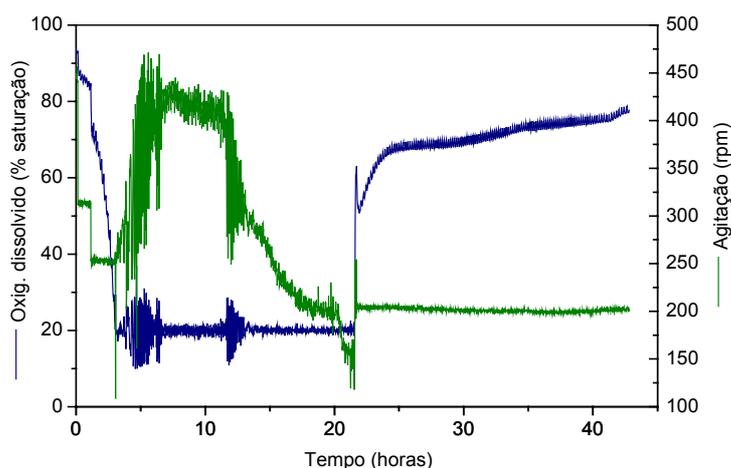


Figura 4.30: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 8).

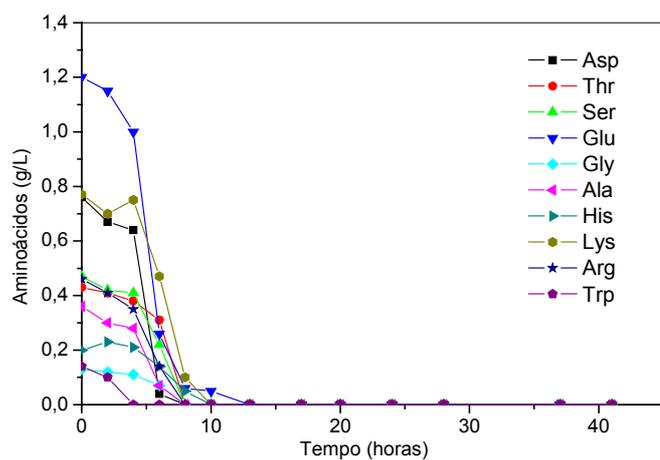


Figura 4.31: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 8).

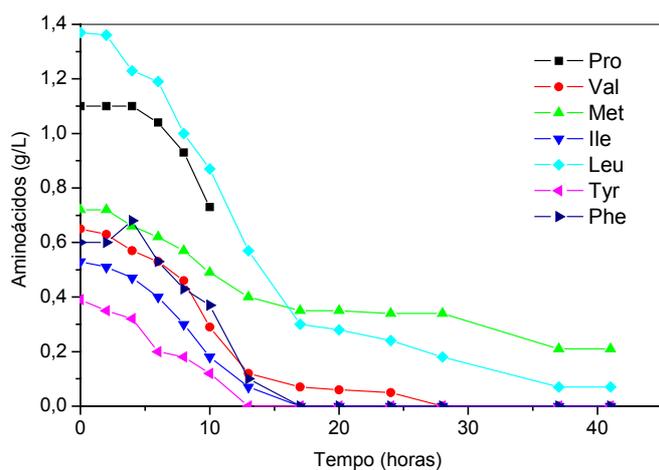


Figura 4.32: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 8).

O término da fase exponencial de crescimento celular coincidiu com a exaustão do AFA e de alguns aminoácidos. Optou-se, assim, por fazer no próximo ensaio uma batelada alimentada. A alimentação seria com a mesma solução de aminoácidos colocada no início. O objetivo era tentar estender a fase de crescimento exponencial e conseqüentemente aumentar a produção de PGA, uma vez que o aumento da massa celular foi acompanhado pelo aumento gradativo da atividade (Figura 4.29-A), indicação clara de que a produção foi associada ao crescimento.

4.4.2 Ensaio 9

O ensaio 9 foi portanto uma batelada alimentada onde se suplementou a mesma solução de aminoácidos (procurando-se manter a concentração no biorreator ao redor de 10g/L). Com base na análise do consumo de aminoácidos do ensaio 8 (Tabela 4.37), optou-se por alimentar a solução após 8 horas de início do cultivo pois, como pode se observar, neste instante os aminoácidos mais rapidamente consumidos já chegaram ou estão chegando à exaustão. O volume total de meio suplementar que foi adicionado, a uma vazão de 1,76mL/mim, foi de 1000ml. A Tabela 4.38 mostra as condições adotadas neste ensaio. Os valores das análises realizadas são apresentados na Tabela 4.39 (biorreator) e Tabela 4.40 (câmara rotativa). A Figura 4.33 mostra a evolução das variáveis de processo.

| Tabela 4.38: Condições operacionais adotadas no ensaio 9 (batelada alimentada). Meio suplementar com aminoácidos (40g/L) a uma vazão de alimentação de 1,76mL/mim iniciada após 8 horas de cultivo. | |
|---|--------------------------------------|
| aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% da saturação ao longo do cultivo |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 46 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

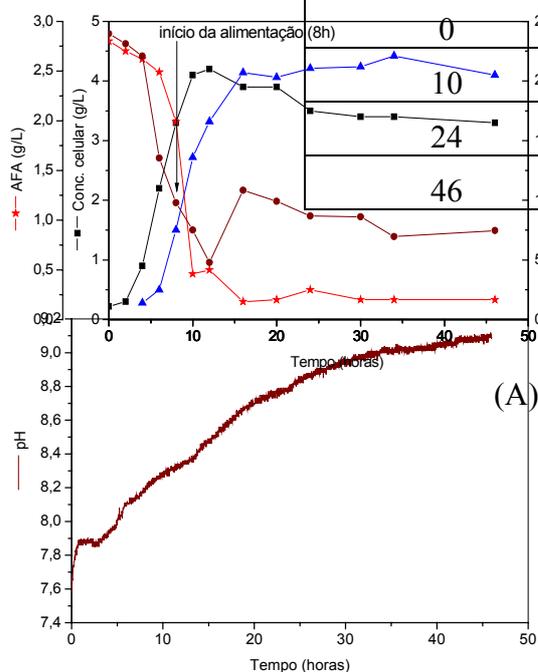
Tabela 4.39: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (9º ensaio – batelada alimentada).

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Lactose* (g/L) | AA totais (g/L) | AFA (g/L) |
|--------|-------------|-----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------|
| 9 | Pré-inóculo | - | 5,3 | - | 4,7 | - | - |
| | inóculo | - | - | - | - | - | - |
| | 0 | 7,6 | 0,22 | - | 14,3 | 11,1 | 2,8 |
| | 2 | 7,9 | 0,3 | - | 14,9 | 11,5 | 2,7 |
| | 4 | 8,0 | 0,9 | 14 | 14,9 | 10,6 | 2,6 |
| | 6 | 8,2 | 2,2 | 25 | 14,6 | 6,5 | 2,49 |
| | 8 | 8,3 | 3,3 | 75 | 14,0 | 4,7 | 1,99 |
| | 10 | 8,4 | 4,1 | 136 | 13,9 | 3,6 | 0,46 |
| | 12 | 8,4 | 4,2 | 166 | 12,2 | 2,3 | 0,5 |
| | 16 | 8,6 | 3,9 | 207 | 13,3 | 5,2 | 0,2 |
| | 20 | 8,8 | 3,9 | 203 | 11,4 | 4,7 | 0,2 |
| | 24 | 8,9 | 3,5 | 211 | 11,9 | 4,2 | 0,2 |
| | 30 | 9,1 | 3,4 | 212 | 11,5 | 4,1 | 0,2 |
| | 34 | 9,1 | 3,4 | 221 | 11,2 | 3,3 | 0,2 |
| | 46 | 9,2 | 3,3 | 205 | 11,6 | 3,6 | 0,2 |

*presente no soro de queijo

Tabela 4.40: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (9º ensaio).

| tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|-------------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| Pré-inóculo | - | 5,3 | - |
| inóculo | - | - | - |
| 0 | 7,9 | 0,3 | - |
| 10 | 8,3 | 3,4 | 60 |
| 24 | 8,6 | 4,4 | 177 |
| 46 | 9,1 | 4,5 | 165 |



(B)

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ala | 0,38 | 0,32 | 0,16 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 00 | 0 | 0 |
| Val | 0,63 | 0,62 | 0,6 | 0,48 | 0,41 | 0,31 | 0,20 | 0,43 | 0,41 | 0,36 | 0,35 | 0,27 | 0,27 |
| Met | 0,81 | 0,79 | 0,76 | 0,73 | 0,64 | 0,60 | 0,43 | 0,89 | 0,86 | 0,80 | 0,81 | 0,63 | 0,73 |
| Ile | 0,52 | 0,52 | 0,50 | 0,40 | 0,28 | 0,19 | 0,12 | 0,28 | 0,24 | 0,19 | 0,16 | 0,11 | 0,10 |
| Leu | 1,43 | 1,43 | 1,37 | 1,23 | 1,10 | 0,9 | 0,6 | 1,22 | 1,10 | 0,94 | 0,84 | 0,63 | 0,64 |
| Tyr | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,46 | 0,38 | 0,30 | 0,53 | 0,35 | 0,22 | 0,25 | 0,30 | 0,31 |
| Phe | 0,68 | 0,68 | 0,63 | 0,55 | 0,53 | 0,32 | 0,21 | 0,50 | 0,37 | 0,34 | 0,36 | 0,26 | 0,30 |
| His | 0,35 | 0,32 | 0,29 | 0,28 | 0,16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,05 | 0 | 0 |
| Lys | 0,84 | 0,80 | 0,79 | 0,45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arg | 0,49 | 0,47 | 0,42 | 0,10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CyS S | 0,03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Trp | 0,12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Também para as variáveis monitoradas observa-se comportamento semelhante em relação ao ensaio 8. O crescimento exponencial se deu nas primeiras 10 horas e a variável CO₂ também atingiu 2%, porém com maior tempo de permanência neste valor.

Entre os aminoácidos mais lentamente consumidos, observa-se uma diminuição da concentração até 10 ou 12 horas de ensaio, seguida de aumento após algumas horas de alimentação. As Figuras 4.34 e 4.35 mostram respectivamente os aminoácidos com maior velocidade e os de menor velocidade de consumo.

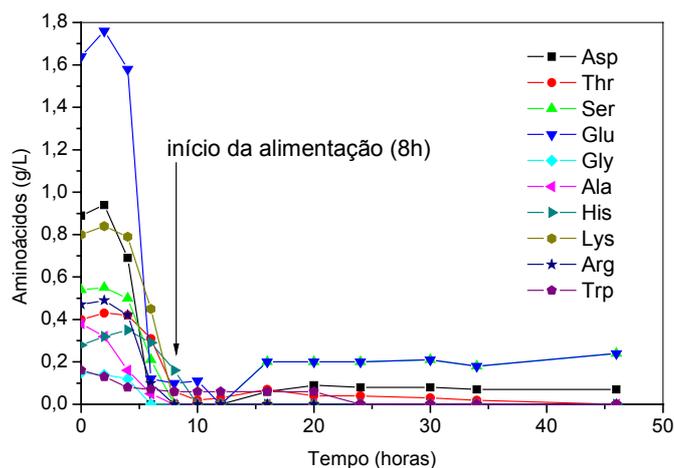


Figura 4.34: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 9).

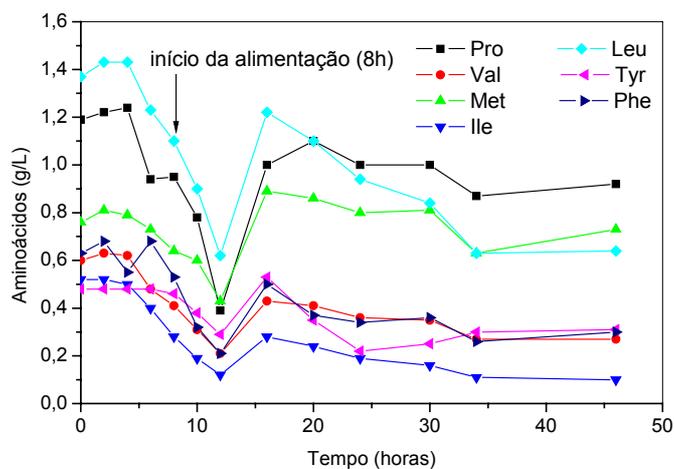


Figura 4.35: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 9).

A Figura 4.36 mostra a evolução do oxigênio dissolvido e da velocidade de agitação. Observe que, semelhantemente ao ensaio 5, a agitação parou para manter o oxigênio dissolvido em 20% da saturação. A partir deste momento, foi necessário fixar a agitação (200 rpm) para continuidade do ensaio.

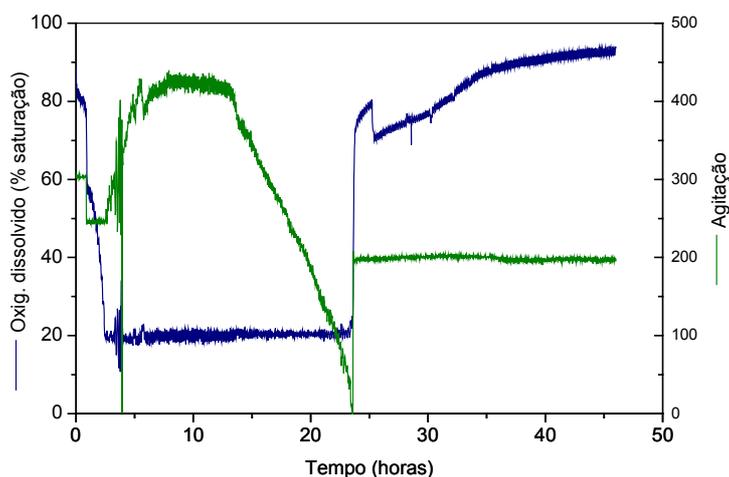


Figura 4.36: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 9).

Da Tabela 4.41 e das Figuras 4.34 e 4.35, observa-se que há aumento na concentração de alguns aminoácidos causado pela diferença na velocidade de consumo de uns em relação aos outros. Sendo assim, com os dados do ensaio 9 resolveu-se calcular a velocidade de consumo de cada aminoácido, e fornecê-los ao microrganismo nesta mesma velocidade ao final da fase exponencial.

4.4.3 Ensaio 10

Esse ensaio foi realizado com o mesmo meio inicial dos ensaios 8 e 9, porém a concentração dos aminoácidos do meio suplementar foi baseada no cálculo das velocidades de consumo de cada um deles, tendo como referência o ensaio 9. Considerou-se a fase exponencial de crescimento (primeiras 10 horas) para o cálculo dessas velocidades. As condições adotadas no ensaio 10 são mostradas na Tabela 4.42. A alimentação dos aminoácidos foi iniciada 5 horas após a partida do fermentador, pois se observou no ensaio anterior que em 8 horas alguns aminoácidos já tinham chegado à exaustão.

| Tabela 4.42: Condições operacionais adotadas no ensaio 10 (batelada alimentada). Meio suplementar com aminoácidos baseado na velocidade de consumo (40g/L) a uma vazão de alimentação de 1,76mL/min iniciada após 5 horas de cultivo. | |
|---|--------------------------------------|
| aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% da saturação ao longo do cultivo |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 38 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

Nos ensaios 8 e 9 observou-se que os aminoácidos são consumidos com diferentes velocidades, o que pode ser visto pelas Figuras 4.31 e 4.32 (ensaio 8) e pelas Figuras 4.34 e 4.35 (ensaio 9). A concentração de cada aminoácido no meio suplementar foi calculada de acordo com sua respectiva velocidade de consumo na fase exponencial. A Tabela 4.43 mostra os valores das concentrações iniciais e das novas concentrações de alimentação. Observe que as novas concentrações foram reduzidas para alguns aa e aumentadas para outros, com relação ao ensaio anterior. Os valores da Tabela são para o preparo de uma solução 40g/L.

Tabela 4.43: Concentração de aminoácidos no meio inicial e no meio suplementar.

| Aminoácidos | Meio inicial (g/L) | Meio suplementar (g/L) |
|-------------|--------------------|------------------------|
| Ala | 1,16 | 2,5 |
| Arg | 1,64 | 3,1 |
| Asp | 2,53 | 7,17 |
| Cst | 0,13 | 0,13 |
| Glu | 4,47 | 12,4 |
| Gly | 0,44 | 1,07 |
| His | 0,98 | 0,6 |
| Leu | 4,18 | 1,4 |
| Ile | 2,13 | 0,92 |
| Lys | 3,02 | 3,0 |
| Met | 2,49 | 0,46 |
| Phe | 2,44 | 0,3 |
| Pro | 4,3 | 2,15 |
| Ser | 2,5 | 2,7 |
| Thr | 1,91 | 0,92 |
| Tyr | 1,96 | 0,3 |
| Trp | 0,53 | 0,48 |
| Val | 2,76 | 1,07 |

Os resultados das análises ao longo do ensaio são mostrados na Tabela 4.44 (biorreator) e Tabela 4.45 (câmara rotativa).

Tabela 4.44: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (10^o ensaio – batelada alimentada).

| Ensaio | Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) | Lactose* (g/L) | AA totais (g/L) | AFA (g/L) |
|--------|-------------|-----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------|
| 10 | Pré-inóculo | - | - | - | | - | |
| | inóculo | - | 2,4 | | 5,8 | - | |
| | 0 | 7,8 | 0,3 | - | 15,6 | 10,4 | 2,8 |
| | 2 | 8,0 | 0,3 | - | 15,5 | 10,1 | 2,7 |
| | 4 | 8,1 | 0,8 | 22 | 14,5 | 7,9 | 2,44 |
| | 6 | 8,2 | 1,8 | 22 | 14,5 | 6,3 | 2,5 |
| | 8 | 8,4 | 2,7 | 41 | 13,7 | 6,0 | 2,26 |
| | 10 | 8,5 | 3,3 | 130 | 13,5 | 4,9 | 1,82 |
| | 12 | 8,6 | 3,2 | 137 | 12,0 | 4,3 | 1,65 |
| | 16 | 8,8 | 3,6 | 191 | 12,0 | 3,7 | 0,9 |

| | | | | | | | |
|--|----|-----|-----|-----|------|-----|------|
| | 21 | 9,0 | 3,9 | 175 | 12,0 | 4,1 | 0,35 |
| | 25 | 9,2 | 3,6 | 153 | 12,1 | 3,2 | 0,3 |
| | 38 | 9,5 | 3,8 | 171 | 12,3 | 2,7 | 0,3 |

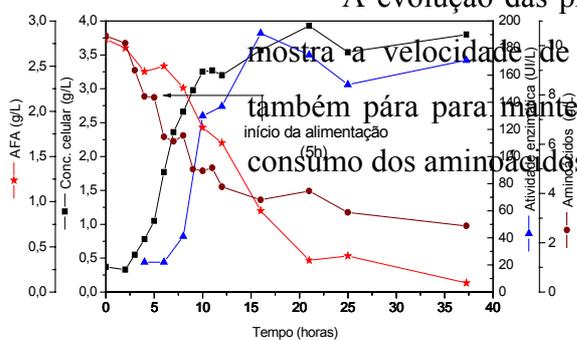
*presente no soro de queijo

Tabela 4.45: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (10º ensaio).

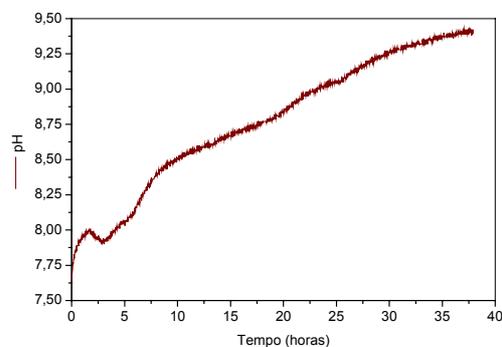
| Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|-------------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| Pré-inóculo | - | 2,4 | - |
| inóculo | - | - | - |
| 24 | 8,5 | 4,3 | 188 |
| 38 | 9,1 | 4,1 | 210 |

Observa-se pelas tabelas que a produtividade do processo não aumentou como era esperado. A atividade enzimática alcançou 191UI/L em 16 horas e a concentração celular não ultrapassou os 4,0g/L. O ensaio em câmara rotativa foi melhor que o do biorreator e reproduziu os anteriores (ensaio 8 e 9).

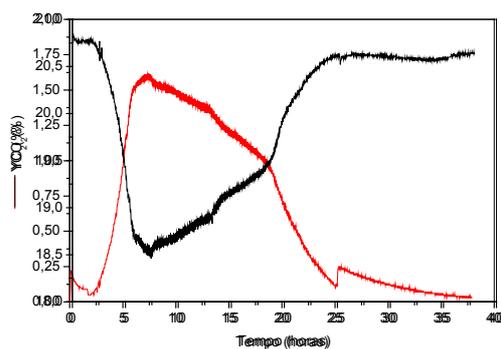
A evolução das principais variáveis é mostrada na Figura 4.37 e a Figura 4.38 mostra a velocidade de agitação e o oxigênio dissolvido. Observe que a agitação também pára para manter o oxigênio em 20% da saturação. A Tabela 4.46 mostra o consumo dos aminoácidos ao longo do tempo.



(A)



(B)



(C)

(D)

Figura 4.37: Resultados experimentais do décimo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO₂ nos gases de saída e (D) concentração de O₂, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

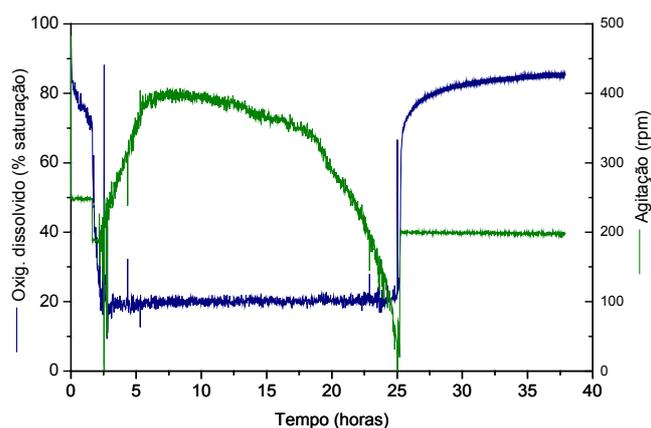


Figura 4.38: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 10).

Tabela 4.46: Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 10 (batelada alimentada).

| | 0h | 2h | 4h | 6h | 8h | 10h | 12h | 16h | 21h | 25h | 38h |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Asp | 0,84 | 0,81 | 0,6 | 0,09 | 0 | 0,08 | 0,18 | 0,19 | 0,11 | 0,13 | 0,11 |
| Thr | 0,42 | 0,40 | 0,34 | 0,27 | 0,33 | 0,22 | 0,14 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| Ser | 0,55 | 0,55 | 0,44 | 0,26 | 0,2 | 0,08 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glu | 1,68 | 1,7 | 1,36 | 0,51 | 0,09 | 0,21 | 0,41 | 0,54 | 0,36 | 0,38 | 0,4 |
| Pro | 1,29 | 1,24 | 1,05 | 0,95 | 1,41 | 1,18 | 0,89 | 0,87 | 0,82 | 0,85 | 0,78 |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Gly | 0,15 | 0,14 | 0,11 | 0,08 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ala | 0,37 | 0,36 | 0,23 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 00 |
| Val | 0,64 | 0,63 | 0,5 | 0,4 | 0,56 | 0,46 | 0,32 | 0,28 | 0,20 | 0,19 | 0,17 |
| Met | 0,75 | 0,74 | 0,59 | 0,48 | 0,72 | 0,62 | 0,46 | 0,48 | 0,81 | 0,54 | 0,44 |
| Ile | 0,53 | 0,53 | 0,42 | 0,26 | 0,37 | 0,28 | 0,19 | 0,15 | 0,12 | 0,09 | 0,06 |
| Leu | 1,43 | 1,44 | 1,15 | 0,81 | 1,16 | 1,09 | 0,83 | 0,81 | 0,69 | 0,62 | 0,45 |
| Tyr | 0,24 | 0,15 | - | 0,06 | - | - | 0,11 | 0,12 | 0,44 | 0,11 | 0,19 |
| Phe | 0,56 | 0,42 | 0,18 | 0,12 | 0,18 | 0,10 | 0 | 0 | 0,11 | 0,11 | 0,08 |
| His | 0,24 | 0,23 | 0,18 | 0,13 | 0,26 | 0,16 | 0,10 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| Lys | 0,78 | 0,67 | 0,65 | 0,60 | 0,69 | 0,44 | 0,35 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arg | 0,48 | 0,2 | 0,14 | 0,81 | 0,33 | - | 0,25 | 0,24 | 0,44 | 0,21 | 0 |
| CyS S | 0,03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Trp | 0,12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Pode-se observar que os mesmos aminoácidos que se esgotaram nos ensaios anteriores também se esgotaram neste, com pequenas diferenças em relação ao ensaio 9 uma vez que maiores concentrações para alguns e menores para outros foram adicionadas. O ácido glutâmico e a arginina, por exemplo, foram colocados em maiores quantidades, e pode-se observar pela Figura 4.39 o aumento da concentração destes após 10 horas de cultivo. Pela Figura 4.40 observa-se também a diferença na velocidade de consumo nas primeiras horas (fase exponencial) e após a alimentação.

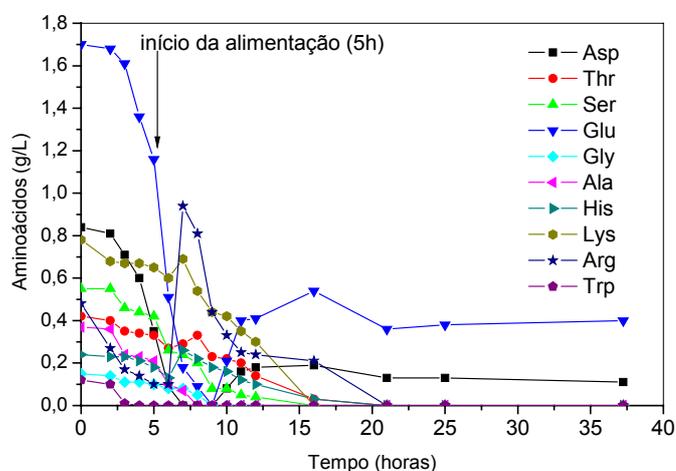
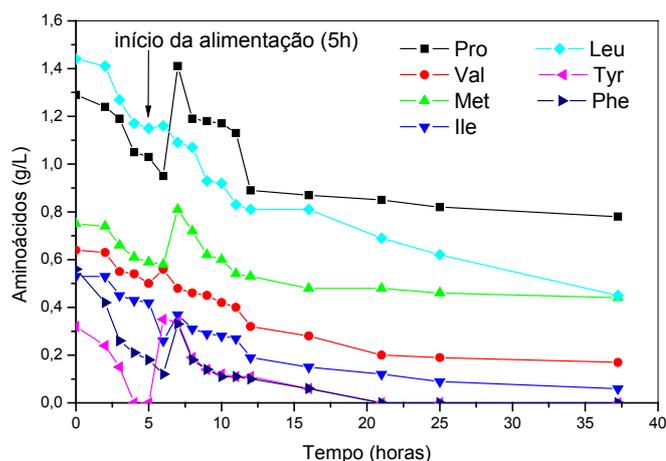


Figura 4.39: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 10).

Figura 4.40: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 10).

4.4.4 Ensaio 11

Este ensaio foi realizado também no modo batelada alimentada, assim como os ensaios 9 e 10, porém alimentando não apenas a solução de aminoácidos como também soro de queijo. Ensaio anteriores em câmara rotativa mostraram que o soro de queijo contém algum fator importante ao metabolismo do microrganismo que induz o crescimento da biomassa, pois na ausência deste não se tem bom crescimento celular. Observou-se de ensaios anteriores (Figuras 4.29-A, 4.33-A e 4.37-A) que a produção da enzima está associada ao crescimento do microrganismo. Sendo assim, a alimentação



com soro de queijo aumentaria a massa celular que conduziria a um aumento na produção da enzima. As condições adotadas para o ensaio 11 são mostradas na Tabela 4.47.

