

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

THIAGO JOSÉ BARBOSA MESQUITA

**CONTROLE DE BIORREATOR COM BASE EM MODELO DE FLUXOS  
METABÓLICOS: SINTONIA DAS CONDIÇÕES DE MICROAERAÇÃO PARA  
MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *S. cerevisiae***

São Carlos

2017



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

THIAGO JOSÉ BARBOSA MESQUITA

**CONTROLE DE BIORREATOR COM BASE EM MODELO DE FLUXOS  
METABÓLICOS: SINTONIA DAS CONDIÇÕES DE MICROAERAÇÃO PARA  
MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *S. cerevisiae***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obter o título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Luperni Horta

Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

SÃO CARLOS

2017



MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE THIAGO JOSÉ BARBOSA MESQUITA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 24 DE FEVEREIRO DE 2017.

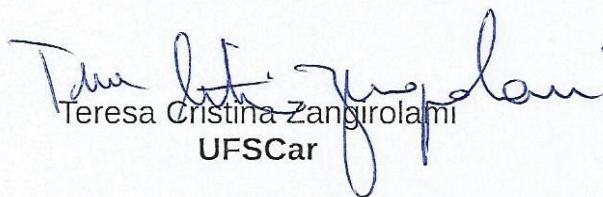
BANCA EXAMINADORA:



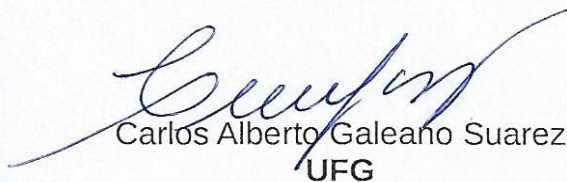
Antonio Carlos Luperni Horta  
Orientador, UFSCar



Ruy de Sousa Junior  
UFSCar



Teresa Cristina Zangirolami  
UFSCar



Carlos Alberto Galeano Suarez  
UFG



Dedico este trabalho a Ele, aos meus pais e toda a minha família que esteve dando apoio e coragem permitindo cumprir mais uma etapa que se torna mais um degrau para alcançar os sonhos.





## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial, iluminar, proteger, reservar o melhor e me renovar em todos os passos dessa caminhada pela estrada da vida, permitindo alcançar as metas. Pois Ele era e é e há de vir.

Ao meu pai, Gentil Mesquita, à minha mãe, Darlene Mesquita, ao meu irmão, Gabriel, que sempre estiveram ao meu lado, sempre querendo que realizasse tudo de maneira justa, íntegra, honrosa e sempre fazendo o meu melhor, em frente e mais além.

As minhas avós, Maria e Therezinha, por ajudar a formar meu caráter sempre demonstrando solidariedade, carinho e ternura, torcendo pelas vitórias e conquistas.

Aos meus avôs, Almir e Gentil, dedico novamente homenagem e espero continuar honrando vosso legado.

À toda minha família (tios, tias, primos e primas) que permitiram viver momentos que são indelévels e constituem meus alicerces.

Aos meus professores orientadores, Dr. Antônio Carlos Luperni Horta e Dra. Teresa Cristina Zangirolami, que foram essenciais para meu crescimento acadêmico, profissional e humano, pois acreditaram no potencial de um estudante vindo do outro extremo desse país. Sendo sempre solícitos e presentes, seja na solução de problemas, no desenvolvimento do trabalho e na partilha do valoroso conhecimento e experiência que possuem. Obrigado pela oportunidade de subir mais um degrau.

Agradeço minha banca avaliadora, prof. Roberto Giordano, prof. Ruy Souza Jr, e prof. Carlos Suarez, que dispuseram de tempo para auxiliar o trabalho com importantes sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao grupo de pesquisa, por todo apoio e suporte na execução e discussão dos resultados. Muito obrigado Dra. Cíntia Sargo, Doutorando Gilson Campani, Jr, Mestranda Sheyla Hidalgo, por toda ajuda, atenção e tempo que foram dispensados, por todo apoio, disponibilidade e parceria.

Ao mestre José Roberto Fuzer Neto, pela grande amizade cultivada ao longo dessa jornada. Obrigado pela paciência, pelas conversas, pela descontração e por todo apoio a este que veio de tão estudar.

Aos técnicos do departamento, cujo suporte permitiram a execução dos trabalhos.

Aos meus companheiros de pós-graduação e laboratório, Alice, Bruna, Diego, Camila, Eric, Kaio, Letícia, Martha, Murilo, Nayana, Valdemir, Vanessa, Vitor... Todos com os quais pude compartilhar as experiências, os risos, os congressos, a descontração, a superação, o crescimento, de maneira que auxiliaram direta e indiretamente no cumprimento das minhas atividades, deixando sempre lembranças.

Também agradeço, à CNPq, à FAPESP e à FAPEAM pelo financiamento

Muito Obrigado!!

*“A mais bela e profunda experiência é a sensação do mistério. Ela é semeadora de toda verdadeira ciência. O homem para quem essa emoção é estranha, que não mais pode se maravilhar e se sentir arrebatado de admiração, está praticamente morto”*

(Albert Einstein)

*“Tudo posso naquele que me fortalece”*  
(Filipenses 4:13)

*“No princípio era o Verbo, e o Verbo estava com Deus, e o Verbo era Deus”*  
(Filipenses 4:13)



## RESUMO

Biocombustíveis são alternativas aos combustíveis fósseis, sendo o bioetanol, produzido a partir do milho e cana de açúcar, um dos principais biocombustíveis líquidos utilizados atualmente. Para que a produção industrial de etanol atinja rendimento máximo é importante utilizar todas as frações fermentescíveis encontradas nos resíduos celulósicos. Estas frações são fermentadas anaerobicamente, o que compromete o rendimento final do produto de interesse, bem como a viabilidade celular. Além disso, a maximização da conversão desses açúcares em etanol requer o desenvolvimento de um controle preciso da suplementação de oxigênio dissolvido para manter a condição de microaerobiose. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo aumentar o rendimento e a produtividade em etanol por meio da utilização de uma estratégia inovadora de controle, baseada nos fluxos metabólicos. Para o desenvolvimento e implementação da estratégia de controle proposta o metabolismo de *S. cerevisiae*, em diferentes condições de fornecimento de glicose e oxigênio, foi simulado utilizando o software Optflux e o modelo em escala genômica *iND750*, reconstruído para *Saccharomyces cerevisiae*. As combinações de fluxos de oxigênio e substrato ideais foram empregadas para gerar correlações matemáticas, que foram utilizadas para manipular as vazões de ar, de nitrogênio e da bomba de alimentação de meio fresco e direcionar os fluxos experimentais de substrato e oxigênio para a região de maximização da produção de etanol prevista pela simulação. A lógica de controle foi implementada no programa SUPERSYS\_HCDC, utilizando a plataforma LabView 8.0. Os cinco cultivos de cerca de 12h foram realizados no modo batelada alimentada em biorreator de 5 L, utilizando *S. cerevisiae* comercial (fermento de panificação) e glicose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$  meio de cultivo e  $300 \text{ g.L}^{-1}$  meio de alimentação) como fonte de carbono em meio mínimo ( $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). A concentração celular foi acompanhada durante cultivo por medidas de densidade ótica (600 nm) e correlacionada com medidas de massa seca. A concentração de açúcares e metabólitos foi realizada pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a viabilidade celular pela contagem em câmara de Neubauer, após coloração pelo azul de metileno. O rendimento de etanol foi de  $0,48 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  para os cultivos conduzidos sob o controle de fluxos metabólicos, valor muito próximo ao rendimento teórico ( $0,51 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ ). Já no cultivo conduzido sem controle e sem fornecimento de fase gasosa (tipo “Usina”) e no cultivo estritamente anaeróbio foi observado um rendimento de  $0,32 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ . A estratégia de controle em malha fechada favoreceu baixos rendimentos em células ( $0,10 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ ) e em glicerol ( $0,056 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ ). Contudo, mesmo com a lógica de controle, os cultivos apresentaram acúmulo de substrato provocado pela inibição natural pelo produto (etanol). A estratégia de controle proposta neste trabalho pode ser estendida a outros processos, pois maximiza a produção de qualquer metabólito que seja favorecido por condições microaeróbicas.

.

Palavras-chave: Bioetanol. *Saccharomyces cerevisiae*. Controle de fluxos metabólicos. Microaeração. Fermentação Alcoólica.



## ABSTRACT

Biofuels are alternatives to fossil fuels, and bioethanol produced from corn and sugarcane is one of the main liquid biofuel currently used. To reach ethanol production maximum yield, it is important to use all fermentable fractions found in cellulosic waste. These fractions are fermented anaerobically, which compromises the final yield of the product of interest, as well as cell viability. In addition, maximizing the conversion of these sugars to ethanol requires the development of a precise control of the dissolved oxygen supplementation to maintain the microaerobic condition. The present work had as objective to increase ethanol yield and productivity by using an innovative control strategy based on the metabolic flows. To implement the proposed control strategy, *S. cerevisiae* metabolism was simulated, in different glucose and oxygen supply conditions, using the Optflux software and the iND750 genomic scale model reconstructed for *Saccharomyces cerevisiae*. The combinations of oxygen and substrate fluxes were used to generate mathematical correlations, which were used to manipulate the air, nitrogen and fresh medium feed flows to direct the substrate and oxygen experimental flows to the ethanol production maximization as predicted by the simulations. The control logic was implemented in the SUPERSYS\_HCDC program using the LabView 8.0 platform. The five cultivations, about 12 h each, were performed in fed batch mode into a 5 L bioreactor using commercial *S. cerevisiae* (baking yeast) and glucose as carbon source (30 g.L<sup>-1</sup> culture medium and 300 g.L<sup>-1</sup> feed medium) in minimal medium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,0 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,0 g.L<sup>-1</sup>, Urea 1,5 g.L<sup>-1</sup>). The cell concentration was monitored during cultivation by optical density measurements (600 nm) and correlated with dry mass measurements. The sugars and metabolites concentration was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), cell viability was monitored by cell counting in Neubauer chamber, after methylene blue coloring. Ethanol yield was 0.48 g<sub>ethanol</sub>. g<sub>substrate</sub><sup>-1</sup> for cultivations submitted to the metabolic fluxes control, which is very close to the theoretical yield (0.51 g<sub>ethanol</sub>. g<sub>substrate</sub><sup>-1</sup>). The cultivations conducted without the gas phase supply ("Usina" type) and strictly anaerobic, presented yield of 0.32 g<sub>ethanol</sub>. g<sub>substrate</sub><sup>-1</sup>. The closed-loop control strategy favored low cells yields (0.10 g<sub>cells</sub>. g<sub>substrate</sub><sup>-1</sup>) and low glycerol yields (0.056 g<sub>glycerol</sub>. g<sub>substrate</sub><sup>-1</sup>). However, even using the proposed control, the cultures presented a substrate accumulation caused by the natural product (ethanol) inhibition. The proposed control strategy can be extended to other processes, because it may maximize the production of any metabolite that is favored by microaerobic conditions.

Keywords: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Metabolic Flux Control, Microaeration, Alcoholic Fermentation.





