

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

**AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS E
APLICAÇÃO DE ENFOQUE HÍBRIDO NA MODELAGEM DO
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE
POR *Bacillus megaterium***

Fábio Cristiano Tonin

São Carlos – SP
2005

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

**AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS E
APLICAÇÃO DE ENFOQUE HÍBRIDO NA MODELAGEM DO
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE
POR *Bacillus megaterium***

Fábio Cristiano Tonin

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, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**Orientador:
Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz**

São Carlos – SP
2005

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

T665av

Tonin, Fábio Cristiano.

Avaliação de variáveis operacionais e aplicação de enfoque híbrido na modelagem do processo de produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* / Fábio Cristiano Tonin. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

85 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Engenharia bioquímica. 2. Automação. 3. Simulação. 4. Redes neurais. 5. Penicilina G acilase – fermentação. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

Dedicação especial

Aos meus pais

José Carlos e Maria de Fátima

& meu irmão, Erick

Por estarem presentes na minha vida.

Agradecimentos

A Deus por dar-me fé e forças para enfrentar os desafios do dia-a-dia.

Ao professor Antonio José Gonçalves da Cruz pela orientação, dedicação, apoio e amizade ao decorrer destes anos o qual tornou possível a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e elaboração deste trabalho, em especial aos professores Roberto de Campos Giordano e Rosineide Gomes da Silva.

Aos amigos Edson, Vanessa, Gilson, Charles e Marcelo do departamento de Engenharia Química pela amizade, disposição e orientação, pois com palavras sábias sempre mostraram um norte a ser seguido.

A todos os companheiros, colegas e amigos de departamento, que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização dessa dissertação, fosse com palavras de descontração, amizade ou mesmo de orientação.

Aos meus familiares que sempre mostraram carinho e amor por eu estar realizando este trabalho.

Aos meus amigos de São Carlos, Aline, Fernanda, Adriano, Haron, Pereira, Lúcio, Breno, Francisco, Camila, Simone, Stella, Thais, e aos de Rio Claro, Andres, Leandro, Fernando, Daniel, Fábio, Ronald, que me ajudaram a fortalecer meu trabalho com um simples bate-papo ou alguma brincadeira nas horas mais complicadas.

A minha companheira e mais que amiga Fernanda que com gestos e palavras de amor, carinho e incentivo sempre mostrou o caminho que eu deveria seguir.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro e ao DEQ/UFSCar pela disposição dos equipamentos e materiais dos laboratórios para a realização deste trabalho.

A todos meu muito obrigado, pois fico feliz em saber que vocês acreditam em mim.

Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar a influência de condições operacionais, particularmente a concentração de oxigênio dissolvido, na produção da penicilina G acilase (PGA) em cultivos empregando bactéria *Bacillus megaterium* em biorreator tipo tanque agitado e aerado. A importância desta variável reside no fato que tanto sua falta como seu excesso pode prejudicar a produção da enzima.

A análise dos dados experimentais permitiu identificar a melhor condição experimental: experimento realizado com controle de oxigênio dissolvido em 10% da saturação. Em relação à composição dos meios, esta não se mostrou significativa. A substituição do ácido fenilacético pelo acetato de potássio, bem como a redução de dezoito para sete aminoácidos não teve efeito sobre as concentrações de células e de enzima obtidas. A operação do cultivo em batelada alimentada e o controle de pH não se mostraram efetivos para melhorar a produção da enzima.

Propôs-se modelo híbrido combinando equação de balanço com redes neurais artificiais para inferir a concentração celular ao longo do processo. O modelo proposto foi capaz de inferir com boa precisão a concentração celular nos ensaios de treinamento e obteve boas previsões nos ensaios de validação para alguns testes realizados.

Abstract

In the present work it was studied the influence of operational conditions particularly dissolved oxygen concentration in the penicillin G acylase (PGA) production. The experiments were carried out in aerated and agitated bioreactor employing bacteria *Bacillus megaterium*. The production of PGA is sensitive to dissolved oxygen concentration during its cultivation. As much its lack as its excess can be reduces PGA production.

As regarding dissolved oxygen concentration the experiments realized in 10% of its saturation showed the better results. The media composition was not significantly influence on enzyme production. The use of potassium acetate instead of phenyl acetic acid as well as the reduction of eighteen for seven amino acids did not have effect on the cells' and enzyme concentrations obtained.

It was proposed an hybrid model combining mass balance equation with artificial neural network to infer the cellular concentration during the process. The proposed model showed good results to modeling cellular concentration in both training and validate data sets.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Ilustração em 3D da estrutura da PGA obtida por difração de raio-X.	20
Figura 2.2: Hidrólise enzimática da PG.	21
Figura 2.3: Representação de um neurônio humano.	31
Figura 2.4: Resultado do treinamento para a rede de inferência com dados filtrados. (A) ensaio I, (B) ensaio II e (C) ensaio III.	36
Figura 2.5: Resultado da validação para a rede de inferência da fase exponencial. (A) ensaio IV, (B) ensaio V e (C) ensaio VI.	37
Figura 3.1: Procedimento experimental de produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> .	43
Figura 3.2: Preparo dos criotubos com <i>Bacillus megaterium</i> .	46
Figura 3.3: Esquema do aparato experimental ilustrando equipamentos.	47
Figura 4.1: Valores experimentais da concentração celular dos cultivos 1 a 6.	54
Figura 4.2: Valores experimentais da atividade enzimática dos cultivos 1 a 6.	55
Figura 4.3: Concentração de oxigênio dissolvido para os ensaios de 1 a 6.	56
Figura 4.4: Fração molar de CO ₂ da saída do biorreator para os ensaios 1 a 6.	56
Figura 4.5: Valores de agitação dos ensaios 1 a 6 realizados	57
Figura 4.6: Valores experimentais da concentração celular dos cultivos 7 a 13.	58
Figura 4.7: Valores experimentais da atividade enzimática dos ensaios 7 a 13.	59
Figura 4.8: Concentração de oxigênio dissolvido para os ensaios de 7 a 13.	59
Figura 4.9: Fração molar de CO ₂ da saída do biorreator para os ensaios 7 a 13.	60
Figura 4.10: Valores de agitação dos ensaios 7 a 13 realizados.	60
Figura 4.11: Modelo neural híbrido.	63

Figura 4.12: Esquema ilustrativo da estrutura de rede neural utilizada.	64
Figura 4.13: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 500 apresentações. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2, (C) Ensaio 3 e (D) Ensaio 6.	66
Figura 4.14: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2, (C) Ensaio 3 e (D) Ensaio 6.	67
Figura 4.15: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 500 apresentações para os ensaios 4 e 5. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.	68
Figura 4.16: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.	68
Figura 4.17: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 500 apresentações. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11, (D) Ensaio 12 e (E) Ensaio 13.	69
Figura 4.18: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11, (D) Ensaio 12 e (E) Ensaio 13.	70
Figura 4.19: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 500 apresentações para os ensaios 7 e 10. (A) Ensaio 7 e (B) Ensaio 10.	71
Figura 4.20: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 7 e (B) Ensaio 10.	71
Figura 4.21: Variação do erro em função do número de apresentações para o número de neurônios na camada oculta (aa^{total} , com os ensaios 1, 2 e 3 usados no treinamento).	72
Figura 4.22: Variação do erro em função do número de apresentações para o número de neurônios na camada oculta (aa^{pref} , com os ensaios 8, 9, 11 e 12 usados no treinamento).	72

Figura 4.23: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 200 apresentações. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2 e (C) Ensaio 3.	73
Figura 4.24: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2 e (C) Ensaio 3.	74
Figura 4.25: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 200 apresentações. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.	75
Figura 4.26: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.	75
Figura 4.27: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 200 apresentações. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11 e (D) Ensaio 12.	76
Figura 4.28: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11 e (D) Ensaio 12.	77
Figura 4.29: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 200. (A) Ensaio 7, (B) Ensaio 10 e (C) Ensaio 13.	78
Figura 4.30: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 7, (B) Ensaio 10 e (C) Ensaio 13.	79

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Algumas empresas que utilizam PGA imobilizada e seus respectivos microrganismos produtores.	21
Tabela 3.1: Composição do meio sólido empregado para preservação e manutenção do <i>Bacillus megaterium</i> .	41
Tabela 3.2: Solução contendo aminoácidos livres.	41
Tabela 3.3: Solução contendo aminoácidos preferenciais.	42
Tabela 3.4: Composição dos meios de produção em <i>shaker</i> e <i>biorreator</i> (aa^{total}).	42
Tabela 3.5: Composição dos meios de produção em <i>shaker</i> e <i>biorreator</i> (aa^{pref}).	42
Tabela 4.1: Condições experimentais comuns mantidas nos ensaios realizados.	52
Tabela 4.2: Condições experimentais adotadas nos ensaios realizados em biorreator	53
Tabela 4.3: Resultados obtidos em <i>shaker</i> durante a realização dos ensaios de 1 a 13.	53
Tabela 4.4: Concentração celular inicial, atividade enzimática máxima no respectivo tempo, atividade enzimática específica e velocidade específica máxima de crescimento celular calculados nos ensaios realizados.	61

Nomenclatura

aa:	Aminoácidos
aa ^{pref}	Solução de aminoácidos preferenciais + soro de queijo + solução de sais +FAK
aa ^{total} :	Solução de aminoácidos livres + soro de queijo + solução de sais + AFA
AE*:	Atividade enzimática específica (UI/g)
AFA:	Ácido fenilacético
6-APA:	Ácido 6-aminopenicilânico
CHE:	Caseína hidrolisada enzimaticamente
CLP:	Controlador lógico programável
C _P :	Concentração de enzima (UI/L)
C _{Pmáx} :	Concentração de enzima máxima (UI/L)
C _X :	Concentração celular (g/L)
C _{X0} :	Concentração celular inicial (g/L)
FAK:	Fenil acetato de potássio
K _{6-APA} :	Constante de inibição não competitiva para 6-APA (mM)
K _{AFA} :	Constante de inibição competitiva para AFA (mM)
K _i :	Constante de Monod do substrato i (g/L)
K _M :	Constante de Michaelis-Menten para PG (mM)
K _S :	Constante de inibição competitiva para PG (mM)
MLP:	<i>Multilayer perceptron</i>
MP:	Meio de produção
nco:	Número de neurônios na camada oculta
OD:	Concentração de oxigênio dissolvido (% Sat.)
P:	Concentração de produto (UI/L)

PDAB:	p-dimetilaminobenzaldeído
PG:	Penicilina G
PGA:	Penicilina G Acilase
PMC:	Perceptrons de múltiplas camadas
RNA:	Rede neural artificial
S_i :	Concentração do substrato i (g/L)
UI:	Unidade internacional de atividade
V_{\max} :	Taxa de reação máxima
Y_{CO_2}	Fração molar de gás carbônico (%)
$Y_{X/P}$:	Fator de rendimento celular em relação ao produto (g células/g produto)
Y_{X/S_i} :	Fator de rendimento celular em relação ao substrato i (g células/g substrato i)

Letras Gregas

δ :	Somatório do erro
μ :	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_{\max} :	Velocidade máxima específica de crescimento celular (h^{-1})

Sumário

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução	16
--------------	----

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica	18
2.1 Introdução sobre as Penicilinas	18
2.2 Penicilina G Acilase	20
2.3 <i>Bacillus megaterium</i>	22
2.4 Penicilina G Acilase Produzida por <i>Bacillus megaterium</i>	22
2.5 Requerimento Nutricional do <i>Bacillus megaterium</i>	26
2.6 Oxigênio Dissolvido e seu Fator de Importância	27
2.7 Modelagem Matemática para o Crescimento Celular	28
2.8 Redes Neurais Artificiais	29
2.8.1 Introdução	29
2.8.2 Redes Neurais e o Sistema Nervoso Humano	30
2.8.3 Modelos de Redes Neurais	32
2.8.4 Perceptron Múltiplas camadas e <i>Backpropagation</i>	33
2.8.5 Modelagem Híbrida	34
2.8.6 Redes de Inferência da Concentração Celular	35

3 Materiais, Equipamentos e Métodos	38
3.1 Materiais e Equipamentos	38
3.1.1 Microrganismo e outros materiais experimentais	38
3.1.2 Equipamentos	38
3.2 Meios de Cultivo	40
3.2.1 Meio de Esporulação	40
3.2.2 Procedimento Experimental para Germinação e Inóculo	41
3.2.3 Produção da Enzima em <i>Shaker</i> e <i>Biorreator</i>	42
3.2.4 Produção da Enzima em <i>Biorreator</i> Agitado e Aerado	43
3.3 Análise das Amostras para Acompanhamento da Produção	43
3.3.1 Análise da Concentração Celular	44
3.3.2 Determinação da Concentração da Enzima (Atividade Enzimática)	44
3.3.2.1 Método espectrofotométrico PDAB	44
3.3.3 Preparo dos Criotubos	45
3.4 Descrição da Instrumentação do Biorreator Convencional e do Sistema de Aquisição de Dados	46
3.4.1 Descrição do Sistema de Controle de Oxigênio Dissolvido	48
3.4.2 Descrição do Sistema de Controle de pH	48
3.4.3 Descrição do Sistema de Controle de Temperatura	49
3.4.4 Descrição do Sistema de Controle de Formação de Espuma	49
3.4.5 Descrição do Sistema de Controle de Vazão do Meio Suplementar	49
3.4.6 Medidor de Vazão	50
3.4.7 Analisador dos Gases de Saída	50

3.4.8 O Controlador Lógico Programável (CLP)	50
3.4.8.1 O Sistema Supervisório	51

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4 Resultados e Discussão	52
4.1 Análise dos Dados Experimentais	52
4.2 Simulação Empregando Modelo Híbrido	63

Capítulo 5

Considerações Finais

5 Conclusões	80
5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros	81

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

6 Referências Bibliográficas	82
------------------------------	----

1 Introdução

O uso de antibióticos no tratamento de infecções causadas por microrganismo difundiu-se principalmente durante a Segunda Guerra Mundial. Foi nesta época que se iniciou a produção da penicilina. Esta era realizada em frascos, empregando meio sólido. Desde a descoberta do composto – por Alexander Fleming em 1929 – até sua ampla utilização, acelerada pela ocorrência do conflito mundial, cerca de duas décadas se passaram. A partir dos anos cinquenta, estudos empregando culturas submersas em tanques agitados e aerados tiveram início nos Estados Unidos.

A descoberta do antibiótico e sua aplicação no tratamento de doenças em seres humanos inauguraram um novo capítulo na ciência, denominado de biotecnologia. Desde então, uma ampla variedade de compostos bioquímicos com atividade antimicrobiana vem sendo descoberta. A partir da identificação e caracterização do núcleo 6-aminopenicilânico (6-APA) da molécula de penicilina tornou possível a obtenção de novos compostos a partir deste. Surgiram as chamadas penicilinas semi-sintéticas, obtidas através da modificação da cadeia lateral da molécula de penicilina.

No Brasil, a produção de antibióticos é gerenciada por empresas estrangeiras ou transnacionais que detêm a tecnologia neste campo. Empresas nacionais necessitam importar insumos para sua produção. Dessa forma, tornam-se imprescindíveis estudos neste campo, principalmente sobre a produção dos antibióticos semi-sintéticos. Na produção de ampicilina e amoxicilina, por exemplo, existe a necessidade do precursor 6-APA obtido da reação de hidrólise da penicilina G. Tradicionalmente o precursor é obtido via hidrólise química. Outra forma de obter o precursor é via enzimática, empregando a enzima penicilina G acilase (PGA). A ligação do núcleo 6-APA obtido com a respectiva cadeia lateral, para obtenção da ampicilina (ou amoxicilina), é hoje majoritariamente realizada via rota química. Contudo,

estudos vêm sendo realizados com objetivo de realizar esta síntese via enzimática, utilizando a mesma enzima, PGA (chamada rota verde de produção).

O Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (LEB/DEQ/UFSCar) realiza em estreita colaboração com o Laboratório de Automação e Desenvolvimento de Bioprocessos (LaDABio) estudos na produção, caracterização, purificação e imobilização da enzima PGA obtida a partir de cultivos submersos empregando o microrganismo *Bacillus megaterium*. A partir de 2005, a produção de PGA por *Xanthomonas sp.* também vem sendo objeto de investigação pelo grupo de pesquisa. Em parceria com o Departamento de Genética e Fisiologia do DEQ/UFSCar estudos na clonagem do gene produtor de PGA e sua expressão em *Escherichia coli* estão sendo estudados.

A produção da enzima pelo microrganismo *B. megaterium* é complexa e as condições operacionais para otimização do processo ainda não estão totalmente elucidadas. Poucos relatos são encontrados na literatura utilizando este microrganismo na obtenção da enzima PGA. Dessa forma, estudos focando este tópico são necessários.

Este trabalho teve por objetivo estudar a influência de condições operacionais na produção da enzima em cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado, particularmente o oxigênio dissolvido. Esta variável é de grande importância, uma vez que tanto sua falta como seu excesso pode prejudicar a produção da enzima (De LEÓN et al., 2003; HOJO, 1997; VISNARDI, 1997).

A partir dos resultados experimentais obtidos, propôs-se modelar o crescimento celular do processo de produção da enzima por *Bacillus megaterium* através de enfoque híbrido, combinando equação de balanço de massa com rede neural artificial.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Introdução sobre as Penicilinas

A penicilina foi descoberta em Londres, em 1929, por *sir* Alexander Fleming. Mais tarde a descoberta revolucionaria o tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas, além de induzir a descoberta de novos compostos de atividade farmacológica produzida através de bioprocessos (SWARTZ, 1985). Essa descoberta trouxe para a biotecnologia um novo produto comercial, de uso terapêutico, além dos tradicionais alimentos e bebidas já existentes na época. Dessa forma, iniciou-se uma revolução no tratamento de infecções bacterianas, que serviu de modelo para o surgimento de numerosos compostos produzidos por via fermentativa. Neste contexto, a palavra fermentação não se refere á cultivos anaeróbios, mas sim ao cultivo em geral de microrganismos em meio sólido ou líquido, quer sejam aeróbios ou anaeróbios (SILVA, 2003).

O início da produção industrial da penicilina ocorreu nos Estados Unidos, em 1941, treze anos após sua descoberta, durante a Segunda Guerra Mundial. Naquela época o cultivo era realizado empregando meio sólido atingindo uma produção de 10 a 20 unidades Oxford/ml (equivalente a 0,006-0,012 mg de benzil penicilina, sal de sódio/ml) (SWARTZ, 1985).

As penicilinas podem ser divididas em três grupos: as biossintéticas, as semi-sintéticas e as sintéticas.

As penicilinas biossintéticas podem ser obtidas diretamente por caldos de cultura de bioprocessos, com diferentes estruturas. As mais conhecidas são as penicilinas G e V, pois possuem maior interesse clínico. Suas cadeias laterais diferem por causa da diferença estrutural do radical em que está ligada na cadeia lateral ao ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (SWARTZ, 1985).

Segundo Hersbach et al. (1984), todas as penicilinas semi-sintéticas são compostas pelo ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e podem ser obtidas pela modificação da cadeia lateral das penicilinas biossintéticas por via química ou enzimática. Um exemplo é a utilização da penicilina amido hidrolase para obtenção do núcleo 6-APA a partir da penicilina (HOJO, 1997).

As penicilinas semi-sintéticas, originadas a partir da modificação da cadeia lateral da molécula de penicilina, vêm sendo obtidas industrialmente pela “Rota Química”, a qual emprega solventes caros e tóxicos. Esta forma de produção pode gerar problemas ambientais havendo a necessidade de tratar os resíduos gerados.

Desde 1994 o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar realiza estudos relativos à produção da enzima penicilina G acilase (PGA) empregando o microrganismo *Bacillus megaterium*. Vários estudos vêm sendo conduzidos focando a produção, purificação e imobilização da enzima. Paralelamente, estudos utilizando PGA imobilizada estão sendo realizados com o objetivo de produzir antibióticos semi-sintéticos (exemplo ampicilina), via “rota verde”. Esta rota possui como atrativos o uso de substâncias mais baratas e pouco nocivas ao meio ambiente. Embora os rendimentos nesta rota ainda sejam menores que aqueles obtidos via rota química, grandes avanços vem sendo obtidos.

PGA pode ser produzida por leveduras, bolores e bactérias com diferentes pesos moleculares e afinidades pelos substratos. De todos os possíveis e conhecidos microrganismos produtores desta enzima o *Bacillus megaterium* é um dos poucos que a produz extracelularmente. Essa característica torna particularmente interessante o estudo do processo de produção desta enzima utilizando este microrganismo, pois do ponto de vista econômico os procedimentos de purificação tornam-se mais simples (SOUZA, 2003).

No Brasil, a produção de antibióticos é feita principalmente por empresas transnacionais que importam insumos. PGA é a segunda enzima mais imobilizada em todo mundo, atrás apenas da glicose isomerase, e o país não possui ainda tecnologia de produção, purificação ou imobilização da mesma (SOUZA, 2003).

Assim, estudos de processos envolvendo a produção de PGA são plenamente justificados, buscando independência tecnológica.

2.2 Penicilina G Acilase

Oficialmente a enzima penicilina G acilase (PGA) é conhecida como penicilina amido hidrolase, (E.C. 3.5.1.11), e tem sido empregada para obtenção do 6-APA e do ácido fenilacético (AFA) a partir de penicilina G (PG) empregando a enzima imobilizada por várias empresas no mundo (SAVIDGE, 1984). A Figura 2.1 apresenta uma ilustração da enzima PGA.

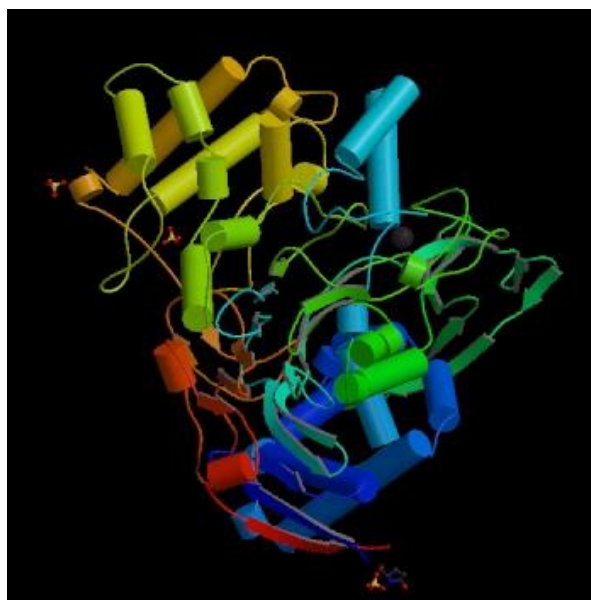


Figura 2.1: Ilustração em 3D da estrutura da PGA obtida por difração de raio-X
Fonte: RESEARCH... <<http://www.rcsb.org/pdb/>>, 15 maio 2005.

