

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

**APLICAÇÃO DA LÓGICA FUZZY NA PRODUÇÃO DE**  
**PENICILINA G ACILASE EM CULTIVOS DE *Bacillus megaterium***

Autor: Edson Romano Nucci

**SÃO CARLOS – SP**

**2003**

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

**APLICAÇÃO DA LÓGICA FUZZY NA PRODUÇÃO DE**  
**PENICILINA G ACILASE EM CULTIVOS DE *Bacillus megaterium***

Autor: Edson Romano Nucci

Orientador: Prof. Dr. Antonio J. G Cruz

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Engenharia Química, na área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**SÃO CARLOS – SP**

**2003**

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

N963aL

Nucci, Edson Romano.

Aplicação da lógica fuzzy na produção de penicilina G  
Acilase em cultivos de *Bacillus megaterium* / Edson Romano  
Nucci -- São Carlos : UFSCar, 2003.

138 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2003.

1. Biotecnologia. 2. Lógica nebulosa. 3. Soft sensing.  
4. Aquisição de banco de dados. 5. Sistema supervisorio. 6.  
Penicillina G Acilase. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Dedico este trabalho ao meu pai Nelson Nucci  
e a minha mãe Aurea T. Hübner Nucci.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz pela excelente orientação, pela amizade e pela confiança no meu trabalho. Obrigado.

À professora Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, Professor Dr. Roberto de Campos Giordano e a Professora Dra. Maria Lúcia G. C. Araújo pelos esclarecimentos dados, os quais muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.

As amigas de laboratório, Rosineide G. Silva, Laura M. Pinotti e em especial a Vanessa R. Souza, pela amizade, pela confiança e pela total ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Ao amigo Tony pelo intenso auxílio na implementação do algoritmo *Fuzzy* em linguagem *Visual Basic (VB)*.

Aos amigos da república, Ana Paula, Karina, Odilon e Tatiana pela convivência, pelo apoio e pelos momentos de descontração presentes nesses anos de amizade.

A todos os amigos da pós-graduação especialmente, Kamilla, Juliana, Marcelo V., Angélica, Paulo, Andréa, Célia, Marcelo R., Anny, Grezielly, Amauri e Álvaro pelo apoio, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

Índice de Figuras .....	i
Índice de Tabelas .....	vii
Resumo .....	x
Abstract .....	xi
<b>1</b> Introdução.....	01
<b>1.1</b> Objetivos .....	03
<b>1.2</b> Organização do trabalho .....	04
<b>2</b> Revisão Bibliográfica .....	06
<b>2.1</b> Penicilinas .....	06
<b>2.2</b> Penicilina G Acilase .....	08
<b>2.3</b> <i>Bacillus megaterium</i> .....	12
<b>2.4</b> Produção de Penicilina G Acilase por <i>Bacillus megaterium</i> .....	13
<b>2.5</b> Produção de PGA empregando <i>Bacillus megaterium</i> com controle de pH .....	15
<b>2.6</b> Medidas em Processos Biotecnológicos e Sistema de Aquisição de Dados. ....	17
<b>2.6.1.1</b> Ambiente Extracelular .....	17
<b>2.6.1.1.1</b> Temperatura .....	17
<b>2.6.1.1.2</b> Pressão .....	18
<b>2.6.1.1.3</b> Detecção de Espuma .....	18
<b>2.6.1.1.4</b> Vazão de Gases e Líquidos .....	19
<b>2.6.1.1.5</b> Volume .....	19
<b>2.6.1.1.6</b> Fração Molar O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> nos Gases de Exaustão.....	19

2.6.1.2	Ambiente Químico .....	20
2.6.1.2.1	pH .....	20
2.6.1.2.2	Oxigênio Dissolvido .....	20
2.7	Resultados obtidos no Laboratório de Bioquímica (DEQ/UFSCar) .....	20
2.8	Lógica <i>Fuzzy</i> .....	24
2.8.1	Operações com Conjuntos <i>Fuzzy</i> .....	28
2.8.2	Sistema de Controle <i>Fuzzy</i> .....	31
2.8.3	Um breve histórico e algumas áreas de Aplicação <i>Fuzzy</i> .....	35
2.8.4	Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> em processos fermentativos .....	38
2.9	Considerações finais .....	39
3	Materiais e Métodos .....	40
3.1	Materiais .....	40
3.1.1	Microrganismo .....	40
3.1.2	Principais Equipamentos .....	41
3.2	Métodos .....	42
3.2.1	Descrição dos Meios de Cultura .....	42
3.2.1.1	Pré-Inóculo .....	42
3.2.1.2	Produção do Inóculo .....	43
3.2.2	Fermentação Principal .....	44
3.2.3	Análises das Amostras para acompanhamento da Produção .....	45
3.2.3.1	Determinação da Concentração de Lactose .....	45
3.2.3.1.1	Método DNS .....	45
3.2.3.2	Método para Determinação de Proteínas .....	47
3.2.3.2.1	Método de Lowry .....	47

3.2.3.2.2	Método de Bradford .....	48
3.2.3.3	Análise de Atividade Enzimática .....	48
3.2.3.3.1	Método Colorimétrico do PDAB .....	49
3.2.4	Concentração Celular .....	50
3.2.5	Hidrólise de Caseína .....	50
3.2.6	Preparo dos Criotubos.....	50
3.3	Sistema de Aquisição de Dados .....	51
3.3.1	Descrição do Sistema de Controle de pH .....	53
3.4	Algoritmo baseado na lógica <i>Fuzzy</i> .....	53
4	Resultados e Discussões .....	59
4.1	Resultados utilizando Caseína Hidrolizada Enzimaticamente na Produção de PGA em Biorreator .....	59
4.1.1	Primeiro Ensaio em Biorreator: Meio de Produção Padrão (CHE/20% OD) .....	60
4.1.2	Segundo Ensaio em Biorreator (Controle de pH/CHE) .....	62
4.1.3	Terceiro Ensaio em Biorreator (Controle de pH/CHE/Sem controle de OD) .....	66
4.2	Resultados utilizando Solução de Aminoácidos Livres.....	69
4.2.1	Quarto Ensaio em Biorreator (Padrão/aa/20% OD) .....	69
4.2.2	Quinto Ensaio em Biorreator (Controle de pH/aa/20% OD) .....	72
4.2.3	Sexto Ensaio em biorreator (Controle de pH/aa/alimentação de aa (40 g/L) e soro de queijo ultrafiltrado) .....	75
4.3	Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> no Processo de Produção de PGA.....	79
4.3.1	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 1º Experimento .....	80



4.3.2	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 2º Experimento .....	81
4.3.3	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 3º Experimento .....	83
4.3.4	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 4º Experimento .....	85
4.3.5	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 5º Experimento .....	87
4.3.6	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 6º Experimento .....	88
4.3.7	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 7º Experimento .....	90
4.3.8	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 8º Experimento .....	92
4.3.9	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 9º Experimento .....	93
4.3.10	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 10º Experimento .....	95
4.3.11	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 11º Experimento .....	97
4.3.12	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 12º Experimento .....	99
4.3.13	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 13º Experimento .....	101
4.3.14	Resultado da Aplicação da Lógica <i>Fuzzy</i> : 14º Experimento .....	103
4.4	Desenvolvimento de Regras <i>Fuzzy</i> : Pacote <i>Fuzzy</i> do Programa MatLab.....	106
4.4.1	Resultados Utilizando as Regras Implementadas no Pacote <i>Fuzzy</i> do Programa MatLab .....	113
5	Conclusões .....	122
6	Sugestões .....	123
7	Referências Bibliográficas .....	124
	Apêndice A1 .....	128
	Apêndice A2 .....	132
	Apêndice A3 .....	136

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Estrutura química do 6-APA (SAVIDGE, 1975).....	06
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura química da Penicilina G (SAVIDGE, 1975).....	07
<b>Figura 2.3.</b> Estrutura química da Penicilina V (SAVIDGE, 1975).....	07
<b>Figura 2.4.</b> Algumas estruturas de antibióticos semi-sintéticos modificados a partir do 6-APA (adaptado de SAVIDGE, 1975 e HOJO, 1997) .....	08
<b>Figura 2.5.</b> Hidrólise enzimática da Penicilina (adaptado de SAVIDGE, 1975).....	09
<b>Figura 2.6.</b> Fermentação com meio otimizado, operado a 30°C, oxigênio dissolvido controlado em 40% da saturação, pH controlado em 7,0 através da adição de NH <sub>4</sub> OH 4M ou HCl 5M, AFA adicionado no início da fermentação até 10 horas de cultivo, agitação controlada entre 300 e 500 rpm em biorreator, volume útil de 5 litros (HOJO, 1997).....	16
<b>Figura 2.7.</b> Influência do ácido fenil acético (AFA) na atividade enzimática em cultivos de <i>B. megaterium</i> .....	23
<b>Figura 2.8.</b> Variável lingüística "velocidade" e sua divisão em categorias através de conjuntos nebulosos. ....	27
<b>Figura 2.9.</b> Estrutura Básica de um Controlador <i>Fuzzy</i> (GOMIDE & GODWIN,1994).....	33
<b>Figura 3.1.</b> Esquematização da preparação do experimento desde o uso de criotubos até o experimento em biorreator.....	44
<b>Figura 3.2.</b> Esquema do aparato experimental com sistema de aquisição de dados (CRUZ,2000).....	52

<b>Figura 3.3.</b> Diagrama esquemático ilustrando a atuação do controlador <i>Fuzzy</i> : (A) regra nível ação, (B) regra identificação (VC1=-0,12 e VC2=0), (Adaptado de Souza Jr, 1999) .....	55
<b>Figura 3.4</b> <i>Fuzzyficação e Defuzzyficação</i> do algoritmo desenvolvido em Fortran .....	57
<b>Figura 4.1.</b> Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado no fermentador: (a) concentração celular e atividade enzimática obtida em análises de laboratório; (b) pH; (c) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (d) concentração do oxigênio dissolvido, (e) Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	61
<b>Figura 4.2.</b> Resultados do segundo ensaio realizado em fermentador: (a) Atividade Enzimática e Concentração celular, obtidas em análises de laboratório; (b) pH; (c) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída, (d) Agitação, obtidos pela aquisição de dados.....	64
<b>Figura 4.3.</b> Resultados do terceiro ensaio em fermentador: (a) concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; (b) valores do pH; (c) concentração de CO <sub>2</sub> ; (d) Oxigênio dissolvido e (e) Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	67
<b>Figura 4.4.</b> Resultados do quarto ensaio em fermentador: (a) concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; (b) valores do pH; (c) concentração de CO <sub>2</sub> ; (d) Oxigênio dissolvido e (e) Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	71
<b>Figura 4.5.</b> Resultados do quinto ensaio em fermentador: (a) concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; (b) valores do pH; (c) concentração de CO <sub>2</sub> ; (d) Oxigênio dissolvido e (e) Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	74
<b>Figura 4.6.</b> Resultados do sexto ensaio em fermentador: (a) concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; (b) valores do pH; (c) concentração de CO <sub>2</sub> e (d) Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados .....	77

<b>Figura 4.7.</b> Fração molar do dióxido de Carbono ( $Y_{CO_2}$ ) e Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> .....	79
<b>Figura 4.8.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo (linha tracejada) e a melhor região de parada (região cinza em destaque) para o primeiro experimento. ....	80
<b>Figura 4.9.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o segundo experimento. ....	81
<b>Figura 4.10.</b> Segundo experimento (A) Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; (B) Derivada da fração molar de $CO_2$ ( $dv_{cdt}$ ). ....	82
<b>Figura 4.11.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o terceiro experimento .....	82
<b>Figura 4.12.</b> Terceiro experimento (A) Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; (B) Derivada da fração molar de $CO_2$ ( $dv_{cdt}$ ). ....	84
<b>Figura 4.13.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o quarto experimento. ....	85
<b>Figura 4.14.</b> Quarto experimento (A) Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; (B) Derivada da fração molar de $CO_2$ ( $dv_{cdt}$ ). ....	86
<b>Figura 4.15.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o quinto experimento. ....	87
<b>Figura 4.16.</b> Quinto experimento (A) Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; (B) Derivada da fração molar de $CO_2$ ( $dv_{cdt}$ ). ....	88

<b>Figura 4.17.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o sexto experimento .....	89
<b>Figura 4.18.</b> Sexto experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ). .....	90
<b>Figura 4.19.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o sétimo experimento. ....	91
<b>Figura 4.20.</b> Sétimo experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ). .....	91
<b>Figura 4.21</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o oitavo experimento. ....	92
<b>Figura 4.22.</b> Oitavo experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ). .....	93
<b>Figura 4.23.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o nono experimento. ....	94
<b>Figura 4.24.</b> Nono experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ). .....	95
<b>Figura 4.25.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o décimo experimento. ....	96
<b>Figura 4.26.</b> Décimo experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ) .....	97

<b>Figura 4.27.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o décimo primeiro experimento. ....	98
<b>Figura 4.28.</b> Décimo primeiro experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ). ....	99
<b>Figura 4.29.</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o décimo segundo experimento. ....	100
<b>Figura 4.30.</b> Décimo segundo experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ). ....	101
<b>Figura 4.31</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o décimo terceiro experimento .....	102
<b>Figura 4.32.</b> Décimo terceiro experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ) .....	103
<b>Figura 4.33</b> Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o décimo quarto experimento .....	104
<b>Figura 4.34.</b> Décimo quarto experimento <b>(A)</b> Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; <b>(B)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (dvc <sub>dt</sub> ) .....	105
<b>Figura 4.35</b> <i>Fuzzyficação e Defuzzyficação</i> do algoritmo <i>Fuzzy</i> (MatLab) .....	106
<b>Figura 4.36.</b> Variáveis de entrada do algoritmo <i>Fuzzy</i> . <b>(A)</b> Variável tempo dividida em tempo cedo, tempo ótimo e tempo tarde; <b>(B)</b> Fração molar de CO <sub>2</sub> (Y <sub>CO2</sub> ) dividida em Y <sub>CO2</sub> baixo, Y <sub>CO2</sub> médio e Y <sub>CO2</sub> alto; <b>(C)</b> Derivada da fração molar de CO <sub>2</sub> (DY <sub>CO2</sub> ) dividida em DY <sub>CO2</sub> negativa ou DY <sub>CO2</sub> zero ou positiva (ZP) .....	106

<b>Figura 4.37.</b> Variável de saída do algoritmo <i>Fuzzy</i> (Grau de certeza da parada do cultivo dividida em não para, atenção e pare cultivo) .....	110
<b>Figura 4.38.</b> Ilustração tridimensional do grau de certeza de parada do cultivo tendo como variáveis: tempo, $Y_{CO_2}$ e grau de certeza na parada .....	111
<b>Figura 4.39.</b> Ilustração tridimensional do grau de certeza de parada do cultivo tendo como variável tempo, derivada da fração molar de $DY_{CO_2}$ e grau de certeza de parada .....	112
<b>Figura 4.40.</b> Ilustração tridimensional do grau de certeza de parada do cultivo tendo como variáveis $CO_2$ , derivada da fração molar de $CO_2$ e grau de certeza ....	112
<b>Figura 4.41.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do primeiro experimento .....	114
<b>Figura 4.42.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do segundo experimento .....	114
<b>Figura 4.43.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do quarto experimento .....	115
<b>Figura 4.44.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do quinto experimento .....	115
<b>Figura 4.45.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do sétimo experimento .....	116
<b>Figura 4.46.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática para o oitavo experimento .....	116
<b>Figura 4.47.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática para o décimo experimento .....	117
<b>Figura 4.48.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática para o décimo segundo experimento .....	117
<b>Figura 4.49.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática para o décimo terceiro experimento .....	118

<b>Figura 4.50.</b> Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática para o décimo quarto experimento .....	118
<b>Figura 4.51.</b> Análise comparativa dos algoritmos implementados graficamente .....	121
<b>Figura A.3.1</b> Tela principal do programa desenvolvido em <i>Visual Basic</i> (Gomes, 2001) .....	137
<b>Figura A.3.2</b> Tela gráfica desenvolvida no programa em <i>Visual Basic</i> (Gomes, 2001) para acompanhar a evolução da concentração celular em tempo real ao longo do cultivo .....	138



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1.</b> Algumas empresas e seus respectivos microrganismos produtores de enzima PGA e forma da enzima intra ou extracelular (SAVIDGE, 1984).....	10
<b>Tabela 2.2.</b> Comparação dos valores de $k_m$ das Penicilinas G Acilase de diferentes microrganismos (SAVIDGE & COLE, 1975).....	11
<b>Tabela 2.3.</b> Produção de Penicilina Acilase em meio complexo e definido (ILLANES <i>et al.</i> , 1994).....	14
<b>Tabela 2.4.</b> Algumas áreas aonde a Lógica <i>Fuzzy</i> vêm sendo utilizada (RISSOLI,1999).....	37
<b>Tabela 3.1.</b> Composição do meio sólido para armazenagem e manutenção do <i>B. megaterium</i> .....	41
<b>Tabela 3.2.</b> Composição dos meios de germinação complexos para a produção de Penicilina G Acilase por <i>B. megaterium</i> .....	43
<b>Tabela 3.3.</b> Composição dos meios para produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em Fermentador do tipo tanque agitado e aerado.....	45
<b>Tabela 3.4.</b> Parâmetros do Controlador <i>Fuzzy</i> utilizados em todos os experimentos na identificação da máxima concentração de enzima (PGA) .....	56
<b>Tabela 4.1.</b> Regras <i>Fuzzy</i> implementadas no pacote <i>Fuzzy</i> do programa MATLAB .....	107
<b>Tabela 4.2</b> Parâmetros, tipo de função e intervalo das variáveis de entrada do algoritmo <i>Fuzzy</i> (MatLab) .....	110
<b>Tabela 4.3.</b> Parâmetros, tipo de função e intervalo das variáveis de saída do algoritmo <i>Fuzzy</i> (MatLab) .....	111

<b>Tabela 4.4.</b> Análise comparativa dos algoritmos <i>Fuzzy</i> implementados .....	120
<b>Tabela A.1</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 1º experimento em biorreator .....	129
<b>Tabela A.2</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 2º experimento em biorreator .....	130
<b>Tabela A.3</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 3º experimento em biorreator .....	31
<b>Tabela A.4</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 4º experimento em biorreator .....	133
<b>Tabela A.5</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 5º experimento em biorreator .....	134
<b>Tabela A.6</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 6º experimento em biorreator .....	135

## RESUMO

Penicilina G acilase (PGA) é uma enzima de grande interesse na produção industrial de antibióticos beta-lactâmicos. Sua principal aplicação é como catalisador na hidrólise da penicilina G em ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), composto-chave na produção industrial de antibióticos semi-sintéticos. PGA é produzida por vários microrganismos, apresentando diferentes características e propriedades. Dentre aqueles, *Bacillus megaterium* é um dos poucos que a produz extracelularmente, simplificando etapas para sua separação e purificação. Outra importante aplicação refere-se à sua utilização na síntese enzimática de antibióticos como amoxicilina e ampicilina via rota verde. Neste trabalho estudou-se a influência do pH na produção da enzima e implementou-se algoritmo baseado na teoria da lógica nebulosa (“*Fuzzy*”) com o objetivo de identificar o momento de máxima concentração da enzima. Experimentos foram realizados em biorreator de bancada (5 litros de volume útil) com aquisição de dados e controle do processo via controlador lógico programável e sistema supervisorio. A utilização de controle de pH nos experimentos não resultou em bons resultados havendo uma diminuição na concentração da enzima em comparação com experimentos realizado sem controle. Este fato poderia estar relacionado com a produção de proteases pelo microrganismo ou pela desativação da enzima causada pela adição pontual de ácido. Dois algoritmos foram implementados. O primeiro foi programado em *Fortran* e utilizado como biblioteca dinâmica em plataforma de comunicação desenvolvida em *Visual Basic* para troca de informações em tempo real com sistema de aquisição de dados. O segundo algoritmo foi implementado no programa *MatLab* (Mathworks, 5.2). Os algoritmos empregaram como variáveis o tempo de cultivo, a fração molar de dióxido de carbono e sua derivada em relação ao tempo. Ambos algoritmos foram capazes de identificar com boa precisão o momento de parar o cultivo. O primeiro foi validado através de sua implementação no sistema em dois experimentos.

***Application of Fuzzy Logic in the Production of Penicillin G Acylase in Bacillus megaterium Cultivations***

**ABSTRACT**

Penicillin G acylase (PGA) is an important enzyme for the pharmaceutical industry. This enzyme has industrial use in the hydrolysis of penicillin G to obtain 6-aminocephalosporanic acid (6-APA), essential intermediate for the production of beta-lactam antibiotics. Many microorganisms produce PGA, but *Bacillus megaterium* is one of the few that excretes the enzyme to the extra cellular medium, facilitating downstream operations. Another recently enzyme application refers to enzymatic synthesis of semi-synthetics antibiotics as amoxicilin and ampicilin via green route. This work studied the pH influence on the production of the enzyme. An algorithm based on the *Fuzzy* logic theory was implemented aiming to determine the maximum enzyme concentration during *Bacillus megaterium* cultivations. Experiments were carried out in a bioreactor (5 liter working volume) coupled to a data acquisition system using a Programmable Logic Controller and Supervisory System. Experiments carried out under pH control showed a decreasing in enzyme concentration compared to standard experiments. This result could be related to production of proteases by microorganism or enzyme deactivation caused by local acid addition. Two algorithms were implemented. The first was programmed in Fortran and linked as dynamic link library in a Visual Basic program to exchange on-line information with data acquisition system. The second one was implemented in MatLab (Mathworks, 5.2) software. On-line variables as cultivation time, carbon dioxide concentration and time carbon dioxide concentration derivate were used as information to *Fuzzy* algorithm. Both algorithms were able to accurately identify the time for which the enzyme reached its maximum. The first algorithm was tested in real time in two experiments.

## 1. Introdução

A penicilina amido hidrolase (E.C. 3.5.1.11), mais conhecida como penicilina G acilase (PGA) é uma enzima empregada na produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, catalisando a transformação da penicilina G no ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). O 6-APA é um composto chave para a produção das chamadas penicilinas semi-sintéticas, como a ampicilina e amoxicilina, com larga aplicação como agentes terapêuticos (BERAZAÍN, 1997).

Segundo ILLANES *et al.*, 1994, mais de 60 % do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) é produzido enzimaticamente.

A PGA pode ser obtida de diferentes microrganismos, sendo que a maioria deles com produção de forma intracelular, processo que exige uma etapa de ruptura das células para sua purificação, tornando assim o processo mais caro. Uma alternativa para simplificar o processo e torná-lo economicamente mais viável é utilizar microrganismos que a produzam de forma extracelular, o que facilita o processo de recuperação. *Bacillus megaterium* é um dos poucos microrganismos com produção extracelular dessa enzima. (SHEWALE & SIVARAMAN, 1989; BRUGGINK, 1998).

A maioria dos trabalhos publicados sobre a produção de PGA referem-se a enzima produzida pela *Escherichia coli* (ILLANES *et al.*, 1994). Na literatura são poucos os trabalhos tendo como tema a produção de penicilina G acilase a partir do *Bacillus megaterium* e os industriais são mantidos sob segredo (ILLANES *et al.*, 1994).

A PGA produzida por *Bacillus megaterium* é induzida pelo ácido fenil acético (AFA) que em altas concentrações inibe o crescimento celular. Com o objetivo de aumentar e melhorar a produção de PGA por *Bacillus megaterium*, o conhecimento das condições operacionais, tais como, adição de ácido fenil acético, controle de pH e concentração de oxigênio dissolvido, são aspectos fundamentais.

Há algum tempo, a área de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar possui uma linha de estudo voltada para a produção da enzima penicilina G acilase por *Bacillus megaterium*. O primeiro trabalho nessa linha foi desenvolvido por HOJO, 1997, que realizou estudos preliminares em frascos agitados em mesa incubadora com o objetivo de definir as melhores condições operacionais a serem utilizadas na segunda etapa do trabalho em cultivos em biorreator de bancada. Trabalhos subseqüentes estudaram o uso do soro de queijo como fonte de carbono (BERAZAÍN, 1997); a influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção da enzima (VISNARDI, 1997); produção, purificação e imobilização de PGA por *B. megaterium* ATCC 14945 (PINOTTI, 1999); requerimentos nutricionais para a produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 (SOUZA, 2002); e a Inferência de Variáveis do Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC (SILVA, 2003).

Com o objetivo de realizar contribuições ao estudo da produção desta enzima pelo *B. megaterium* este trabalho baseou-se em um enfoque interdisciplinar, envolvendo duas áreas de pesquisa do DEQ/UFSCar: Engenharia Bioquímica e Simulação e Controle de Processos. Avaliou-se a influência do pH na produção da enzima e o comportamento de variáveis adquiridas em tempo real

como possíveis detentoras de importantes informações sobre o andamento do processo em cultivos realizados em biorreator de bancada com sistema de aquisição de dados. Os experimentos obtidos foram realizados em grupo, constituído por Pinotti e Silva (Doutorado), Souza e Nucci (Mestrado).

## 1.1 Objetivos

Este trabalho teve por objetivos:

- Realizar experimentos com controle de pH empregando o microrganismo *Bacillus megaterium* ATCC 14945 com vistas à produção da enzima penicilina G acilase em biorreator de bancada, acoplado a sistema de aquisição de dados. Os resultados obtidos foram utilizados como base para a obtenção de possível perfil ótimo de pH a ser adotado durante os cultivos.
- Analisar a relação entre variáveis adquiridas em tempo real e aquelas obtidas em análises de laboratório, em experimentos com *B. megaterium* em biorreator com sistema de aquisição de dados, com o objetivo de identificar e estabelecer possíveis relações que seriam úteis para otimização do cultivo. A aplicação de técnicas de inteligência artificial como a lógica *Fuzzy* seria uma das ferramentas com grande potencial de utilização devido à complexidade inerente aos processos envolvendo cultivos microbianos.

## 1.2 Organização do Trabalho

O trabalho foi dividido em sete capítulos, os quais estão organizados da seguinte forma:

Capítulo 1: realiza-se uma contextualização do processo de produção da enzima penicilina G acilase, deixando claro os objetivos a serem estudados.

Capítulo 2: apresenta-se uma revisão da literatura sobre o tema penicilina G acilase, descrevendo sua produção e principais características do processo. No final deste capítulo é realizada uma revisão sobre a lógica nebulosa (“*Fuzzy*”) focalizando basicamente sua estrutura e aplicações.

Capítulo 3: discorre-se sobre os principais materiais que foram utilizados para a realização deste trabalho, bem como os métodos utilizados nas análises de laboratório.

Capítulo 4: discute-se os resultados obtidos dividindo-os em três etapas. A primeira é referente aos experimentos realizados em reator de bancada utilizando caseína hidrolisada enzimática (CHE) como fonte de nitrogênio. A segunda refere-se aos experimentos (similares aos da primeira parte) utilizando solução de aminoácidos livres como fonte de nitrogênio. Finalmente, a terceira etapa apresenta os resultados da aplicação da lógica *Fuzzy* em experimentos realizados



em reator de bancada, com o objetivo de identificar o momento em que se atinge a máxima concentração da enzima.

Capítulo 5: as conclusões obtidas do trabalho são relatadas.

Capítulo 6: Apresenta algumas sugestões para a continuidade deste trabalho.

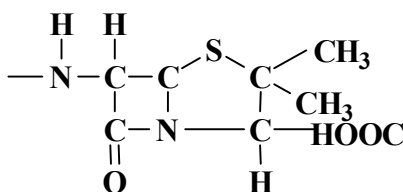
Capítulo 7: as referências bibliográficas utilizadas no desenvolvimento deste projeto são apresentadas.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Penicilinas

Alexander Fleming foi quem descobriu o primeiro antibiótico, em 1929, denominando-o de penicilina, ao observar que uma placa de ágar inoculada com *Staphylococcus aureus* tinha sido contaminada por uma colônia de fungo do gênero *penicillium*, na qual aparecia cercada por uma zona clara, indicando a inibição do crescimento bacteriano (BERAZAÍN, 1997; HOJO, 1997).

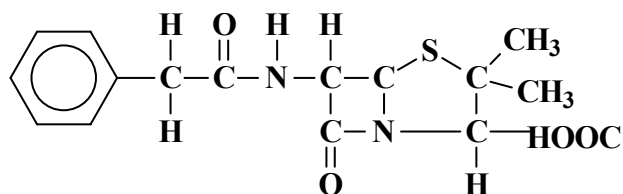
Penicilinas são um tipo de antibiótico produzido naturalmente por fungos do gênero *Penicillium* ou obtido enzimaticamente (BERAZAÍN, 1997). As penicilinas são produtos de estruturas semelhantes, diferenciando entre si apenas por uma cadeia lateral ligada a um núcleo comum, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Figura 2.1). O ácido 6-aminopenicilânico é produzido a partir da hidrólise da Penicilina G, sendo um composto chave na produção industrial de antibióticos semi-sintéticos (ILLANES *et al.*, 1994).



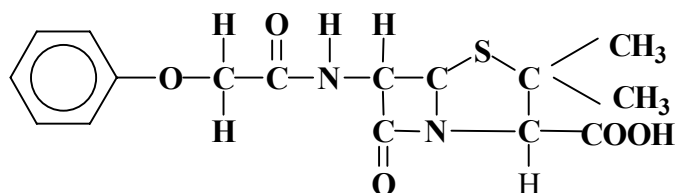
**Figura 2.1:** Estrutura química do 6-APA (SAVIDGE, 1975)

Podemos citar dentre estas penicilinas, a benzil penicilina (Penicilina G) e a fenoximetil penicilina (Penicilina V) por apresentarem atividade farmacológica, embora limitada a poucos microrganismos patogênicos (VISNARDI, 1997).

As Figuras 2.2 e 2.3 apresentam a estrutura química da Penicilina G e Penicilina V respectivamente.

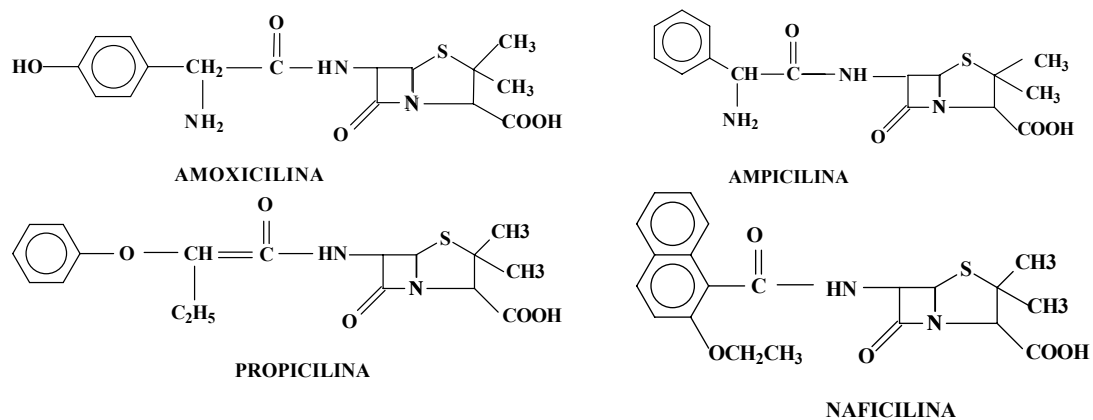


**Figura 2.2** Estrutura química da Penicilina G (SAVIDGE, 1975)



**Figura 2.3** Estrutura química da Penicilina V (SAVIDGE, 1975)

Para combater microrganismos patogênicos, tem-se buscado outros antibióticos, destacando-se as penicilinas semi-sintéticas. Entre alguns dos antibióticos semi-sintéticos produzidos a partir do 6-APA, destacam-se a ampicilina, amoxicilina, nafcilina e propicilina. A Figura 2.4 apresenta as estruturas químicas destas penicilinas semi-sintéticas modificadas a partir do 6-APA.



**Figura 2.4:** Algumas estruturas de antibióticos semi-sintéticos modificados a partir do 6-APA (adaptado de SAVIDGE, 1975 e HOJO, 1997)

As Penicilinas podem ser divididas basicamente em dois grupos:

a) Penicilinas biossintéticas: são aquelas que podem ser obtidas diretamente de caldos de cultura de bioprocessos. As principais penicilinas biossintéticas são a Penicilina G e Penicilina V (HOJO, 1997).

b) Penicilinas semi-sintéticas: obtidas a partir da modificação das penicilinas biossintéticas. A partir de penicilinas acilase (enzimas) que hidrolisam a Penicilina G obtém-se o 6-APA que posteriormente é transformado em penicilina semi-sintética (HOJO, 1997).

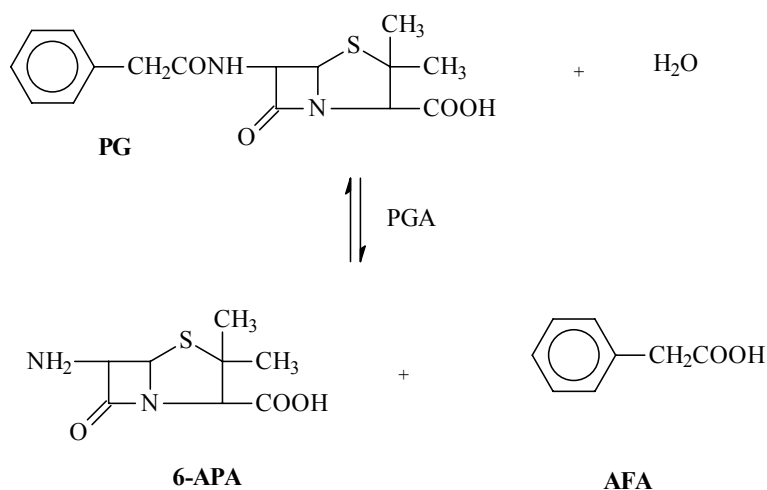
## 2.2 Penicilina G Acilase

A penicilina G acilase (PGA), também chamada de penicilina amido hidrolase ou penicilina amidase (E.C. 3.5.1.11), tem sido empregada para catalisar

a modificação da penicilina G para a obtenção 6-APA (SAVIDGE, 1984). A PGA é a segunda enzima mais imobilizada no mundo, após a glicose isomerase.