## Lista de abreviaturas e siglas

<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato	
<b>C<sub>EtOH</sub></b>	Concentração de etanol	(g.L <sup>-1</sup> )
<b>cFP</b>	<i>Compact Fieldpoint</i>	
<b>C<sub>glicerol</sub></b>	Concentração de glicerol	(g.L <sup>-1</sup> )
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
<b>CMA</b>	Cultivo Malha Aberta	
<b>CMF</b>	Cultivo Malha Fechada	
<b>COD</b>	Concentração de Oxigênio Dissolvido	
<b>COV</b>	Composto Orgânico Volátil	
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás dióxido de carbono	
<b>Co</b>	Concentração de oxigênio	(mg.L <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>s</sub></b>	Concentração do substrato	(g.L <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>sf</sub></b>	Concentração do substrato na corrente de alimentação	(g.L <sup>-1</sup> )
<b>C(s)</b>	Função de transferência do sinal de entrada	
<b>C<sub>x</sub></b>	Concentração de massa seca	(gMs.L <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>x0</sub></b>	Concentração inicial de massa seca	(gMs.L <sup>-1</sup> )
<b>DO</b>	Densidade ótica	
<b>e(t)</b>	Sinal de erro	
<b>F</b>	Vazão da bomba	(L.h <sup>-1</sup> )
<b>Fa</b>	Fluxo de retirada de amostra	(L.h <sup>-1</sup> )
<b>FBA</b>	<i>Flux Balance Analysis</i> (Análise do Balanço de Fluxos)	
<b>FTU</b>	Fermentação Tipo Usina	
<b>FEA</b>	Fermentação Estritamente Anaeróbia	
<b>F_bomba</b>	Vazão atualizada da bomba	(L.h <sup>-1</sup> )
<b>GLP</b>	Gás Liquefeito de Petróleo	
<b>gMs</b>	Grama de massa seca	
<b>gP</b>	Grama de produto	
<b>GSMM</b>	<i>Genome Scale Metabolic Model</i>	
<b>G(s)</b>	Função de transferência do sistema	

<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico	
<b>I</b>	Controlador integral	
<b>IC</b>	Inteligência Computacional	
<b>J<sub>i</sub></b>	Fluxo de componentes (O <sub>2</sub> , Substrato...)	(mmol.gMs <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monopotássico	
<b>k<sub>LA</sub></b>	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	(h <sup>-1</sup> )
<b>K<sub>o</sub></b>	Constante de saturação	(mg.L <sup>-1</sup> )
<b>M</b>	Molar	(mol L <sup>-1</sup> )
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio	
<b>m<sub>x</sub></b>	Massa seca de células	(gMs)
<b>m<sub>x,in</sub></b>	Massa seca de células no início da alimentação	(gMs)
<b>m<sub>p</sub></b>	Massa de produto	(g)
<b>m<sub>s</sub></b>	Massa de substrato	(g)
<b>m<sub>SF</sub></b>	Massa de substrato na corrente de alimentação	(g)
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida	
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada	
<b>nCO<sub>2</sub></b>	Número de mols de CO <sub>2</sub>	(mmol)
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de amônio	
<b>nO<sub>2</sub></b>	Número de mols de O <sub>2</sub>	(mmol)
<b>N<sub>2</sub></b>	Gás nitrogênio	
<b>OD</b>	Oxigênio dissolvido	(% saturação)
<b>OTR</b>	<i>Oxygen Transfer Rate</i> (taxa de transferência de oxigênio)	(mmol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>OUR</b>	<i>Oxygen Uptake Rate</i> (taxa de assimilação de oxigênio)	(mmol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>O<sub>2</sub></b>	Gás oxigênio	
<b>P<sub>e</sub></b>	Pressão de entrada	(atm)
<b>ppm</b>	Partes por milhão	
<b>PPG</b>	Polipropileno glicol	
<b>Pr<sub>p</sub></b>	Produtividade de produto	(g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Pr<sub>x</sub></b>	Produtividade de biomassa	(g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>s</sub></b>	Pressão de saída ou do reator	(atm)
<b>Q<sub>e</sub> ou Q<sub>gas,e</sub></b>	Vazão volumétrica de gás de entrada	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>s</sub> ou Q<sub>gas,s</sub></b>	Vazão volumétrica de gás de saída	(L.min <sup>-1</sup> )

<b>Q<sub>ar</sub></b>	Vazão volumétrica de ar	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>ar,atua</sub></b>	Vazão recebida pelo fluxômetro de ar	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>ar,calc</sub></b>	Vazão calculada e enviada para o fluxômetro de ar	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>N2</sub></b>	Vazão volumétrica de nitrogênio industrial	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>N2,atua</sub></b>	Vazão recebida pelo fluxômetro de N <sub>2</sub>	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>N2,calc</sub></b>	Vazão calculada e enviada para o fluxômetro de N <sub>2</sub>	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>qO<sub>2</sub></b>	Velocidade específica de consumo de oxigênio	(mmol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Q<sub>O2,e</sub></b>	Vazão volumétrica de entrada de oxigênio	(L.min <sup>-1</sup> )
<b>R</b>	Constante universal dos gases	(atm.L.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )
<b>r<sub>i</sub></b>	Velocidade de consumo ou produção de um componente i	(mmol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>RNA's</b>	Redes Neurais Artificiais	
<b>rpm</b>	Rotações por minuto	
<b>RQ</b>	Quociente respiratório	
<b>RQ<sub>calc</sub></b>	Quociente respiratório calculado	
<b>RQ<sub>menor</sub></b>	Limite superior RQ	
<b>RQ<sub>maior</sub></b>	Limite inferior RQ	
<b>R(s)</b>	Função de transferência do sinal de saída	
<b>t</b>	Tempo	(h)
<b>t<sub>bat</sub></b>	Tempo final da batelada	(h)
<b>t<sub>cult</sub></b>	Tempo de cultivo	(h)
<b>T<sub>e</sub></b>	Temperatura de entrada	(K)
<b>T<sub>s</sub></b>	Temperatura de saída ou do reator	(K)
<b>u(t)</b>	Sinal do controlador	
<b>V</b>	Volume	(L)
<b>V<sub>ad</sub></b>	Volume alimentado acumulado	(L)
<b>V<sub>ret</sub></b>	Volume retirado acumulado	(L)
<b>V<sub>in</sub></b>	Volume no início da alimentação	(L)
<b>V<sub>0</sub></b>	Volume no início do cultivo	(L)
<b>vvm</b>	<i>Vessel volume per minute</i> (Volume de ar por volume de meio por minuto)	
<b>y<sub>CO2,ar</sub></b>	Fração de dióxido de carbono no ar	
<b>y<sub>CO2,e</sub></b>	Fração de dióxido de carbono no gás de entrada	

$y_{CO_2,N_2}$	Fração de dióxido de carbono no nitrogênio industrial	
$y_{CO_2,s}$	Fração de dióxido de carbono no gás de saída	
$y_{O_2,ar}$	Fração de oxigênio no ar	
$y_{O_2,e}$	Fração de oxigênio no ar nos gás de entrada	
$y_{O_2,N_2}$	Fração de oxigênio no nitrogênio industrial	
$y_{O_2,s}$	Fração de oxigênio no ar nos gás de saída	
<b>YPD</b>	<i>Yeast extract, Peptone and Dextrose</i>	
$Y_{P/S}$	Rendimento de produto por substrato	(gP. g substrato <sup>-1</sup> )
$Y_{X/S}$	Rendimento de biomassa por substrato	(gMs.g substrato <sup>-1</sup> )

### Letras Gregas

$\Delta$	Incremento ou decremento de variáveis	
$\Delta t$	Variação de tempo (iteração da lógica)	(h)
$\mu$	Taxa específica de crescimento	(h <sup>-1</sup> )
$\mu_p$	Taxa específica de produção de produto	(gP.gMs <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )

## Índice de ilustrações

FIGURA 1 - Emissão de CO <sub>2</sub> no Brasil .....	28
FIGURA 2 - Rede metabólica simplificada de <i>S. cerevisiae</i> . .....	34
FIGURA 3 - Representação esquemática de um sistema de controle .....	40
FIGURA 4 - Diagrama de blocos simplificado para malha aberta.....	43
FIGURA 5 - Diagrama de blocos de um sistema de controle malha fechada.....	44
FIGURA 6 - Representação esquemática da estratégia experimental proposta .....	50
FIGURA 7 - Fluxograma para o sistema de controle em malha aberta .....	58
FIGURA 8 - Fluxograma para o sistema de controle em malha fechada.....	59
FIGURA 9 - Pseudocódigo da atuação do controle de vazões.....	60
FIGURA 10 - Pseudocódigo para vazão de gás de entrada.....	61
FIGURA 11 - Pseudocódigo da heurística de controle proposta para a malha fechada. 62	
FIGURA 12 - Sistema controle e aquisição .....	64
FIGURA 13 - Analisador de Gases e cFP .....	65
FIGURA 14 - Modelo linear para os pontos ótimos de produção de etanol .....	72
FIGURA 15 - Fluxo de oxigênio durante a fase de alimentação até o fim do cultivo CMA: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), setpoint (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). .....	73
FIGURA 16 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo CMA: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), setpoint (—) e vazão da bomba de alimentação (—). .....	73
FIGURA 17 – Perfil do fluxo de etanol no cultivo CMA. Sendo (■) fluxo off-line e (●) fluxos simulados pelo Optflux.....	75
FIGURA 18 - Perfil do cultivo CMA sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação. ....	76
FIGURA 19 - Produtividade específica de etanol (●), glicerol (▼) e $\mu$ (■) no CMA. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação.....	78
FIGURA 20 - Logaritmo da massa seca de células com tempo durante alimentação no CMA. ....	78

FIGURA 21 – Comparação do quociente respiratório com vazões de CMA. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim do meio de alimentação. São apresentados RQ (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). .....	81
FIGURA 22 - Comparação do quociente respiratório com $rO_2$ e $rCO_2$ no CMA. São apresentados RQ (—), velocidade de consumo de $O_2$ (—) e velocidade de produção de $CO_2$ (—).....	81
FIGURA 23 - Modelo para fluxo de oxigênio. Pontos simulados (■). Pontos simulados de fluxo ótimo de etanol (■) em destaque .....	83
FIGURA 24 - Modelo linear para relação $J_s$ em função de $JO_2$ . Pontos simulados (■). Pontos simulados com fluxo ótimo de etanol (■), em destaque.....	83
FIGURA 25 - Fluxo de oxigênio durante a fase de alimentação no CMF1 até o fim do cultivo: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) fim do meio de alimentação. ....	84
FIGURA 26 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo CMF1: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■) e vazão da bomba de alimentação (—). ...	85
FIGURA 27 - Perfil do fluxo de etanol no cultivo CMF1. Sendo (■) fluxo off-line e (●) fluxos simulados pelo Optflux.....	86
FIGURA 28 - Comparação do quociente respiratório com vazões de gases no CMF1: RQ calculado online (—), RQ calculado offline (■), limite inferior do controle (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) início da lógica de controle, (b) adição do PPG e (c) fim do meio de alimentação.....	87
FIGURA 29 - Comparação do quociente respiratório com $rO_2$ e $rCO_2$ no CMF1. São apresentados RQ (—), velocidade de consumo de $O_2$ (—) e velocidade de produção de $CO_2$ (—).....	87
FIGURA 30 - Perfil do cultivo CMF1 em sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação .....	88
FIGURA 31 - Massa produzida ao longo do cultivo CMF1 .....	89
FIGURA 32 - Logaritmo da massa seca de células com tempo durante alimentação no CMF1 .....	90
FIGURA 33 - Produtividade específica de etanol (●), glicerol (▼) e $\mu$ (■) no CMF1. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação.....	91
FIGURA 34 – Volume usado de nitrogênio.....	94

FIGURA 35 - Fluxo de oxigênio no cultivo CMF2. Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) fim do meio de alimentação.....	96
FIGURA 36 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo CMF2: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), vazão da bomba de alimentação (—) e perfil de alimentação aproximado (—).....	97
FIGURA 37 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo FTU: Fluxo off-line (■) e vazão da bomba de alimentação (—).....	98
FIGURA 38 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo FEA: Fluxo off-line (■) e vazão da bomba de alimentação (—).....	98
FIGURA 39 - Comparação dos fluxos de CO <sub>2</sub> .....	99
FIGURA 40 - Comparação do quociente respiratório com vazões de gases no cultivo CMF2: RQ calculado online (—), RQ calculado offline (■), limite do controle (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) início da lógica de controle e (b) fim do meio de alimentação.....	100
FIGURA 41 - Comparação do quociente respiratório com rO <sub>2</sub> e rCO <sub>2</sub> no cultivo CMF2. São apresentados RQ (—), velocidade de consumo de O <sub>2</sub> (—) e velocidade de produção de CO <sub>2</sub> (—).....	101
FIGURA 42 - Perfil do fluxo de etanol no cultivo CMF2. Sendo (■) fluxo off-line e (●) fluxos simulados pelo Optflux.....	102
FIGURA 43 - Perfil do cultivo CMF2 sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo de O <sub>2</sub> dissolvido e (c) fim da lógica de alimentação.....	103
FIGURA 44 - Comparativo entre os fluxos de células simulados e de células viáveis	105
FIGURA 45 - Comparativo entre os fluxos de células simulados e fluxos calculados pelos dados do FOGALE.....	106
FIGURA 46 - Perfil do cultivo FTU sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica e (b) fim da lógica de alimentação .....	107
FIGURA 47 - Perfil do cultivo FEA sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica e (b) fim da lógica de alimentação .....	108

FIGURA 48 - Produtividade específica de etanol (●), glicerol (▼) e $\mu$ (■) no cultivo CMF2. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação .....	109
FIGURA 49 - Comparativo entre produtividades de etanol das estratégias de fermentação. Sendo (■) CMF2, (●) FTU e (▲) FEA .....	111
FIGURA 50 - Comparativo entre produtividades de glicerol das estratégias de fermentação. Sendo (■) CMF2, (●) FTU e (▲) FEA .....	111
FIGURA 51 - Comparativo entre produtividades de células das estratégias de fermentação. Sendo (■) CMF2, (●) FTU e (▲) FEA .....	112
FIGURA 52 - Relação linear concentração celular e DO para CMA .....	131
FIGURA 53 - Relação linear concentração celular e DO para CMF1 .....	131
FIGURA 54 - Relação linear concentração celular e DO para CMF2 .....	132
FIGURA 55 - Relação linear concentração celular e DO para FTU .....	132
FIGURA 56 - Relação linear concentração celular e DO para FEA .....	133