Segundo dados de Illanes et al. (1994), mais de 60% de 6-APA eram produzidos enzimaticamente correspondendo algo em torno de 5500 ton/ano em todo mundo.

PGA pode também ser utilizada na síntese de antibióticos semi-sintéticos β -lactâmicos através da denominada “rota verde” (VIEIRA, 2003).

Dentre os vários microrganismos capazes de produzir a PGA encontram-se o *Bacillus megaterium* e a *Escherichia coli*. A principal diferença entre eles está ligada ao fato de que o primeiro produz a enzima extracelular, enquanto o segundo, o faz intracelular, havendo a necessidade de romper as células para posterior obtenção da PGA. Encontram-se muitos artigos envolvendo *E. coli*, ao passo que para *B. megaterium* a literatura é mais escassa. Alia-se o fato de que muitas informações são mantidas em sigilo por grandes empresas (ILLANES et al., 1994).

A Tabela 2.1 mostra algumas empresas que utilizam a PGA obtida de diferentes microrganismos na forma imobilizada.

Tabela 2.1: Algumas empresas que utilizam PGA imobilizada e seus respectivos microrganismos produtores (SAVIDGE, 1984).		
Empresa	Microrganismo	Tipo de Enzima
BAYER	<i>Escherichia coli</i>	Intracelular
KYOWA HAKKO	<i>Kluyvera citrofila</i>	Intracelular
PFIZER	<i>Proteus rettgeri</i>	Intracelular
SQUIBB	<i>Bacillus megaterium</i>	Extracelular

A Figura 2.2 apresenta a equação da reação de hidrólise da PG catalisada pela enzima PGA obtendo o 6-APA e o AFA.

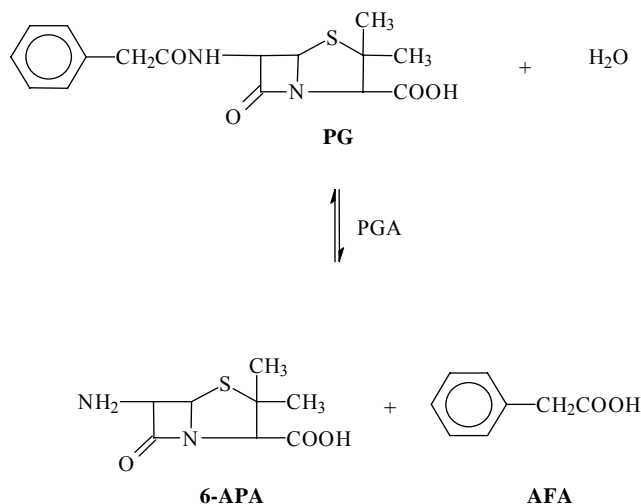


Figura 2.2: Hidrólise enzimática da PG (SILVA, 2003).

2.3 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium é um microrganismo aeróbio que se encontra em forma cilíndrica e unida em pequenas cadeias, proveniente do solo, podendo ser encontrado também em água marinha, alimentos desidratados, peixes, entre outros. Suas dimensões variam de acordo com o meio de cultura, mas em ágar nutriente, seu diâmetro é de aproximadamente 1,5 µm, ao passo que em meios com carboidratos possam assumir cerca de 3,0 µm. Seus esporos podem ser de formas ovalada de peras ou alongada (HOJO, 1997).

Murao et al. (1964) mostram que a temperatura ótima de crescimento do *B. megaterium* está entre 28° e 35°C, enquanto que em temperaturas que excedem 45°C não ocorre crescimento. O pH ótimo de cultivo está em torno de 7,0 a 8,5. Em pH menor ou igual a 5 não foi verificado crescimento do microrganismo. Ele pode produzir amônia e formar ácidos, ao passo que não gera gases em meios contendo amido, glicose, frutose, galactose, maltose e sacarose. Tem forte capacidade para reduzir nitrato a nitrito. Digere a caseína e se reproduz em meios sem fatores de crescimento, com apenas nitratos ou sais de amônio e glicose como fonte de carbono e nitrogênio.

B. megaterium é importante economicamente, pois é o maior produtor de vitamina B₁₂, além de poder produzir penicilinas acilase e amilase, antibióticos, entre outros produtos (VARY, 1994).

2.4 Penicilina G Acilase Produzida por *Bacillus megaterium*

Trabalhos clássicos relacionados com produção de PGA empregando *B. megaterium* foram realizados por Acevedo e Cooney (1973), Gentina et al. (1997), Illanes et al. (1994).

Os meios utilizados e as condições ótimas na produção de PGA diferem e dependem do microrganismo produtor. Industrialmente, o que se procura é o condicionamento do microrganismo de forma a aumentar a produtividade da enzima, de acordo com o meio e

condições de fermentação. A formulação correta do meio de cultura é fundamental para a obtenção de um rendimento maior, fazendo com que a composição dos meios de fermentações industriais não seja usualmente encontrada devido ao seu valor comercial (SILVA, 2003).

Usa-se a definição de unidade internacional de atividade (UI) para determinar qual é a quantidade de enzima necessária para converter 1 μmol de 6-APA a partir de benzil penicilina por minuto em tampão borato a pH 8,7 e 37°C (SAVIDGE e COLE, 1975).

Vários meios de cultura para produção de PGA via *B. megaterium*, são encontrados na literatura. Alguns autores propõem meios a base de caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) (SAVIDGE e COLE, 1975; CHIANG e BENNETT, 1967; HOJO, 1997). Outros utilizam meios complexos preparados a partir de solução de aminoácidos (aa) e/ou vários sais (ACEVEDO e COONEY, 1973; ILLANES et al., 1994; SOUZA, 2003).

Para a produção da enzima PGA, faz-se necessário o uso de um indutor, como o ácido fenilacético (AFA). Segundo Acevedo e Cooney (1973), este ácido estimula o crescimento e induz a produção quando presente em baixas concentrações, e inibe a síntese de enzima e o crescimento quando presente em altas concentrações.

Illanes et al. (1994) relatam o efeito da glicose na produção da enzima bem como a influência do AFA, tanto em meio complexo como em meio definido. Os resultados, em termos da produção de PGA e produtividade, sugerem meio complexo sem adição de glicose, que a priori reprime a síntese de enzima em meios complexos, mas não em meios definidos.

Empregando meio semelhante ao de Illanes et al. (1994), Gentina et al. (1997), verificaram o efeito de várias fontes de nitrogênio complexas na síntese e excreção de PGA por *B. megaterium*, tendo como melhor substrato a CHE, pelo fato de haver maior conteúdo de aa livres em comparação com as outras fontes utilizadas.

O primeiro trabalho, na linha de pesquisa de produção da PGA por *B. megaterium* no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, foi o de Hojo (1997). O autor estudou a influência da composição do meio de cultura na produção da enzima. O meio otimizado foi empregado em experimentos onde se constatou que a produção da enzima era dependente das condições operacionais, como concentração de oxigênio dissolvido, pH e adição de Ácido Fenil Acético (AFA), denominado indutor.

O uso do planejamento composto central foi utilizado para correlacionar a atividade enzimática com as variáveis estudadas. Através da análise canônica da superfície de resposta foi possível obter condições experimentais onde a atividade da enzima atingiu 250 UI/L de caldo. Este valor foi da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos por Illanes et al. (1994). Nestes experimentos, o oxigênio dissolvido foi controlado em 10 e 20% de saturação nas fases de crescimento e produção, respectivamente (HOJO, 1997).

O uso do soro de queijo como fonte de carbono para produzir PGA foi objeto de estudo de Berazaín (1997). O autor concluiu que o uso deste composto reduz o custo da produção de PGA, pois o mesmo é obtido em grandes quantidades como subproduto do processo de produção de queijos (atualmente com baixíssimo ou nenhum valor comercial). Embora novas aplicações venham sendo estudadas e propostas para este subproduto (na produção de bebidas lácteas, por exemplo) o volume a ser descartado ainda é muito grande. Nos estudos realizados por Berazaín (1997), o emprego do soro de queijo como matéria-prima no processo de produção de PGA proporcionou atingir uma produção de 180 UI/L de PGA.

Visnardi (1997) observou a influência de oxigênio dissolvido no processo de produção de PGA. Valores altos (acima de 40% do valor de saturação) e baixos (menores de 5%) de oxigênio dissolvido não favoreceram a produção de PGA. Em relação a esta variável o autor

conclui que deve existir um perfil ótimo a ser seguido durante o cultivo de forma a maximizar a produção.

Pinotti (1999) estudou a utilização de lactose e glicose como fontes de carbono e CHE como fonte de nitrogênio na produção da enzima PGA. Testou também a troca de glicose por soro de queijo no meio de produção. A autora verificou que a produção de PGA é dependente da fonte de nitrogênio e carbono, atingindo maiores concentrações de enzima (138 UI/L) quando se utilizou caseína hidrolisada com Alcalase[®] e soro de queijo como fontes de carbono e nitrogênio. Para produção da enzima, o soro de queijo fornece nutrientes que se mostram importantes.

Estudos sobre os requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium* na produção de PGA foram realizados por Souza (2003). Para otimizar os meios de cultivo, estudou-se a influência de diferentes concentrações de aminoácidos (aa) no meio de cultura em frascos agitados. Os resultados mostraram que nenhum dos aa, quando omitidos individualmente, era essencial ao crescimento e à produção da enzima. Além disso, concentrações iniciais acima de 10,0 g/L de aminoácidos inibiam sua síntese. Com o teste da influência dos diferentes componentes do soro de queijo na produção de PGA por *B. megaterium*, também em frascos agitados, verificou-se que a substituição do soro de queijo pelos aa livres que compõem suas proteínas, não favorece a síntese de enzima, mesmo que permita o crescimento celular. Em ensaios em biorreator de 5 L, em batelada alimentada com oito aa preferenciais (a solução completa continha dezoito aa), atingiu-se 263 UI/L de atividade enzimática. O estudo da influência do oxigênio dissolvido mostrou, em um experimento, que a redução de 20 para 5 % de saturação após 12 horas de cultivo, resultou em uma produção de enzima de 330 UI/L.

Silva (2003) realizou experimentos de produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em reator convencional, utilizando sistema de aquisição de dados, com monitoramento em tempo real de variáveis como fração molar de oxigênio e dióxido de

carbono nos gases de saída, pH e oxigênio dissolvido. A partir dos resultados experimentais foram propostos três modelos cinéticos não-estruturados do processo, utilizando um ou mais substrato(s) limitante(s). Devido à complexidade do processo, Silva (2003) utilizou também a técnica das redes neurais na modelagem do processo. Estudos envolvendo a identificação de estado e o tratamento de sinais utilizando redes neurais foram realizados. Nos experimentos em biorreator de bancada atingiu-se valores de atividade enzimática em torno de 200 UI/L.

Nucci (2003) estudou a influência do pH na produção da enzima e implementou um algoritmo baseado na teoria da lógica nebulosa, *Fuzzy*, com o objetivo de identificar em “tempo real” (*on-line*) o momento de máxima concentração da enzima durante os experimentos. Em biorreator de bancada (5 litros de volume útil) realizaram-se experimentos com aquisição de dados e controle do processo por controlador lógico programável e sistema supervisor. Os cultivos atingiram uma máxima concentração de 203 UI/L. Em experimentos em que não houve controle de pH, originaram melhores resultados, em comparação aos que tiveram controle, devido ao aumento na concentração da enzima.

2.5 Requerimento Nutricional do *Bacillus megaterium*

Os nutrientes são as substâncias químicas necessárias ao crescimento dos seres vivos. Eles estão divididos em duas frentes, de acordo com Souza (2003):

- Fins energéticos: transformação da fonte de carbono em CO₂ ou em outras substâncias;
- Fins biossintéticos: anabolismo resultando em biossíntese de novo material celular.

Além disso, os microrganismos precisam de uma série de elementos químicos, combinados ou não, que podem ser:

- Macronutrientes: C, H, O, N, P, S, K, Mg;
- Micronutrientes (traços metálicos): Co, Cu, Zn, Mo.

Os microrganismos requerem exigências nutricionais que são reveladas pela própria composição elementar da célula. Uma célula bacteriana é composta de 70% de água e 30% de matéria química, principalmente de proteína. Infelizmente, não se encontram dados para *B. megaterium*. Para *E. coli*, que através de modificação genética pode ser um microrganismo produtor de PGA, sua composição é C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn e traços de Zn, Co, Cu e Mo (MICROBIOLOGY, 2005).

2.6 Oxigênio Dissolvido e sua Importância

Segundo Souza (2003), medir a quantidade de oxigênio no meio de cultivo com *B. megaterium* é uma forma de avaliar o desempenho do biorreator, e também uma importante variável para a otimização do processo fermentativo.

Como o oxigênio é um gás parcialmente solúvel no meio de cultura, torna este componente um importante substrato em fermentações aeróbias, sendo muitas vezes denominado de substrato limitante.

Shuler e Kargi (1992) descrevem que o oxigênio é um importante fator de crescimento para os cultivos aeróbios.

Vojtisek e Slekek (1975) apud Shewale e Sivaraman (1989) relatam que altos valores da concentração de oxigênio no meio de cultivo com *E. coli* podem conduzir a um efeito repressivo na produção de PGA.

Vaz et al. (1978) apud Shewale e Sivaraman (1989) verificaram que manter o oxigênio dissolvido no processo em baixas concentrações, ou seja, em torno de 5% do valor de saturação, é um dos principais fatores que contribuem para a produção de PGA em larga escala.

2.7 Modelagem Matemática para o Crescimento Celular

Silva (2003) propõe três abordagens para modelar o processo de crescimento do *B. megaterium*, levando em conta a presença de um ou mais substrato(s) limitante(s).

Na primeira proposta, tomou-se o AFA como apenas um substrato limitante, acrescido à concentração de aminoácidos totais.

Na segunda proposta, os aminoácidos totais e o AFA foram separados, como dois substratos limitantes.

Por último, os aminoácidos mais rapidamente consumidos, os aminoácidos mais lentamente consumidos e o AFA foram três substratos limitantes.

Pela cinética de crescimento de Monod, para múltiplos substratos, na forma aditiva, foi proposto um crescimento celular e um consumo de substrato. Isso se deve ao fato do crescimento continuar mesmo quando o AFA ou algum grupo de aminoácidos se esgote, que não poderia ocorrer se a cinética multiplicativa fosse adotada as equações (2.1), (2.2) e (2.3):

$$\frac{dC_X}{dt} = \sum_{i=1}^{n^oS} \left(\frac{\mu_{\max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X \quad (\text{Eq. 2.1})$$

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_i}} \cdot \left(\frac{\mu_{\max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \sum_{i=1}^{n^oS} \left(\frac{\mu_{\max i} \cdot S_i}{K_i + S_i} \right) \cdot C_X \quad (\text{Eq. 2.3})$$

onde, C_X : concentração celular (g/L), S_i : concentração do substrato i (g/L), P : concentração de produto (UI/L), $\mu_{\max i}$: velocidade máxima específica de crescimento celular nos substratos (h^{-1}), K_i : constante de Monod do substrato i (g/L), Y_{X/S_i} : fator de rendimento celular em relação ao substrato i (g células/g substrato i), $Y_{X/P}$: fator de rendimento celular em relação ao produto (g células/g produto).

Embora os modelos propostos descrevessem qualitativamente o processo durante a fase de batelada, nos experimentos em batelada alimentada os modelos não foram capazes de descrever adequadamente o processo.

2.8 Redes Neurais Artificiais

2.8.1 Introdução

Redes neurais artificiais são modelos computacionais fundamentados na estrutura e no comportamento dos neurônios cerebrais (SILVA et al., 2000). Eles podem reconhecer padrões, base de dados e “aprender” comportamentos dinâmicos complexos de sistemas físicos. O significado de rede neural artificial (RNA) relaciona-se com pesquisas no campo da Inteligência Artificial, onde originou estudos para entender e modelar o comportamento do cérebro humano (SILVA, 2003).

Os primeiros estudos formativos de redes neurais datam da década de quarenta. Em artigo publicado por Warren S. McCulloch e Walter H. Pitts, 1943, sugeriam a construção de uma máquina baseada ou inspirada no cérebro humano, mostrando que um neurônio podia ser modelado por uma função degrau para realizar uma função lógica (LAU, 1990).

Em 1949, Donald Olding Hebb postulou a primeira regra de aprendizagem auto-organizada. Anos depois, em 1958, Frank Rosenblatt propôs o *perceptron* como primeiro modelo para aprendizagem supervisionada. Mais estudos e modelos decorreram-se com o passar dos anos, e no início dos anos setenta Paul J. Werbos desenvolveu o algoritmo *Backpropagation*, porém este foi ignorado por alguns anos (HAYKIN, 2002).

Tempos depois, na década de oitenta, as pesquisas receberam um forte impulso com a descrição e popularização deste algoritmo publicado em Rumelhart et al. (1986). Assim, esse algoritmo se tornou uma ferramenta muito importante para treinamento de redes com múltiplas camadas para desempenho de uma vasta aplicação em tarefas.

2.8.2 Redes Neurais e o Sistema Nervoso Humano

O cérebro humano pode ser considerado uma das mais avançadas máquinas de processamento, devido sua estrutura e capacidade de processamento e armazenamento de dados. Todas as funções e movimentos do corpo humano estão ligados a pequenas células, chamadas neurônios. Em cada ser humano existem aproximadamente 10 bilhões de neurônios (INTRODUÇÃO, 2005).

Neurônios estão ligados uns com os outros por meio de sinapses, formando uma extensa rede, chamada *rede neural*. As sinapses por sua vez, transmitem estímulos através de diferentes concentrações de Na^+ (sódio) e K^+ (potássio) por todo o corpo humano. Essas conexões geram uma fantástica rede com alta capacidade de processamento e armazenamento de informações e dados.

Os principais componentes dos neurônios são:

- Dendritos que tem por função receber os estímulos transmitidos pelos outros neurônios;
- Corpo de neurônio, também chamado de soma, responsável por coletar e combinar informações vindas de outros neurônios;
- E finalmente o axônio, que é constituído de uma fibra tubular que pode alcançar até alguns metros, e é responsável por transmitir os estímulos para outras células.

Pela Figura 2.3 pode-se verificar a estrutura de um neurônio.

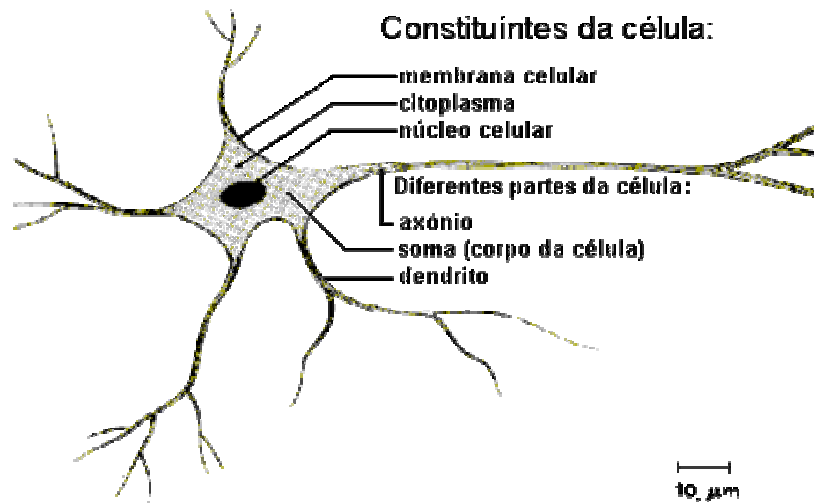


Figura 2.3: Representação de um neurônio humano
 Fonte: INTRODUÇÃO... <<http://www.din.uem.br/ia/neurais/>> 15 maio 2005.

Todo o sistema nervoso é formado por um conjunto complexo de neurônios. Neles a comunicação é realizada através de impulsos, quando recebido, o neurônio o processa, e passado um limite de ação, dispara um segundo impulso que produz uma substância neurotransmissora o qual flui do corpo celular para o axônio (que por sua vez pode ou não estar conectado a um dendrito de outra célula). O neurônio que transmite o pulso pode controlar a frequência de pulsos aumentando ou diminuindo a polaridade na membrana pós sináptica. Eles têm um papel essencial na determinação do funcionamento, comportamento e do raciocínio do ser humano.

Ao contrário das redes neurais artificiais, redes neurais naturais não transmitem sinais negativos, sua ativação é medida pela frequência com que emite pulsos, frequência esta composta por pulsos contínuos e positivos. As redes naturais não são uniformes como as redes artificiais, e apresentam uniformidade apenas em alguns pontos do organismo. Seus pulsos não são síncronos ou assíncronos, devido ao fato de não serem contínuos, o que a difere de redes artificiais.

2.8.3 Modelos de Redes Neurais

Estrutura e algoritmos de aprendizagem são as maneiras pelas quais se podem classificar uma Rede Neural Artificial (RNA). As conexões entre os neurônios e sua natureza determinam a estrutura da RNA. O ajuste dos pesos e o treinamento da RNA são realizados pelo algoritmo de aprendizagem (SILVA, 2003).

Quanto a estrutura, RNAs podem ser separadas em pelo menos dois tipos: redes *feedforward* e redes recorrentes. Em *feedforward* os neurônios são agrupados em camadas e seu fluxo de informações entre uma camada e outra é unidirecional, a partir da entrada, passando pela camada(s) oculta(s) e chegando a saída, sendo seus neurônios ligados entre as camadas e não dentro de uma mesma camada. Seu treinamento pode convergir mais rapidamente que em outras redes. Ao passo que em redes recorrentes as conexões permitem o fluxo de informação em ambos os sentidos para um mesmo par de unidades (SILVA, 2003).