Embora a conversão microbiana da penicilina G para o 6-APA seja conhecida há quase cinco décadas, a aplicação industrial da PGA foi introduzida com sucesso somente nos últimos dez anos, devido ao fato que a produção eficiente da enzima e sua recuperação não era disponível há uma década atrás (BRUGGINK, 1998).

A Figura 2.5 mostra a reação de hidrólise da Penicilina G catalisada pela PGA para a produção de 6-APA.



**Figura 2.5** Hidrólise enzimática da penicilina G (adaptado de SAVIDGE, 1975)

Segundo ILLANES *et al.*, 1994, mais de 15 penicilinas semi-sintéticas derivadas do 6-APA são comercializadas atualmente, sendo as ampicilinas e amoxicilinas de maior importância.

O 6-APA também pode ser obtido pela hidrólise da Penicilina V, embora a enzima preferencialmente utilizada seja a Penicilina G acilase. As penicilinas

acilases (PA's) mais importantes são a Penicilina G e a Penicilina V, onde a penicilina acilase proveniente de bactérias tem maior afinidade para hidrolisar a Penicilina G, enquanto que as provenientes de fungos e actinomicetos têm maior afinidade para hidrolisar a Penicilina V (SAVIDGE, 1984).

A PGA é uma enzima induzida pelo ácido fenil acético (AFA) (SAVIDGE e COLE, 1975; ILLANES *et al.*, 1994) tendo a capacidade de quebrar a Penicilina G em dois componentes: o 6-APA e o AFA (ACEVEDO & COONEY, 1973).

A Penicilina G Acilase pode ser obtida de vários microrganismos e as bactérias produtoras mais conhecidas são: *Acromobacter spp*, *Actinoplanes spp*, *Bovista plúmbea*, *Fusarium spp*, *Kluyvera citrophila*, *Proteus rettigeri*, *Pseudomonas melanogenum*, *Streptomyces lavendulae*, *Escherichi coli* e *Bacillus megaterium* (SHEWALE & SIVARAMAN, 1989).

SAVIDGE, 1984, citou algumas empresas que utilizam diferentes microrganismos para a produção de Penicilina G acilase. Estas estão apresentadas na Tabela 2.1.

<b>Tabela 2.1:</b> Algumas empresas e seus respectivos microrganismos produtores de enzima PGA e forma da enzima intra ou extracelular (SAVIDGE, 1984).		
<b>Empresa</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Tipo de enzima</b>
Bayer	<i>Escherichia coli</i>	Intracelular
Kyowa Hakka	<i>Kluyvera citrophila</i>	Intracelular
Novo	<i>Bacillus gram-positivo</i>	Intracelular
Pfizer	<i>Proteus rettgeri</i>	Intracelular
Squibb	<i>Bacillus megaterium</i>	Extracelular

SAVIDGE & COLE, 1975, relataram que as enzimas produzidas a partir de diferentes organismos apresentam características, propriedades e valores de parâmetros cinéticos diferentes.

A Tabela 2.2 apresenta a constante de Michaelis-Menten para diferentes penicilinas G acilase obtidas de diferentes microrganismos.

<b>Tabela 2.2:</b> Comparação dos valores de $k_m$ das Penicilinas G Acilase de diferentes microrganismos (SAVIDGE & COLE, 1975).	
Microrganismo	$K_m$ (Mm)
<i>Escherichia coli</i>	7,7
<i>Escherichia coli</i> NCIB 8743 A	0,67
<i>Escherichia coli</i> NCIB 8743 A imobilizada	30,0
<i>Bacillus megaterium</i>	4,5

ILLANES *et al.*, 1994, relataram que a presença de glicose no meio de fermentação não favorece a produção da PGA, ocorrendo repressão catabólica. Sendo assim, a produção da enzima ocorre principalmente após o consumo da glicose pelo microrganismo.

A maioria das pesquisas feitas abordando a produção e uso da penicilina acilase utiliza a enzima proveniente da *Escherichia coli* (enzima produzida de forma intracelular) na qual para sua obtenção necessita-se de uma ruptura das células, o que encarece a produção (SHEWALE & SIVARAMAN, 1989). Segundo SAVIDGE & COLE, 1975, o rompimento das células de *Escherichia*

*coli* pode ser feito por ultra-som em escala de laboratório ou pela passagem das células em um homogeneizador de alta pressão em larga escala.

### 2.3 *Bacillus megaterium*

O *Bacillus megaterium* é um microrganismo aeróbio que apesar de ser considerado proveniente do solo, pode ser encontrado em ambientes bastante diversos como em alimentos desidratados, água marinha, sedimentos, peixes (VARY, 1994).

Pode ser encontrado em forma cilíndrica, ovalada, unidos em pequenas cadeias, apresentando diferentes dimensões dependendo do meio de cultura, cujo diâmetro em agar-ágar nutriente é de aproximadamente 1,5  $\mu\text{m}$ . Em meios onde contenha carboidratos apresenta diâmetro de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$ . Apresenta capacidade de esporular, e seus esporos podem assumir formas ovaladas ou alongadas (VARY, 1994).

Quando o *Bacillus megaterium* é cultivado em meio de cultura por tempo prolongado, sua coloração pode variar desde uma tonalidade marrom até preta.

Quanto às suas propriedades fisiológicas, sabe-se que a temperatura ótima de crescimento está em torno de 28° a 35 °C, não ocorrendo nenhum crescimento a 45 °C ou maior. O pH ótimo está entre 7,0 a 8,5 e nenhum crescimento ocorre a pH 5,0 ou menor (MURAO *et al.*, 1964).

A importância econômica do *Bacillus megaterium* está relacionada com sua capacidade de produzir a penicilina G acilase, glicose desidrogenase e sendo ainda o microrganismo aeróbio maior produtor de vitamina B<sub>12</sub> (HOJO, 1997).



Segundo SAVIDGE & COLE, 1975 o peso molecular da PGA encontra-se em torno de 120.000 Da.

#### **2.4 Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium***

Dentre os trabalhos publicados sobre a produção de Penicilina G acilase (PGA), a maioria refere-se à obtenção da enzima proveniente de *Escherichia coli* que a produz de maneira intracelular. Informações sobre a produção de PGA pelo *Bacillus megaterium*, que a produz extracelularmente, são escassas e principalmente protegidas em segredo industrial (ILLANES *et al.*, 1994).

ILLANES *et al.*, 1994, estudaram a produção de penicilina acilase por *Bacillus megaterium* em meios complexo e definido. Em seu trabalho constataram que a excreção da enzima é fortemente dependente da composição do meio de cultivo. Os efeitos dos níveis de fósforo inorgânico e ácido fenil acético foram avaliados. Segundo os autores, para altos níveis de fósforo inorgânico a maior parte da enzima é excretada, e baixos níveis aumentam a atividade intracelular e diminuem a atividade total.

Os mesmos autores determinaram também que a PGA é induzida pelo ácido fenil acético (AFA), tanto em meio complexo como definido, encontrando um valor de 1,5 g/L como concentração ideal quando adicionado ao meio fermentativo próximo do início da fermentação, onde a concentração celular era 0,2 g/L (ILLANES *et al.*, 1994).

Os melhores resultados em termos de produção (atividade/volume) e produtividade (atividade/volume/tempo de cultivo) de PGA foram obtidos no

meio complexo sem glicose. A presença deste monossacarídeo provocava uma repressão da síntese da PGA pelo *B. megaterium*. Isto pode ser observado na Tabela 2.3 (ILLANES *et al.*, 1994).

**Tabela 2.3:** Produção de Penicilina Acilase em meio complexo e definido (ILLANES *et al.*, 1994).

Meio	Complexo	Complexo <sup>a</sup>	Definido
Crescimento celular (g/L)	2,5	2,6	1,9
Taxa de crescimento específico (h <sup>-1</sup> )	0,38	0,30	0,31
Produção de PGA (UI/L)	168	220	158
Produtividade de PGA (UI/L*h)	5,7	10,8	3,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sem Glicose

<sup>b</sup> Produtividade aumentada para um valor máximo de 8,9 quando a ácido fenil acético foi adicionado mais tarde ao meio de cultura

GENTINA *et al.*, 1997, utilizando meio semelhante ao de ILLANES *et al.*, 1994, verificaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio complexos na síntese de PGA por *Bacillus megaterium*. Eles obtiveram como melhor substrato a caseína hidrolisada devido ao maior conteúdo de amino ácidos livres em comparação com a outras fontes utilizadas.

ACEVEDO & COONEY, 1973, estudaram a produção da PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 para examinar os efeitos do nitrogênio, enxofre e fósforo contidos na forma de histidina, sulfato e fosfato, respectivamente, em cultivo contínuo. Os autores concluíram que sob condições estáveis, a produção da enzima muda com a natureza do nutriente limitante e a taxa de diluição. Neste caso particular de produção de PGA, as culturas limitadas

por enxofre resultaram em atividades enzimáticas maiores que aquelas com limitações de nitrogênio e fósforo. O indutor, ácido fenil acético (AFA), não foi incluído no meio até 10 horas de cultivo, pois demonstrou inibir o crescimento se adicionado no início.

Segundo SZENTIRMAI, 1963, quando o ácido fenil acético (AFA) é adicionado entre 10 e 15 horas a partir do início do cultivo ocorre uma repressão na produção da enzima. SHEWALE & SIVARAMAM, 1989, sugerem como melhor momento para adição do AFA o período entre 8 e 10 horas após a inoculação do microrganismo.

## **2.5 Produção de PGA empregando *Bacillus megaterium* com controle de pH**

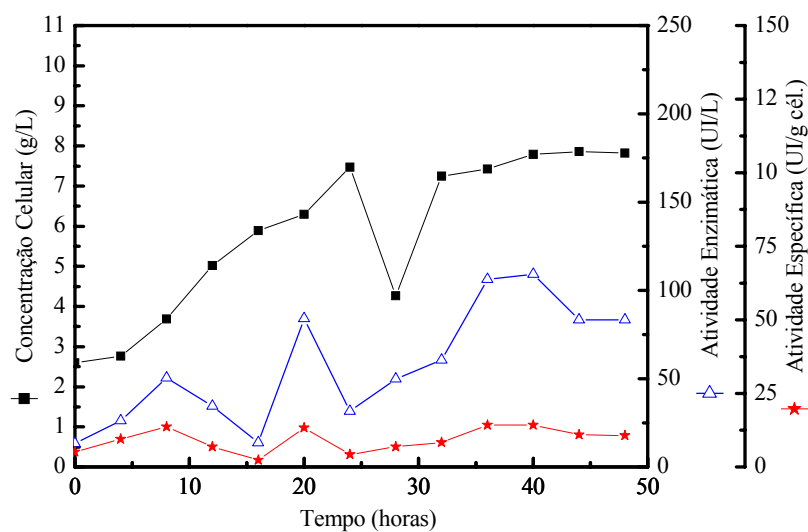
HOJO, 1997, realizou cultivo em tanque agitado e aerado empregando o microrganismo *Bacillus megaterium* com controle de pH. As condições de operação adotadas foram: oxigênio dissolvido controlado em 40% da saturação através da manipulação da velocidade de agitação; indutor (ácido fenil acético, AFA) adicionado no início da fermentação; pH controlado em 7,0 através da adição de soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4M ou HCl 5M.

Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na Figura 2.6.

Segundo HOJO, 1997, os resultados obtidos nesse experimento onde houve o controle de pH não foram satisfatórios, pois a produção de enzima apresentou baixa atividade específica (atividade/massa celular) e total (atividade/volume).

Nos experimentos seguintes retirou-se o controle de pH e avaliou-se a influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção da enzima (30%, 20%, 15% e 10 % da saturação) e adicionou-se o AFA após dez horas do início do cultivo. O melhor resultado foi obtido mantendo uma concentração de oxigênio dissolvido em 10 % de saturação na etapa de produção.

Nessas condições a produção da enzima atingiu valores da ordem de 250 UI/L de meio e 50 UI/g célula. Segundo o autor, este resultado foi atribuído grandemente à alteração da concentração de oxigênio dissolvido de 20 % para 10 % após oito horas do início do cultivo.



**Figura 2.6:** Fermentação com meio otimizado, operado a 30°C, oxigênio dissolvido controlado em 40% da saturação, pH controlado em 7,0 através da adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4M ou  $\text{HCl}$  5M, AFA adicionado no início da fermentação até 10 horas de cultivo, agitação controlada entre 300 e 500 rpm em biorreator, volume útil de 5 litros (HOJO, 1997).

## **2.6 Medidas em Processos Biotecnológicos e Sistema de Aquisição Dados**

O desenvolvimento de novos e mais sofisticados sistemas para monitoramento de fermentação estão proporcionando contribuições no sentido de atingir um melhor entendimento dos processos microbianos. A implementação de novas técnicas permite melhorar o meio de controle e monitorar os processos metabólicos, resultando em melhoramento da produtividade. Sensores “on-line” são tipicamente os mais utilizados para propósito de controle (ARMIGER, 1985).

Quando se trabalha com processos bioquímicos, uma das grandes dificuldades é a avaliação em tempo real de algumas variáveis principais do processo, como a concentração celular, de açúcares e produto.

O desenvolvimento de sensores para bioprocessos não é uma tarefa fácil, uma vez que algumas características devem ser respeitadas (CRUZ, 2000):

- estabilidade e resistência por um período de vários dias;
- necessidade de resposta para uma ampla faixa de medida;
- necessidade de esterilização dos sensores “in-situ”;
- não contaminar o sistema;

### **2.6.1 Ambiente Extracelular**

#### **2.6.1.1 Temperatura**

Calor pode ser facilmente transferido para as células e diretamente influenciar no metabolismo celular sendo uma variável importante a ser controlada nos processos fermentativos. Sensores típicos usados para medir temperatura em fermentação são os termoelementos que têm como base a

mudança de resistência de uma fio de platina. A temperatura é freqüentemente controlada durante o cultivo, quer seja mantida constante ou sendo um parâmetro do cultivo (CRUZ, 2000).

### **2.6.1.2 Pressão**

A pressão é uma variável que precisa ser considerada, pois influenciará a solubilidade de gases como oxigênio e dióxido de carbono, embora exerça pouca influência sobre o microrganismo, caso não ultrapasse muito a pressão atmosférica. Manter uma sobrepressão no interior do reator é uma maneira de reduzir possíveis contaminações, ou seja, assegurar melhores condições de assepsia para o processo (CRUZ, 2000).

### **2.6.1.3 Detecção de Espuma**

O sistema empregado para detecção de espuma em um reator bioquímico é relativamente simples e emprega uma haste de metal, localizada em um ponto acima do líquido. À medida que ocorre a formação de espuma, esta fecha o circuito ao entrar em contato com a haste, uma vez que a outra extremidade do circuito encontra-se em contato com o líquido. Nesse momento algum equipamento é acionado para a adição do antiespumante. (uma bomba peristáltica, uma válvula solenóide, por exemplo) (CRUZ, 2000).

#### **2.6.1.4 Vazão de Gases e Líquidos**

Vazões de gases e líquidos são importantes variáveis do processo sendo empregadas no cálculo de balanços materiais ao longo do processo. São determinadas através de rotâmetros, quando o processo é apenas monitorado (não existindo a necessidade do sinal elétrico), ou por meio de transdutores (que se baseiam em elementos sensíveis ao campo magnético, à temperatura, por exemplo), caso em que se deseja monitorar e/ou controlar (CRUZ, 2000).

#### **2.6.1.5 Volume**

A medida do volume do meio contido em fermentador é importante para os processos em batelada alimentada e contínuos. Geralmente três tipos de sistemas são utilizados para medir volume tendo por base sensores de nível, medida do peso e medida da pressão diferencial (CRUZ, 2000).

#### **2.6.1.6 Fração Molar de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> nos Gases de Exaustão do Fermentador**

A fração mássica de O<sub>2</sub> é determinada pela passagem dos gases no interior de uma célula de medida onde existe um campo magnético, tomando por base as propriedades paramagnéticas do oxigênio.

A fração mássica de CO<sub>2</sub> segue o mesmo processo que a de O<sub>2</sub>, e tem por base a propriedade desse gás em absorver o comprimento de onda infravermelho (CRUZ, 2000).

## **2.6.2 Ambiente Químico**

### **2.6.2.1 pH**

Os sensores esterilizáveis de pH encontram-se disponíveis há um longo tempo. Eles foram um dos primeiros sensores de medida direta confiáveis. Num sistema fermentativo a mudança no pH do meio acarreta alterações na atividade das enzimas, ocasionando mudanças no metabolismo do microrganismo

O sistema de controle de pH é composto de uma sonda e por duas bombas, as quais são responsáveis pela adição de ácido e base no sistema (CRUZ, 2000).

### **2.6.2.2 Oxigênio Dissolvido**

A medida da concentração de oxigênio dissolvido no meio reacional também é realizada há longo tempo, e foi um dos sensores chave no progresso de cultivos aeróbios (CRUZ, 2000).

## **2.7 Resultados obtidos no Laboratório de Bioquímica (DEQ/UFSCar)**

HOJO, 1997, foi o primeiro trabalho da linha de pesquisa de produção da penicilina G acilase (PGA) por *Bacillus megaterium* no Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Utilizou técnicas de planejamento experimental tendo como variáveis o ácido fenil acético (AFA), glicose, carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) e como resposta a atividade enzimática específica.



Os efeitos destas variáveis sobre a resposta foram avaliados pelo método da análise canônica da superfície de resposta, a qual permitiu encontrar um meio ótimo de cultura. Segundo HOJO, 1997, as faixas de concentrações ótimas para a produção de PGA determinadas foram: 2,0 a 2,4 g/L de AFA; 5,0 a 8,0 g/L de glicose; 30,0 a 50,0 g/L de CHE; 7,3 a 8,0 g/L de CaCO<sub>3</sub>.

As condições operacionais ótimas para a produção em biorreator foram: concentração de oxigênio dissolvido mantido em 20 % da saturação na fase de crescimento e 10 % na fase de produção (mudança esta realizada após 8 horas do início do cultivo); agitação entre 200 e 500 rpm. Com as melhores condições de produção estudadas obteve-se uma produção de PGA em torno de 250 UI/L, valores semelhantes ao obtidos por ILLANES *et al.*, 1994.

BERAZAÍN, 1997, utilizou soro de queijo (principal sub-produto do processo de fabricação de queijo) como fonte de carbono em meio de cultura para a produção da enzima PGA por *Bacillus megaterium*. Uma das justificativas apresentadas por Berazaín, 1997, para avaliar a utilização desta matéria-prima na composição de meios de cultura, foi que apenas 60 % deste sub-produto é utilizado efetivamente para a fabricação de produtos para consumo humano ou animal sendo o restante (cerca de 40 %) descartado, desprezado como carga poluente.

O soro de queijo mostrou-se muito efetivo para ser utilizado como fonte de carbono no meio de cultura, podendo reduzir os custos de produção da penicilina G acilase e reduzir a carga poluente dos rios.

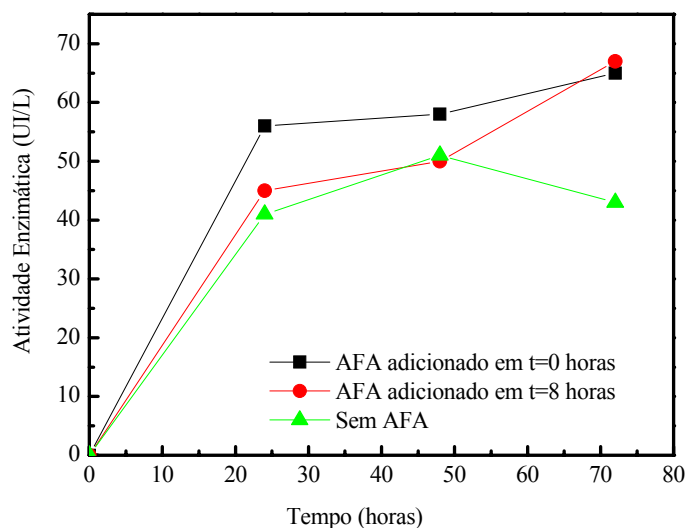
VISNARDI, 1997, estudou a influência da concentração de oxigênio dissolvido no processo de produção de PGA. Segundo o autor, a produção de

PGA está relacionada com a concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo; valores altos (40 % da saturação) ou valores baixos (5 % da saturação) não favorecem a produção da enzima. Um ponto ótimo para a concentração de oxigênio dissolvido encontra-se em torno de 10% da saturação durante todo o cultivo, obtendo uma produção máxima de enzima.

PINOTTI *et al.*, 2000, testaram alguns meios de cultivo para a produção de PGA empregando *Bacillus megaterium*. A fonte de carbono estudada foi glicose e lactose, e a fonte de nitrogênio a caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) com proteases de diferentes especificidades. Concentrações de enzima da ordem de 130 UI/L foram obtidas utilizando caseína hidrolisada com Alcalase<sup>®</sup> como fonte de nitrogênio, e soro de queijo como fonte de carbono. Nestes estudos verificou-se que a CHE como fonte de nitrogênio era essencial para a produção de Penicilina G Acilase. Trabalhos realizados em paralelo objetivaram desenvolver meio reacional onde a solução de CHE pudesse ser substituída por solução de aminoácidos livres, com composição similar à encontrada na solução de CHE. Experimentos realizados com esta nova formulação de meio resultaram em significativo aumento na produção da enzima (SOUZA, 2003).

Dados obtidos por PINOTTI, 2001, mostraram que a adição do indutor (AFA) no início da fermentação ou 8 horas após a inoculação do microrganismo, não afeta o crescimento e nem a produção de PGA. Este resultado contrariou aqueles relatados na literatura (SZENTIRMAI, 1963; SHEWALE & SIVARAMAM, 1989).

A Figura 2.7 mostra valores da atividade enzimática (AE) obtida em experimentos com adição de AFA em diferentes tempos ( $t = 0$  h;  $t = 8$  h) e sem adição de AFA, PINOTTI (2001).



**Figura 2.7.** Influência do ácido fenil acético (AFA) na atividade enzimática em cultivos de *B. megaterium*.

Segundo PINOTTI & GOMES (comunicação verbal, 2001) a omissão de  $\text{CaCO}_3$  não interfere na produção de PGA. Com a adição do AFA no início do cultivo, este componente pode ser omitido do meio de cultura. Anteriormente era utilizado com o objetivo de manter o pH em torno de 7 durante a adição do AFA.

SOUZA, 2003, estudou os requerimentos nutricionais para a produção de PGA por *B. megaterium* realizando experimentos em frascos agitados e em biorreator. Na produção de enzima foi estudada a influência do soro de queijo como fonte de carbono e caseína hidrolisada enzimaticamente e amino ácidos como fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que o soro de queijo é

fundamental para a produção da enzima e a substituição de solução de CHE por solução de aminoácidos conduziu a grande aumento na produção da enzima. Cultivos realizados em biorreator com esta nova composição de meio alcançaram uma produção da ordem de 330 UI/L.

SILVA, 2003, estudou a inferência de variáveis para a produção de PGA por *B. megaterium*. Através do sistema de aquisição de dados, as principais variáveis do processo foram monitoradas e utilizadas para inferência da concentração celular. Para a inferência foi utilizado enfoque empírico baseado em redes neurais artificiais.

## 2.8 Lógica Nebulosa (*Fuzzy*)

A lógica nebulosa (*Fuzzy*) é a lógica que suporta os modos de raciocínio que são aproximados ao invés de exatos. Esta abordagem foi apresentada em 1964 por Lofti A. Zadeh, professor no Departamento de Engenharia Elétrica e Ciências da Computação da Universidade da Califórnia em Berkeley. A lógica *Fuzzy* permite representar, de forma mais real, o raciocínio humano por meio do tratamento de imprecisões usando cálculos e operações com conjuntos *Fuzzy*, além das variáveis lingüísticas (ORTEGA, 2001).

Na teoria dos conjuntos clássicos, um conjunto é uma coleção bem definida de objetos, não tendo dificuldades em classificar elementos como pertencentes ou não a esse dado conjunto. Dessa forma, dado um conjunto  $A$  e um elemento  $x$  do conjunto universo  $U$ , conseguimos dizer se  $x \in A$  ou se  $x \notin A$ . Por exemplo,

afirmamos sem receio que o número 5 pertence ao conjunto dos números naturais e que  $-5$  não pertence a este mesmo conjunto (PATTERSON, 1996).

Um método para se definir conjuntos é por uma função usualmente chamada de *função característica*, onde se declara qual elemento de um conjunto Universo  $U$  é membro do conjunto em questão, ou seja, discrimina entre todos os elementos de  $U$  aqueles que, segundo um critério, pertence ou não a este conjunto.

Exemplo:

Segundo GOMIDE & GODWIN, 1994, dado um universo  $U$  e um elemento  $x \in U$ , o grau de pertinência  $\mu_A(x)$  onde  $A \subseteq U$  é definido por:

$$\mu_A(x) = \begin{cases} 1 \rightarrow x \in A \\ 0 \rightarrow x \notin A \end{cases} \quad (2.1)$$

Essa função característica mapeia os elementos de  $U$  em 0 e 1, isto é:

$$\mu_A(x) : U \rightarrow \{0,1\} \quad (2.2)$$

Para todo  $x \in U$ , quando  $\mu_A(x) = 1$ ,  $x$  é declarado membro de  $A$ ; quando  $\mu_A(x) = 0$ ,  $x$  é declarado não membro de  $A$ .

A lógica *Fuzzy* é uma generalização da teoria dos conjuntos tradicionais para resolver os paradoxos gerados a partir da classificação “verdadeiro ou falso” da lógica clássica. Tradicionalmente, uma proposição lógica tem dois extremos, ou seja, ou “completamente verdadeiro” ou “completamente falso”. Entretanto, na lógica *Fuzzy*, uma premissa varia em grau de pertinência de 0 a 1, o que leva a ser parcialmente verdadeira ou parcialmente falsa (FABRI, 1999).

GOMIDE & GODWIN, 1994, destaca um conceito de fundamental importância quando se fala em lógica *Fuzzy*: as variáveis lingüísticas. Uma

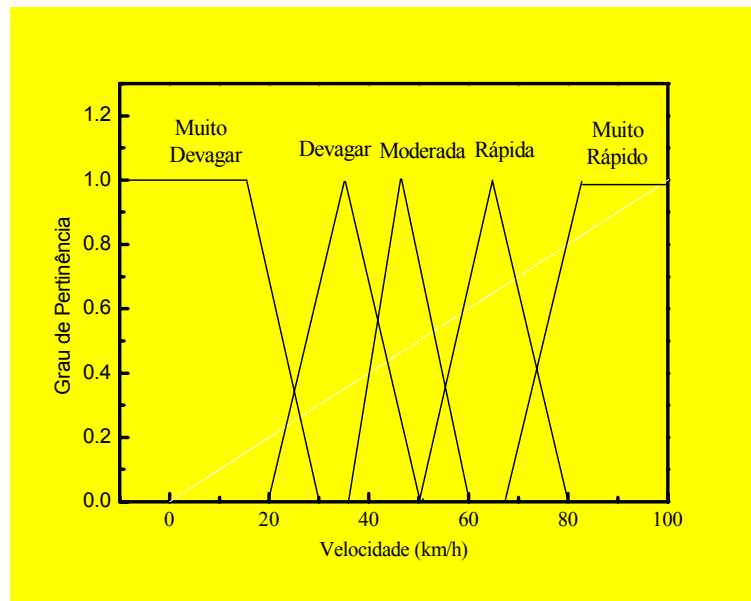
variável lingüística *Fuzzy* tem seu valor expresso qualitativamente por um termo lingüístico (palavras ou frases).

LEE, 1990, define que variáveis lingüísticas são caracterizadas por uma quintupla  $(x, T(x), U, G, M)$  onde  $x$  é o nome da variável (por exemplo, temperatura, pressão, etc),  $T(x)$  é o conjunto de termos lingüísticos de  $x$  (elevado, baixo, pouco, etc),  $U$  é o domínio (conjunto universo) de valores de  $x$  sobre o qual o significado do termo lingüístico é determinado (por exemplo, a temperatura pode estar entre 25 e 50 °C),  $G$  é uma regra sintática para descrever os termos lingüísticos e  $M$  é a regra semântica que assinala para cada termo lingüístico  $t \in T$  o seu significado, que é um conjunto *Fuzzy* em  $U$  (ou seja,  $M : T \rightarrow F(x)$ , onde  $F(x)$  é o espaço dos conjuntos *Fuzzy*).

Por exemplo, se “*velocidade*” é interpretada como uma variável lingüística, então os termos deste conjunto podem ser descritos como:

$$T(\textit{velocidade}) = \{\textit{muito devagar, devagar, moderada, rápida, muito rápida}\}$$

onde cada termo de  $T(\textit{velocidade})$  é caracterizado por um conjunto *Fuzzy* no universo de discurso  $U = [0,100]$ . Assim, segundo o autor é possível interpretar “*devagar*” como “uma velocidade abaixo de 40 km/h”, “*moderada*” como “uma velocidade entre 50 e 60 Km/h” e “*rápida*” como “uma velocidade acima de 70 km/h”. Essa noção de elementos associados a um grau de pertinência com relação a valores lingüísticos de variáveis lingüísticas é a noção básica de sistemas nebulosos. Isto pode ser visto na Figura 2.8.



**Figura 2.8** Variável linguística "velocidade" e sua divisão em categorias através de conjuntos nebulosos.

Na teoria dos conjuntos convencionais, a pertinência de um elemento em um conjunto qualquer é caracterizada por duas situações mutuamente exclusivas: ou o elemento “pertence” ou “não pertence” ao conjunto. Na teoria dos conjuntos *Fuzzy*, a noção básica de pertinência é modificada, permitindo que os elementos de um conjunto base pertençam a um conjunto *Fuzzy* com um certo grau de pertinência (um elemento pode pertencer parcialmente a um dado conjunto) (RISSOLI, 1999).

Pela Figura 2.8 é possível dizer que uma velocidade de 50 km/h é uma velocidade moderada com um grau de pertinência (GP) 0,9; já 40 km/h é uma velocidade devagar com um GP 0,7 e é uma velocidade moderada com GP 0,25. Finalmente uma velocidade de 70 km/h é uma velocidade rápida com GP 0,65 e é uma velocidade muito rápida com GP 0,20.

Um conjunto *Fuzzy* é caracterizado por uma função de pertinência (ou função característica), e o grau de pertinência pode ser considerado como uma medida que expressa a possibilidade de que um dado elemento seja membro de um conjunto *Fuzzy*.

Um elemento de um conjunto *Fuzzy* é representado genericamente por um par de  $a/x$  onde  $x$  é o elemento do conjunto base  $X$  e  $a = A(x)$ .

Quanto à representação de um conjunto *Fuzzy*, este é freqüentemente denotado pela notação de soma. Por exemplo.

$$A = \{a_1/x_1 + a_2/x_2 + \dots + a_n/x_n\} \quad (2.3)$$

ou

$$A = \sum_i \mu_A(x_i)/x_i \quad (2.4)$$

onde o conjunto *Fuzzy*  $A$  sobre o conjunto base  $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ . O símbolo "+" não apresenta aqui a soma algébrica, mas denota apenas a união dos elementos do conjunto. A notação  $\mu_A(x_i)/x_i$  se refere ao elemento  $x_i$  que pertence ao conjunto *Fuzzy*  $A$  com um grau de pertinência  $\mu_A(x_i)$ . Em geral, somente são listados no conjunto *Fuzzy*  $A$  aqueles cujo grau de pertinência é diferente de zero (GOMIDE & GODWIN, 1994; RISSOLI, 1999; ORTEGA, 2001).

### 2.8.1 Operações com Conjuntos *Fuzzy*

As três operações básicas sobre conjuntos convencionais - complemento, intersecção e união - podem ser generalizadas para os conjuntos *Fuzzy* de várias maneiras.



Sejam A e B dois conjuntos *Fuzzy* em U com funções de pertinência  $\mu_A$  e  $\mu_B$  respectivamente. As operações de conjuntos tais como a união ( $A \cup B$ ), intersecção ( $A \cap B$ ) e complemento ( $\neg A$ ) para conjuntos *Fuzzy* são definidas, tais como:

$$\mu_{A \cup B}(u) = \max[\mu_A(u), \mu_B(u)] \quad (2.5)$$

$$\mu_{A \cap B}(u) = \min[\mu_A(u), \mu_B(u)] \quad (2.6)$$

$$\mu_{\neg A}(u) = 1 - \mu_A(u) \quad (2.7)$$

Note que a escolha dos operadores união e intersecção são arbitrárias. A única propriedade que o operador intersecção deve satisfazer é retornar “1” quando ambos os argumentos são “1” e “0” quando um dos argumentos for “0”. Da mesma forma, a operação união exige que o operador retorne “1” se pelo menos um dos argumentos for “1” e “0” se nenhum dos argumentos for “1”. Para obtermos os conjuntos *Fuzzy* e suas operações basta generalizarmos a função característica da lógica clássica para o intervalo  $[0,1]$ , ou seja, como descrito na equação 2.3. Isto implica considerarmos um contínuo de valores de pertinência e não apenas “pertence” ou “não-pertence” (ORTEGA, 2001).

LEE,1990 e GOMIDE & GODWIN, 1994, descrevem as operações entre conjuntos nebulosos de forma mais genérica, ou seja, em função de normas triangulares ( $s$  e  $t$ ), definições estas não apresentadas neste trabalho de Mestrado.

Se  $A_1, \dots, A_n$  são conjuntos *Fuzzy* em  $U_1, \dots, U_n$ , respectivamente, o produto cartesiano de  $A_1, \dots, A_n$  é o conjunto nebuloso (*Fuzzy*) com a função de pertinência (LEE, 1990):

$$\mu_{A_1 \times \dots \times A_n}(u_1, u_2, \dots, u_n) = \min \{ \mu_{A_1}(u_1), \dots, \mu_{A_n}(u_n) \} \quad (2.8)$$

Relações nebulosas são uma extensão das relações usualmente encontradas na teoria de conjuntos. Por uma relação nebulosa  $R$ , definida no produto cartesiano  $X \times Y$ , entende-se:

$$R: X \times Y \rightarrow [0,1] \quad (2.9)$$

Desta forma, para cada par de elementos  $(x,y)$ ,  $x \in X$  e  $y \in Y$ , tem-se um número entre 0 e 1 associado ao par, este expressa o grau com que  $x$  e  $y$  se relacionam. Assim, pode se dizer que a relação nebulosa definida pelo produto cartesiano traduz uma implicação  $X \rightarrow Y$ .