O meio inicial foi o mesmo dos ensaios anteriores e a alimentação dos aminoácidos foi a mesma do ensaio 10 (baseada na velocidade de consumo). Esta foi iniciada 5 horas após a partida do fermentador. A alimentação com soro de queijo foi iniciada em tempo diferente, após 8 horas de cultivo.

| Tabela 4.47: Condições operacionais adotadas no ensaio 11 (batelada alimentada). Meio suplementar com aminoácidos baseado na velocidade de consumo (40g/L) a uma vazão de alimentação de 1,76mL/mim iniciada após 5 horas de cultivo e soro (176,8g/L) após 8 horas. | |
|--|--------------------------------------|
| Aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% da saturação ao longo do cultivo |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 46 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

Com ensaios em batelada alimentada pode-se conseguir aumento da concentração celular e produção da enzima, com fonte de carbono e nitrogênio sempre disponível para crescimento celular sem o efeito inibidor, ocasionado por concentrações iniciais acima de 10,0g/L no caso dos aminoácidos.

O ensaio teve duração de 46 horas com retiradas de amostras a intervalos regulares. O resultados da análise dessas amostras é mostrado na Tabela 4.48. A Figura 4.41 mostra as principais variáveis monitoradas ao longo do cultivo. O ensaio em frascos agitados, realizado em paralelo, é mostrado na Tabela 4.49.

Tabela 4.48: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (11^o ensaio – batelada alimentada).

| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração celular (g/l) | Atividade enzimática (UI/l) | AA totais (g/L) | AFA (g/l) |
|--------|---------------|------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------|
| 11 | Pré-inóculo | | 5,4 | | | |
| | Inóculo | | 3,9 | | | |
| | 0 | 7,6 | 0,4 | | | 2,8 |
| | 2 | 7,86 | 0,5 | | | 2,7 |
| | 4 | 8,03 | 0,98 | 0 | 10,4 | 2,65 |
| | 6 | 8,2 | 2,4 | 23 | 10,2 | 2,5 |
| | 8 | 8,4 | 3,0 | 60 | 9,1 | 2,0 |
| | 10 | 8,44 | 4,7 | 122 | 5,7 | 1,36 |
| | 12 | 8,5 | 5,4 | 185 | 7,1 | 0,4 |
| | 14 | 8,7 | 5,9 | 184 | 5,3 | 0,15 |
| | 16 | 8,9 | 5,8 | 199 | 3,84 | 0,17 |
| | 20 | 9,2 | 5,8 | 215 | 3,7 | 0,18 |
| | 24 | 9,3 | 5,6 | 188 | 2,6 | 0,19 |
| | 28 | 9,4 | 5,5 | 195 | 2,85 | 0,18 |
| 34,5 | 9,5 | 5,6 | 188 | 2,73 | 0,17 | |

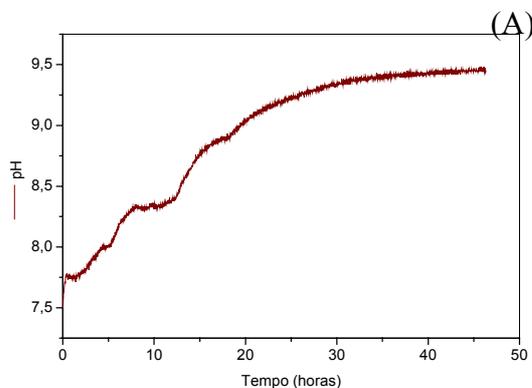
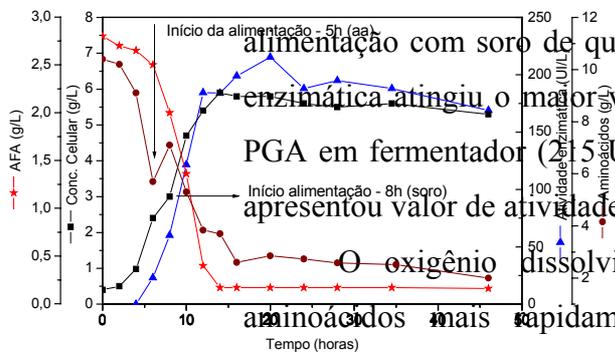
| | | | | | | |
|--|----|-----|-----|-----|------|------|
| | 46 | 9,6 | 5,3 | 169 | 2,58 | 0,16 |
|--|----|-----|-----|-----|------|------|

Tabela 4.49: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (11º ensaio).

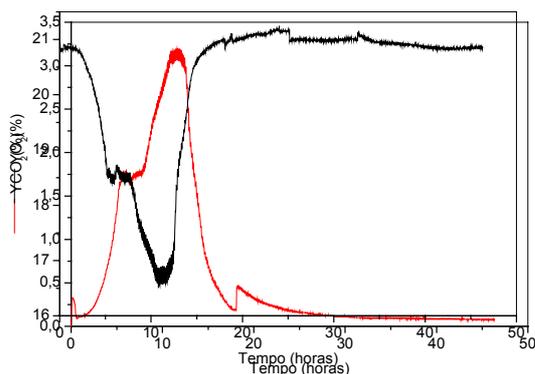
| tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| 24 | 8,5 | 3,6 | 219 |
| 38 | 9,0 | 3,4 | 151 |

Da análise das tabelas e da figura, observa-se que com relação ao ensaio anterior houve um aumento na concentração de biomassa ocasionado mais provavelmente pela alimentação com soro de queijo do que pela alimentação de aminoácidos. A atividade enzimática atingiu o maior valor até então, desde o início dos ensaios de produção de PGA em fermentador (215 UI/L em 20 horas). O ensaio realizado em câmara rotativa apresentou valor de atividade ligeiramente superior, porém com massa celular menor.

Os aminoácidos mais rapidamente consumidos e mais lentamente consumidos são mostrados nas Figura 4.43 e 4.44 respectivamente.



(B)



(C)

(D)

Figura 4.41: Resultados experimentais do décimo primeiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO_2 nos gases de saída e (D) concentração de O_2 , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

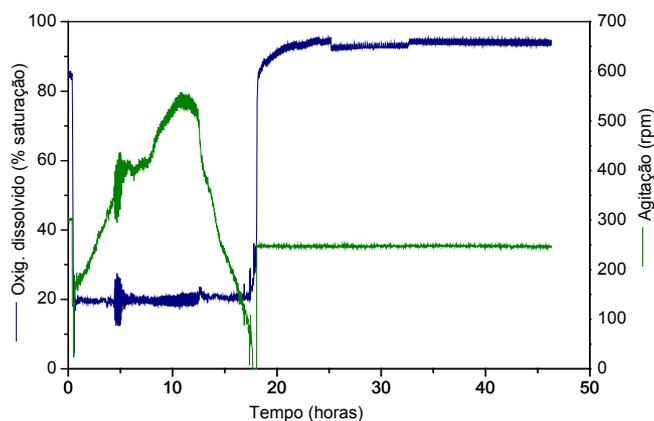


Figura 4.42: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 11).

O maior crescimento celular (em torno de 6g/L) pode ser observado também pela análise da fração molar de CO_2 (Figura 4.41-C) que atingiu valores acima de 3%. Em todos os ensaios com aminoácidos até então esta não tinha ultrapassado os 2% para concentrações celulares em torno de 4g/L. O pH apresentou comportamento semelhante aos demais ensaios.

Observa-se pela Figura 4.42 que o oxigênio dissolvido foi controlado em 20% da saturação até aproximadamente 17 horas. A agitação apresentou valor máximo (em torno de 550rpm) em aproximadamente 12 horas, referente ao período de maior crescimento celular. Esta foi diminuindo gradativamente até quase parar, para manter o controle de oxigênio dissolvido. Após 17 horas foi fixada em 250rpm.

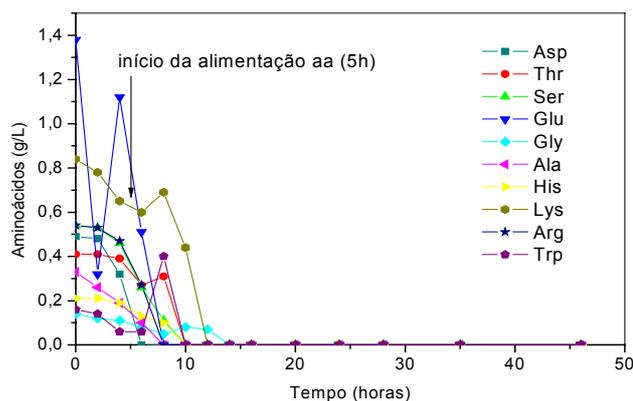


Figura 4.43: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 11).

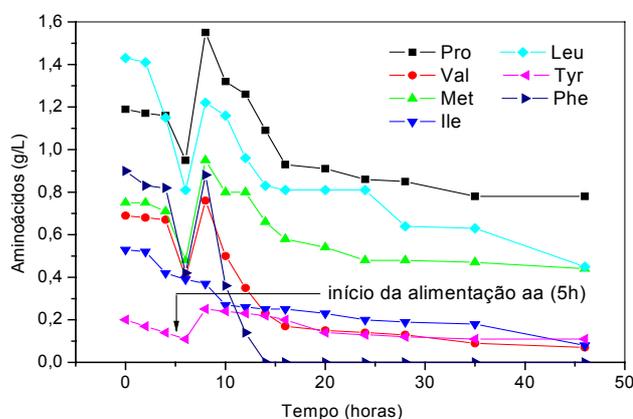


Figura 4.44: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 11).

Diferentemente dos ensaios 9 e 10, onde após a alimentação há acúmulo de alguns aminoácidos, este ensaio apresentou consumo total dos aminoácidos mais rapidamente consumidos (Figura 4.43). Este fato pode ser atribuído ao maior crescimento celular ocorrido neste experimento.

4.4.5 Ensaio 12

Os ensaios 6 e 7 da primeira etapa, com caseína hidrolisada, foram realizados com controle de pH, porém uma queda acentuada na atividade enzimática foi observada em ambos. Uma nova tentativa de controle de pH com o novo meio contendo aminoácidos foi realizada no ensaio 12.

A tendência de aumento de pH, associado ao consumo de peptídeos e aminoácidos, é um padrão de comportamento observado nos ensaios por causa da formação de amônia produzida durante a metabolização desses aminoácidos. Acreditou-se assim que este aumento poderia ser uma das causas da estagnação do crescimento celular e conseqüentemente da atividade enzimática. Assim, neste ensaio controlou-se o pH em 8 com HCl 5M. As demais condições foram as mesmas dos ensaios anteriores e estão resumidas na Tabela 4.50. Este ensaio foi um ensaio em batelada.

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% da saturação ao longo do cultivo |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Controlado em 8 |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 44 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

O ensaio teve uma duração de 44 horas, pois assim como os ensaios da primeira etapa com controle de pH, a atividade enzimática apresentou uma queda bem acentuada após 24 horas. O resultado das análises é mostrado na Tabela 4.51. Os gráficos das principais variáveis são mostrados na Figura 4.45. O resultado do ensaio em paralelo realizado em câmara rotativa é mostrado na Tabela 4.52.

Tabela 4.51: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (12^o ensaio).

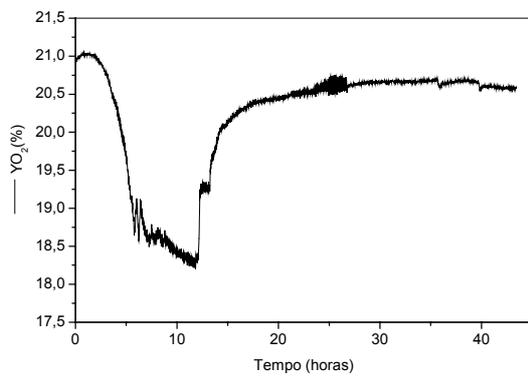
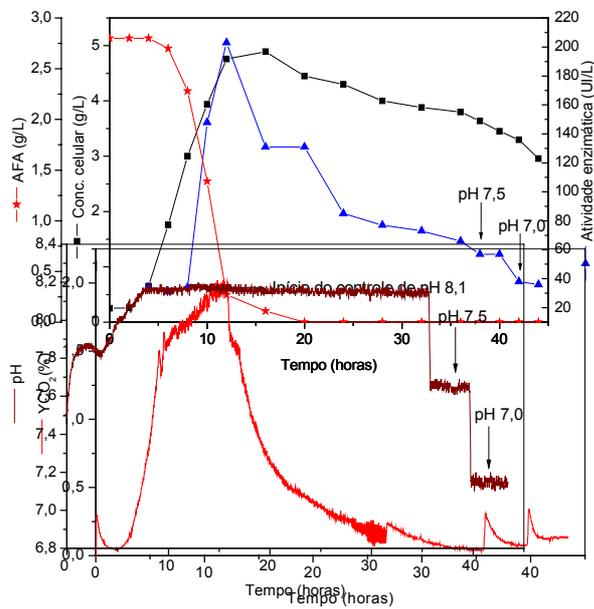
| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração celular (g/l) | Atividade enzimática (UI/l) | AA total (g/L) | AFA (g/l) |
|--------|---------------|----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------|
| 12 | Pré-inóculo | | 4,7 | | | |
| | Inóculo | | 3,4 | | | |

| | | | | | |
|----|------|------|-----|--|------|
| 0 | 7,5 | 0,25 | | | 2,8 |
| 2 | 7,9 | 0,6 | | | 2,8 |
| 4 | 7,8 | 0,65 | 34 | | 2,8 |
| 6 | 8,0 | 1,8 | 31 | | 2,7 |
| 8 | 8,2 | 3,9 | 34 | | 2,28 |
| 10 | 8,3 | 4,0 | 148 | | 1,39 |
| 12 | 8,3 | 4,7 | 203 | | 0,27 |
| 16 | 8,32 | 4,9 | 131 | | 0,11 |
| 20 | 8,2 | 4,5 | 131 | | 0 |
| 24 | 8,2 | 4,3 | 85 | | 0 |
| 28 | 8,3 | 4,0 | 77 | | 0 |
| 32 | 8,2 | 3,9 | 73 | | 0 |
| 36 | 8,2 | 3,8 | 66 | | - |
| 38 | 7,6 | 3,6 | 57 | | 0 |
| 40 | 7,6 | 3,5 | 57 | | 0 |
| 42 | 7,3 | 3,3 | 38 | | 0 |
| 44 | 7,2 | 2,9 | 36 | | 0 |

Tabela 4.52: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (12^o e 13^o ensaios).

| Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|-----------|-----|----------------------------|-----------------------------|
| inóculo | - | 3,4 | - |
| 0 | 7,9 | 0,2 | - |
| 24 | 8,5 | 3,3 | 193 |
| 36 | - | 3,2 | 201 |

Observa-se pela tabela e pela figura que a atividade enzimática atingiu seu máximo em 12 horas (203UI/L), antes dos ensaios anteriores, onde o máximo se deu em torno de 16 horas. Porém, com o controle de pH, observa-se uma queda gradativa na atividade com a continuidade do cultivo. O controle de pH foi iniciado em torno de 8 horas quando este atingiu o valor de pH 8. Como após as 36 horas a atividade já tinha decaído resolveu-se testar o controle do pH em 7,5 e após 40 horas em 7, apenas para verificar se ocorreriam mudanças significativas no cultivo. Provavelmente a adição local de ácido nas condições de baixa agitação após 15 horas de cultivo tenham desnaturado a PGA produzida pelo microrganismo ocasionando a queda acentuada da atividade enzimática, assim como ocorreu no ensaio 6. Figura 4.46 mostra o oxigênio dissolvido e a agitação para este ensaio.



(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 4.45: Resultados experimentais do décimo segundo ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e AFA (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO_2 nos gases de saída e (D) concentração de O_2 , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Observa-se que a agitação oscilou muito, apresentando um sinal bem ruidoso quando comparado aos demais. Conseqüentemente o oxigênio dissolvido também apresentou esta característica.

Neste ensaio, por problemas técnicos não foram realizadas análises da concentração dos aminoácidos.

O ensaio em paralelo realizado em câmara rotativa (Tabela 4.52) apresentou o mesmo nível de atividade do ensaio 12 sem levar em conta a queda que este teve após o controle do pH.

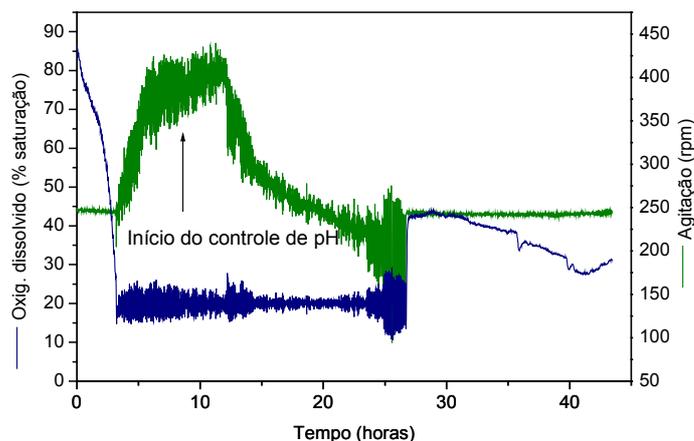


Figura 4.46: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 12).

4.4.6 Ensaio 13

O ensaio 13 foi uma batelada realizada sem o sistema de aquisição de dados, pois o sistema de aquisição estava sendo utilizado em outro ensaio paralelo. Os valores das variáveis foram anotados em intervalos regulares nos períodos de retirada das amostras.

Como a maioria dos ensaios realizados em frascos agitados apresentou atividades enzimáticas ou atividades específicas maiores, resolveu-se realizar ensaios em biorreator limitando o oxigênio dissolvido seguindo as condições de Visnard, 1997. A limitação do oxigênio dissolvido que ocorre naturalmente em câmara rotativa por causa da aeração superficial pode ser a causa dos maiores índices de atividade. O objetivo deste ensaio foi somente testar a limitação do oxigênio dissolvido no final da fase exponencial de crescimento do microrganismo, ou seja, após 12 horas de cultivo.

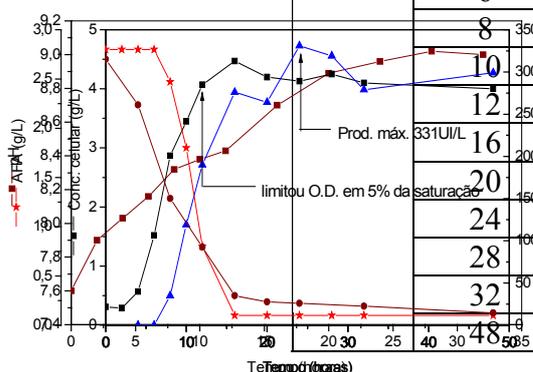
O resumo das condições adotadas é mostrado na Tabela 4.53 e o resultado das variáveis analisadas é mostrado na Tabela 4.54. Os gráficos das variáveis são mostrados na Figura 4.47. Como o ensaio 13 foi realizado quase que em paralelo com o ensaio 12, não foi possível usar os analisadores de gases, portanto para este ensaio não se tem o acompanhamento das variáveis Y_{CO_2} e Y_{O_2} . Por esse motivo também o ensaio realizado em paralelo foi o mesmo do ensaio 12.

| | |
|---------------------|--|
| aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% saturação e após 12h 5% da saturação |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 48 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

Observa-se pela tabela e pela figura que a atividade enzimática atingiu valores acima de 300UI/L, indicando assim que as condições limitadas de oxigênio dissolvido favoreceram a produção da enzima. Outra importante característica deste ensaio foi a manutenção desse valor até o final do cultivo, com pequena queda no valor da amostra de 32 horas, ainda que dentro da faixa de erro aceitável.

Tabela 4.54: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (13^o ensaio).

| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração celular (g/l) | Atividade enzimática (UI/l) | AA Total (g/L) | AFA (g/l) |
|--------|---------------|-----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------|
| 13 | Pré-inóculo | | 4,45 | | | |
| | Inóculo | | 3,8 | | | |
| | 0 | 7,6 | 0,3 | | 10,8 | 2,8 |
| | 2 | 7,9 | 0,3 | | | 2,8 |
| | 4 | 8,0 | 0,6 | 0 | 8,9 | 2,8 |
| | 6 | 8,2 | 1,5 | 0 | | 2,7 |
| | 8 | 8,3 | 2,9 | 35 | 5,2 | 2,47 |
| | 10 | 8,4 | 3,5 | 119 | | 1,8 |
| | 12 | 8,4 | 4,0 | 190 | 3,2 | 0,8 |
| | 16 | 8,7 | 4,5 | 276 | 1,2 | 0,1 |
| | 20 | 8,9 | 4,2 | 264 | 0,9 | 0,1 |
| | 24 | 8,9 | 4,1 | 331 | 0,89 | 0,1 |
| | 28 | 9,0 | 4,2 | 319 | | 0,1 |
| 32 | 9,0 | 4,1 | 279 | 0,77 | 0,1 | |
| 48 | | 3,6 | | 299 | 0,5 | 0,1 |



(A)

(B)

Figura 4.47: Resultados experimentais do décimo terceiro ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório) e (B) pH do meio reacional.

Os valores anotados de agitação e oxigênio dissolvido são mostrados na Figura 4.48. Apesar dos valores pontuais é possível observar a manutenção do oxigênio dissolvido em 20% até as 12 horas e a diminuição para 5% após esse período. Para as variáveis pH, agitação e oxigênio dissolvido não foram anotados os seus valores na amostra de 48 horas.

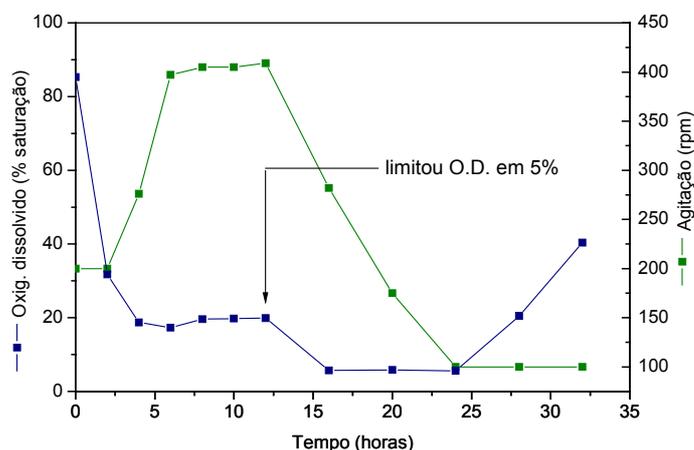


Figura 4.48: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 13).

Pela Figura 4.47-A observa-se o consumo do AFA e dos aminoácidos quase simultâneos, fato este já observado em ensaios anteriores. Observando os aminoácidos individualmente (Figuras 4.49 e 4.50), percebe-se que do grupo de aminoácidos mais rapidamente consumidos a histidina não é mais consumida após as 15 horas e a lisina apresenta um consumo mais lento. Foi adotado que os aminoácidos mais rapidamente consumidos representam os aminoácidos que são consumidos até as 10 horas de cultivo. Entre os consumidos após esse tempo estão os aminoácidos mais lentamente consumidos.

Observando a Figura 4.50 percebe-se que após 30 horas de cultivo quase todos os aminoácidos deste grupo foram consumidos.

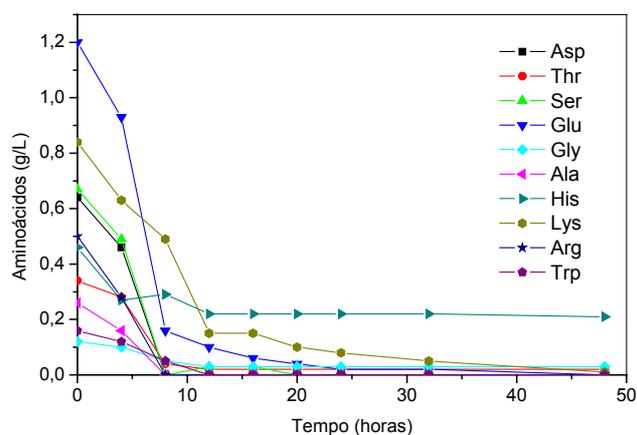


Figura 4.49: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 13).

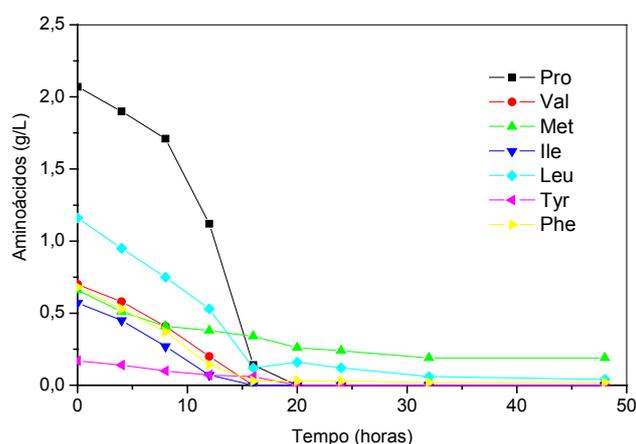


Figura 4.50: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 13).

4.4.7 Ensaio 14

Por causa do bom resultado obtido no ensaio 13, resolveu-se realizar outros dois ensaios em paralelo, mas desta vez não tendo controle de pH como ocorreu no ensaio 12. Assim como os ensaios 12 e 13, os ensaios 14 e 15 foram realizados praticamente em paralelo. Antes do término do primeiro, o segundo já havia sido iniciado. O ensaio em câmara rotativa realizado em paralelo serve para ambos, pois dos dois inóculos iniciados escolheu-se um para a realização do ensaio em paralelo. O resultado do ensaio em câmara rotativa é mostrado na Tabela 4.57.

O ensaio 14 foi portanto um ensaio batelada padrão e no ensaio 15 (que será discutido no próximo item) limitou-se o oxigênio dissolvido em 5% da saturação após 8

horas. As condições adotadas no ensaio 14 são mostradas na Tabela 4.55. O resultado das análises é mostrado na Tabela 4.56. A Figura 4.51 mostra o resultado gráfico da concentração celular, da atividade enzimática e o consumo dos substratos ao longo do cultivo, além das variáveis obtidas em linha com o sistema de aquisição de dados.

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% da saturação ao longo do cultivo |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 43 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

Observa-se com os resultados que a atividade permaneceu no mesmo nível do ensaio 8 (180UI/L) que foi operado no mesmo modo e da mesma maneira, com oxigênio dissolvido em 20% ao longo do cultivo e sem controle de pH. Neste a atividade apresenta uma queda em torno de 20 horas (Figura 4.51-A). A atividade obtida em câmara rotativa (150UI/L) ficou ligeiramente abaixo da obtida no fermentador.

O consumo do AFA e dos aminoácidos ocorre quase que simultaneamente chegando à exaustão no mesmo tempo, entre 15 e 20 horas.

O crescimento celular também permaneceu no mesmo nível de ensaio anteriores, com exceção do ensaio 11 onde foi alimentado soro de queijo que propiciou aumento de biomassa, porém sem reflexo na atividade enzimática.

Uma característica comum a praticamente todos os ensaios é a queda do CO₂ após um período (variável para cada ensaio) em um patamar máximo. Após um certo período dessa queda observa-se que a atividade enzimática atinge o seu valor máximo.