## Índice de tabelas

TABELA 1 - Características de um biocatalisador ideal para hidrolisados de material .....	32
TABELA 2 - Concentrações em cada estágio do CMA.....	79
TABELA 3 - Parâmetros cinéticos globais do CMA .....	79
TABELA 4 - Produtividades médias do CMA.....	80
TABELA 5 - Concentrações em cada estágio do CMF1 .....	91
TABELA 6 - Parâmetros globais do CMF1 .....	92
TABELA 7 - Produtividades médias do CMF1 .....	93
TABELA 8 - Comparação dos diversos parâmetros do cultivo ao fim da alimentação de ambas estratégias .....	93
TABELA 9 - Comparativo dos parâmetros das estratégias de fermentação .....	110
TABELA 10 – Comparativo dos resultados obtidos com dados da literatura .....	113
TABELA 11 - Resultado dos estudos in silico realizados pela Dra. Cíntia Sargo, utilizando o modelo metabólico IND750 (DUARTE, HERRGÅRD e PALSSON, 2004). Análise da influência do fluxo de consumo de oxigênio nos fluxos de produção de biomassa, CO <sub>2</sub> e etanol (neste caso considerando um fluxo de glicose de 3 mmol.gMs <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ). *Destaque para o fluxo denominado de ótimo de consumo de oxigênio, para produção de etanol.....	129
TABELA 12 – Produção de etanol ao adotar diferentes fluxos de consumo de oxigênio (considerando um fluxo de glicose 3 mmol.gMs <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> .* Em destaque o fluxo de O <sub>2</sub> que proporcionou uma produção de 90% em relação ao fluxo máximo de etanol. ....	130



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1	Objetivos .....	26
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
2.1	Combustíveis .....	27
2.1.1	Combustíveis Fósseis .....	27
2.1.2	Biocombustíveis .....	28
2.1.3	Etanol.....	31
2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e outras leveduras.....	32
2.2.1	Características Gerais do Metabolismo .....	32
2.2.2	Papel do Oxigênio .....	34
2.2.3	Microaeração .....	36
2.3	Otimização e controle de bioprocessos.....	38
2.3.1	Biologia de Sistemas .....	40
2.3.2	Malha Aberta vs Malha Fechada .....	42
2.3.3	<i>Softsensors</i> .....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	Microrganismo .....	49
3.2	Modelo Computacional .....	49
3.2.1	Estratégia de Controle .....	49
3.2.3	Controle dos Fluxos de Consumo de Oxigênio e de Substrato .....	52
3.2.4	Ajustes do Controle e do Softsensor.....	60
3.2.5	Estudos in silico.....	63
3.2.6	Sistema de Aquisição .....	63
3.3	Cultivos Batelada Alimentada de <i>S. cerevisiae</i> em Biorreator .....	65
3.3.1	Obtenção dos parâmetros de desempenho dos cultivos.....	66
3.4	Metodologia analítica .....	68
3.4.1	Concentração Celular .....	68
3.4.2	Concentração de Açúcares e Metabólitos.....	69
3.4.3	Viabilidade celular.....	70
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
4.1	Desempenho das estratégias de controle.....	71
4.1.1	Estratégia de Controle em Malha Aberta (CMA).....	71

4.1.2	Estratégia de Controle em Malha Fechada (CMF1) .....	82
<b>4.2</b>	<b>Desempenho das estratégias de fermentação .....</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE.....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>119</b>
	<b>ANEXO A – RESULTADOS OBTIDOS PELAS SIMULAÇÕES .....</b>	<b>129</b>
	<b>APÊNDICE A – CORRELAÇÕES LINEARES ENTRE CONCETRAÇÃO CELULAR E DENSIDADE ÓTICA .....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de produtos químicos e energia usando a fermentação de recursos renováveis tem recebido atenção como uma rota alternativa aos processos petroquímicos. Como exemplo, têm-se o uso da biomassa para produção de produtos como acetona (MAY *et al.*, 2012), ácido lático (YE *et al.*, 2013), ácido acrílico (HUN *et al.*, 2015) e bioetanol (TALEBNIA, 2015).

O etanol, como substituto energético, já atingiu certa maturidade e apresenta real impacto na redução do consumo de gasolina e óleo diesel. Esse álcool quando produzido a partir da cana de açúcar torna-se competitivo devido aos ganhos econômicos, estratégicos e ambientais. O etanol de cana de açúcar não apresenta tantas impurezas como a gasolina, como compostos sulfurados e particulados, além de apresentar menor custo de produção e menor impacto na relação combustível/alimentos comparado ao etanol proveniente de milho ou outros grãos. Porém é necessária uma utilização completa e eficiente das frações de açúcares disponíveis, a fim de aumentar ainda mais a produtividade e diminuir a geração de resíduos (VAN MARIS *et al.*, 2006; GOLDEMBERG, 2011).

Dentre os processos de fermentação alcoólica, a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o mais comum, pois se sabe que esta espécie produz de maneira eficiente etanol usando hexoses como substrato, além de apresentarem boa tolerância ao álcool etílico produzido e a outros componentes inibitórios (WATANABE, 2013).

Contudo, essa levedura, quando submetida à anaerobiose assimila a fonte de carbono mais lentamente, e se o processo for longo, a viabilidade celular e a produção de etanol são comprometidas (CASTRO, 2013).

Portanto para que se eliminem rotas competitivas e se minimize o surgimento de produtos secundários, é preciso adotar medidas de controle com intuito de aumentar o rendimento do produto desejado. A utilização dos açúcares por *S. cerevisiae* representa um processo que requer atenção, porque o fornecimento de oxigênio precisa ser suficiente para atender as necessidades metabólicas, diminuindo o desequilíbrio redox, mas sem estimular a respiração celular. Caso a respiração seja ativada, a célula altera o modo de operação diminuindo o rendimento em etanol e aumentando a biomassa celular formada (PITKÄNEN, *et al.*, 2003).

Cultivos em condições microaeróbias ou sob limitação por oxigênio (concentração de oxigênio dissolvido menor que 1,5%) são utilizados industrialmente para obter diversos

produtos, tais como 2-3 butanodiol (FRANZÉN, 2003); vacinas contra organismos patogênicos como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e outros (TAKAGI et al., 2006; MARTHOS et al., 2015; VAN DE WATERBEEMD et al., 2013) e no tratamento de águas residuárias (CARIUS et al., 2014), além do etanol 1G e 2G. Apesar da importância, há poucos estudos na literatura que tratam do controle do fornecimento de O<sub>2</sub> em condições microaerófilas. Destes, a maioria ainda aborda o problema sob a ótica do controle convencional *feedback*, baseado na medida da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido (da ordem de ppm) por sensores altamente sensíveis, que são caros e de curta durabilidade (CARIUS et al., 2014). Está claro que a estratégia convencional não é adequada para o problema de controle do fornecimento de O<sub>2</sub> em condições limitadas.

Assim, o principal desafio reside no desenvolvimento de um controle para o fornecimento de oxigênio robusto, integrado às respostas fisiológicas das células, com intuito de maximizar a obtenção de bioetanol, que favoreça o máximo aproveitamento das fontes de carbono para geração do produto de interesse.

## 1.1 Objetivos

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um controle da distribuição dos fluxos metabólicos de *S. cerevisiae* para obtenção de etanol, a partir de variáveis como: fluxo de oxigênio, fluxo de glicose, vazão de ar e vazão de nitrogênio.

E os objetivos específicos, para auxiliar a atingir o geral, serão:

- Aplicar conhecimento da biologia de sistemas para identificar a faixa de fluxos de oxigênio e substrato que maximizam os fluxos em etanol e minimizam os fluxos em produtos indesejados;
- Estabelecer um softsensor baseado na estimativa e análise dos fluxos metabólicos em tempo real;
- Implementar sistema de controle dos fluxos de substrato e de oxigênio para processos microaeróbios;
- Avaliar o desempenho dos cultivos conduzidos sob as novas estratégias de controle.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Combustíveis

De maneira prática, combustíveis são substâncias de composição variada que quando queimadas produzem energia. O cenário mundial se encontra em um estado de transição entre as fontes não renováveis, caso dos combustíveis fósseis, e as fontes renováveis, como os biocombustíveis (SCHOBERT, 2013).

#### 2.1.1 Combustíveis Fósseis

A formação de combustíveis fósseis é resultado da decomposição de matéria orgânica, logo apresentam uma grande quantidade de carbonos. Eles contêm componentes químicos derivados de outros compostos de origem biológica, por exemplo a existência de uma quantidade considerável de compostos opticamente ativos indica que a origem são outras moléculas quirais produzidas em processos bioquímicos. São exemplos dessa classe de combustíveis: o carvão, o gás natural e o petróleo (SCHOBERT, 2013).

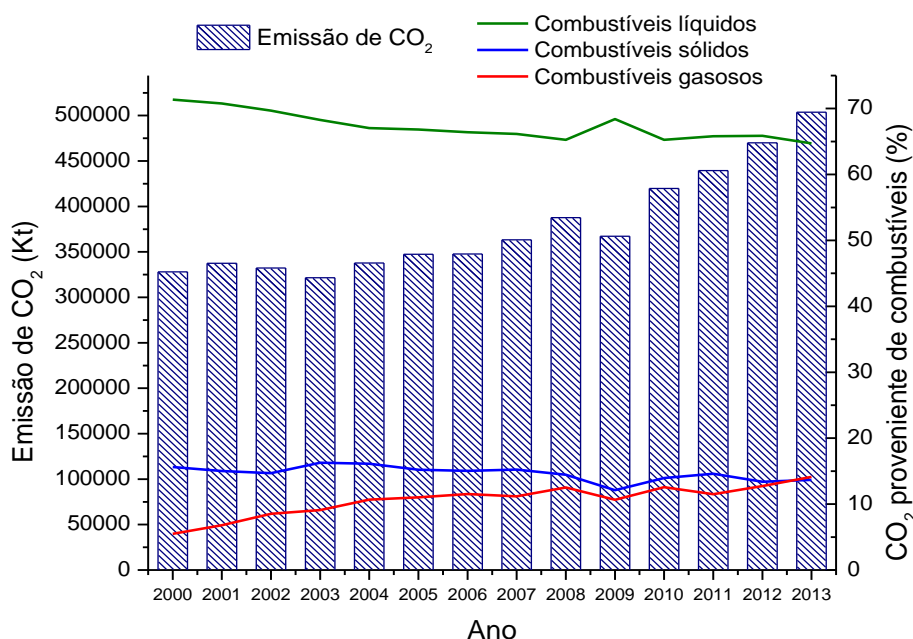
Usando esses materiais como matéria prima é possível obter uma série de derivados com características físico-químicas distintas. A partir do petróleo é possível produzir uma grande variedade de materiais sintéticos e outros compostos químicos devido a sua natureza complexa, tais compostos como hexano e tolueno são usados como solventes orgânicos (TANKIEWICZ, MORRISON e BIZIUK, 2013). Contudo o principal objetivo é usá-lo para o fornecimento de energia. Ele pode ser convertido em produtos gasosos de valor comercial, que incluem propano, etano, GLP (Gás Liquefeito de Petróleo) e hidrogênio; e também combustíveis líquidos, como gasolina, diesel e óleo combustível (CURLEY, 2012).

Contudo essas substâncias apresentam riscos ao meio ambiente associado ao uso e exploração. A combustão emite para atmosfera espécies químicas nitrogenadas e sulfuradas, compostos orgânicos voláteis (COVs) e metais pesados. Conseqüentemente o acúmulo acarreta fenômenos de grande impacto ambiental e social (SINGH e SINGH, 2012).

A economia industrial ainda é dependente de energias não renováveis, e um aumento da demanda energética requer uma quantidade maior de combustíveis fósseis gerando um aumento nas emissões de poluentes ambientais. Percebe-se, então, que a energia tem um papel fundamental na produtividade e crescimento (AYRES e AYRES, 2010).

No Brasil, de acordo com dados do Banco Mundial (FIGURA 1), a emissão de CO<sub>2</sub> está aumentando gradativamente desde 2006, sendo utilizados principalmente combustíveis na forma líquida. Por isso o uso de opções à neutralidade na emissão de gás carbônico é de fundamental importância para minimização desse fenômeno. Contudo, a fim de ser usada de forma substancial, essa solução alternativa precisa ter um bom rendimento energético e econômico que justifiquem a utilização (FAIRLEY, 2011).

FIGURA 1 - Emissão de CO<sub>2</sub> no Brasil



Fonte: [www.worldbank.org](http://www.worldbank.org)

### 2.1.2 Biocombustíveis

O uso de biomassa para geração de energia é uma das alternativas ao uso de combustíveis fósseis. São denominados de biocombustíveis as substâncias cuja energia é obtida através do processo de fixação biológica de carbono, ou seja, a fonte energética é produzida por um ser vivo. Devido à variedade de formas em quem podem ser encontrados, os biocombustíveis são subdivididos em quatro classes: primeira geração, segunda geração, terceira geração e quarta geração (SCHOBERT, 2013).