As relações *Fuzzy* em diferentes espaços podem ser combinadas umas com as outras, por meio de operações de composição. As composições mais comuns entre relações nebulosas ( $R_1$  e  $R_2$ ) são: Sup – Min e Inf - Max.

•Sup-Min:

$$(R_1 \bullet R_2)(x,y) = \sup [\min (R_1(x,z),R_2(z,y))] \quad (2.10)$$

•Inf - Max:

$$(R_1 \otimes R_2)(x, y) = \inf[\max(R_1(x, z), R_2(z, y))] \quad (2.11)$$

Um caso particular de composição é aquela efetuada entre uma relação nebulosa  $R$  e um conjunto nebuloso  $X$ .

$$Y = X \bullet R \quad (2.12)$$

$$Y = X \otimes R \quad (2.13)$$

### 2.8.2 Sistema de Controle *Fuzzy*

“A idéia básica em controle *Fuzzy* é modelar as ações a partir de conhecimento especialista, ao invés de modelar o processo em si, levando-nos a uma abordagem diferente dos sistemas convencionais de controle de processos, onde os mesmos são desenvolvidos via modelagem matemática dos processos de modo a derivar as ações de controle como função do estado do processo” (GOMIDE & GODWIN, 1994).

Na implementação do controlador nebuloso é necessário um protocolo de controle, caracterizando as principais propriedades da adequada estratégia de controle. O protocolo de controle, basicamente, nada mais é do que o conhecimento do operador humano.

A estratégia de controle de um operador humano pode ser representada como um conjunto de relações condicionais *Fuzzy* que formam um conjunto de regras de decisão.

Cada regra *Fuzzy* é composta (na mesma forma como na lógica clássica) por uma parte antecedente (a parte "SE") e uma parte conseqüente (a parte "ENTÃO") resultando em uma estrutura do tipo:

SE (antecedentes) ENTÃO (conseqüentes)

Os antecedentes descrevem uma condição, enquanto que os conseqüentes descrevem uma conclusão ou uma ação que é descrita quando as condições são satisfeitas. Os antecedentes definem uma região *Fuzzy* no espaço das variáveis de entrada enquanto que os conseqüentes descrevem uma região no espaço de saída do sistema.

Segundo SOUSA Jr & ALMEIDA, 2001, quando se pergunta a uma pessoa sobre qual método que utilizou para controlar um sistema por um longo período, a resposta é freqüentemente numa forma de regra *Fuzzy*, tal como:

‘SE a temperatura está muito alta, ENTÃO aumento a velocidade do fluido de refrigeração’

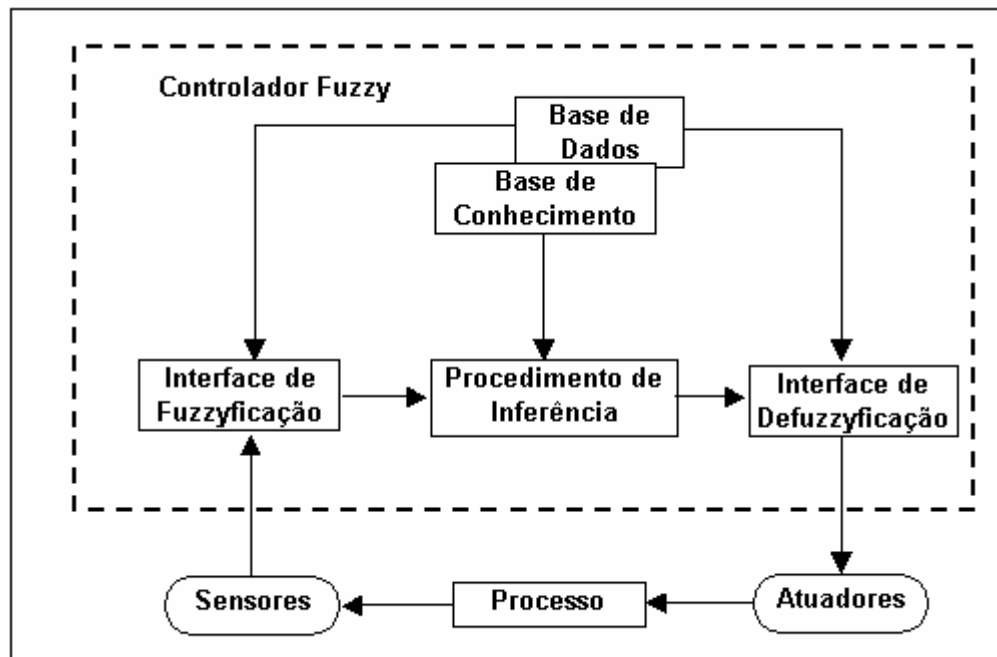
A regra ‘SE-ENTÃO’ corresponde ao produto cartesiano  $A_i \times B_i$  de dois Conjuntos *Fuzzy*.  $R = \sum A_i \times B_i$  seria a relação *Fuzzy* gerada a partir de todas as regras *Fuzzy* ‘SE - ENTÃO’ fornecida pelo operador. Dado os valores de entrada do controlador, a ação de controle (inferência) é derivada do esquema *modus ponens*:

Fato:	$x \text{ é } A'$
Regra:	<u>se (x é A') então (y é B)</u>
Conseqüência:	$y \text{ é } B'$

Segundo SOUSA Jr & ALMEIDA, 1999, os conjuntos A e B no esquema *modus ponens* são conjuntos *Fuzzy* e não simplesmente valores numéricos, assim antes de calcular o conseqüente, é necessário *fuzzyficar* o antecedente. De modo análogo, depois de calculado o conseqüente é necessário a *defuzzyficação* para a real utilização sobre o processo. Os conceitos sobre *fuzzyficação* e *defuzzyficação* são relatados posteriormente.

A estrutura de um processo controlado por um controlador *Fuzzy* é mostrado na Figura 2.9, enfatizando-se seus componentes básicos como: a interface de

*fuzzyficação*, a base de conhecimento, a base de dados, o procedimento de inferência e a interface de *defuzzyficação* (GOMIDE & GODWIN, 1994).



**Figura 2.9** Estrutura Básica de um Controlador *Fuzzy* (GOMIDE & GODWIN, 1994)

**Interface de *Fuzzyficação*:** A interface de *fuzzyficação* envolve as seguintes funções: (a) medir os valores de entrada das variáveis; (b) executar um mapeamento que transfere os valores das variáveis de entrada dentro do universo correspondente; (c) executar a função de *fuzzyficação* que converte os dados em valores lingüísticos satisfatórios vistos como conjuntos *Fuzzy* (LEE, 1990).

**A Base de Conhecimento:** consiste de uma base de regras, caracterizando a estratégia de controle e suas metas;

**A Base de Dados:** “armazena as definições necessárias sobre discretizações e normalizações dos universos de discurso, as partições *Fuzzy* dos espaços de entrada e saída e as definições das funções de pertinência” (GOMIDE & GODWIN, 1994).

**Procedência de Inferência:** depois das variáveis lingüísticas serem interpretadas, através da *fuzzyficação*, a próxima etapa será a descrição das situações nas quais existem reações através de regras de produção (*IF-THEN*). Cada regra na saída especifica uma ou várias conclusões.

**Interface de Defuzzyficação:** A *defuzzyficação* é um procedimento na qual é possível interpretar a distribuição de possibilidades da saída de um modelo lingüístico.

Existem muitas técnicas de *defuzzyficação* e entre elas pode-se destacar o centro de área (CA) e o critério do máximo (Max).

O método centro de área é a técnica mais comumente usada e pode ser chamada como centro de gravidade ou centróide. O método CA para calcular o valor representativo considera toda a distribuição de possibilidades de saída do modelo. Este modelo pode ser compreendido como uma média ponderada onde  $\mu_A(x)$  funciona como o peso do valor de  $x$  (quando  $x$  é discreto) (ORTEGA, 2001).

$$y_0 = \frac{\sum_x \mu_A(x) \cdot x}{\sum_x \mu_A(x)} \quad (2.14)$$

No método *máximo*, escolhe-se o ponto onde a função inferida tem seu valor máximo: ( $Y(y)$  é a função de pertinência da variável de controle  $y$  e  $y_0$  é o valor de controle *defuzzyficado*).

$$\max Y(y) = Y(y_0) \quad (2.15)$$

A aplicação de tal procedimento não considera a forma da função de pertinência de controle, tendo como consequência uma possível descontinuidade na resposta do controlador (SOUZA Jr, 1999; GOMIDE & GODWIN, 1994).

### 2.8.3 Um Breve Histórico e Algumas Áreas de Aplicação *Fuzzy*

Segundo HIROTA, 1994, o número total de indústrias no Japão que aplicam a lógica *Fuzzy* atualmente é maior que 200, mas essa situação foi bem diferente há algumas décadas atrás. O interesse pela lógica *Fuzzy* só foi relatado após a publicação de um artigo por Zadeh em 1965.

Em 1972 formou-se no Japão o primeiro grupo de pesquisa em sistema *Fuzzy*, coordenado pelo professor Toshiro Terano, e em 1974 iniciou-se um importante capítulo para o desenvolvimento desta teoria com a apresentação do primeiro controlador *Fuzzy* criado por E. Mandani, no Reino Unido (HIROTA, 1994). A partir de então vários foram os pesquisadores que tentaram aplicar a teoria de lógica *Fuzzy* para controlar sistemas em engenharia. ORTEGA, 2001, relata que em 1976 ocorreu a primeira aplicação industrial da lógica *Fuzzy*, desenvolvida pela empresa “Circle Cement e Sira”, na Dinamarca, que consistiu

em um controlador *Fuzzy* que incorporava o conhecimento e as experiências dos operários para controlar os fornos das fábricas.

Em 1987, foi inaugurado com sucesso o primeiro trem controlado com lógica *Fuzzy*, no sistema de metrô de Sendai no Japão (SOUSA Jr & ALMEIDA, 1999). Foi nesta mesma época que a Yamaha desenvolveu um helicóptero não tripulado, chamado de Yamaha-50, totalmente controlado por um controlador *Fuzzy*.

Em 1990 que a lógica *Fuzzy* atingiu sua maior popularidade com o lançamento no mercado da primeira máquina de lavar *Fuzzy*, da Matsushita Electric Industrial Co, marcando o início do desenvolvimento de consumo.

Nos dias de hoje uma variedade de aplicações industriais e comerciais estão disponíveis. Particularmente destaca-se neste cenário o Japão. Podemos destacar alguns exemplos de tais aplicações em produtos comerciais: geladeiras (Sharp), ar condicionados (Mitsubishi), câmeras de vídeo (Cânon, Panasonic), máquinas de lavar roupa (Sanyo). Atualmente existem várias empresas (Siemens, Daimler-Benz, General Motors, Motorola, etc) que possuem laboratórios de pesquisa em lógica *Fuzzy* para o desenvolvimento de seus produtos (GOMIDE & GODWIN, 1994).

Nos sistemas industriais incluem-se controles de grupo de elevadores (Hitachi), veículos autoguiados e robôs móveis (NASA, IBM), controle de motores (Hitachi), ventilação de túneis urbanos (Toshiba Corp.), incineradores de lixo urbano (Mitsubishi Heavy Industries Ltd.) e controle automático de operações do metrô.(Hitachi) (GOMIDE & GODWIN, 1994, HIROTA, 1994, SOUZA Jr & ALMEIDA, 1999).



A lógica *Fuzzy* é empregada em diversas áreas, e os japoneses são os responsáveis por este grande sucesso (RISSOLI, 1999). Algumas destas áreas estão apresentadas na Tabela 2.4.

<b>Tabela 2.4</b> Algumas áreas aonde a Lógica <i>Fuzzy</i> vem sendo utilizada	
<b>Área</b>	<b>Descrição</b>
Comércio	Aperfeiçoamento de controladores para máquinas de lavar, aspirador de pó, ar condicionado, filmadoras, máquinas fotográficas, cortadores de grama, etc
Entretenimento	Desenvolvimento de Jogos
Finanças	Controles de crédito e de taxas e negócios nas bolsas de valores, além do gerenciamento de manufaturas
Indústrias	Permitindo maior economia e eficiência na aplicação de controles industriais
Medicina	Auxiliando em diagnósticos e tratamentos de doenças
Pesquisa	Procuram evoluir e transmitir os conhecimentos desta lógica
Sismologia	Desenvolvimento do sistema de previsão de terremotos
Transporte	Mais eficiência e segurança para automóveis, helicópteros, aviões, ônibus e metrô

#### 2.8.4 Aplicações da Lógica *Fuzzy* em Processos Fermentativos

Alguns autores utilizaram o controle *Fuzzy* em processos fermentativos.

YAMADA *et al.*, 1991, publicaram uma aplicação de controle *Fuzzy* para fermentação em batelada alimentada da coenzima Q<sub>10</sub>, onde se utilizou a limitação do suprimento de oxigênio. Esta limitação foi controlada pela condição de suprimento de oxigênio quando os substratos eram totalmente consumidos. O controlador *Fuzzy* usado por estes autores apresentava 70 regras *Fuzzy*.

SHIBA *et al.*, 1994, utilizaram um sistema *Fuzzy* no controle da glicose e do etanol para a melhora da produção de  $\alpha$ -amilase em uma cultura em batelada alimentada da *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores relatam que o controlador foi desenvolvido para o controle simultâneo da glicose (0,15 g/L) e do etanol (2 g/L). Resultados mostram que a atividade e a atividade específica foram duas e três vezes maior respectivamente, se comparados com a situação onde somente a glicose era controlada.

ALFAFARA *et al.*, 1993, utilizou um sistema *Fuzzy* para o controle da concentração de etanol e também para perceber a máxima produção de um peptídeo (GSH) em uma cultura de batelada alimentada utilizando uma levedura. Este controle, além de manter constante a concentração de etanol, também tinha a função de verificar “estados emergenciais da glicose”, como por exemplo, acumulação ou deficiência. Resultados mostraram que a taxa específica de crescimento crítica  $\mu_c$  corresponde a uma taxa de produção de GSH. Assim, o controle de  $\mu$  para  $\mu_c$  poderia ser feito indiretamente mantendo uma concentração

de etanol constante, ou seja, zero formação de etanol manipulando a taxa de alimentação de glicose.

SOUZA Jr & ALMEIDA, 1999, utilizaram a lógica *Fuzzy* na implementação de um controle *Fuzzy* para a determinação do momento em que deve ser iniciada a adição da sacarose a um sistema fermentativo para produção de cefalosporina C em regime de batelada alimentada.

## 2.9 Considerações Finais

Como descrito nesta revisão bibliográfica, a produção de PGA é processo complexo necessitando de muitas etapas até o final para a obtenção da enzima. Há na literatura muitos trabalhos sobre a produção de PGA, sendo principalmente produzido pelo microrganismo *E. coli*, apesar de produzir a enzima de forma intracelular. Neste trabalho utilizou-se *B. megaterium* na produção de PGA.

O interesse pela lógica *Fuzzy* só teve início após a publicação de Zadeh em 1965, mas hoje há um interesse muito grande na utilização desta técnica, sendo os japoneses os responsáveis pela maioria dos trabalhos publicados nesta área. Deste modo, decidiu-se utilizá-la com o objetivo de identificar o ponto de máxima concentração de enzima em cultivos empregando o microrganismo *B. megaterium*.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

Os principais reagentes utilizados foram:

- Soro de queijo (Sigma)
- Caseína (Riedel)
- Ácido fenil acético (Carlos Erba)
- Penicilina G (Paraquímica)
- Aminoácidos (doação da Ajinomoto)

Demais reagentes de diferentes marcas comerciais.

##### 3.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos ensaios de produção da penicilina G acilase foi o *Bacillus megaterium* ATCC 14945 (cedido pela Fundação Tropical – Campinas/SP). Foi preservado em tubos inclinados (composição como descrita na Tabela 3.1). Repiques mensais foram realizados com o objetivo de garantir a manutenção do microrganismo. Uma outra forma de armazenamento do microrganismo foi em criotubos (esporos mantidos em solução de glicerol 20%) estocados em ultrafreezer a  $-60^{\circ}\text{C}$ .

A Tabela 3.1 apresenta a composição do meio sólido utilizado no preparo dos tubos inclinados.

**Tabela 3.1** Composição do meio sólido para armazenagem e manutenção do *B. megaterium*.

Composição	Concentração
Agar	20 g/L
Extrato de Carne	3 g/L
Peptona	5 g/L
Glicose	1,5 g/L
Água da torneira	1 L

### 3.1.2 Principais Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram:

- Câmara rotativa com controle de temperatura e agitação (“shaker”), marca New Brunswick Scientific.
- Reator tipo tanque agitado marca New Brunswick BIOFLO II com capacidade para 5 litros (acoplado a um sistema de aquisição de dados e analisador de gases de saída, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>).
- Controlador Lógico Programável (CLP);
- Autoclaves, marca FABBE modelo 103, 2000W e 4000W.
- Estufa de secagem e esterilização marca FANEM 320 – SE e 315/9.
- Câmara de fluxo laminar marca VECO.
- Balanças analíticas marcas METTLER PB – 3002 e KERN 410.
- pHmetro marca ORION modelo 420 A.

- pHstato marca METROHM modelo 718 STAT Titrino.
- Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultropec 2000.
- Banhos termostatizados, marca BROOKFIELD modelo EX – 200 e NESLAB modelo RTE – 111.
- Bomba de vácuo marca FABBE modelo 341.
- Centrífuga marca EPPENDORF modelo 5403.
- Reator de vidro com camisa de água volume 50 ml.
- Demais equipamentos e vidraçarias comuns de laboratório (dessecadores, tubos de ensaio, tubos de Follin-Wu, provetas, balões volumétricos, erlenmeyers, béqueres, pipetas, filtro microporoso, cubetas, tampões de algodão, buretas, conta-gotas).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Descrição dos Meios de Cultura**

#### **3.2.1.1 Pré-Inóculo**

A produção do pré-inóculo foi feita com meio de crescimento em apenas um frasco de erlenmeyer (500 ml), com 75 ml de meio, em câmara rotativa (“shaker”) por 24 horas, 300 rpm e temperatura de 30 °C.

A Tabela 3.2 descreve a composição dois meios de germinação: o primeiro denominado MG1 (HOJO, 1997) continha solução de caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) e o segundo, MG2 (SOUZA, 2003), solução de aminoácidos livres (aa). A solução de sais (concentrada) utilizada no preparo dos

meios de cultura continha a seguinte composição (mg/L):  
 $MgCl_2 \cdot 6H_2O = 75,3$ ;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O = 55,1$ ;  $Na_2SO_4 = 53,3$ ;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O = 14,5$ ;  
 $CoCl_2 \cdot 6H_2O = 1,21$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O = 1,07$ ;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O = 0,8$ ;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O = 0,68$   
 e  $ZnCl_2 = 0,063$ .

<b>Tabela 3.2</b> Composição dos meios complexos de germinação para a produção de Penicilina G Acilase por <i>B. megaterium</i>		
Nutrientes	MG1 (g/L)	MG2 (g/L)
Caseína hidrolisada enzimaticamente <sup>1</sup>	40,0	-
Solução de sais	0,9	0,2
Soro de queijo	7,0	7,0
Solução de aa <sup>2</sup>	-	10,0

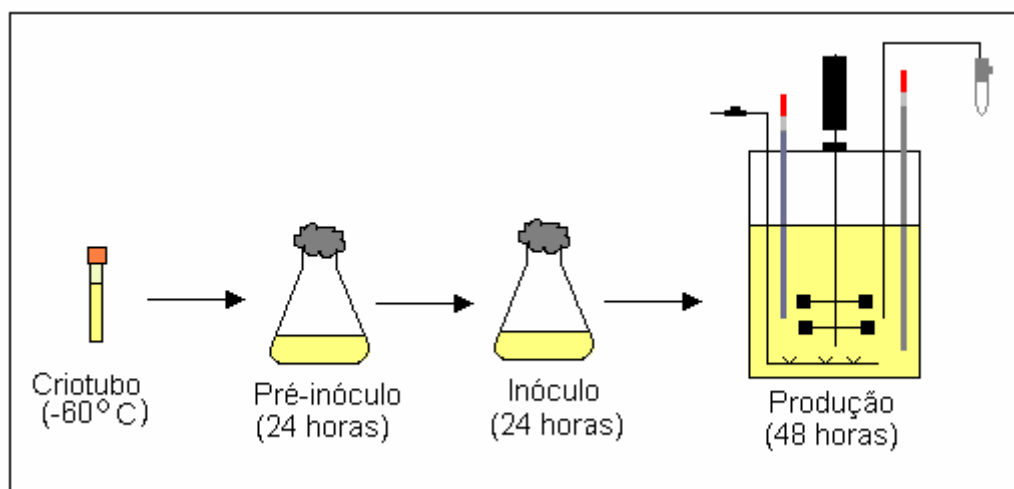
<sup>1</sup> Considerando uma solução de Caseína de 80 g/l.

<sup>2</sup> Mistura de aa (g/l): alanina = 1,16; ácido aspártico = 2,53; cistina = 0,13; glicina = 0,44; histidina HCl = 0,98; lisina HCl = 3,02; metionina = 2,49; Fenilalanina = 2,44; prolina = 4,30; serina = 2,49; treonina = 1,91; tirosina = 1,96; triptofano = 0,53; valina = 2,76; arginina = 1,64; ácido glutâmico = 4,47; leucina = 4,18; isoleucina = 2,21.

### 3.2.1.2 Produção do Inóculo

O inóculo foi preparado em três frascos de erlenmeyers de 1000 ml com 150 ml de meio e cultivado em mesa agitadora (“Shaker”) por 24h, 300 rpm e 30 °C. Após esse período, o inóculo foi transferido para o erlenmeyer de meio de produção (num total de 10% volume total da fermentação). O meio de germinação utilizado para a obtenção do Inóculo foi o mesmo descrito para a preparação do pré-inóculo.

Na Figura 3.1 está apresentado um esquema do preparo do inóculo e pré-inóculo partindo de criotubos até a fermentação final em biorreator.



**Figura 3.1.** Esquemática da preparação do experimento desde o uso dos criotubos até o experimento em biorreator.

### 3.2.2 Fermentação Principal

As fermentações foram realizadas em biorreator do tipo agitado e aerado acoplado a um sistema de aquisição de dados, com capacidade para 5,0 litros de volume útil. Após a obtenção do inóculo e do meio de produção, estes foram transferidos para o biorreator por gravidade.

A composição do meio de crescimento utilizado para a fermentação é descrita na Tabela 3.3.



**Tabela 3.3.** Composição dos meios para produção de PGA por *B. megaterium* em Fermentador do tipo tanque agitado e aerado.

<b>Composição</b>	<b>MP1</b>	<b>Mp2</b>
Caseína hidrolisada enzimáticamente (CHE)	51,3 g/L *	-
Solução de aminoácidos <sup>1</sup> (a.a.)	-	10,0 g/L **
Soro de queijo	19,6 g/L	19,6 g/L
Ácido fenil acético (AFA)	2,7 g/L	2,7 g/L
Antiespumante	0,5 ml/L	0,5 ml/L

\* HOJO, 1997.

\*\* SOUZA, 2003.

### 3.2.3 Análise das amostras para acompanhamento da Produção

A análise das amostras para acompanhamento da produção inicia-se pela separação do microrganismo do meio de cultura (centrifugação a 4°C a 10.822g durante 20 minutos e filtração em membrana milipore porosidade 0,45 µm). O sobrenadante é utilizado para quantificação de substratos e produto.

#### 3.2.3.1 Determinação da Concentração de Lactose

##### 3.2.3.1.1 Método DNS

A concentração de lactose foi realizada pelo método de DNS. Curvas de calibração com soluções padrões de lactose na faixa de 0,6g/l e 1,5 g/l foram preparadas (MILLER, 1959).

### a) Reagentes

O reagente DNS foi preparado em banho à  $\pm 45^\circ \text{C}$ , ou usando bico de Bunsen com muito cuidado, para que não atinja a temperatura de ebulição.

Em um becker de  $\pm 400 \text{ mL}$ , dissolveu-se por completo 30 g de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e pótassio) em 50 mL de água destilada. Adicionou-se em seguida 1 g de 3-5 ácido dinitrosalicílico (DNS) à solução anterior, e com um bastão de vidro tentou dissolver ao máximo as partículas sólidas. E finalmente adicionou 20 mL de NaOH 2 N (8,3 g em 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), misturando sempre até completa dissolução dos sólidos presentes.

Transferiu quantitativamente a solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. Colocou este balão em banho de água à temperatura ambiente por  $\pm 2$  horas para resfriamento. Por fim ajustou o volume do balão para 100 mL com água destilada.

### b) Procedimento

A 1 mL de solução de AR, adequadamente diluída adicionou 2 mL da solução de DNS. O tubo Follin-Wu de 25 mL com esta mistura foi aquecido por 5 minutos em água em ebulição e em seguida foi resfriado em água gelada, mantendo os tubos tampados com rolhas fendidas.

Completo o volume do tubo até 25 mL com água destilada, homogeneizou-se bem, e determinou a transmitância no espectrofotômetro.

**Obs:** calibrou o espectrofotômetro com teste em branco, antes de fazer as leituras das outras soluções.

A leitura foi feita a 540 nm (visível) e a faixa de concentração de AR deve ser de 0,6 a 1,5 g/L.

### **3.2.3.2 Métodos para Determinação de Proteínas**

Os métodos de LOWRY e BRADFORD foram utilizados para a determinação de proteínas.

#### **3.2.3.2.1 Método de Lowry**

A concentração de proteínas nas amostras retirada foi avaliada quantitativamente empregando o método de Lowry (HARTREE, 1972), que utiliza como curva padrão a soro albumina bovina.

As amostras a serem analisadas foram convenientemente diluídas (quando necessário) para não ultrapassarem a concentração de 0,4 mg/ml.

Em tubos de ensaios, adicionou-se 1 ml de amostra e 5 ml de solução preparada na hora do uso contendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1 N,  $\text{CuSO}_4$  1% em água destilada e tartarato de sódio potássico 1% em água destilada. Esperou-se 15 minutos e adicionou-se 0,5 ml do reagente Folin Ciocalteau diluído 1:2 na hora do uso. Após 30 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro à 660nm.

### 3.2.3.2 Método de Bradford

O reativo foi preparado dissolvendo-se 100mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 (RioRad) em 50 ml de etanol e 95% v/v (Merck) sob vigorosa agitação. A esta solução adicionou-se 100 ml de ácido fosfórico a 85% p/v, diluindo-se em balão volumétrico até 1l com água destilada. Esta solução foi filtrada sob vácuo em sistema Millipore com papel de filtro Wathman 113, e armazenada em frascos na geladeira, sendo estável por duas a três semanas.

Procedimento:

Em tubos de ensaios limpos e secos, adicionou-se 5ml do reativo e 100µl da amostra. A amostra foi convenientemente diluída quando necessário, de forma que a concentração de proteína total não ultrapasse a 660mg/l. Agitou-se em vórtice, deixando-se em repouso por 5 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm.

Para amostras muito diluídas, a solução foi realizar uma diluição inversa das amostras, ou seja, adicionar maior volume de amostra para cada 5 ml do reativo, desde que leitura da absorbância estivesse compreendida dentro da faixa de calibração (BRADFORD, 1976).

### 3.2.3.3 Análise de Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi quantificada através da conversão de penicilina G em 6-APA, e consiste em deixar a penicilina ser hidrolisada por uma alíquota da amostra obtida.

### 3.2.3.3.1 Método Colorimétrico do PDAB

Este método consiste em determinar a atividade amidase da penicilina G acilase utilizando o colorimétrico p-dimetilamidobenzaldeído (PDAB). O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G, reage com o PDAB, gerando um produto colorido que é 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 200-1000  $\mu\text{m}/\text{ml}$ .

#### Procedimento:

Em um reator aquecido por meio de camisa de água, a 37 °C colocou-se uma quantia de PG 5% p/v em tampão fosfato 10mM pH 8,0 e esperou-se estabilizar a temperatura. Após a estabilização foi adicionado a solução de enzima sob agitação. Tomaram-se alíquotas em diferentes tempos de reação, no qual devem ser colocadas em cubetas preparadas com reagentes PDAB, que consistia em uma mistura de 0,5 ml de PDAB 0,5% p/v em metanol, 2,0ml de ácido acético 20% v/v e 1,0ml de solução de hidróxido de sódio 0,05 M, deixando-se reagir por 2,5 minutos.

Obtidos os pontos em diferentes tempos como descrito acima, estes são dispostos em um gráfico e realiza-se um ajuste linear dos pontos obtidos. A partir da tangente desta reta, calcula-se a atividade enzimática em UI/L.

### 3.2.4 Concentração Celular

Durante os cultivos as amostras são retiradas em períodos de 2 horas (até a 12 horas) e após em períodos de 4 horas.

A análise da concentração celular é feita pelo método da massa seca.

Centrífuga-se uma alíquota de 10 ml de amostra. Após a centrifugação o sobrenadante é analisado e os tubos de centrifuga contendo as células já sem o meio de cultura são lavados com um volume de 20 ml de solução de ácido acético 5% e em seguida filtrados em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (previamente pesadas). As membranas contendo o filtrado são levadas novamente para estufa.

### 3.2.5 Hidrólise de Caseína

A hidrólise da caseína 8% foi realizada em pH-stato (Metrohn modelo Titrimo) usando solução 5M de NaOH para manter o pH constante. Temperatura de 50 °C e pH = (8,0  $\pm$  0,1) são os valores ótimos recomendados pela indústria Novo Nordisk Industrial do Brasil. O tempo para ocorrer à hidrólise de caseína foi em média de 4 horas após colocar-se a enzima e mais 30 minutos em banho a 80 °C.

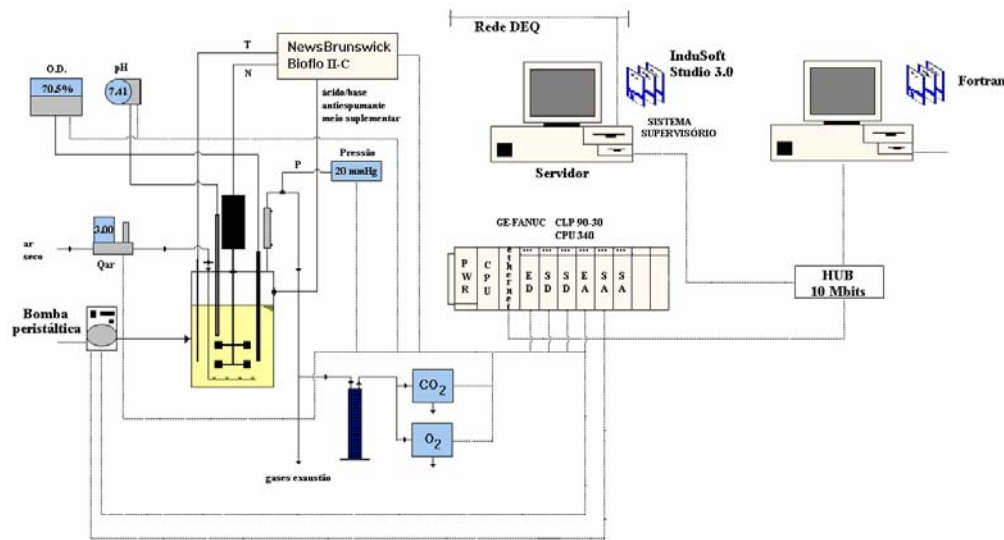
### 3.2.6 Preparo dos Criotubos

O preparo dos criotubos com o *Bacillus megaterium* ATCC 14945 foram realizado em várias etapas. A linhagem foi repicada em tubos inclinados com

meio sólido e mantida por 7 dias a 30° C. Decorrido este período, os esporos foram suspensos em 3 ml de solução salina 0,9% e repassados aos frascos de Roux, previamente preparados com meio sólido. Os frascos de Roux são mantidos à 30° C por 7 dias. Passado este período, adicionou-se ao frasco contendo os esporos uma solução crioprotetora estéril (glicerol 20% v/v) precipitada de uma vigorosa agitação e raspagem dos esporos; as suspensões de esporos de todos os frascos foram transferidas para um erlenmeyer previamente esterilizado. Uma alíquota para contagem dos esporos foi retirada em Câmara de Neubauer e por fim os criotubos foram utilizados para acondicionar os volumes de suspensão de esporos referentes à concentração desejada ( $10^8$  esporos/ml) e armazenados em ultrafreezer.

### **3.3 Sistema de Aquisição de Dados**

Um esquema do aparato experimental com o sistema de aquisição de dados utilizado neste trabalho é ilustrado na Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Esquema do aparato experimental com sistema de aquisição de dados (CRUZ,2000).

O sistema de aquisição de dados é formado pelos seguintes equipamentos (CRUZ, 2000):

- Eletrodo de pH (tipo 465-90, Mettler Toledo) conectado a Medidor e Transmissor de pH (modelo TH-41, Digimed);
- Eletrodo de oxigênio dissolvido (tipo 12/320T,, Metler Toledo) conectado a Medidor e Transmissor de Oxigênio Dissolvido (O<sub>2</sub> 4500, Metler Toledo);
- Bombas peristálticas (BVP, Ismatec) para adição de meio suplementar, ácido e/ou base;
- Fluxômetro de massa (modelo 33116-20, 0 a 5 NLPM, Cole Parmer®) para monitorização da vazão de ar no sistema;
- Transdutor de pressão (modelo 560, T&S Equipamentos) para monitorizar a sobre pressão no interior do biorreator;



- Sensor de temperatura (Pt – 100), inserido em um poço dentro do reator;
- Analisador de oxigênio e de dióxido de carbono (Rosemount Analytical) acoplados para análise dos gases de saída do fermentador. Os analisadores são calibrados com gases padrões (N<sub>2</sub> 99,99% e CO<sub>2</sub> 5,0% / 95%).