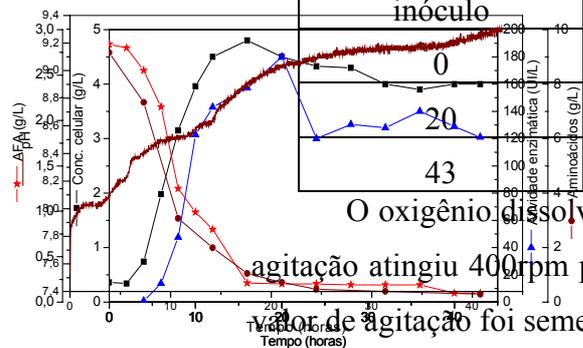
Tabela 4.56: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (14^o ensaio).

| Ensaio | Tempo | pH | Concentração | Atividade | AA Total | AFA |
|--------|-------|----|--------------|-----------|----------|-----|
|--------|-------|----|--------------|-----------|----------|-----|

| | (horas) | | celular (g/l) | enzimática (UI/l) | (g/L) | (g/l) |
|----|-----------------|-----|------------------|----------------------|-------|-------|
| 14 | Pré- inóculo | | | | | |
| | Inóculo | | | | | |
| | 0 | 7,5 | 0,36 | | 9,2 | 2,8 |
| | 2 | 7,8 | 0,34 | | | 2,8 |
| | 4 | 8,0 | 0,74 | 1 | 7,3 | 2,5 |
| | 6 | 8,1 | 2,0 | 14 | | 2,2 |
| | 8 | 8,4 | 3,2 | 48 | 3,1 | 1,2 |
| | 10 | 8,5 | 4,0 | 123 | | 1,0 |
| | 12 | 8,6 | 4,5 | 143 | 2,0 | 0,8 |
| | 16 | 8,8 | 4,8 | 157 | 1,0 | 0,2 |
| | 20 | 9,0 | 4,5 | 180 | 0,7 | 0,2 |
| | 24 | 9,1 | 4,3 | 120 | 0,5 | 0,2 |
| | 28 | 9,2 | 4,3 | 130 | | 0,19 |
| | 32 | 9,2 | 4,0 | 128 | 0,4 | 0,19 |
| | 36 | 9,2 | 4,0 | 140 | | 0,19 |
| | 40 | 9,2 | 4,0 | 129 | | 0,1 |
| 43 | 9,3 | 4,0 | 121 | 0,3 | 0,1 | |

Tabela 4.57: Resultados obtidos na produção de PGA em câmara rotativa (14^o e 15^o ensaios).

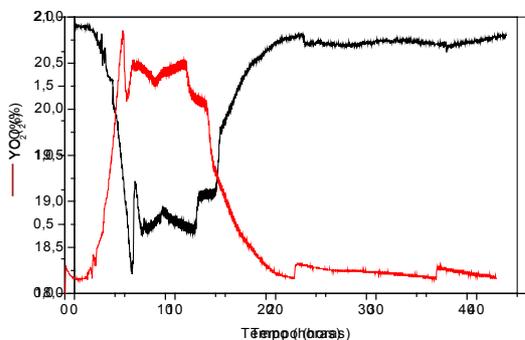
| Tempo (h) | pH | Concentração celular (g/L) | Atividade enzimática (UI/L) |
|-----------|----|----------------------------|-----------------------------|
| inóculo | - | - | - |
| 0 | - | 0,2 | - |
| 20 | - | 3,7 | 121 |
| 43 | - | 4,6 | 150 |



O oxigênio dissolvido e a agitação são mostrados na Figura 4.52. Observe que a agitação atingiu 400rpm para manter o oxigênio dissolvido em 20% da saturação. Este valor de agitação foi semelhante aos demais ensaios.

(A)

(B)



(C)

(D)

Figura 4.51: Resultados experimentais do décimo quarto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório); (B) pH do meio reacional; (C) concentração de CO₂ nos gases de saída e (D) concentração de O₂, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

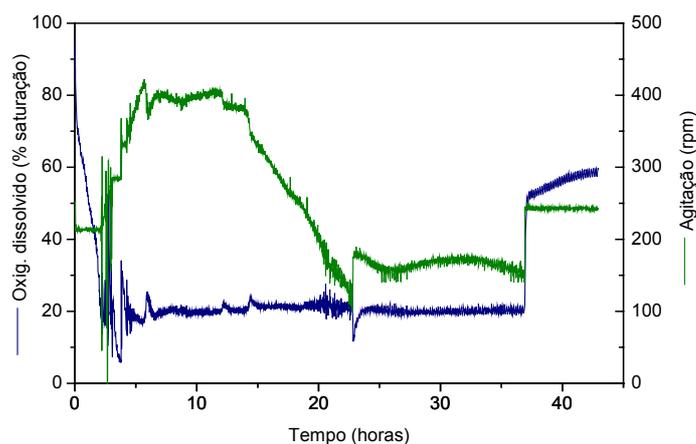


Figura 4.52: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 14).

O consumo dos aminoácidos é semelhante ao ensaio anterior. Entre os mais rapidamente consumidos (Figura 4.53), a histidina e a lisina apresentaram um consumo mais lento. Porém foram mantidos neste grupo pois nos ensaios anteriores observa-se claramente o consumo desses aminoácidos antes das 10 horas de cultivo. Além disso, no modelo proposto, que será descrito após os dados experimentais, foi necessário padronizar os dois grupos de aminoácidos.

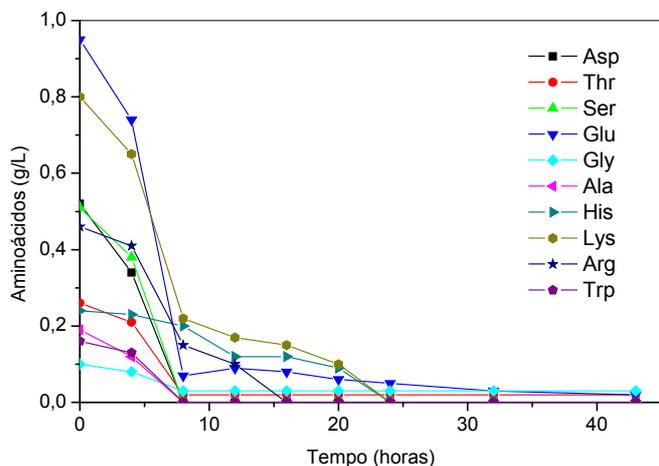


Figura 4.53: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 14).

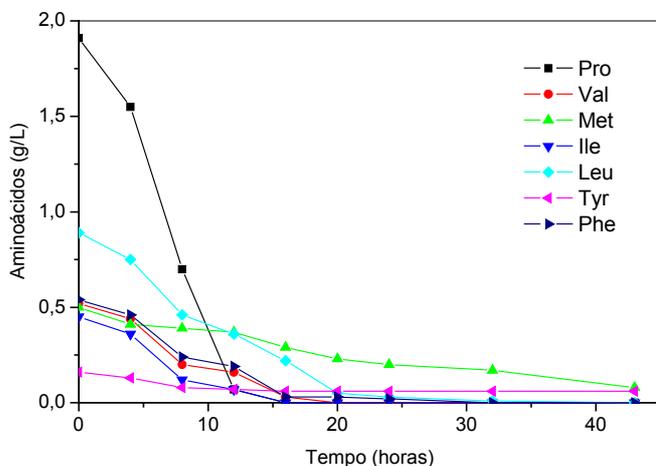


Figura 4.54: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 14).

4.4.8 Ensaio 15

O ensaio 15 foi realizado na tentativa de se reproduzir os resultados do ensaio 13, que teve a maior atividade enzimática (331UI/L). A diferença entre eles estava no momento da redução do oxigênio dissolvido de 20% para 5% da saturação. No ensaio 13 essa redução ocorreu após o término da fase exponencial (12 horas de cultivo). No ensaio 15 optou-se por antecipar a diminuição do oxigênio dissolvido para 8 horas, anterior ao término da fase exponencial.

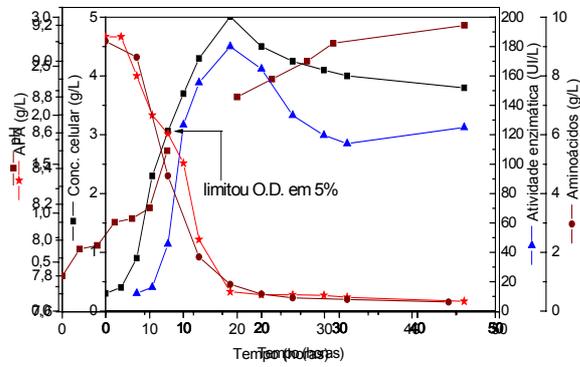
Assim como no ensaio 13, esse foi realizado sem o sistema de aquisição de dados que estava sendo utilizado no ensaio 14. Assim, não se tem o acompanhamento da fração molar dos gases de saída, YO_2 e YCO_2 . As condições adotadas são mostradas na Tabela 4.58. O ensaio teve duração de 46 horas, pois após 20 horas este já apresentava uma razoável queda na atividade. O resultado das amostras é mostrado na Tabela 4.59. A Figura 4.55 mostra gráficos da atividade enzimática, da concentração de células, do consumo de AFA e dos aminoácidos. Os valores de pH anotados a cada retirada de amostra são mostrados na Figura 4.55-B.

| | |
|---------------------|--|
| aeração | 2L/min ao longo do cultivo |
| Temperatura | 30°C |
| Oxigênio dissolvido | 20% saturação e após 8h 5%da saturação |
| Adição de AFA | Adicionado no início |
| pH | Sem controle |
| Volume | 4,0L de meio e 0,45 de inóculo |
| Duração | 46 horas |
| CaCO ₃ | Ausente |

Comparando o ensaio 14 (Tabela 4.56), com oxigênio dissolvido em 20% da saturação ao longo do cultivo, com o ensaio 15 (tabela 4.59), que teve uma limitação de oxigênio dissolvido após 8 horas, percebe-se que há pouca diferença nos resultados experimentais, principalmente no valor da atividade enzimática. Esperava-se que esse ensaio apresentasse resultados iguais ou superiores aos do ensaio 13, porém não se obteve valores de atividades superiores a 180UI/L, talvez em razão da inativação do microrganismo.

Tabela 4.59: Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator com meio contendo aminoácidos (15º ensaio).

| Ensaio | Tempo (horas) | pH | Concentração celular (g/l) | Atividade enzimática (UI/l) | AA Total (g/L) | AFA (g/l) |
|--------|---------------|-----|----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------|
| 15 | Pré-inóculo | 8,3 | | | | |
| | Inóculo | 8,7 | | | | |
| | 0 | 7,8 | 0,3 | | 9,2 | 2,8 |
| | 2 | 8,0 | 0,4 | | | 2,8 |
| | 4 | 8,0 | 0,9 | 12 | 8,6 | 2,4 |
| | 6 | 8,1 | 2,3 | 16 | | 2,0 |
| | 8 | 8,1 | 3,0 | 46 | 4,6 | 1,8 |
| | 10 | 8,2 | 3,7 | 127 | | 1,5 |
| | 12 | 8,5 | 4,3 | 156 | 1,84 | 0,7 |
| | 16 | - | 5,0 | 180 | 0,9 | 0,2 |
| | 20 | 8,8 | 4,5 | 165 | 0,58 | 0,17 |
| | 24 | 8,9 | 4,3 | 133 | 0,45 | 0,17 |
| | 28 | 9,0 | 4,1 | 120 | | 0,16 |
| | 31 | 9,1 | 4,0 | 114 | 0,4 | 0,14 |
| 46 | 9,2 | 3,8 | 125 | 0,3 | 2,8 | |



(A)

(B)

Figura 4.55: Resultados experimentais do décimo quinto ensaio realizado em fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática, AFA e aa total (obtidas em análises de laboratório). (B) pH do meio reacional.

Os valores anotados de agitação e oxigênio dissolvido são mostrados na Figura 4.56. Na figura está assinalado o momento da redução do oxigênio dissolvido. O espaço em branco na figura refere-se à ausência dos valores da amostra de 16 horas. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, observa-se que a agitação aumenta gradativamente até atingir 400rpm. Este momento representa a fase de crescimento exponencial. Embora representada por valores anotados, observa-se pela figura que a agitação ficou pouco tempo no seu valor máximo, sendo logo diminuída para manter o oxigênio dissolvido em 5% da saturação. A limitação do oxigênio dissolvido antes do término da fase exponencial pode ter prejudicado a produção da enzima.

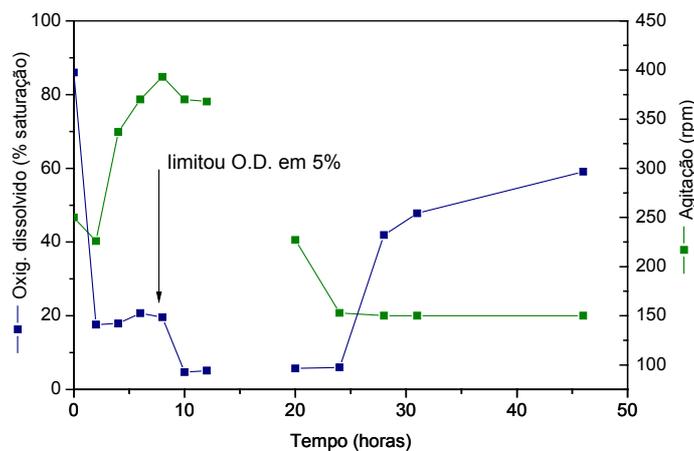


Figura 4.56: Oxigênio dissolvido e agitação (ensaio 15).

As concentrações dos aminoácidos ao longo do tempo são mostradas nas Figuras 4.57 e 4.58. Neste ensaio a lisina foi totalmente consumida até as 10 horas de cultivo e a histidina foi totalmente consumida nas primeiras 15 horas. É importante lembrar que embora o método de análise das concentrações dos aminoácidos em HPLC tenha grande precisão, estes são utilizados em baixas concentrações e podem ocorrer erros nas diluições das amostras. Portanto, essas diferenças observadas entre um ensaio e outro são perfeitamente aceitáveis.

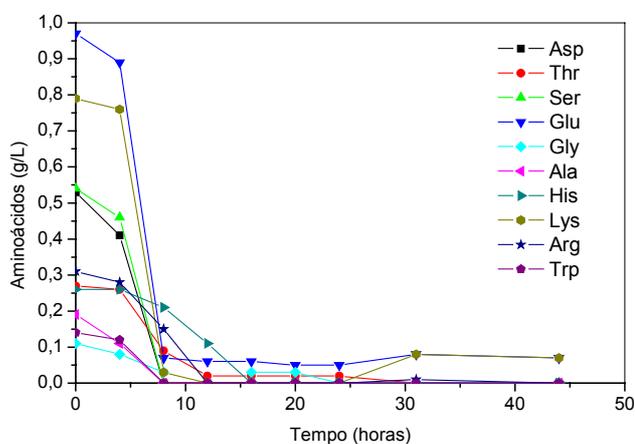


Figura 4.57: Aminoácidos mais rapidamente consumidos (ensaio 15).

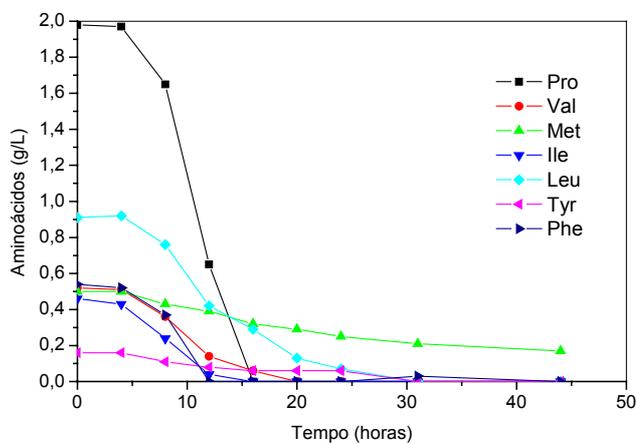


Figura 4.58: Aminoácidos mais lentamente consumidos (ensaio 15).

Foi realizado um último ensaio no biorreator, baseado no ensaio 11 (batelada alimentada com soro e aminoácidos). A diferença estava no soro de queijo, que desta vez foi ultrafiltrado. Além disso, a alimentação com soro e aminoácidos iniciou-se ao mesmo tempo (5 horas de cultivo). Os resultados deste ensaio ficaram bem abaixo do esperado e portanto não serão mostrados.

4.5 Considerações Finais Sobre o Capítulo

4.5.1 Ensaio da Primeira Etapa

Todos os ensaios realizados em câmara rotativa e em biorreator na primeira etapa deram informações importantes sobre o processo de produção de PGA como um todo. Mesmo com as mudanças previstas para os meios de cultivo, os resultados obtidos desses ensaios foram de grande valia para a programação dos que se seguiram. Entre as principais constatações estão:

- A estocagem do microrganismo em criotubos é uma boa maneira de preservação, uma vez que todos os ensaios realizados após a padronização vêm mantendo os mesmos níveis de atividade enzimática. A ordem de grandeza da variação está dentro da margem esperada de desvio entre diferentes cultivos.
- A redução do ensaio de 72 horas para 24 horas não afetou os valores de atividade enzimática na etapa de produção, permitindo assim otimizar o tempo total de cultivo.
- Um maior número de esporos no meio de germinação não implica aumento na concentração de células e nem de atividade no final do ensaio. Para simplificar os procedimentos experimentais, optou-se pela relação de 3mL de esporos/75 mL de meio, pois 3mL é o volume de esporos contidos em cada criotubo.
- A maior produção de enzima foi obtida na presença de soro de queijo, que provavelmente contém algum(s) micronutriente(s) essencial(is) para o microrganismo. Na presença deste observa-se que o consumo de lactose é praticamente nulo, porém com maior germinação de esporos e produção de enzima. Já na sua ausência, observa-se menor germinação e produção.
- A adição de sais, tanto no meio de germinação como no de produção, contribuiu para um melhor crescimento celular e produção da enzima.

- A adição de ácido fenilacético (AFA) no início da etapa de produção não inibiu o crescimento celular.
- Glicose e glicerol, testados como fonte de carbono, foram consumidos preferencialmente pelo *B. megaterium*. Houve aumento da biomassa presente, mas não se observou produção significativa de enzima durante o consumo destes e nem a posteriori.
- Até o ponto em que foram realizados estes ensaios acreditava-se que a fonte de nitrogênio complexa (caseína hidrolisada enzimaticamente por Alcalase®) era melhor tanto para germinação como para crescimento do microrganismo, pois nos ensaios utilizando a fonte sintética (aminoácidos) não ocorreu a germinação dos esporos. Sendo assim, aparentemente o microrganismo requeria peptídeos ao invés de aminoácidos livres para germinar e, posteriormente, expressar PGA. Porém o que veio a se notar depois era que a concentração de aminoácidos utilizada nos meios era muito alta e estava inibindo o crescimento do microrganismo. Os resultados dos ensaios com aminoácidos constituíram a segunda parte deste capítulo.

Um quadro geral dos ensaios da primeira etapa é mostrado na Tabela 4.60.

Os dois primeiros ensaios em biorreator foram realizados sem a presença de sais minerais. A possível contaminação do ensaio 2 deixa dúvidas acerca dos seus valores, mostrados na Tabela 4.60.

Pode-se observar pelos valores da tabela que a atividade enzimática máxima atingida em cada ensaio permaneceu na mesma ordem de grandeza, não ultrapassando 100UI/L. A média da concentração celular dos ensaios 3 a 7 foi de 8,2g/L e da atividade específica foi em torno de 10 UI/L⁻¹g⁻¹_{células}.

Os valores de μ_{\max} encontrados para estes ensaios estão bem abaixo dos encontrados na literatura para bactérias. Por exemplo, os valores de μ_{\max} para *Escherichia coli* crescendo a 37°C em diferentes substratos limitantes tais como glicose, glicerol e lactose variam de 0,8 a 1,4 (Blanch e Clark, 1997).

Pela tabela observa-se que os valores de μ_{\max} para o *Bacillus megaterium* crescendo em meio complexo composto principalmente de caseína hidrolisada e soro de queijo não ultrapassaram 0,35h⁻¹. Ressalte-se que, nesses ensaios, a fonte principal de carbono são os peptídeos gerados pela hidrólise enzimática de caseína. Não é de se

estranhar, portanto, que a velocidade específica máxima seja menor que a média para bactérias crescendo com fontes facilmente metabolizáveis, como glicose ou glicerol.

Tabela 4.60: Resumo dos ensaios realizados em biorreator – Primeira etapa.

| Ensaio | Meio | Características | Modo de Operação | C _p (max) (UI/L) | C _x (max) (g/L) | Atividade específica (UI/g) | μ _{max} (h ⁻¹) | Produtividade (UI/Lh) |
|--------|--|--|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------|
| 1 | Caseína Soro CaCO ₃ AFA | - OD em 20% (no início) e 10% (após 12h). | batelada | 59 | 1,9 | 33,7 | 0,20 | 0,6 |
| 2 | Caseína Soro CaCO ₃ AFA | - OD em 20% (no início) e 10% após a adição de AFA (8h). | batelada | 78 | 6,8 | 11,6 | 0,30 | 2,7 |
| 3 | Caseína Soro Sais (2x) CaCO ₃ AFA | - Sem controle de OD no início, 20% (após 10h) e 10% (após 15h). | batelada | 64 | 7,2 | 10,0 | 0,20 | 1,45 |
| 4 | Caseína Soro Sais (2x) CaCO ₃ AFA | - OD em 20% (no início) e 10% (após 10h). | batelada | 56 | 8,5 | 7,4 | 0,35 | 1,8 |
| 5 | Caseína Soro Sais (2x) CaCO ₃ AFA | - OD em 20% (desde o início). | batelada alimentada com AFA | 57 | 7,8 | 7,2 | 0,35 | 2,4 |
| 6 | Caseína Soro Sais (2x) AFA | - Agitação fixa (em torno de 550rpm) por problemas no eletrodo de OD. - Controle de pH em 8. Após 32h o | batelada (controle de pH) | 95 | 8,8 | 13,9 | 0,20 | 6,8 |

| | | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|--|------------------------------|----|-----|-----|------|-----|
| | | pH foi controlado em 7,5-7,6. | | | | | | |
| 7 | Caseína Soro Sais (2x) AFA | - Agitação fixa (início 450rpm e após 12h 600rpm) para tentar reproduzir as condições do ensaio 6. - Controle de pH em 8 até o final. | batelada (controle de pH) | 70 | 9,0 | 9,8 | 0,20 | 5,0 |

Uma comparação dos resultados obtidos para concentração celular, atividade enzimática e evolução do pH dos ensaios 3-7 são mostrados nas Figuras 4.59, 4.60 e 4.61.

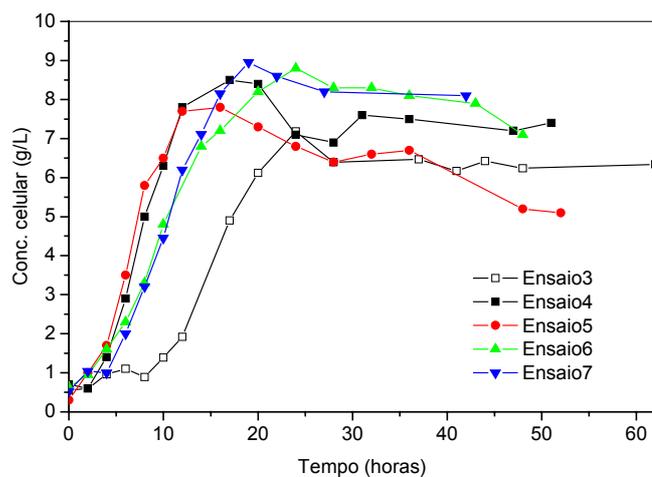


Figura 4.59: Concentração celular de todos os ensaios em biorreator na primeira etapa.

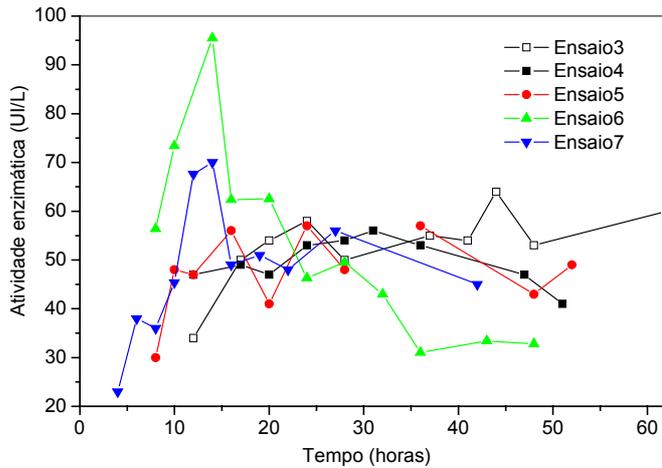


Figura 4.60: Atividade enzimática de todos os ensaios em biorreator na primeira etapa.

Pode se observar que os maiores valores de concentração celular e atividade enzimática foram obtidos nos ensaios 6 e 7, embora nestes a atividade enzimática tenha apresentado uma queda significativa após aproximadamente 16 horas de cultivo. A evolução do pH é mostrada na Figura 4.30.

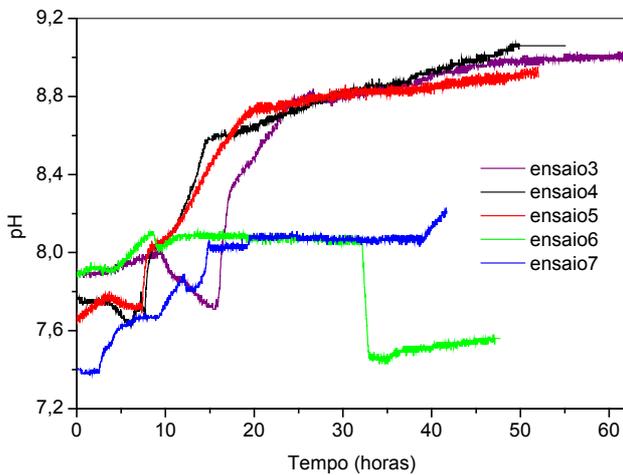


Figura 4.61: Evolução do PH de todos os ensaios em biorreator.

4.5.2 Ensaios da Segunda Etapa

A mudança nos meios de germinação e produção, com a substituição da caseína hidrolisada enzimaticamente, que contém preferencialmente peptídeos, por aminoácidos livres, elevou a atividade enzimática mesmo com menor crescimento celular e conseqüentemente aumentou a atividade específica, como pode ser observado pela Tabela 4.61.

Em todos os ensaios realizados na segunda etapa, os resultados foram melhores que os da primeira etapa, como pode ser observado pelos valores de C_p , C_x , μ_{max} , atividade específica e produtividade nas Tabelas 4.60 e Tabela 4.61.

Os ensaios realizados nesta etapa nos mostraram que o crescimento do microrganismo consumindo uma solução de aminoácidos de 10g/L (ao invés do hidrolisado enzimático de caseína) na presença de soro de queijo, sais e AFA levava a atividades enzimáticas em torno de 200UI/L, nível nunca antes atingido. Os aminoácidos, por serem moléculas mais simples, são mais facilmente assimiláveis e metabolizáveis.

Tabela 4.61: Resumo dos ensaios realizados em biorreator – segunda etapa.

| Ensaio | Meio | Características | Modo de Operação | C_p (max) (UI/L) | C_x (max) (g/L) | Atividade específica (UI/g) | μ_{max} (h ⁻¹) | Produtividade (UI/Lh) |
|--------|--|----------------------------------|---|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 8 | AA (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | - OD em 20% (desde o início). | batelada | 175 | 4,3 | 40,7 | 0,60 | 13,5 |
| 9 | AA (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | - OD em 20% (desde o início). | Batelada alimentada com aminoácidos (8h) | 207 | 4,2 | 53,0 | 0,56 | 13,0 |
| 10 | AA (10g/L) Soro Sais (4x) AFA | - OD em 20% (desde o início). | Batelada alimentada com aminoácidos (5h) | 191 | 3,9 | 53,0 | 0,48 | 12 |
| 11 | AA (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | - OD em 20% (desde o início). | Batelada alimentada com aminoácidos (5h) e soro (8h) | 215 | 6,0 | 37,0 | 0,44 | 11 |
| 12 | AA | - OD em 20% (desde o início) | batelada (controle de pH) | 203 | 4,9 | 43,0 | 0,57 | 16,9 |

| | | | | | | | | |
|----|--|---|------------------|-----|-----|------|------|------|
| | (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | (desde o início). - Controle de pH em 8. Após 36h em 7,5 e após 40h em 7. | (controle de pH) | | | | | |
| 13 | AA (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | - Sem aquisição de dados - OD em 20% (no início) e 5% após 12 horas. | batelada | 331 | 4,5 | 80,7 | 0,55 | 13,8 |
| 14 | AA (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | - OD em 20% (desde o início). | batelada | 180 | 4,8 | 40,0 | 0,57 | 6,0 |
| 15 | AA (10g/L) Soro Sais (2x) AFA | - Sem aquisição de dados - OD em 20% (no início) e 5% após 8 horas. | batelada | 180 | 5,0 | 36,0 | 0,46 | 11,2 |

Uma comparação das concentrações celulares obtidas em cada ensaio é mostrada na Figura 4.62.