Biocombustíveis de primeira geração são produzidos diretamente de uma cultura agrícola. São explorados principalmente plantações cujo amido, açúcar, óleos vegetais e até



gorduras animais possam ser transformadas em uma fonte energética. Os açúcares na forma de amido, presentes em cultivos de milho e batata, ou sacarose, presentes em cultivos de beterraba e cana de açúcar, podem ser convertidos por intermédio da fermentação alcoólica em etanol, enquanto óleos vegetais e gorduras podem ser submetidos ao processo de transesterificação para produção do chamado biodiesel. Dentro dessa primeira classe de combustíveis verdes também se encontram o biogás, produzido pela digestão anaeróbia de matéria orgânica, e os bioéteres, gerados por reações de desidratações de álcoois (GOLDEMBERG, 2011; SCHOBERT, 2013).

Dentre essas opções a produção do etanol tem sido a de maior expansão e emprego. O etanol obtido apresenta um teor baixo de impurezas quando comparado à gasolina e o processo de fermentação alcoólica é uma tecnologia dominada. O uso dessa substância também apresenta uma forma de diminuir a dependência energética de fontes fósseis e como uma nova fonte de investimento e emprego nas áreas rurais (FARRELL, 2006; WALKER, 2010; FAIRLEY, 2011).

Como já explicitado anteriormente é possível obter etanol usando como fonte diferentes tipos de cultivares, porém existem certos impasses que devem ser levados em consideração no processo. Um deles se encontra no fato que, diferente da cana de açúcar, os custos de produção de etanol usando milho ou trigo são maiores e podem apresentar rendimentos baixos devido à relação amido e proteína presentes nessas espécies vegetais, uma vez que uma quantidade alta de proteínas interfere na quantidade de amido disponível que será metabolizado pelo microrganismo. Toda a energia necessária para processamento da cana de açúcar pode ser obtida a partir da queima do bagaço. Já os grãos necessitam de um beneficiamento maior e de outras fontes de energia para seu processamento (WALKER, 2010; CHERUBINI, 2010; RENÓ, *et al.*, 2014).

O uso dos grãos como fonte de energia também encontra outro impasse no campo econômico e social. Além de serem necessárias medidas protecionistas e subsídios por parte do governo, é necessário um cuidado quanto a frações de recursos empregados na produção de alimentos, fibras e energia (CHERUBINI, 2010; SANTOS, GÓMEZ e BUCKERIGDE, 2011; NAIK, *et al.*, 2010).

O uso da cana de açúcar (*Saccharum L.*) é o que mais se aproxima de uma exceção a essa regra. Essa espécie vegetal apresenta a capacidade de coprodução de alimentos e combustíveis, sendo a dualidade alimentos/energia muito baixa. Em relação ao balanço de carbono ele é praticamente nulo, pois a quantidade de CO<sub>2</sub> emitido (que inclui todo o

processo até a queima do combustível) é praticamente a mesma assimilada durante o desenvolvimento da cultura (JAMES, 2004; SANTOS *et al.*, 2012).

Contudo apesar das vantagens estratégicas da cana de açúcar ainda existem algumas limitações. Uma delas se refere à fertilidade do solo, o uso constante de plantações de cana de açúcar em uma determinada região diminui gradualmente a viabilidade do solo por reduzir as fontes de fósforo e potássio, levando a custos adicionais para o plantio ao se utilizar suplementos sintéticos (TAIZ e ZEIGER, 2002). Outra limitação se refere ao clima: é uma espécie que cresce predominantemente em regiões tropicais e subtropicais de clima quente não apresentando crescimento apreciável em regiões temperadas. Os resíduos gerados também precisam de uma destinação adequada para que a sustentabilidade requisitada pelo uso da espécie vegetal seja alcançada (IRVINE, 2004; CHEESMAN, 2004; HEIN e LEEMANS, 2012; RENÓ, *et al.*, 2014).

Com intenção de superar parte dos obstáculos encontrados nos biocombustíveis de primeira geração, desenvolveram-se os biocombustíveis de segunda geração ou biocombustíveis avançados.

O que diferencia essas duas classes de substâncias é a matéria prima empregada. Geralmente são explorados materiais lignocelulósicos provenientes da agroindústria, da silvicultura ou de plantações específicas voltadas para produção de lignocelulose. Ao contrário da primeira geração, cuja fração usada para gerar energia é pequena quando comparada ao restante da biomassa, a segunda geração aproveita toda a espécie vegetal. Essa classe de biocombustíveis propõe uma maior eficiência no uso da terra e eficiência ambiental. O termo segunda geração varia para matéria prima, rotas de conversão e produto final. De maneira geral o termo é empregado para materiais vegetais que tiveram sua função principal já exaurida, por exemplo, óleo vegetal usado (CHERUBINI, 2010; NAIK, *et al.*, 2010; SIMS, *et al.*, 2010; SANTOS, GÓMEZ e BUCKERIGDE, 2011).

Quanto aos métodos extrativos dos açúcares presentes na matéria lignocelulósica, esses são divididos em processos termoquímicos e bioquímicos. A gaseificação é um procedimento termoquímico que consiste em manter a matéria orgânica exposta a altas temperaturas e um ambiente com baixas concentrações de oxigênio. Dessa forma é produzido o gás de síntese que pode ser usado diretamente em outro momento do processo ou serve de intermediário para outros componentes químicos. Outro processo termoquímico é a pirólise cuja temperatura de trabalho é intermediária e o ambiente está isento de oxigênio, produzindo bio-óleo, carvão e gases leves semelhantes ao gás de síntese. Os processos bioquímicos são conduzidos em temperaturas mais brandas e velocidades de reação menores, e estão divididos

em digestão anaeróbia e processos fermentativos. A digestão anaeróbia envolve uso de bactérias para o consumo da matéria orgânica em ambiente com ausência de oxigênio produzindo principalmente biogás. Os processos fermentativos fazem uso de uma gama de microrganismos e enzimas que tenham a capacidade de transformar o substrato sólido ou líquido em um produto recuperável, geralmente álcoois e ácidos orgânicos. Usando esses métodos para transformar a matéria vegetal é possível, então, a produção de substâncias como metanol, biohidrogênio, biodiesel de Fischer-Tropsch e o etanol celulósico (CHERUBINI, 2010; NAIK, *et al.*, 2010; SIMS, *et al.*, 2010; SANTOS, GÓMEZ e BUCKERIGDE, 2011).

Quanto aos biocombustíveis de terceira geração, conhecidos como biocombustíveis de algas, podem ser produzidos onde CO<sub>2</sub>, água e os nutrientes tenham disponibilidade adequada. Os biocombustíveis de quarta geração, por sua vez, abrangem os chamados biocombustíveis solares. Essa classe inclui a biologia sintética, na qual organelas sintéticas são produzidas ou as organelas existentes são modificadas com foco inicial na capacidade de fotossíntese, e os eletrobiocombustíveis, produzidos pela combinação da produção de biocombustível microbiano com o processo fotovoltaico (ARO, 2016).

### 2.1.3 Etanol

A produção de biocombustíveis por rota bioquímica é feita em três etapas principais: pré tratamento do resíduo, sacarificação dos polissacarídeos e fermentação dos açúcares pelos microrganismos. Entre os biocombustíveis mais conhecidos, o bioetanol ou etanol de segunda geração é um dos que tem tido expressão no mercado (TALEBNIA, 2015). Para a transformação do resíduo em etanol se utiliza o processo biológico conhecido como fermentação alcoólica. Para que ele ocorra da melhor forma possível é necessário um microrganismo capaz de preencher uma série de características consideradas essenciais ao processo (Tabela 1). Entre os microrganismos existentes e capazes de realizar a fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a que preenche a maior parte dos requisitos sugeridos (ZALDIVAR, NIELSEN e OLSSON, 2001).

TABELA 1 - Características de um biocatalisador ideal para hidrolisados de material

Características essenciais	Características desejadas
Ampla utilização de tipos de substratos	Uso simultâneo de açúcares
Rendimentos e produtividade de etanol consideráveis	Capacidade de quebra da celulose e hemicelulose
Mínima formação de produtos secundários	Status de “ <i>Generally regarded as safe</i> ” (Seguro a saúde humana)
Alta tolerância ao etanol	Reutilizável
Tolerância a possíveis inibidores	Suplementação mínima de nutrientes
Tolerância ao processo	Tolerância a pH baixos e altas temperaturas

Fonte: Adaptado de ZALDIVAR, NIELSEN e OLSSON (2001)

Quanto à fonte de carbono a ser consumida, os processos de fermentação de hexoses já estão consolidados. Contudo, para as pentoses, como a xilose, isso já não pode ser afirmado, pois é necessária a aplicação de metodologias que contornem a baixa assimilação por parte das leveduras. O uso de todos os açúcares disponíveis no substrato lignocelulósico pode ser um requisito essencial para a produção eficiente de etanol (LEE, 1997; SIMS *et al.*, 2010) e sucesso da biorrefinaria, contanto que todas as questões técnicas e econômicas pertinentes sejam consideradas (FURLAN *et al.*, 2012)

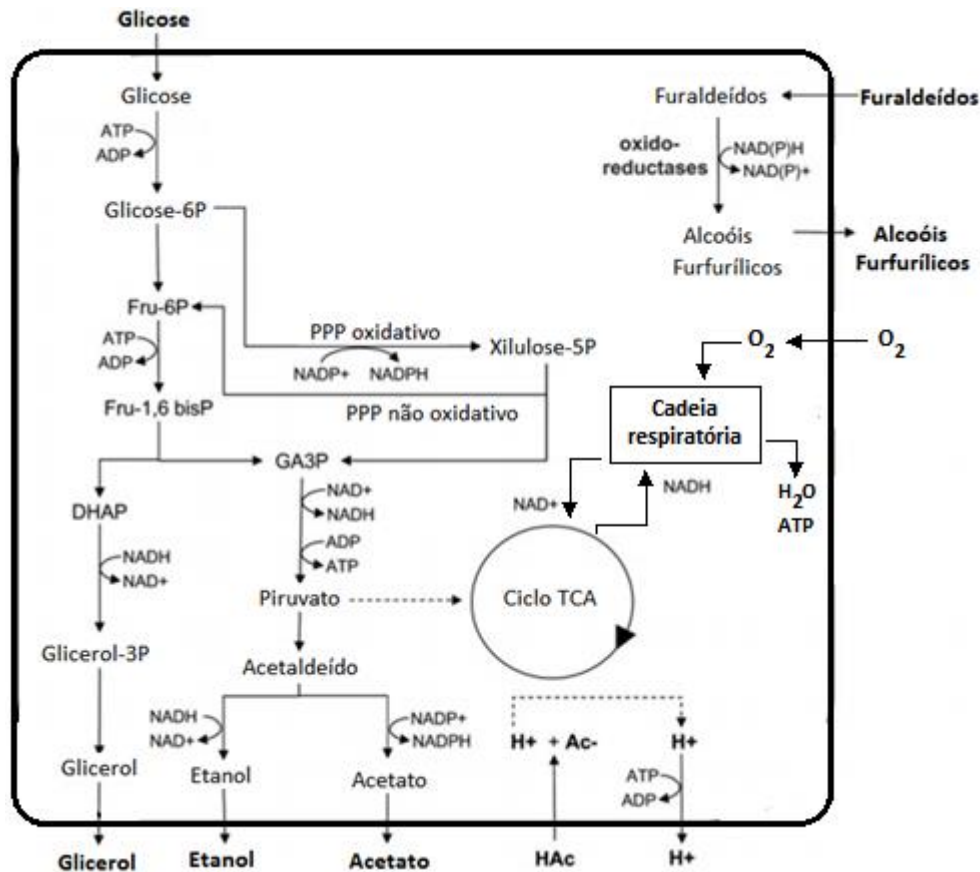
## 2.2 *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras

### 2.2.1 Características Gerais do Metabolismo

As leveduras têm sido utilizadas pela humanidade de maneira direta e indireta por muito tempo. O principal exemplo dessa interação é a produção de bebidas alcoólicas pela levedura *S. cerevisiae* e consumo dessas bebidas por várias civilizações ao longo do curso da história. É um dos microrganismos mais estudados, tendo seu genoma sequenciado. Ela é capaz de produzir a energia que precisa para o desenvolvimento na presença de oxigênio (aeróbio) ou na ausência desse componente químico (anaeróbio). Logo, a quantidade de oxigênio disponível e o tipo de substrato empregado irão definir o metabolismo, indo desde do completamente aeróbio oxidativo até o fermentativo (BRIGGS, *et al.*, 2004; KUNZE, 2004; TENGE, 2009; PIRES e BRÁNYIK, 2015).