A fase de treinamento precisa produzir uma RNA que tanto seja estável quanto convergente. Para isso, é necessário um grupo de dados padrões de entrada e saída conhecidos e seus respectivos ajustes dos parâmetros. Geralmente, para treinar a rede neural há necessidade de se ajustar os fatores pesos até que o padrão de saída possa ser reproduzido, sendo este calculado a partir da base de dados na entrada (BAUGHMAN e LIU, 1995).

Para o treinamento, existem dois tipos de aprendizagens: supervisionado ou não supervisionado. Quando os pesos são ajustados de acordo com a diferença entre a saída desejada com a obtida pela rede, esse tipo de algoritmo de aprendizagem é chamado de supervisionado. Esse algoritmo é o mais comumente encontrado na engenharia química, e utilizado neste trabalho, é o algoritmo *backpropagation* ou retropropagação. Já o algoritmo não supervisionado não necessita de saída desejada conhecida, onde a própria RNA realiza automaticamente um mapa com dados de entrada apresentados para prever o conjunto de

saída. Essas redes possuem mais aplicações em tarefas de classificação e agrupamento de dados.

2.8.4 Perceptron Múltiplas Camadas e *Backpropagation*

Segundo Haykin (2002), um *perceptron* é a forma mais simples de uma rede neural usada para a classificação de padrões. De forma simples, ele está composto de um único neurônio com pesos ajustáveis.

Tradicionalmente, a rede é composta de um conjunto de unidades sensoriais dividida em camada de entrada, uma ou mais camadas ocultas e uma camada de saída. As redes neurais que recebem o sinal de entrada propagando-se para frente através da rede, camada por camada, são chamadas de *multilayer perceptron* (MLP) ou perceptrons de múltiplas camadas (PMC). A informação segue um fluxo unidirecional, onde a camada de entrada tem um papel importante de distribuição destes dados (HAYKIN, 2002).

Os PMC têm sido aplicados para resolver diversos problemas complicados, especialmente em engenharia, mostrando-se muito eficientes, através do seu treinamento de forma supervisionada com um algoritmo de atualização de pesos muito popularmente conhecido como *error backpropagation* ou retropropagação do erro (BAUGHMAN e LIU, 1995). Na literatura é muito comum encontrar o termo algoritmo de retropropagação e seu processo de aprendizagem é conhecido como aprendizagem por retropropagação.

Em redes mais simples, utiliza-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e, para as mais robustas, o da retropropagação. Ambos são algoritmos de otimização de mesmas características que buscam reduzir a minimização dos erros entre valores calculados com os desejados (SILVA, 2003).

Durante o treinamento, a RNA processa os padrões de conjunto de dados de entrada na seguinte forma: primeiramente aplica-se um padrão de entrada a rede e permite-se que sua

atividade passe diretamente para camada de saída, também chamado de passo para frente. Como inicialmente esse resultado é errado, então a rede compara este padrão com um desejado para aqueles dados, resultando em um erro para cada neurônio na camada de saída. O somatório do erro (δ) é retropropagado, fazendo o chamado passo de retropropagação, determinando a mudança dos pesos anteriormente utilizados (CAUDIL, 1991).

O cálculo do δ para cada neurônio do PMC requer o conhecimento da função de ativação associada aquele neurônio. A mais comum utilizada para realizar o ajuste dos δ da rede é a Soma dos Quadrados dos Erros, porém a mais amplamente utilizada é a função sigmoideal, representada na equação (2.4):

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

2.8.5 Modelagem Híbrida

Dois tipos de abordagens podem ser empregados neste tipo de modelagem chamados de *black box* ou caixa-preta e *gray box* ou caixa-cinza.

Na abordagem caixa-preta, o desenvolvimento deste modelo está relacionado com observações do comportamento de seus dados de entrada e saída, sem importar sua preocupação fenomenológica. Este método é vantajoso quando nenhum conhecimento do processo está disponível. Sua vantagem está relacionada com a geração de um modelo matemático de um sistema sem o conhecimento dos fenômenos que estão acontecendo no processo. Quando se utiliza esse processo, fica inviável realizar extrapolações. Encontram-se na literatura alguns trabalhos relacionados: Psychogios e Ungar (1992), Van Can et al. (1997), Silva et al. (2000).

Já na abordagem caixa-cinza, também denominada modelagem híbrida, objeto de estudo deste trabalho, há combinação de equações de conservação que trazem certo conhecimento do processo a ser modelado, com uma ou mais redes neurais, ajudando como

estimadoras de parâmetros ou variáveis não conhecidas. Para este caso, a rede pode ser treinada para prever parâmetros do modelo fenomenológico ou substituir equações deste, por exemplo, velocidade de reação, taxa de crescimento celular, entre outras. Alguns trabalhos podem ser encontrados neste enfoque como Azevedo et al. (1997), Galvanauskas et al. (2004), Komives e Parker (2003), Psychogios e Ungar (1992), Silva et al. (2000), Thompson e Kramer (1994), Van Can et al. (1997).

2.8.6 Redes de Inferência da Concentração Celular

Em Silva (2003) encontram-se estudos sobre inferência da concentração celular de *Bacillus megaterium* durante o cultivo para a produção de PGA. Em sua tese de doutorado Silva utilizou uma única rede neural *feedforward* com algoritmo de Levenberg-Marquardt realizado em Matlab® 5.2, para inferência da concentração celular.

Foram utilizados, inicialmente, dados ruidosos para treinamento da rede, tendo como variáveis de entrada tempo, YCO_2 e velocidade de agitação em tempos atuais, e, posteriormente, dados filtrados. Para a filtragem dos dados na entrada, foi utilizado filtro média móvel, o qual encontra-se descrito em Silva (2003).

A partir da análise de erro quadrado médio pelo número de neurônios, constatou-se que os menores erros na etapa de validação foram obtidos quando se utilizou 10 neurônios na camada oculta (nco).

Os resultados de treinamento e validação obtidos por Silva (2003) com 10 neurônios na camada oculta (nco) são apresentados nas Figuras 2.4 e 2.5, respectivamente. A rede aprendeu bem a dinâmica do processo na etapa de treinamento na fase de crescimento exponencial. No início da fase estacionária a rede não consegue inferir quantitativamente a concentração celular. Após certo tempo, esta volta a inferir de maneira razoável o valor da concentração celular.

Pela Figura 2.4, nota-se que a rede inferiu razoavelmente até o término da fase exponencial, descolando um pouco no final.

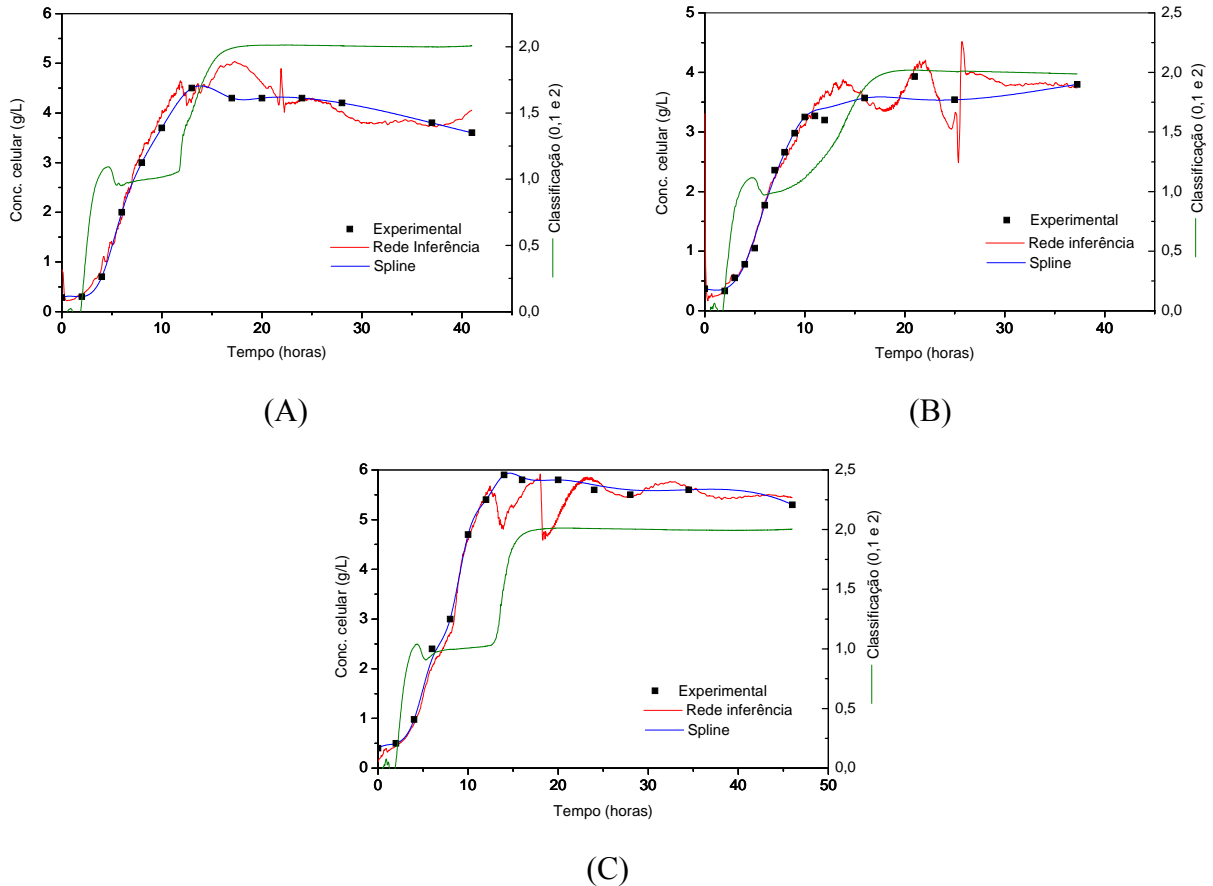


Figura 2.4: Resultado do treinamento para a rede de inferência com dados filtrados. (A) ensaio I, (B) ensaio II e (C) ensaio III (SILVA, 2003).

Não é de se estranhar à dificuldade da rede em inferir a concentração celular ao final do cultivo. Quando a rede de identificação de fases indicar o fim do crescimento exponencial, qualquer processo industrial deve ser interrompido. Desta forma, é plenamente satisfatório que a rede seja precisa na inferência apenas até o final do crescimento, como é o caso apresentado.

Uma vez que não é preciso uma rede de inferência de concentração celular ao longo de todo cultivo, resolveu-se utilizar somente a fase de crescimento (obtida a partir da rede de identificação de fases) para o treinamento e validação da rede. Na validação há algum desvio

sistemático, principalmente no final da fase exponencial, mas, de forma geral, a inferência mostra-se de boa qualidade. Os resultados da validação são mostrados na Figura 2.5.

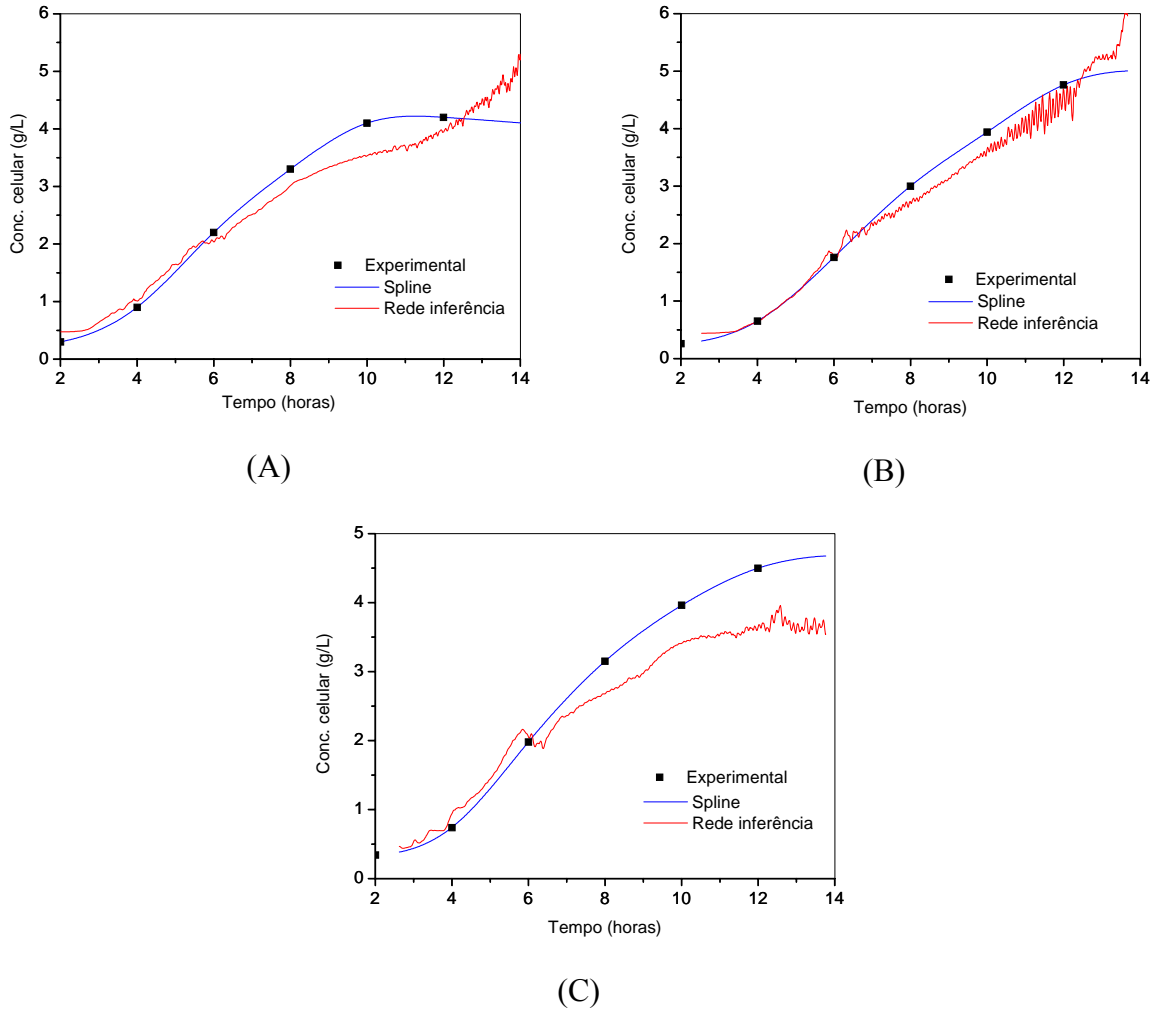


Figura 2.5: Resultado da validação para a rede de inferência da fase exponencial. (A) ensaio IV, (B) ensaio V e (C) ensaio VI (SILVA, 2003).

3 Materiais, Equipamentos e Métodos

Este item apresenta os principais materiais e métodos utilizados durante a execução da parte experimental desta dissertação.

3.1 Materiais e Equipamentos

3.1.1 Microrganismo e Outros Materiais Experimentais

O microrganismo utilizado para a produção de PGA foi o *Bacillus megaterium* ATCC 14945, cedido pela Fundação Tropical de Campinas, SP, com suspensão de esporos contendo aproximadamente 10^8 esporos/mL e mantida em criotubos com glicerol 20% a -50°C .

Soro de queijo (Sigma), ácido fenilacético (Carlo Erba), aminoácidos (Ajinomoto), fenil acetato de potássio (Prodotti), e Penicilina G (Paraquímica) são alguns materiais experimentais utilizados, uma vez que os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

3.1.2 Equipamentos

Vários equipamentos de uso geral em um laboratório bioquímico foram utilizados durante a realização deste trabalho. São eles:

- **Câmara Asséptica**

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

- **Autoclaves**

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

demais utensílios de usos diversos envolvidos na realização dos ensaios). As autoclaves são da marca Fabbe Primar Industrial (São Paulo, SP, Brasil), e todo material foi esterilizado a 120 °C por 15 minutos.

- **Câmara Incubadora Rotativa Climatizada (*Shaker*)**

As etapas de crescimento do microrganismo (germinação e inóculo) foram realizadas em frascos agitados (erlenmeyers) em câmara incubadora rotativa climatizada (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, EUA).

- **Centrífuga Refrigerada**

Para separar as células do sobrenadante nas amostras coletadas durante os ensaios, como parte do procedimento para determinação da atividade celular e massa seca, foi utilizada a centrífuga refrigerada da marca Eppendorf (modelo 5403, Netherler-Hinz GMBH-Hamburg), com capacidade para seis tubos.

- **Estufas**

Para secagem de vidrarias utilizou-se estufa da marca Fanem (São Paulo, SP, Brasil) a 60°C. Para esterilização de alguns utensílios foi utilizada estufa de circulação mecânica também da marca Fanem a 100°C.

- **Reator Tipo Tanque Agitado e Aerado (*Biorreator*)**

Para fermentações em escala de laboratório foi utilizado um reator tipo tanque agitado e aerado da marca Bioflo II-C, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, EUA com capacidade para 5 litros (acoplado a um sistema de aquisição de dados e analisador de gases de saída, CO₂ e O₂).

- **Outros Equipamentos**

- Balança Analítica marca Mettler modelo PB 3002
- Balança de precisão marca Kern modelo 410
- Ultrafreezer marca Forma Scientific
- pHmetro marca Orion modelo 420 A
- Espectrofotômetro marca Pharmacia Biotech modelo Ultraspec 2000
- Banho termostático marca Brookfield modelo EX – 200
- Banho termostático marca Neslab modelo RTE – 111
- Bomba de vácuo marca Fabbe modelo 341
- Reator de vidro com camisa de água
- Agitador mecânico marca Fisatom modelo 710
- Vidrarias em geral

3.2 Meios de Cultivo

A enzima PGA foi produzida em *shaker* e em *biorreator*, seguindo-se os procedimentos e composições de meios:

3.2.1 Meio de Esporulação

A composição do meio sólido para o cultivo e preservação da linhagem em tubos inclinados ("slants") e frascos de Roux é descrita na Tabela 3.1. O microrganismo foi repicado dentro de tubos de ensaio, deixados em câmara rotativa por sete dias a 30°C, sendo retirado do tubo por meio de uma solução salina 0,9% p/v e transferido para o frasco de produção do inóculo. Uma outra forma de armazenamento do microrganismo foi em criotubos (esporos mantidos em solução de glicerol 20%) estocados em ultrafreezer a –50°C.

Tabela 3.1: Composição do meio sólido empregado para preservação e manutenção do <i>B. megaterium</i> (SOUZA, 2003).	
Nutriente	Concentração (g/L)
Agar	20,0
Extrato de carne	3,0
Glicose	1,5
Peptona	5,0

3.2.2 Procedimento Experimental para Germinação e Inóculo

O meio de germinação e inóculo foram incubados em *shaker* por 24 horas, a 300 rpm e 30 °C (frascos de Erlenmeyer de 500 mL). O inóculo representa 10% do volume total do meio de fermentação para produção de enzima.

Nos ensaios 01 a 06 foi utilizado meio contendo solução de 18 aminoácidos livres com concentração de 10 g/L, soro de queijo a 19,6 g/L e sais minerais a 0,5 g/L.

E nos ensaios 07 a 13 foi utilizado meio composto por solução de 7 aminoácidos preferenciais com concentração de 10 g/L, soro de queijo a 19,6 g/L e sais minerais a 0,5 g/L, uma vez que, estudos realizados por Silva (2003) e Souza (2003), podem-se verificar em experimentos anteriores que estes compostos eram os mais rapidamente consumidos, mostrando que *Bacillus megaterium* possuía certa “afinidade” a estes aminoácidos enfocados neste conjunto de cultivos.

As Tabelas 3.2 e 3.3 mostram as composições dos meios compostos por aminoácidos livres e aminoácidos preferenciais, respectivamente.

Tabela 3.2: Solução contendo aminoácidos livres.			
Aminoácido	Símbolo	Peso Molecular	Concentração (g/L)
Alanina	Ala	89,09	0,29
Arginina	Arg	174,20	0,41
Ácido aspártico	Asp	133,1	0,68
Cistina	Cst	240,3	0,03
Ácido glutâmico	Glu	147,13	1,17
Glicina	Gly	75,07	0,11
Histidina HCl	His	191,7	0,25
Leucina	Leu	131,2	1,05
Isoleucina	Ile	131,2	0,52

Lisina HCl	Lys	182,6	0,76
DL-metionina	Met	149,21	0,62
Fenilalanina	Phe	165,2	0,61
Prolina	Pro	115,13	1,07
Serina	Ser	105,1	0,62
Treonina	Thr	119,1	0,48
Tirosina	Tyr	181,19	0,49
Triptofano	Trp	204,2	0,15
Valina	Val	117,1	0,69

Tabela 3.3: Solução contendo aminoácidos preferenciais.			
Aminoácido	Símbolo	Peso Molecular	Concentração (g/L)
Alanina	Ala	89,09	0,72
Arginina	Arg	174,20	0,95
Ácido aspártico	Asp	133,1	2,31
Ácido glutâmico	Glu	147,13	3,98
Lisina HCl	Lys	182,6	0,95
Serina	Ser	105,1	0,81
Treonina	Thr	119,1	0,28

3.2.3 Produção da Enzima em *Shaker* e *Biorreator*

A produção da enzima em *shaker* foi realizada em meio de cultura com a adição do inóculo e mantido por pelo menos 24 horas a 300 rpm e 30°C, em paralelo com biorreator.

As Tabelas 3.4 e 3.5 mostram a composição e concentrações dos meios utilizados chamados de aa^{total} e aa^{pref} , respectivamente, nas etapas de reações.

Tabela 3.4: Composição dos meios de produção em <i>shaker</i> e <i>biorreator</i> (aa^{total}).	
Nutriente	Concentração (g/L)
Solução de aminoácidos livres (Vide Tabela 3.2)	10,0
Soro de queijo	19,6
Solução de sais	0,5
Ácido fenilacético – AFA	2,7

Tabela 3.5: Composição dos meios de produção em <i>shaker</i> e <i>biorreator</i> (aa^{pref}).	
Nutriente	Concentração (g/L)
Solução de aminoácidos preferenciais (Ver tabela 3.3)	10,0
Soro de queijo	19,6
Solução de sais	0,5
Fenil acetato de potássio – FAK	3,45

3.2.4 Produção da Enzima em *Biorreator* Agitado e Aerado

Os procedimentos utilizados até a obtenção do inóculo são os mesmos descritos para os ensaios em câmara rotativa. Após esterilização do reator, o meio de produção foi adicionado ao seu interior, utilizando-se 10% em volume de inóculo por volume de meio de produção. A concentração de oxigênio dissolvido, a vazão de ar e a agitação variaram entre um ensaio e outro. A temperatura foi controlada a 30°C, a aeração mantida em 2,0 L/min (21 °C e 1 atm) e o *biorreator* operado por um período de 24h, aproximadamente. A composição do meio foi a mesma para a produção em *shaker* e está descrita na Tabela 3.4.