### 3.3.1 Descrição do Sistema de Controle de pH

O pH é controlado na faixa de 2,00 a 12,00 ( $\pm 0,01$ ). Sensor amperométrico (pHE - 200) é imerso no meio da reação para determinar o valor do pH, sendo o sinal deste sensor enviado ao transmissor. Para controle de pH, emprega-se um controlador por faixas (com limites inferior e superior) (pHC - 200) o qual aciona duas bombas peristálticas para adição de ácido ou base, dependendo do pH do meio e do “set-point” determinado pela função lógica programável (CRUZ, 2000).

### 3.4 Algoritmo baseado na Lógica *Fuzzy*

Desenvolveu-se algoritmo *Fuzzy* composto por 11 regras. O algoritmo *Fuzzy* tomou por base aquele desenvolvido por SOUSA Jr (1999). Este foi programado em FORTRAN e compilado como biblioteca dinâmica (DLL) para uso em conjunto com programa elaborado em *Visual Basic* (GOMES, 2001).

Comparando-se o perfil da fração molar de CO<sub>2</sub> ( $Y_{CO_2}$ ) e o da concentração de PGA observa-se que após o pico de CO<sub>2</sub>, tem-se a máxima produção da enzima, a partir do qual o nível de liberação começava a cair sensivelmente. Fazendo uso apenas do tempo de cultivo e do nível de liberação de gás carbônico, deveria ser esta transição de nível de liberação de CO<sub>2</sub>, de crescente para decrescente, a principal informação utilizada para se chegar ao objetivo desejado.

O controlador *Fuzzy* (SOUSA Jr, 1999) foi dividido em três níveis de raciocínio: atenção, identificação do pico CO<sub>2</sub> e proteção. As regras do nível de atenção são:

- 1) SE tempo cedo e CO<sub>2</sub> baixo ENTÃO não ativa o nível de ação
- 2) SE tempo tarde e CO<sub>2</sub> baixo ENTÃO não ativa o nível de ação
- 3) SE tempo cedo e CO<sub>2</sub> alto ENTÃO ativa o nível de ação
- 4) SE tempo tarde e CO<sub>2</sub> alto ENTÃO ativa o nível de ação

O nível de ação é ativado assim que o grau de pertinência “ativa” ultrapasse um valor pré-determinado de 0,8 (80% de certeza) (Figura 3.3 - A).

A regra associada com o nível identificação do pico CO<sub>2</sub> baseou-se no cálculo da variação da fração molar de CO<sub>2</sub> ( $\Delta CO_2$ ), equação (3.1).

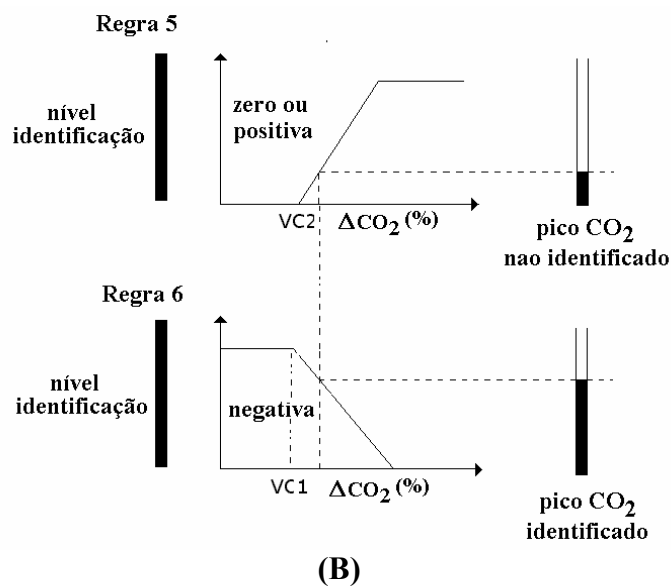
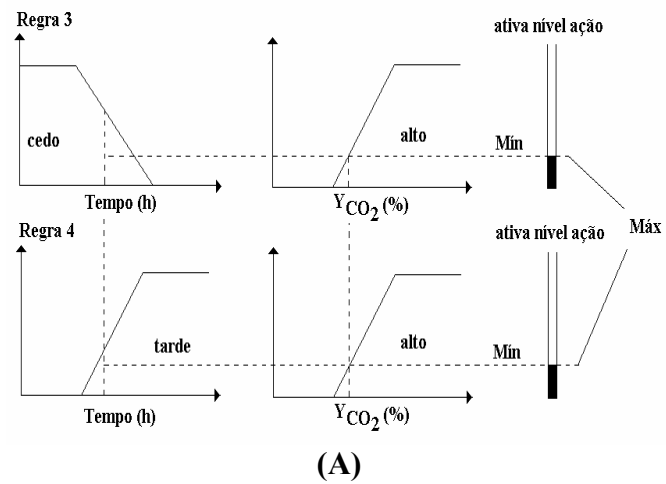
$$\Delta CO_2(n) = CO_2(n) - CO_2(n - 20) \quad (3.1)$$

onde  $n$  é o enésimo valor de  $\Delta CO_2$  lido pelo sistema de aquisição de dados e 20 minutos é o intervalo de tempo admitido.

A equação (3.1) funciona como um filtro passa-baixa, suavizando os dados experimentais obtidos pelo sistema de aquisição de dados. As duas regras *Fuzzy* para o nível de identificação foram (Figura 3.3).

5) SE variação de ( $\Delta\text{CO}_2$ ) é zero ou positiva ENTÃO não avisa “pico  $\text{CO}_2$ ”

6) SE variação de ( $\Delta\text{CO}_2$ ) é negativa ENTÃO avisa “pico  $\text{CO}_2$ ”



**Figura 3.3.** Diagrama esquemático ilustrando a atuação do controlador *Fuzzy*: (A) regra nível ação, (B) regra identificação (Adaptado de SOUSA Jr, 1999).

Foi necessário ainda adicionar regra de proteção ao controlador *Fuzzy*, para evitar a identificação de um “falso pico” gerado por oscilações no sistema.

As regras de proteção foram:

- 7) SE tempo é cedo e variação de CO<sub>2</sub> negativa ENTÃO espera
- 8) SE tempo é tarde e variação de CO<sub>2</sub> negativa ENTÃO confirma “pico CO<sub>2</sub>”
- 9) SE tempo é cedo e variação de CO<sub>2</sub> positiva ENTÃO cancela “pico CO<sub>2</sub>”
- 10) SE tempo é tarde e variação de CO<sub>2</sub> positiva ENTÃO cancela “pico CO<sub>2</sub>”

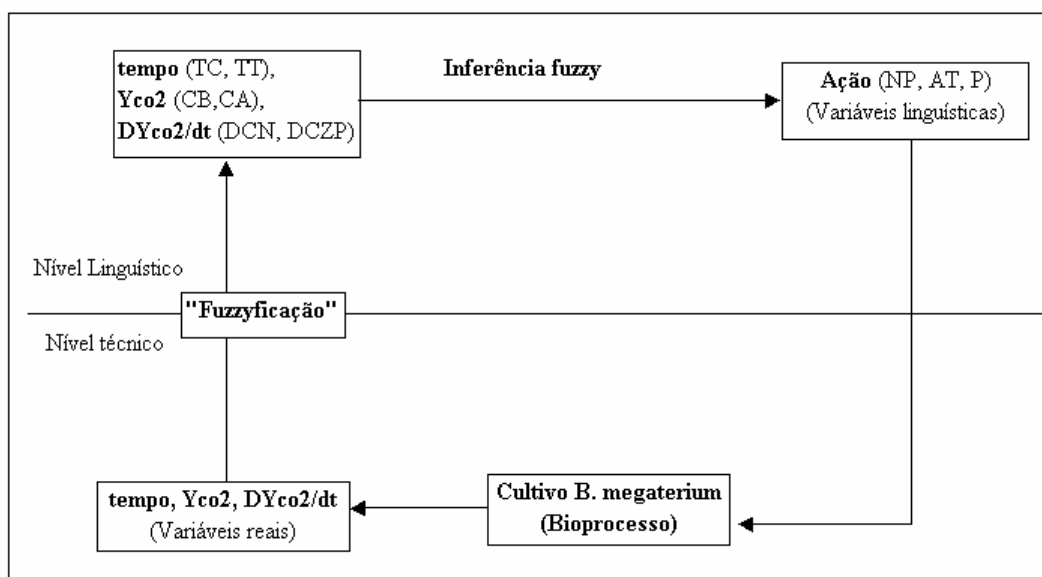
Como critério de parada do cultivo, estipulou-se o cálculo da derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> ( $DY_{CO_2}/dt$ ). No momento em que esta variável atingisse valor maior ou igual a  $-0,20$ , sinalizava-se que o cultivo havia atingido máximo nível de atividade enzimática.

Na Tabela 3.4 são apresentados os valores dos parâmetros do controlador *Fuzzy* utilizados nos experimentos.

<b>Tabela 3.4.</b> Parâmetros do Controlador <i>Fuzzy</i> utilizados em todos os experimentos na identificação da máxima concentração de enzima (PGA).	
Tempo Cedo (T1)	15 horas
Tempo Tarde (T2)	17 horas
YCO <sub>2</sub> Baixo (C1)	0,5 % de saturação
YCO <sub>2</sub> Alto (C2)	1,1 % de saturação
VC1	-0,12
VC2	0,0
trec (tempo de recuperação)	1,20 hora

Cabe ressaltar que estes foram ajustados em um conjunto de dados (ajustes), sendo fixados e utilizados nos demais experimentos. O valor fixado para T1 e T2 corresponde aos valores de tempo de cultivo, C1 corresponde a um valor estabelecido para que os níveis de atenção do controlador entre em Atenção e C2 corresponde ao valor que permitisse a colocação dos dados do nível de liberação de CO<sub>2</sub> dentro do nível de Ação.

A Figura 3.4 apresenta a seqüência da *fuzzyficação* e *defuzzyficação* do algoritmo desenvolvido em Fortran.



TC=tempo cedo; TT=tempo tarde; CB=Yco<sub>2</sub> baixo; CA=Yco<sub>2</sub> alto; DCN=Dyco<sub>2</sub> negativa; DCZP=DYco<sub>2</sub> zero ou positiva; NP=não pare; AT=atenção e P=pare cultivo.

**Figura 3.4** Etapas de *fuzzyficação* e *defuzzyficação* do algoritmo *Fuzzy* desenvolvido em Fortran.

Dentre as variáveis reais obtidas nos experimento em biorreatores na produção de PGA por *B. megaterium* destacam-se o tempo, a fração molar de CO<sub>2</sub> (Yco<sub>2</sub>) e a derivada da fração molar de CO<sub>2</sub>(DYco<sub>2</sub>) em relação ao tempo. Através

da *fuzzyficação* destas variáveis reais (nível técnico → nível lingüístico), obtem-se as variáveis lingüísticas (TC=tempo cedo; TT=tempo tarde; CB=Yco<sub>2</sub> baixo; CA=Yco<sub>2</sub> alto; DCN=Dyco<sub>2</sub> negativa; DCZP=DYco<sub>2</sub> zero ou positiva;). A seguir, ocorre a inferência *Fuzzy* fornecendo a ação do algoritmo (NP=não pare; AT=atenção e P=pare cultivo) indicando o tempo ideal para a parada do cultivo.

#### **4. Resultados e Discussões**

Os resultados serão apresentados em três itens.

No item 4.1 é apresentado resultado de experimentos utilizando caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) como fonte de nitrogênio.

O item 4.2 apresenta os resultados dos experimentos onde a solução de CHE foi substituída pela solução de amino ácidos livres (a.a.).

O item 4.3 apresenta os resultados utilizando algoritmo empregando lógica *Fuzzy* (elaborado em Fortran, Microsoft, e “pacote Fuzzy” do programa MatLab, Mathworks 5.2).

##### **4.1 Resultados utilizando Caseína Hidrolisada Enzimaticamente (CHE) na Produção de PGA em Biorreator**

Foram realizados três experimentos com a utilização de CHE como fonte de nitrogênio e com o soro de queijo como fonte de carbono. O primeiro experimento foi considerado ensaio padrão (sendo utilizado como referência de comparação para os outros experimentos). No segundo e terceiro ensaios foi utilizado controle de pH em  $8.1 \pm 0,1$  empregando HCl 5M.

#### **4.1.1 Primeiro Ensaio em Biorreator: Meio de Produção Padrão (CHE/20% OD)**

O primeiro ensaio foi realizado em biorreator tipo tanque agitado e aerado (Bioflow II-C) empregando microrganismo *Bacillus megaterium*, utilizando meios de cultura como descrito no item 3.2.1. Este experimento teve o acompanhamento em tempo real de variáveis de processo como pH, fração molar dos gases de saída ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), temperatura e controle de oxigênio dissolvido.

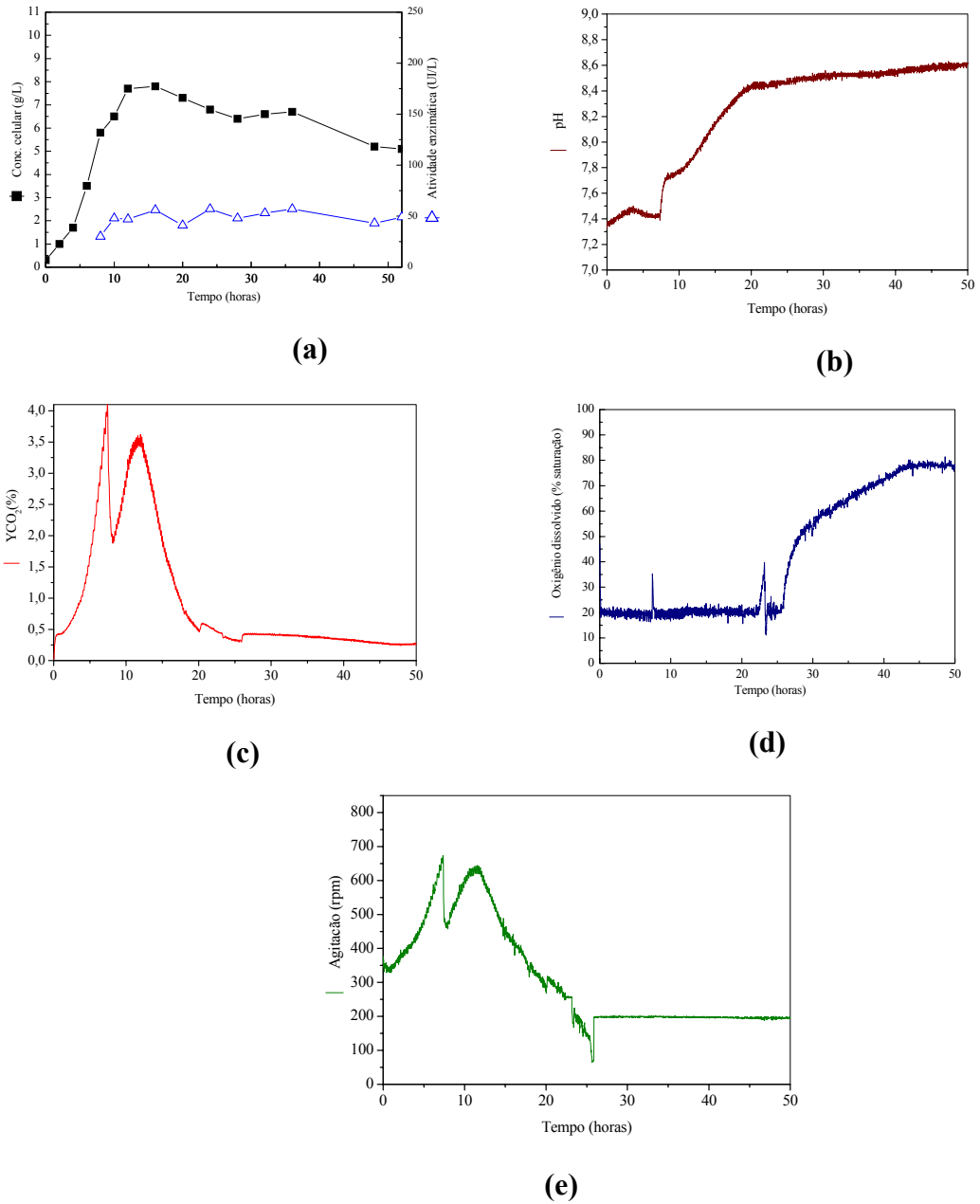
As condições das variáveis de processo adotadas foram: temperatura controlada em  $30^\circ\text{C}$ ; controle de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo o cultivo; sem controle de pH; aeração de 2 NLPM/min; adição do ácido fenil acético no início do cultivo.

Este ensaio teve duração de 52 horas com amostras retiradas a cada 2 horas nas primeiras 16 horas, e em seguida em períodos de 4 horas. Analisou-se a concentração celular, atividade enzimática, concentração de lactose e concentração de proteínas.

Os resultados referentes a esse ensaio são apresentados no Apêndice A1 (Tabela A.1). Neste ensaio são apresentados os gráficos das variáveis obtidas pelo sistema de aquisição de dados (Figura 4.1). Nessa figura também estão incluídos os resultados da concentração celular (Cx) e atividade enzimática (A.E.), que foram obtidos após análises quantitativas.

A Figura 4.1 apresenta os gráficos do primeiro experimento obtido pelo sistema de aquisição de dados.





**Figura 4.1:** Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado no fermentador: **(a)** concentração celular e atividade enzimática obtida em análises de laboratório; **(b)** pH; **(c)** concentração de  $CO_2$  nos gases de saída; **(d)** concentração do oxigênio dissolvido e **(e)** agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Como pode ser visto na Figura 4.1 – (a) a atividade enzimática apresentou-se irregular a partir de 12 horas até o final do cultivo, tendo um comportamento oscilatório. A produção máxima atingida neste experimento foi de 57 UI/L em 16 horas de cultivo (apresentando um valor muito baixo) e a concentração celular apresentou seu máximo em 16 horas com 7,8 g/l. A produção da enzima está associada ao crescimento celular embora exiba um atraso de médio de 4 horas. A fração molar de dióxido de carbono exibe relação direta com a concentração celular. O pH caminha a valores básicos durante o transcorrer do cultivo.

O oxigênio dissolvido (OD) foi controlado em 20 % saturação até próximo a 30 horas de cultivo. Como pode ser visto na Figura 4.1 – (d), o valor de OD começou a aumentar a partir de 28 h, pois o controlador (Controlador Lógico Programável - CLP) não estava mais conseguindo controlá-lo, assim a agitação foi mantida constante em 200 rpm.

#### **4.1.2 Segundo Ensaio em Biorreator (Controle de pH/CHE)**

Este experimento teve o acompanhamento em tempo real de variáveis de processo como pH, fração molar dos gases de saída ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ) e temperatura. Neste ensaio houve problemas com o eletrodo de oxigênio dissolvido, inviabilizando o acompanhamento dessa variável.

As condições das variáveis de processo adotadas foram: temperatura controlada em  $30^\circ\text{C}$ ; pH controlado à  $(8,0 \pm 0,1)$  com a adição de HCl 5M; sem controle de oxigênio dissolvido; aeração de 2 NLPM/min e adição do ácido fenil acético no início do cultivo.

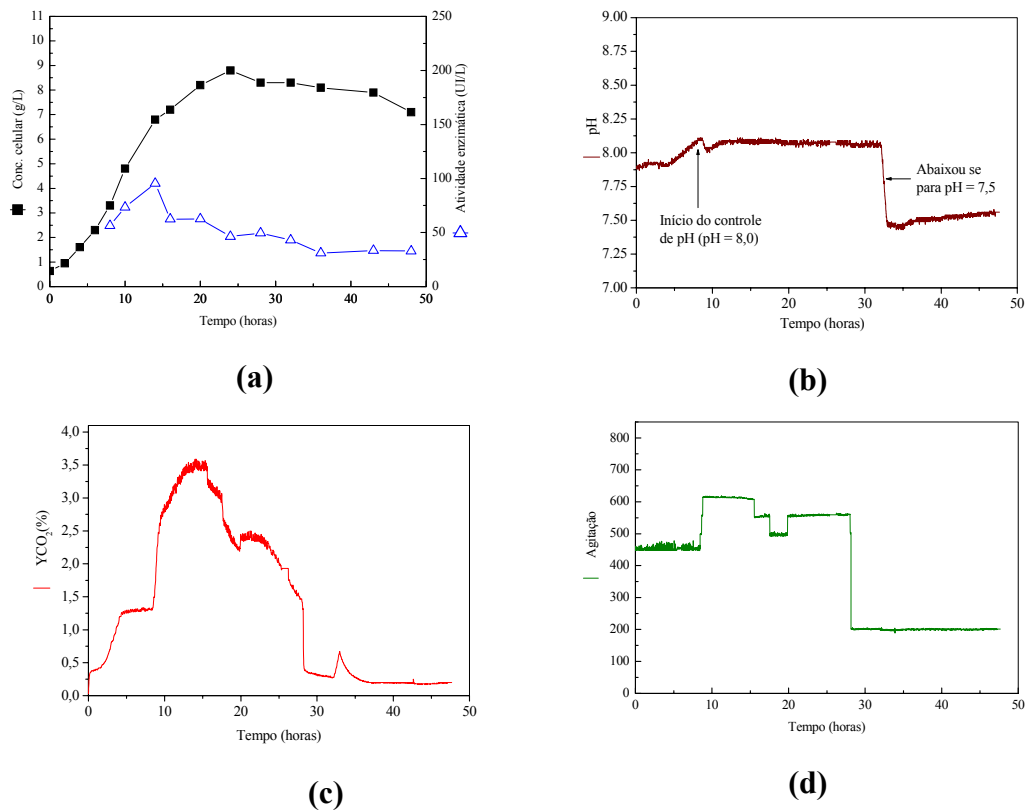
Este ensaio teve duração de 48 horas com amostras retiradas a cada 2 horas nas primeiras 16 horas, e a partir desse momento passaram a ser retiradas a cada 4 horas. Analisou-se a concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de lactose e concentração de proteínas.

Os resultados referentes a esse ensaio são apresentados no Apêndice A1 (Tabela A.2).

A Figura 4.2 ilustra o perfil da concentração celular (Cx) e produção de enzima (A.E.), a variação do pH, a fração molar dos CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> nos gases de exaustão do biorreator e a agitação.

Observa-se na Figura 4.2 – (a) que a atividade enzimática atingiu seu valor máximo em 14 horas (95,0 UI/L). Após esse período iniciou-se um decréscimo em sua concentração atingindo em 36 horas o valor de 26 UI/L. Apesar deste decréscimo ocorrido após 14 horas, pode-se notar que a produção neste experimento foi maior que a obtida no ensaio anterior (57 UI/L). Neste experimento, a produção da enzima diminuiu o atraso (2 horas) em relação ao crescimento celular.

A partir de 34 horas, alterou-se o “set-point” do pH para 7,5, com o objetivo de avaliar o comportamento do microrganismo em um pH mais baixo que o do início do ensaio (Fig. 5.2-(b)). Como se pode observar, a partir desse momento a concentração da enzima caiu mais ainda chegando até o final da fermentação num valor muito baixo.



**Figura 4.2:** Resultados do segundo ensaio realizado em fermentador: **(a)** Atividade Enzimática e Concentração celular, obtidas em análises de laboratório; **(b)**; pH; **(c)** concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída, **(d)** Agitação, obtidos pela aquisição de dados.

Na Fig.5.2-(c), pode-se verificar que houve um aumento na evolução de CO<sub>2</sub> até 16 horas devido ao crescimento do microrganismo. Após este período a concentração de CO<sub>2</sub> começou a diminuir, embora o crescimento celular continuasse até 25 horas, mantendo-se estável até o final da fermentação (concentração de 8,8 g/L).

Neste segundo ensaio não foi possível monitorar e controlar a concentração de oxigênio dissolvido devido a problemas no sensor. Desta forma a agitação foi mantida entre 450 e 600 rpm até 36 horas e depois fixada em 200 rpm (Fig. 5.2-d).

Com o sistema de aquisição de dados foi possível acompanhar as variáveis de processo em tempo real (tempo de aquisição dos dados: 2 segundos). A Figura 4.2 (b) (c) e (d) ilustra as variáveis acompanhadas durante o cultivo (pH,  $Y_{O_2}$  e  $Y_{CO_2}$ , e agitação respectivamente), bem como a concentração celular e de enzima obtidas em análise de laboratório (Figura 4.2 –(a)).

Pode-se verificar na figura 4.2 – (b) que o controle de pH funcionou muito bem, apresentando o perfil que foi desejado durante todo o cultivo, ou seja, controlou-se o pH em  $(8,0 \pm 0,1)$  até 34 horas e depois em  $(7,5 \pm 0,1)$  até o final do cultivo.

Este experimento apresentou um aumento significativo na produção de PGA em relação ao experimento anterior (mesmo apresentando um decréscimo na produção após 16 horas de cultivo), levando-nos a programar um terceiro ensaio com controle de pH, onde este ensaio teria as condições operacionais como no segundo, diferenciando-se apenas por uma suplementação de ácido fenil acético (AFA) após 10 horas de fermentação, uma vez que o AFA é o indutor da reação.

Como não foi possível neste segundo ensaio acompanhar a concentração do oxigênio dissolvido e a produção foi maior que no primeiro ensaio, programou-se para o terceiro ensaio seguir com o mesmo perfil de agitação (fixando a agitação manualmente), esperando obter os mesmos resultados ou até melhores.

### 4.1.3 Terceiro Ensaio em Biorreator (Controle de pH/CHE/Sem controle de OD)

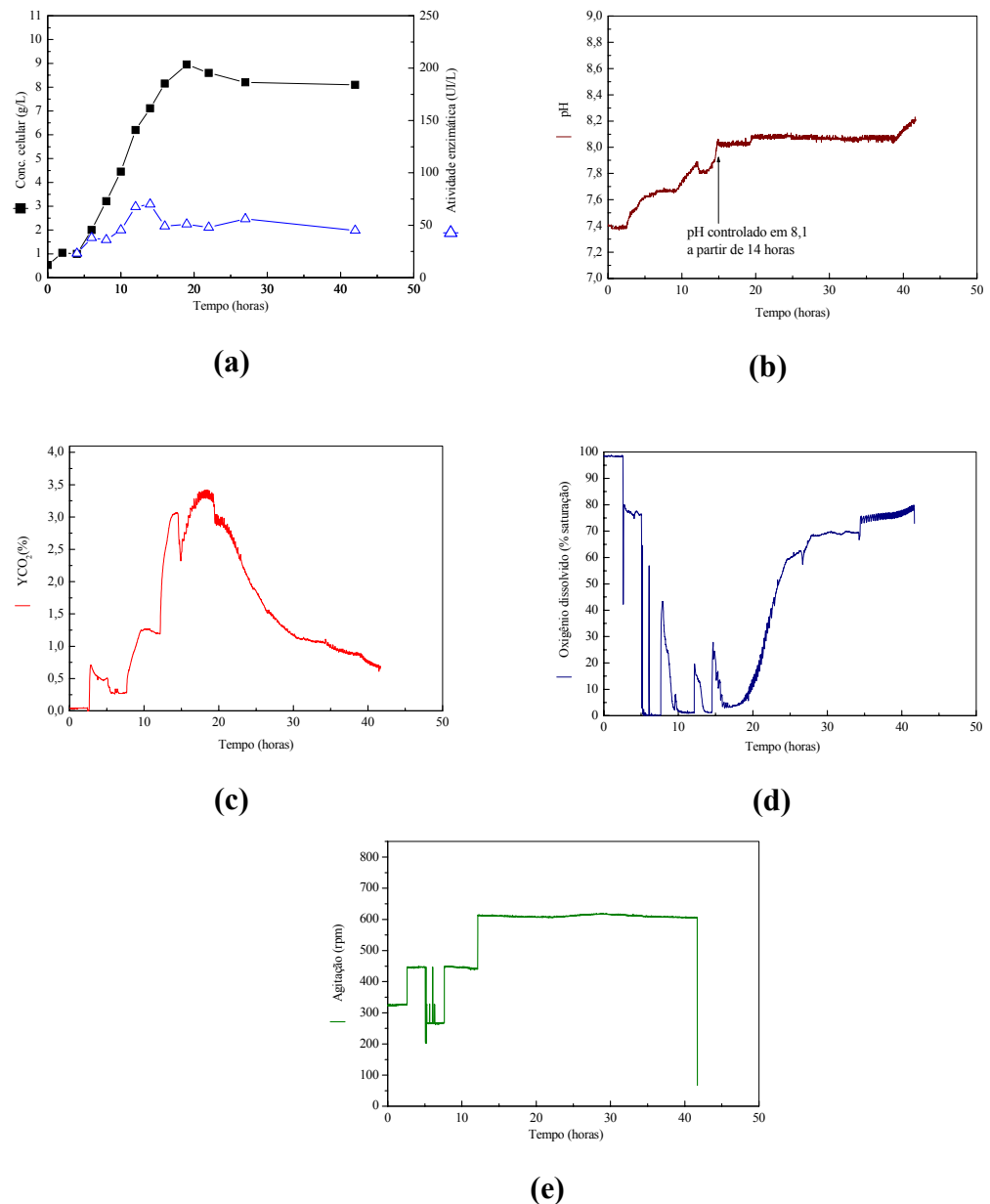
O terceiro ensaio empregou os mesmos meios de cultura. Contudo, houve a suplementação de solução contendo ácido fenil acético (indutor da reação) após 10 horas de cultivo (batelada alimentada).

As condições operacionais adotadas foram: temperatura controlada em 30°C; pH controlado à  $(8,0 \pm 0,1)$  com a adição de HCl 5M; aeração de 2 NLPM/min; adição do ácido fenil acético (AFA) no início do cultivo; suplementação de solução de AFA após 10 horas de cultivo (1 L);

O ensaio teve duração de 42 horas. Analisou-se a concentração celular, atividade enzimática, concentração de lactose e concentração de proteínas. Os resultados referentes a esse ensaio são apresentados no Apêndice A1 (Tabela A.3).

O controle de pH iniciou-se após 12 horas de fermentação ( $\text{pH} = 8,1 \pm 0,1$ , controle liga-desliga da bomba peristáltica: bomba funcionava 20 segundos e ficava em repouso por 10 segundos). O controlador apresentou desempenho muito satisfatório mantendo o pH do meio de cultivo em  $8,1 \pm 0,1$ .

A Figura 4.3 mostra os resultados da concentração celular (Cx) e a atividade enzimática (A.E.) obtidas após análise em laboratório, os valores de pH, fração molar dos gases de saída ( $Y_{\text{CO}_2}$  e  $Y_{\text{O}_2}$ ), agitação e oxigênio dissolvido adquiridos pela aquisição de dados.



**Figura 4.3** Resultados do terceiro ensaio em fermentador: **(a)** concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; **(b)** valores do pH; **(c)** concentração de CO<sub>2</sub>; **(d)** Oxigênio dissolvido e **(e)** Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Na Figura 4.3 – (a) pode-se verificar que a atividade enzimática foi menor que obtida no segundo ensaio. A atividade enzimática atingiu um valor máximo da ordem de 70 UI/L em 14 horas de fermentação tendo a partir deste ponto um

decréscimo em sua produção, mantendo-se estável até o final da fermentação. A concentração celular chegou a 9,0 g/L em 19 horas de cultivo.

O controle de pH realizado pelo controlador lógico programável (CLP) deste terceiro ensaio iniciou-se após 12 horas de fermentação, apresentando o perfil de pH desejado, ou seja, um controle de pH em  $(8,1 \pm 0,1)$ .

O AFA foi adicionado no início do cultivo em todos os experimentos. Como neste terceiro ensaio houve a suplementação do cultivo com ácido fenil acético, o pH teve uma pequena defasagem para subir, ou seja, para iniciar o controle do pH que seria ajustado para em torno de 8,1.

Pôde-se perceber que houve um aumento de produção de penicilina G acilase no cultivo onde o pH foi controlado em 8,1 até 14 horas (ensaio 2). Em todos os experimentos verificou-se que logo após atividade enzimática atingir um valor máximo, houve uma queda de sua concentração. A razão desta queda ainda é incerta. Estudos em paralelo tentando quantificar se proteínas presentes no meio de cultivo poderiam estar induzindo à formação de proteases, as quais hidrolisam a enzima PGA formada, não identificaram nenhuma protease. É mais provável que essa queda na concentração da enzima deve-se à sua inativação pela adição do ácido HCl 5M durante o cultivo sob baixa agitação.

As dificuldades operacionais relacionadas com estes três experimentos iniciais (perda da medida de oxigênio dissolvido durante o cultivo em dois experimentos) e a complexidade inerente aos bioprocessos dificultam uma análise mais profunda destes resultados. Por outro lado, estudos em paralelo realizados por SOUZA *et al.*, 2002, mostraram que a substituição da caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) por solução de aminoácidos livres resultou em grande



aumento na produção de PGA. Dessa forma, os próximos experimentos foram realizados com esta solução.

Ressalta-se, que o controle de pH implementado no sistema supervisorio apresentou um bom desempenho nos dois experimentos em que foi utilizado.

## **4.2 Resultados utilizando Solução de Aminoácidos Livres**

Foram realizados três experimentos com a utilização da solução de aminoácidos (10 g/L) como fonte de nitrogênio e com soro de queijo como fonte de carbono. Pode-se verificar que esta troca provocou forte influência na produção de PGA gerando um aumento significativo em sua concentração.

### **4.2.1 Quarto Ensaio em Biorreator (Padrão/aa/20% OD)**

Neste experimento realizou-se a troca da fonte de nitrogênio, o hidrolisado de caseína foi substituído por solução de aminoácidos livres.

Os resultados obtidos mostraram um aumento na produção de PGA. Com este novo meio a produção saltou de 95 UI/L (máxima produção obtida no segundo ensaio) para 180 UI/L.

Este experimento teve o acompanhamento em tempo real de variáveis de processo como pH, oxigênio dissolvido, fração molar do CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> e agitação. O ensaio teve duração de 42 horas com amostras retiradas a cada 2 horas (primeiras 16 horas), e a partir desse momento a cada 4 horas. Analisou-se a concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.) e concentração de lactose.