O metabolismo é altamente regulado, e esse controle é exercido pela regulação da expressão de proteínas e enzimas (nível genético) e pela produção enzimática (nível fenotípico). O transporte de substratos para dentro e para fora dos compartimentos celulares também exerce uma regulação das vias metabólicas. Estímulos externos também são capazes de ativar ou reprimir certas rotas metabólicas, sendo um deles a presença de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Quando exposta a um excesso de oxigênio ocorre o efeito Pasteur: o processo fermentativo é inibido e a produção de biomassa aumenta, já que se torna mais vantajoso produzir energia pela fosforilação oxidativa. Outro fenômeno interessante que ocorre com as leveduras é o chamado efeito de Crabtree, quando, em presença de uma alta concentração de glicose mesmo em condições aeróbias, o metabolismo da célula é direcionado para fermentação e produção de álcool, conseqüentemente diminuindo o consumo de oxigênio (BRIGGS, *et al.*, 2004; KUNZE, 2004; TENGE, 2009; PIRES e BRÁNYIK, 2015).

Um fator essencial para o funcionamento adequado do metabolismo celular é a manutenção do equilíbrio redox. Como mostra a FIGURA 2, as reações de oxidação dos carboidratos geram difosfopiridina nucleotídeo reduzidas (NADH) e a célula apresenta uma quantidade finita de  $\text{NAD}^+$ . Logo, para manter o funcionamento das vias glicolíticas, as células devem manter o suprimento de difosfopiridina nucleotídeo oxidado ( $\text{NAD}^+$ ). Em um crescimento plenamente aeróbio, NADH é reoxidado devido à cadeia de transporte de elétrons presente na fosforilação oxidativa. Nesse caso o último acceptor de elétrons é o oxigênio e água é formada. Em um processo fermentativo (microaeróbio ou anaeróbio), os fluxos pelas vias oxidativas são reduzidos, portanto a produção de energia e a regeneração de  $\text{NAD}^+$  são mediante a redução do acetaldeído em etanol, produção de polióis (ex.: glicerol) e ácidos orgânicos (ex.: piruvato, fumarato e succinato) (BRIGGS, *et al.*, 2004; KUNZE, 2004; TENGE, 2009; PIRES e BRÁNYIK, 2015). E se a condição de ausência de oxigênio é prolongada, a produção de etanol diminui e a produção de glicerol é estimulada (NELSON e COX, 2014)

FIGURA 2 - Rede metabólica simplificada de *S. cerevisiae*.

Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* (2011)

### 2.2.2 Papel do Oxigênio

A presença do oxigênio é essencial na regulação do metabolismo, influenciando na distribuição do fluxo de carbono na célula e, conseqüentemente, na viabilidade das células expostas por muito tempo às diversas concentrações de oxigênio.

A quantidade de oxigênio necessária para cada cepa é uma variante genética, e está relacionada com a quantidade de esteróis e ácidos graxos que são consumidos e produzidos. Nenhuma levedura pode se desenvolver de maneira eficiente em um ambiente anaeróbico sem suplementação de esteróides e ácidos graxos. Esses metabólitos podem ser assimilados do meio ou sintetizados a partir de carboidratos, porém é preciso a presença de oxigênio para formação desses compostos no último caso (BRIGGS *et al.*, 2004). Lai e colaboradores

(2006) avaliaram o transcriptoma da *S. cerevisiae* frente a anoxia e posterior reoxigenação. Notou-se que o genoma da levedura é sensível aos níveis de oxigênio presentes e o estado metabólico que a célula apresenta influenciam nos genes que são ativados, sendo que um número maior de genes é ativado quando o metabolismo é alterado para anaerobiose do que quando é alterado para aerobiose.

Verbelen e colaboradores (2009) realizaram fermentações de alta densidade celular usando uma cepa de levedura cervejeira em distintos modos de aeração (concentrações de oxigênio de 0,8; 7,8; e 51,8 ppm), com intuito de investigar as alterações fisiológicas e metabólicas. Os dados demonstram que a expressão de um grupo determinado de genes no início do processo de fermentação determinou o curso posterior do processo. A exposição de uma etapa à pré-oxigenação forneceu uma resposta ao estresse, tornando as células mais robustas às mudanças nos níveis de aeração. Os genes SDO1 e CTT1 estão correlacionados ao estresse oxidativo, sendo que: o primeiro é responsável por codificar a enzima superóxido dismutase, que catalisa a conversão do ânion superóxido para oxigênio e peróxido de hidrogênio; o segundo codifica a catalase citosólica, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (HERRERO *et al.*, 2008). Ambos tiveram superexpressão nos primeiros instantes do cultivo para altos níveis de oxigenação; quando em baixas concentrações a expressão dos genes permaneceu baixa. O OLE1, que expressa a enzima ácido graxo desaturase dependente de oxigênio, teve seu pico na condição com menor nível de oxigênio no meio. O gene ATF1 é responsável pela codificação da álcool acetil transferases (ele realiza a síntese de acetato de etila e acetato de isoamila). Esse gene apresentou um perfil semelhante ao OLE1, sendo que nas condições com aeração houve diminuição na concentração dos ésteres. A semelhança no perfil de ambos é devido ao mecanismo de regulação do OLE1 ser o mesmo que co-regula a transcrição do ATF1, ambos também são reprimidos na presença de oxigênio e ácidos graxos. E, embora distintas, as vias apresentam caráter hipóxico.

Logo, se faz necessário trabalhar em uma faixa restrita de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo, ou seja, em microaeração, de forma que o metabolismo para produção de etanol seja estimulado e que a via da respiração celular se torne parcialmente ativa, gerando um efeito indireto no crescimento e na capacidade de fermentação do microrganismo, seja pela energização dos processos de transporte e estabilização da mitocôndria ou pela redução da formação de metabólitos secundários usados para aliviar o acúmulo de NADH na célula (PREEZ, 1994; JIN e JEFFRIES, 2004; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Microaeração

Um processo microaerado é caracterizado pelo fornecimento limitado de oxigênio durante o cultivo, e alguns trabalhos da literatura procuraram avaliar a influência de condições de limitação do fornecimento de oxigênio sobre as cepas de *S. cerevisiae*, outras leveduras e bactérias, como *Escherichia coli*. Porém as condições que definem um estado de microaeração são diferentes para cada estudo.

O esquema de microaeração do trabalho de Alfenore e colaboradores (2003) consistiu em um fluxo constante de ar ( $100 \text{ L.h}^{-1}$ ) no *headspace* de um reator de 20 L com concentração inicial de substrato de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  e suplementação de meio fresco. Contudo a concentração final de etanol no cultivo plenamente aeróbio ( $147 \text{ g etanol.L}^{-1}$ ) foi superior à condição microaerófila ( $131 \text{ g etanol.L}^{-1}$ ). A quantidade de glicerol produzido foi maior na condição microaerófila ( $12,2 \text{ g glicerol.L}^{-1}$ ) em relação a aeróbia ( $4 \text{ g glicerol.L}^{-1}$ ). Segundo os autores, o acúmulo do glicerol é uma resposta ao baixo nível de aeração fornecido e ao estresse gerado pelo acúmulo de NADH. Por fim, foi proposto neste trabalho uma “teoria de duas fases” para explicar o perfil de produção de etanol e de biomassa por *S. cerevisiae*. De acordo com a teoria, existe uma primeira fase de produção simultânea de etanol e produção de biomassa que é seguida por uma fase de produção de etanol sem crescimento celular.

Fromanger e colaboradores (2009) identificaram uma faixa de fluxos de assimilação de oxigênio ( $J_{O_2}$ ) de 0,30 a  $2,48 \text{ mmol O}_2.\text{gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$  que favorecia a produção de etanol, ao estudar os efeitos fisiológicos de fornecimento controlado de oxigênio em cultivos batelada alimentada de *Candida shehatae*. Para os valores acima dos estabelecidos, o metabolismo era plenamente aeróbio. Os cultivos foram realizados em duas etapas, a primeira com 20 % da saturação com intuito de alcançar uma quantidade de biomassa entre 8 e  $12 \text{ gMs.L}^{-1}$ , e a segunda etapa consistiu em limitar o fornecimento de oxigênio e alimentar o reator com concentração de fonte de carbono de  $650 \text{ g.L}^{-1}$ . Sob condições ótimas de cultivo, sendo temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 4,5, a concentração de máxima de etanol foi  $48,81 \text{ g.L}^{-1}$  para xilose com  $J_{O_2}$  igual  $1,19 \text{ mmol O}_2.\text{gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , enquanto para glicose a concentração máxima foi de  $54,19 \text{ g.L}^{-1}$  com  $J_{O_2}$  sendo  $0,3 \text{ mmol O}_2.\text{gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A velocidade específica de crescimento para xilose foi de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , enquanto para glicose foi de  $0,08 \text{ h}^{-1}$ . Também foi detectada a formação de polióis com concentrações variando de 7,5 a  $18,1 \text{ mmol poliól.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . As informações obtidas reforçam a ideia de que para ambas as fontes de carbono a produção de



etanol está acoplada com a geração de biomassa com intuito de suprir a necessidade energética quando a respiração se torna limitada.

No trabalho realizado por Silva e colaboradores (2011), a quantidade de etanol obtida ( $26,7 \text{ g L}^{-1}$ ) pela fermentação de xilose por *Pichia stipitis* em um reator agitado foi favorecida por uma agitação de 250 rpm e aeração de 0,25 vvm. Para os autores, o coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio ( $k_{LA}$ ) ideal na condição microaeróbia foi de  $4,8 \text{ h}^{-1}$ , e essas foram condições de operação que permitiram um aumento na eficiência do processo. Valores de  $k_{LA}$  superiores favoreceram o crescimento celular e afetaram negativamente os valores de concentração de etanol.

Em outro trabalho, Silva e colaboradores (2012) estudaram cultivos de *Pichia stipitis* com  $C_{x0} = 1 \text{ g.L}^{-1}$  em xilose e estabeleceram condições de transferência de oxigênio que fossem capazes de maximizar a conversão da fonte de carbono em etanol. Foi observado que o aumento do  $k_{LA}$  alterou o perfil de produção de etanol. Os maiores valores de coeficiente de rendimento de etanol ( $Y_{P/S} = 0,33 \text{ g etanol.g substrato}^{-1}$ ) foram obtidos com  $k_{LA} = 0,7 \text{ h}^{-1}$ , enquanto os maiores valores de produtividade volumétrica ( $Q_p = 0,32\text{-}0,38 \text{ g etanol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foram obtidos em valores intermediários de  $k_{LA}$  ( $4,9\text{-}18,7 \text{ h}^{-1}$ ). Logo a região de trabalho mais adequada para a produção de etanol foi entre  $2,3 \text{ h}^{-1}$  e  $4,9 \text{ h}^{-1}$  pela boa produtividade de etanol, concentração de produto ( $26,5 \text{ g etanol.L}^{-1}$ ), consumo de substrato (apenas 4% de substrato restante) e concentração final de biomassa ( $15 \text{ gMs.L}^{-1}$ ) após 96 h.

Durante a avaliação de estratégias para produção de etanol por *S. cerevisiae* de López-Abelairas e colaboradores (2013), os autores observaram uma maior estabilidade do cultivo contínuo quando foram feitas alternâncias entre condições microaerófilas (sendo a vazão de ar igual  $60 \text{ L/h}$  no *headspace*) e anaeróbias usando mosto de trigo como fonte de carbono. Foi obtida uma produtividade de etanol mais elevada quando comparado com cultivos anaeróbios e em batelada. Quanto a produção de metabólitos secundários (glicerol, ácido lático, ácido acético e ácido succínico), as condições microaerófilas prolongadas levaram ao aumento da excreção desses componentes no meio, enquanto a microaeração alternada com anaerobiose apresentou uma redução na concentração desses compostos.

A microaeração demonstra também influência em outros microrganismos que não são leveduras. Okuda *et al.* (2007) usaram a microaeração para cultivo de *Escherichia coli* KO11 (cepa modificada para produção de etanol) em hidrolisado de madeira usada na construção civil. O cultivo anaeróbio forneceu uma concentração de etanol de  $28,8 \text{ g.L}^{-1}$ , contudo foi observado que nem todos os açúcares presentes foram consumidos pois a concentração de xilose permaneceu constante. A microaeração com velocidade de

transferência de oxigênio (OTR) igual a 4 mmol  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  permitiu obter a concentração de 35,4 g.L<sup>-1</sup> do álcool. Foi observado que, devido ao processo de microaeração, a produção de ácidos orgânicos foi reduzida e se promoveu um aumento na concentração de acetato. Na OTR de 15 mmol  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  obteve-se uma concentração de etanol 26,6 g.L<sup>-1</sup>, pois houve consumo de etanol pelas células depois de 24 h.