A Figura 3.1 apresenta esquema ilustrativo do procedimento experimental de produção de PGA por *B. megaterium*.

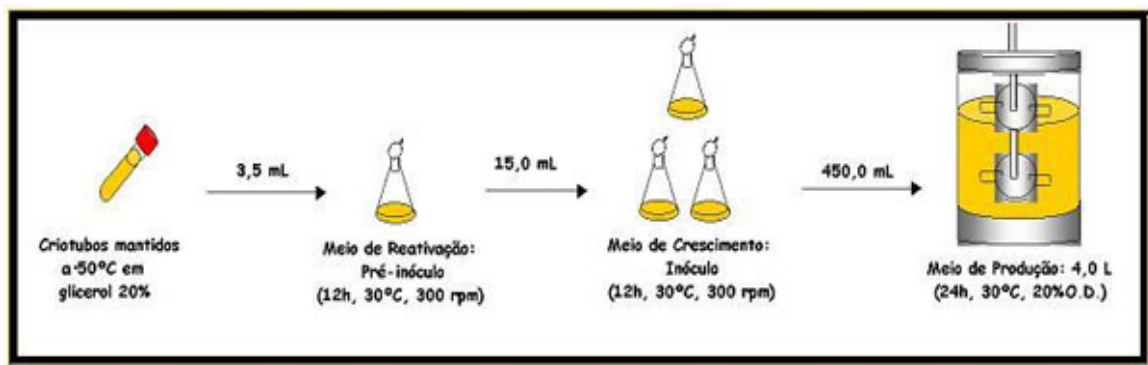


Figura 3.1: Procedimento experimental de produção de PGA por *B. megaterium* (SOUZA, 2003).

3.3 Análise das Amostras para Acompanhamento da Produção

A análise das amostras para acompanhamento da produção iniciou-se pela separação do microrganismo do meio de cultura. A separação foi realizada por centrifugação ou filtração. A centrifugação procedeu-se a 4°C a 11000·rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para análises das atividades enzimáticas.

3.3.1 Análise da Concentração Celular

Para os experimentos de 1 a 6, a análise da concentração celular foi feita pela pesagem da massa seca. Antes de fazer a filtração ou centrifugação, o tubo de centrífuga ou a membrana do filtro foram previamente secos a 60°C por 24h, colocados em dessecador e posteriormente pesados. Filtrou-se ou centrifugou-se uma alíquota de 10 mL da amostra. Após filtração ou centrifugação o sobrenadante era utilizado para análises e as membranas ou tubos eram novamente secos a 60°C por 24h e pesados. Pela diferença de massa determinou-se a concentração celular. Nos meios com presença de CaCO₃ retirou-se o carbonato de cálcio lavando-se o filtro ou o tubo de ensaio contendo as células, já sem o meio de cultura, com um volume de 20 mL de solução de ácido acético 5%.

Quanto aos outros experimentos, a análise da concentração celular (C_x) foi realizada empregando método espectrofotométrico ($\lambda = 600$ nm, amostra diluída 20 vezes em solução salina 0,8%). A equação (3.1) apresenta a curva de calibração empregada:

$$C_x (g / L) = 0,3 \cdot Abs_{600} \cdot (diluição) \quad (\text{Eq. 3.1})$$

3.3.2 Determinação da Concentração da Enzima (Atividade Enzimática)

3.3.2.1 Método Espectrofotométrico PDAB

Este método determina a concentração da enzima (C_p) ou atividade enzimática da penicilina G acilase utilizando p-dimetilaminobenzaldeído (PDAB). O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G que reage com o PDAB, gerando um produto colorido que foi acompanhado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. A leitura relaciona-se à concentração de 6-APA por meio de uma curva de calibração obtida com soluções padrões de 6-APA na faixa de 200-1000 µg/ml (BALASINGHAM et al., 1972).

Procedimento: Em um reator aquecido por meio de uma camisa de água, ajustado para 37°C, coloca-se 4 ml de PG 5% (p/v) em tampão fosfato 20mM pH 8,0 e espera-se estabilizar a temperatura, após a adição de 2 ml da solução de enzima sob agitação. Tomam-se alíquotas em diferentes tempos de reação, colocadas em cubetas preparadas com reagente PDAB (mistura de 0,5 ml de PDAB 0,5% (p/v) em metanol, 2,0 ml de ácido acético 20% (v/v) e 1,0 ml de solução de hidróxido de sódio 0,05M) deixando-se reagir por 2,5 minutos.

Pelas alíquotas obtidas em diferentes tempos como descrito acima, estes foram dispostos em um gráfico e realizou-se um ajuste linear dos pontos obtidos. A partir da tangente desta reta, calculou-se a atividade enzimática em UI/L.

3.3.3 Preparo dos Criotubos

Dentre os métodos mais usuais de preservação de microrganismo, o de congelamento a baixas temperaturas torna-se mais vantajoso em relação aos demais, por preservar a cultura por longos períodos. O preparo dos criotubos com *Bacillus megaterium* ATCC 14945 passa por várias etapas descritas a seguir (Figura 3.2):

- primeiro a linhagem é repicada em tubos inclinados com meio sólido, mantidos por sete dias a 30°C.
- após este período, os esporos são suspensos em 5ml de solução salina 0,9% e repassados aos frascos de Roux, previamente preparados com meio sólido de esporulação, mantidos por sete dias a 30°C.
- decorrido os sete dias, é adicionada aos frascos contendo o meio esporulado uma solução crioprotetora estéril (glicerol 20% v/v), precedida de uma vigorosa agitação e raspagem dos esporos.
- as suspensões de esporos de todos os frascos são transferidas para um erlenmeyer previamente esterilizado.

- Retira-se uma alíquota para contagem dos esporos em câmara de Neubauer e finalmente utilizar-se-á os criotubos para acondicionar os volumes de suspensão de esporos referentes à concentração desejada.
- Os criotubos são armazenados em ultrafreezer a -50°C .

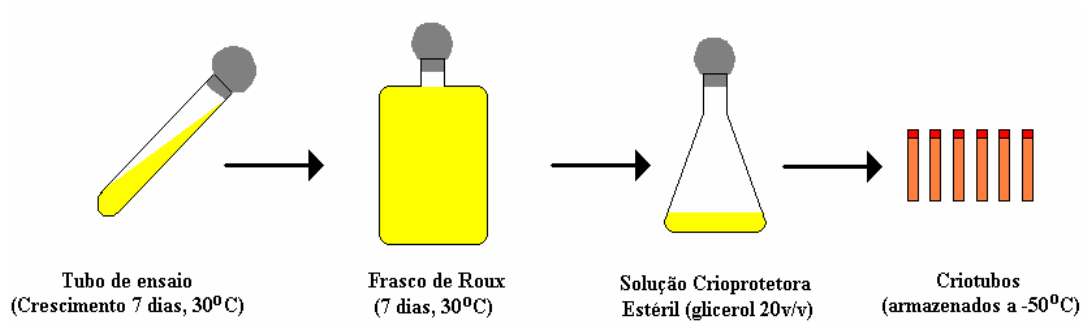


Figura 3.2: Preparo dos criotubos com *Bacillus megaterium* (SILVA, 2003).

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

O sistema de aquisição de dados implementado no Laboratório de Fermentações do DEQ – UFSCar é composto por um Controlador Lógico Programável (CLP – GE Fanuc, série 90-30), Sistema Supervisório (InduSoft, versão 3.0) operado em microcomputador tipo PC. O CLP tem suas entradas e saídas conectadas ao *biorreator* tipo tanque agitado e aerado (Bioflo II-C, News Brunswick Scientific Co., Inc., Edson, NJ, EUA). O *biorreator* convencional é utilizado nos experimentos em batelada e batelada alimentada. A comunicação entre o CLP e o Sistema Supervisório é realizada via protocolo TCP/IP. Um esquema do aparato experimental juntamente com o sistema de aquisição de dados é apresentado na Figura 3.3. Toda a instrumentação foi baseada nas normas da "American National Standard".

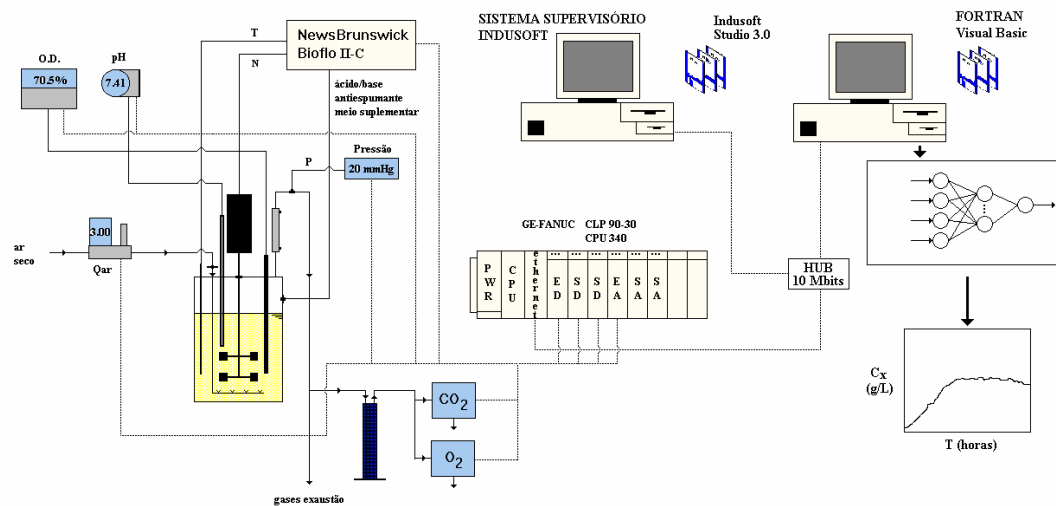


Figura 3.3: Esquema do aparato experimental ilustrando equipamentos (SILVA, 2003).

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

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

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

Os seguintes equipamentos fazem parte da instrumentação utilizada no biorreator:

- Eletrodo de pH, tipo 465-90 (Mettler Toledo, NJ, EUA) conectado ao Medidor e Transmissor de pH, modelo TH-41 (Digimed);
- Eletrodo de oxigênio dissolvido, tipo 12/320T (Mettler Toledo) conectado ao Medidor e Transmissor de Oxigênio Dissolvido, O₂ 4500 (Mettler Toledo);

- Bombas peristálticas BVP (Ismatec, Zürich, Suíça) para adição de meio suplementar, ácido e/ou base;
- Fluxômetro de massa, modelo 33116-20, 0 a 5 L/min (21°C, 1 atm), Cole Parmer® (Venon Hills) para monitoração da vazão de ar no sistema;
- Transdutor de pressão (modelo 560, T&S Equipamentos) para monitorar a sobrepressão no interior do biorreator;
- Sensor de temperatura (Pt-100), inserido em um poço dentro do reator;
- Analisadores de oxigênio (modelo 755, Rosemount Analytical) e dióxido de carbono (modelo 880A, Rosemount Analytical) acoplados para análise dos gases de saída do biorreator. Os analisadores são calibrados com gases padrões (N₂ 99,99% e CO₂ 5,0%/95%N₂).

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

3.4.1 Descrição do Sistema de Controle de Oxigênio Dissolvido

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

3.4.2 Descrição do Sistema de Controle de pH

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

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

3.4.3 Descrição do Sistema de Controle de Temperatura

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

3.4.4 Descrição do Sistema de Controle de Formação de Espuma

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

3.4.5 Descrição do Sistema de Controle de Vazão do Meio Suplementar

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

3.4.6 Medidor de Vazão

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

3.4.7 Analisador dos Gases de Saída

- **Dióxido de Carbono (CO₂)**

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

- **Oxigênio (O₂)**

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

3.4.8 O Controlador Lógico Programável (CLP)

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

3.4.8.1 O Sistema Supervisório

O sistema supervisório é formado por um microcomputador com processador K6-2 de 450 Mhz, 128 MB RAM e por "software" de supervisão da InduSoft.

O InduSoft é um "software" para desenvolvimento de interfaces homem-máquina, estações de supervisão local de processos industriais e estações de concentradoras de dados em processos distribuídos. É baseado em um microcomputador interligado a um processo ou máquina através de um controlador lógico programável (CLP) ou outro sistema de aquisição de dados. A interface gráfica do sistema e a utilização de planilhas para configuração geram um ambiente simples e de rápida assimilação. Abaixo seguem as características do sistema:

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

O sistema InduSoft é voltado para aplicações em *Supervisão e Controle de Processos*, onde se utiliza uma arquitetura distribuída baseada em CLP's e microcomputadores e flexível para conexão com qualquer tipo de CLP, fazendo com que o microcomputador seja utilizado como estação de supervisão local do processo. Cruz (2000) usou este sistema para a produção de cefalosporina, executando as funções de monitoramento do sistema, controle de situações de alarme, geração de gráficos e histórico das variáveis de processo e interface para a entrada de comandos do operador.

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise dos Dados Experimentais

Foram realizados dois conjuntos de experimentos em biorreator. A composição dos meios utilizados, chamados de **aa^{total}** e **aa^{pref}**, encontra-se descrita na Tabela 3.4 (Item 3.2.3). Os experimentos foram realizados em diferentes condições operacionais, as quais estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições experimentais comuns mantidas nos ensaios realizados.		
Ensaios em batelada (1, 3, 4, 7 a 13)		
Aeração, L/min (21°C e 1 atm)	2,0	
Temperatura (°C)	30	
Volume (L)	4,0 de meio e 0,5 de inóculo	
Ensaios em batelada alimentada (2, 5 e 6)		
Aeração, L/min (21°C e 1 atm)	2,0	
Temperatura (°C)	30	
Volume inicial (L)	3,5 (ensaio 6) 4,0 (ensaios 2 e 5)	0,5 de inóculo
Início da suplementação e Meio suplementar	Ensaio 2	5 h de cultivo Suplementação: aa 1,76 mL/min (10 g/L)
	Ensaio 5	5h de cultivo aa (10g/L)e soro de queijo
	Ensaio 6	5h de cultivo aa. total (40g/L) + AFA e soro de queijo

Com o meio **aa^{total}** (solução de aminoácidos livres + soro de queijo + solução de sais + AFA) foram realizados seis ensaios em biorreator (denominados ensaios 1 a 6). Empregando o meio **aa^{pref}** (solução de aminoácidos preferenciais + soro de queijo + solução de sais + FAK) foram realizados sete ensaios (denominados ensaios 7 a 13).

Na Tabela 4.2 encontram-se as condições experimentais relativas a cada experimento realizado em biorreator. Ressalta-se que no ensaio 6 foi utilizada concentração de aminoácidos (aa) quatro vezes maior que nos demais ensaios, 40 g/L, o que resultou em um crescimento celular elevado e uma baixa atividade enzimática, quando comparado aos demais experimentos (vide Figuras 4.1 e 4.3, respectivamente).

Tabela 4.2: Condições experimentais adotadas nos ensaios realizados em biorreator.

Ensaio	Meio de Cultura	Duração (horas)	Condições operacionais
1	aa ^{total}	37	Batelada; controle de OD em 20%
2	aa ^{total}	38	Batelada alimentada; controle de OD em 20%
3	aa ^{total}	44	Batelada; controle de OD em 20% e pH em 8,0
4	aa ^{total}	43	Batelada; controle de OD em 20%
5	aa ^{total}	40	Batelada alimentada; controle de OD em 15%
6	aa ^{total}	30	Batelada alimentada; controle de OD em 20%
7	aa ^{pref}	24	Batelada; controle de OD em 20%
8	aa ^{pref}	22	Batelada; controle de agitação em 350 rpm
9	aa ^{pref}	20	Batelada; controle de agitação em 300 rpm
10	aa ^{pref}	24	Batelada; controle de agitação em 300 rpm
11	aa ^{pref}	24	Batelada; controle de agitação em 300 rpm
12	aa ^{pref}	33	Batelada; controle de OD em 10%
13	aa ^{pref}	24	Batelada; controle de OD em 15%

Para efeito comparativo, paralelamente a todos os ensaios realizados em biorreator foram conduzidos ensaios em *shaker*. A Tabela 4.3 mostra os dados obtidos nestes experimentos.

Tabela 4.3: Resultados obtidos em *shaker* durante a realização dos ensaios de 1 a 13 em biorreator.

Ensaio	Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	Atividade Enzimática (UI/L)
1	0	0,4	-
	10	2,6	42
	24	3,5	171
	37	4,0	179
2	24	4,3	188
	38	4,1	210
3	0	0,2	-
	24	3,3	193
	36	3,2	201
4	0	0,2	-
	20	3,7	121
	43	4,6	150
5	0	0,28	-
	24	3,37	90
	40	3,6	115
6	0	0,4	-
	24	4,41	52
7	0	0,4	-
	22	3,9	150
8	0	0,3	-
	24	3,3	139

9	0	0,33	-
	12	1,7	55
	24	2,7	147
10	0	0,5	-
	12	2,5	97
	24	3,5	171
11	0	0,6	-
	12	3,0	96
	24	4,7	200
12	0	0,46	-
	12	2,5	187
	24	3,2	371
13	0	0,5	-
	12	2,4	183
	24	2,9	285
	36	2,8	283

Para facilitar a apresentação e análise dos experimentos, estes serão apresentados em dois grupos: experimentos de 1 a 6 (empregaram solução de aminoácidos totais + AFA, aa^{total}) e experimentos de 7 a 13 (empregaram solução de aminoácidos preferenciais + FAK, aa^{pref}). A Figura 4.1 apresenta as concentrações celulares dos ensaios de 1 a 6.

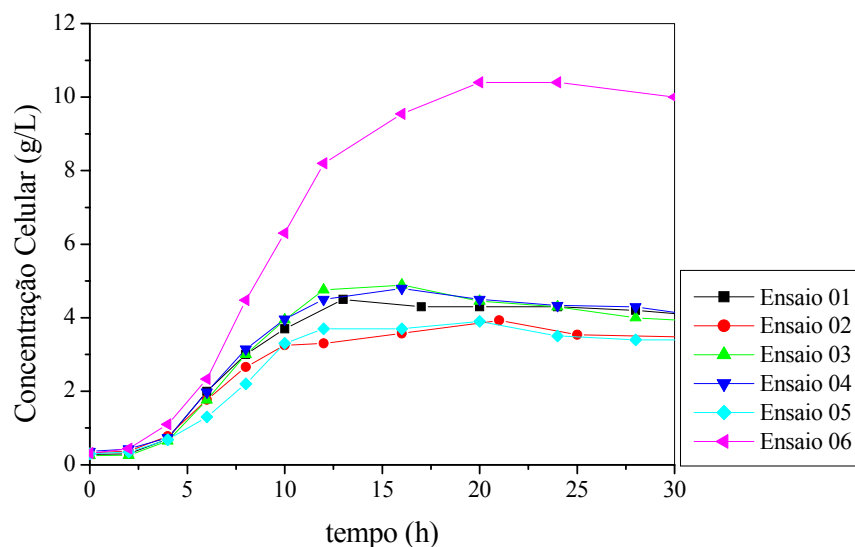


Figura 4.1: Valores experimentais da concentração celular dos cultivos 1 a 6.

Observando a Figura 4.1, verifica-se que no experimento 6 a concentração celular obtida foi cerca de duas vezes maior que a média dos demais experimentos. Este fato é

atribuído à maior concentração de aminoácidos do meio suplementar empregado neste experimento (40 g/L). O experimento 5 apresenta uma velocidade de crescimento celular um pouco menor que os demais experimentos, fato que é explicado pela condição operacional utilizada neste experimento: controle do oxigênio dissolvido em 15% da saturação; os demais foram controlados em 20% da saturação.

A Figura 4.2 apresenta os gráficos da concentração de enzima obtida nos experimentos de 1 a 6.

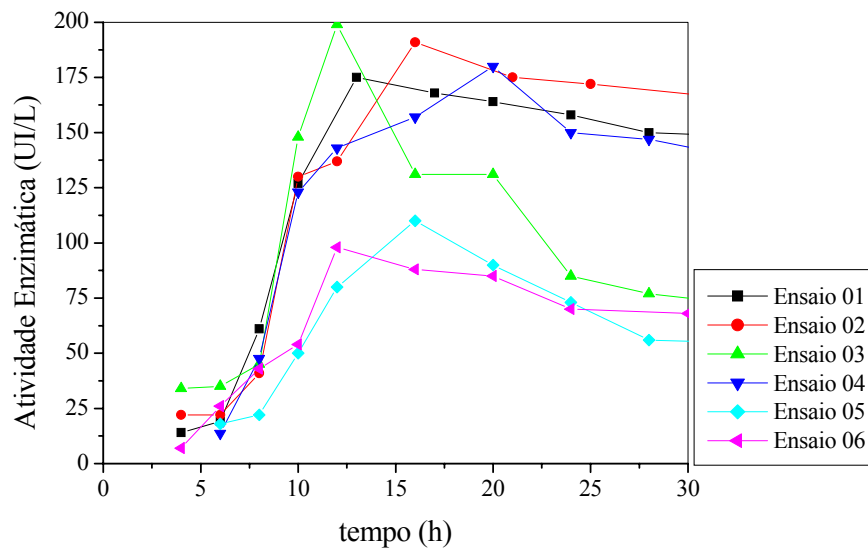


Figura 4.2: Valores experimentais da atividade enzimática dos cultivos 1 a 6.

Comparando os valores das concentrações de enzima obtidas nos experimentos 1 a 6, Figura 4.2, nota-se que os menores valores foram obtidos nos ensaios 5 (atribuído a problemas na linhagem durante a etapa de preparo de inóculo) e 6 (atribuído a alta concentração de substrato empregado). A diminuição da concentração de enzima após 12 horas no experimento 3 é atribuída ao controle de pH utilizado neste experimento. A adição de solução de HCl 5M para manter o pH em 8,0 pode ter sido responsável pela desnaturação da enzima no meio reacional. Nos experimentos 1, 2 e 4 a concentração de PGA alcançou valores da ordem de 170 UI/L.