As condições das variáveis de processo adotadas foram: temperatura controlada em 30°C; controle de oxigênio dissolvido em 20% saturação durante todo o cultivo; sem controle de pH; aeração de 2 NLPM/min e adição do ácido fenil acético no início do cultivo.

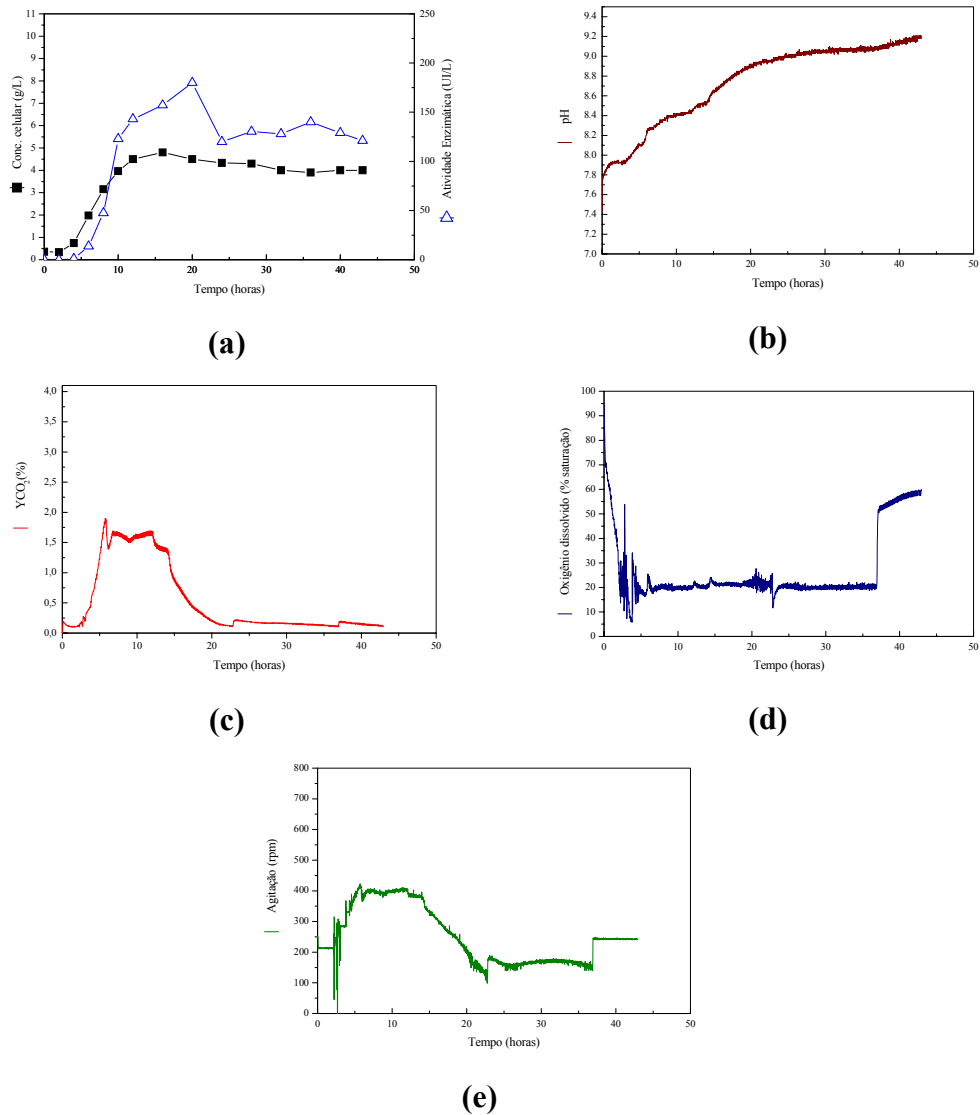
A partir deste ensaio decidiu-se realizar em paralelo aos ensaios em fermentador experimentos em shaker nas mesmas condições. A atividade enzimática obtida no shaker em 20 e 43 horas foi na ordem de 121 UI/L e 150 UI/L respectivamente. Na Tabela A.4 (Apêndice A2) estão os resultados obtidos neste experimento.

Na Figura 4.4 estão apresentados os gráficos das variáveis como concentração celular e atividade enzimática, pH, oxigênio dissolvido, fração molar deCO<sub>2</sub> e agitação.

Este experimento foi considerado como ensaio padrão (pois não houve o controle de pH e o oxigênio foi controlado em 20% de saturação durante todo o cultivo) e serviu como base de comparação para os demais ensaios.

Como se pode verificar, Figura 4.4 - (a), a atividade enzimática apresentou alto valor, chegando a 180 UI/l em 20 horas de cultivo. Este resultado foi considerado positivo pois anteriormente a máxima produção obtida tinha sido 95 UI/l (segundo experimento).

A atividade enzimática seguiu as mesmas características que nos ensaios anteriores, tendo seu pico de máxima atividade entre 12 e 20 horas, logo em seguida houve uma queda e por fim, manteve-se constante depois de 24 horas com uma produção de 120 UI/L.



**Figura 4.4.** Resultados do quarto ensaio em fermentador: **(a)** concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; **(b)** valores do pH; **(c)** concentração de CO<sub>2</sub>; **(d)** Oxigênio dissolvido e **(e)** Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Neste experimento não houve o controle de pH. O oxigênio dissolvido (Figura 4.4 - (c)) foi controlado em 20 % de saturação durante todo o cultivo, como vinha sendo controlado nos ensaios anteriores. Pode-se notar que há um aumento da concentração de oxigênio no fim do cultivo, isto se deve pelo fato do

controlador não conseguir mantê-lo em 20%. Assim, pela Figura 4.4 - (f), a agitação foi mantida constante em 250 rpm.

#### 4.2.2 Quinto Ensaio em Biorreator (Controle de pH/aa/OD 20%)

Este quinto ensaio teve por objetivo verificar o efeito do controle do pH na produção de PGA pelo *Bacillus megaterium*.

O controlador de pH foi ativado após 8 horas do início da fermentação ( $\text{pH} = 8,1 \pm 0,1$ ), atuando sob a bomba de adição de ácido (controle liga-desliga).

A bomba do controlador funcionava 20 segundos adicionando HCl 5M e ficava em repouso por 10 segundos. Caso esses 20 segundos não fossem suficiente para o controle de pH, a bomba era novamente acionada com um tempo de 30 segundos ligada e 10 segundos em repouso. Este controle apresentou novamente um ótimo funcionamento e um perfil de pH como programado no início do experimento, ou seja, foi controlado até o final do cultivo em ( $8,1 \pm 0,1$ ).

As condições das variáveis de processo adotadas foram: temperatura controlada em 30°C; controle de oxigênio dissolvido em 20% saturação durante todo o cultivo; com controle de pH em ( $8,1 \pm 0,1$ ).; aeração de 2 NLPM/min e adição do ácido fenil acético no início do cultivo;

Foi realizado novamente um ensaio em *shaker* paralelamente ao quinto ensaio do fermentador utilizando-se os mesmos meios, inclusive o mesmo inóculo. Neste ensaio em shaker paralelo ao quinto experimento em biorreator apresentou atividade enzimática em 24 horas na ordem de 193 UI/L, enquanto que em 36 horas a atividade enzimática foi na ordem de 201 UI/L

Na Tabela A.5 (Apêndice A2) estão os resultados obtidos neste quinto experimento em biorreator com controle de pH visando a produção de PGA por *B. megaterium*.

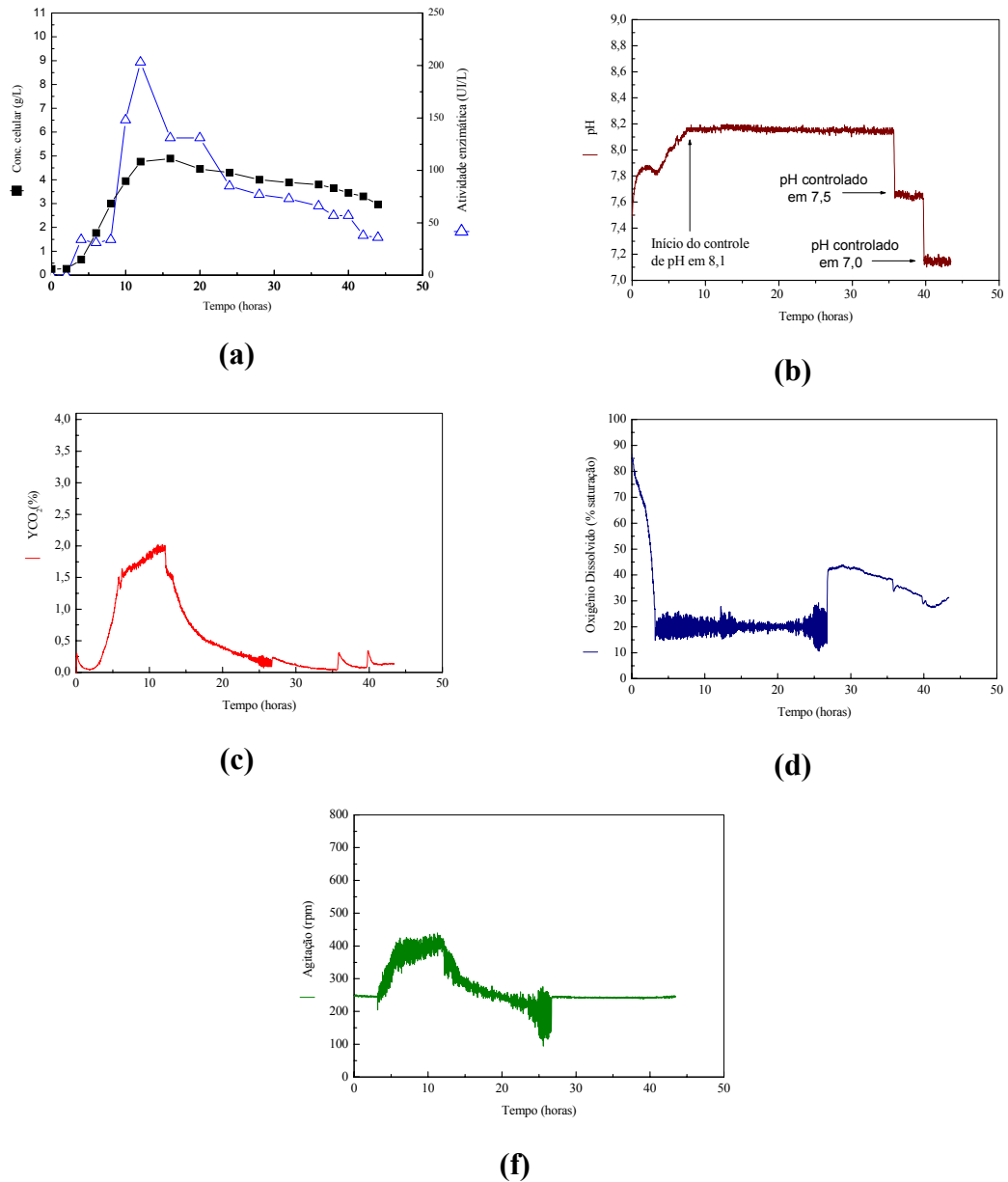
Na Figura 4.5 estão apresentados os gráficos das variáveis, como concentração celular (Cx) e atividade enzimática (A.E.), que foram obtidos após análises quantitativas e perfil de pH, fração molar dos gases de saída, agitação e oxigênio dissolvido obtidas pelo sistema de aquisição de dados.

Como se pode verificar na Figura 4.5 – (a) houve uma produção máxima de 203 UI/L em 12 horas de cultivo e, como nos ensaios anteriores, houve uma ligeira queda após esta produção chegando ao final do cultivo em 44 horas com uma A.E. muito baixa, ou seja, 36 UI/L.

O controle de pH iniciou-se com 8 horas de cultivo, e este foi controlado em  $(8,1 \pm 0,1)$  até 36 horas. Após 36 horas de cultivo o controlador foi novamente programado para que o pH chegasse a um valor mais baixo que o programado no início do experimento, isto é, para  $\text{pH}=7,5$ . Isto foi decidido para que pudéssemos verificar como a produção de PGA se comportaria num pH muito baixo.

Após 40 horas de cultivo o pH da solução do fermentador foi novamente alterado, agora para um valor mais baixo, ou seja, o pH da solução do fermentador deveria permanecer em 7,0. (Figura 4.5 – (b))

Pelas atividades enzimáticas e concentração celular realizada em laboratório, pode-se perceber que a produção de PGA em pHs muito baixo é insatisfatória e que o crescimento celular é prejudicado levando a uma morte celular maior do que nos ensaios realizados anteriormente.



**Figura 4.5** Resultados do quinto ensaio em fermentador: **(a)** concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; **(b)** valores do pH; **(c)** concentração de CO<sub>2</sub>; **(d)** Oxigênio dissolvido e **(e)** Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Neste experimento houve o controle de oxigênio dissolvido em 20% saturação durante todo do cultivo, seguindo as mesmas características que nos ensaios anteriores. Após 26 horas de cultivo pode-se verificar pela Figura 4.5 – (c) que houve um aumento da concentração de oxigênio, isto se deve (como descrito anteriormente) à dificuldade do controlador conseguir manter dentro do reator uma concentração de 20 % de O.D.

Pela dificuldade de manter o O.D. em 20 % de saturação a agitação após 26 horas estava quase parando, assim pela Figura 4.5 – (e) pode-se notar que a agitação foi mantida constante até o final do cultivo em 250 rpm.

Neste experimento obteve-se uma produção da enzima maior que nos ensaios anteriores. Decidiu-se para o próximo experimento utilizar uma solução de soro de queijo ultrafiltrada. Foi decidido utilizar esta solução (onde se eliminava as proteínas presentes no soro) para verificar se haveria produção de proteases induzidas pela presença de proteínas do soro de queijo no meio reacional.

#### **4.2.3 Sexto Ensaio em Biorreator (Controle de pH/aa/Alimentação de a.a. (40 g/l) + soro de queijo ultrafiltrado)**

Este ensaio teve as mesmas condições operacionais do anterior diferenciando-se na utilização de solução de soro de queijo ultrafiltrado e utilização de solução de HCl 2,5 M para o controle de pH do meio reacional em  $8,7 \pm 0,1$ .

As condições das variáveis de processo adotadas foram: temperatura controlada em 30°C; sem controle de O.D. por problemas no eletrodo; com controle de pH em  $(8,7 \pm 0,1)$ .; aeração de 2 NLPM/min; adição do ácido fenil acético no início do cultivo; utilização de soro de queijo ultrafiltrado; alimentação com uma solução de aminoácidos e outra com soro de queijo ultrafiltrado.

Este ensaio foi uma batelada alimentada onde foi adicionado ao meio de produção uma solução de aminoácidos 10 g/l (800 ml) e uma solução de soro de queijo ultrafiltrado 19,6 g/L (300 ml).

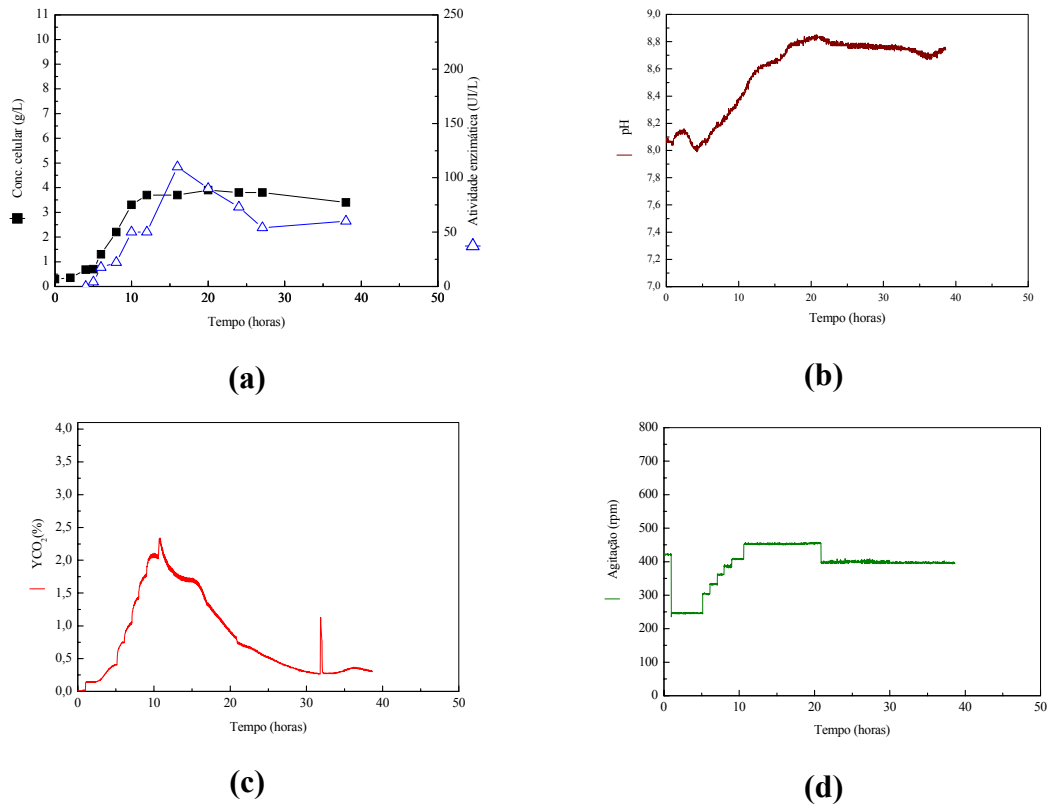
O pH deste ensaio foi controlado em  $(8,7 \pm 0,1)$  tendo em vista obter com este controle uma maior produção se comparado com os resultados obtidos nos ensaios anteriores. Este controle somente teve início em 18 horas de cultivo

Foi realizado um ensaio em shaker paralelamente ao ensaio do fermentador. Pôde-se verificar que tanto o ensaio em shaker (produção de 90 UI/L em 24 horas) quanto o ensaio em fermentador (produção de 110 UI/L em 16 horas), tiveram uma máxima produção de PGA muito similar, mas apresentando uma produção muito baixa se comparada com os experimentos 4 e 5, onde a máxima produção foi de 180 UI/L e 203 UI/L respectivamente.

Na Tabela A.6, apêndice A2, apresenta os resultados obtidos neste experimento.

Na Figura 4.6 estão apresentados os gráficos das variáveis (concentração celular (Cx) e atividade enzimática (A.E.), que foram obtidos após análises quantitativas e perfil de pH, fração molar dos gases de saída, agitação) obtidas pelo sistema de aquisição de dados.





**Figura 4.6.** Resultados do sexto ensaio em fermentador: **(a)** concentração celular e atividade enzimática obtida em análise de laboratório; **(b)** valores do pH; **(c)** concentração de CO<sub>2</sub>; **(d)** Agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Por problemas no eletrodo de oxigênio dissolvido, não foi possível acompanhar esta variável. Durante o cultivo, a velocidade de agitação foi constantemente manipulada manualmente (seguindo perfil do experimento anterior) com o objetivo de manter o oxigênio dissolvido em 20 %, conforme ilustra a Figura 4.6 – (f). Foi preciso diminuir a agitação de 425 para 250 rpm após 1 hora do início do cultivo para que o oxigênio dissolvido caísse rapidamente.

Como se pode verificar na Figura 4.6 – (a) houve uma produção máxima de 110 UI/L em 16 horas de cultivo, apresentando após esta hora o mesmo perfil de atividade que nos ensaios de anteriores, chegando ao final do cultivo com uma

produção de 60 UI/L em 38 horas (apresentado um valor muito baixo se comparado com o quarto ensaio).

O controle de pH iniciou-se após 18 horas de cultivo, e este foi controlado em  $(8,7 \pm 0,1)$  até o final do cultivo (Figura 4.6 – (b)). O controlador funcionou muito bem e seu procedimento seguiu como no ensaio anterior.

Como neste ensaio foi utilizada uma solução de soro ultrafiltrado, pode-se verificar pela Figura 4.6 – (a) que a massa celular apresentou uma concentração menor que nos dois últimos ensaios. Uma explicação para esse fato seja justamente a falta de proteínas que foram tiradas quando o soro foi ultrafiltrado, apresentando estas de alguma forma essenciais para o crescimento e produção da enzima.

Neste experimento verificou-se a importância da solução do soro de queijo, pois quando ultrafiltrado sua produção foi bem menor do que quando se utilizou uma solução padrão (experimentos 4 e 5).

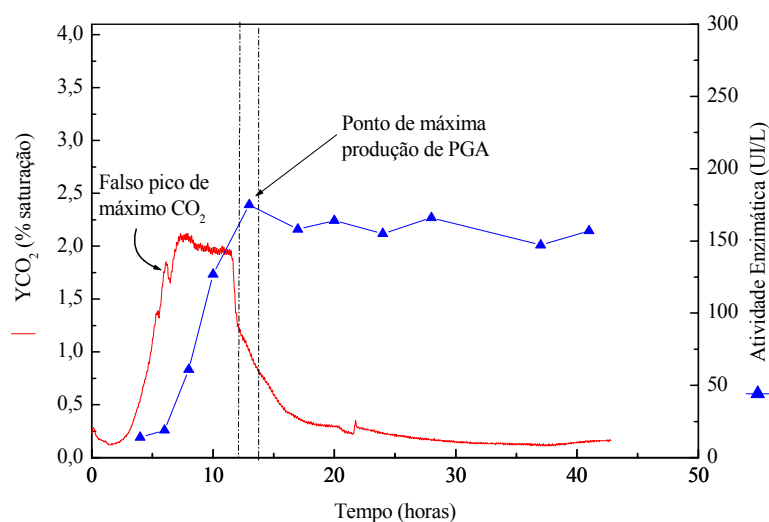
Os cultivos realizados em biorreator com controle de pH não levaram a resultados conclusivos em relação à influência da adição de ácido no aumento ou diminuição da concentração de enzima. Estudos realizados por Gomes (2001), a diferentes pHs em frascos agitados empregando *B. megaterium* não produziram resultados satisfatórios quanto à proposição de um pH ótimo de cultivo. Os experimentos realizados sem controle de pH foram os que obtiveram os melhores resultados na produção da enzima.

### 4.3 Aplicação da Lógica *Fuzzy* no Processo de Produção de PGA.

Devido à complexidade do processo de produção de PGA, inerente a todos os processos biotecnológicos, buscou-se investigar a utilização de ferramentas baseadas na inteligência artificial, como a lógica *Fuzzy*, com o objetivo de extrair informações sobre o processo a partir de variáveis mensuráveis em linha.

O presente trabalho buscou implementar sistema que identifica e avisa o ponto (ou região) onde ocorre a máxima produção de PGA, e conseqüentemente o momento de finalizar os cultivos.

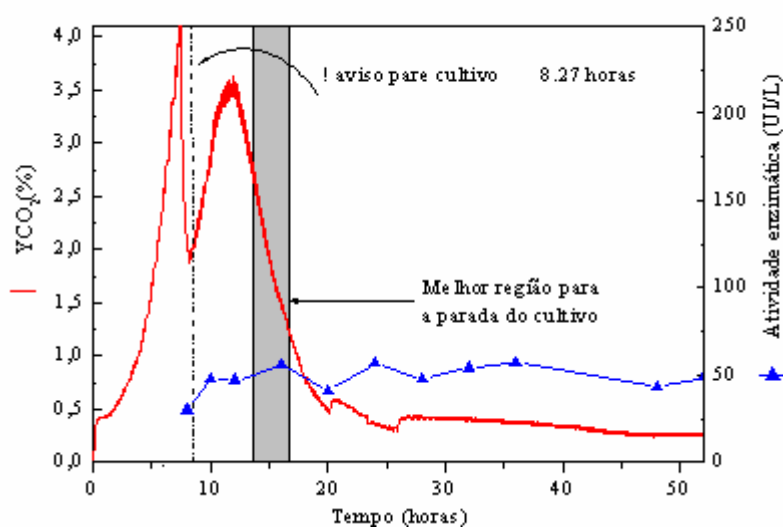
No processo de produção de PGA por *B. megaterium* verifica-se que há um ponto onde a fração molar de CO<sub>2</sub> atinge um máximo. Este momento encontra-se defasado em relação ao tempo em que a concentração de enzima atinge seu máximo valor (Figura 4.7). Este atraso pode variar de um experimento para outro.



**Figura 4.7** Fração molar do dióxido de carbono ( $Y_{CO_2}$ ) e produção de PGA por *Bacillus megaterium*.

### 4.3.1 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 1º Experimento

A Figura 4.8 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* no primeiro experimento.



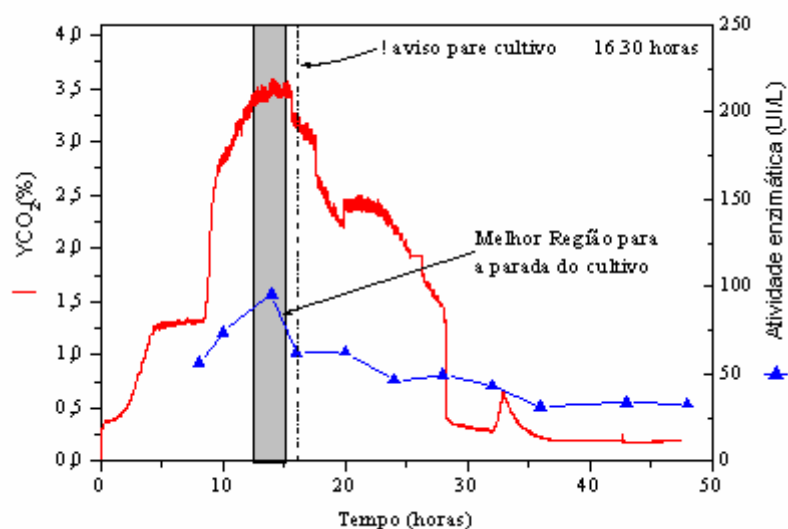
**Figura 4.8** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo (linha tracejada) e a melhor região de parada (região cinza em destaque) para o primeiro experimento.

O aparecimento de um “falso” pico de  $CO_2$  após 7 horas do cultivo fez com o algoritmo sinalizasse o ponto de parada do cultivo em 8,27 horas (linha tracejada no gráfico). A região cinza do gráfico, representa o intervalo ideal para finalizar o cultivo.

Análises realizadas em laboratório determinaram a concentração máxima de enzima em 16 horas (56 UI/L). O algoritmo *Fuzzy* foi enganado pelo falso “pico” de  $CO_2$  existente neste experimento.

### 4.3.2 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 2º Experimento

A Figura 4.9 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* no segundo experimento.

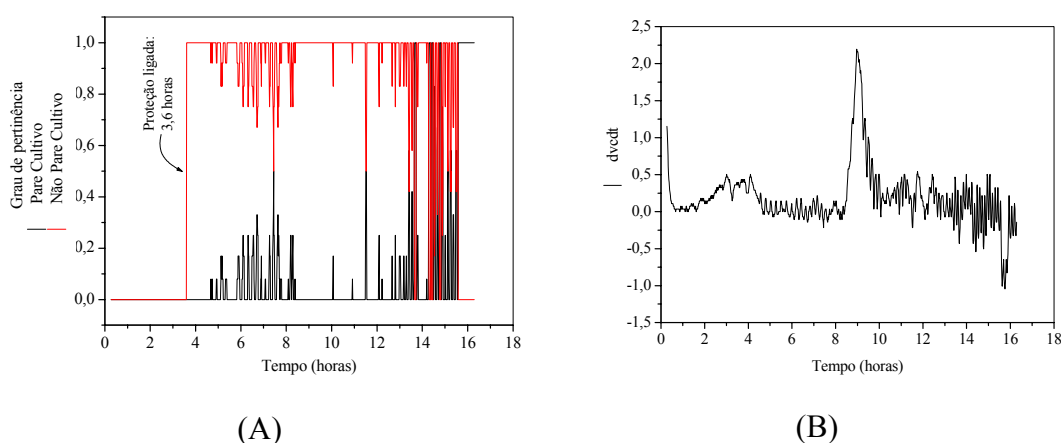


**Figura 4.9** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o segundo experimento.

O algoritmo *Fuzzy* sinalizou a parada do cultivo neste segundo experimento em 16,30 horas. Experimentalmente a máxima produção de enzima foi alcançada em 14 horas de cultivo (90 UI/L). A linha tracejada presente na Figura 4.9 indica o ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo. A região cinza refere-se a melhor região para a parada do cultivo.

Diferentemente do primeiro experimento, neste a fração molar de  $\text{CO}_2$  não apresentou a formação de dois picos de  $\text{CO}_2$ , que havia levado à incorreta sinalização do ponto de máxima parada pelo algoritmo no primeiro experimento.

O perfil do grau de pertinência “pare” e “não pare” para este experimento está mostrado na Figura 4.10-A. O algoritmo entra em estado de proteção em 3,6 horas, devido ao fato de  $C1 > 0,5$ , permanecendo em proteção até 13,6 horas, quando o grau de pertinência de “pare cultivo” atingiu 1,0. Neste ponto o algoritmo entrou no nível de ação várias vezes (14,41 horas e 14,76 horas) até chegar em 15,58 horas de cultivo. A partir deste ponto, o algoritmo passou a analisar a derivada da fração molar de  $CO_2$  (Figura 4.10-B); aguardou tempo de recuperação e em 16,30 horas sinalizou a que naquele ponto era a máxima produção de enzima.

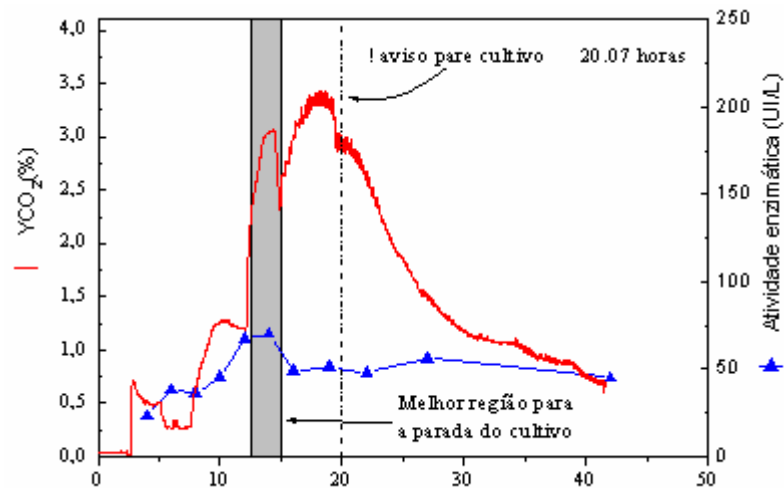


**Figura 4.10.** Segundo experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Variação da derivada da fração molar de  $CO_2$  (dvc/dt).

Neste experimento o algoritmo foi capaz de identificar satisfatoriamente o momento de parada do cultivo.

### 4.3.3 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 3º Experimento

A Figura 4.11 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o terceiro experimento.



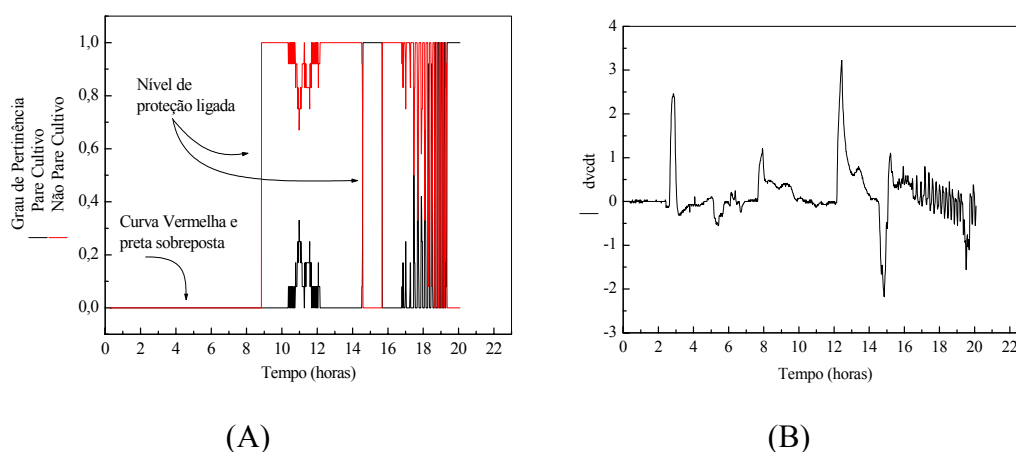
**Figura 4.11.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o terceiro experimento.

Para este experimento o algoritmo *Fuzzy* sinalizou a parada do cultivo em 20 horas (linha tracejada, Figura 4.11). Análises realizadas em laboratório mostraram que a produção máxima ocorreu em 14 horas de cultivo (70 UI/L). Deste modo percebe-se que houve um grande intervalo entre a sinalização do algoritmo e a real máxima produção de enzima.

Novamente ocorreu neste experimento a formação de dois picos de  $\text{CO}_2$ , similar ao primeiro experimento. Neste caso o tempo de recuperação foi suficiente para que o algoritmo voltasse ao nível de atenção, mas a sinalização para a parada do cultivo identificada pelo algoritmo, foi distante do ponto de máxima produção de enzima quantificada em laboratório. Neste caso, o surgimento do segundo

“pico” na fração molar de  $\text{CO}_2$  é justificado pela alimentação de solução de AFA após 10 horas do início do cultivo.

A Figura 4.12 apresenta o grau de pertinência de “pare” e “não pare” cultivo e o gráfico da derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvcdt) até a região onde o algoritmo *Fuzzy* identificou o momento de parada do cultivo para este terceiro experimento.