Deniz *et al.* (2014) realizaram cultivo de *E. coli* KO11 em bagaço de marmelo em um número maior de condições de OTR (0, 2, 5, 9, 16 mmol  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) investigadas em 64h de experimento. A máxima concentração de etanol obtida foi igual a 20,51 g.L<sup>-1</sup> em OTR de 5 mmol  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Essa condição também forneceu a maior taxa de consumo do substrato (93,49 %) e  $Y_{P/S}$  de 0,33 g etanol.g substrato<sup>-1</sup>. Segundo a consideração de Okuda *et al.*, a microaeração aumentou o suprimento de  $\text{NAD}^+$ , que incrementou os fluxos na via glicolítica e na via Pentose Fosfato, resultando em maiores fluxos de assimilação de glicose e manose. Após o consumo completo das hexoses, o microrganismo começou assimilação de xilose até esgotamento dessa fonte de carbono, sendo possível graças ao decréscimo dos níveis de  $\text{NADH}$ , que causam a inibição alostérica da fosfotranscetilase, e ao ATP adicional gerado pela produção de acetato e pela fosforilação oxidativa.

### 2.3 Otimização e controle de bioprocessos

O desafio de desenvolver um processo produtivo de etanol com melhorias de desempenho e que esteja de acordo com os critérios técnicos, econômicos e ambientais, requer o controle apropriado e preciso da fermentação alcoólica. A otimização do processo depende do conhecimento prévio do processo e do modelo matemático que o descreve. O uso de um modelo bem definido tem se tornado um dos aspectos cruciais na produção de bioetanol, pois o sistema de equações será empregado de acordo com o fenômeno a ser descrito (LIN e TANAKA, 2006; CARDONA, SÁNCHEZ e GUTIÉRREZ, 2010).

O ato de otimizar e controlar um processo bioquímico deve levar em conta o grande número de reações bioquímicas complexas e os fenômenos de transporte envolvidos, além dos mecanismos regulatórios inerentes de cada microrganismo. Associado ao desenvolvimento celular, mas ocorrendo em velocidades diferentes, estão outras reações catalisadas por enzimas que transformam os reagentes em metabólitos, tanto no meio extracelular quanto no cenário intracelular. Esse dinamismo dos processos biológicos também acrescenta dificuldades na validação de modelos, pois os parâmetros usados podem sofrer variações ocasionadas por eventuais alterações genéticas e alterações metabólicas não observadas

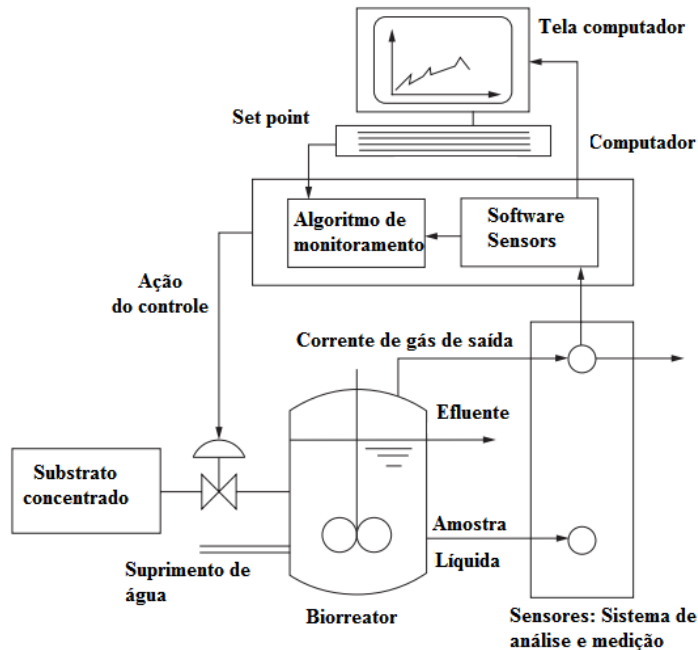
macroscopicamente (AZEVEDO, PIMENTA e OLIVEIRA, 1996; BOURDREAU e MCMILLIAN, 2007; SONNLETINER, 2013).

O uso de estratégias eficientes de monitoramento on-line e controle do processo se torna um desafio. A medida de parâmetros fisiológicos se torna mais complicada quando não se tem sensores disponíveis ou os existentes não são capazes de quantificar os dados por estarem no limite de detecção. Dessa forma a maior parte dos algoritmos empregados na indústria realizam um controle indireto do processo através de variáveis como temperatura, pH e oxigênio dissolvido, porque sensores com sensibilidade e capacidade de aferição das variáveis bioquímicas (composição celular, enzimas, proteínas, entre outros) estão associados a um alto custo de investimento e de manutenção (BOURDREAU e MCMILLIAN, 2007; NICOLETTI, JAIN e GIORDANO, 2009; CARDONA, SÁNCHEZ e GUTIÉRREZ, 2010; HITZMANN e STANKE, 2013)

Para auxiliar no entendimento das interações dos vários componentes celulares e melhorias no processo é possível incorporar ao estudo ferramentas de bioinformática. A Biologia de Sistemas é capaz de utilizar plataformas tecnológicas conhecidas como “ômicas” para prever o comportamento de organismos em diferentes condições ambientais, elucidando as características do genótipo e fenótipo (NANDIKOLLA *et al.*, 2011).

Logo a complexidade do sistema será dada de acordo com os objetivos do controle e da compreensão do processo. A FIGURA 3 representa um sistema de controle de um bioprocessos. O valor de saída do algoritmo de controle é usado como informação para o atuador no controle da vazão de alimentação do reator. Os dados de entrada necessários para realizar os ajustes são obtidos por intermédio de sensores *in situ* e conhecimento da dinâmica do processo biológico. Em certos casos, quando a variável controlada é de difícil medição e essa é uma variável-chave do processo, é preciso fazer uso conjunto das informações obtidas no processo, do conhecimento prévio do processo e de técnicas computacionais inteligentes (lógica *fuzzy* ou redes neurais) para realizar a síntese dos *softwares sensors* e ao fim a estimativa dos valores (DOCHAIN, 2008; NICOLETTI, JAIN e GIORDANO, 2009; HITZMANN e STANKE, 2013). Um exemplo é o trabalho de Horta *et al.* (2014), no qual é proposto o uso de inteligência artificial para supervisionar e controlar cultivos celulares em alta densidade, como resultado foi construído o programa SUPERSYS\_HCDC.

FIGURA 3 - Representação esquemática de um sistema de controle



Fonte: Adaptado de DOCHAIN (2008)

### 2.3.1 Biologia de Sistemas

O uso combinado de diversos campos do conhecimento (biologia, matemática, física, bioquímica, biologia molecular e ciência da computação) é um dos pilares principais da Biologia de Sistemas. Essa área do conhecimento permite gerar uma visão holística de diversas interações complexas dentro dos diferentes sistemas biológicos. Baseia-se na integração dos dados experimentais e da literatura, no processamento dos dados e na modelagem. Essa característica tem sido explorada para a criação de fábricas celulares com intuito de produzir diversos derivados químicos, combustíveis, produtos farmacêuticos e ingredientes alimentícios (NANDIKOLLA *et al.*, 2011; CVIJOVIC, BORDEL e NIELSEN, 2011; ZHANG, RODRIGUEZ, KEASLING, 2011; LEE *et al.*, 2011; GARCIA-ALBORNOZ e NIELSEN, 2013; BORODINA e NIELSEN, 2014).

As “ômicas” são campos de estudo que permitem a identificação, caracterização e quantificação de grupos de moléculas biológicas em diferentes níveis, por exemplo, estrutura genética (Genômica), função das proteínas (Proteômica) e reações químicas envolvendo metabólitos (Metabolômica). (ROLDÃO, KIM e NIELSEN, 2012).

Embora o genoma, o transcriptoma e o proteoma forneçam informações sobre as funções celulares, muitos dos dados obtidos não são quantitativos, e, muitas vezes, quando são quantificados, não é possível a relação com mudanças no fenótipo ao longo das etapas de regulação (WINTER e KRÖMER, 2013).

A resposta mais rápida e sensível dos organismos ao ambiente se dá a partir do nível “metabolômico”. Portanto, para visualizar a rede de reações que ocorrem se emprega uma análise de fluxos metabólicos. Esses fluxos são os resultados finais de toda a expressão gênica, concentração de metabólitos, cinéticas de reação e regulação do indivíduo (inclusive as considerações termodinâmicas). Então é possível utilizar a análise de fluxos (Fluxômica) para avaliar a distribuição das moléculas por várias vias de reação. A adição dessa camada adicional possibilita a interconexão com outras “ômicas” e caracterização mais adequada de qualquer resposta metabólica (JEFFRIES, 2006; FRIZTSCH *et al.*, 2012; WINTER e KRÖMER, 2013; CASCANTE *et al.*, 2014)

Todo conhecimento obtido nesses diversos níveis é integrado, compilado e complementado com dados experimentais para reconstrução de modelos metabólicos em escala genômica (Genome Scale Metabolic Models-GSMM). (FRANCKE, SIEZEN e TEUSNIK, 2005).

Portanto os GSMMs junto a métodos de otimização como FBA (*Flux Balance Analysis* -Análise do Balanço de Fluxos), que assumem um balanço de fluxos para conjunto de reações metabólicas, e uma função objetivo são usados para simular uma célula *in silico* em softwares dedicados, como o Optflux (ROCHA *et al.*, 2010).

O uso desses modelos fornece análise completa da rede celular, da qual podem se estabelecer ou restringir condições ótimas para maximização de um produto ou minimização de um metabólito não desejado. Por conseguinte, é possível traçar estratégias adequadas de controle do processo (HERRGÄRD e PALSSON, 2007; LEE *et al.*, 2012; GARCIA-ALBORNOZ e NIELSEN, 2013).

Entre os microrganismos, a *S. cerevisiae* e a *E. coli* são os mais bem caracterizados na Biologia de Sistemas e apresentam diversos modelos já publicados. No caso da levedura, alguns exemplos são: *iFF708* (FÖSTER *et al.*, 2003), *iN750* (DUARTE, HERRGÄRD e PALSSON, 2004), *Yeast 1.0* (HERRGÄRD *et al.*, 2008), *iMM904* (MO, PALSSON e HERRGÄRD, 2009), *Yeast 4.0* (DOBSON *et al.*, 2010). As diferenças entre os modelos se dão pelos números de reações que se levam em consideração (abrangência do modelo), locais das células onde essas interações ocorrem (compartimentalização) e a aplicação do modelo

(engenharia metabólica, interpretação biológica, compreensão do processo evolutivo e estruturação computacional) (ÖSTERLUND, NOOKAEW e NIELSEN, 2011).

Bro *et al.* (2006) usaram o modelo *iFF708* para melhorar o rendimento de etanol produzido por *S. cerevisiae* em anaerobiose de forma que a produção de glicerol fosse minimizada em cultivo. A melhor estratégia forneceu uma estirpe modificada que reduziu o glicerol em 40 % e forneceu aumento de 3 % do produto final, sendo a fonte de carbono glicose. Outra estirpe obtida forneceu um aumento de 25 % na produção de etanol usando uma mistura de xilose e glicose como fontes de carbono.

Usando o modelo *iND750*, Hjersted, Henson e Mahadevan (2007) investigaram novas estratégias de engenharia metabólica para aumentar a produção de etanol usando glicose e a mistura glicose/xilose em uma batelada alimentada. Em glicose, a inserção de genes permitiu um aumento de cerca de 5,25 % em comparação com a cepa selvagem, contudo em condições microaeróbicas a levedura selvagem apresentou maior aumento na produtividade (3,19 %). Com a mistura glicose/xilose em condições plenamente anaeróbicas o aumento no rendimento de etanol foi de 12,2 % depois da inserção de genes.

Um modelo mais simples, consistindo em 6 reações que representam as vias metabólicas principais, foi usado por Barrera-Martínez *et al.* (2010) a fim de investigar o metabolismo de *S. cerevisiae* submetida a cultivos batelada alimentada plenamente aeróbios. Usando o balanço de fluxos metabólicos, notou-se que o fluxo para formação de biomassa é favorecido quando os fluxos da glicólise e cadeia respiratória são máximos, minimizando a perda de carbono por fluxos em direção da via fermentativa.

Agren, Otero e Nielsen (2013) também utilizaram o modelo *iFF708* para avaliar estratégias de mutação gênica e de condições ambientais que otimizassem a produção de ácido succínico pela *S. cerevisiae*. As cepas foram avaliadas em cultivos batelada em glicose sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Uma cepa submetida à deleção de um gene específico e em condições anaeróbicas forneceu um rendimento significativo de  $Y_{SUC/S} = 0,02 \text{ C-mol}_{\text{Succinato}} \cdot \text{C-mol}_{\text{Glicose}}^{-1}$ .