As Figuras 4.3 e 4.4 ilustram, respectivamente, as concentrações de oxigênio dissolvido e frações molares de dióxido de carbono dos experimentos 1 a 6.

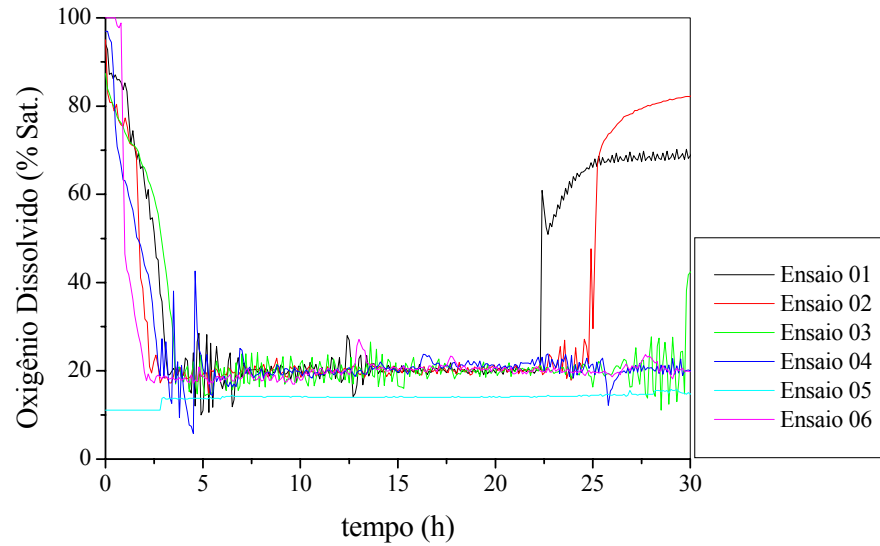


Figura 4.3: Concentração de oxigênio dissolvido para os ensaios de 1 a 6.

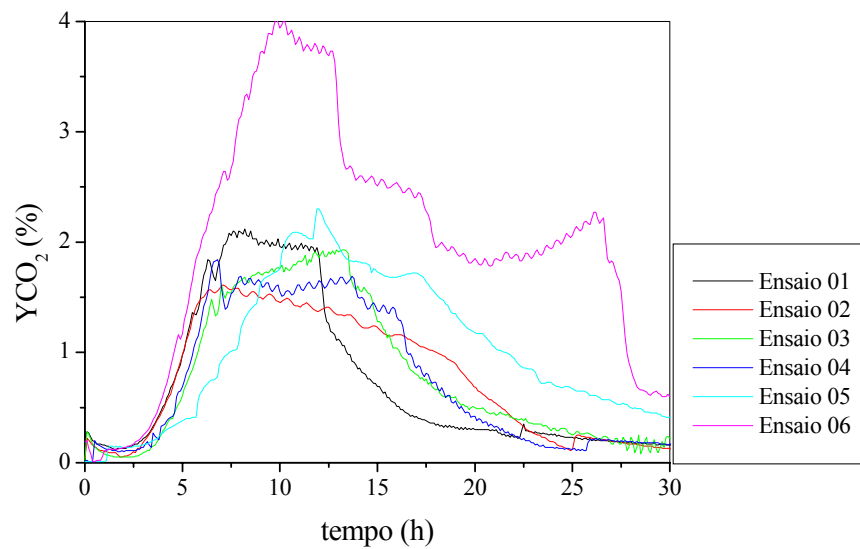


Figura 4.4: Fração molar de CO₂ da saída do biorreator para os ensaios 1 a 6.

Na Figura 4.4 observa-se que o experimento 6 apresenta o maior valor da concentração de dióxido de carbono nos gases de exaustão, fato coerente com a massa celular obtida neste cultivo. Para os demais ensaios, existe uma concordância ao longo do tempo entre esta variável e a concentração celular.

A Figura 4.5 mostra o gráfico da velocidade de agitação para os experimentos 1 a 6. Nesta figura é possível constatar que para o ensaio que atingiu a maior concentração celular (ensaio 6) a velocidade de agitação também atingiu um maior valor, coerente com o fato de neste ensaio ser necessário manter uma maior taxa de transferência de oxigênio.

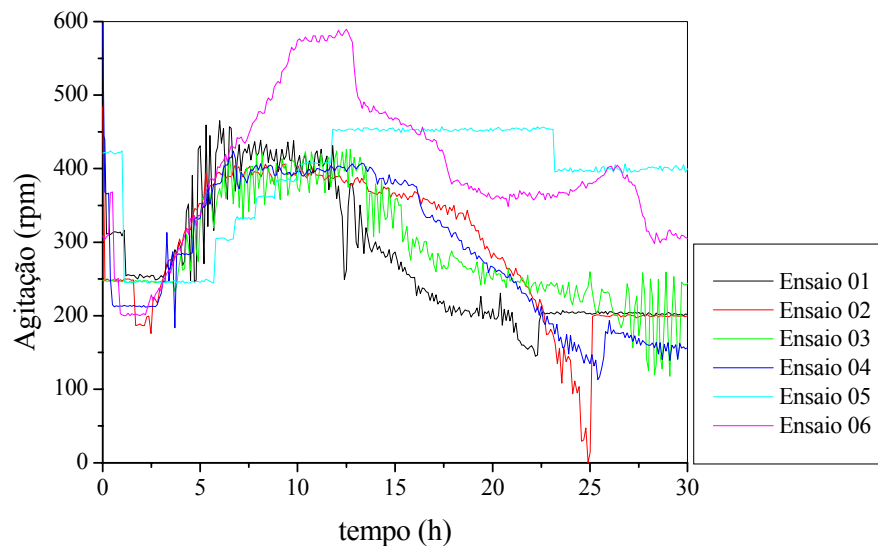


Figura 4.5: Valores de agitação dos ensaios 1 a 6 realizados.

A Figura 4.6 apresenta os valores das concentrações celulares dos experimentos de 7 a 13.

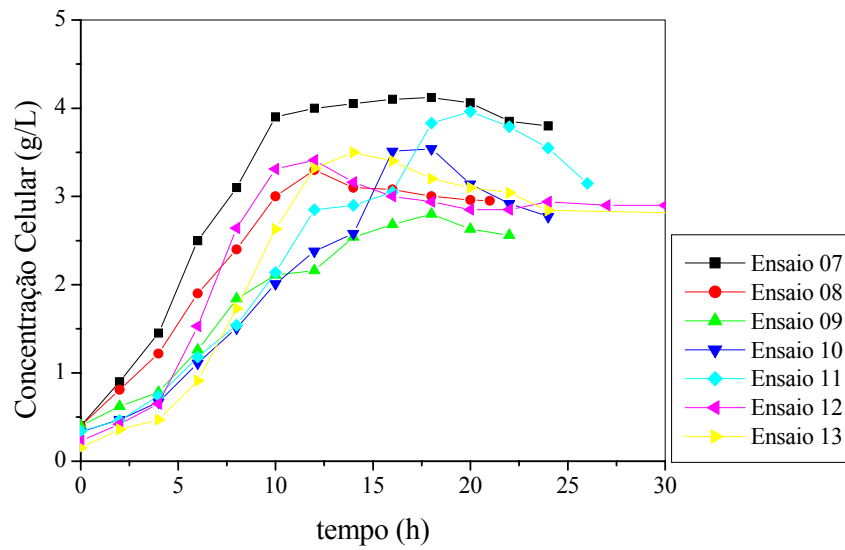


Figura 4.6: Valores experimentais da concentração celular dos cultivos 7 a 13.

A partir da análise da Figura 4.6, observa-se que os experimentos 9, 10 e 11 têm a velocidade de crescimento limitada pela concentração de oxigênio dissolvido utilizada (estes experimentos foram realizados a velocidade de agitação constante, 300 rpm). Nos experimentos 12 e 13, realizados com controle de oxigênio dissolvido em 10% e 15% da saturação, respectivamente, também apresentam um atraso no crescimento celular nas primeiras horas de cultivo. Nos ensaios 7 e 8 não houve limitação no crescimento celular por esta variável.

A Figura 4.7 apresenta os valores da concentração de enzima obtidos nos ensaios 7 a 13.

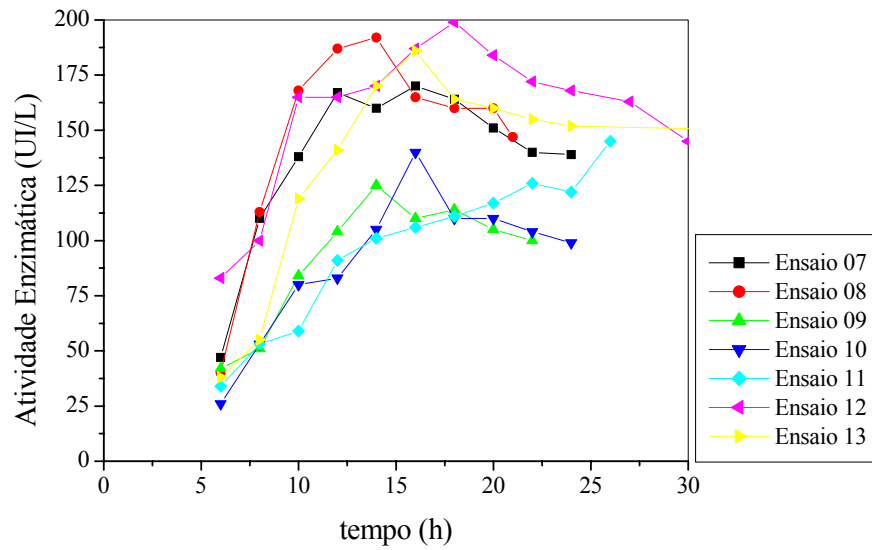


Figura 4.7: Valores experimentais da atividade enzimática dos ensaios 7 a 13.

A limitação do oxigênio dissolvido ocasionada pela realização do cultivo a 300 rpm (ensaios 9, 10 e 11) resultou nos menores valores da concentração de enzima nestes experimentos (Figura 4.7). Nos demais experimentos a concentração de enzima atingiu valores da ordem de 180-200 UI/L.

As Figuras 4.8 e 4.9 ilustram, respectivamente, as concentrações de oxigênio dissolvido e fração molar de dióxido de carbono dos experimentos 7 a 13.

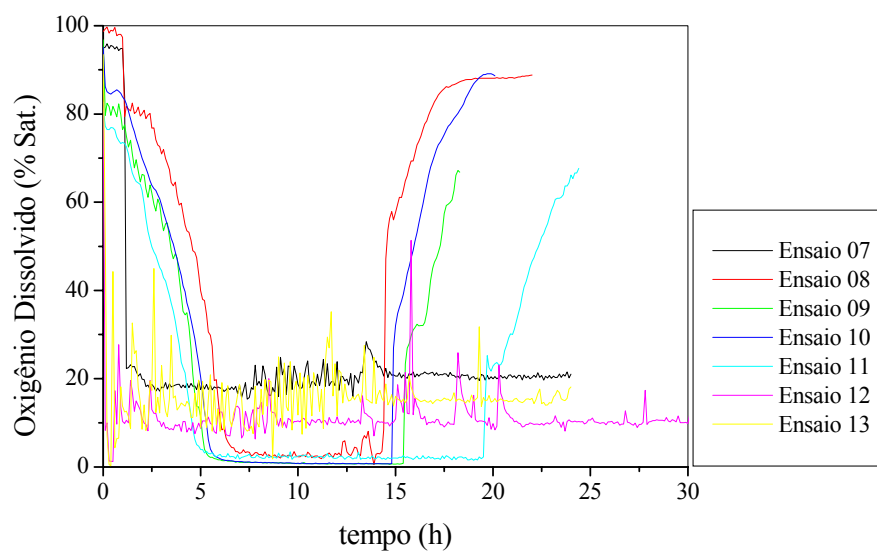


Figura 4.8: Concentração de oxigênio dissolvido para os ensaios de 7 a 13.

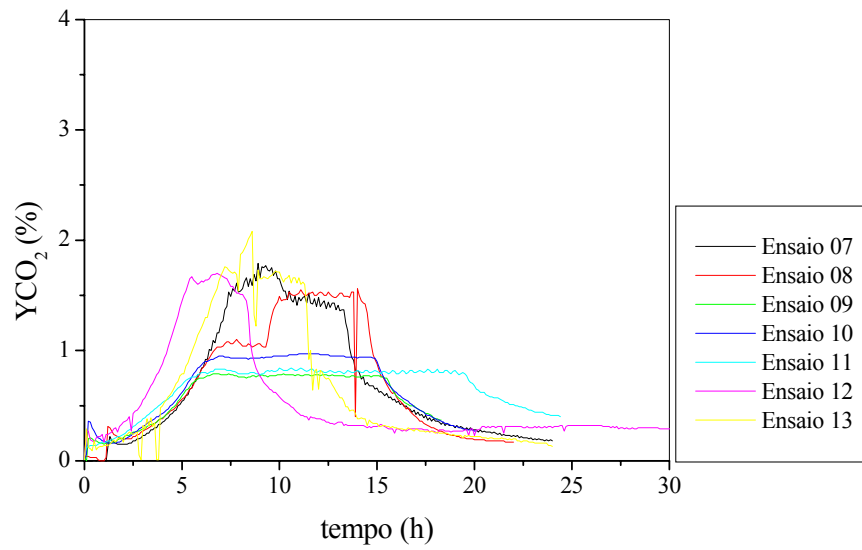


Figura 4.9: Fração molar de CO₂ da saída do biorreator para os ensaios 7 a 13.

A Figura 4.10 ilustra o gráfico da velocidade de agitação para os experimentos 7 a 13.

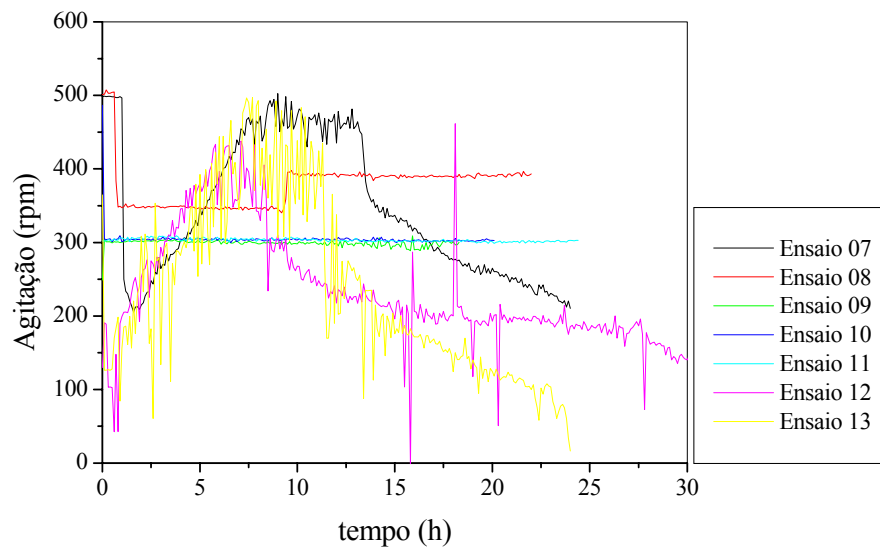


Figura 4.10: Valores de agitação dos ensaios 7 a 13 realizados.

Com o objetivo de realizar um estudo mais detalhado acerca dos experimentos realizados, alguns parâmetros foram calculados. A Tabela 4.4 apresenta os valores experimentais destes parâmetros: concentração celular inicial (C_{x0}), atividade enzimática máxima no respectivo tempo ($C_{P_{máx}} / t$), atividade enzimática específica (AE^*) e velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{máx}$) para os treze experimentos realizados.

Tabela 4.4: Concentração celular inicial, concentração de enzima máxima no respectivo tempo, atividade enzimática específica e velocidade específica máxima de crescimento celular calculados nos ensaios realizados.				
Ensaio	C_{x0} (g/L)	$C_{P_{máx}}$ (UI/L) / t (h)	AE^* (UI PGA/g C_x)	$\mu_{máx}$ (h^{-1})
01	0,28	175 / 13	39,0	0,36
02	0,35	191 / 16	53,5	0,31
03	0,30	200 / 12	42,0	0,38
04	0,32	180 / 20	40,0	0,36
05	0,30	110 / 16	29,7	0,29
06	0,31	98 / 12	12,0	0,37
07	0,30	167 / 12	41,7	0,27
08	0,48	187 / 12	57,1	0,20
09	0,40	120 / 16	42,0	0,20
10	0,33	140 / 16	40,0	0,20
11	0,24	126 / 22	33,2	0,21
12	0,23	200 / 18	69,0	0,35
13	0,15	186 / 16	54,7	0,33

$$AE^* = \frac{C_{P_{máx}}}{C_x} \text{ (UI - enzima / g - célula)}$$

A partir da análise dos valores de atividade enzimática específica (AE^*) apresentados na Tabela 4.4, verificou-se que os experimentos realizados com controle de oxigênio dissolvido em 20% da saturação (ensaios 1, 2, 3, 4, 7) apresentaram valores semelhantes (~40 UI PGA/g-célula). Embora o experimento 6 fosse realizado na mesma condição operacional quanto ao controle de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (20% da saturação), neste experimento foi utilizada na corrente de suplementação concentração de substrato (aminoácidos) quatro vezes maior que nos demais. Apesar da alta concentração celular obtida neste experimento (Figura 4.1), houve uma baixa produção de enzima (Figura 4.2), que pode

ser atribuída a uma inibição na formação do produto pelo substrato (vide experimento 6 realizado em *shaker* na Tabela 4.3).

A utilização de ácido fenil acético (AFA) ou fenil acetato de potássio (FAK) de meio reacional não resultou efeito significativo na concentração de enzima obtida nos cultivos como ilustram os valores da AE^* (Tabela 4.4) para os experimentos 3 e 7, ambos realizados nas mesmas condições operacionais.

Nos experimentos 8 a 11 verificaram-se os menores valores da velocidade específica máxima de crescimento celular em relação aos demais experimentos. Este fato é atribuído à limitação pelo oxigênio, uma vez que estes experimentos foram realizados em condições (agitação constante) onde a velocidade de transferência de massa se igualava ao consumo pelo microrganismo atingindo 0% da saturação durante boa parte do cultivo (vide Figura 4.8). Nestes experimentos, a velocidade de transferência de oxigênio igualou-se à velocidade de consumo de oxigênio.

Os experimentos 5 e 13 foram realizados controlando a concentração de oxigênio dissolvido em 15% da saturação. Estes deveriam apresentar resultados semelhantes, uma vez que a utilização dos meios contendo aa^{total} e aa^{pref} não produziu efeito na concentração celular e de enzima (Figuras 4.1, 4.2 e 4.6 e 4.7, respectivamente). A menor atividade enzimática específica obtida no ensaio 5 pode ser atribuída a problemas na linhagem durante a etapa de preparo de inóculo. O experimento realizado em *shaker* em condições padrões (conduzidos em todos os experimentos) também apresentou uma concentração de enzima com valores abaixo dos observados normalmente (vide Tabela 4.3). Conforme já verificado anteriormente pelo grupo de pesquisa, esta linhagem de microrganismo pode se desenvolver em dois tipos de colônia: uma mais produtiva e outra menos (PINOTTI et al., 2000b), o que pode justificar a baixa atividade enzimática deste experimento (ensaio 5).

O experimento conduzido com concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação (ensaio 12) foi o que atingiu a maior atividade específica (69 UI PGA/g-célula) sendo, portanto, a melhor condição operacional.

4.2 Simulação empregando Modelo Híbrido

A Figura 4.11 apresenta uma ilustração do modelo híbrido empregado neste trabalho.

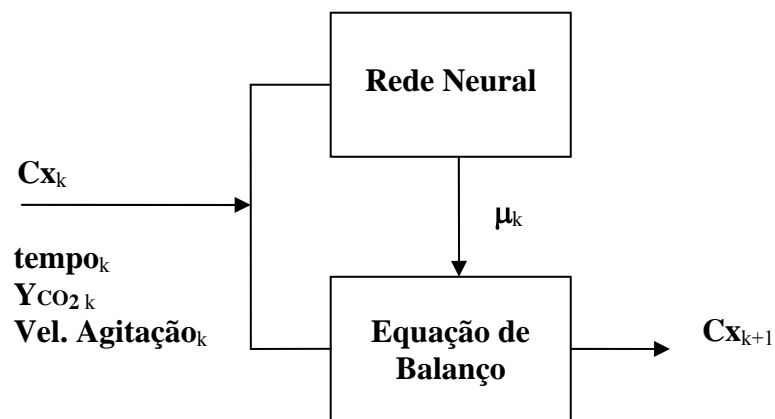


Figura 4.11: Modelo neural híbrido. A rede estima o termo cinético do processo (velocidade específica de crescimento celular) a partir de variáveis adquiridas em tempo real, usado como entrada para a equação de balanço (adaptado de PSICHOGIOS e UNGAR, 1992).

A rede neural empregada foi uma Rede *Feedforward* com uma camada oculta utilizando treinamento supervisionado (algoritmo de atualização de pesos *Backpropagation*). Foram escolhidas três variáveis como entrada para a rede: tempo (h), Y_{CO_2} (%), velocidade de agitação (rpm). Como variável de saída a rede previa a velocidade específica de crescimento celular: μ (h^{-1}). A Figura 4.12 ilustra um esquema da estrutura de rede neural utilizada.