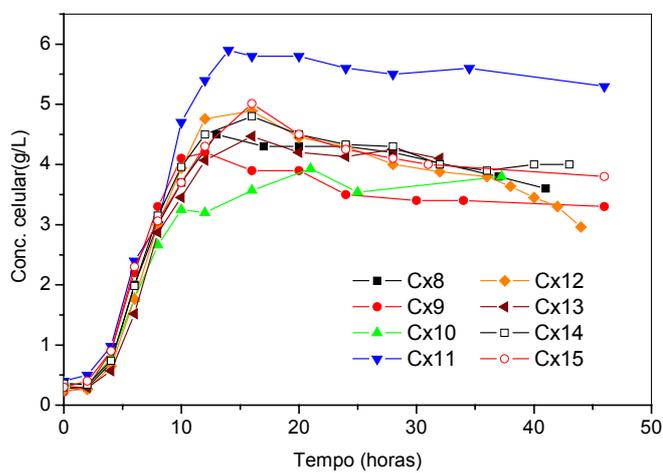


Figura 4.62: Concentração celular de todos os ensaios em biorreator na segunda etapa.

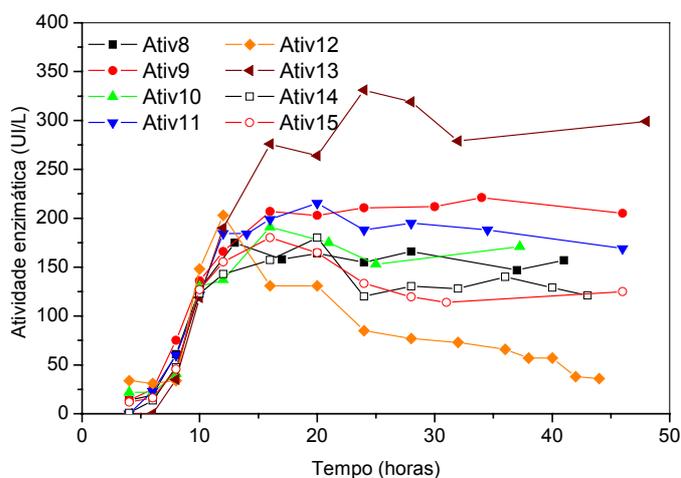


Figura 4.63: Atividade enzimática de todos os ensaios em biorreator na segunda etapa.

Pode-se observar que as concentrações celulares, com exceção do ensaio 11, apresentaram resultados bem semelhantes com valores na faixa de 3,5g/L a 4,5g/L. Embora estes estejam abaixo dos valores dos ensaios realizados na primeira etapa, a atividade específica atingida ($UI\ L^{-1}g^{-1}_{células}$) foi maior, pois apesar dos baixos valores de concentrações celulares, as atividades enzimáticas foram maiores. A produtividade também atingiu níveis consistentemente maiores.

Na primeira etapa, as concentrações celulares apresentaram valores entre 7g/L e 9g/L. Apesar de maiores não foram acompanhados de aumentos na atividade enzimática. Provavelmente com meio contendo caseína hidrolisada, composta principalmente de peptídeos, o microrganismo precise ativar outro mecanismo para a hidrólise desses peptídeos em aminoácidos, dificultando assim a expressão da PGA.

Os valores de μ_{max} obtidos nos ensaios da segunda etapa foram maiores que os anteriores, chegando mais próximos aos valores para bactérias citados na literatura. Pela Tabela 4.61 observa-se que os valores de μ_{max} para o *Bacillus megaterium* crescendo em meio semi-sintético composto principalmente por aminoácidos e soro de queijo alcançaram $0,60h^{-1}$, contra $0,35h^{-1}$ (no máximo) para os ensaios com CHE. Aminoácidos são, assim, metabolizados mais rapidamente que os peptídeos provenientes da caseína.

Com relação às atividades enzimáticas, os valores alcançados já não foram tão uniformes. Variações significativas foram obtidas entre um ensaio e outro quando se leva em conta somente esta variável. Porém, se analisarmos os valores das produtividades (Tabela 4.64) em cada ensaio percebemos que estes se mantiveram na faixa de 11UI/Lh a 13UI/Lh, apresentando apenas dois extremos para os ensaios 12 (16,9UI/Lh) e 14 (6UI/Lh).

A variável pH (Figura 4.64) também apresenta comportamento semelhante em todos os ensaios, com exceção do ensaio 12, que teve o pH do meio controlado em 8.

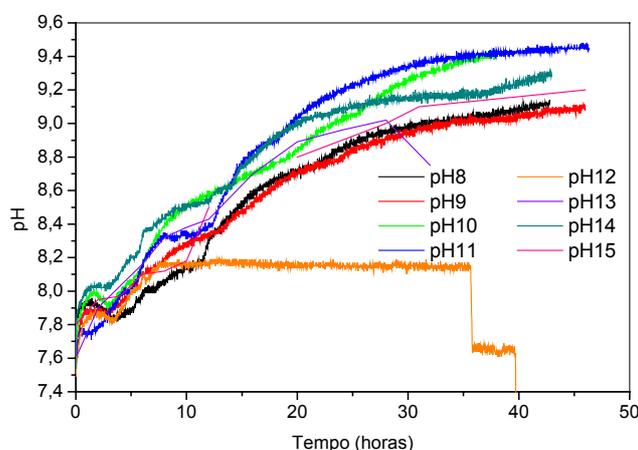


Figura 4.64: pH de todos os ensaios em biorreator na segunda etapa.

5. Modelo Cinético do cultivo de *Bacillus megaterium* para produção de PGA

Modelos não-estruturados mais simples e conhecidos, como o clássico modelo de Monod, propõem uma relação entre a velocidade específica de crescimento celular e a concentração de um substrato limitante. Esse modelo e suas variantes são eficazes para descrever o crescimento do microrganismo como função de um substrato simples. Entretanto há muitas situações em que múltiplos substratos simultaneamente limitam a velocidade de crescimento (Blanch e Clark, 1997).

Um candidato natural a substrato limitante é a fonte de carbono. Entretanto, no caso específico do *Bacillus megaterium* este problema revelou-se mais complexo. Três substratos foram testados para esse fim: glicose, lactose e glicerol. Como indicam os resultados apresentados anteriormente, culturas na presença de glicose e glicerol proporcionaram crescimento da biomassa um pouco maior do que aquele observado na

ausência desses substratos, sem que se observasse aumento na produção da enzima – ao contrário, a produtividade se reduzia. O consumo de lactose, por sua vez, mostrou-se insignificante, como pôde ser observado nos resultados experimentais, já reportados, obtidos em câmara rotativa e em biorreator. Desta forma, os experimentos realizados nos deram a indicação de que o microrganismo utiliza outro(s) nutriente(s) como fonte de carbono e que provavelmente a exaustão deste(s) limita o crescimento celular.

Como nos estudos dos requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium* não se obteve sucesso utilizando meio sintético, que tem composição química bem definida, torna-se mais difícil estudar os efeitos de alguns componentes no meio, com o acompanhamento de possíveis substratos limitantes, dificultando-se assim a modelagem da cinética do processo.

Após a mudança dos meios da primeira para a segunda etapa, passou-se a acompanhar as concentrações de todos os aminoácidos e do AFA ao longo do cultivo. Constatou-se que estes estavam sendo utilizados como fonte de carbono pelo microrganismo. Estas suposições foram sendo fortalecidas à medida que se analisava o consumo dos aminoácidos e do AFA a cada ensaio. Como pode se notar dos ensaios em biorreator descritos anteriormente observa-se que o consumo de alguns aminoácidos preferenciais e do AFA se dá nas primeiras quinze horas de cultivo, enquanto que outro grupo de aminoácidos é metabolizado mais lentamente.

A previsão da concentração celular e da concentração de produto através de um modelo matemático é uma tarefa difícil, em especial quando o meio de fermentação contém algum(s) elemento(s) complexo(s) – como é o caso aqui, com a presença de soro de queijo. Este(s) elemento(s) contém uma grande variedade de micronutrientes na sua composição que influenciam no metabolismo celular.

O modelo aqui proposto para a o crescimento de *Bacillus megaterium*, consumo de substrato(s) e formação de PGA foi baseado nas seguintes constatações obtidas principalmente na segunda etapa:

- A produção da PGA está associada ao crescimento do microrganismo. O valor máximo de enzima coincide, com pequeno atraso, com a máxima concentração celular. Assim, é crucial modelar a fase de crescimento com precisão;
- O consumo de AFA e dos aminoácidos preferenciais ocorre quase simultaneamente. Há um grupo de aminoácidos consumidos mais lentamente;

- Considerando-se os quatro ensaios em batelada que foram utilizados para a formulação do modelo, a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{\max}) foi em média $0,55\text{h}^{-1}$, determinada a partir da linearização da curva de crescimento exponencial, $\ln(C_x/C_{x0}) = \mu_{\max} * t$ (com desvio-padrão entre ensaios de $6,0 \times 10^{-2}$); o rendimento de biomassa em relação ao substrato ($Y_{X/S}$) foi em média $0,35\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ (d.p. $5,1 \times 10^{-2}$) e a atividade específica máxima foi em média $49,4\text{UIL}^{-1}\text{g}^{-1}$ (d.p. 21,0).

A velocidade máxima específica de crescimento celular (μ_{\max}) obtida por linearização foi usada para inicializar o método de regressão não-linear de Marquardt. Os valores de μ_{\max} e de $Y_{X/S}$ usados na inicialização do algoritmo de Marquardt foram as médias dos obtidos experimentalmente. Foram considerados para ajuste os pontos experimentais da fase exponencial.

Para os testes dos modelos propostos foram utilizados quatro experimentos da segunda etapa. Os ensaios escolhidos foram os aqueles realizados no modo batelada, a saber: ensaios 8, 13, 14 e 15.

Levando-se em conta a presença de um ou mais substrato(s) limitante(s), foram propostos três modelos para descrever o crescimento do *Bacillus megaterium*:

Proposta 1: O AFA, somado à concentração de aminoácidos totais, representando apenas um substrato limitante.

Proposta 2: Os aminoácidos totais e o AFA foram separados, como dois substratos limitantes.

Proposta 3: Os aminoácidos mais rapidamente consumidos (aa+), os aminoácidos mais lentamente consumidos (aa-) e o AFA eram três substratos limitantes distintos.

Propõe-se que o crescimento celular e o consumo de substrato sigam a cinética de crescimento de Monod, para múltiplos substratos, na forma aditiva, pois o crescimento continua mesmo quando o AFA ou algum grupo de aminoácidos se esgota, o que não poderia ocorrer se a cinética multiplicativa fosse escolhida (Blanch e Clark, 1997):

$$\frac{dC_X}{dt} = \sum_{i=1}^{n^o S} \left(\frac{\mu_{\max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X \quad (5.1)$$

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_i}} \left(\frac{\mu_{\max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X \quad (5.2)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \sum_{i=1}^{n^o S} \left(\frac{\mu_{\max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X \quad (5.3)$$

- onde: C_X : concentração de células (g/L)
 S_i : concentração do substrato i (g/L)
 P : concentração de produto (g/L)
 $\mu_{\max i}$: velocidade máxima específica de crescimento celular nos respectivos substratos (h^{-1})
 K_i : constante de Monod do substrato i (g/L)
 Y_{X/S_i} : fator pseudo-estequiométrico (ou de rendimento) de células em relação ao substrato i ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{substrato } i}$)
 $Y_{X/P}$: fator pseudo-estequiométrico células-produto ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{produto}}$)

Os valores dos parâmetros cinéticos do modelo foram ajustados por regressão não linear utilizando o algoritmo de Marquardt (Himmelblau, 1970). Em cada caso foram utilizados três ensaios para o ajuste e um para validação. O parâmetro referente ao produto ($Y_{X/P}$) foi estimado em separado. Os parâmetros referentes à concentração de células e de substratos foram estimados com base nos respectivos perfis experimentais e, de posse deles, ajustava-se $Y_{X/P}$ com base na curva de atividade enzimática.

5.1 Primeira Proposta

Na primeira proposta as velocidades de crescimento celular e consumo de substrato no meio foram representadas considerando-se a presença de apenas um substrato. Este substrato limitante único era constituído pelos aminoácidos agrupados ao AFA (e denominado aaAFA).

Segundo Monod, com apenas um substrato, tem-se:

$$\frac{dC_x}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max} \cdot S}{K + S} \right) \cdot C_x \quad (5.4)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{\mu_{\max} S}{K + S} \right) \cdot C_x \quad (5.5)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \left(\frac{\mu_{\max} S}{K + S} \right) \cdot C_x \quad (5.6)$$

- onde: C_x : concentração de células (g/L)
 S : concentração de substrato (AFA + aminoácidos, aaAFA) (g/L)
 P : concentração de produto (PGA) (g/L)
 μ_{\max} : velocidade máxima específica de crescimento celular em aaAFA (h^{-1})
 K : constante de Monod do substrato limitante único (g/L)
 $Y_{X/S}$: fator pseudo-estequiométrico célula-substrato ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
 $Y_{X/P}$: fator pseudo-estequiométrico células-produto ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{produto}}$)

Os parâmetros cinéticos do modelo foram estimados utilizando dados dos experimentos 8, 13 e 14 e validados com os dados do quarto ensaio 15. A Tabela 5.1 apresenta os valores dos parâmetros estimados pelo algoritmo, com intervalo de confiança de 95%. A Figura 5.1 mostra os resultados do ajuste.

Observa-se que, mesmo sendo uma grande simplificação, o modelo consegue descrever qualitativamente o processo, inclusive para o ensaio de validação (Figura 5.1-D). Com relação à formação de produto, o modelo se afasta dos dados experimentais após 16 horas, quando a atividade enzimática apresenta uma queda acentuada. O modelo não consegue acompanhar essa queda, já que neste não foi incluída cinética de hidrólise ou de inativação da PGA. No entanto, em um processo industrial, a corrida teria sido interrompida antes dessa fase. Ressalte-se que foi introduzido um atraso de 2 h para o início da produção, como se observa na Figura 5.1.

Tabela 5.1: Parâmetros estimados (95% de intervalo de confiança) para a primeira proposta de modelo.

| | Parâmetros | Valores |
|--|------------|---------|
|--|------------|---------|

| | | |
|---|----------------------------------|-------------------------------|
| Velocidade máxima específica de crescimento | μ_{\max} (h^{-1}) | $0,46 \pm 0,2$ |
| Constante de saturação | K | $9,00 \pm 6,0$ |
| Rendimento célula substrato | $Y_{X/S}$ | $0,34 \pm 2,0 \times 10^{-2}$ |
| Rendimento célula produto | $Y_{X/P}^*$ | $0,02 \pm 1,0 \times 10^{-3}$ |

* Estimado separadamente, com base apenas na curva de atividade enzimática, após o ajuste dos demais parâmetros.

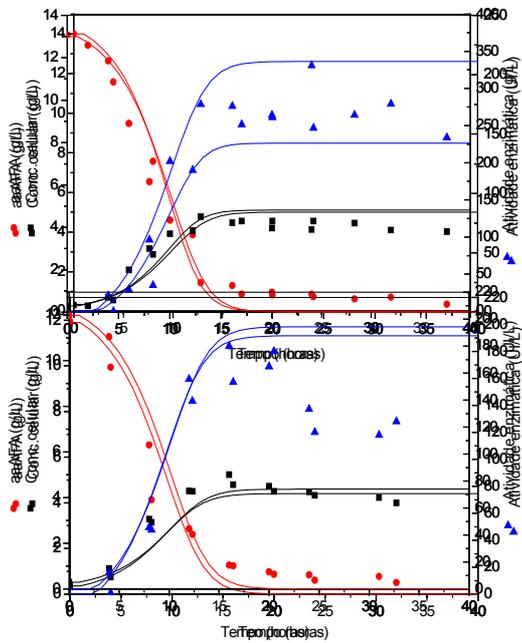
O modelo sistematicamente prevê o esgotamento do substrato, o que de fato não ocorre. Essa é uma limitação inerente a esta proposta, pois todos os aminoácidos foram agrupados no mesmo substrato aaAFA, quando se sabe que há dois grupos com dinâmica de consumo bem distinta. A concentração de células, por sua vez, é subestimada na fase de crescimento exponencial, em todas as simulações.

Observe que nesta primeira proposta os valores médios de μ_{\max} e de $Y_{X/S}$ anteriormente estimados ($0,55 \text{ h}^{-1}$ e $0,35$, respectivamente) ficam dentro da faixa de 95% de confiança da estimativa. Contudo, os intervalos de confiança dos parâmetros cinéticos (μ_{\max} e K) são largos.

A matriz de correlação dos parâmetros é mostrada na Tabela 5.2. Observa-se que a correlação entre os dois parâmetros cinéticos é extremamente alta.

Note-se que um coeficiente de correlação próximo a +1 entre μ_{\max} e K indica que o trecho de baixas concentrações de substrato foi dominante no ajuste. Nessa região (para $S \rightarrow 0$) o modelo de Monod se reduz a um de pseudo-primeira ordem (com constante cinética μ_{\max}/K_S).

| Tabela 5.2: Matriz de correlação dos parâmetros. | | | |
|--|--------------|------|-----------|
| | μ_{\max} | K | $Y_{x/s}$ |
| μ_{\max} | 1,00 | 0,99 | 0,27 |



| | | | |
|-----------|---|------|------|
| K | - | 1,00 | 0,22 |
| $Y_{x/s}$ | - | - | 1,00 |

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 5.1: Primeira hipótese, AFA + aminoácidos representando apenas um substrato. (A) ensaio 8, (B) ensaio 13, (C) ensaio 14 e (D) ensaio 15 (validação).

5.2 Segunda Proposta

Em uma tentativa de melhorar o ajuste, formulou-se a segunda proposta de modelo cinético, para a qual as velocidades de crescimento celular e de consumo de substrato foram representadas considerando-se a presença de dois substratos limitantes: AFA e aminoácidos totais.

Propõe-se neste caso que o crescimento celular e o consumo de substrato sigam a cinética de crescimento de Monod, para múltiplos substratos, na forma aditiva:

$$\frac{dC_x}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} \right) \cdot C_x \quad (5.7)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S_1}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} \right) \cdot C_x \quad (5.8)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S_2}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} \right) \cdot C_x \quad (5.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} \right) \cdot C_x \quad (5.10)$$

onde: C_x : concentração de células (g/L)
 S_1 e S_2 : concentração de aminoácidos totais e AFA respectivamente (g/L)
 $\mu_{\max 1}$ e $\mu_{\max 2}$: velocidade máxima específica de crescimento celular nos respectivos substratos (h^{-1})
 K_1 e K_2 : constante de Monod dos aminoácidos e do AFA respectivamente (g/L)
 $Y_{x/S1}$ e $Y_{x/S2}$: fator de rendimento de células em relação a cada substrato ($g_{\text{células}}/g_{\text{substrato}}$).
 $Y_{X/P}$: fator de rendimento células-produto ($g_{\text{células}}/g_{\text{produto}}$)

Os valores dos parâmetros obtidos com o ajuste do modelo e respectivos intervalos de 95% de confiança são mostrados na Tabela 5.3. A Figura 5.2 mostra o resultado das simulações com estes parâmetros. Novamente, os parâmetros foram ajustados utilizando o resultado dos ensaios 8, 13 e 14 e validados com o ensaio 15.

Observa-se pela Figura 5.2 que o modelo apresenta boa concordância com os dados de consumo de AFA. Já para consumo de aminoácidos o modelo uma vez mais prevê a exaustão do substrato de forma antecipada, coerentemente com o fato de haver dois grupos distintos de aminoácidos. A formação de produto (novamente com o atraso, imposto pelo modelo, de 2 h) teve comportamento semelhante ao da proposta anterior, anterior com boa estimativa até aproximadamente 16 horas.

O fato que sobressai na Tabela 5.3 é o intervalo de confiança grande obtido para todos os parâmetros (exceto $Y_{X/P}$, cuja estimativa continua precisa porque feita à parte). Mais ainda, os parâmetros do segundo substrato têm o intervalo incluindo o valor zero. É razoável supor que o pior ajuste desses parâmetros se deve ao fato de que a maior simplificação adotada se concentrou no segundo substrato, que sabidamente não é consumido de maneira uniforme. A matriz de correlação dos parâmetros está transcrita na Tabela 5.4.

Tabela 5.3: Parâmetros estimados (95% de intervalo de confiança) para a segunda proposta de modelo.

| | Parâmetros | Valores |
|---|------------------------------------|-------------------------------|
| Velocidade máxima específica de crescimento | $\mu_{\max 1}$ (h^{-1}) | $0,40 \pm 0,3$ |
| | $\mu_{\max 2}$ (h^{-1}) | $0,15 \pm 0,4$ |
| Constante de saturação | K_{S1} | $9,00 \pm 7,1$ |
| | K_{S2} | $2,80 \pm 8,8$ |
| Rendimento célula substrato | $Y_{X/S1}$ | $0,30 \pm 0,2$ |
| | $Y_{X/S2}$ | $0,50 \pm 0,7$ |
| Rendimento célula produto | Y_{XP}^* | $0,02 \pm 1,0 \times 10^{-3}$ |

* Estimado separadamente, com base apenas na curva de atividade enzimática, após o ajuste dos demais parâmetros

Tabela 5.4: Matriz de correlação dos parâmetros.

| | $\mu_{\max 1}$ | K_{S1} | $\mu_{\max 2}$ | K_{S2} | $Y_{X/S1}$ | $Y_{X/S2}$ |
|----------------|----------------|----------|----------------|----------|------------|------------|
| $\mu_{\max 1}$ | 1,00 | 0,49 | -0,65 | -0,31 | 0,75 | -0,74 |
| K_{S1} | - | 1,00 | 0,01 | -0,15 | -0,19 | 0,21 |
| $\mu_{\max 2}$ | - | - | 1,00 | 0,82 | -0,69 | 0,71 |
| K_{S2} | - | - | - | 1,00 | -0,16 | 0,19 |
| $Y_{X/S1}$ | - | - | - | - | 1,00 | -0,99 |
| $Y_{X/S2}$ | - | - | - | - | - | 1,00 |

É interessante observar a alta correlação negativa entre os dois coeficientes pseudo-estequiométricos. Isso significa que aumentar $Y_{X/S1}$, reduzindo simultaneamente $Y_{X/S2}$ (ou vice-versa) levaria a ajustes de qualidade estatisticamente equivalente. Esse comportamento é esperado, uma vez que ambos substratos produzem massa celular. Os parâmetros cinéticos do segundo substrato têm, novamente, alta correlação positiva (embora menor que no primeiro caso), uma indicação de que a região de baixas concentrações de aminoácidos totais teve peso no ajuste do modelo. Para o AFA, o ajuste dos parâmetros cinéticos tem melhor qualidade (correlação 0,49).

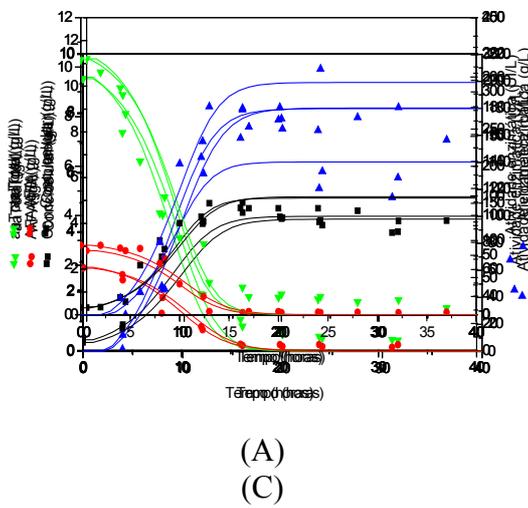


Figura 5.2: Segunda hipótese, AFA e aatotais representando dois substratos limitantes. (A) ensaio 8, (B) ensaio 13, (C) ensaio 14 e (D) ensaio 15 (validação).

O perfil de evolução da massa celular continua, na maioria dos casos, subestimado pelo modelo.

5.3 Terceira Proposta

Em uma terceira alternativa, as velocidades de crescimento celular e consumo de substrato no meio foram representadas considerando-se a presença de três substratos limitantes, sendo estes representados pelos aminoácidos mais rapidamente consumidos (aa+), os mais lentamente consumidos (aa-) e o AFA.

Propõe-se neste caso que o crescimento celular e o consumo de substrato sigam a cinética de crescimento de Monod, para múltiplos substratos, na forma aditiva:

$$\frac{dC_x}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} + \frac{\mu_{\max 3} \cdot S_3}{K_3 + S_3} \right) \cdot C_x \quad (5.11)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S_1}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} \right) \cdot C_x \quad (5.12)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S_2}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_1 + S_2} \right) \cdot C_x \quad (5.13)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S_3}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 3} \cdot S_3}{K_3 + S_3} \right) \cdot C_x \quad (5.14)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} + \frac{\mu_{\max 3} \cdot S_3}{K_3 + S_3} \right) \cdot C_x \quad (5.15)$$

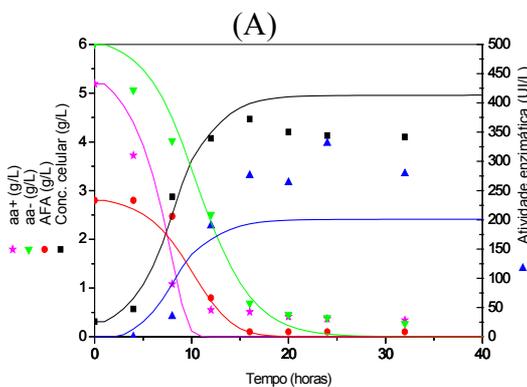
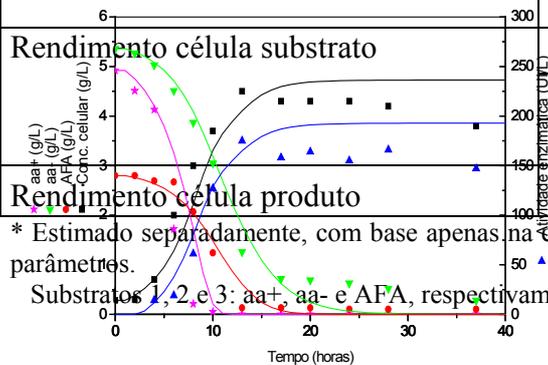
onde: C_x concentração de células (g/L)
 S_1, S_2 e S_3 concentração de aa+, aa- e AFA respectivamente (g/L)
 μ_{maxi} velocidade máxima específica de crescimento no substrato i (h^{-1})
 K_1, K_2 e K_3 constantes de Monod do substrato (g/L)
 $Y_{X/Si}$ fator de rendimento em cada substrato ($g_{células}/g_{substrato}$).
 $Y_{X/P}$ fator de rendimento de células-produto ($g_{células}/g_{produto}$)

Os parâmetros estimados e o resultados das simulações são mostrados na Tabela 5.5 e na Figura 5.3 respectivamente.