### 2.3.2 Malha Aberta vs Malha Fechada

Um processo e seus controladores são caracterizados pela ação das entradas em relação ao sinal de saída. As entradas englobam todas as variáveis controladas e distúrbios inerentes ao processo, já as saídas são todas as quantidades computadas ao fim do processo e que podem ser influenciadas por estímulos no processo. Um sistema de controle apresenta

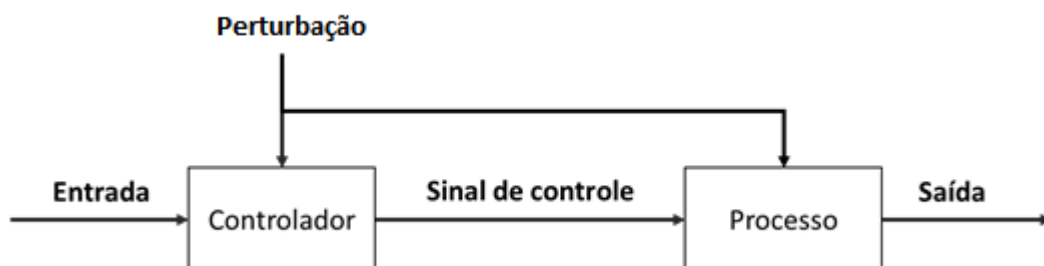
capacidade de manipular um determinado número de variáveis garantindo estabilidade e desempenho. O esquema do controle será desenvolvido de acordo com os objetivos que se desejam alcançar no processo (POLKE, 1994; OGATA, 2010; SEBORG, *et al.*, 2011).

### 2.3.2.1 Sistema em Malha Aberta

Em um sistema malha aberta (FIGURA 4), as informações geradas na saída não apresentam efeito na ação de controle, ou seja, não há realimentação dos sinais de saída para que sejam comparados com as entradas. Nesse sistema, o controle computa somente a entrada de acordo com o estado em que se encontra e modelo matemático proposto. Para cada entrada existe uma condição de operação (POLKE, 1994; OGATA, 2010; SEBORG *et al.*, 2011).

Sistemas em malha aberta apresentam uma construção mais simples e de menor custo, sendo úteis em situações cuja realimentação não é crítica ou para sistemas que estejam bem definidos, sendo que as relações entre as variáveis do processo estão especificadas mediante modelos matemáticos, de modo que esses representam os pontos principais do processo estudado. Portanto para um sistema malha aberta eficiente, os efeitos das entradas sobre as saídas devem ser conhecidos, os ruídos devem ser minimizados e quantificados, o processo quando não submetido a condicionais de controle deve ter um perfil estável, e a fim de manter a qualidade, a recalibração da estrutura de controle pode ser necessária de tempos em tempos (POLKE, 1994; LEIGH, 2004)

FIGURA 4 - Diagrama de blocos simplificado para malha aberta

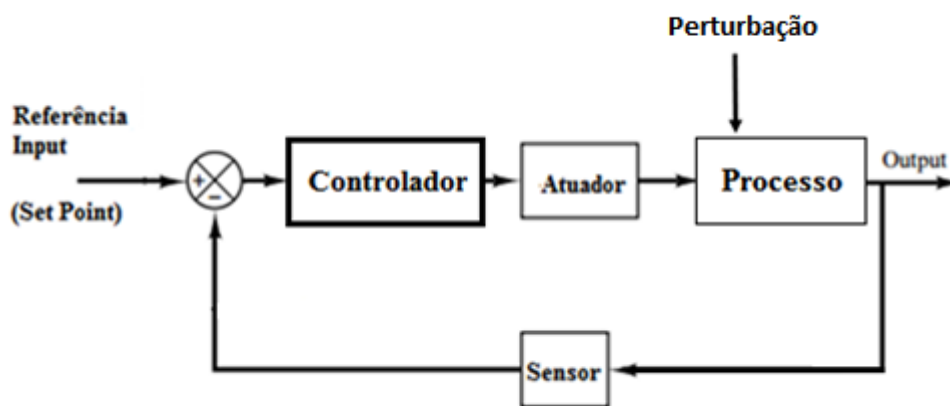


Fonte: Adaptado de Polke (1994)

### 2.3.2.2 Sistema em Malha Fechada

Sistemas de laço fechado ou malha fechada (FIGURA 5) utilizam uma medida adicional do sinal de erro, que se refere a diferença entre o setpoint e o sinal de saída ou uma função do sinal de saída, como uma informação para reduzir o erro. Essa característica acaba tornando esse tipo de sistema mais robusto frente às perturbações e a variações do sistema. É possível obter um melhor desempenho mesmo que as condições observadas para malha aberta não sejam alcançadas. Dentro deste contexto estão inseridos os controladores clássicos como proporcional (P), proporcional-integral (PI), proporcional derivativo (PD) e proporcional integral derivativo (PID) (OGATA, 2010; CASTRUCCI, SALES e BITTAR, 2011).

FIGURA 5 - Diagrama de blocos de um sistema de controle malha fechada



Fonte: Adaptado de OGATA (2010)

Do ponto de vista de precisão, o sistema em malha fechada apresenta vantagem em relação a um esquema em malha aberta devida a tolerância aos distúrbios. Contudo em termos de estabilidade, um controle em malha aberta se mostra mais adequado devido à construção mais simples, enquanto que para a malha fechada alcançar a estabilidade pode se tornar um desafio, pois pode haver um excesso de correção dos erros e equívocos que acarretam na instabilidade de sistemas estáveis. Logo, o uso de uma combinação adequada geralmente torna o custo geral da estrutura de controle mais viável e apresenta melhorias no desempenho geral do sistema. Esses sistemas podem incorporar também o uso dos sistemas inteligentes como as redes neurais, a lógica *fuzzy* e os softsensors, como forma de aprimorar as estruturas de controle (LEIGH, 2004; OGATA, 2010; CASTRUCCI, SALES e BITTAR, 2011).



### 2.3.3 Softsensors

Os sensores virtuais ou software sensors (*softsensor*) se baseiam em usar informações online para estimar variáveis de um cultivo que seriam difíceis de medir diretamente. Eles apresentam dois componentes principais. O primeiro componente consiste nos sensores de hardware que irão fornecer informações das variáveis indiretas que apresentam relação com a variável de interesse. O segundo componente será um modelo ou uma correlação matemática que descreve a interdependência entre os dados dos sensores *in situ* com a variável alvo (NICOLETTI, JAIN e GIORDANO, 2009; LANTZ, *et al.*, 2010).

Muitos dos sensores por softwares propostos podem ser agrupados em três classes: (i) sensores baseados em modelos (precisam de um conhecimento fenomenológico prévio do processo); (ii) sensores baseados em dados (usam informações de sistemas similares para inferir valores); (iii) sensores híbridos (englobam recursos das classes i e ii) (NICOLETTI, JAIN e GIORDANO, 2009; LANTZ, *et al.*, 2010).

Sensores baseados em modelos em um processo fermentativo são construídos com base nas relações estequiométricas e balanços de elementos. Um softsensor que consiga aferir o quociente respiratório (RQ) pode ser usado para detectar o início da fase de crescimento oxidativo (JOBÉ *et al.*, 2003), onde o grau de redução do substrato é diferente do grau de redução do produto de maneira significativa, sendo esse o caso da produção de etanol (VILLADSEN, NIELSEN, LIDÉN, 2011). Outra aplicação é a aferição da evolução da produção de CO<sub>2</sub> como uma medida da atividade metabólica (TAHERZADEH, NIKLASSON e LIDÉN, 2000; NILSSON, TAHERZADEH e LIDÉN, 2001). Contudo esse tipo de sensor pode apresentar um desempenho baixo por causa dos ruídos, precisão dos instrumentos que quantificam a fração molar de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no gás efluente e incertezas do processo, sendo necessário a aplicação de filtros, como o filtro de Kalman, para diminuir as instabilidades que podem surgir nos processos (SUNDSTRÖM e ENFORS, 2008; ZHANG, 2009; LANTZ, *et al.*, 2010).

*Softsensors* baseados em dados usam correlações entre variáveis. Eles incluem o uso de métodos como as redes neurais ou simplesmente polinômios previamente ajustados. O sistema de aprendizado e adaptação permite a aferição da biomassa, concentração de substrato, concentração de produto e mudanças no perfil de crescimento em uma fermentação. O uso desse tipo de sensor baseado no aprendizado é interessante para aplicação nos processos usuais de produção de etanol, porém apresenta limitações quanto à produção de biocombustíveis de segunda geração e condições como a microaeração, devido ao caráter

heterogêneo dos dados da literatura para realizar o treinamento e aprendizagem das redes neurais. Por exemplo, os dados não são apresentados de maneira uniforme entre trabalhos e as condições entre eles são distintas. É necessário então um esforço para realizar um pré-processamento de informações e utilização de filtros que permitam uma melhor performance da rede (SUNDSTRÖM e ENFORS, 2008; ZHANG, 2009; LANTZ, *et al.*, 2010).

Assim, o uso desse recurso para estimar valores de uma variável de interesse é uma alternativa conveniente aos métodos diretos. O uso de softsensor não representa um custo adicional ao processo pois utiliza dados já disponíveis. Os dados estimados servem como sinais de entrada para algoritmos de controle melhorando tanto a resposta quanto o conhecimento relacionado ao comportamento do processo (NICOLETTI, JAIN e GIORDANO, 2009; LANTZ, *et al.*, 2010).

Em busca de condições ideais de cultivo para *E. coli* para produção da enzima catecol-O-metiltransferase solúvel, Silva *et al.* (2012) avaliaram o uso de uma Rede Neural Artificial (RNA) *Feedforward* como softsensor. As variáveis de entrada usadas foram temperatura, pH e agitação e, como saída, o modelo fornecia a atividade da enzima. O modelo obtido apresentou boa correlação entre os dados preditos e os obtidos experimentalmente, e as condições ótimas propostas pela rede neural permitiram um aumento de 4 vezes na atividade da enzima quando comparada a condições de operação normais.

Carius *et al.* (2014) projetaram um estratégia de controle da concentração de oxigênio dissolvido para cultivos de *Rhodospirillum rubrum* em condições de limitação desse nutriente. Usou-se um modelo de controle com dois graus de liberdade, contendo uma parte *feedforward*, que gerava transições plausíveis entre os estados estacionários, e um controlador PID, que compensava os erros do modelo e perturbações do processo. A variável de entrada era o sinal de um sensor de oxirredução *in situ* que gerava o potencial redox do cultivo e ajustava o fornecimento de oxigênio manipulando a composição do gás de entrada por meio do gás nitrogênio e o ar. A estratégia se mostrou eficiente por estabilizar os estados estacionários em níveis diferentes de limitação de oxigênio, garantindo que esse nutriente foi o único substrato que influenciou o processo.

O trabalho de Farrell *et al.* (2015) buscou utilizar um controlador PID para manutenção do nível de oxigênio dissolvido durante cultivo de *E. coli* a fim de produzir subunidades de vacinas. Para isso, foi explorada a ideia de um “DO-stat” (Dissolved Oxygen stat), no qual a vazão de meio num processo batelada alimentada seria controlada e seria suficiente para garantir que o OUR da biomassa não ultrapassasse o OTR do reator. O estudo foi realizado em reatores de 2, 20 e 200 L. O sistema de controle foi capaz de manter os níveis

de oxigênio dissolvido no reator piloto de 200 L, bem como por um período longo de cultivo. Segundo o autor, a indução proporcionada pela estrutura de controle foi capaz de prover proteínas de melhor qualidade e maiores níveis de biomassa.

Zeng e Deckwer (1996) revisaram as informações e dados obtidos em dois trabalhos anteriores em que avaliaram a produção de 2,3-butanediol sob condições microaeróbias para *Enterobacter aerogenes*. Segundo os autores, em um processo microaeróbio a tensão do oxigênio dissolvido deve se aproximar de zero, essas condições aumentam a eficiência da transferência de oxigênio, de maneira que a força motriz para o fenômeno seja máxima. O consumo específico de oxigênio ( $qO_2$ ) (Eq. 1) pode ser descrito por uma equação tipo Monod, onde  $qO_2^{máx}$  é a velocidade máxima de consumo de oxigênio,  $K_o$  é a constante de saturação e  $C_o$  é a concentração de oxigênio.

$$qO_2 = qO_2^{máx} \frac{C_o}{K_o + C_o} \quad (1)$$

De acordo com o modelo, as células começariam a ter suas funcionalidades alteradas pelo fornecimento de oxigênio quando  $C_o \leq$  cerca de  $4 K_o$ . O parâmetro  $K_o$  pode ainda ser usado como parâmetro para determinação se um regime é microaeróbio, relacionando-o com concentração de oxigênio dissolvido. Segundo os autores, para grande parte dos microrganismos, valores de  $K_o$  variam entre  $0,01-0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , correspondente a uma faixa de  $0,1-1,5\%$  da saturação de ar. Nessa faixa, o cultivo estaria submetido a uma condição de microaerobiose. Como concentrações de oxigênio tão baixas não podem ser devidamente aferidas por sensores comuns, é proposto acompanhar o consumo específico de oxigênio pela equação 2 e equação 3, sendo OTR, a taxa de transferência de oxigênio;  $K_L a$  o coeficiente de transferência volumétrico;  $C_o^*$ , a concentração de saturação de oxigênio;  $C_o$ , concentração de oxigênio; e  $C_x$ , concentração de células.

$$qO_2 = \frac{OTR}{C_x} \quad (2)$$

$$OTR = K_L a * (C_o^* - C_o) \approx K_L a * C_o^* \text{ em } C_o \approx 0 \quad (3)$$

Pela relação proposta, é necessário medir a biomassa viável para o acompanhamento adequado. Destacando os dados obtidos no trabalho de Zeng *et al.* (1994), no qual se usou um algoritmo PID para manipular a vazão de ar e controlar o RQ inferido; o valor ideal de

velocidade de consumo específico de oxigênio para *Enterobacter* foi de  $3,6 \text{ mmol. g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  com um RQ de 4,46 e uma produtividade de  $0,61 \text{ g}_{\text{Produto}} \cdot \text{g}_{\text{Substrato}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Esses dados corroboraram com os parâmetros estequiométricos estimados.