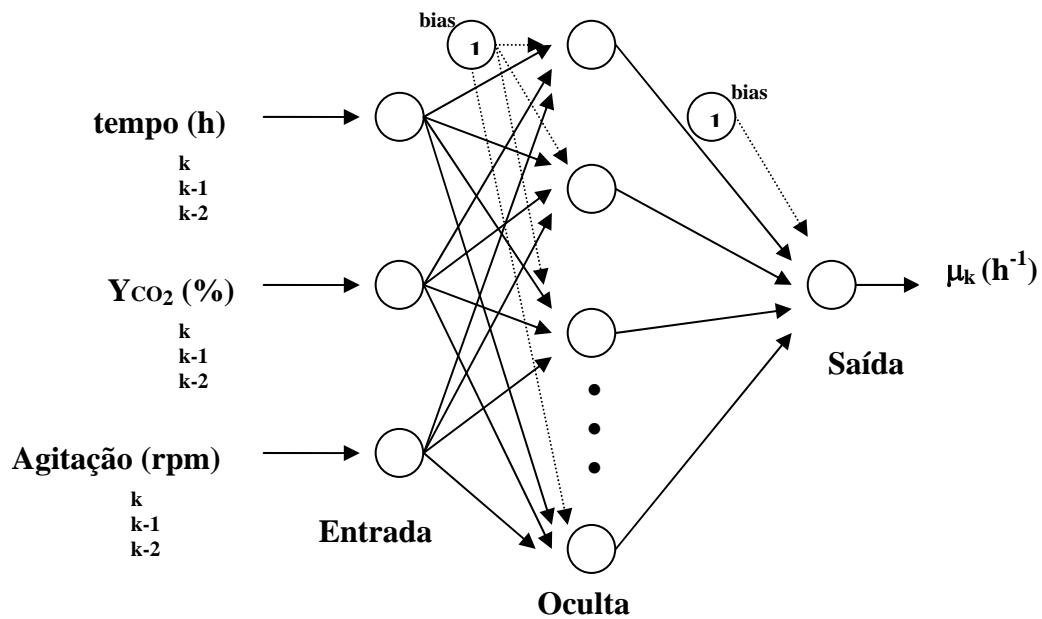


Figura 4.12: Esquema ilustrativo da estrutura de rede neural utilizada.

A equação de balanço (Equação 4.1) é integrada utilizando algoritmo de Runge-Kutta, 4ª ordem (MATHEWS e FINK, 1999).

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Como os valores da velocidade específica de crescimento celular (μ) não estão disponíveis experimentalmente, fez necessário estimá-los a partir dos valores experimentais da concentração celular (amostras retiradas periodicamente do biorreator, 2 em 2 horas). Como as variáveis de entrada da rede neural possuem uma frequência de amostragem maior em relação à variável amostrada (para treinamento da rede empregou-se 6 minutos) houve a necessidade de gerar dados de concentração celular. Para isso foi empregado um polinômio interpolador *Spline* (PRESS et al., 1986). A partir da interpolação foi possível gerar a mesma quantidade de pontos para concentração celular e assim, empregando a Equação (4.2) obtiveram-se os valores de μ .

$$\mu = \frac{1}{C_x} \cdot \frac{dC_x}{dt} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Todos os programas foram implementados em MatLab[®] (versão 6.0 Release 12).

Vários testes foram realizados. A rede neural foi treinada empregando as variáveis de entrada no tempo atual para prever μ , e também foram utilizados tempos passados para estas variáveis, uma vez que fazendo uso apenas dos tempos atuais, os resultados não foram satisfatórios. O número de neurônios na camada oculta (nco) também foi avaliado (analisou-se 7, 10, 12 e 15). São apresentados os melhores resultados obtidos, ou seja, para entrada da rede empregaram-se valores das variáveis nos tempo atuais e dois tempos passados. Optou-se por se utilizar 15 nco e 500 apresentações, uma vez que este apresentou o menor valor do erro 0,0054, frente a 0,0075 para 12 nco, 0,0097 para 10 nco e 0,0122 para 7 nco. Valores superiores a 15 nco, superestimaram os resultados da RNA.

Na etapa de treinamento da rede, os experimentos foram divididos em dois conjuntos de dados. No primeiro foram agrupados os experimentos de 1 a 6, chamados de **aa^{total}**, e **aa^{pref}** para o segundo conjunto, composto pelos experimentos de 7 a 13.

A Figura 4.13 apresenta os gráficos de velocidade específica de crescimento celular, μ , gerados após o treinamento da rede neural *versus* μ “experimental” (empregou-se os ensaios 1, 2, 3 e 6, respectivamente na etapa de treinamento, por apresentarem as condições extremas obtidas). Foram utilizadas 500 apresentações da base de dados durante a fase de treinamento. Pode-se verificar que a rede neural conseguiu realizar um treinamento muito satisfatório no intervalo de dados avaliado.

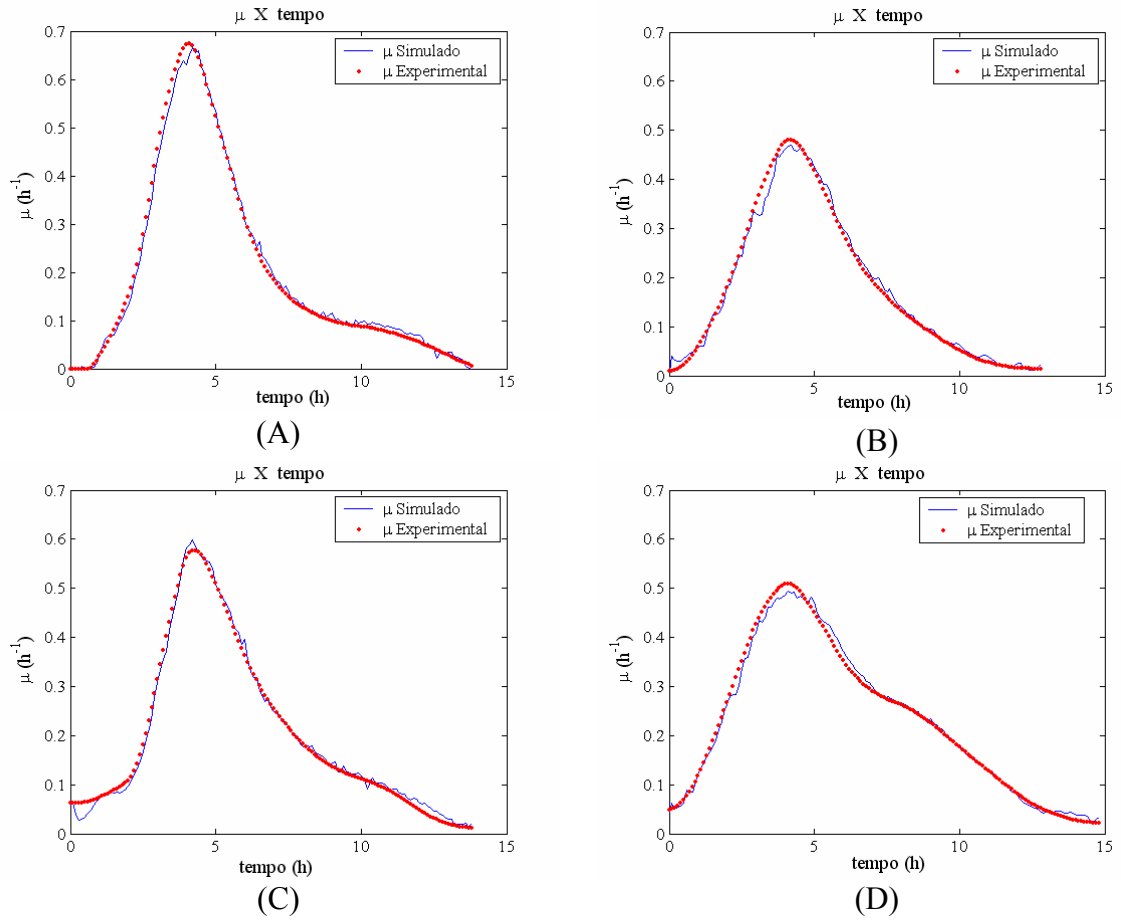


Figura 4.13: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 500 apresentações. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2, (C) Ensaio 3 e (D) Ensaio 6.

A Figura 4.14 apresenta os valores das concentrações celulares fornecida pelo modelo híbrido após a etapa de treinamento da rede neural.

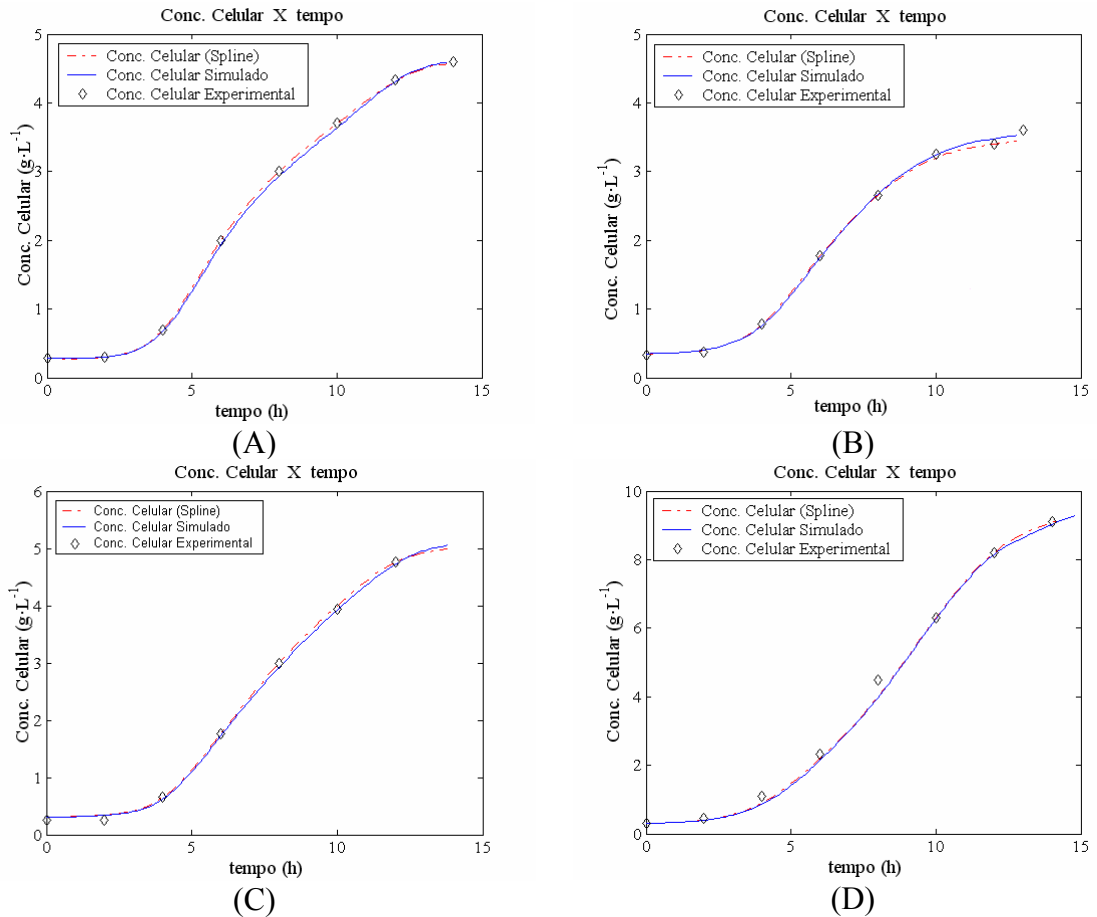


Figura 4.14: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2, (C) Ensaio 3 e (D) Ensaio 6.

A partir dos resultados obtidos na Figura 4.14 pode-se afirmar que o modelo híbrido foi capaz de inferir com boa acuidade a concentração celular nos experimentos utilizados durante a fase de treinamento.

Na etapa seguinte, avaliou-se a capacidade do modelo em prever o perfil da concentração celular nos experimentos não utilizados (etapa de validação). A Figura 4.15 apresenta as simulações da velocidade de crescimento celular obtida nos experimentos 4 e 5.

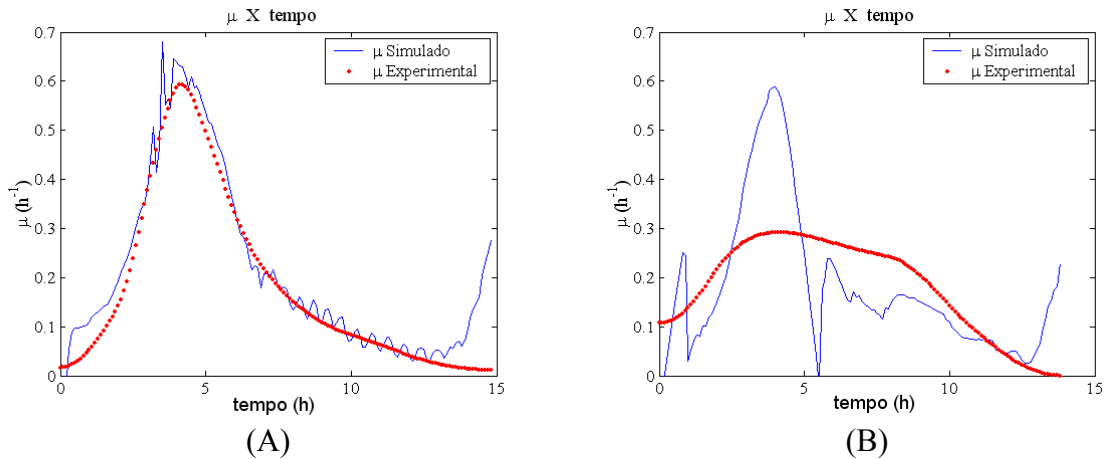


Figura 4.15: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 500 apresentações para os ensaios 4 e 5. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos pelo treinamento para os ensaios 1, 2, 3 e 6, pode-se verificar que a rede neural não conseguiu acompanhar a curva de μ experimental do experimento 5 utilizado na etapa de validação.

A simulação da concentração celular pelo modelo híbrido é apresentada na Figura 4.16 para etapa de validação.

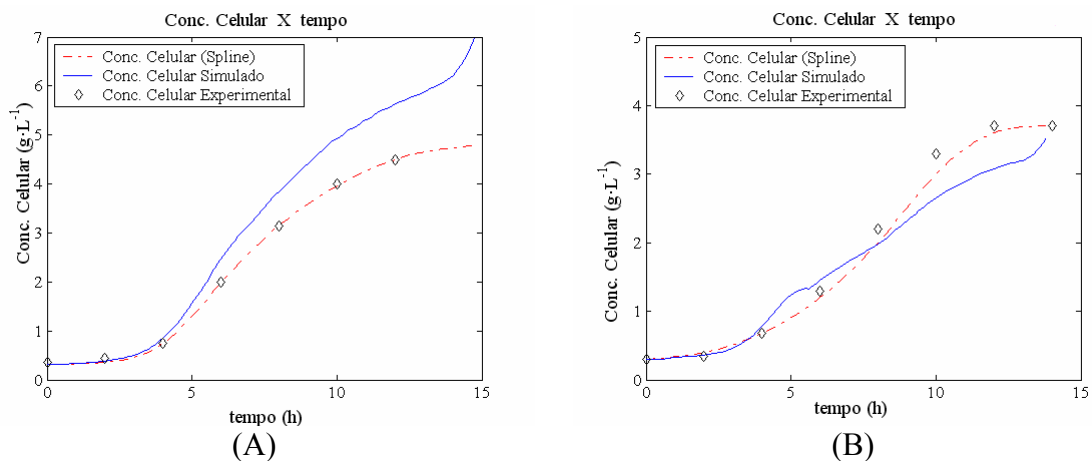


Figura 4.16: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.

Observa-se que para o ensaio 4, o modelo forneceu uma estimativa da concentração celular acima do valor experimental a partir de cinco hora de cultivo. Já para o experimento 5, o modelo previu satisfatoriamente os valores da concentração celular.

A Figura 4.17 apresenta os gráficos de μ obtidos após o treinamento da rede neural versus μ “experimental” para o segundo grupo de ensaios (8, 9, 11, 12 e 13). Foram utilizadas 500 apresentações da base de dados durante a fase de treinamento.

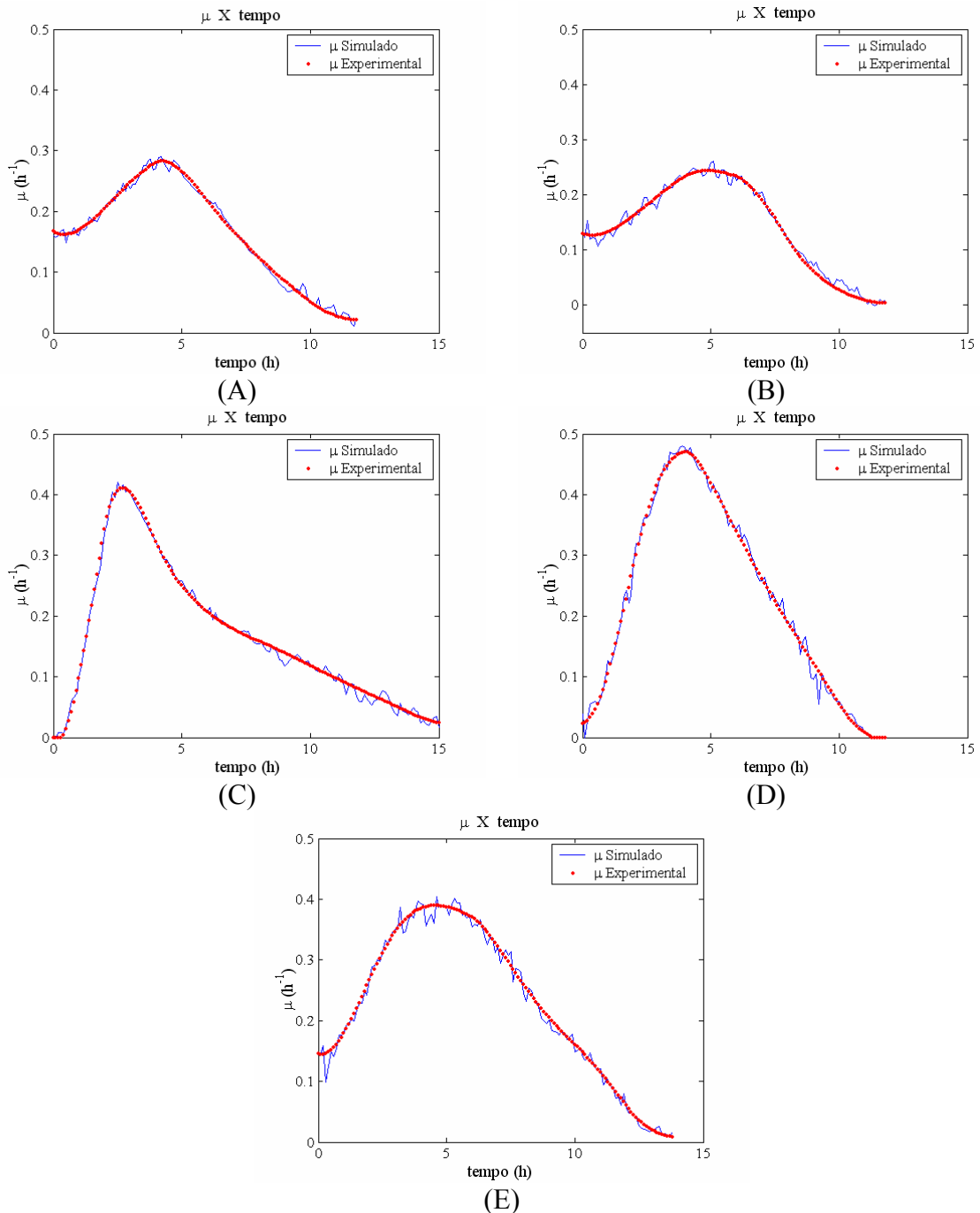


Figura 4.17: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 500 apresentações. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11, (D) Ensaio 12 e (E) Ensaio 13.

Observa-se pela Figura 4.17, que após 500 apresentações dos dados à rede neural, foi capaz de realizar uma boa previsão dos valores de μ para os ensaios de treinamento.

A Figura 4.18 apresenta os valores da concentração celular obtidas pelo modelo híbrido (etapa de treinamento).

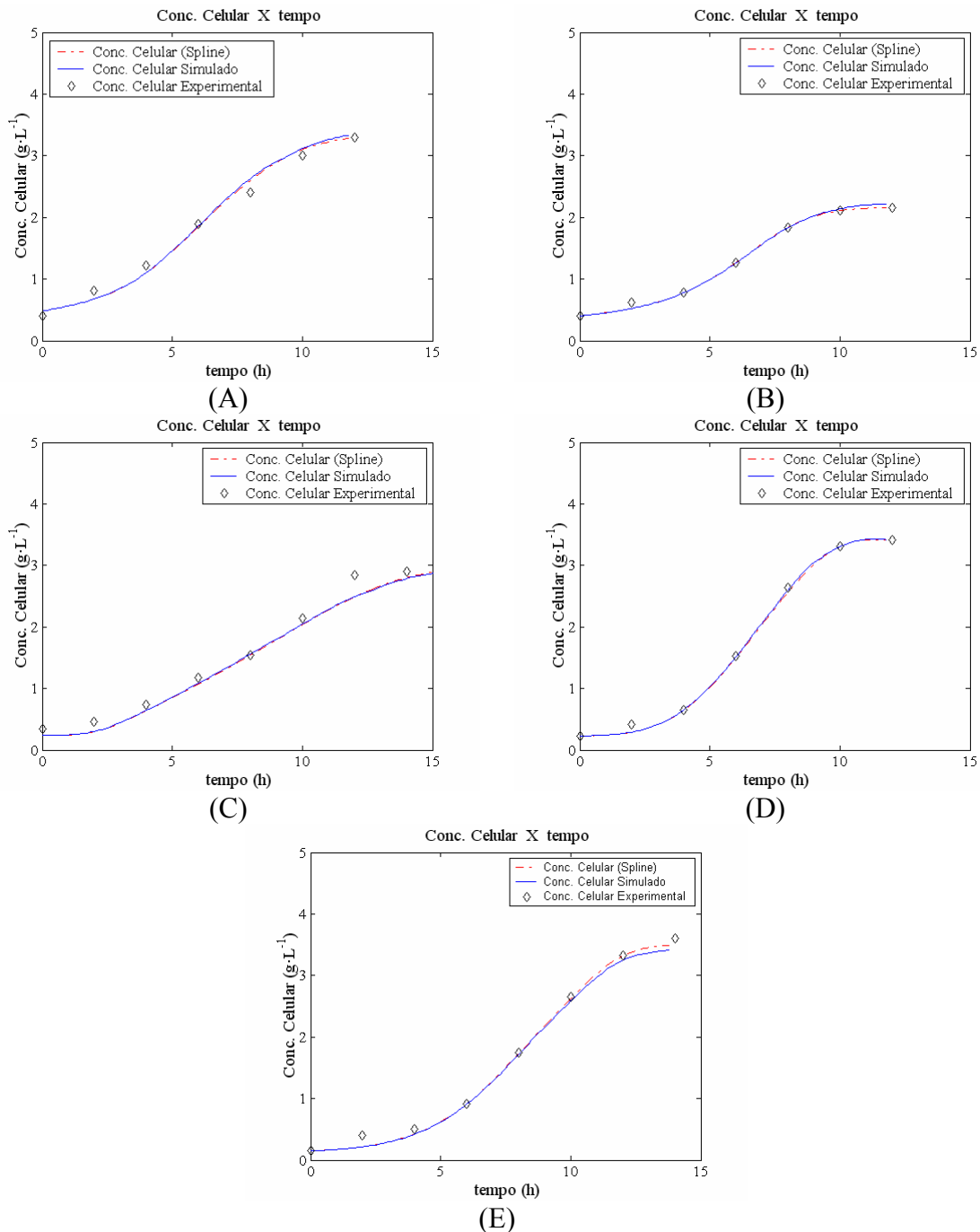


Figura 4.18: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11, (D) Ensaio 12 e (E) Ensaio 13.