**Figura 4.12.** Terceiro experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvcdt).

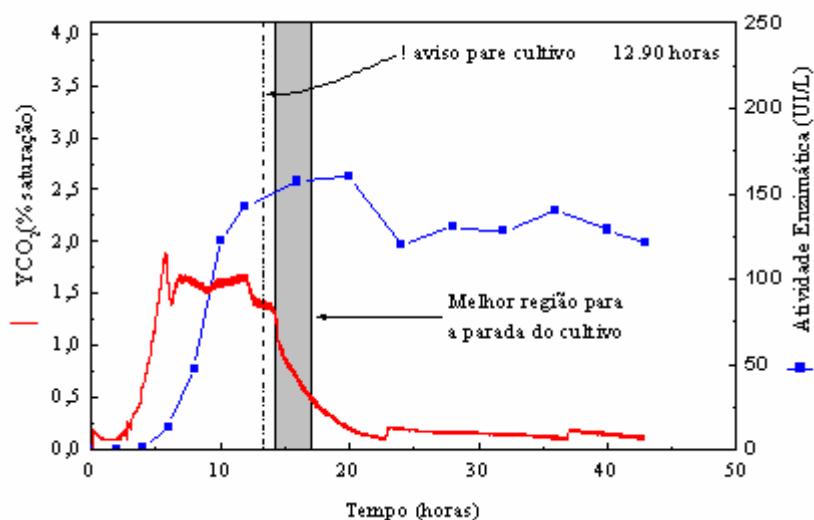
O algoritmo *Fuzzy* entrou em estado de “proteção ligada” (linha vermelha do gráfico) em 8,84 horas permanecendo neste nível até 14,5 horas, quando voltou ao nível de atenção (Figura 4.12-A). No momento em que a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  tornou-se menor que  $-0,20$ , o algoritmo esperou o tempo de recuperação de 1,20 horas para sinalizar a parada do cultivo. Como o nível de  $\text{CO}_2$  ainda estava aumentando (derivada positiva) então o algoritmo não identificou o ponto de máxima produção de enzima.

A sinalização da parada do cultivo ocorreu em 20,07 horas, seis horas depois de atingida a máxima atividade.



#### 4.3.4 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 4º Experimento

A Figura 4.13 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o quarto experimento.

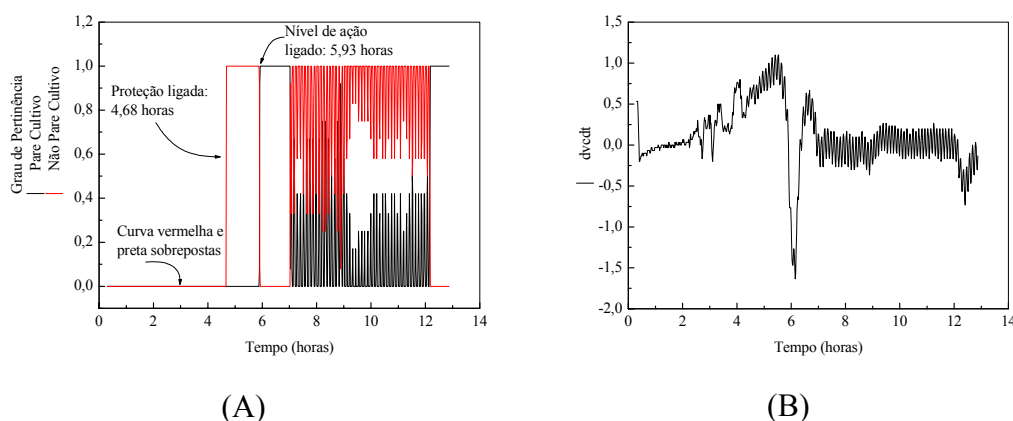


**Figura 4.13.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o quarto experimento.

A Figura 4.13 mostra que o algoritmo *Fuzzy* identificou o momento para a parada do cultivo em 12,9 horas de cultivo. Análises realizadas em laboratórios mostraram que a máxima produção de enzima deu-se em 16 horas de cultivo. Neste experimento também houve uma pequena antecipação do algoritmo.

Analisando a Figura 4.13 pôde-se perceber que a produção em 12 horas era na ordem de 143 UI/L, enquanto que em 16 horas era de 157 UI/L. Como o algoritmo *Fuzzy* identificou um ponto entre 12 e 16 horas, é possível dizer que se ocorresse a parada do cultivo nesse intervalo, não haveria grandes perdas de atividade.

A Figura 4.14 apresenta o perfil do grau de pertinência para este experimento e também a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$ .



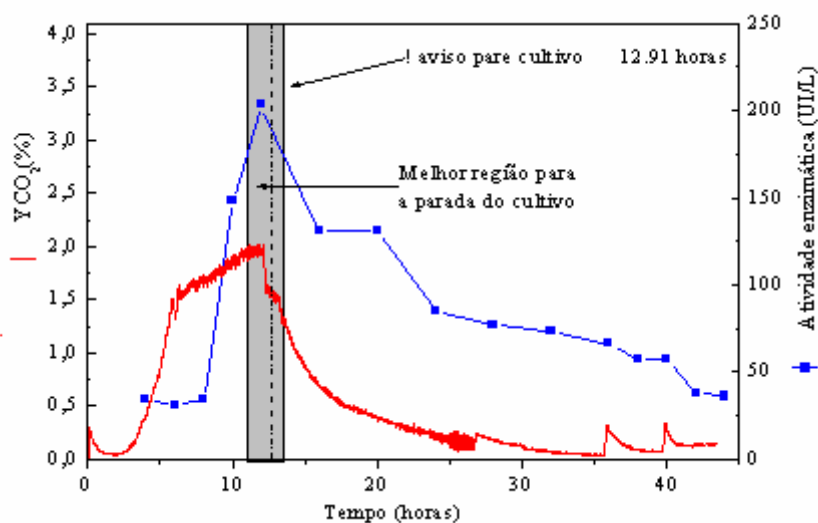
**Figura 4.14.** Quarto experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvc/dt).

A Figura 4.14-A apresenta como se desenvolveu o grau de pertinência do algoritmo *Fuzzy* para a identificação do ponto de máxima produção de enzima. A curva vermelha refere-se à não parada do cultivo, enquanto que a curva preta, seria para a finalização do cultivo. Quando o “Pare cultivo” atingiu um grau de pertinência igual a 1,0, o tempo de recuperação foi ativado (12,18 horas). Como o nível de liberação de  $\text{CO}_2$  começou a cair sensivelmente após 12 horas, então transcorrido o tempo de recuperação e a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  negativa (Figura 4.14-B), então o algoritmo sinalizou a parada do cultivo em 12,9 horas.

O algoritmo *Fuzzy* antecipou em três horas o momento de parada do cultivo (comparando-se com o tempo em que ocorreu a máxima concentração da enzima).

### 4.3.5 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 5º Experimento

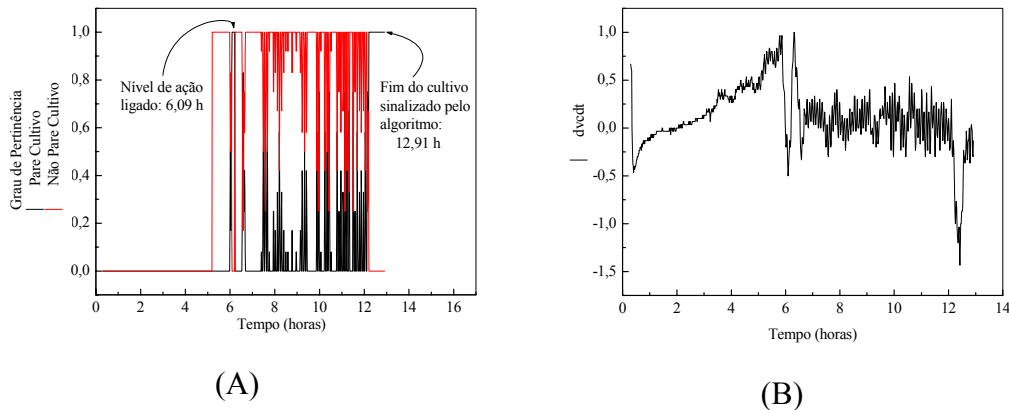
A Figura 4.15 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o quinto experimento.



**Figura 4.15** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada para o quinto experimento.

Neste experimento o algoritmo *Fuzzy* sinalizou a parada do cultivo em 12,91 horas. Análises de laboratório mostraram a concentração máxima de enzima ocorreu em 12 horas (203 UI/L). O algoritmo indicou com boa precisão o momento de parada do cultivo (tempo pertencente à região cinza na Figura 4.15).

A Figura 4.16 apresenta o perfil do grau de pertinência e a derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> deste quinto experimento.

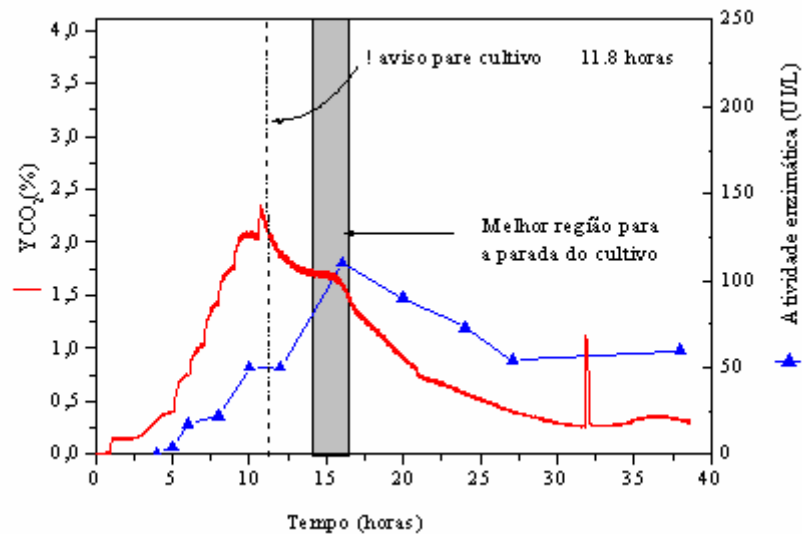


**Figura 4.16.** Quinto experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvc/dt).

Analisando a Figura 4.16-A foi possível notar que o grau de pertinência “pare cultivo” chegou ao valor de 1,0 em 6,1 horas. Como a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (Figura 4.16-B) era ainda positiva, então o algoritmo saiu do nível de ação e voltou para o nível de atenção. Permaneceu neste nível até 12,21 horas, quando novamente entrou no nível de ação aguardando apenas o tempo de recuperação para sinalizar a parada do cultivo. Como após ter passado o tempo de recuperação, a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  era negativa e menor que  $-0,20$ , então o algoritmo sinalizou a parada do cultivo em 12,91 horas.

#### 4.3.6 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 6º Experimento

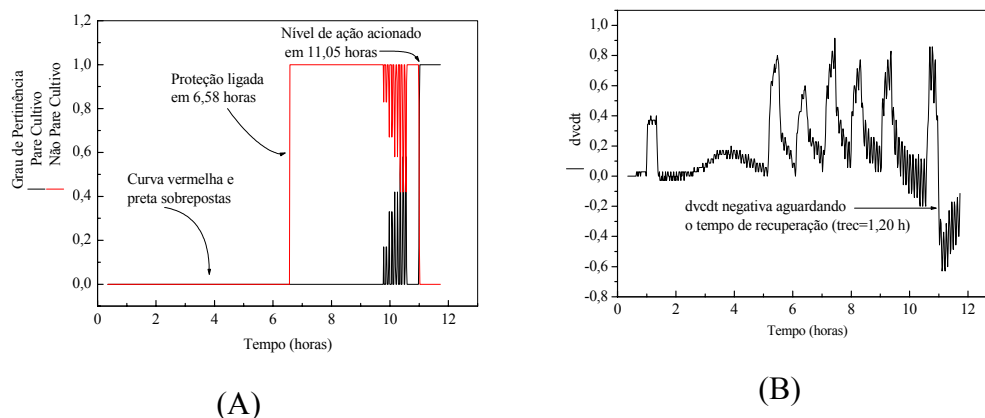
A Figura 4.17 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o sexto experimento



**Figura 4.17.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no sexto experimento.

Neste experimento o algoritmo sinalizou a parada do cultivo em 11,80 horas. As análises de laboratório quantificaram a máxima concentração de PGA (ca 110 UI/L) em 16 horas. Sendo assim, verificou-se uma antecipação da indicação “pare cultivo” pelo algoritmo. A concentração da enzima em 12 horas estava na ordem de 50 UI/L enquanto que em 16 horas esta foi de 110 UI/L. Uma justificativa para este comportamento pode estar relacionado à composição do meio de suplementação, a qual neste caso utilizou solução de soro de queijo ultrafiltrada.

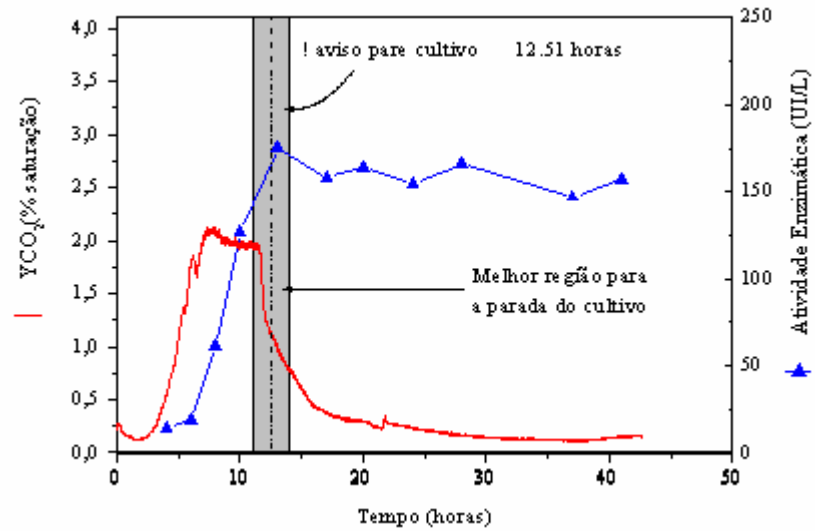
O algoritmo entrou em nível de proteção em 6,58 horas permanecendo neste até 11,05 horas, foi quando entrou em nível de ação (Figura 4.18-A). Deste modo, o algoritmo aguardou o tempo de recuperação, verificou se a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  era negativa (dvcdt) e maior que  $-0,20$  (Figura 4.18-B), sinalizando após todo este processo o momento ideal para a parada do cultivo.



**Figura 4.18.** Sexto experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> (dvcdt).

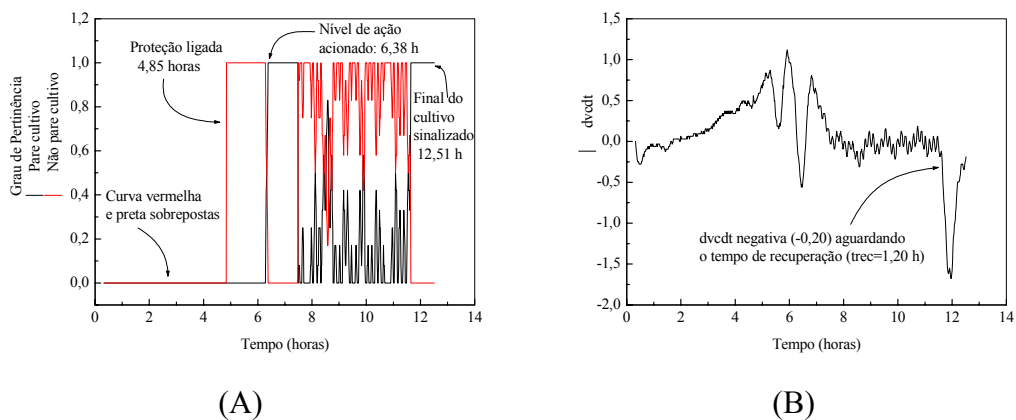
#### 4.3.7 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 7º Experimento

A Figura 4.19 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o sétimo experimento. Neste ensaio o algoritmo sinalizou o momento de parada do cultivo em 12,51 horas. A máxima produção da enzima ocorreu em 13 horas de cultivo (175 UI/L aproximadamente). Pela Figura 4.19 verifica-se que a sinalização do algoritmo *Fuzzy* (linha tracejada) está dentro da região onde melhor seria para a parada do cultivo (região cinza). O algoritmo indicou com boa precisão o momento de parada do cultivo.



**Figura 4.19.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no sétimo experimento.

Analisando a Figura 4.20-A é possível descrever que o algoritmo *Fuzzy* entrou em nível de proteção em 4,85 horas. O algoritmo permaneceu neste nível até 6,38 horas entrando em seguida no nível de ação. Novamente como acontecido anteriormente, transcorrido o tempo de recuperação e o nível de  $CO_2$  ainda apresentava derivada positiva, então o algoritmo voltou ao nível de proteção.

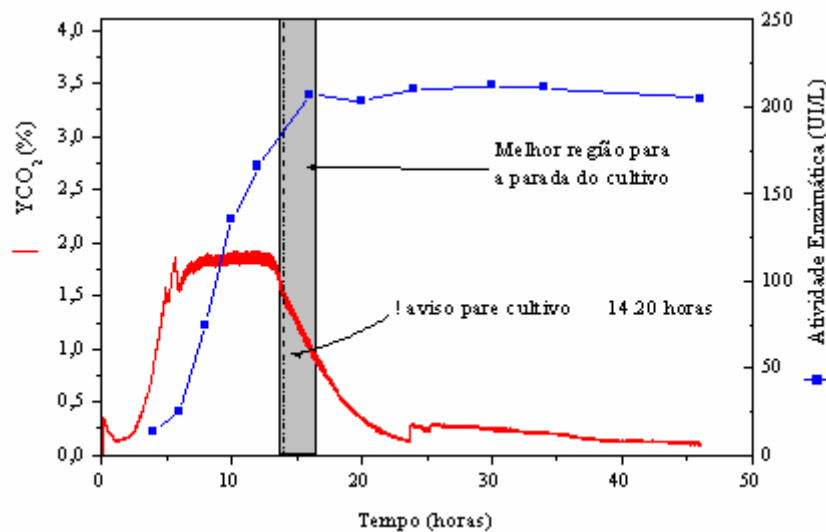


**Figura 4.20.** Sétimo experimento (A) Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; (B) Derivada da fração molar de  $CO_2$  (dvcdt).

O algoritmo ficou no nível de proteção até aproximadamente 11,5 horas, foi quando o grau de pertinência de “pare cultivo” (curva preta da Figura 4.20-A) chegou a 1,0. Estando no nível de ação, o algoritmo verificou se a  $dvcdt$  era negativa (menor que -0.20) e aguardou o tempo de recuperação. Como o nível de  $CO_2$  estava apresentando derivadas negativas, então o algoritmo identificou o ponto de parada do cultivo em 12,51 horas.

#### 4.3.8 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 8º Experimento

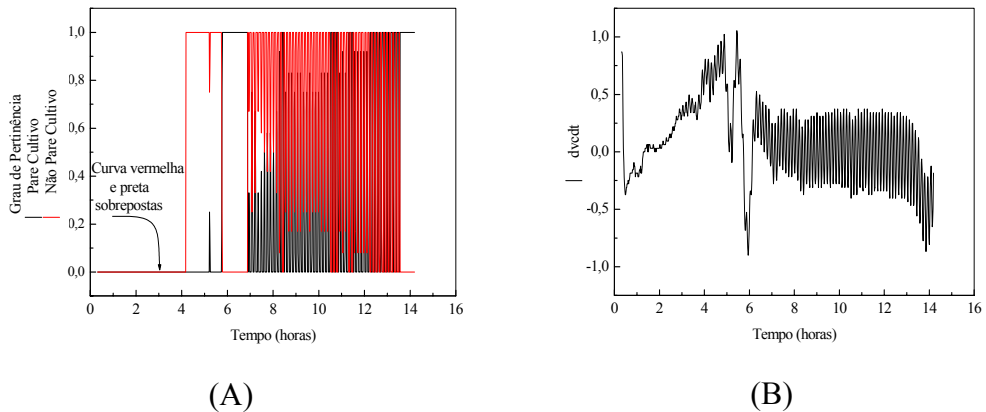
A Figura 4.21 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o oitavo experimento.



**Figura 4.21.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no oitavo experimento.

Neste experimento a máxima produção de enzima deu-se em 16 horas de cultivo (207 UI/L). O algoritmo *Fuzzy* identificou o ponto de máxima produção de enzima em 14,20 horas de cultivo, com certa antecipação.



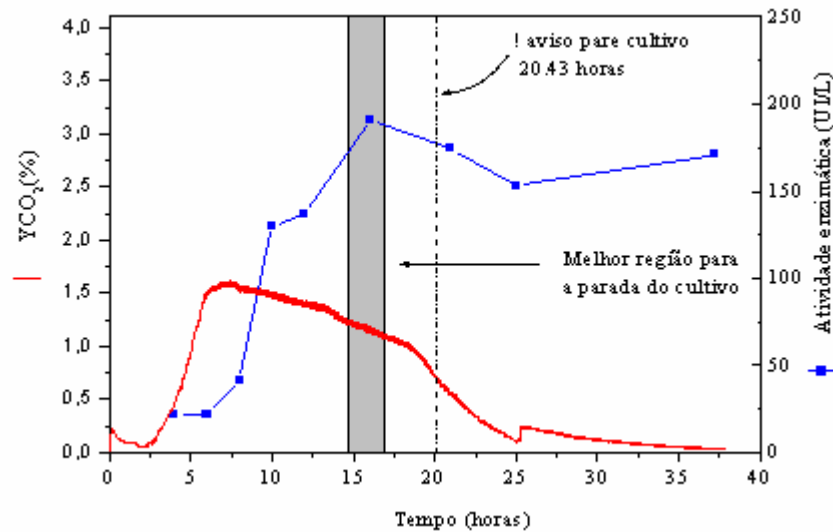


**Figura 4.22.** Oitavo experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvcdt).

O algoritmo *Fuzzy* entrou em nível de proteção (linha vermelha da Figura 4.22-A) em 4,19 horas até quando o grau de pertinência de “pare cultivo” (linha preta) atingiu grau de pertinência 1,0 (5,78 horas). O algoritmo entrou no nível de ação em vários momentos no desenvolvimento do experimento, mas em todos voltou ao nível de proteção pelo fato de dvcdt ser ainda positiva. Finalmente quando dvcdt era negativa (Figura 4.22-B) e passado o tempo de recuperação, o algoritmo sinalizou o momento para a parada do cultivo em 14,20 horas.

#### 4.3.9 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 9º Experimento

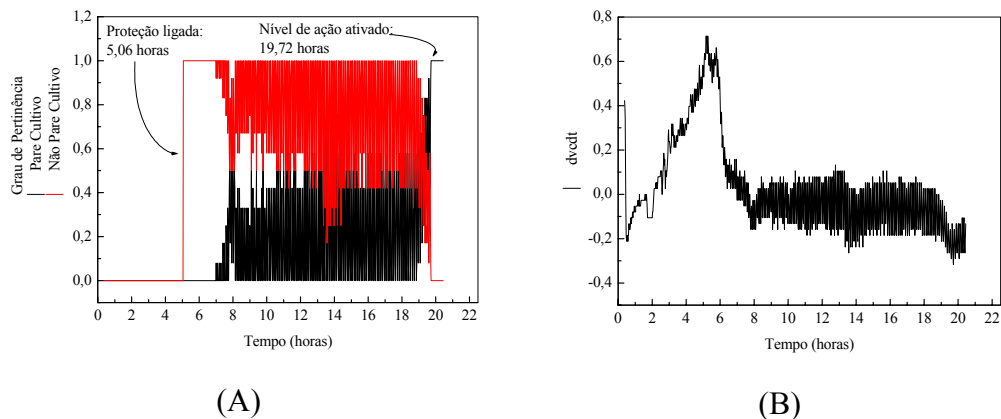
A Figura 4.23 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o nono experimento.



**Figura 4.23.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no nono experimento.

O perfil da fração molar de  $\text{CO}_2$  para este nono experimento apresentou-se diferente dos outros experimentos, não apresentando um nítido pico de  $\text{CO}_2$ . Isto se deve pelo fato deste experimento ser uma batelada alimentada. Sendo assim o algoritmo *Fuzzy* identificou o ponto onde ocorreria a máxima produção de enzima em 20,43 horas de cultivo enquanto as análises de laboratório mostraram a máxima produção de PGA em 16 horas (191 UI/L). Analisando o gráfico da Figura 4.23 é possível notar que em 21 horas de cultivo a produção de enzima foi de 175 UI/L. Sendo assim, a diferença entre a produção identificada pelo algoritmo e a real produção quantificada em laboratório foi de 16 UI/L, ou seja, este atraso do algoritmo não traria grandes problemas para a obtenção da máxima produção de enzima.

A Figura 4.24 apresenta o perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” cultivo e da derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  para o nono experimento.



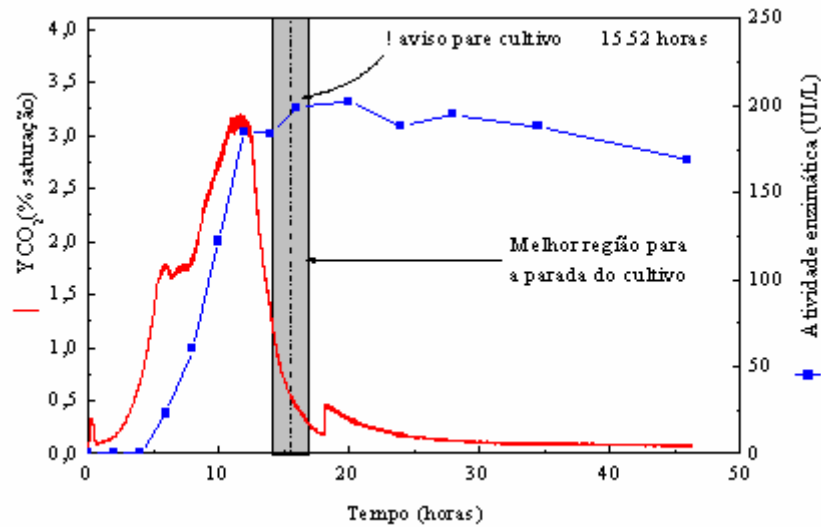
**Figura 4.24.** Nono experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare ” e “Não Pare” Cultivo; **(B)** Derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> (dvc/dt).

Analisando o desenvolvimento do algoritmo *Fuzzy* durante todo o cultivo, nota-se que este entrou em nível de proteção em 5,06 horas pelo fato de  $C1 > 0,5$ . O grau de pertinência de “pare cultivo” somente atingiu o valor 1,0 em 19,72 horas (Figura 4.24-A), onde o algoritmo verificou se a derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> era negativa e aguardou o tempo de recuperação, sinalizando que o ponto de máxima produção de enzima seria em 20,43 horas.

A derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> apresentou muitos ruídos após 6 horas de cultivo (Figura 4.24-B), isto se deve pelo fato que a fração molar de CO<sub>2</sub> não ter apresentado um nítido pico de CO<sub>2</sub> como presente nos casos anteriores.

#### 4.3.10 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 10º Experimento

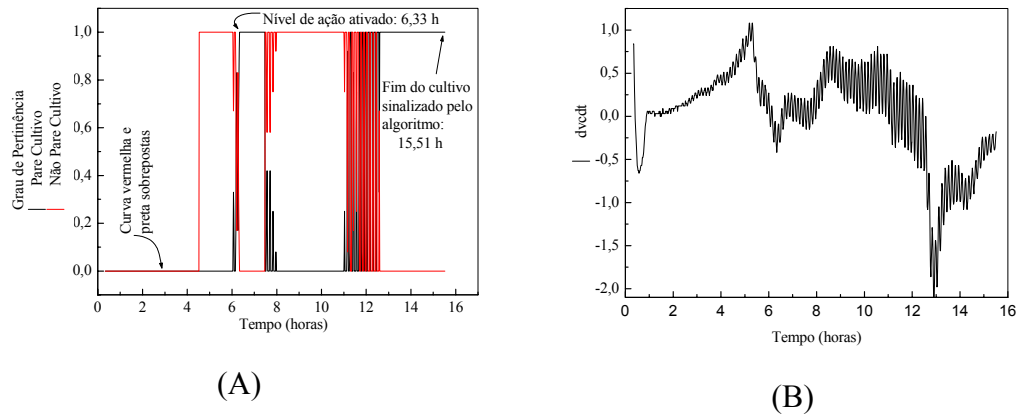
A Figura 4.25 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o décimo experimento.



**Figura 4.25.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no décimo experimento.

Como verificado nos experimentos 5, 7 e 8, o ponto de máxima produção de enzima identificado pelo algoritmo neste experimento (linha tracejada da Figura 4.25) pertence à região (região destacada em cinza) ótima para a finalização do cultivo. O algoritmo identificou o ponto de máxima concentração da enzima em 15,52 horas. Análises de laboratório mostraram que a máxima produção de enzima deu-se em 16 horas (199 UI/L). Deste modo, novamente o algoritmo apresentou-se eficiente na identificação do ponto para a parada do cultivo.

A Figura 4.26-A apresenta como se comportou o grau de pertinência de “pare” e “não pare” durante todo o décimo experimento.

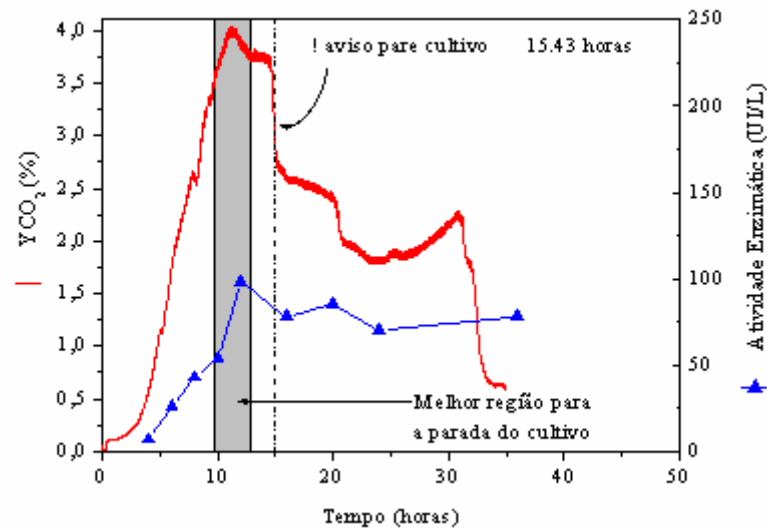


**Figura 4.26.** Décimo experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; **(B)** Derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> (dvc/dt).

O algoritmo *Fuzzy* entrou em estado de proteção em 4,53 horas permanecendo neste nível até 6,33 horas onde o algoritmo entrou em nível de ação (Figura 4.26-A). Quando o cultivo chegou em 7,48 horas o algoritmo voltou ao nível de proteção. Até o final do cultivo este entrou novamente em nível de ação várias vezes devido à derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> ter ultrapassado várias vezes o valor de -0,20 (Figura 4.26-B). Quando chegou em 12,6 horas de cultivo, o algoritmo entrou por final no nível de ação, permanecendo neste até o final do cultivo em 15,51 horas, quando sinalizou a parada do cultivo.

#### 4.3.11 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 11<sup>o</sup> Experimento

A Figura 4.27 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o décimo primeiro experimento.



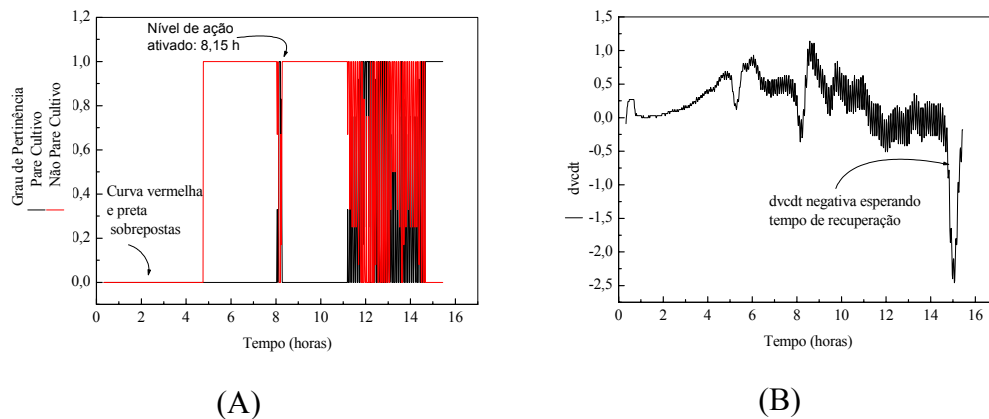
**Figura 4.27.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no décimo primeiro experimento.

Pela Figura 4.27 percebe-se que o perfil da fração molar de CO<sub>2</sub> para este décimo primeiro experimento diferenciou-se dos demais, chegando a um valor de CO<sub>2</sub> alto. Apesar do alto nível de CO<sub>2</sub>, para este experimento a atividade enzimática foi baixa se comparado com os demais experimentos. A máxima produção de enzima neste décimo primeiro experimento foi de 98UI/L em 12 horas de cultivo, enquanto que o algoritmo sinalizou que a máxima produção seria em 15,43 horas, ou seja, houve um atraso do algoritmo referente a real máxima produção de PGA quantificada pelas análises em laboratório através das amostras retiradas do biorreator periodicamente.

O algoritmo *Fuzzy* entrou em nível de ação para este décimo experimento em 4,77 horas permanecendo neste até 8,15 quando o nível de ação (que seria para sinalizar a parada do cultivo) foi ativado, mas voltou logo em seguida (8,28 horas) ao nível de proteção. A partir de 11,78 horas de cultivo, o grau de pertinência “para cultivo” atingiu várias vezes o valor 1,0 (Figura 4.28-A). Quando o

algoritmo chegou em 14,66 horas de cultivo (nível de ação ativado), o algoritmo novamente analisou se a fração molar de  $\text{CO}_2$  tinha começado a cair (dvcdt negativa) (Figura 4.28-B).

Como a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  era realmente negativa e maior que  $-0,20$ , esperou o tempo de recuperação ( $t_{rec}=1,20$  h) e por final sinalizou o ponto de máxima produção de enzima (o ponto onde se deveria finalizar o cultivo) em 15,43 horas.