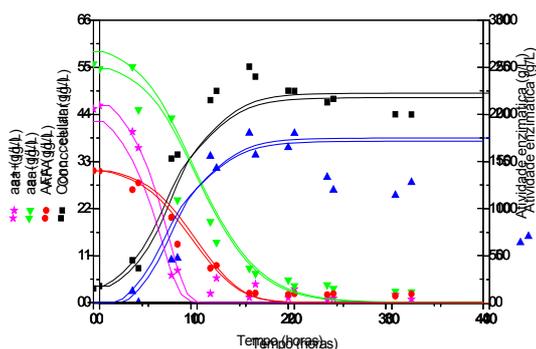
| Tabela 5.5: Parâmetros estimados (95% de intervalo de confiança) para a segunda proposta de modelo. | | |
|---|---------------------------|--------------------------------|
| | Parâmetros | Valores |
| Velocidade máxima específica de crescimento | μ_{max1} (h^{-1}) | $0,25 \pm 0,1$ |
| | μ_{max2} (h^{-1}) | $0,06 \pm 0,1$ |
| | μ_{max3} (h^{-1}) | $0,10 \pm 0,1$ |
| Constante de saturação | K_{S1} | $0,88 \pm 7,1$ |
| | K_{S2} | $6,00 \pm 8,8$ |
| | K_{S3} | $1,15 \pm 2,0$ |
| Rendimento célula substrato | $Y_{X/S1}$ | $0,41 \pm 0,1$ |
| | $Y_{X/S2}$ | $0,14 \pm 0,3$ |
| | $Y_{X/S3}$ | $0,60 \pm 0,5$ |
| | $Y_{X/P}^*$ | $0,022 \pm 1,0 \times 10^{-3}$ |

* Estimado separadamente, com base apenas na curva de atividade enzimática, após o ajuste dos demais parâmetros.

Substratos 1, 2, e 3: aa+, aa- e AFA, respectivamente.



(B)



(C)

(D)

Figura 5.3: Terceira hipótese, aa+, aa- e AFA representando três substratos limitantes. (A) ensaio 8, (B) ensaio 13, (C) ensaio 14 e (D) ensaio 15 (validação).

Os parâmetros, de forma geral, têm sua estimativa deteriorada, sendo que para a maioria deles o intervalo de confiança inclui o zero. As constantes de Monod, ou de saturação (K) são particularmente pouco precisas. Já os fatores de rendimento têm melhor qualidade de ajuste.

O perfil de consumo do AFA é qualitativamente bem representado. Os aminoácidos aa+, facilmente metabolizáveis, no entanto, não são tão bem ajustados pelo modelo. Quanto aos aa-, apresentam uma cauda não representável por esta simplificação (que os agrupa como um substrato único). Por outro lado, permanece a tendência de se subestimar a massa celular. A Tabela 5.6 traz a matriz de correlação das estimativas.

Tabela 5.6: Matriz de correlação dos parâmetros.

| - | $\mu_{\max 1}$ | K_{S1} | $\mu_{\max 2}$ | K_{S2} | $\mu_{\max 3}$ | K_{S3} | $Y_{X/S1}$ | $Y_{X/S2}$ | $Y_{X/S3}$ |
|----------------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|------------|------------|------------|
| $\mu_{\max 1}$ | 1,00 | 0,77 | -0,25 | -0,29 | -0,33 | -0,34 | 0,65 | -0,13 | -0,13 |
| K_{S1} | - | 1,00 | -0,26 | -0,14 | 0,10 | -0,002 | 0,05 | -0,21 | 0,17 |
| $\mu_{\max 2}$ | - | - | 1,00 | 0,25 | -0,56 | -0,08 | -0,12 | 0,93 | -0,80 |
| K_{S2} | - | - | - | 1,00 | 0,16 | 0,005 | -0,27 | -0,13 | 0,23 |
| $\mu_{\max 3}$ | - | - | - | - | 1,00 | 0,76 | -0,55 | -0,64 | 0,82 |
| K_{S3} | - | - | - | - | - | 1,00 | 0,40 | -0,09 | 0,26 |
| $Y_{X/S1}$ | - | - | - | - | - | - | 1,00 | 0,004 | -0,40 |
| $Y_{X/S2}$ | - | - | - | - | - | - | - | 1,00 | -0,91 |

| | | | | | | | | | |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|------|
| $Y_{X/S3}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,00 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|------|

* Substratos 1, 2 e 3: aa+, aa- e AFA, respectivamente

5.4 Simulação dos Ensaio em Batelada Alimentada

Após ajustar e validar os três modelos a ensaios em batelada, esses são testados contra ensaios em batelada alimentada. Na segunda etapa foram realizados três ensaios em batelada alimentada (ensaios 9, 10 e 11). As condições adotadas na fase de suplementação de cada ensaio são mostradas na Tabela 5.7. As condições operacionais adotadas e os resultados obtidos nestes ensaios foram descritos e discutidos nos itens 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4 respectivamente.

| Tabela 5.7: Condições experimentais das correntes de meio suplementar adotadas nos ensaios 9, 10 e 11. | | | |
|--|----------------------|-------------------------|--|
| Ensaio | Q_{MS} (mL/min) | C_{MS} (g/L de aa) | $t_{início\ suplementação}$ (horas) |
| Ensaio 9 | 1,76 | 40,0 | 8,0 |
| Ensaio 10 | 1,76 | 40,0 | 5,0 |
| Ensaio 11 | 1,76 | 40,0 | 5,0(AA) 8,0 (soro) |

Q_{MS} : vazão de meio suplementar

C_{MS} : concentração de meio suplementar

Para cada um desses ensaios foi realizado um teste de validação, usando cada uma das propostas de modelo. Os balanços de massa (5.1) a (5.3) tiveram acrescido um termo de diluição:

$$\frac{dC_X}{dt} = \sum_{i=1}^{n^o S} \left(\frac{\mu_{max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X - \frac{Q_{MS_i}}{V} \cdot C_X \quad (5.16)$$

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_i}} \left(\frac{\mu_{max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X - \frac{Q_{MS_i}}{V} \cdot (S_i - C_{MS_i}) \quad (5.17)$$

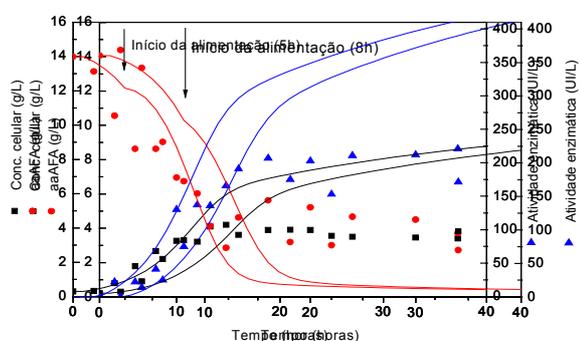
$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \sum_{i=1}^{n^o S} \left(\frac{\mu_{max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X - \frac{Q_{MS_i}}{V} \cdot P \quad (5.18)$$

onde: C_X concentração de células (g/L)

- S_i concentração do substrato i (g/L)
- P concentração de produto (g/L)
- $\mu_{\max i}$ velocidade máxima específica de crescimento celular nos respectivos substratos (h^{-1})
- K_i constante de Monod do substrato i (g/L)
- Y_{X/S_i} fator pseudo-estequiométrico (ou de rendimento) de células em relação ao substrato i ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{substrato } i}$)
- $Y_{X/P}$ fator pseudo-estequiométrico células-produto ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{produto}}$)
- Q_{MS_i} vazão de meio suplementar (L/h)
- C_{MS_i} :concentração de substrato no meio suplementar (g/L)

As Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 apresentam os resultados das simulações com os mesmos conjuntos de parâmetros ajustados para os ensaios em batelada. Nenhuma das três propostas foi capaz de prever corretamente, sequer de forma qualitativa, as concentrações de células, substratos e enzima.

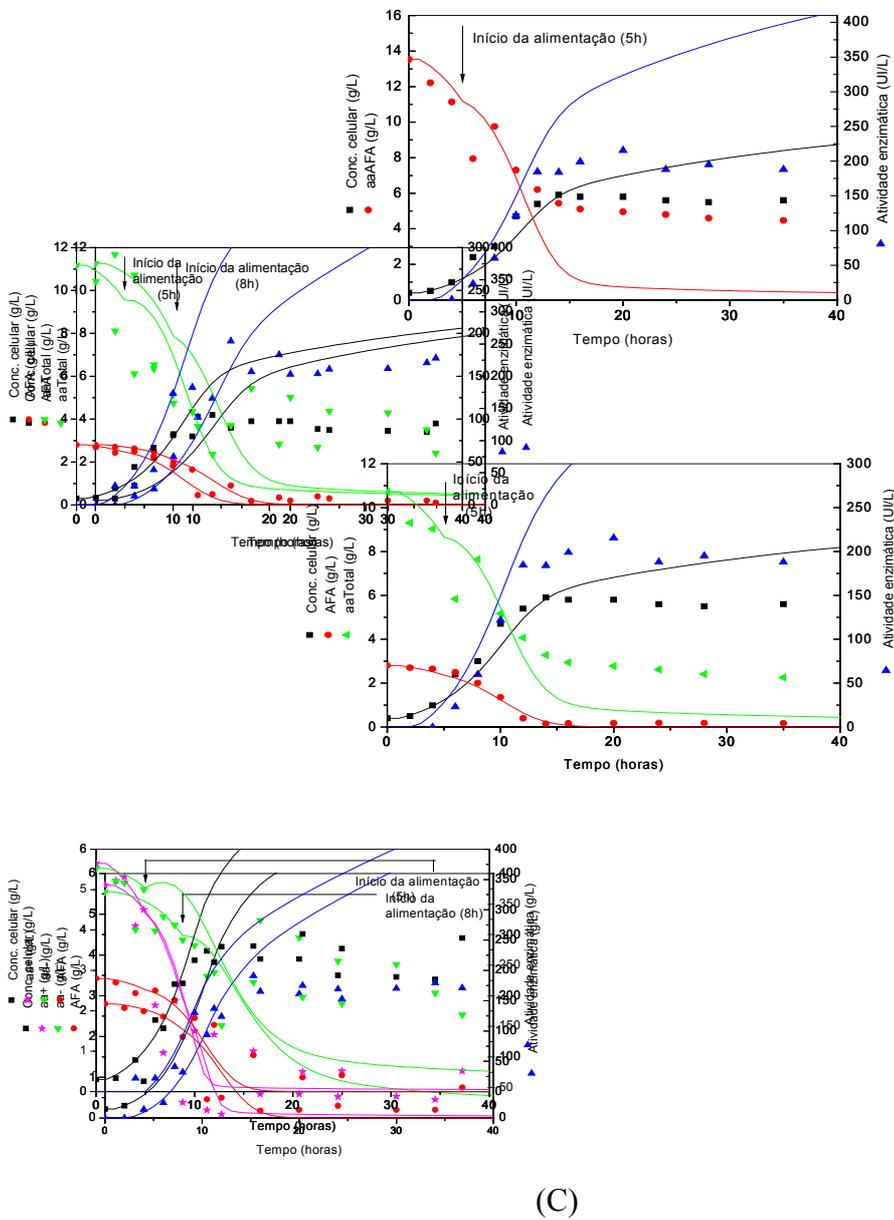
O acúmulo de substrato encontrado em todos os experimentos deve estar ocorrendo em função de algum efeito de inibição, que poderia estar relacionado com o acúmulo do íon amônio, por exemplo. Neste caso, este efeito deveria ser incorporado ao



modelo. Outros parâmetros cinéticos relacionados à manutenção, morte celular, hidrólise da enzima, efeito da concentração de oxigênio dissolvido poderiam ser incorporados ao modelo. A inclusão desses parâmetros, no entanto, elevaria ainda mais a complexidade do modelo e mais problemas inerentes à estimativa de parâmetros surgiriam inevitavelmente.

(A)

(B)



(C)

Figura 5.4: Primeira hipótese, AFA + aminoácidos representando apenas um substrato. (A) ensaio 9, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11 (batelada alimentada).

(A)

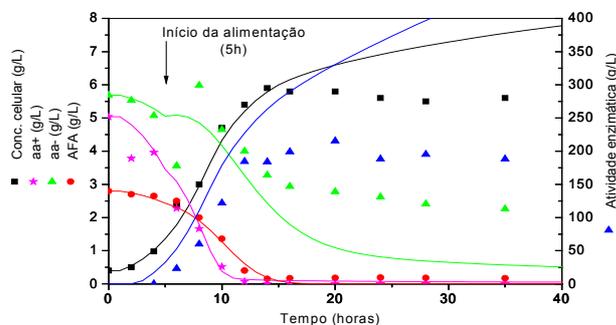
(B)

(C)

Figura 5.5: Segunda hipótese, AFA e aaTotais representando dois substratos limitantes. (A) ensaio 9, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11 (batelada alimentada).

(A)

(B)



(C)

Figura 5.6: Terceira hipótese, aa+, aa- e AFA representando três substratos limitantes. (A) ensaio 9, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11 (batelada alimentada).

5.5 Considerações Finais Sobre o Capítulo

A partir dos ensaios em batelada realizados na segunda etapa foi possível propor três modelos cinéticos. Em todos eles, admite-se que a produção de PGA é associada ao crescimento, mas com atraso de 2 horas. As diferenças entre as três propostas foram baseadas na observação do perfil de consumo de aminoácidos e AFA ao longo das corridas experimentais. Nos ensaios descritos no Capítulo 3, referentes à segunda etapa de experimentos, observou-se exaustão de AFA antes de 15 horas de cultivo.

Na primeira proposta de modelo, aminoácidos e AFA foram agrupados em um substrato único. Na segunda, os aminoácidos foram considerados como um substrato e AFA como outro, apresentando assim dois substratos limitantes.

Quando se analisou o consumo de cada aminoácido, observou-se que uns eram consumidos preferencialmente em relação a outros. Assim surgiu a terceira proposta de modelo, onde os aminoácidos consumidos preferencialmente (aa+) foram considerados como um substrato, os consumidos mais lentamente (aa-) foram considerados como outro e AFA como um terceiro.

O modelo não estruturado da primeira proposta segue a cinética de crescimento de Monod para um único substrato limitante e os da segunda e terceira propostas seguem a mesma cinética, porém para múltiplos substratos. A cinética aditiva foi assumida, pois o crescimento continua mesmo quando um dos substratos se esgota, o que não poderia ocorrer com a cinética multiplicativa.

Nas três propostas, a validação (usando um quarto ensaio batelada) mostrou que os modelos descrevem qualitativamente de forma aceitável o consumo do(s) substrato(s), mas não apresentam boa concordância com os dados de concentração celular. Ao se analisarem os parâmetros obtidos, observa-se que à medida que se aumenta o número destes, seus intervalos de confiança também aumentam. Conclui-se daí que o enfoque utilizado, de modelo não-estruturado, pode estar alcançando seus limites. Aumentar o número de parâmetros deve conduzir a valores fisicamente pouco significativos destes, sem que se aumente a capacidade de generalização do modelo.

Testes dos três modelos para três ensaios em batelada alimentada mostraram ser indispensável acrescentar à cinética de crescimento termo de inibição por produto (amônio é o principal candidato). Além disso, manutenção, morte celular, dentre outros termos, seriam muito provavelmente necessários para ajustar os modelos, ao menos de forma qualitativa.

O enfoque clássico, assim, mostra-se demasiadamente simplificado para descrever em detalhe o complexo sistema bioquímico apresentado neste trabalho, a produção de PGA por células de *Bacillus megaterium*. Um dos objetivos centrais desta tese é a implementação de algoritmo de inferência que permita a monitoração, em tempo real, do cultivo. Para se empregar algoritmos baseados em modelos cinéticos clássicos, incluídos nos balanços de massa (como, por exemplo, o filtro de Kalman), é necessário que a capacidade preditiva e de generalização do modelo seja adequada. Os resultados apresentados neste capítulo, entretanto, não dão indicações seguras nesse sentido.

Uma alternativa seria empregar modelos mais estruturados, considerando alguns metabólitos-chave intermediários. Entretanto, não se dispõe, para o sistema aqui estudado, de dados que permitam utilizar esse enfoque. Impõe-se, portanto, o uso de técnicas de inteligência artificial para superar essas dificuldades. Redes neurais artificiais são uma alternativa para inferir as variáveis de interesse a partir de outras, mensuráveis em tempo real. Assim, no próximo capítulo apresentam-se resultados de inferência deste sistema via redes neurais artificiais.

6. Inferência de Estado do Processo de Produção de PGA

Uma das propostas deste projeto de tese foi desenvolver algoritmos de inferência de estado, que sirvam como estimadores de variáveis no processo de produção de PGA por *Bacillus megaterium*. Outra importante aplicação desses algoritmos é na detecção de falhas do processo. Tais algoritmos demandam um banco de dados consistentes para sua implementação e validação.

As propostas para se modelar o crescimento do microrganismo, o consumo de substrato(s) e a produção de PGA apresentadas no capítulo anterior, que se baseavam em abordagem clássica, usando modelos cinéticos não-estruturados, mostraram-se demasiadamente simplificadas. Apesar de descreverem qualitativamente o consumo do(s) substrato(s), os modelos foram limitados na descrição da concentração celular e da produção de enzima. Seu uso em métodos de inferência não-linear baseados em modelo, como o filtro de Kalman estendido, poderia redundar em algoritmos pouco confiáveis para aplicação em tempo real. Assim tornou-se necessário buscar alternativas para a previsão das variáveis-chave do processo de produção de PGA.

Medidas em tempo real de muitas das variáveis importantes em processos fermentativos apresentam considerável atraso devido à qualidade e até à indisponibilidade de sensores (Soroush, 1998). Sendo assim, há a necessidade de inferi-las a partir de variáveis mensuráveis. A utilização de sensores baseados em “software”, como redes neurais, é uma alternativa ao uso de um modelo fenomenológico do processo. Esses algoritmos utilizam variáveis disponíveis em linha, denominadas variáveis secundárias (como a concentração dos gases na saída do sistema, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido no meio, a velocidade de agitação), para estimar as variáveis primárias do processo (como concentração celular e de enzima, por exemplo).

Uma etapa que precede a inferência propriamente dita, quando se utilizam medidas em tempo real, é o tratamento dos dados provenientes da instrumentação, após serem capturados pelo sistema de aquisição. As variáveis armazenadas por este sistema apresentavam ruídos aleatórios elevados. Testes preliminares, empregando os dados “crus” para treinar redes neurais de inferência, indicaram que era necessário reduzir o

ruído das medidas antes que os dados fossem alimentados aos sensores de “software” (as redes de inferência) de forma a minimizar erros e ambigüidades nas predições.

Sabe-se que medidas em linha contêm ruídos aleatórios. Ocasionalmente, podem também estar presentes erros sistemáticos (mais ou menos grosseiros), que podem ser consequência da utilização prolongada dos instrumentos sem recalibração adequada, de erros humanos ou de outras perturbações não medidas (desvios de tensão na rede elétrica, por exemplo). Para se propor e implementar um sistema utilizando redes neurais é necessário, entre outras coisas, o pré-processamento dos dados (Bailey e Thompson, 1990; Stein, 1993). Um desses pré-processamentos é a filtragem desses dados para redução dos ruídos aleatórios. Esse tipo de procedimento foi adotado neste trabalho. Não houve preocupação de identificar erros sistemáticos, pois os protocolos de testes executados com a instrumentação antes de cada ensaio se mostraram suficientes para eliminá-los.

De todos os ensaios realizados, foram escolhidos alguns para serem utilizados no treinamento e validação dos algoritmos de filtragem de ruído e de inferência de estado. Entre os escolhidos estão todos os ensaios (da segunda etapa) onde se empregou o sistema de aquisição de dados, incluindo-se tanto ensaios em batelada como em batelada alimentada. A Tabela 6.1 mostra os ensaios utilizados para inferência com redes neurais.

| Ensaio | Modo de Operação | Oxigênio dissolvido | Controle de pH | Alimentação |
|-----------|---------------------|--------------------------------------|----------------|------------------------------|
| Ensaio 8 | Batelada | 20% da saturação ao longo do cultivo | não | - |
| Ensaio 9 | Batelada alimentada | 20% da saturação ao longo do cultivo | não | aminoácidos (8h) |
| Ensaio 10 | Batelada alimentada | 20% da saturação ao longo do cultivo | não | aminoácidos (5h) |
| Ensaio 11 | Batelada alimentada | 20% da saturação ao longo do cultivo | não | aminoácidos (5h) e soro (8h) |
| Ensaio 12 | Batelada | 20% da saturação ao longo do cultivo | sim | - |

| | | | | |
|-----------|----------|--------------------------------------|-----|---|
| Ensaio 14 | Batelada | 20% da saturação ao longo do cultivo | não | - |
|-----------|----------|--------------------------------------|-----|---|

6.1 Filtragem dos Dados Usados no Algoritmo de Inferência

Várias técnicas de filtragem são utilizadas para o tratamento de dados ruidosos. Entre os filtros mais conhecidos e utilizados está o filtro média móvel (MM), o mais comum em Processamento Digital de Sinais, por ser simples e de fácil implementação (Smith, 1999). Como o próprio nome diz, este algoritmo calcula a média de um número de pontos do sinal de entrada, em uma janela temporal, para produzir um ponto de sinal de saída (no tempo atual), de acordo com a equação 6.1:

$$y(i) = \frac{1}{M} \sum_{j=0}^{M-1} x(i+j) \quad (6.1)$$

Na equação 6.1 x é o sinal de entrada, y o sinal de saída e M o número de pontos usados na janela da média móvel. Por exemplo, numa média móvel com $M=5$ pontos, o ponto 80 no sinal de saída é dado pela equação 6.2, onde o grupo de pontos é escolhido simetricamente em torno do ponto de saída. Alternativamente, o grupo de pontos a partir do sinal de entrada pode ser constituído por pontos posteriores (equação 6.3) ou anteriores (equação 6.4) ao ponto de saída. Obviamente, quando se usam informações posteriores ao instante de saída provoca-se um atraso na previsão, igual ao número de pontos posteriores ao tempo “presente” do filtro.

$$y(80) = \frac{x(78) + x(79) + x(80) + x(81) + x(82)}{5} \quad (6.2)$$

$$y(80) = \frac{x(80) + x(81) + x(82) + x(83) + x(84)}{5} \quad (6.3)$$

$$y(80) = \frac{x(76) + x(77) + x(78) + x(79) + x(80)}{5} \quad (6.4)$$

Redes neurais artificiais também têm sido usadas para compressão e filtragem de dados. Entre as redes utilizadas com esse objetivo, destacam-se as redes neurais autoassociativas tipo “feedforward”. Elas têm importantes aplicações em engenharia

química e bioquímica, tanto para filtragem de sinais como para compressão de dados, diminuindo a dimensão de um vetor de entrada (Baughman e Liu, 1995). A Figura 6.1-A mostra a arquitetura padrão de uma rede autoassociativa com três camadas.

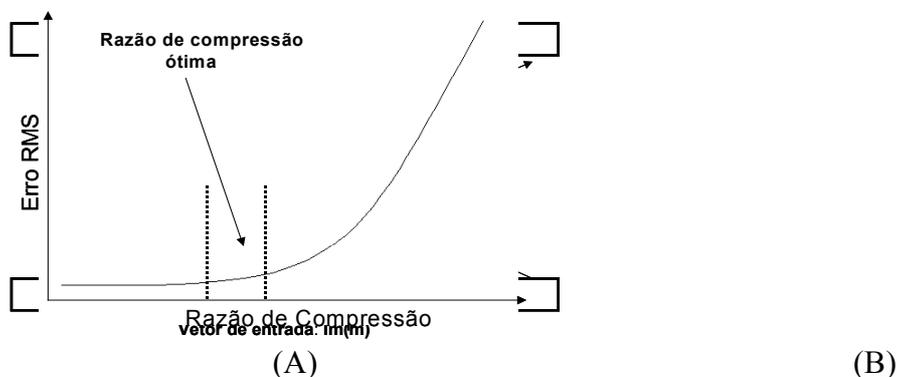


Figura 6.1: (A) Rede neural autoassociativa de três camadas. (B) Determinação da taxa de compressão ótima (adaptado de Baughman e Liu, 1995).

O vetor $\mathbf{In}(m)$ representa a camada de entrada, o vetor $\mathbf{B}(n)$ representa a camada oculta e o vetor $\mathbf{Out}(m)$ representa a camada de saída da rede. Note que m e n são iguais aos números de neurônios nas respectivas camadas. A rede autoassociativa correlaciona o padrão de entrada a ele mesmo, ou seja, $\mathbf{In}(m)=\mathbf{Out}(m)$. O objetivo da rede é mapear somente informações importantes do vetor de entrada no vetor de saída enquanto remove erros e ruídos. O vetor de entrada é mapeado em um vetor intermediário menor $\mathbf{B}(n)$, conhecido como gargalo (“bottleneck”), de n nodos (onde $m>n$). A idéia aqui é que a redução da dimensão da informação no gargalo faça com que apenas a informação essencial, característica do padrão que se deseja identificar, seja preservada ao passar pela rede. A compressão é quantificada usando a razão de compressão de dados (CR), definida como a razão m/n . Para se determinar a razão de compressão ótima gera-se um gráfico do erro RMS versus a razão de compressão variando-se o número de nodos na camada oculta (Figura 6.1-B e equação 6.5).

$$\text{Razão de Compressão (CR)} = m/n \quad (6.5)$$

Quanto maior CR maior a redução dos ruídos; porém se CR é muito grande, informações essenciais do vetor de entrada podem ser perdidas e grandes erros podem ocorrer. Por outro lado, se CR for pequeno ($m/n \leq 1$), a rede mapeia todo o padrão de entrada no padrão de saída sem eliminar qualquer erro ou ruído.

Outra topologia de rede muito utilizada para filtragem de sinais é a rede recorrente externa com atraso na retroalimentação (vide figura 6.2-B). Neste caso, realimenta-se o vetor de saída (com atraso de um intervalo de amostragem) para a entrada da rede.

Para filtrar os dados provenientes do sistema de aquisição foram testadas duas configurações de rede, além do filtro média móvel. Para a escolha da estrutura de rede avaliaram-se o desvio médio relativo e a variância do desvio médio relativo na etapa de validação (ensaios não utilizados no treinamento). O desvio médio relativo pode ser positivo ou negativo. Essa estatística indica possíveis tendências na resposta do filtro: desvios elevados (em módulo) são gerados quando a saída do filtro está sistematicamente acima ou abaixo do valor “verdadeiro” da medida (aqui dado pelo alisamento por FFT). Já a variância do desvio mede a amplitude das oscilações da saída do filtro ao redor do valor “verdadeiro” sendo assim um indicador da capacidade de alisamento do algoritmo.

Em primeiro lugar, testou-se a rede autoassociativa “feedforward” (RAF) citada acima. De início, foi necessário definir a razão de compressão a ser utilizada. Para isso, foram treinadas várias configurações de rede. Variou-se o número de nodos na camada oculta de 1 até 8 para 10 e 15 entradas, com 30 iterações de treinamento. Com mais iterações, não se observou diminuição do erro. A razão de compressão escolhida foi 3 (10 entradas com 3 neurônios na oculta ou 15 entradas com 5 neurônios na oculta). Constatou-se que para CR próximo da unidade não se tem boa redução dos ruídos. Como já citado, valores extremos de CR podem prejudicar o desempenho da rede. A configuração de rede RAF é mostrada na Figura 6.2-A.