Para todos os experimentos que compunham a base de dados empregada no treinamento o modelo híbrido forneceu boa previsão da concentração celular ao longo dos experimentos.

Nas Figuras 4.19 e 4.20 são apresentados os ensaios de validação realizados (simulação para os ensaios 7 e 10).

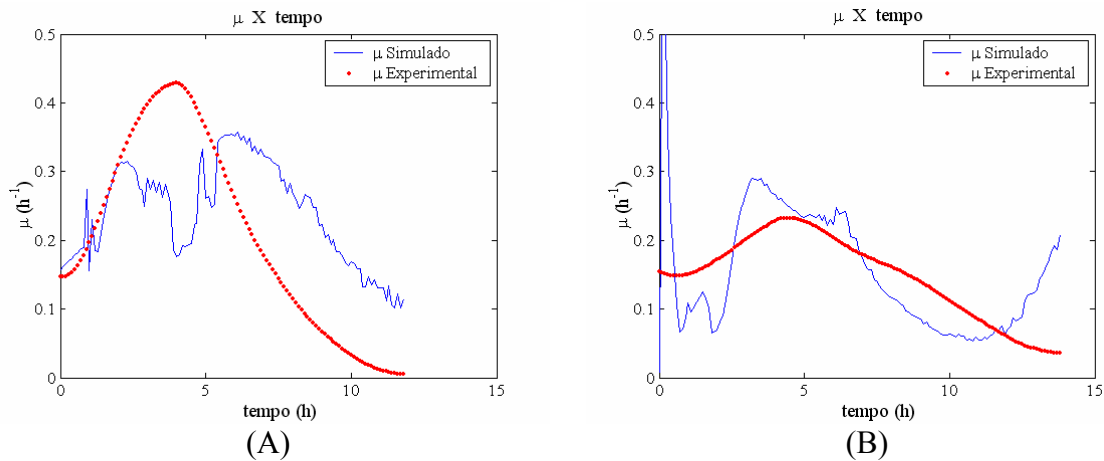


Figura 4.19: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 500 apresentações para os ensaios 7 e 10. (A) Ensaio 7 e (B) Ensaio 10.

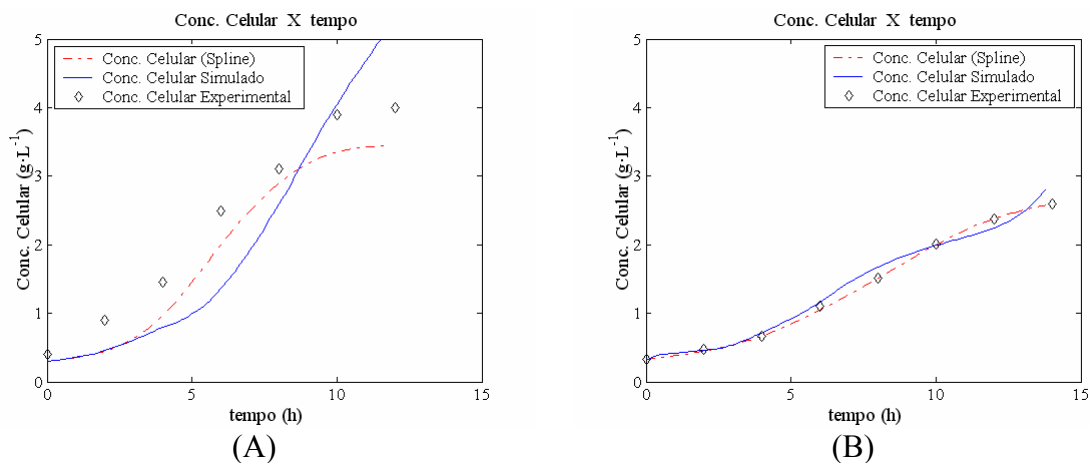


Figura 4.20: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 7 e (B) Ensaio 10.

Embora no ensaio 7 o modelo híbrido não tenha fornecido uma boa previsão da concentração celular, na simulação do ensaio 10 houve uma boa concordância entre os valores simulados e os obtidos experimentalmente.

Em outro teste avaliaram-se como variáveis de entrada da rede neural o tempo, a fração molar de CO_2 , a velocidade de agitação e a *derivada* da fração molar de CO_2 . Para estes dados, utilizaram-se essas variáveis no tempo atual e dois tempos atrasados.

Avaliou-se o número de neurônios empregado na camada oculta empregando 7, 10, 12 e 15 neurônios. As Figuras 4.21 e 4.22 mostram os resultados obtidos.

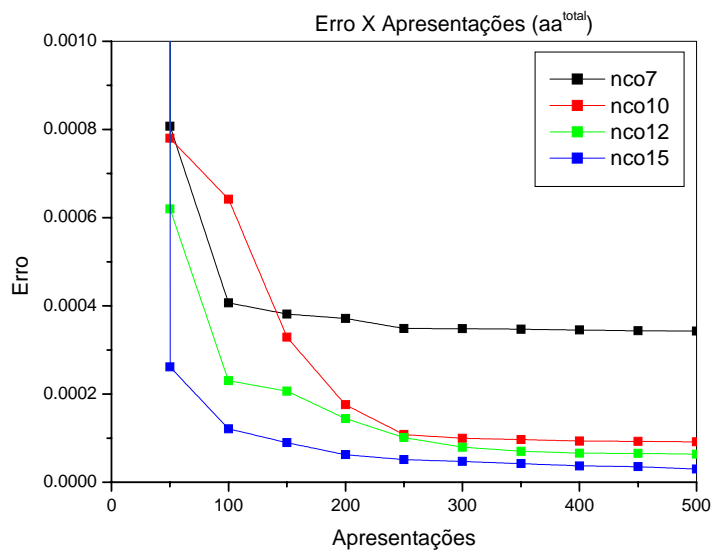


Figura 4.21: Variação do erro em função do número de apresentações para o número de neurônios na camada oculta (aa^{total} , com os ensaios 1, 2 e 3 usados no treinamento).

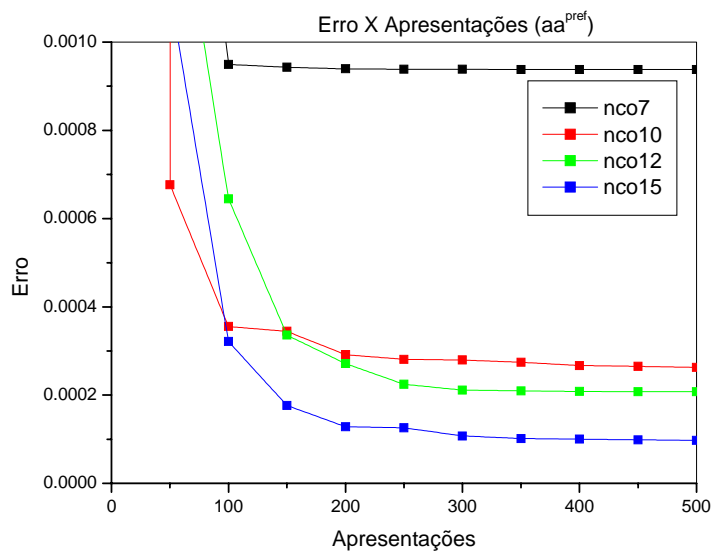


Figura 4.22: Variação do erro em função do número de apresentações para o número de neurônios na camada oculta (aa^{pref} , com os ensaios 8, 9, 11 e 12 usados no treinamento).

Pelas Figuras 4.21 e 4.22, verifica-se que a melhor configuração de RNA emprega 15 neurônios na camada oculta. Além disso, 200 apresentações seria um número suficiente de apresentações da base de dados durante a etapa de treinamento.

A Figura 4.23 apresenta os gráficos de μ gerado após o treinamento da rede neural com μ “experimental” (empregaram-se os ensaios 1, 2, e 3, na etapa de treinamento). Foram utilizadas 200 apresentações da base de dados durante a fase de treinamento. Pode-se verificar que a rede neural conseguiu realizar um treinamento satisfatório. Optou-se por excluir o cultivo 6 durante o treinamento do conjunto aa^{total} , visto que este poderia superestimar os dados da concentração celular (maior concentração celular obtida).

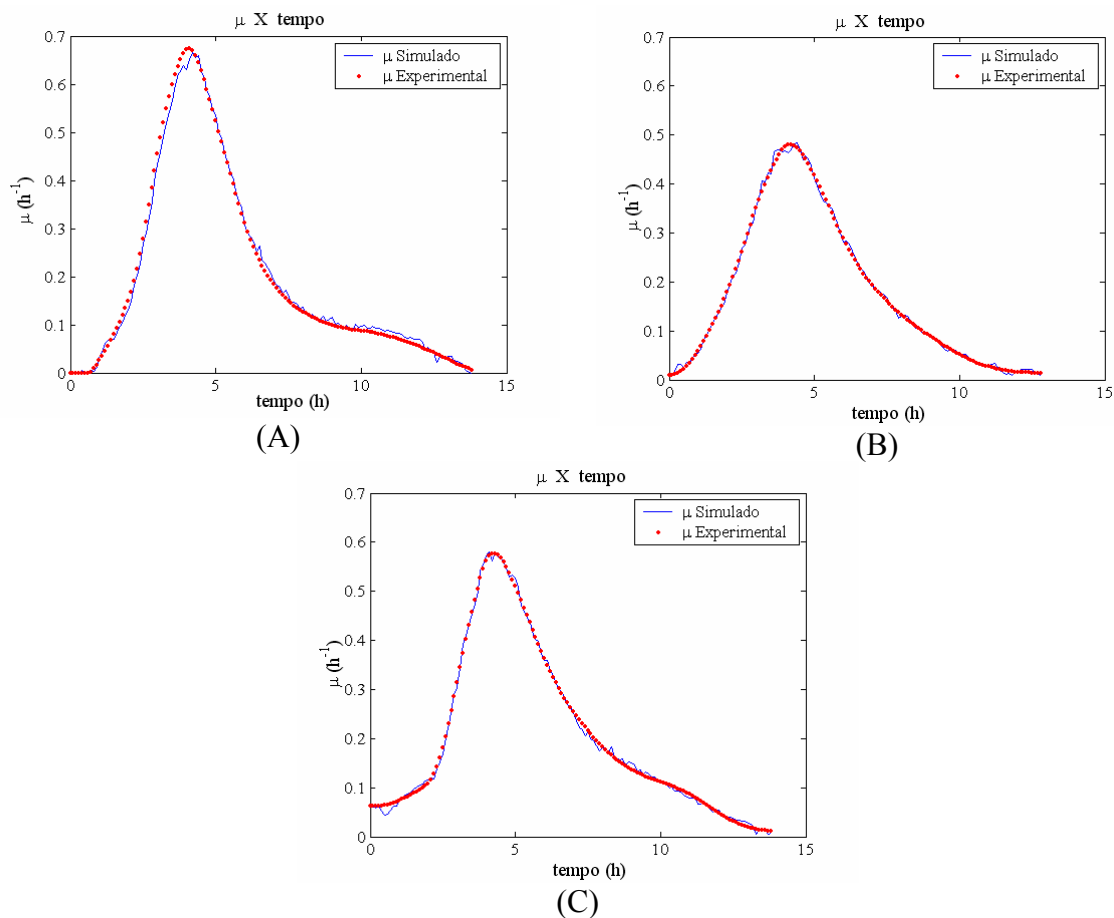


Figura 4.23: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 200 apresentações. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2 e (C) Ensaio 3.

A Figura 4.24 apresenta os valores da concentração celular obtidas pelo modelo híbrido durante etapa de treinamento.

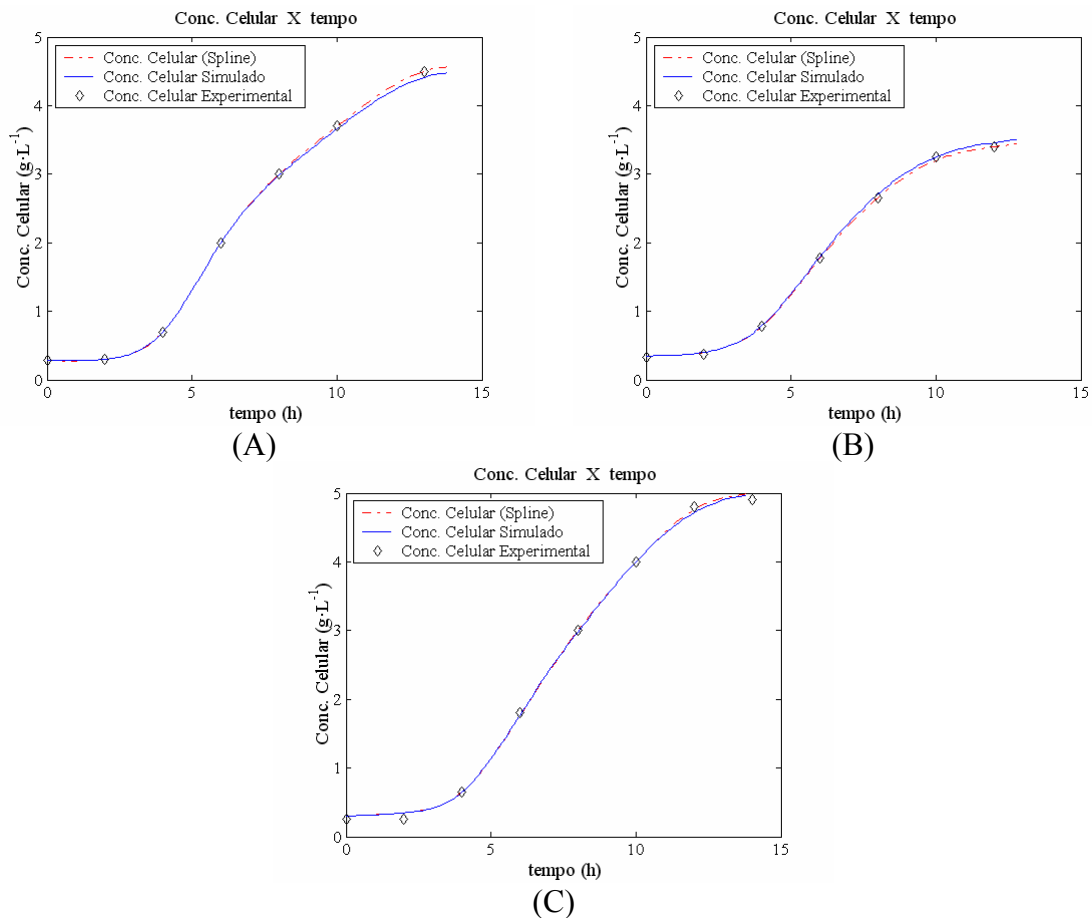


Figura 4.24: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2 e (C) Ensaio 3.

Assim, pode-se verificar que o modelo produziu resultados satisfatórios durante a etapa de treinamento.

Pela Figura 4.25, pode-se notar o comportamento da curva de μ durante os teste para validação para os experimentos 4 e 5.

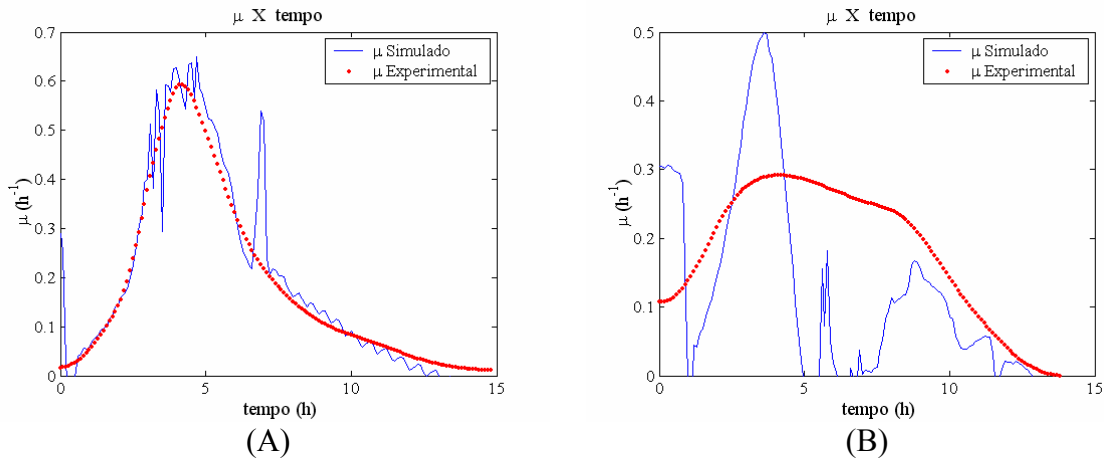


Figura 4.25: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 200 apresentações. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.

Ao analisarmos a Figura 4.25 para o ensaio 5 (B), verifica-se um comportamento muito irregular para μ simulado, se comparado aos dados de μ experimental, mostrando que este experimento não foi possível identificar construir dados sejam compatíveis aos experimentais. No ensaio 4, a curva de simulação mostrou um certo acompanhamento durante um determinado período.

A Figura 4.26 apresenta a simulação do modelo híbrido para os experimentos de validação.

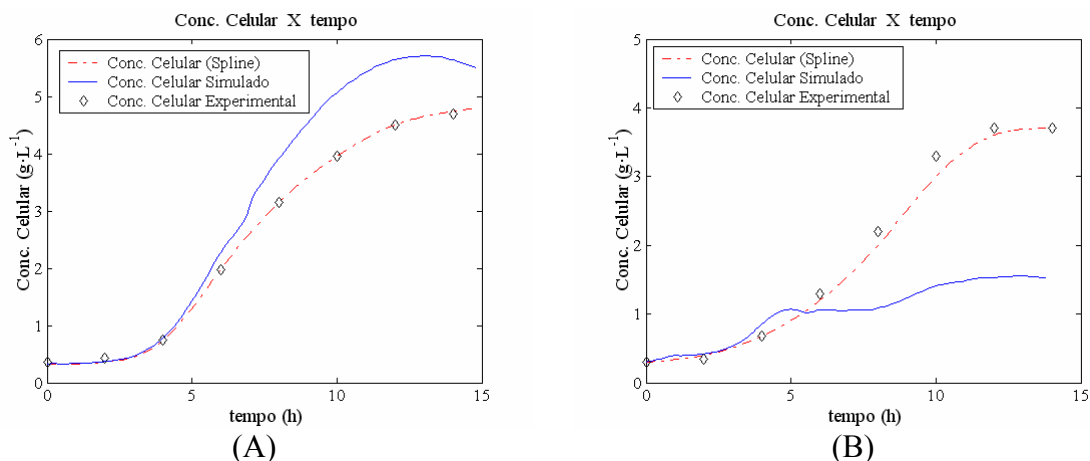


Figura 4.26: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 4 e (B) Ensaio 5.

A Figura 4.27 apresenta os gráficos de μ gerado após o treinamento da rede neural com μ “experimental” (empregou-se os ensaios 8, 9, 11 e 12, respectivamente). Foram

utilizadas 200 apresentações da base de dados durante a fase de treinamento. Pode-se verificar que a rede neural conseguiu realizar um treinamento satisfatório, com relação aos dados apresentados.

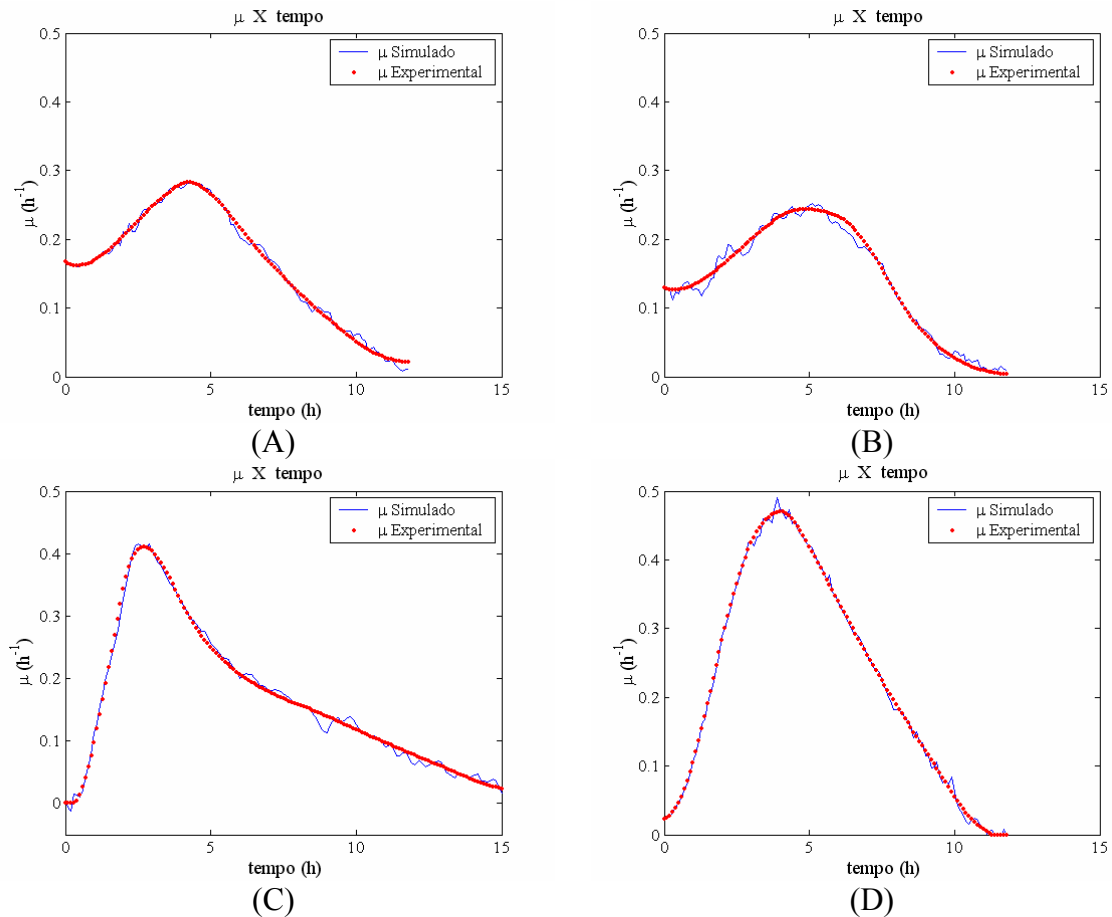


Figura 4.27: Treinamento da rede neural com 15 neurônios na camada oculta e 200 apresentações. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11 e (D) Ensaio 12.