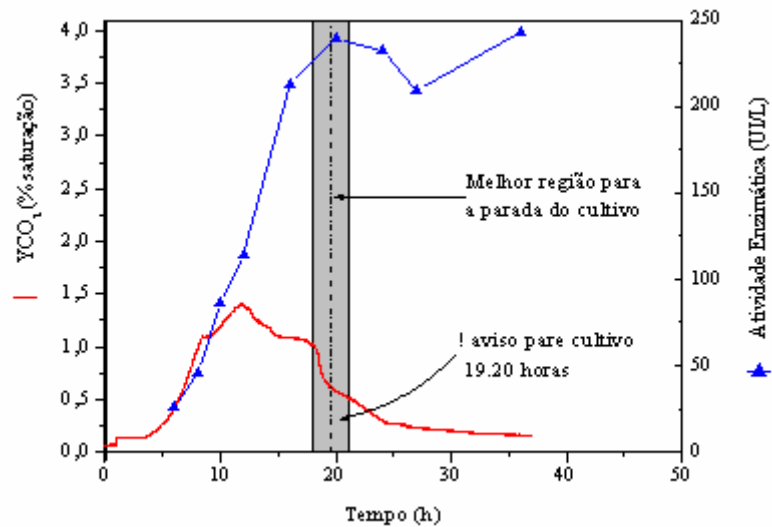
**Figura 4.28.** Décimo primeiro experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; **(B)** Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvcdt).

Neste experimento, o algoritmo *Fuzzy* sinalizou a máxima produção de enzima novamente com um atraso, similar aos experimentos 2, 3 e 9.

#### 4.3.12 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 12º Experimento

A Figura 4.29 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *fuzzy* para o décimo segundo experimento.

Para este experimento o algoritmo funcionou com uma boa precisão o ponto de máxima produção de enzima.



**Figura 4.29.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no décimo segundo experimento.

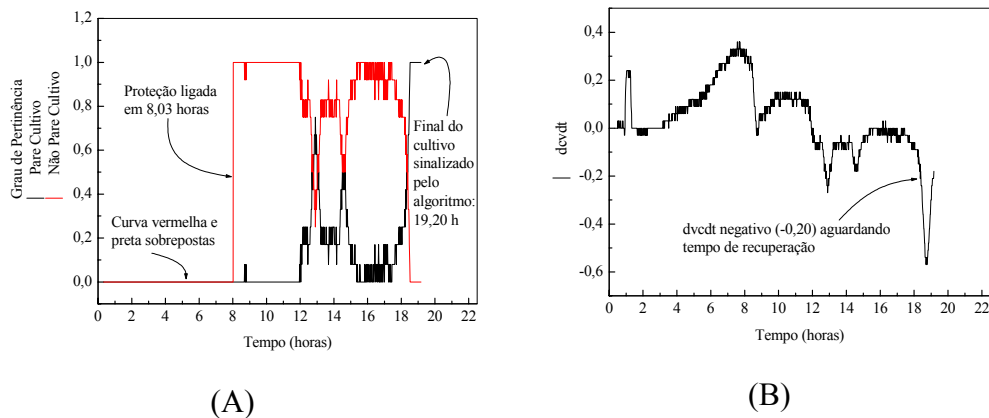
O algoritmo sinalizou o ponto de máxima produção em 19,2 horas de cultivo (linha tracejada). A partir das amostras retiradas do biorreator com um intervalo de 2 e 4 horas, foi possível verificar que a máxima produção de PGA deu-se em 20 horas (239 UI/L), ou seja, um tempo muito próximo daquele identificado pelo algoritmo.

A Figura 4.30-A apresenta o grau de pertinência de “pare” e “não pare” cultivo deste décimo segundo experimento enquanto que a Figura 4.29-B apresenta a derivada da fração molar de CO<sub>2</sub>.

Durante todo o experimento o algoritmo *Fuzzy* entrou em diferentes níveis de atuação. O algoritmo entrou no nível de proteção em 8,03 horas permanecendo neste nível até 18,51 horas, quando o grau de pertinência de “pare cultivo” atingiu valor 1,0.(Figura 4.30-A)



Neste tempo a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  era negativa e menor a  $-0,20$ .(Figura 4.30-B) Assim, o algoritmo aguardou o tempo de recuperação e sinalizou o ponto de máxima produção de enzima em 19,20 horas.

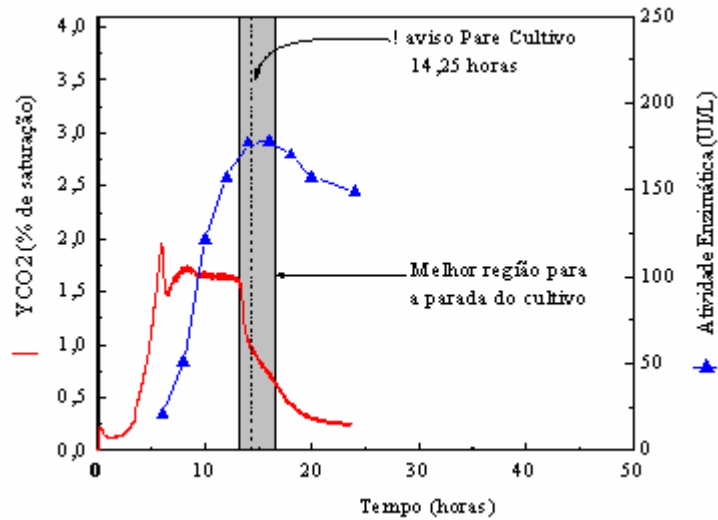


**Figura 4.30.** Décimo segundo experimento (A) Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; (B) Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  (dvcdt).

Neste experimento o algoritmo *Fuzzy* comportou-se eficientemente identificando com boa precisão a máxima produção de enzima.

#### 4.3.13 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 13º Experimento

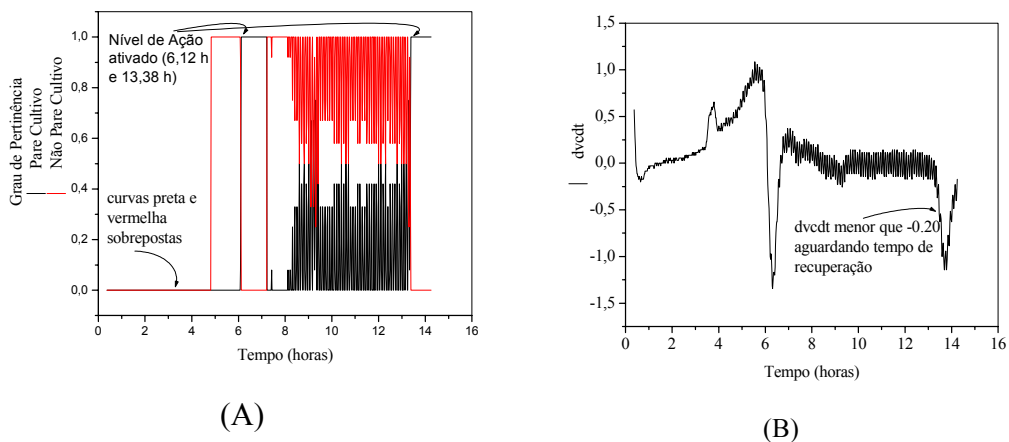
A Figura 4.31 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para o décimo terceiro experimento. Neste ensaio o algoritmo sinalizou o momento de parada do cultivo muito próximo da máxima produção de enzima quantificada em laboratório. Pela Figura 4.31 verifica-se que a sinalização do algoritmo *Fuzzy* (linha tracejada) está dentro da região onde melhor seria para a parada do cultivo (região cinza).



**Figura 4.31.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no décimo terceiro experimento.

A máxima concentração de enzima quantificada em laboratório a partir das amostras retiradas com intervalo de 2 horas identificou uma máxima produção de PGA em 14 horas. O algoritmo *Fuzzy* identificou um momento onde se deveria parar o cultivo em 14,25 horas. Deste modo percebe-se que para este décimo terceiro experimento o algoritmo apresentou eficiente e consistente na identificação do momento da parada do cultivo.

A Figura 4.32 apresenta o perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” cultivo e da derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  para o décimo terceiro experimento. O algoritmo *Fuzzy* neste décimo terceiro experimento entrou em estado de proteção em 4,83 horas permanecendo neste nível até 6,12 horas. Logo em seguida o algoritmo entrou no nível de ação aguardando o tempo de recuperação ( $t_{rec} = 1,20$  horas). Como a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $dv_{cdt}$ ) ainda era positiva, o algoritmo voltou ao nível de proteção em 7,23 horas.



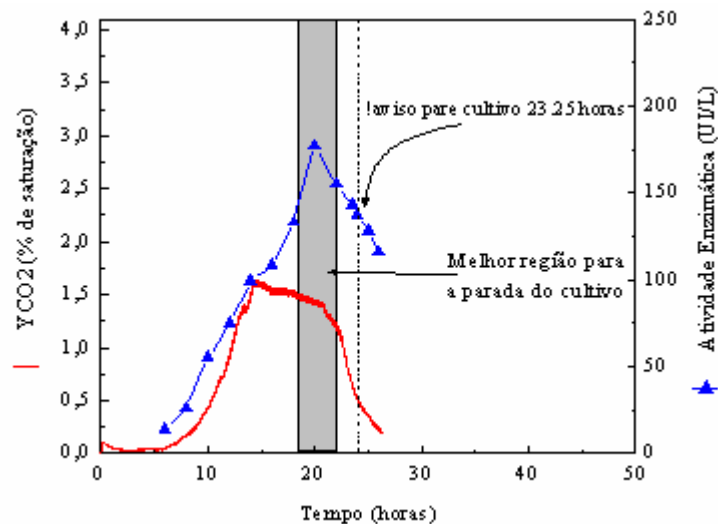
**Figura 4.32.** Décimo terceiro experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” Cultivo; **(B)** Derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> (dvc/dt).

Quando o grau de pertinência “pare cultivo” atingiu valor igual a 1,0, o nível de ação foi ativado (13,38 horas). Deste modo, aguardou o tempo de recuperação e verificou novamente se dvc/dt era negativa, sinalizando assim o “pare cultivo” em 14,25 horas.

#### 4.3.14 Resultado da Aplicação da Lógica *Fuzzy*: 14<sup>o</sup> Experimento

Realizou-se experimento em condições padrões para avaliar o algoritmo *Fuzzy* em tempo real, inserindo-o como biblioteca dinâmica na plataforma computacional desenvolvida em Visual Basic (Gomes, 2001). Este sistema permitia a troca de dados entre o computador onde o algoritmo estava implementado e o Sistema Supervisório, onde este último enviava as informações das variáveis de processo a cada 2 segundos (tempo, fração molar de CO<sub>2</sub> e velocidade de agitação). A Figura 4.33 apresenta o resultado da utilização do algoritmo *Fuzzy* para este experimento. Neste ensaio o algoritmo *Fuzzy* sinalizou

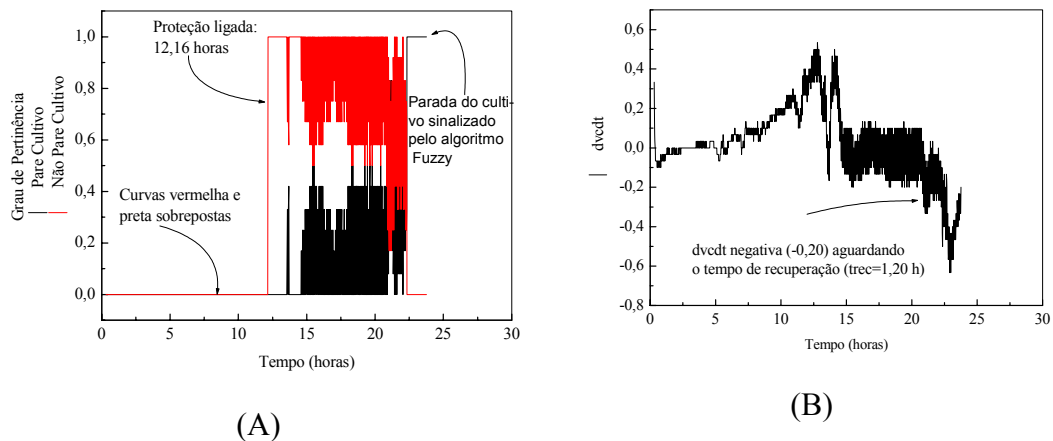
o momento de parada do cultivo 23.25 horas, enquanto que a máxima produção de enzima quantificada em laboratório a partir das amostras retiradas do biorreator deu-se em 20 horas, com uma produção de 177 UI/L.



**Figura 4.33.** Identificação do ponto de parada do cultivo sinalizado pelo algoritmo e a melhor região de parada no décimo quarto experimento.

No momento em que o algoritmo *Fuzzy* identificou o ponto ideal de máxima produção de enzima, foi retirada uma amostra do biorreator (a partir deste ponto amostras foram retiradas em intervalos de trinta minutos até o final do cultivo). Constatou-se que a produção de enzima presente nessa amostra era de 143 UI/L. Deste modo, entre o ponto de máxima concentração de enzima (177 UI/L em 20 horas) e o tempo indicado para finalização do cultivo pelo algoritmo *Fuzzy* (143 UI/L em 23,25 horas) houve uma diferença na atividade enzimática de aproximadamente 34 UI/L. Devido às condições do cultivo — que apresentou um atraso em relação aos demais realizados em batelada — pode-se concluir que o algoritmo teve um desempenho satisfatório.

A Figura 4.34 apresenta o perfil do grau de pertinência de “Pare” e “Não Pare” cultivo e da derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  para este experimento. O algoritmo *Fuzzy* entrou em estado de proteção em 12,16 horas permanecendo neste nível até 22,33 horas, quando o algoritmo entrou no nível de ação. Como a derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $dvc/dt$ ) era negativa, o algoritmo sinalizou a parada do cultivo em 23,25 horas.



**Figura 4.34.** Décimo quarto experimento **(A)** Perfil do grau de pertinência de “Pare Cultivo” e “Não Pare Cultivo”; **(B)** Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $dvc/dt$ ).

Este último experimento foi importante para a avaliar o algoritmo *Fuzzy* em tempo real no sistema de aquisição de dados, o qual apresentou-se robusto e eficiente. O algoritmo identificou o momento onde ocorreria a máxima concentração de enzima, mesmo que esta identificação tenha ocorrido com um atraso de cerca de 3 horas.

As telas do programa *Visual Basic* onde a rotina *Fuzzy* foi implementada estão ilustradas no Apêndice A3. Neste anexo está presente a simulação da concentração celular e também o momento em que o algoritmo *Fuzzy* identificou o momento onde deveria “parar o cultivo”.

#### 4.4 Desenvolvimento de Regras *Fuzzy*: Pacote *Fuzzy* do Programa MatLab

Utilizou-se o pacote *Fuzzy* do programa MatLab para realizar um estudo preliminar empregando lógica *Fuzzy*. Através desta ferramenta é possível propor e visualizar as funções de pertinência propostas para entrada e saída do atuador/controlador *Fuzzy*. As regras *Fuzzy* propostas encontram-se na Tabela 4.1.

A partir da análise das variáveis de todos experimentos realizados (banco de dados disponível) foi possível identificar como mais importantes as seguintes variáveis: tempo de cultivo, a fração molar de CO<sub>2</sub> (YCO<sub>2</sub>) e sua derivada em relação ao tempo.

Para a variável tempo, foi proposta uma divisão nas seguintes variáveis lingüísticas: tempo cedo (TC), tempo ótimo (TO) e tempo tarde (TT); a fração molar de CO<sub>2</sub> foi dividida em: YCO<sub>2</sub> baixo (CB), YCO<sub>2</sub> médio (CM) e YCO<sub>2</sub> alto (CA); a derivada em relação ao tempo (DYCO<sub>2</sub>) foi dividida em apenas duas variáveis: DYCO<sub>2</sub> negativa (DCN) e DYCO<sub>2</sub> zero ou positiva (DCZP). Por fim, o grau de certeza para a parada do cultivo foi dividido em: não pare cultivo (NP), atenção (AT) e pare cultivo (P).

**Tabela 4.1.** Regras *Fuzzy* implementadas no pacote *Fuzzy* do programa MATLAB.

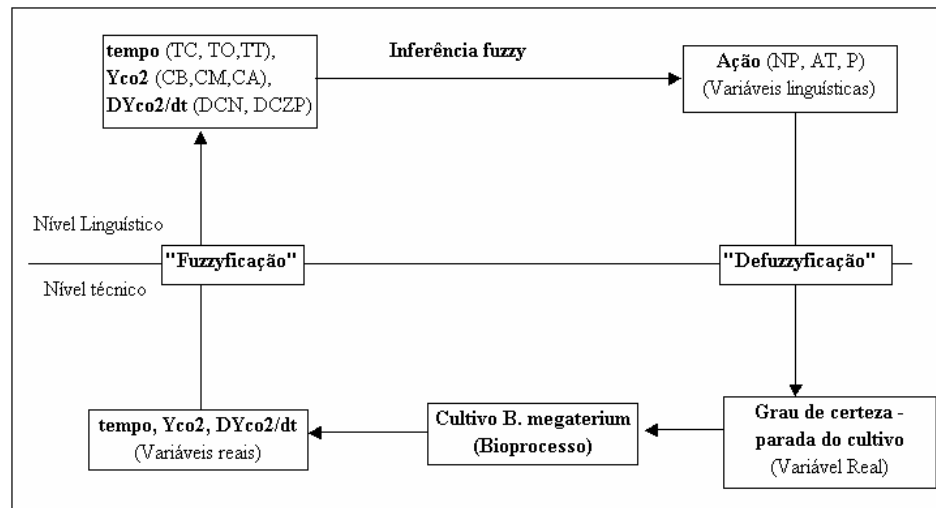
Regras	TEMPO	YCO <sub>2</sub>	DYCO <sub>2</sub>	AÇÃO
	SE			ENTÃO
1.	TC	CB	DCN	NP
2.	TC	CM	DCZP	NP
3.	TC	CA	DCZP	NP
4.	TC	CA	DCN	AT
5.	TO	CA	DCZP	NP
6.	TO	CM	DCZP	AT
7.	<b>TO</b>	<b>CM</b>	<b>DCN</b>	<b>P</b>
8.	TO	CA	DCZP	AT
9.	<b>TO</b>	<b>CA</b>	<b>DCN</b>	<b>P</b>
10.	TT	CB	DCZP	NP
11.	TT	CA	DCZP	NP
12.	TT	CM	DCZP	NP
13.	TO	CB	DCN	AT

TC=Cedo; TO=Ótimo; TT=Tarde; CB=Baixo; CM=Médio; CA=Alto; DCN=Negativa; DCZP=Zero\_Positiva; NP=Não\_Pare; AT=Atenção e P=Pare\_Cultivo.

A análise de todos os experimentos realizados permitiu propor intervalo de tempo ótimo para produção de enzima entre 11,5 horas até 25 horas, pois todos os pontos de máxima concentração de enzima obtidos se encontraram dentro deste intervalo. O valor da fração molar de CO<sub>2</sub> dos tempos em que a concentração de enzima atingiu seu máximo valor variou amplamente nos experimentos analisados. Assim, adotou-se como valor ótimo para fração molar de CO<sub>2</sub> a média aritmética de todos os valores correspondentes à máxima atividade enzimática dos

experimentos. Como último critério para a parada do cultivo foi quando o valor de  $DYCO_2$  fosse menor que 0,2.

A figura 3.35 apresenta a seqüência da *fuzzyficação* e *defuzzyficação* do algoritmo desenvolvido no programa MatLab.

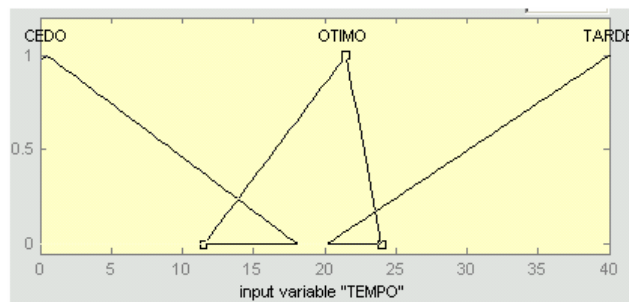


**Figura 4.35.** *Fuzzyficação* e *Defuzzyficação* do algoritmo *Fuzzy* (MatLab, Mathworks, v. 5.2).

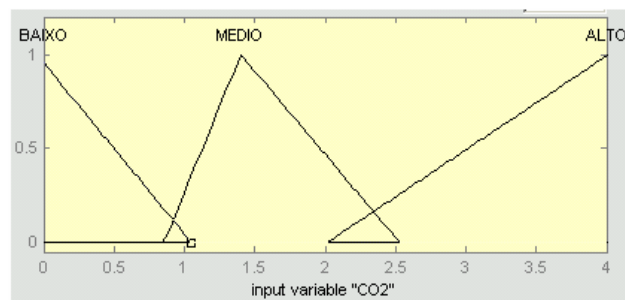
Nos cultivos utilizando o microrganismo *B. megaterium* destacam-se as seguintes variáveis reais: tempo, fração molar de  $CO_2$  ( $Y_{CO_2}$ ) e a derivada da fração molar de  $CO_2$  ( $DY_{CO_2}$ ) em relação ao tempo. Através da *fuzzyficação* destas variáveis reais (nível técnico  $\rightarrow$  nível lingüístico), obtém-se as variáveis lingüísticas descritas como na Tabela 4.1. Após essa etapa, ocorre a inferência *Fuzzy* e finalmente a *defuzzyficação* (item 2.8.2) das variáveis lingüísticas, chegando ao final com a variável real “Grau de certeza – parada do cultivo”, onde está mostra através de porcentagem o momento ideal para a parada do cultivo.



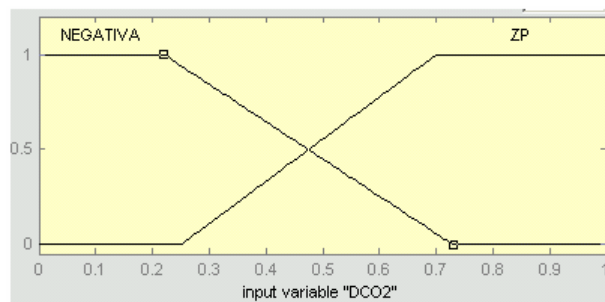
As Figuras 4.36e 4.37 apresentam as funções de pertinência (entrada e saída, respectivamente) do segundo algoritmo *Fuzzy*.



(A)

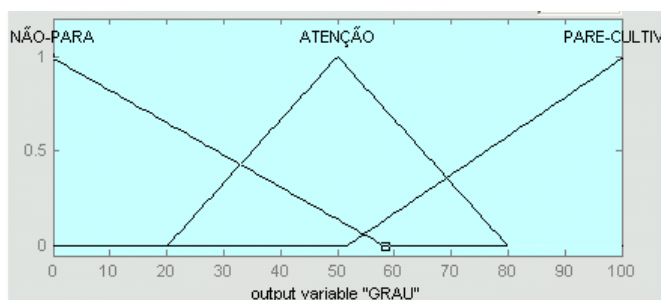


(B)



(C)

**Figura 4.36.** Variáveis de entrada do algoritmo *Fuzzy*. (A) Variável tempo dividida em tempo cedo, tempo ótimo e tempo tarde; (B) Fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $Y_{\text{CO}_2}$ ) dividida em  $Y_{\text{CO}_2}$  baixo,  $Y_{\text{CO}_2}$  médio e  $Y_{\text{CO}_2}$  alto; (C) Derivada da fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $DY_{\text{CO}_2}$ ) dividida em  $DY_{\text{CO}_2}$  negativa ou  $DY_{\text{CO}_2}$  zero ou positiva (ZP).



**Figura 4.37.** Variável de saída do algoritmo *Fuzzy* (Grau de certeza da parada do cultivo dividida em não para, atenção e pare cultivo).

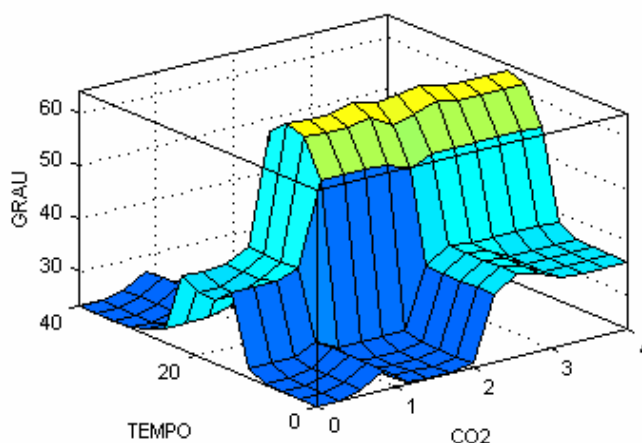
As Tabelas 4.2 e 4.3 representam respectivamente os parâmetros, tipos de funções e os intervalos utilizados nas variáveis de entrada e de saída do algoritmo *Fuzzy* desenvolvido no programa MatLab.

<b>Tabela 4.2</b> Parâmetros, tipo de função e intervalo das variáveis de entrada do algoritmo <i>Fuzzy</i> (MatLab, Mathworks v. 5.2).						
<b>Variáveis de entrada</b>	<b>Parâmetros</b>				<b>Tipo de função</b>	<b>Intervalo</b>
<b>Tempo cedo</b>	-20,0	0,0	18,0		Triangular	[0,40]
<b>Tempo ótimo</b>	11,5	21,0	24,0		Triangular	[0,40]
<b>Tempo tarde</b>	20,0	40,0	60,0		Triangular	[0,40]
<b>Yco<sub>2</sub> baixo</b>	-1,0	0,0	1,0		Triangular	[0,4]
<b>Yco<sub>2</sub> médio</b>	0,8	1,4	2,5		Triangular	[0,4]
<b>Yco<sub>2</sub> alto</b>	2,0	4,0	6,0		Triangular	[0,4]
<b>Dyco<sub>2</sub> negativa</b>	-0,6	-0,1	0,2	0,7	Trapezoidal	[0,1]
<b>DYco<sub>2</sub> zero ou positiva</b>	0,25	0,7	1,1	1,9	Trapezoidal	[0,1]

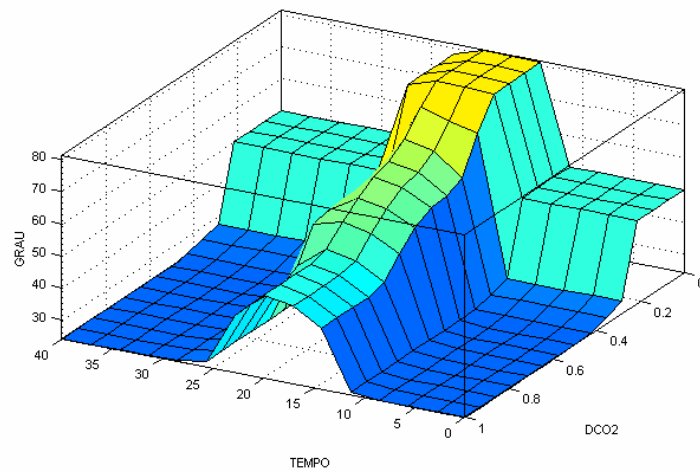
**Tabela 4.3** Parâmetros, tipo de função e intervalo das variáveis de saída do algoritmo *Fuzzy* (MatLab).

Variáveis de saída	Parâmetros			Tipo de função	Intervalo
<b>Ação – Não pare cultivo</b>	-49,0	-0,5	58,0	Triangular	[0,100]
<b>Ação – Atenção</b>	20,0	50,0	80,0	Triangular	[0,100]
<b>Ação – Pare cultivo</b>	51,0	100,0	150,0	Triangular	[0,100]

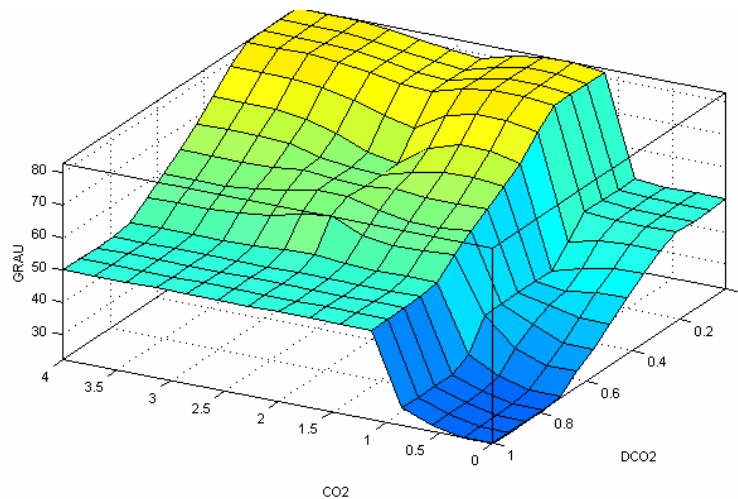
As Figuras 4.38 4.39 e 4.40 apresentam as superfícies tridimensionais geradas a partir das regras inseridas no algoritmo *Fuzzy*.



**Figura 4.38.** Ilustração tridimensional do grau de certeza de parada do cultivo tendo como variáveis: tempo,  $Y_{CO_2}$  e grau de certeza na parada.



**Figura 4.39.** Ilustração tridimensional do grau de certeza de parada do cultivo tendo como variáveis: tempo, derivada da fração molar de  $DYCO_2$  e grau de certeza de parada.



**Figura 4.40.** Ilustração tridimensional do grau de certeza de parada do cultivo tendo como variáveis:  $YCO_2$ , derivada da fração molar de  $DYCO_2$  e grau de certeza na parada.

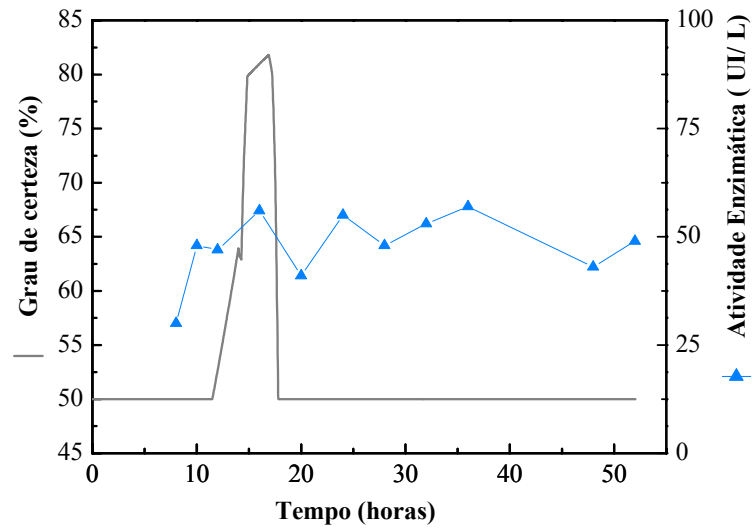
A Figura 4.38 apresenta um maior grau de certeza para a parada do cultivo entre 12 e 24 horas, isto porque analisando todos os experimentos realizados foi

possível perceber que a máxima produção de PGA ocorre neste intervalo. Este intervalo foi denominado de “tempo ótimo” nas regras *Fuzzy* descritas na Tabela 4.1. Percebe-se também que em “tempo tarde”, depois de 25 horas, o grau de certeza é muito pequeno, pois nas regras *Fuzzy* foi descartado que depois de 25 horas haveria um ponto de máxima produção de enzima.

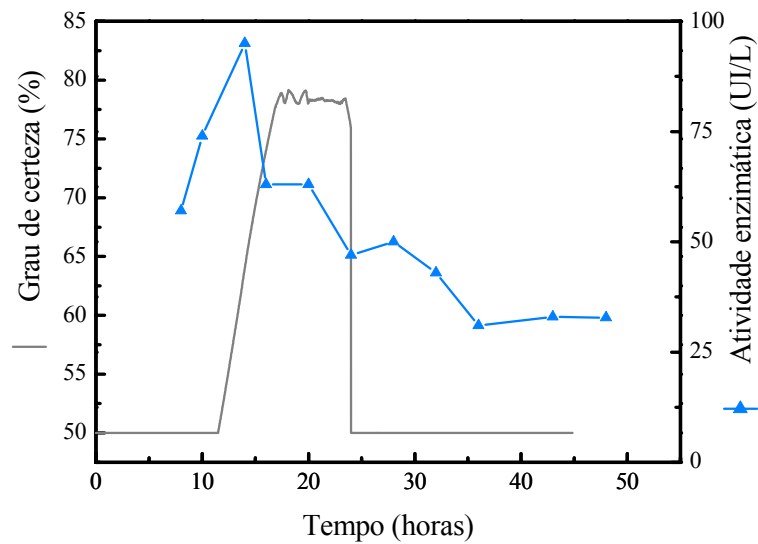
A Figura 4.39 apresenta que o maior grau de certeza foi dado quando a derivada da fração molar de CO<sub>2</sub> é menor que 0.20 (o que é correto devido ao último critério de parada do cultivo como descrito anteriormente) e também, o tempo está no intervalo de “tempo ótimo” (12 a 24 horas). Estas regras *Fuzzy* mostraram-se eficientes, gerando bons resultados na determinação do grau de certeza da variável pare cultivo cujos resultados são apresentados no item 4.4.1.

#### **4.4.1 Resultados Utilizando as Regras Implementadas no Pacote *Fuzzy* do Programa MATLAB**

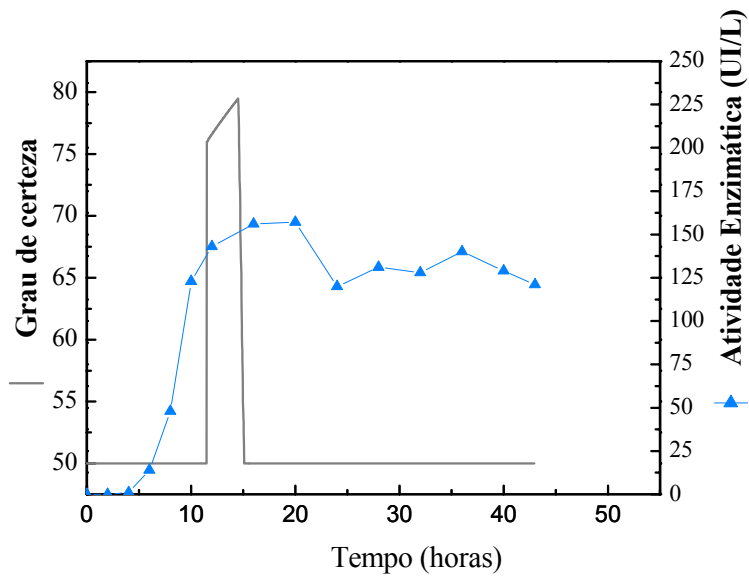
As Figuras 4.41 a 4.49 apresentam a comparação do grau de certeza fornecido pelo algoritmo *Fuzzy* desenvolvido no programa MatLab (linha contínua) e a atividade enzimática (linha com pontos experimentais), nos experimentos realizados em biorreatores. Percebeu-se para a maioria dos experimentos onde o algoritmo *Fuzzy* foi testado, que este algoritmo apresentou-se eficiente e consistente na resposta fornecida. Este algoritmo indicou um alto grau de certeza para a parada do cultivo muito próximo da máxima produção de enzima quantificada através das análises em laboratório.