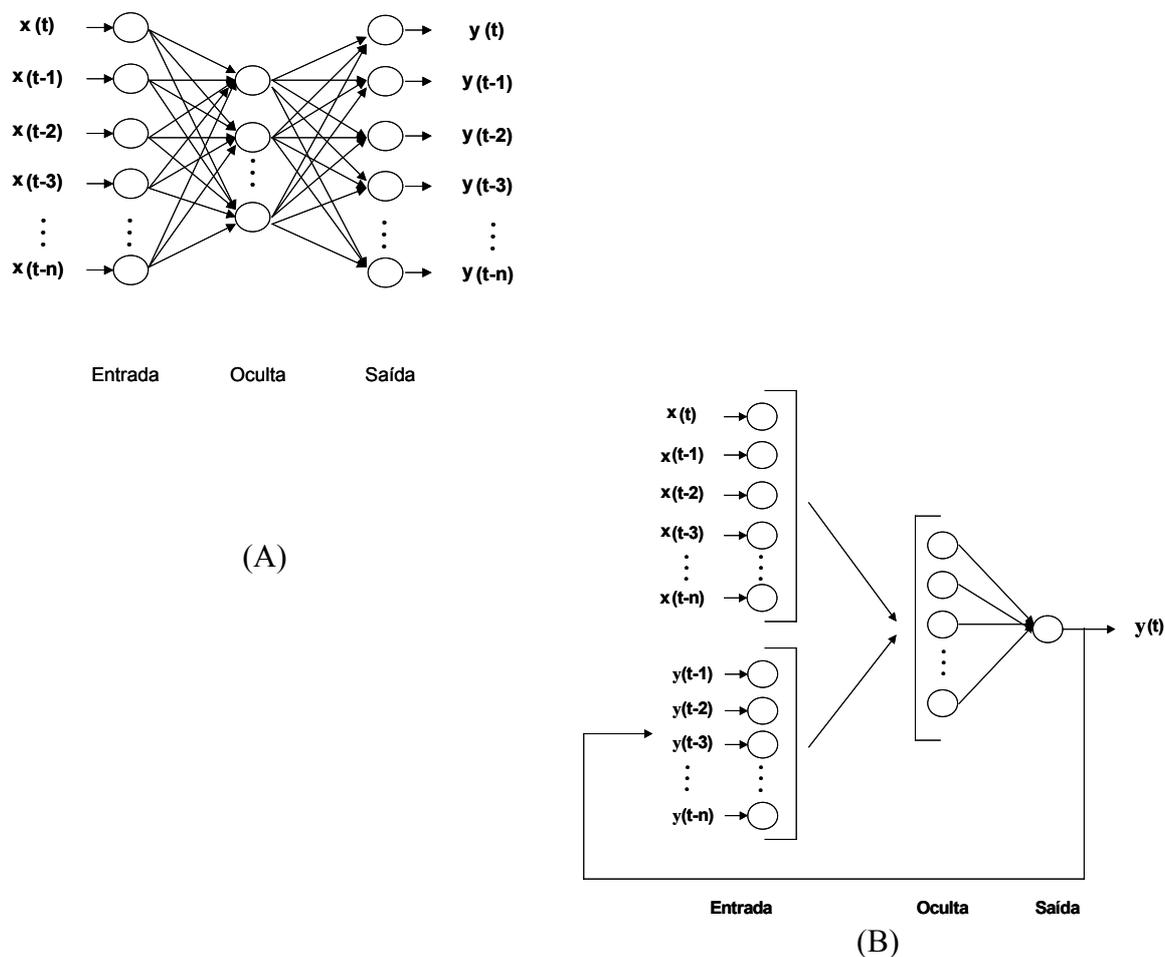


Figura 6.2: Estruturas das redes testadas. (A) Rede neural autoassociativa “feedforward”(RAF) e (B) Rede recorrente externa (RRE).

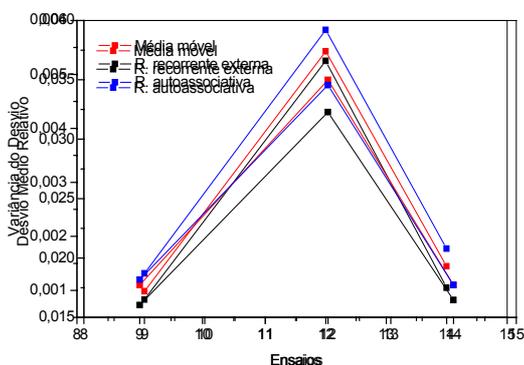
Para o treinamento foram utilizados os ensaios 8, 10 e 11 e na validação os ensaios 9, 12 e 14. Para a determinação de CR foi utilizada apenas a variável Y_{CO_2} em cada ensaio. As funções de transferência escolhidas, após vários testes, foram a tangente sigmoideal (na camada oculta) e a linear (nos neurônios de saída). O vetor de entrada da rede RAF (\mathbf{X}) corresponde à variável Y_{CO_2} original (ruidosa) no tempo atual e atrasada n vezes (equação 6.6). A saída-alvo para o aprendizado da rede foi a própria variável filtrada pelo algoritmo FFT (Transformada Rápida de Fourier) do programa Origin 6.0. O algoritmo de treinamento foi o de Levenberg-Marquardt. Todos os cálculos foram realizados em ambiente MATLAB® 5.2 (Mathworks).

$$\mathbf{X} = [x(t), x(t-1), \dots, x(t-n)] \quad (6.6)$$

A outra rede testada foi a rede recorrente externa (RRE) mostrada na Figura 6.2-B. Na RRE, além da mesma entrada da rede RAF, incluiu-se o desvio (y =dados ruidosos-dados lisos) atrasado de uma amostragem. Assim, as entradas da rede são os dados ruidosos de t até $t-n$ (onde n é o tamanho da janela temporal), além dos desvios de $t-1$ até $t-n$ (equação 6.7). Da mesma forma que na rede anterior foram testados dois valores de n (9 e 14) totalizando 10 e 15 entradas. A saída da rede é o desvio y , que é subtraído do dado ruidoso. O algoritmo de treinamento também foi o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os cálculos foram realizados em ambiente MATLAB® 5.2 (Mathworks).

$$\mathbf{X} = [x(t), x(t-1), \dots, x(t-n), y(t-1), y(t-2), \dots, y(t-n)] \quad (6.7)$$

Comparou-se o desempenho das duas redes com o do filtro média móvel. Para melhor comparação, as mesmas janelas temporais (10 e 15 amostragens) foram utilizadas para a média móvel e para as redes. Nas comparações mostradas a seguir, foi



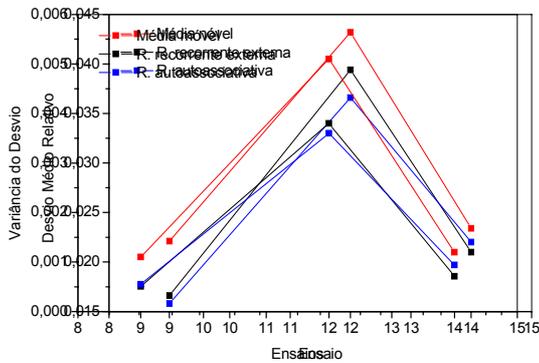
utilizada a abordagem da equação 6.4, onde a janela temporal é definida antes do tempo presente. As outras duas configurações (janela centrada e janela para frente) também foram testadas, mas o desempenho do filtro MM foi essencialmente o mesmo em todas as situações. Optou-se por apresentar apenas uma delas, a bem da concisão.

A Figura 6.3 mostra o resultado do desvio médio relativo e da variância de cada ensaio de validação para $n=9$. Observa-se pela figura a superioridade da rede RRE em relação ao filtro MM e em relação à rede RAF.

(A)

(B)

Figura 6.3: Comparação do desempenho do filtro MM, da rede RRE e da rede RAF.



(A) Desvio médio relativo e (B) Variância do desvio médio relativo.

A Figura 6.4 mostra o resultado do desvio médio relativo e da variância de cada ensaio de validação para $n=14$.

(A)

(B)

Figura 6.4: Comparação do desempenho do filtro MM, da rede RRE e da rede RAF.

(A) Desvio médio relativo e (B) Variância do desvio médio relativo.

Observe que o filtro média móvel apresenta maior variância para os dois casos analisados. Com relação às redes RRE e RAF, observa-se que os resultados foram semelhantes, com discreta superioridade para a rede RRE no ensaio 14. Como o tempo de processamento aumenta com o aumento do número de entradas e saídas, escolheu-se para a filtragem dos dados a rede RRE, pois embora o resultado de ambas tenha sido semelhante, o tempo de processamento na rede RAF foi muito maior.

Escolhida a rede RRE para a filtragem, uma série de simulações foram realizadas para se avaliar o número de entradas e o número de nodos na camada oculta.

Uma alternativa que se mostrou eficiente na filtragem dos dados foi a utilização de duas redes combinadas em série com o filtro média móvel, segundo o esquema da Figura 6.5. Três ensaios foram usados no treinamento (8, 10 e 11) e três na etapa de validação desse novo algoritmo (9, 12 e 14).

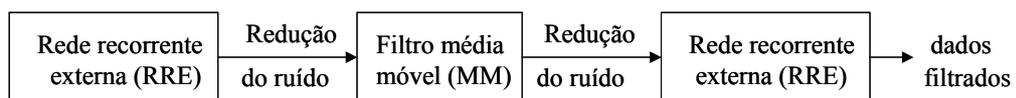
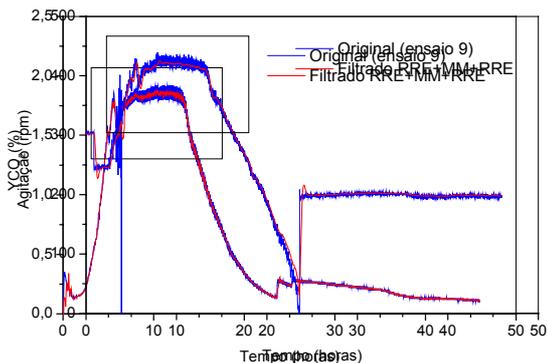


Figura 6.5: Filtro RRE-MM-RRE.

O resultado obtido com o filtro da figura 6.5 para um ensaio típico é mostrado na Figura 6.6. Foram filtradas as variáveis Y_{CO_2} , velocidade de agitação (Figura 6.6) e pH (Figura 6.7). A área marcada na figura corresponde à parte ampliada mostrada na Figura 6.8.



(A)

(B)

Figura 6.6: Resultados da validação da rede RRE+MM+RRE para filtragem das variáveis (A) Y_{CO_2} , (B) velocidade de agitação do ensaio 9.

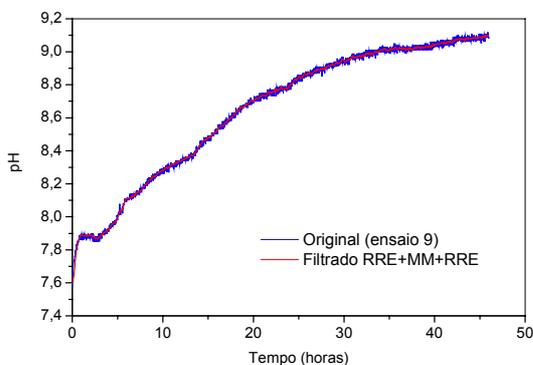
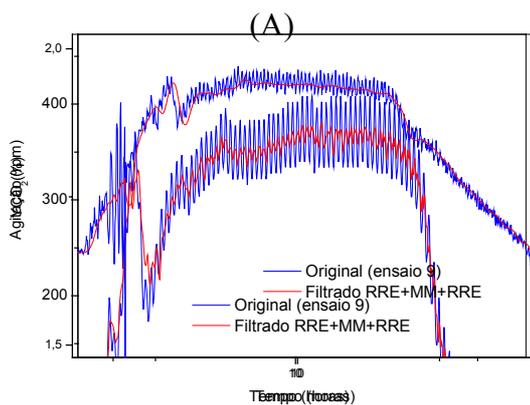


Figura 6.7: Resultados da validação da rede RRE+MM+RRE para filtragem da variável pH.



(A)

(B)

Figura 6.8: Resultados ampliados da validação da rede RRE+MM+RRE (A) Y_{CO_2} , (B) velocidade de agitação do ensaio 9.

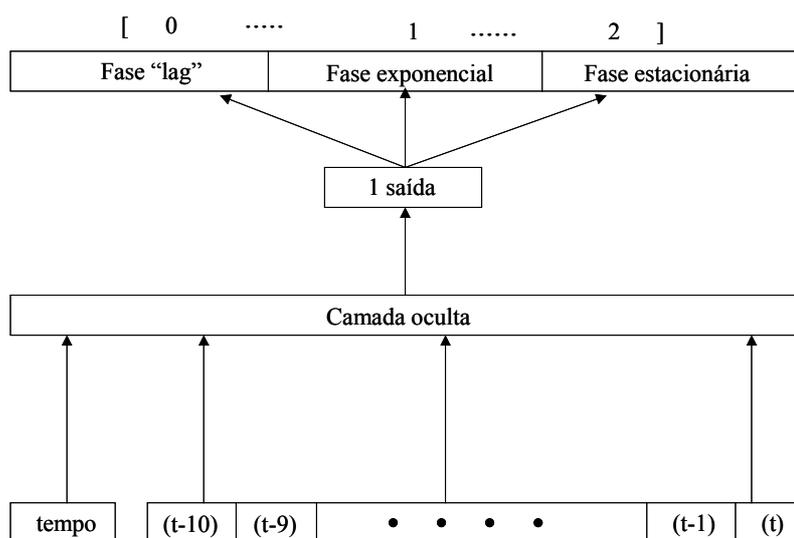
O filtro RRE-MM-RRE foi o que apresentou melhor desempenho. Observa-se que o algoritmo foi eficiente, diminuindo de forma considerável as oscilações observadas nas variáveis obtidas em linha. Com isso, torna-se possível projetar algoritmos de inferência e controle mais robustos em aplicações reais.

6.2 Rede para Identificação de Fases

Após a filtragem dos dados de todas as variáveis de interesse para inferência utilizou-se uma rede neural para classificar o crescimento celular nas três fases do crescimento microbiano (fase lag, fase de crescimento exponencial e fase estacionária).

Como se mostra mais adiante, uma rede neural única não foi capaz de inferir quantitativamente bem a concentração de *Bacillus megaterium* durante toda a fase de cultivo. Utilizando como entrada para a rede toda a base de dados, observou-se uma melhor inferência na fase de crescimento exponencial do que na fase estacionária. Sendo assim, foi utilizada uma rede neural de identificação de fases antes da rede de inferência.

Utilizou-se para identificação uma rede MLP “feedforward”, mostrada na Figura 6.9. A entrada da rede foi o tempo (valor atual) e a variável Y_{CO_2} (tempo atual e atrasado 9 amostragens), totalizando um vetor X de dimensão igual a onze. Foram realizadas simulações onde a variável agitação também foi incluída como entrada. Neste caso a entrada da rede foi a mesma da anterior, com mais 10 entradas (agitação no tempo atual e atrasada 9 intervalos), porém não houve melhoria significativa de desempenho. A rede teve apenas uma saída, entre 0 e 2. No treinamento, impôs-se a



saída igual a zero para a fase “lag”, igual à unidade para a fase exponencial e igual a dois para a estacionária. O número de nodos na camada oculta foi definido de forma a evitar sobre treinamento (“overfitting”), usando sempre as corridas de validação para teste. Optou-se por dez neurônios na camada oculta. No treinamento foram utilizados os ensaios 8,10,11,e 12 e na validação os ensaios 9 e 14.

Figura 6.9: Estrutura da rede de identificação de fases do cultivo de *B. megaterium*.

A separação das fases para o treinamento da rede foi feita visualmente (usando a curva experimental de C_X alisada pelo método B-spline do MATLAB 5.2 – vide figuras). O instante arbitrado para início de cada fase está indicado na Tabela 6.2, para os ensaios usados no treinamento.

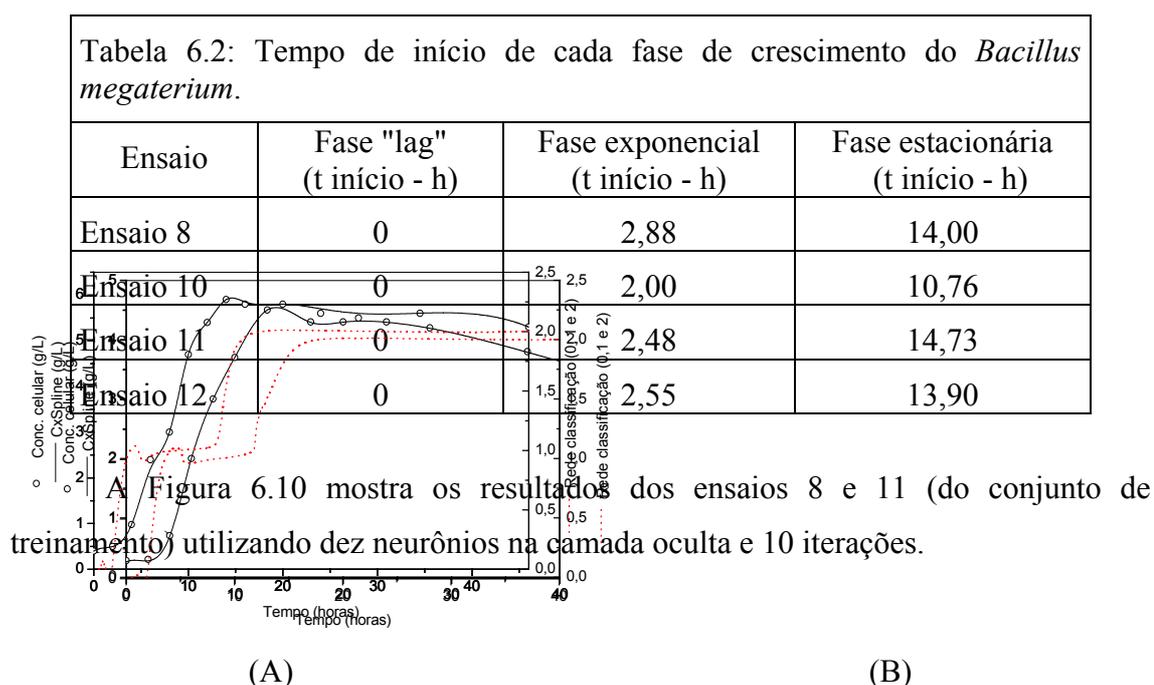


Figura 6.10: Resultado do treinamento da rede de identificação de fases de crescimento (A-ensaio 8 e B-ensaios 11, parte do conjunto de treinamento). Saída: 0 → fase lag; 1 → fase exponencial; 2 → fase estacionária.

As Figuras 6.11 e 6.12 mostram o resultado dos ensaios usados para validação (9 e 14).

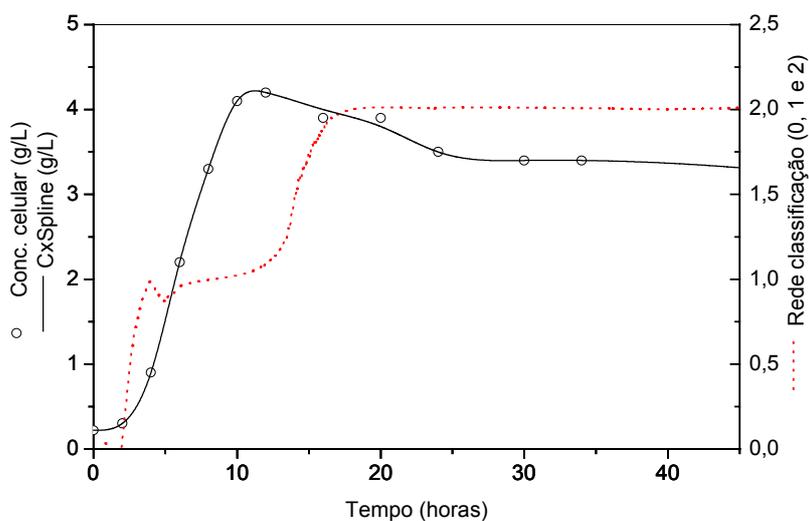


Figura 6.11: Resultado da validação da rede de identificação de fases de crescimento (ensaio 9). Saída: 0 → fase lag; 1 → fase exponencial; 2 → fase estacionária.

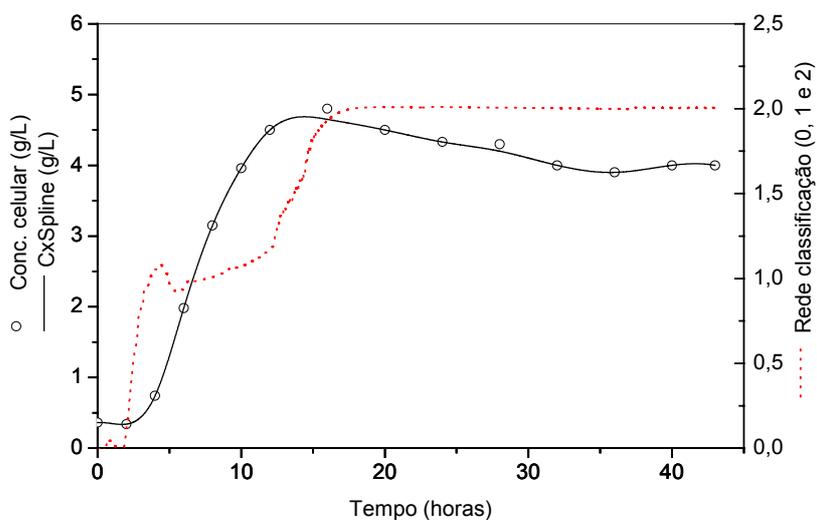


Figura 6.12: Resultado da validação da rede de identificação (ensaio 14). Saída: 0 → fase lag; 1 → fase exponencial; 2 → fase estacionária.

Os resultados do treinamento e da validação para a rede de identificação de fases de crescimento de *B. megaterium* indicam que o algoritmo foi muito bem sucedido nessa tarefa.

6.3 Redes de Inferência da Concentração Celular

6.3.1 Dados Ruidosos

Para a inferência da concentração de células de *Bacillus megaterium* durante o cultivo para a produção de PGA, foi utilizado uma rede neural "feedforward" com algoritmo de treinamento de Levenberg-Marquardt realizado em MATLAB® 5.2 (Mathworks). As funções de transferência utilizadas foram a tangente sigmoïdal (na camada oculta) e a linear (nos neurônios de saída).

É importante ressaltar que, neste item, empregava-se sempre uma única rede para toda a duração do cultivo.

Primeiramente, utilizaram-se dados ruidosos no treinamento da rede. Foram testadas várias combinações de entradas para a rede neural com as variáveis tempo, Y_{CO_2} , velocidade de agitação e pH. Os melhores resultados foram obtidos tendo como entrada tempo, Y_{CO_2} e velocidade de agitação, no instante presente.

Outras tentativas foram feitas utilizando entradas atrasadas n amostragens (de t a $t-n$), com n variando de 1 a 5. Como não foi observada melhora significativa no desempenho com esse procedimento, optou-se por utilizar apenas dados no tempo presente. A Figura 6.13 mostra o esquema da rede escolhida para a inferência da concentração celular.

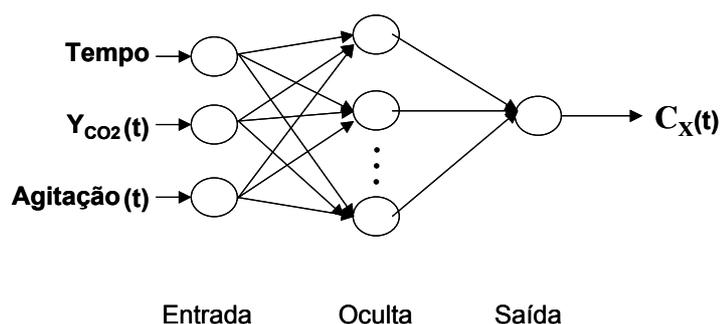


Figura 6.13: Estrutura da rede de inferência.

Ainda com dados de entrada ruidosos, foram realizados testes, acompanhando-se o erro quadrático médio nas etapas de treinamento e validação, variando-se o número de nodos na camada oculta (N_h). Foram usados para treinamento os ensaios 8, 10 e 11 e para validação os ensaios 9, 12 e 14. Observou-se inicialmente que aumentando N_h a inferência para o conjunto de treinamento era muito boa, porém com inferência ruim na validação, clássico teste positivo de sobre-treinamento. O número de elementos na camada oculta foi variado de 2 a 30, de cinco em cinco. O gráfico do erro para o treinamento e validação é mostrado na Figura 6.14.

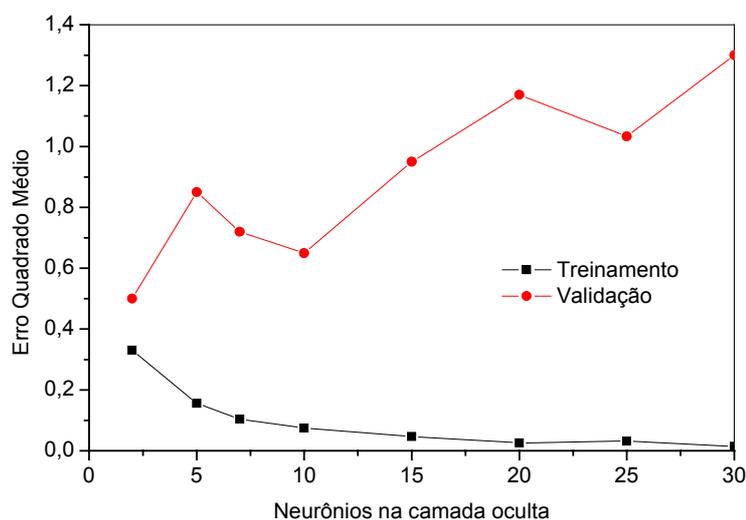
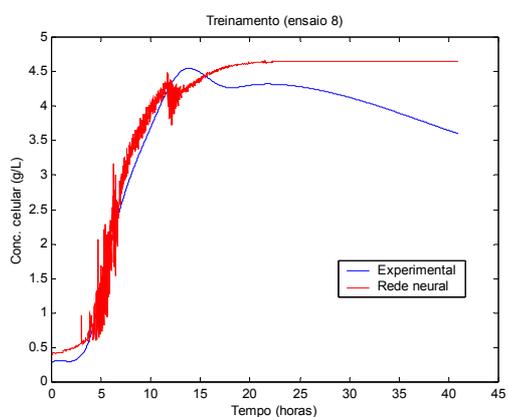


Figura 6.14: Erro quadrado médio para os ensaio de treinamento e de validação (dados ruidosos).

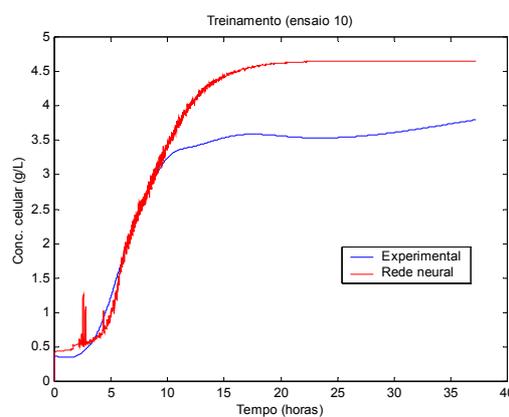
Como observado anteriormente, embora o erro tenda a diminuir com o aumento de nodos durante o treinamento, este aumenta na etapa de validação. A rede sobretreinada perde capacidade de generalização.

Da análise da Figura 6.14 nota-se que os menores erros na etapa de validação foram para $N_h=2$ e $N_h=10$, assim foram realizados treinamento e validação para essas duas condições.