A seguir, seguem os respectivos gráficos da concentração celular para os experimentos utilizados no treinamento na Figura 4.28 para o conjunto aa^{pref} .

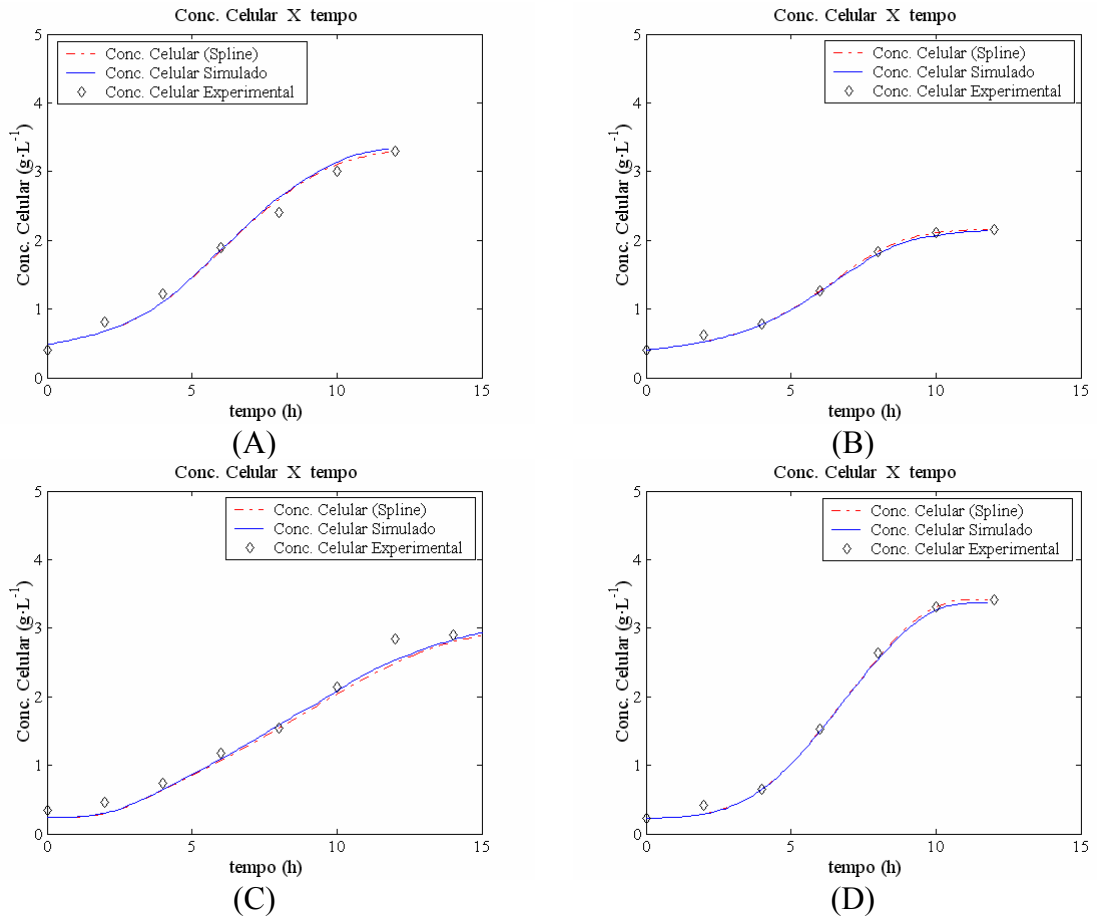


Figura 4.28: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido. (A) Ensaio 8, (B) Ensaio 9, (C) Ensaio 11 e (D) Ensaio 12.

Novamente, nota-se que o modelo acompanhou muito bem as curvas de concentração celular para a etapa de treinamento.

Dessa forma, faz-se necessário realizar a etapa de validação, como pode ser visualizado nas Figuras 4.29 e 4.30, para verificar se foi possível o modelo híbrido, para os experimentos de 6 a 13, ajustar dados fora da etapa de treinamento realizar um bom acompanhamento dos dados simulados com os experimentais.

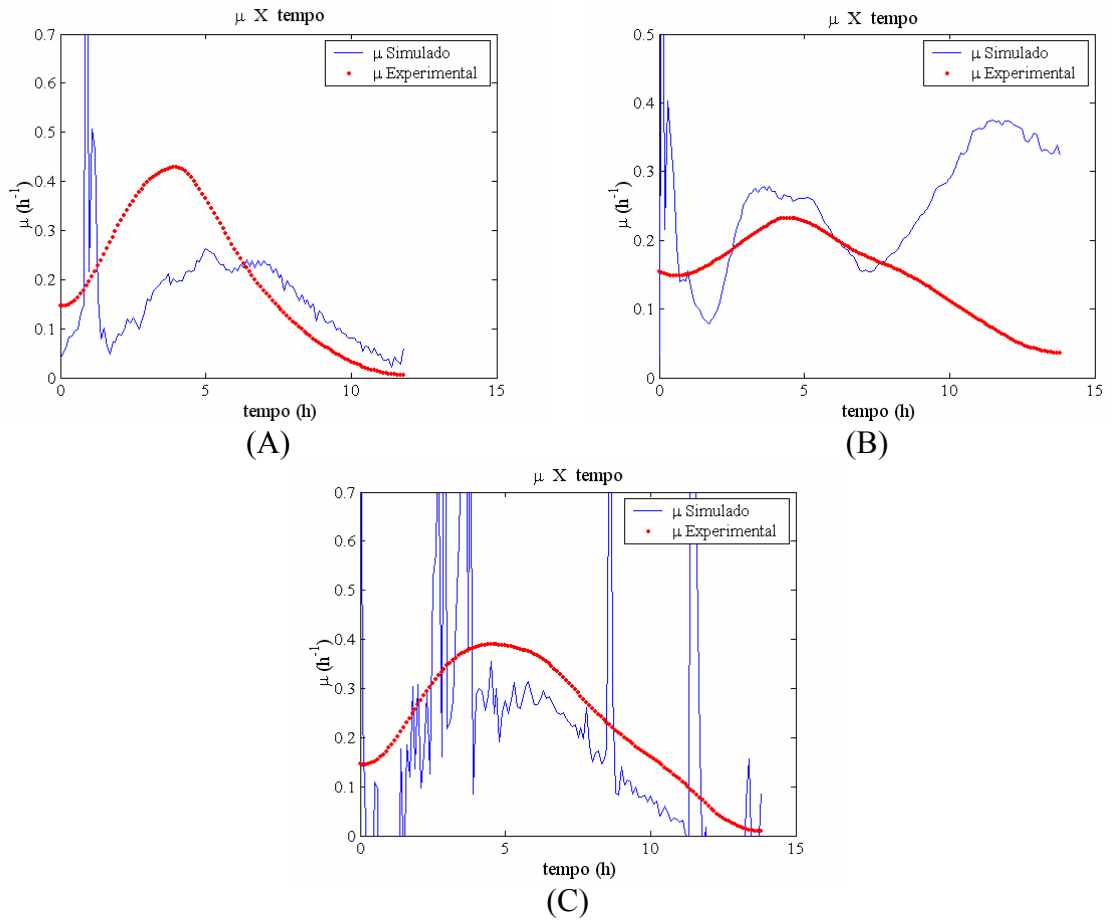


Figura 4.29: Resultados de validação apresentados pela Rede Neural previamente treinada com 15 nco e 200. (A) Ensaio 7, (B) Ensaio 10 e (C) Ensaio 13.

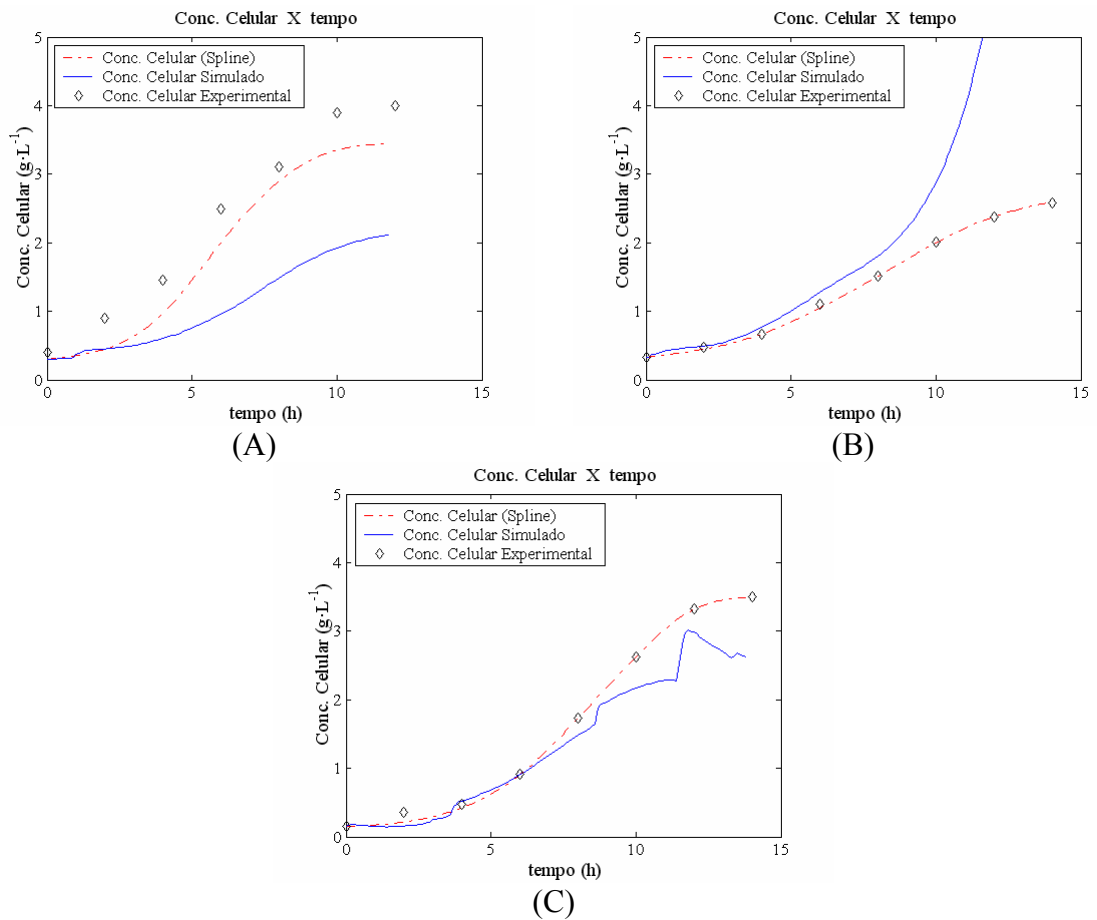


Figura 4.30: Concentração celular dos ensaios prevista pelo modelo híbrido na etapa de validação. (A) Ensaio 7, (B) Ensaio 10 e (C) Ensaio 13.

A partir dos dados apresentados pela rede neural previamente treinada, pode-se concluir que a inclusão da variável derivada da fração molar de CO_2 como informação de entrada para rede neural não resultou em melhores resultados (Figuras 4.30 e 4.26).

5 Conclusões

Estudos sobre produção da enzima Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* estão inseridos em contexto de grande importância. O Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar vem realizando estudos empregando esta bactéria e alguns resultados importantes já foram alcançados, como a substituição do meio de cultivo – caseína hidrolisada enzimaticamente por aminoácidos livres, proporcionando aumento da concentração de enzima durante o processo. Paralelamente, desenvolveram-se modelos matemáticos (fenomenológico e empírico) para o processo além de estudos empregando lógica nebulosa (Fuzzy) para inferir o momento de finalizar o cultivo. Contudo, existe ainda a necessidade de realizar investigações buscando identificar perfil ótimo com relação à concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo e também a proposição de um modelo que represente melhor o processo.

A partir da análise dos resultados dos experimentos para produção de PGA por *Bacillus megaterium* realizados em diferentes condições operacionais observou-se que a maior atividade enzimática específica foi atingida quando a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 10% da saturação durante todo o cultivo. Os dados obtidos neste trabalho indicaram que existe um ponto ótimo em relação a esta variável. Se por um lado altos valores da concentração oxigênio dissolvido (20% da saturação) favorecem o crescimento celular por outro reprimem a produção da enzima. No outro extremo, baixos valores da concentração de oxigênio dissolvido (5% da saturação) limitam o crescimento celular prejudicando também a produção da enzima. Este resultado está de acordo com o verificado por De León et al. (2003) empregando *E. coli* modificada para produção de PGA. Dessa forma, para o microrganismo empregado, *Bacillus megaterium*, e para o meio utilizado há também um compromisso entre concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo e a produção da enzima.

Em relação à redução do número de aminoácidos no meio reacional de 18 para 7, mantendo a concentração final de 10,0 g/L e mantendo os preferencialmente consumidos, não resultou em diferenças significativas na concentração final de enzima produzida. Houve, contudo, uma simplificação do meio de cultivo empregado. O controle de pH também não se mostrou eficaz.

A aplicação do enfoque híbrido na determinação da concentração celular através de dados obtidos em tempo real forneceu resultados satisfatórios. Na etapa de treinamento o modelo foi capaz de aprender, através da parte empírica, rede neural, as relações entre as variáveis de entrada e saída, utilizando a equação de balanço para estimar a concentração celular.

5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros

Sugere-se realizar estudos para buscar um valor ótimo para produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* entre 5 e 10% de saturação da concentração de oxigênio dissolvido.

Em relação à modelagem empregando redes neurais, sugere-se alisar os dados da variável de fração molar de CO₂ e calcular a derivada em intervalos de tempo maiores (a cada 10, 20 ou 30 minutos), utilizando esta informação como entrada para a rede neural em substituição ao tempo de cultivo.

6 Referências Bibliográficas

ACEVEDO, F.; COONEY, C. L. Penicillin amidase production by *Bacillus megaterium*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, p.493-503, 1973.

ARMIGER, W. B. **Instrumentation for monitoring and controlling bioreactors**. Malvern, PA, USA: BioChem Technology Inc., 2000.

AZEVEDO, S. F.; DAHM, B.; OLIVEIRA, F. R. Hybrid Modeling of Biochemical Processes: a comparison with the conventional approach. **Computers Chemical Engineering**, v. 21, p.S751-S756, 1997.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York, USA: McGraw-Hill Book Company, 1986.

BALASINGHAM, K. et al. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. **Biochimica ET Biophysica Acta**, p.250-256, 1972.

BAUGHMAN, D. R.; LIU, Y. A. **Neural networks in bioprocessing and chemical engineering**. London, UK: Academic Press, Inc., 1995.

BERAZAÍN, J. G. H. Q. **Estudo sobre a utilização do soro de queijo na produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 1997. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1997.

BERAZAÍN, J.G.H.Q.; HOJO, O.; HOKKA, C. O. Utilization of cheese whey for the production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE (ESBES-2). 2., September 16-19, 1998. **Proceedings ...** Portugal: ESBES, 1998. p.72-77.

BULL, D. N. **Instrumentation for fermentation process control**. Upper Montclair, NJ, USA: Satori Corporation, 2000.

CAUDIL, M. Neural network training tips and techniques. **AI Expert**, v. 6, n.1, p.56-61, 1991.

CHIANG, C.; BENNETT, R. E. Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, v.93, n.1, p.302-308, 1967.

CRUZ, A. J. G. **Estudo de produção de cefalosporina C com acompanhamento em linha de variáveis do processo**. 2000. 236f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2000.

DEMUTH, H.; BEALE, M. **Neural network toolbox for use with Matlab®**. Natick, USA: The MathWorks, Inc., 2000.

De LEÓN, A. et al. Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p.689-697, 2003.

GALVANAUSKAS, V.; SIMUTIS, R.; LÜBBERT, A. Hybrid process models for process optimization, monitoring and control. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, p.393-400, 2004.

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**, v.13, p.127-128, 1997.

HAYKIN, S. **Redes neurais: princípios e prática**. 2.ed. Tradução Engel, P. M. Porto Alegre, Brasil: Bookman, 2001.

HERBACH, G. J. M.; Van Der BEEK, C. P.; Van DIJCK, P. W. M. The penicillins: properties, biosynthesis and fermentation. In: VANDAME, E. J. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**. New York, USA: Marcel Dekker, v. 22, p.45-140, 1984.

HOJO, O. **Estudo sobre a produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 1997. 123f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1997.

ILLANES, A. et al. Production of penicillin acylase from *Bacillus megaterium* in complex and defined media. **Process Biochemistry**, v.29, p.263-270, 1994.

INTRODUÇÃO a Redes Neurais. Departamento de Informática da Universidade Estadual de Maringá. Disponível em: <<http://www.din.uem.br/ia/neurais/>>. Acesso em: 15 maio. 2005.

KOMIVES, C.; PARKER, R. S. Bioreactor state estimation and control. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.468-474, 2003.

LAU, C. G. Y. Neural network, theory and modeling. **Proceedings of the IEEE**, v.78, n.9, p.1411-1413, 1990.

MATHEWS, J. H.; FINK, K. D. **Numerical recipes using matlab**. 3.ed. London, UK: Prentice-Hall, 1999.

MICROBIOLOGY and Bacteriology: the world of microbes. Disponível em: <<http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/>>. Acesso em: 15 maio. 2005.

MURAO, S.; SAKAGUCHI, K.; KONO, K. **Process for preparing 6-aminopenicilanic acid by *Bacillus megaterium***. U.S. Patent 3,144,395, 1964.

NUCCI, E. R. **Aplicação da lógica Fuzzy na produção de penicilina G acilase em cultivos de *Bacillus megaterium***. 2003. 157f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.

PINOTTI, L. M. **Estudo da produção, purificação e imobilização de penicilina G acilase de *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 1999. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1999.

PINOTTI, L. M. et al. Study of different media for production of penicillin G acylase for *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-6, p.655-663, 2000a.

PINOTTI, L. M. et al. Produção de penicilina G acilase por *B. megaterium* ATCC 14945: seleção de microrganismo padrão para inóculo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, (SINAFERM-13). 13., Teresópolis, Brasil, 2000. **Anais....** Teresópolis: SINAFERM, 2000b. p.1-6.

PINOTTI, L. M. **Produção e purificação de penicilina G acilase**. 2003. 270f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.

PRESS, W. H. et al. **Numerical recipes: the art of scientific computing**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1986.

PSICHOGIOS, D. C.; UNGAR, L. H. A hybrid neural network: first principles approach to process modeling. **AIChE Journal**, v. 38, no. 10, p.1499-1511, 1992.

RESEARCH Collaboratory for Structural Bioinformatics: Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acesso em: 15 maio. 2005.

- RUMELHART, D. E.; McCLELLAND, J. L. and Research Group. **Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition**. Cambridge, UK: MIT Press, v. I, 1986.
- SAVIDGE, T. A.; COLE, M. Penicillin acylase (bacterial). **Methods in Enzymology**, v.43, p.705-721, 1975.
- SAVIDGE, T.A. Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. In: VANDAME, E. J. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**. New York, USA: Ed. Marcel Dekker, v. 22, p.171-224, 1984.
- SHEWALE, J. W.; SIVARAMAN, H. Penicillin Acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. **Process Biochemistry**, p.146-154, 1989.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: basic concepts**. New Jersey, USA: Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences, 1992.
- SILVA, R. G. et al. A hybrid feedforward neural network model for the cephalosporin C production process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, n.04-07, p.587-597, 2000.
- SILVA, R. G. **Inferência de variáveis do processo de produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 2003. 266f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.
- SOUZA, V. R. **Requerimentos nutricionais da produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 2003. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.
- SWARTZ, R. W. Penicillins. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology**. Oxford, UK: Pergamon Press, 1985. v.3, p.7-47.
- SZENTIRMAI, A. Production of penicillin acylase. **Applied Microbiology**, v.12, p.185-187, 1964.
- THOMPSON, M. L.; KRAMER, M. A. Modeling chemical processes using prior knowledge and neural networks. **AIChE Journal**, v.40, n.8, p.1328-1340, 1994.
- VANDAME, E. J. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**. New York, USA: Ed. Marcel Dekker, v. 22, 1984.
- Van CAN, H. J. L. et al. An efficient model development strategy for bioprocesses based on neural networks in macroscopic balances. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, n.64, p.551-566, 1997.
- VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. **Microbiology**, v.140, p. 1001-1013, 1994.
- VAZ, R.; CARLOS, E.; YOKOYA, F. Rev. Lationoam. Ing. Quim., v.8, n.79, 1978. In: SHEWALE, J. G.; SIVARAMAN, H.; Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. **Process Biochemistry**, 1989.
- VIEIRA, M. F. **Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004.
- VISNARDI, C. **Estudo de alguns aspectos do processo de produção da penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 1997. 59f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. 1997.

VOJTISEK, V.; SLEZAK, J. Folia microbiológica., v.20, 1975. In: SHEWALE, J. G.; SIVARAMAN, H.; Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. **Process Biochemistry**, 1989.