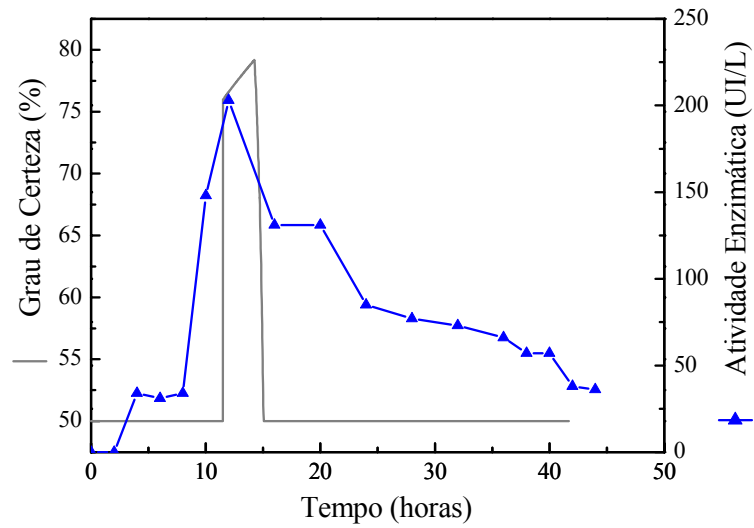
**Figura 4.41.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática no primeiro experimento.



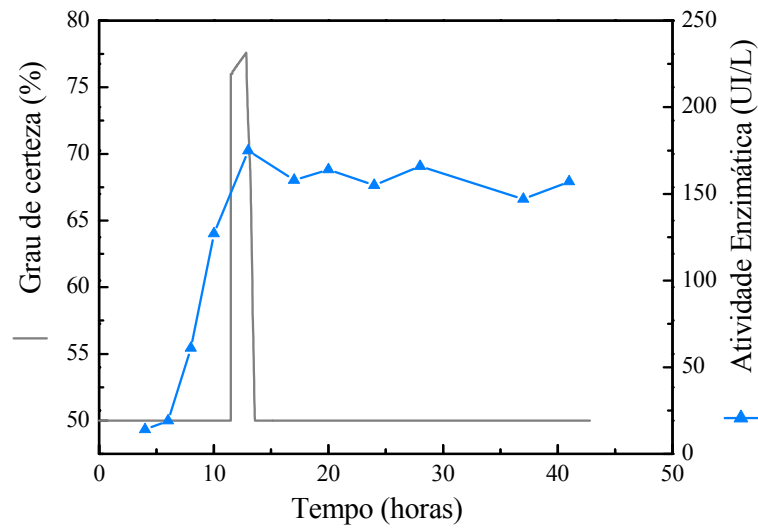
**Figura 4.42.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do segundo experimento.



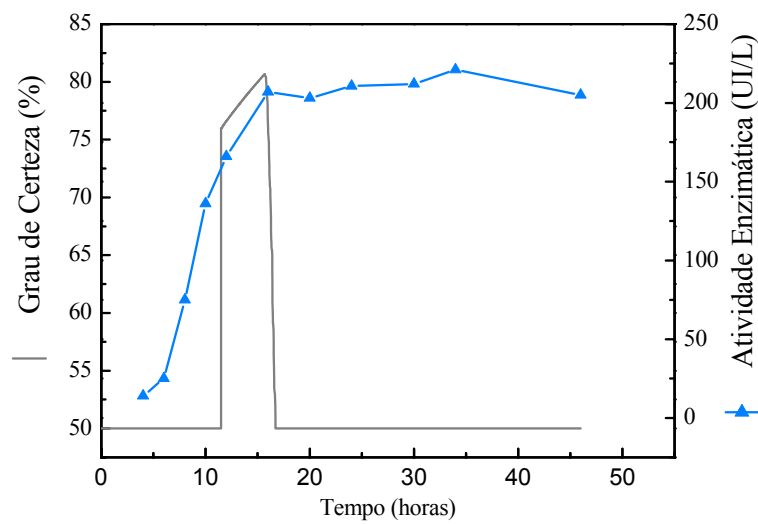
**Figura 4.43.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do quarto experimento.



**Figura 4.44.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do quinto experimento.

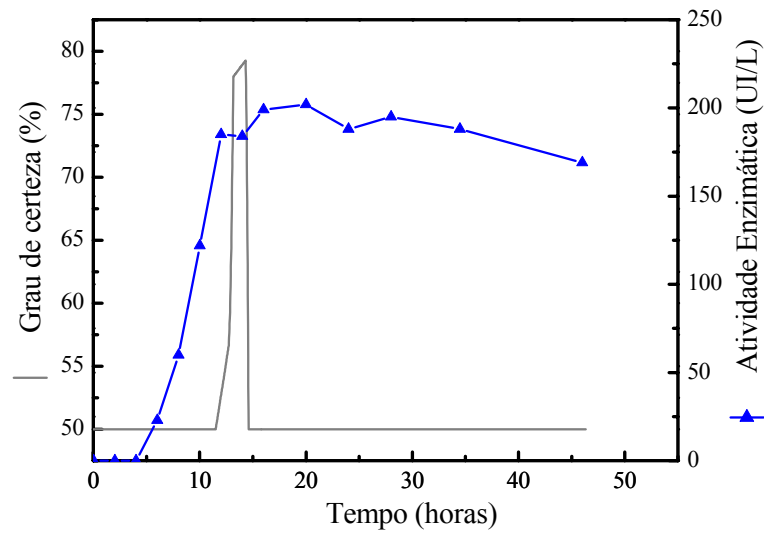


**Figura 4.45.** Grau de certeza para a parada do cultivo utilizando e atividade enzimática do sétimo experimento.

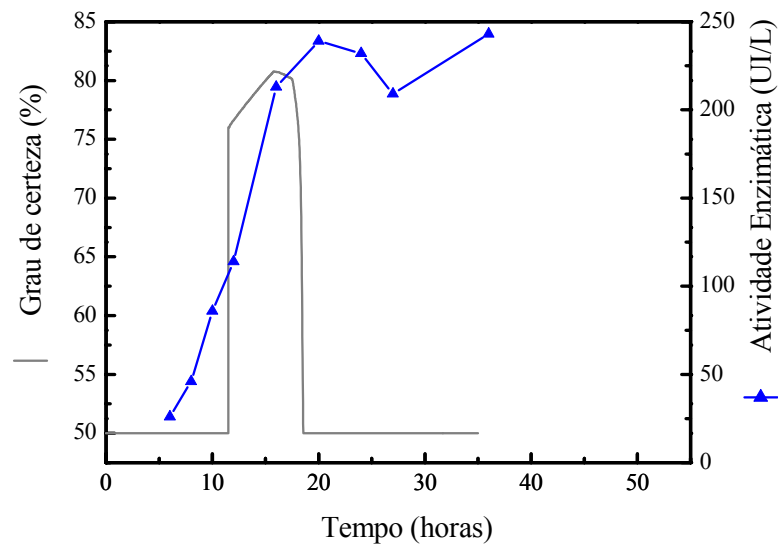


**Figura 4.46.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do oitavo experimento.

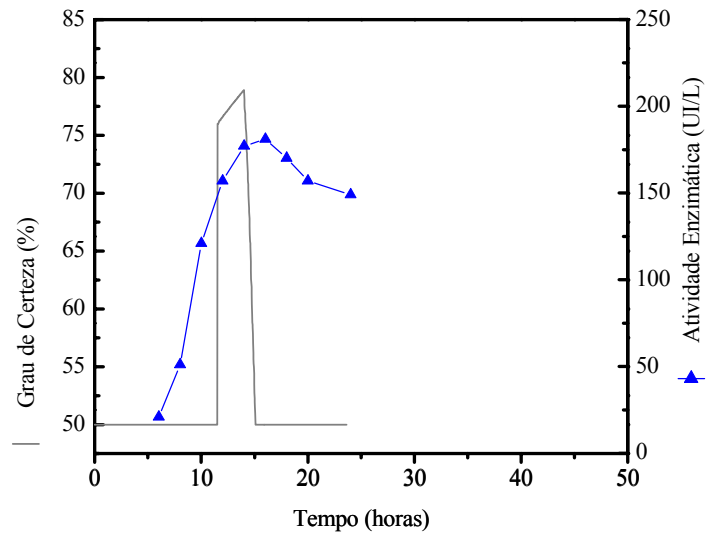




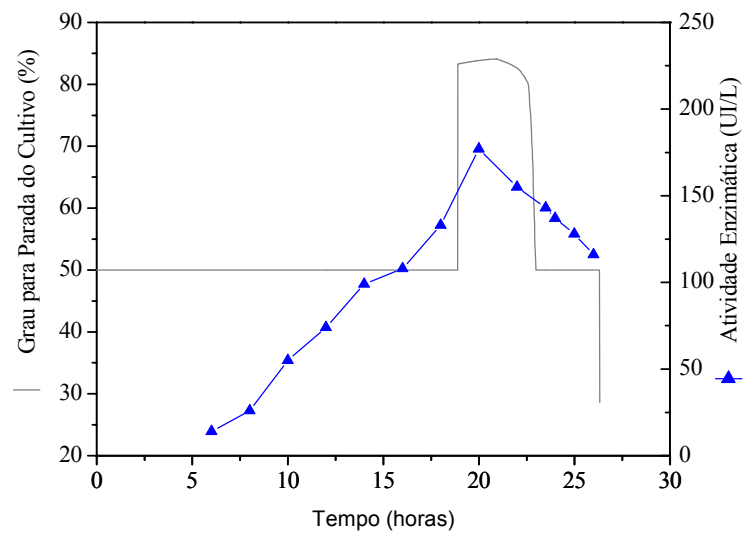
**Figura 4.47.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do décimo experimento.



**Figura 4.48.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do décimo segundo experimento.



**Figura 4.49.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do décimo terceiro experimento.



**Figura 4.50.** Grau de certeza para a parada do cultivo e atividade enzimática do décimo quarto experimento.

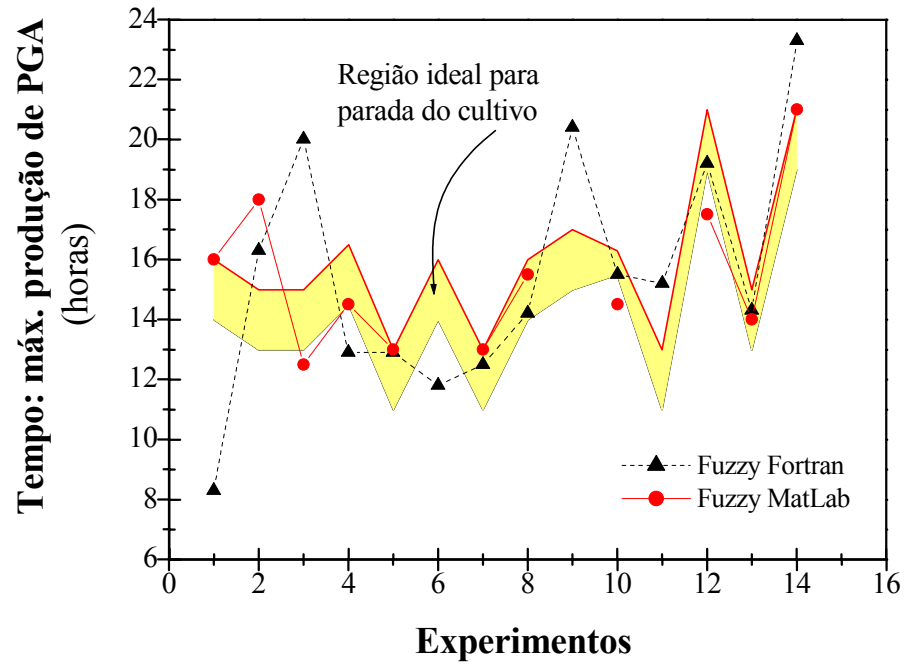
A Tabela 4.4 apresenta o resultado comparativo entre o algoritmo *Fuzzy* proposto no item 4.3 e o implementado no pacote *Fuzzy* do programa MATLAB. O algoritmo *Fuzzy* implementado em Fortran fornece apenas um ponto (um determinado tempo) onde a concentração de enzima atinge seu máximo, enquanto o algoritmo *Fuzzy* desenvolvido no MatLab fornece uma porcentagem de certeza para a parada do cultivo. Esta porcentagem varia entre 0 a 100 %.

Deste modo, pôde-se verificar que o segundo algoritmo *Fuzzy* apresentou-se mais eficiente e consistente na resposta (alto grau de certeza muito próximo da máxima produção de enzima quantificada em laboratório) que o primeiro algoritmo (Fortran).

Observando a Tabela 4.4, notou-se um melhor desempenho do segundo algoritmo *Fuzzy* elaborado. Este fato pode ser melhor visualizado na Figura 4.51. Esta Figura ilustra o tempo ideal para a parada do cultivo (região amarela em destaque) e também o momento em que cada algoritmo (FORTRAN – linha tracejada e MATLAB – linha contínua) indicou a ponto onde haveria a máxima concentração de enzima (PGA). Percebe-se que a região ideal para a parada do cultivo varia de cultivo para outro, não apresentando um uma linearidade no tempo onde há a máxima concentração de enzima (PGA).

<b>Tabela 4.4.</b> Análise comparativa dos algoritmos <i>Fuzzy</i> implementados.			
<b>Experimentos</b>	<b>Região ideal para parada do cultivo (horas)</b>	<b>Tempo indicado pelo primeiro algoritmo <i>Fuzzy</i> (FORTRAN) (horas)</b>	<b>Tempo indicado pelo segundo algoritmo <i>Fuzzy</i> (MATLAB) (horas)</b>
1 <sup>o</sup>	14,0 - 16,0	8,3	16,0 (81% certeza)
2 <sup>o</sup>	13,0 – 15,0	16,3	18,0 (79% certeza)
3 <sup>o</sup>	13,0 – 15,0	20,0	12,5 (77% certeza)
4 <sup>o</sup>	14,5 – 16,5	12,9	14,5 (79% certeza)
5 <sup>o</sup>	11,0 – 13,0	12,9	13,0 (77% certeza)
6 <sup>o</sup>	14,0 – 16,0	11,8	*
7 <sup>o</sup>	11,0 – 13,0	12,5	13,0 (76% certeza)
8 <sup>o</sup>	14,0 – 16,0	14,2	15,5 (80% certeza)
9 <sup>o</sup>	15,0 – 17,0	20,4	*
10 <sup>o</sup>	15,5 – 16,3	15,5	14,5 (78% certeza)
11 <sup>o</sup>	11,0 – 13,0	15,2	*
12 <sup>o</sup>	19,0 – 21,0	19,2	17,5 (80% certeza)
13 <sup>o</sup>	13,0 – 15,0	14,25	14,0 (78% certeza)
14 <sup>o</sup>	19,0 - 21,0	23,76	21,0 (84% certeza)

(\* = constante 50 %)



**Figura 4.51** Análise comparativa dos algoritmos implementados graficamente

## 5. Conclusões

Dos resultados apresentados conclui-se:

- Não foi possível estabelecer um perfil ótimo de pH para o cultivo do microrganismo com vistas à produção de PGA, mas com base nos resultados obtidos nos experimentos em biorreator percebeu-se que há uma produção de enzima (PGA) maior quando não há o controle de pH.
- Algoritmo *Fuzzy* desenvolvido em linguagem FORTRAN apresentou-se eficiente identificando com boa precisão o momento de parada do cultivo (região onde a enzima atinge seu máximo) para a maioria dos experimentos realizados.
- Algoritmo *Fuzzy* implementado no MATLAB utilizando o conjunto de regras disponíveis no Pacote *Fuzzy* foi robusto e eficiente identificando a parada dos experimentos, conforme apresentado nas Figuras 4.41 a 4.50, com alto grau de certeza (mais de 75%) em todos os cultivos.

## 6. Sugestões

- Realizar experimentos em biorreator de bancada para a produção de PGA por *B. megaterium* com controle de pH desde o início da fermentação. O ponto de adição de ácido e/ou base deverá estar bem próximo ao impelidor, de forma a ocorrer rápida diluição das soluções.
- Implementar no algoritmo *Fuzzy* desenvolvido em linguagem Fortran a variável agitação, sendo outra variável importante, junto com a fração molar de CO<sub>2</sub> e sua derivada, na identificação da concentração máxima de enzima.
- Melhorar as regras desenvolvidas no pacote *Fuzzy* do programa MatLab para que o grau de certeza apresentado seja maior e mais próximo possível do momento em que a concentração de enzima atinja seu máximo.
- Implementar o algoritmo desenvolvido no pacote *Fuzzy* do programa MatLab em linguagem Fortran e adiciona-lo ao programa desenvolvido em Visual Basic.
- Adotar como prática a realização de medidas (Atividades Enzimáticas, Concentração celular) em duplicata e/ou triplicata, visando o cálculo do erro e da variância.

## 7. Referências Bibliográficas

Acevedo, F.; Cooney, C.L. Penicillin Amidase Production By *Bacillus Megaterium*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.15: 493-503, 1973.

Alfara, C. G. *et al.* Fuzzy control of ethanol concentration and its application to maximum glutathione production in yeast-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, pp 493 – 501, 1993.

Berazain, J. G. H. Q. Estudo sobre a utilização de soro de queijo na Produção da Penicilina G Acilase por *Bacillus Megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 97p. (Dissertação).

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.

Bruggink, A.; Roos, E.C.; Vroom, E. Penicillin Acylase in the Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Organic Process Research & Development*, 2(2): 128-133, 1998.

Cruz, A. J. G. Estudos de produção de cefalosporina C com acompanhamento em linha de variáveis do processo. UFSCar, 2000, 236 p. (Tese de Doutorado)

Fabri, J. A. Sistemas Neuro-Fuzzy Aquisição e Processamento de Conhecimento. São Carlos, UFSCar, 1999. 82 p. (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). Relatório de Iniciação Científica, FAPESP, Proc. 02/01076-6, 2001.

Gomide, F. A. C.; Gudwin, R. R.. Modelagem, controle, sistemas e lógica Fuzzy. *Controle e Automação*, v. 4, n. 3, pp. 97 - 115, 1994



- Hirota, K. Industrial Applications and Education on Fuzzy Systems in Japan. *Controle e Automação*, v. 4, n.3, pp.155-161, 1994.
- Hojo, O. Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus Megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 123 p. (*Tese de Doutorado*)
- Illanes, A.; Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Reyes, I; Torres, R. Cartagena, O.; Ruiz & M, A. Production of *Bacillus megaterium* in Complex and Definid Media. *Process Biochemistry*, 29: 263-270, 1994.
- Lee, C. C. Fuzzy Logic in control systems: Fuzzy logic controller - Part I & part II. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, v. 20, n. 2, pp 404-435, 1990.
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n.3, 1959.
- Murao, S.; Sakaguchi, K.; Kono, K. Process for Preparing 6-Aminopenicilanic Acid by *Bacillus megaterium*, *U.S. Patent* 3,144,395 (1964).
- Patterson, D. W. Artificial Neural Networks – Theory and Applications. *Prentice Hall*, Singapore, 1996.
- Pinotti, L.M.; Silva, A.F.S.; Silva, R.G.; Giordano, R.L.C. Study of Different Media for Production of Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 655-663, 2000.
- Pinotti, L.M. Estudo da Produção, Purificação e Imobilização de Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1999. 103 p (*Dissertação*)
- Rissoli, V. R. V. Sistema Especialista Fuzzy para Avaliação de Instituições Educacionais. São Carlos, UFSCar, 1999. 132 p. (*Dissertação*)
- 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.

Shewale, J.W.; Sivaramam, H. Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA. *Process Biochemistry*, 146-154.1989.

Shiba, S., Nishida, Y., Parque, Y.S., Iijima, S., Kobayashi, T. Improvement of cloned  $\alpha$ -amilase gene-expression in fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by regulation both glucose and ethanol concentrations using a Fuzzy controller. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 1055 – 1063, 1994.

Silva, R. G. Inferência de Variáveis do Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. 203 p. (Tese de Doutorado)

Souza, V. R., Pinotti, L.M., Inocência, G. E. M.. Influence of Amino Acids Composition in the production Penicillin G Acylase by *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Anais do VII SHEB - Simpósio de Hidrólise Enzimática e Biomassas*. UEM-Maringá, Dez/2002.

Souza, V. R. Requerimentos Nutricionais na produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. 140 p. (Dissertação)

Sousa Jr, R. Aplicação da Lógica Nebulosa (“Fuzzy”) no Controle de Reatores Bioquímicos para a Produção de Cefalosporina C em Regime de Batelada alimentada. São Carlos, UFSCar, 1999. 143 p. (Dissertação)

Sousa Jr, R. Almeida, P.I.F. Design of Fuzzy system for the control of a biochemical reator in fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 461 – 469. 2001

Szentirmai, A. Production of Penicillin Acylase. *Applied Microbiology*, 12, 185-187, 1963.

Vary, P.S. Prime Time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, v. 140, p. 1001-1013, 1994.

Visnard, C. Estudo de Alguns Aspectos do Processo de Produção da Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 59 p. (Dissertação)

Yamada, Y., Haneda, K., Murayama, S., Shiomi, S., Aplication of *Fuzzy* system to coenzyme Q10 fermentation. *Journal of Chemical Enginnering of Japan*. v. 24, pp.94 –99, 1991.

**Apêndice A1: Valores experimentais obtidos em cultivos do microrganismo  
*B. megaterium*. Experimentos utilizando caseína hidrolisada  
enzimáticamente.**

A Tabela A.1 mostra os resultados obtidos das análises de concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de lactose e Lowry na produção de PGA no primeiro ensaio em biorreator.

**Tabela A.1.** Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por *B. megaterium*. 1º experimento em biorreator.

Ensaio	Tempo (horas)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A. E. (UI/L)	Lowry (g/L)	Bradford (g/L)	Lactose (g/L)
1	Pré-inóculo	nd	7,2	nd	nd	nd	nd
	Inóculo	nd	6,3	nd	32,3	0,5	6,0
	0	7,7	0,3	nd	45,1	0,9	13,9
	2	7,8	1,0	nd	45,6	0,9	13,7
	4	7,9	1,7	nd	44,5	1,0	13,3
	6	7,8	3,5	nd	42,1	1,0	13,7
	8	8,1	5,8	30	41,2	1,0	13,7
	10	8,2	6,5	48	37,7	1,0	13,8
	12	8,3	7,7	47	35,3	1,0	13,7
	16	8,6	7,8	56	31,5	1,1	13,1
	20	8,9	7,3	41	29,5	1,0	12,5
	24	8,9	6,8	57	29,7	1,0	12,2
	28	8,9	6,4	48	29,7	1,1	11,7
	36	9,0	6,7	57	29,4	1,1	11,8
	48	9,1	5,2	43	27,9	1,1	11,8
52	9,1	5,1	49	27,7	1,1	11,6	

(nd = não determinado)

A Tabela A.2 mostra os resultados obtidos das análises de concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de Lowry e lactose na produção de PGA no segundo ensaio em biorreator.

<b>Tabela A.2:</b> Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . 2 <sup>o</sup> experimento em biorreator.						
<b>Ensaio</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>C<sub>x</sub> (g/L)</b>	<b>A. E. (UI/L)</b>	<b>Lowry (g/L)</b>	<b>Lactose (g/L)</b>
2	Pré-inóculo	nd	6,8	nd	nd	nd
	Inóculo	nd	6,5	nd	33,7	6,1
	0	7,8	0,6	nd	47,5	14,9
	2	7,9	1,0	nd	47,6	14,6
	4	8,0	1,6	nd	46,9	14,4
	6	8,0	2,3	nd	47,1	14,3
	8	8,1	3,3	56	47,4	14,4
	10	8,1	4,8	73	43,8	13,6
	14	8,1	6,8	95	42,4	13,4
	16	8,1	7,2	62	39,5	13,6
	20	8,1	8,2	60	37,7	13,6
	24	8,1	8,8	46	31,6	13,6
	28	8,1	8,3	50	29,1	13,5
	32	8,1	8,3	42	29,4	13,3
	36	7,5	8,1	31	28,7	13,5
43	7,5	7,9	33	28,6	13,2	
48	7,6	7,1	33	28,1	13,4	

(nd = não determinado)

A Tabela A.3 apresenta os resultados obtidos neste terceiro experimento, como concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.) e concentração de proteínas e lactose presentes nas amostras retiradas periodicamente do biorreator.

**Tabela A.3** Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por *B. megaterium*. 3º experimento em biorreator

Ensaio	Tempo (horas)	pH	Cx (g/L)	A.E. (UI/L)	Lowry (g/L)	Lactose (g/L)
3	Pré-Inóculo	nd	5,9	nd	29,3	nd
	Inóculo	nd	6,4	nd	25,8	7,4
	0	7,4	0,5	nd	45,7	15,8
	2	7,6	1,0	nd	45,5	15,8
	4	7,7	1,0	23	46,4	15,9
	6	7,7	2,0	38	46,2	15,9
	8	7,8	3,2	36	45,7	15,5
	10	7,8	4,5	45	45,0	15,9
	12	8,1	6,2	68	42,5	15,8
	14	8,1	7,1	70	37,4	15,5
	16	8,1	8,2	49	34,8	15,5
	19	8,1	9,0	51	30,2	14,3
	22	8,1	8,6	48	26,6	13,7
	27	8,1	8,2	56	26,3	13,3
42	8,3	8,1	45	19,6	13,4	

(nd = não determinado)

**Apêndice A2: Valores experimentais obtidos em cultivos do microrganismo *B. megaterium*. Experimentos utilizando solução de aminoácidos livres.**



Na tabela A.4 estão os resultados obtidos neste quarto experimento. Nesta tabela contém os valores da concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.) e concentração de lactose quantificadas em análise de laboratório.

**Tabela A.4:** Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por *B. megaterium*. 4<sup>o</sup> experimento em biorreator.

Ensaio	Tempo (horas)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A. E. (UI/L)	Lactose (g/L)
4	Pré-inóculo	nd	5,5	nd	5,4
	Inóculo	nd	nd	nd	5,0
	0	7,8	0,3	nd	15,1
	2	8,0	0,4	nd	14,3
	4	8,1	0,7	nd	13,9
	6	8,2	2,0	14	13,7
	8	8,4	3,2	48	13,6
	10	8,5	4,0	123	13,7
	12	8,5	4,50	143	13,6
	16	8,8	4,8	158	13,5
	20	9,0	4,5	180	13,4
	24	9,1	4,3	120	13,3
	28	9,2	4,3	130	13,1
	32	9,2	4,0	128	13,0
	36	9,2	3,9	140	12,9
	40	9,3	4,0	130	12,5
43	9,4	4,0	121	12,2	

(nd = não determinado)

Na tabela A.5 estão os resultados obtidos neste quinto experimento em biorreator com controle de pH visando a produção de PGA por *B. megaterium*.

**Tabela A.5:** Valores de pH, concentração celular (Cx), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por *B. megaterium*. 5<sup>o</sup> experimento em biorreator.

Ensaio	Tempo (horas)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A. E. (UI/L)	Lactose (g/L)
5	Pré-Inóculo	nd	4,7	nd	5,1
	Inóculo	8,6	3,4	nd	5,3
	0	7,4	0,3	nd	15,8
	2	7,8	0,3	nd	15,6
	4	7,8	0,7	34	15,4
	6	8,0	1,8	31	15,4
	8	8,1	3,0	34	15,3
	10	8,1	3,9	148	15,4
	12	8,1	4,8	203	15,4
	16	8,1	4,9	131	15,3
	20	8,0	4,4	130	15,3
	24	8,0	4,3	85	15,4
	28	8,0	4,0	77	15,5
	32	8,1	3,9	73	15,3
	36	8,1	3,8	66	15,3
	40	7,5	3,8	57	15,1
	42	7,0	3,3	38	14,8
44	7,0	3,0	36	14,7	

(nd = não determinado)

Na tabela A.6 presente no apêndice A2 apresenta os resultados obtidos neste sexto experimento em biorreator tipo tanque agitado e aerado com controle de pH em  $(8,7 \pm 0,1)$ , alimentação de aminoácidos 10 g/l e soro ultrafiltrado visando a produção de PGA por *B. megaterium*.

**Tabela A.6:** Valores de pH, concentração celular (C<sub>x</sub>), atividade enzimática (A.E.), concentração de proteínas e lactose na produção de PGA por *B. megaterium*. 6º experimento em biorreator.

Ensaio	Tempo (horas)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A. E. (UI/L)
6	Pré-Inóculo	nd	4,6	nd
	Inóculo	nd	3,7	nd
	0	8,07	0,3	nd
	2	8,14	0,4	nd
	4	8,03	0,7	nd
	6	8,13	1,3	18
	8	8,24	2,2	22
	10	8,38	3,3	50
	12	8,57	3,7	50
	16	8,69	3,7	110
	20	8,83	3,9	90
	24	8,77	3,5	73
	28	8,76	3,8	54
	38	8,74	3,4	63

(nd = não determinado)

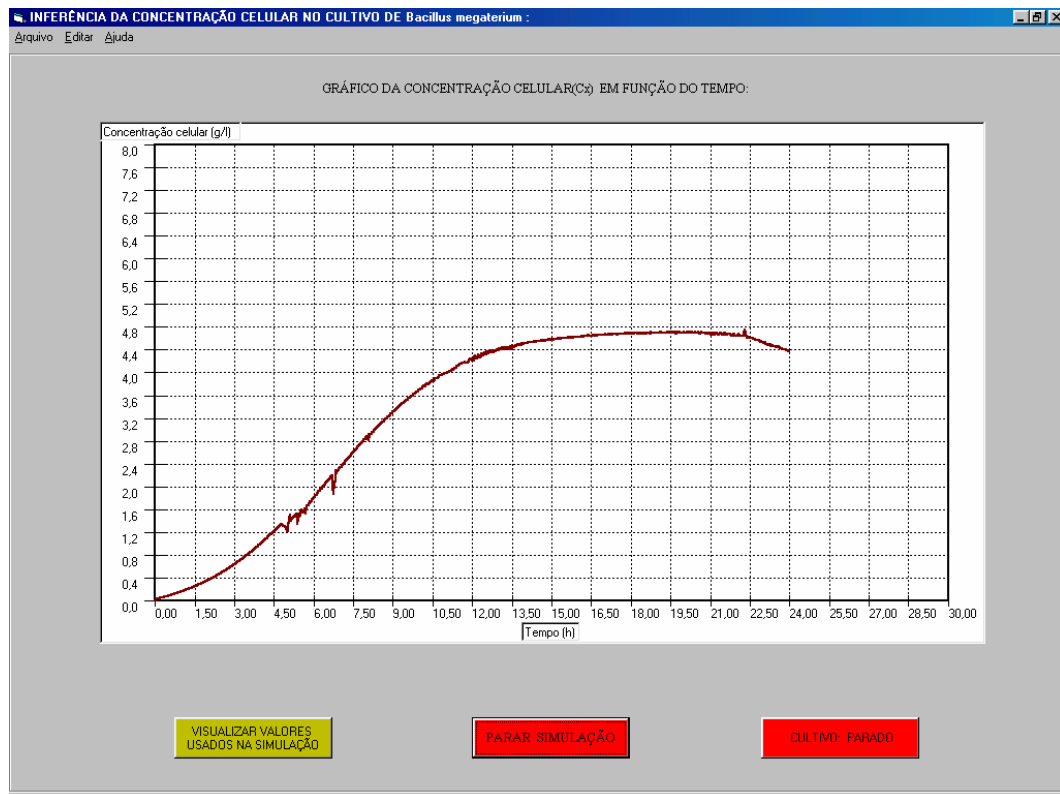
**Apêndice A3: “Telas” desenvolvidas no programa em *Visual Basic* onde o algoritmo *Fuzzy* foi implementado como biblioteca dinâmica (DLL)**

A Figura A3.1 ilustra a tela principal do programa desenvolvido em *Visual Basic* (Gomes, 2001) para troca de informações com o Sistema Supervisório, onde o algoritmo *Fuzzy* desenvolvido foi implementado.

**Figura A3.1.** Tela principal do programa desenvolvido em *Visual Basic* (Gomes, 2001)

Nesta tela observam-se os campos relativos aos valores da fração molar de dióxido de carbono e velocidade de agitação, valores estes utilizados para suprir o algoritmo baseado em redes neurais para inferência da concentração celular em tempo real (Gomes, 2001; Silva, 2003). No canto inferior direito encontram-se campos ilustrando a parada do cultivo (CULTIVO PARADO) e o tempo em que este deveria ser interrompido (23,25 horas), conforme cálculos realizados pelo algoritmo *Fuzzy*. É possível acompanhar também o valor da concentração celular e o valor da velocidade de consumo de oxigênio (OUR), da velocidade de produção de dióxido de carbono (CPR) e do quociente respiratório (RQ),

localizados no campo inferior esquerdo. Pressionando-se o botão indicado por “VISUALIZAR GRÁFICO”, outra tela é aberta, apresentando gráfico da concentração celular (Figura A3.2).



**Figura A3.2.** Tela gráfica desenvolvida no programa em *Visual Basic* (Gomes, 2001) para acompanhar a evolução da concentração celular em tempo real ao longo do cultivo.