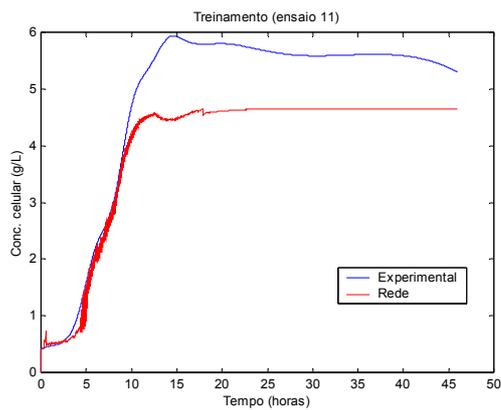
As Figuras 6.15 e 6.16 mostram o resultado do treinamento (ensaio 8, 10 e 11) e da validação (ensaios 9, 12 e 14) para $N_h=2$. Observe que dados ruidosos nas variáveis de entrada da rede produzem uma inferência também ruidosa para a variável de saída. Apesar dos ruídos, observa-se que tanto no treinamento como na validação há uma boa inferência na etapa exponencial do crescimento celular. O inverso ocorre na fase estacionária, onde a rede subestima ou superestima o crescimento celular, tanto na etapa de treinamento como na de validação. Essa rede, com apenas dois neurônios na camada intermediária, consegue perceber o fim do crescimento exponencial mas o baixo nível do sinal de entrada Y_{CO_2} não permite que a massa celular estacionária seja quantitativamente prevista com precisão. Qualitativamente, a rede apreende o fim do crescimento, mas para o baixo nível da velocidade de respiração da fase estacionária, é-lhe impossível discernir com precisão a massa celular (e menos ainda a morte celular).



(A)

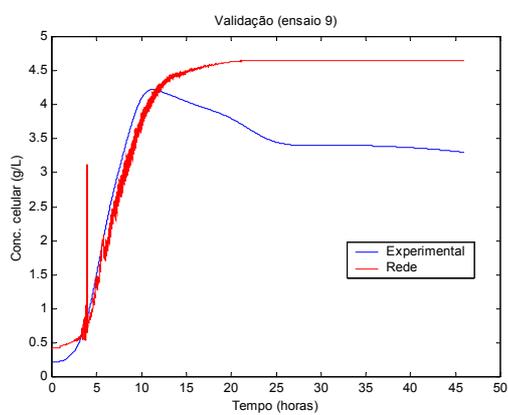


(B)

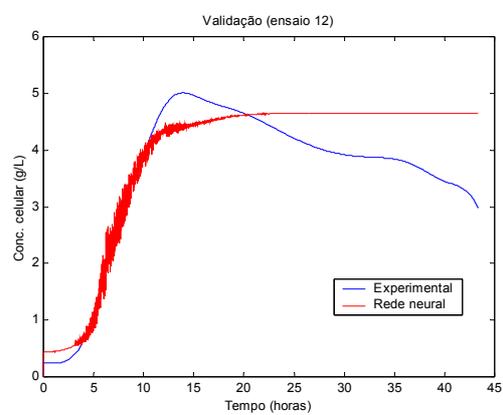


(C)

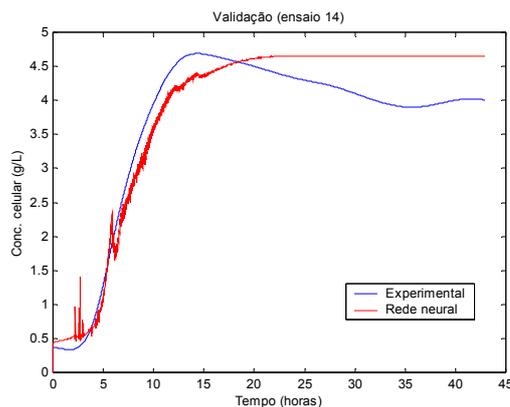
Figura 6.15: Resultado do treinamento para $N_h=2$. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11.



(A)



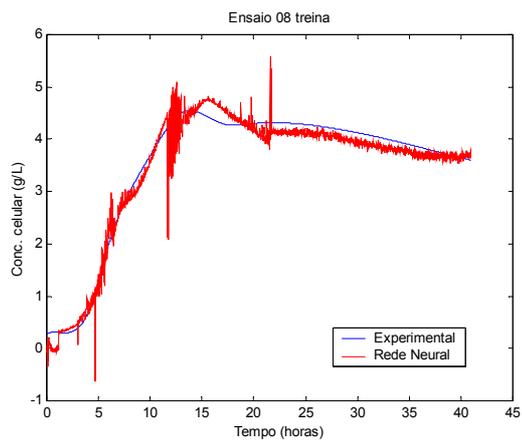
(B)



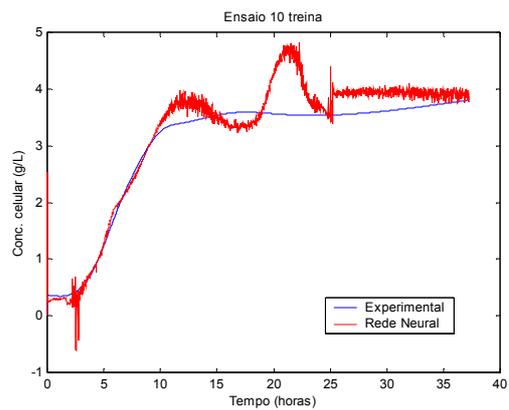
(C)

Figura 6.16: Resultado da validação para $N_h=2$. (A) ensaio 9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14.

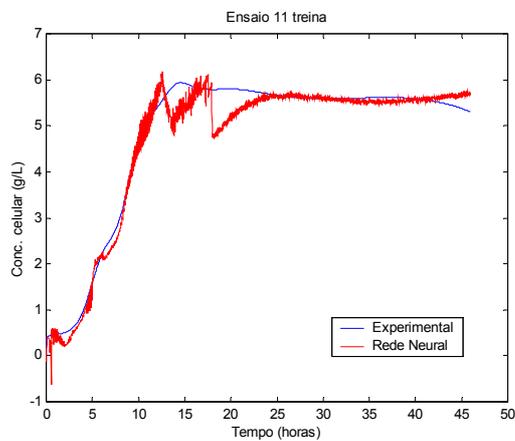
As Figuras 6.17 e 6.18 mostram o resultado do treinamento (ensaio 8, 10 e 11) e da validação (ensaios 9, 12 e 14) para $N_h=10$. Nota-se que com o aumento do N_h há um aumento no ruído (em relação a $N_h=2$). Da mesma maneira que no caso anterior, apesar do aumento do ruído, observa-se que a rede tem um bom desempenho para a fase exponencial do crescimento celular, para o conjunto de treinamento. Porém, na etapa de validação as previsões da rede descolaram dos dados experimentais no meio da fase exponencial, comportamento este esperado levando-se em conta o erro quadrado médio na validação para $N_h=10$.



(A)



(B)



(C)

Figura 6.17: Resultado do treinamento para $N_h=10$. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11.

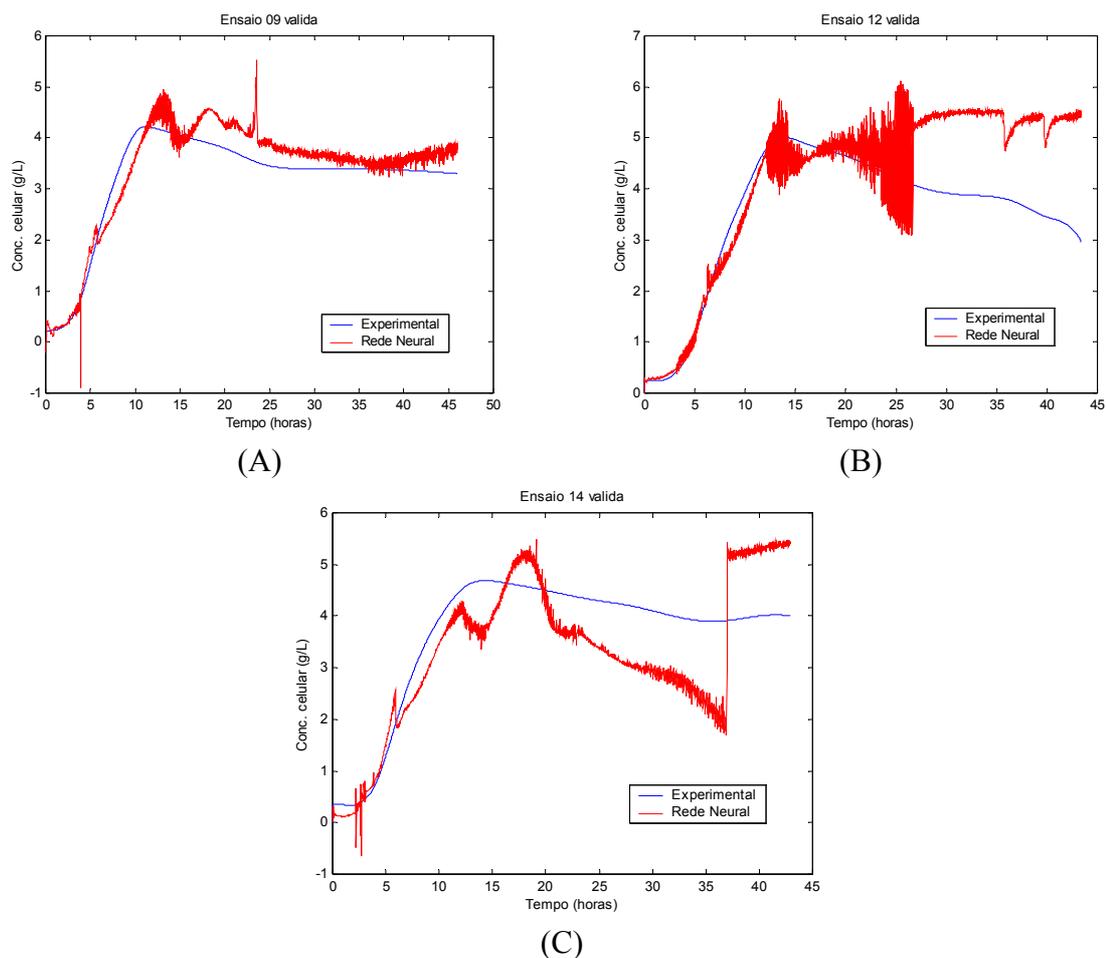


Figura 6.18: Resultado da validação para $N_h=10$. (A) ensaio 9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14.

Os baixos níveis de Y_{CO_2} presentes na fase estacionária (ao redor de 0,20%) começam a aproximar-se da resolução da instrumentação (e, portanto, da sua precisão, de 0,05% de acordo com o fabricante). Com isso, o ruído da instrumentação torna-se cada vez mais significativo. Como essa medida tem papel primordial na identificação, é de se esperar que o algoritmo falhe na fase estacionária. Note-se que o desempenho da rede para o conjunto de treinamento ainda é aceitável (Figura 6.17) mas, para o conjunto de validação fica evidente a interferência do ruído na inferência (Figura 6.18). Fica clara a necessidade de filtrar os dados de entrada neste caso.

6.3.2 Dados de Entrada Filtrados

A arquitetura da rede utilizada para dados ruidosos (Figura 6.13) foi também aplicada neste item. Os dados de entrada utilizados foram inicialmente filtrados pelo algoritmo RRE+MM+RRE, esquematizado na Figura 6.5. Assim como na rede anterior, foi realizado teste para acompanhamento do erro quadrado médio nas etapas de treinamento e validação variando-se o número de nodos na camada oculta (N_h). A Figura 6.19 mostra o gráfico do erro quadrado médio para diferentes valores de N_h .

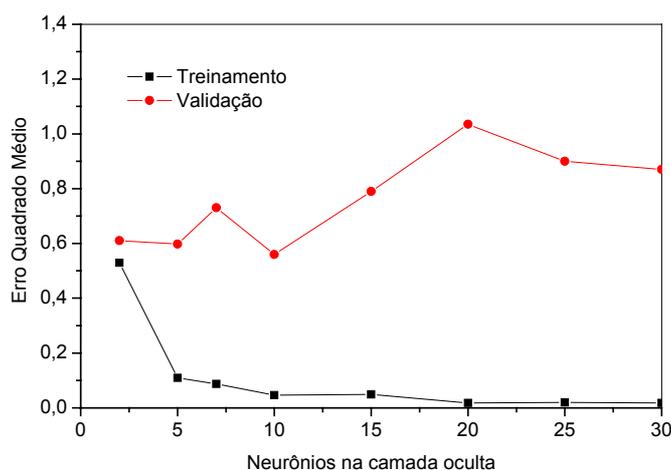


Figura 6.19: Erro quadrado médio para os ensaio de treinamento e de validação (dados de entrada filtrados).

Diferente do resultado usando dados ruidosos, neste os menores valores do erro quadrático médio na validação foram para $N_h=10$. Para melhor comparação com o caso anterior, os ensaios usados no treinamento e na validação foram os mesmos. Os resultados do treinamento são mostrados na Figura 6.20. Semelhantemente aos resultados anteriores (dados ruidosos) a rede apreende bem a dinâmica do processo na fase de crescimento exponencial. No início da fase estacionária a rede não consegue inferir quantitativamente a concentração celular. Após certo tempo, esta volta a inferir de maneira razoável o valor de C_X . Nessa figura, juntamente com os resultados de inferência da massa celular, foi colocada a saída da rede de identificação de fases do crescimento. Esta última consegue indicar com sucesso o término da fase exponencial.

A Figura 6.21 mostra o resultado da validação para esta mesma rede com as bases de dados não utilizadas no treinamento. Pela figura observa-se novamente que a

rede inferiu razoavelmente até o término da fase exponencial, descolando um pouco no final. A partir do término da fase exponencial, indicado pela rede de identificação de fases, a inferência novamente falha.

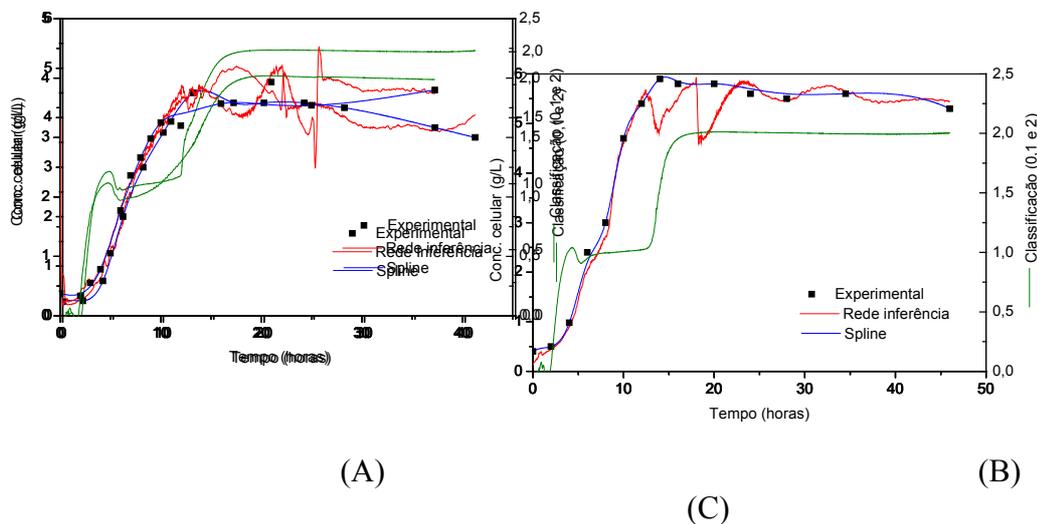
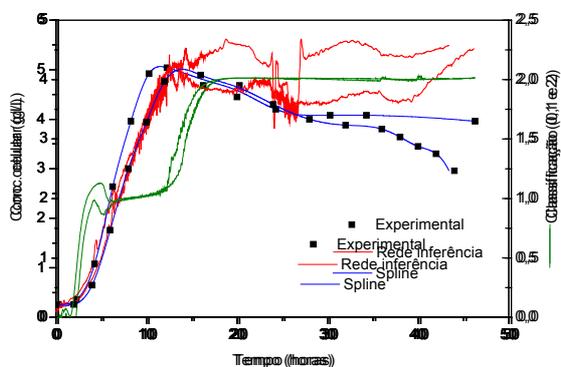


Figura 6.20: Resultado do treinamento para a rede de inferência. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11.

Como já visto, não é de se estranhar a dificuldade da rede em inferir a concentração celular ao final do cultivo. Mas é muito importante salientar que a produção de enzima é associada ao crescimento, com um atraso de aproximadamente duas horas, como se constatou no capítulo anterior. Assim, para todos os efeitos práticos, não se necessita de uma rede que ajuste a fase estacionária. Quando a rede de identificação de fases indicar o fim do crescimento exponencial, qualquer processo industrial deve ser interrompido. Desta forma, é plenamente satisfatório que a rede seja precisa na inferência apenas até o final do crescimento, como é o caso presente.

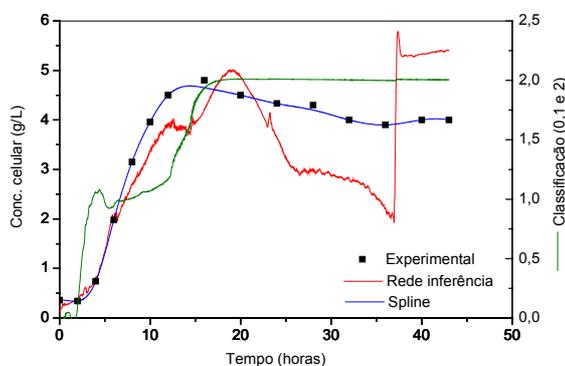
De fato, este é um processo bioquímico complexo e o conjunto de dados disponíveis incluía diferentes modos de operação (batelada e batelada alimentada), com diferentes concentrações de aminoácidos no meio de alimentação, diferentes perfis de aeração, etc. Nessas circunstâncias, os resultados obtidos e a capacidade de generalização da rede de inferência da massa celular se mostram, de fato, muito bons.



(A)



(B)



(C)

Figura 6.21: Resultado da validação para a rede de inferência. (A) ensaio9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14.

Uma vez que não é preciso uma rede de inferência de concentração celular ao longo de todo cultivo, resolveu-se utilizar somente a fase de crescimento (obtida a partir da rede de identificação de fases) para o treinamento e validação da rede. Assim como no treinamento da rede anterior, os resultados desta também foram muito bons. Na validação há algum desvio sistemático, principalmente no final da fase exponencial, mas, de forma geral, a inferência continua de boa qualidade. Os resultados da validação são mostrados na Figura 6.22.

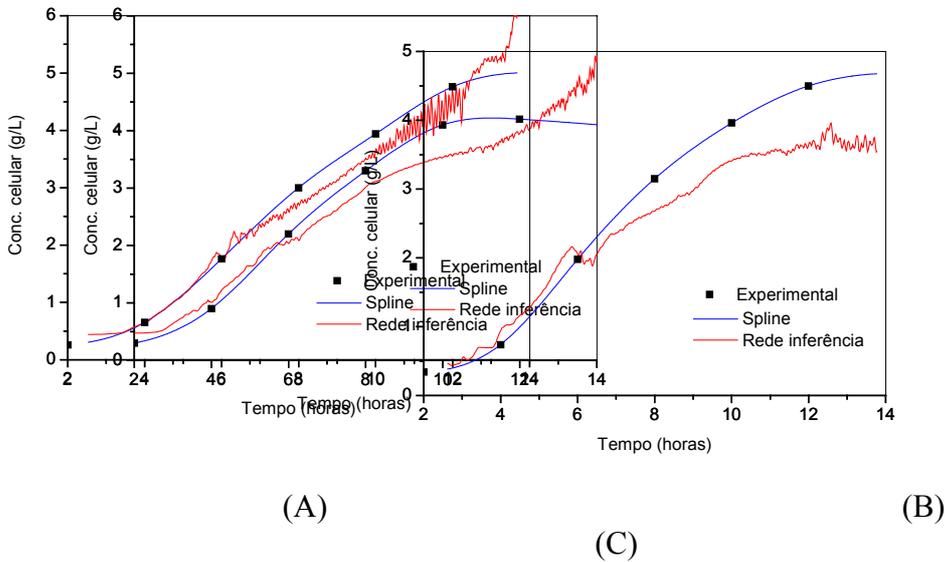
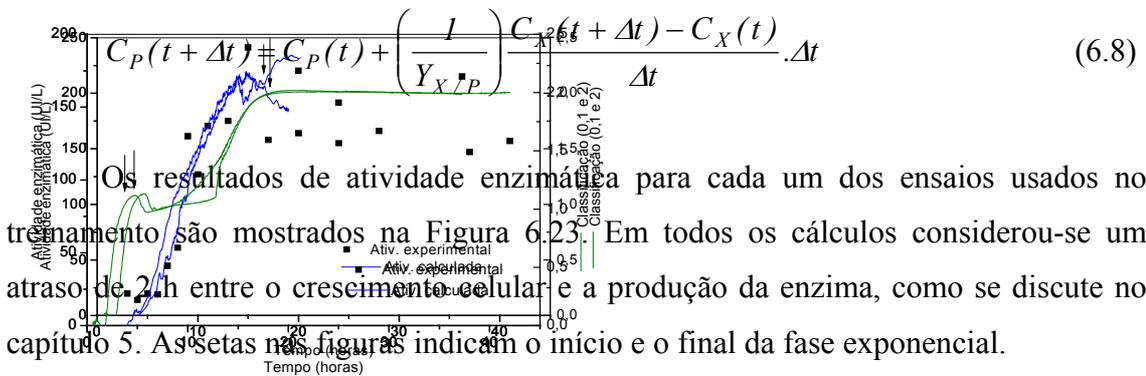


Figura 6.22: Resultado da validação para a rede de inferência da fase exponencial. (A) ensaio 9, (B) ensaio 12 e (C) ensaio 14.

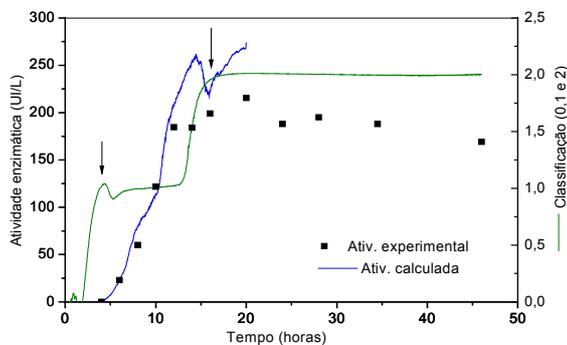
6.4 Inferência da Concentração de Enzima

Tendo disponíveis dados de concentração celular, inferidos pela rede neural do item anterior, lançou-se mão de enfoque híbrido para estimar a concentração de produto (atividade enzimática). Para isto, emprega-se aproximação de primeira ordem. A velocidade de crescimento é aproximada por diferença e, empregando-se o valor de rendimento célula-produto, estimado no capítulo anterior ($Y_{XP} = 0,02$), pode-se obter a velocidade de produção. A estimativa de C_P (UI/L) foi obtida a partir da equação 6.8.



Os resultados de atividade enzimática para cada um dos ensaios usados no treinamento são mostrados na Figura 6.25. Em todos os cálculos considerou-se um atraso de 2h entre o crescimento celular e a produção da enzima, como se discute no capítulo 5. As setas nas figuras indicam o início e o final da fase exponencial.

(A) (B)



(C)

Figura 6.23: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática. (A) ensaio 8, (B) ensaio 10 e (C) ensaio 11.

Os resultados de atividade enzimática para cada um dos ensaios usados na validação são mostrados nas Figuras 6.24, 6.25 e 6.26.

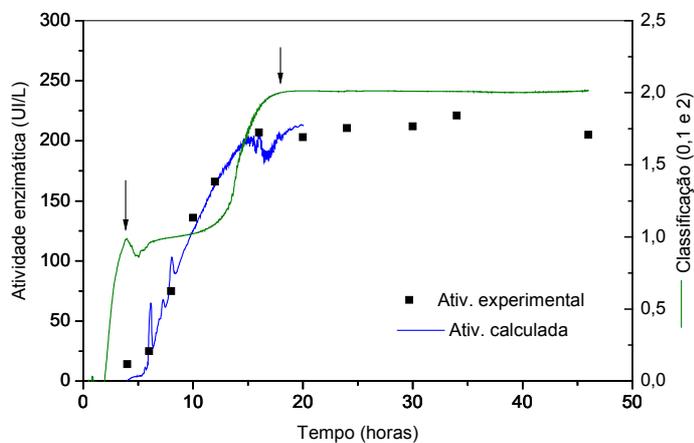


Figura 6.24: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática (equação 6.8). Concentração celular obtida por rede MLP (item 6.3.2). Vetor de entrada: tempo presente, Y_{CO_2} e velocidade de agitação (ambos no instante presente). Medidas filtradas pelo algoritmo RRE+MM+RRE. Início e término da inferência indicados pela rede de identificação de fases de crescimento. Dados do ensaio 9.

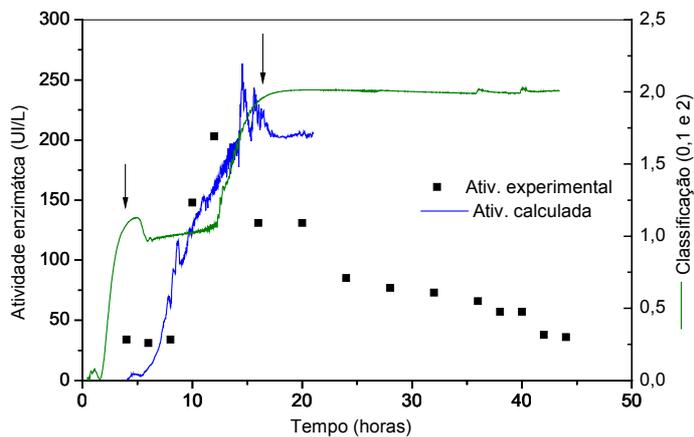


Figura 6.25: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática (equação 6.8). Concentração celular obtida por rede MLP (item 6.3.2). Vetor de entrada: tempo presente, Y_{CO_2} e velocidade de agitação (ambos no instante presente). Medidas filtradas pelo algoritmo RRE+MM+RRE. Início e término da inferência indicados pela rede de identificação de fases de crescimento. Dados do ensaio 12.

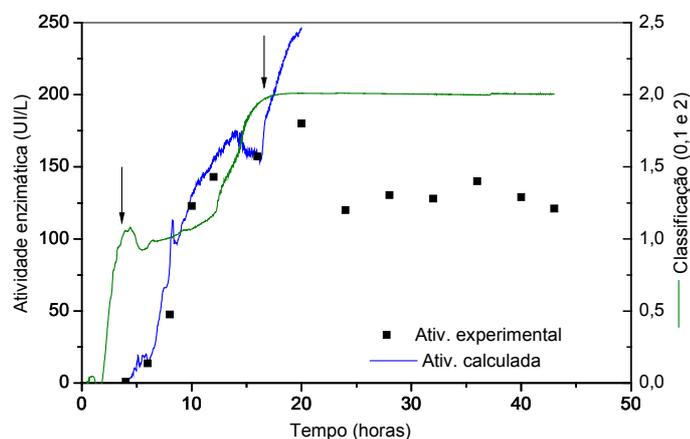


Figura 6.26: Validação do algoritmo de inferência da atividade enzimática (equação 6.8). Concentração celular obtida por rede MLP (item 6.3.2). Vetor de entrada: tempo presente, Y_{CO_2} e velocidade de agitação (ambos no instante presente). Medidas filtradas pelo algoritmo RRE+MM+RRE. Início e término da inferência indicados pela rede de identificação de fases de crescimento. Dados do ensaio 14.

Os resultados obtidos são de boa qualidade, principalmente tendo-se em mente que esses são ensaios de validação *stricto sensu*, pois várias alterações foram feitas entre cada conjunto de ensaios da base de dados (modo de operação do reator, composição do meio, controle de pH, etc). O algoritmo não capturou o início da forte inativação da enzima que se observou no ensaio 12 (um comportamento na verdade atípico). Mas, para todos os efeitos práticos, conclui-se que o algoritmo foi bem sucedido, indicando corretamente o estado metabólico da cultura e inferindo concentrações celulares e de produto de forma muito satisfatória até o final do crescimento, quando a corrida industrial seria interrompida.

6.5 Considerações Finais Sobre o Capítulo

Como os dados provenientes do sistema de aquisição apresentavam ruídos aleatórios foi necessário filtrá-los para serem utilizados na rede de inferência da massa

celular. Após comparação de diferentes filtros, uma alternativa se mostrou bem eficiente: a utilização de duas redes em série, intermediadas por filtro média móvel (Figura 6.5).

Como a rede para inferência utilizando toda a base de dados do cultivo de *Bacillus megaterium* não foi eficiente para prever quantitativamente todo cultivo microbiano, optou-se por utilizar uma rede de classificação de fases de crescimento para indicar o momento inicial e final da fase exponencial. Identificando o final do crescimento exponencial, esta rede indicaria também o momento para se finalizar o ensaio. Os resultados das simulações indicaram que o algoritmo foi bem sucedido nesta tarefa.

Finalmente, utilizou-se um algoritmo híbrido para estimar a concentração de produto a partir da resposta de rede de inferência de massa celular, e usando informações levantadas durante o ajuste de modelos não-estruturados de crescimento (capítulo 5): o fato da produção ser associada ao crescimento, mas com atraso de cerca de 2h e o coeficiente pseudo-estequiométrico $Y_{X/P}$. Os resultados obtidos foram muito satisfatórios, permitindo determinar essas duas variáveis primárias (C_X e C_P) a partir de medidas em tempo real.

7. Conclusões

Os resultados experimentais de produção de penicilina G acilase (PGA) por *Bacillus megaterium* realizados no período de desenvolvimento deste trabalho serviram como base para a proposição de modelos cinéticos não-estruturados e para desenvolvimento de algoritmos de inferência de estado com redes neurais.

Nos ensaios realizados na primeira etapa de corridas experimentais, a atividade enzimática não ultrapassou os 100UI/L e os valores de μ_{max} ficaram bem abaixo dos encontrados na literatura para bactérias. Embora não sendo utilizadas na etapa de modelagem e nem no treinamento das redes de inferência, as informações obtidas a partir desses ensaios foram essenciais para o planejamento dos ensaios que se seguiram. Entre as principais informações estavam:

- Tempo de cultivo: a redução do ensaio de 72 horas para 24 horas não afetou os valores de atividade enzimática na etapa de produção, permitindo assim otimizar o tempo total de cultivo.
- Estocagem do microrganismo: a estocagem do microrganismo em criotubos mostrou-se uma boa técnica de preservação, conservando a cultura por tempos prolongados.
- Adição de nutrientes: adição de sais, tanto no meio de germinação como no de produção, contribuiu para um maior crescimento celular e produção da enzima. A presença de soro de queijo revelou-se essencial para aumentar a produção de enzima. Este provavelmente contém algum(s) micronutriente(s) essencial(is). Glicose e glicerol foram consumidos preferencialmente pelo microrganismo, mas sem aumentar atividade enzimática medida no meio ao final de cada ensaio.

Nos ensaio da segunda etapa, quando se substituiu a caseína hidrolisada enzimaticamente, que contém preferencialmente peptídeos, por aminoácidos livres, houve uma elevação da atividade enzimática mesmo com menor crescimento celular (com conseqüente aumento da atividade específica). Os aminoácidos, por serem moléculas mais simples, mostraram-se facilmente assimiláveis e metabolizáveis. Nesta etapa, os resultados indicaram que o crescimento do microrganismo em uma solução de

aminoácidos de 10g/L (ao invés do hidrolisado enzimático de caseína), na presença de soro de queijo, sais e AFA, levava a atividades enzimáticas em torno de 200UI/L.

Com os ensaios realizados nesta segunda etapa foi possível propor três modelos cinéticos para descrever o crescimento do *B. megaterium*, o consumo de substrato e a produção da enzima. As propostas levaram em conta a presença de um ou mais substrato(s) limitante(s). Na primeira proposta de modelo, aminoácidos e AFA foram agrupados em um substrato único. Na segunda, os aminoácidos foram considerados como um substrato e AFA como outro, havendo assim dois substratos limitantes. Na terceira, os aminoácidos consumidos preferencialmente (aa+) foram considerados como um substrato, os consumidos mais lentamente (aa-) foram considerados como outro e AFA como um terceiro.

Nas três propostas, a validação (usando um quarto ensaio batelada) mostrou que os modelos descrevem qualitativamente de forma aceitável o consumo do(s) substrato(s), mas não apresentam boa concordância com os dados de concentração celular. Conclui-se assim que as propostas apresentadas foram demasiadamente simplificadas para descrever o complexo sistema de produção de PGA por *Bacillus megaterium*.

Finalmente, uma série de ensaios em bioreator serviu de base para desenvolvimento e validação de algoritmo para inferir a massa celular e a concentração de enzima no meio a partir de variáveis secundárias, medidas em tempo real (fração molar de CO₂ nos gases de escape e velocidade de agitação). O alto nível de ruído da instrumentação impôs a necessidade de um filtro dos sinais adquiridos (pH, frações molares de CO₂ e O₂ nos gases de escape, O₂ dissolvido, velocidade de agitação). Para tanto, foi desenvolvida uma concepção não-convencional de filtro, combinando uma rede neural recorrente, seguida de um filtro média móvel e de outra rede recorrente (RRE+MM+RRE). Essa configuração mostrou-se robusta e eficiente.

As características do processo não favoreceram o uso de uma rede neural única para inferir a massa celular em toda a extensão do cultivo. Assim, lançou-se mão de uma rede MLP para identificação de padrão, que forneceu indicações de boa precisão quanto ao término de cada uma das fases do cultivo microbiano: lag, exponencial e estacionária/morte. O cultivo deve ser interrompido cerca de duas horas após a fase exponencial, cujo término é sinalizado por essa rede.

Para inferência da concentração celular durante a fase de crescimento, empregou-se outra rede MLP, com bons resultados. A rede foi validada frente a um conjunto de ensaios diferentes entre si e com relação ao conjunto-base de treinamento, no que se refere a vários aspectos: do modo de operação do reator, à concentração de nutrientes até o controle de pH e da aeração. Tendo isso em mente, pode-se afirmar que, mesmo do ponto de vista quantitativo, os resultados foram muito promissores.

Por fim, a concentração de produto (atividade de PGA no meio de cultura) foi estimada através de enfoque híbrido, usando a velocidade de crescimento inferida pela rede MLP acoplada ao fator de rendimento célula-produto estimado no ajuste dos modelos não-estruturados. Outra informação importante utilizada neste último algoritmo foi o fato da produção ser associada ao crescimento, mas com atraso de 2h. Novamente, os resultados quantitativos do algoritmo de inferência do produto foram muito satisfatórios.

De forma geral, este trabalho mostrou que o uso de algoritmos baseados em técnicas de inteligência artificial é muito promissor para inferência de estado de bioreatores, mas o desenvolvimento de aplicativos em casos específicos é extremamente laborioso. Dificilmente haverá um enfoque genérico para esse problema, dada a enorme diversidade dos processos bioquímicos. A obtenção de algoritmos robustos e confiáveis será consequência, assim, de um trabalho metódico, do tipo tentativa-e-erro. Neste caso específico, poder-se-iam sugerir inúmeras outras topologias de rede, associadas ou não a modelos fenomenológicos ou a modelos estocásticos em geral. Há ampla e continuamente crescente literatura a respeito que, certamente, não se esgotará em futuro previsível.

7.1 Sugestões

Como continuidade deste trabalho propõe-se:

- Utilização de outros métodos de preservação de microrganismo como a liofilização;
 - Estudos de outras topologias de rede;
 - Utilização de enfoques híbridos: neuro-fenomenológico e neuro-fuzzy-fenomenológico;-
- Implementação das estratégias desenvolvidas no sistema supervisor.

Referências Bibliográficas

- Acevedo, F.; Cooney, C.L. Penicillin Amidase Production by *Bacillus megaterium*, Biotechnology and Bioengineering, **15**: 493-503, 1973.
- Acuña, G.; Latrille, E.; Béal, C.; Corrieu, G. Static and Dynamic Neural Models for Estimating Biomass Concentration during Thermophilic Lactic Acid Bacteria Batch Cultures. Journal of Fermentation and Bioengineering, **85**(6), 615-622, 1998.
- Alvaro, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Blanco, R. M.; Guisàn, J.M. Immobilization - Stabilization of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 181-195, 1990.
- Anderson, J.A. An Introduction to Neural Networks. Cambridge, USA, The MIT Press, 650p, 1995.
- Araújo, M.L.G.C. Estudo Cinético do Processo de Produção de Cefalosporina C com Células Livres e Imobilizadas de Cephalosporium acremonium ATCC 48272. São Carlos, UFSCar, 1996. 189p (Tese).
- Bailey, J.E.; Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. New York, USA, McGraw-Hill Book Company, 984p, 1986.
- Bailey, D.L; Thompson, D. Developing Neural-Network Applications. AI Expert, **5**(9), 34-41, 1990.
- Balasingham, K.; Warburton, D.; Dunnill, P.; Lilly, D. The Isolation and Kinetics of Penicillin Amidase from *Escherichia Coli*. Biochimica ET Biophysica Acta, 250-256, 1972.
- Baughman, D.R.; Liu, Y.A. Neural Networks in Bioprocessing and Chemical Engineering, Academic Press, California, USA, 1995.
- Berazaín, J.G.H.Q. Estudo sobre a Utilização de Soro de Queijo na Produção da Penicilina G Acilase por Bacillus megaterim ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 97p (Dissertação).
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, USA, 1974.
- Blanch, H.W; Clark, D.S. Biochemical Engineering. New York, USA, Marcel Dekker, 700p, 1997.
- Bonvin, D.; Vallière, P.; Rippin, D.W.T. Application of Estimation Techniques to Batch Reactors – I. Modelling Thermal Effects. Computers and Chemical Engineering, **13**(1/2), 1-9, 1989.
- Bradford, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, **72**, 248-254, 1976.
- Brass, J.M.; Hoeks, F.W.J.M.M.; Rohner, M. Application of modelling Techniques for the Improvement of Industrial Bioprocess. Journal of Biotechnology, **59**, 63-72, 1997.
- Bruggink, A.; Roos, E.C.; Vroom, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. Organic Process Research & Development, **2**(2), 128-133, 1998.
- Caudil, M. Neural Network Training Tips and Techniques. AI Expert, **6**(1), 56-61, 1991.

- Chase, H.A.; Shepherd, S.T.; Reynolds, P.E. Studies on the Penicillin-Binding Components of *Bacillus megaterium*. FEBS Letters, 76(2), 199-203, 1977.
- Chaudhuri, B.; Modak, J.M. Optimization of Fed-Batch Bioreactor Using Neural Network Model. Bioprocess Engineering, 19, 71-79, 1998.
- Chen, L.; Bernard, O.; Bastin, G.; Angelov, P. Hybrid Modelling of Biotechnological Process Using Neural Network. Control Engineering Practice, 8, 821-827, 2000.
- Chiang, C.; Bennett, R.E. Purification and Properties of Penicillin Amidase from *Bacillus megaterium*. Journal of Bacteriology, 93(1), 302-308, 1967.
- Costa, A.C.; Henriques, A.S.W.; Alves, T.L.M.; Maciel Filho, R.; Lima, E.L. A Hybrid Neural Model for the Optimization of Fed-Batch Fermentations. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 16(01), 53-63, 1999.
- Cruz, A.J.G.; Giordano, R.C.; Hokka, C.O. Fed-Batch Penicillin Bioreactor Modeling: Effect of Shear Forces on Process Kinetics. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 12(4), 208-227, 1995.
- Cruz, A.J.G. Modelagem Fenomenológica e Simulação por Redes Neurais do Bioprocesso de Produção da Penicilina-G. São Carlos, UFSCar, 1996. 113p (Dissertação).
- Cruz, A.J.G.; Araujo, M.L.G.; Giordano, R.C.; Hokka, C.O. Phenomenological and Neural Network Modelling of Cephalosporin C Production Bioprocess. Appl. Biochem. Biotechnol., 70-71, 579-592, 1998.
- Cruz, A.J.G. Estudo de Produção de Cefalosporina C com Acompanhamento em linha de variáveis do Processo. São Carlos, UFSCar, 2000. 236p (Tese).
- Di Massimo, C.; Montague, G.A.; Willis, M.J.; Tham, M.T.; Morris, A.J. Towards Improved Penicillin Fermentation via Artificial Neural Network. Computers and Chemical Engineering, 16(4), 283-291, 1992.
- Done, S.H.; Brannigan, J.A.; Moody, P.C.E.; Hubbard, R.E. Ligand-induced Conformational Change in Penicillin Acylase. J. Mol. Biol., 284, 463-475, 1998.
- Duggleby, H.J.; Tolley, S.P.; Hill, C.P.; Dodson, E.J.; Dodson, G.; Moody, P.C.E. Penicillin Acylase has a Single-amino-acid Catalytic Centre. Nature, 373, 264-268, 1995.
- Farza, M.; Hammouri, H.; Jallut, C.; Lieto, J. State Observation of a Nonlinear System: Application to (Bio) Chemical Processes. AIChE Journal, 45(1), 93-106, 1999.
- Ferreira, E.M.F.C. Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos. Universidade do Porto, Porto, Portugal, 1995. 295p (Tese).
- Fonseca, V.V. Influência da Rotação na Produção de Penicilina G em Reator Convencional. São Carlos, UFSCar, 1992. (Dissertação).
- Gentina, J.C.; Acevedo, F.; Villagra, M.P. Short Communication: Effect of Complex Nitrogen Sources on the Production of Penicillin Acylase by *Bacillus megaterium*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 127-128, 1997.
- Gomes, T.C. Aquisição de Dados do Cultivo de *Bacillus megaterium* com vistas à produção de Penicilina G Acilase (PGA). São Carlos, UFSCar, 2002. (Trabalho de Graduação).

- Grewal, M.S.; Andrews, A.P. Kalman Filter. Theory and Practice. New Jersey, EUA, Prentice Hall, 381p, 1993.
- Guan, Y.; Wu, X. Y.; Treffry, T. E.; Lilley, T. H. Studies on the Isolation of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* by Aqueous Two-Phase Partitioning. Biotechnology and Bioengineering, 40, 517-524, 1992.
- Harrison, F.G.; Gibson E.D. Approaches for Reducing the Manufacturing Costs of 6-Aminopenicillanic Acid. Process Biochemistry, 33-36, 1984.
- Hartree, E.F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry that Gives a Linear Photometric Response. Analytical Biochemistry, 48, 422-427, 1972.
- Hassoun, M.H. Fundamentals of Artificial Neural Network. Cambridge, USA, The MIT Press, 1995.
- Henriques, A.W.S.; Costa, A.C.; Alves, T.L.M.; Lima, L.E. Optimization of Fed-Batch Process: Challenges and Solutions. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 16(02), 171-177, 1999.
- Hilton, G. E. How Neural Networks Learn from Experience. In: Scientific American, 105-109, 1992.
- Himmelblau, D.M. Process Analysis by Statistical Methods. New York, John Wiley & Sons, 1970.
- Hiss, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: Biotecnologia Industrial, v.2. Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, Brasil, 541p, 2001.
- Hojo, O. Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 123p (Tese).
- Hoskins, J.C e Himmelblau, D.M. Artificial Neural Network Models of Knowledge Representation in Chemical Engineering. Computers and Chemical Engineering, 12(9/10), 881-890, 1988.
- Hussain, M.A. Review of the Applications of Neural Network in Chemical Process Control - Simulation and Online Implementation. Artificial Intelligence in Engineering, 13, 55-68, 1999.
- Illanes, A. Biotecnologia de Enzimas. Valparaíso, Chile, Ediciones Universitarias de Valparaíso, 254p, 1994.
- Illanes, A.; Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Reyes, I.; Torres, R.; Cartagena, O.; Ruiz & M, A. Production of Penicillin Acylase from *Bacillus megaterium* in Complex and Defined Media. Process Biochemistry, 29, 263-270, 1994.
- Inocência, G.E.M. Influência do Soro de Queijo na Produção de PGA por *Bacillus megaterium*. São Carlos, UFSCar, 2002. (Trabalho de Graduação).
- Kang, J.H.; Hwang, Y.; Yoo, O. J. Expression of Penicillin G Acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus Subtilis*. Journal of Biotechnology, 17, 99-108, 1991.
- Konstantinov, K.B. Monitoring and Control of the Physiological State of Cell Cultures. Biotechnology and Bioengineering, 52, 271-289, 1996.
- Lau, C.G.Y. Neural Network, I: Theory and Modeling. Proceedings of the IEEE, 78(9), 1411-1413, 1990.
- Lau, C.G.Y.; Widrow, B. Neural Network, II: Analysis, Techniques and Applications. Proceedings of the IEEE, 78(10), 1547-1549, 1990.
- Lawrence, P.J. Penicillin: Reversible Inhibition of Forespore Septum Development in *Bacillus megaterium* cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 6(6), 815-820, 1974.

- Lednický, P.; Mészáros, A. Neural Network Modeling in Optimisation of Continuous Fermentation Processes. Bioprocess Engineering, 18, 427-432, 1998.
- Lee, S. C.; Hwang, Y. B.; Chang, H. N.; Chang, Y. K. Adaptive Control of Dissolved Oxygen Concentration in a Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 37, 597-607, 1991.
- Lim, H. C.; Lee, K. S. Process Control and Optimization. In: Bioprocess Monitoring and Control, edited by M-N Pons, Hanser Ed., Munique, 1991.
- Linko, S.; Luopa, J.; Zhu, Y.-H. Neural Network as 'software sensors' in Enzyme Production. Journal of Biotechnology, 52, 257-266, 1997.
- Linko, S.; Zhu, Y.-H.; Linko, P. Applying Neural Network as Software Sensors for Enzyme Engineering. TRENDS in Biotechnology, 17(4), 155-162, 1999.
- Martín, L.; Prieto, M.A.; Cortés, E.; García, J.L. Cloning and Sequencing of the *pac* Gene Encoding the Penicillin G Acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. FEMS Microbiology Letters, 125, 287-292, 1995.
- McCullough, J.E. Gene Cloning in Bacilli Related to Enhanced Penicillin acylase production. Bio/Technology, 879-882, 1983.
- Meevootisom, V.; Saunders, J.R. Cloning and Expression of Penicillin Acylase Genes from Overproducing Strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. Appl. Microbiol Biotechnol., 25, 372-378, 1987.
- Meleiro, L.A.C. Aplicação de Técnicas de Tratamento e Análise de Sinais Adquiridos pelo Sistema Supervisório da Produção de Cefalosporina C em Regime de Batelada Alimentada. São Carlos, UFSCar, 1998. 157p (Dissertação).
- Modak, J.M.; Lim, H.C. Optimal Mode of Operation of Bioreactor for Fermentation Process. Chemical Engineering Science, 47, 15/16, 3869-3884, 1992.
- Murao, S.; Sakaguchi, K.; Kono, K. Process for Preparing 6-Aminopenicillanic Acid by *Bacillus megaterium*, U.S. Patent 3,144,395, 1964.
- Nielsen, J.; Villadsen, J. Bioreactors: Description and Modelling. In: Biotechnology, edited by H.-J. Rehm and G. Reed in cooperation with A. Puhler and P. Stadler, VCH, Federal Republic of Germany, 1993.
- Nielsen, J. Simulation of Bioreactions. Computers Chem. Engng., 18, Suppl. S615-S620, 1994.
- Nucci, E.R. Aplicação da Lógica Fuzzy no Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. 115p (Dissertação).
- Parmar, A.; Kumar, H.; Marwaha, S.S. e Kennedy, J.F. Advances in Enzymatic Transformation of Penicillins to 6-Aminopenicillanic Acid (6-APA). Biotechnology Advances, 18, 289-301, 2000.
- Pham, D.T. An introduction to Artificial Neural Networks. In: Neural Networks for Chemical Engineers, edited by A.B. Bulsari, Elsevier Science B.V., Netherlands, 1995.
- Patnaik, P.R. Neural Control of an Imperfectly Mixed Fed-Batch Bioreactor for recombinant β -galactosidase. Biochemical Engineering Journal, 3, 113-120, 1999.
- Pelczar Jr., M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. Microbiologia – Conceitos e Aplicações (Volume 1), Makron Books LTDA, São Paulo, Brasil, 1997.

- Pinotti, L.M. Estudo da Produção, Purificação e Imobilização de Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterim* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1999. 103p (Dissertação).
- Pinotti, L.M. Produção e Purificação de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterim* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. 230p (Tese).
- Psichogios, D.C.; Ungar, L.H. A Hybrid Neural Network-First Principles Approach to Process Modeling. AICHE Journal, 38(10), 1499-1511, 1992.
- Ramirez, W.F. Optimal State and Parameter Identification. An Application to Batch Fermentation. Chemical Engineering Science, 42(11), 2749-2756, 1987.
- Robas, N.; Zouheiry, H.; Bralant, G.; Bralant, C. Improved Penicillin Amidase Production Using a Genetically Engineered Mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. Biotechnology and Bioengineering, 41, 14-24, 1993.
- Ruck, D.W.; Rogers, S.K.; Kabrisky, M.; Maybeck, P.S.; Oxley, M.E. Comparative Analysis of Backpropagation and the Extended Kalman Filter for Training Multilayer Perceptrons. IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell, 14(6), 686-691, 1992.
- Rumelhart, D.E.; McClelland, J.L. and Research Group Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition, vol.I, cap.8. MIT, Cambridge, MA, 1986.
- San, K.Y.; Stephanopoulos, G. Studies on On-Line Bioreactor Identification. II. Numerical and Experimental Results. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1189-1197, 1984.
- Savidge, T. A.; Cole, M. Penicillin Acylase (bacterial). Methods in Enzymology, 43, 705-721, 1975.
- Savidge, T.A. Enzymatic Conversions used in the Production of Penicillins and Cephalosporins. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics, edited by Vandame, E. J., Ed. Marcel Dekker, 1984.
- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. e Borzani, W. Biotecnologia Industrial- v.2- Engenharia Bioquímica, Editora Edgard Blucher LTDA, Brasil, 2001.
- Schügerl, K. Common Instruments for Process Analysis and Control. In: Biotechnology-Measuring, Modeling and Control, edited by H.-J Rehm e G. Reed, VCH, New York, 1991.
- Seborg, D.E.; Edgar, T.F.; Mellichamp, D.A. Process Dynamics and Control. New York, EUA, John Wiley & Sons, 717p, 1989.
- Senthilvel, S.G.; Pai, J.S. Purification of Penicillin Acylase of *Bacillus megaterium*. Biotechnology Techniques, 10(8), 611-614, 1996.
- Shene, C.; Diez, C.; Bravo, S. Neural Network for the Prediction of the State of *Zymomonas mobilis* CP4 Batch Fermentations. Computers and Chemical Engineering, 23, 1097-1108, 1999.
- Shewale J.W.; Sivaraman, H. Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA. Process Biochemistry, 146-154, 1989.
- Shimizu, H.; Takanatzu, T.; Shioya, S.; Suga, K. I. An Algorithmic Approach to Constructing the On Line Estimation System for the Specific Growth Rate. Biotechnology and Bioengineering, 33, 354-364, 1988.
- Shimizu, H.; Yasuoka, K.; Uchiyama, K.; Shioya, S. Bioprocess Fault Detection by Nonlinear Multivariate Analysis: Application of an Artificial Autoassociative Neural Network and Wavelet Filter Bank. Biotechnol. Prog., 14, 79-87, 1998.

- Shuler, M.L.; Kargi, F. Bioprocess Engineering - Basic Concepts. New Jersey, USA, Prentice Hall, 479p, 1992.
- Smith, S.W. (1999), The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing. Califórnia Technical Publishing, San Diego, CA, USA.
- Somogyi, M. Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem., 195(1), 19-23, 1952.
- Son, H.; Mheen, T.; Seong, B.; Han, M.H. Studies on microbial Penicillin Amidase (IV) the Production of Penicillin Amidase from a Partially Constitutive Mutant of *Bacillus megaterium*. J. Gen. Appl. Microbiol., 28, 281-291, 1982.
- Sorosh, M. State and Parameter Estimations and their Applications in Process Control. Computers and Chemical Engineering, 23, 229-245, 1998.
- Souza, V.R. Requerimentos Nutricionais na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. 121p (Dissertação).
- Sousa Jr., R. Aplicação da Lógica Nebulosa ("Fuzzy") no Controle de Reatores Bioquímicos para a Produção da Cefalosporina C em Regime Batelçada Alimentada. São Carlos, UFSCar, 1999. 143p (Dissertação).
- Stanbury, P.F.; Whitaker, A.; Hall, S.J. Principles of Fermentation Technology. Great Britain, Butterworth Heinemann, 357p, 1999.
- Stein, R. Selecting Data for Neural Networks. AI Expert, 43-47, 1993.
- Stephanopoulos, G.; San, K.Y. Studies on On-Line Bioreactor Identification. I. Theory. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1176-1188, 1984.
- Suga, K.; Shiba, Y.; Sorai T.; Shioya, S.; Ishimura, F. Reaction Kinetics and Mechanism of Immobilized Penicillin Acylase from *Bacillus megaterium*. Ann. NY Acad. Sci., 613, 808-815, 1990.
- Swartz, R. W. Penicillins. In: Moo-Young, M., Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press, Oxford, v. 3, p. 7, 47, 1985.
- Syu, M-J.; Tsao, G.T. Neural Network Modeling of Batch Cell Growth Pattern. Biotechnology and Bioengineering, 42, 376-380, 1993.
- Syu, M-J; Chang, J.B. Recurrent Backpropagation Neural Network Adaptive Control of Penicillin Acylase Fermentation by *Arthrobacter viscosus*. Ind. Eng. Chem. Res., 36, 3756-3761, 1997.
- Syu, M-J; Chang, J.B. Recurrent Backpropagation Neural Network Adaptive Control of Penicillin Acylase Fermentation by *Arthrobacter viscosus*. Ind. Eng. Chem. Res., 36, 3756-3761, 1997.
- Thibault, J.; Breusegem, V.V.; Chéry, A. On-Line Prediction of Fermentation Variables Using Neural Network. Biotechnology and Bioengineering, 36,1041-1048, 1990.
- Valle, F.; Balbás, P.; Merino, E; Bolivar, F. The Role of Penicillin Amidases in Nature and in Industry. TIBS 16, 36-40, 1991.
- Vallièrè, P.; Bonvin, D. Application of Estimation Techniques to Batch Reactors – II. Experimental Studies in State and Parameter Estimation. Computers and Chemical Engineering, 13(1/2), 11-20, 1989.

- van Can, H.J.L.; te Braake, H.A.B.; Hellinga, C.; Luyben, K.C.A.M.; Heijnen, J.J. An Efficient Model Development Strategy for Bioprocesses Based on Macroscopic Balances. *AIChE Journal*, 42(12), 3403-3418, 1996.
- van Can, H.J.L.; te Braake, H.A.B.; Hellinga, C.; Luyben, K.C.A.M.; Heijnen, J.J. An Efficient Model Development Strategy for Bioprocesses Based on Macroscopic Balances. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(6), 550-566, 1997.
- Vandamme, E.J.; Voets, J.P. *Adv. Appl. Microbiol.* 1974, apud SEBEK, O. K. *Biotechnology*, 6, cap.7, 1987.
- Vary, P.S. Prime Time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 140, 1001-1013, 1994.
- Villadsen, J. Simulation of Biochemical Reaction. *Computers and Chemical Engineering*, 13(4/5), 385-395, 1989.
- Visnard, C. *Estudo de Alguns Aspectos do Processo de Produção da Penicilina G Acilase por Bacillus megaterium ATCC 14945*. São Carlos, UFSCar, 1997. (Dissertação).
- Whitaker, A. Fed-batch Culture. *Process Biochemistry*, 15, 10-15, 1980.
- Widrow, B.; Lehr, M.A. 30 Years of Adaptive Neural Networks: Perceptron, Madaline and Backpropagation. *Proceedings of IEEE*, 78(9), 1415-1442, 1990.
- Wilson, D.I.; Agarwal, M.; Rippin, D.W.T. Experiences Implementing the Extend Kalman Filter on an Industrial Batch Reactor. *Computers and Chemical Engineering*, 22(11), 1653-1672, 1998.
- Yamane, T e Shimizu, S. Fed-batch Techniques in Microbial Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 30, 148-194, 1984.