Franzén, Albers e Niklasson (1996) também usaram uma estratégia de controle clássico para manter a condição de limitação de oxigênio ou de microaerobiose, e avaliar a produção de etanol por *S. cerevisiae*. O RQ foi estimado e posteriormente controlado por um controlador PID. Porém, devido ao caráter dinâmico e possíveis mudanças repentinas da vazão de gás de entrada, foi incorporado um filtro exponencial de primeira ordem. A inserção do filtro permitiu obter condições dinâmicas favoráveis e precisas, e a estabilidade do sistema com RQ variando de 10 a 50 foi mantida. Nesse caso, notou-se que as medidas de oxigênio são a maior fonte de erro. Nos dados publicados no trabalho de Franzén (2003) utilizando essa lógica de controle, foi obtido um rendimento de  $0,43 \text{ g etanol. g substrato}^{-1}$  em RQ igual a 12.

Com base nos trabalhos apresentados que tratam do fornecimento de  $\text{O}_2$  ou da produção de um metabólito específico, grande parte ainda aborda o problema usando estruturas de controle convencional, por exemplo, baseado na medida da concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido (da ordem de ppm) por sensores altamente sensíveis, que são caros e de curta durabilidade. Portanto, o uso de um sistema de controle baseado nos fluxos de  $\text{O}_2$  e substrato se mostra promissor com base no que foi discutido nas seções 2.2 e 2.3 da revisão da literatura. A proposta se baseia na aplicação dos conhecimentos clássicos de controle de bioprocessos em sincronia com os avanços recentes da Biologia de Sistemas, a partir da qual é possível simular o metabolismo de um determinado organismo, identificando as faixas de fluxos que favorecem a formação do produto de interesse, permitindo conhecimento prévio das condições de cultivo ideais e possibilitando traçar estratégias eficientes e um controle a nível metabólico. Tal proposta não se limita aos cultivos de *S. cerevisiae*, estendendo-se a todos os bioprocessos de interesse industrial conduzidos sob limitação por oxigênio, pois existe uma quantidade de bioprodutos que são produzidos de maneira mais efetiva quando as quantidades de oxigênio são limitadas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo

Empregou-se fermento comercial fresco da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, marca Itaiquara. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos 2 no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

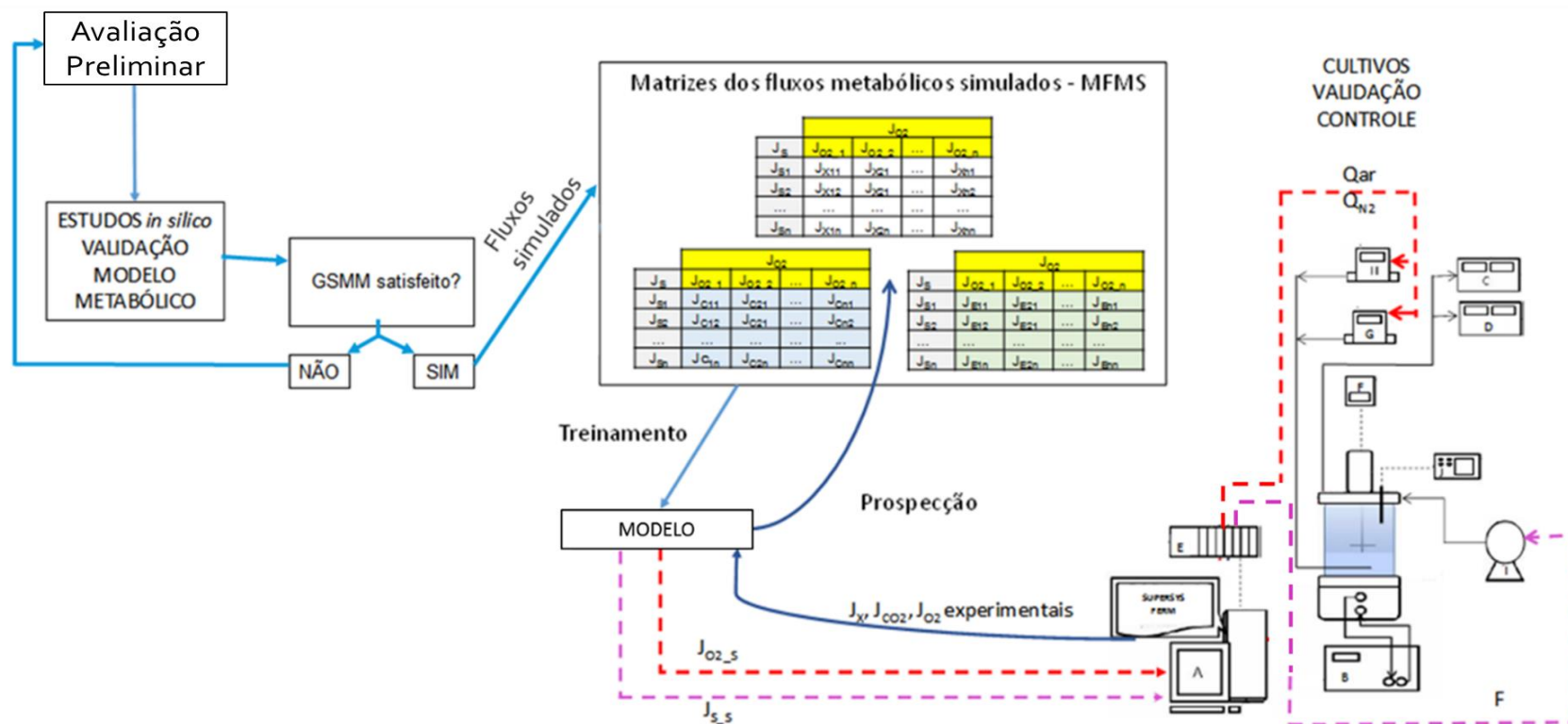
#### 3.2 Modelo Computacional

##### 3.2.1 Estratégia de Controle

A estratégia experimental proposta para o desenvolvimento está representada na FIGURA 6. Estudos *in silico* do metabolismo de *S. cerevisiae* foram realizados com a fonte de carbono glicose. O modelo metabólico foi utilizado para estabelecer as condições de cultivo microaeróbias e avaliar o metabolismo da levedura, gerando as matrizes dos fluxos metabólicos simulados, composta por fluxo de substrato, fluxo de oxigênio, fluxo de etanol e quociente respiratório. Essas variáveis foram usadas para traçar as lógicas de controle que foram implementadas durante os cultivos. A capacidade preditiva do modelo foi avaliada por meio da comparação dos fluxos simulados com valores dos fluxos calculados a partir dos dados obtidos experimentalmente.

Os resultados simulados nas matrizes foram utilizados para gerar relações matemáticas, que foram empregadas nas estratégias de controle propostas para maximizar a produção de etanol em cultivos conduzidos no modo batelada alimentada. A primeira estratégia avaliada consistiu em um sistema de malha aberta e a segunda estratégia foi baseada em um sistema em malha fechada, na qual o quociente de respiração celular (RQ) foi a variável controlada. Os fluxos simulados no Optflux (função objetivo de maximização da produção da biomassa, seção 3.2.5) foram empregados para manipular as vazões de ar e nitrogênio (*loop* de controle do fluxo de oxigênio) e a vazão da bomba de alimentação (*loop* de controle do fluxo de substrato), conforme detalhado a seguir. Todo o sistema de supervisão e lógica foi montado no programa SUPERSYS\_HDCD (HORTA, 2012) já disponível no LaDABio 2, construído na plataforma LabView 8.0.

FIGURA 6 - Representação esquemática da estratégia experimental proposta



Fonte: Adaptado de Horta *et al.* (2014)

$J_X$  – fluxo de biomassa ( $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $J_{CO_2}$  – fluxo de gás carbônico ( $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $J_E$  – fluxo de etanol ( $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $J_S$  – fluxo de substrato ( $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $J_{O_2}$  – fluxo de oxigênio ( $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Índices: S – selecionado. Equipamentos: A- Sistema computacional de monitoramento e supervisão SUPERSYS; B – Banho; C – Analisador de CO<sub>2</sub>; D – Analisador de O<sub>2</sub>; E – CLP-FieldPoint; F – controlador da velocidade do impelidor; G – Fluxômetro de ar; H – Fluxômetro de nitrogênio; I – bomba de alimentação; J - Sensor de biomassa. Linhas cheias pretas – correntes. Linhas pontilhadas – informação. Loops de controle: controle do consumo de oxigênio (em vermelho); controle do consumo de substrato (em lilás). Algumas linhas de aquisição e comunicação com o field point omitidas.

### 3.2.2 Estimativa dos fluxos experimentais, produtividade, rendimentos e velocidade específica de crescimento

A determinação dos fluxos online e o cálculo dos fluxos off-line (valores corrigidos com informações de massa seca do cultivo, volume de retirada de amostra e volume alimentado) (Eq. 4) foram baseados na estimativa das velocidades de consumo de substrato ou formação de produto, obtidas a partir dos balanços de material para cada componente para um processo batelada alimentada (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN. 1998):

$$\text{Fluxo } (J_i) = \frac{r_i}{C_x} \quad (4)$$

Sendo que:  $J_i$  é o fluxo de um componente  $i$  (substrato, subprodutos,  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), em  $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ;  $r_i$  é a velocidade de consumo ou produção de um componente  $i$ , em  $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para oxigênio e gás carbônico (Eq. 8 e 9), e  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para os demais componentes (Eq. 5, 6 e 7),  $C_x$  é a concentração celular, em  $\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ .

Balanço de células:

$$\frac{d(mx)}{dt} = r_x V \quad (5)$$

Balanço de Substrato:

$$\frac{d(ms)}{dt} = FC_{\text{SF}} - r_s V \quad (6)$$

Balanço de Produto:

$$\frac{d(mp)}{dt} = r_p V \quad (7)$$

Balanço de  $\text{CO}_2$ :

$$\frac{d(C_{\text{CO}_2} V)}{dt} = y_{\text{CO}_2 e} \frac{Q_{\text{gas},e} P_e}{T_e R} - y_{\text{CO}_2 s} \frac{Q_{\text{gas},s} P_s}{T_s R} + \frac{n_{\text{CO}_2 \text{ produzido}}}{t} \quad (8)$$

Balanço de  $\text{O}_2$ :

$$\frac{d(C_{\text{O}_2} V)}{dt} = y_{\text{O}_2 e} \frac{Q_{\text{gas},e} P_e}{T_e R} - y_{\text{O}_2 s} \frac{Q_{\text{gas},s} P_s}{T_s R} - q_{\text{O}_2} C_x V \quad (9)$$

Sendo que  $mx$ ,  $ms$  e  $mp$  são a massa de células, massa de substrato e massa de produto respectivamente. As variáveis  $P_e$ ,  $T_e$  e  $Q_e$  são as condições na entrada do reator, fornecidas pelo fluxômetro (condições CNTP), já as variáveis  $P_s$ ,  $T_s$  e  $Q_s$  são as

condições de saída do reator que são as mesmas do interior do reator,  $V$  é volume de meio,  $y_{CO_2e}$  e  $y_{CO_2s}$  são respectivamente fração molar de entrada e saída de  $CO_2$ , e por fim  $y_{O_2e}$  e  $y_{O_2s}$  são respectivamente fração molar de entrada e saída de  $O_2$ .

### 3.2.3 Controle dos Fluxos de Consumo de Oxigênio e de Substrato

Para a estimativa do fluxo de biomassa ( $J_x=h^{-1}$ , Eq.10) pela Eq. 11, a massa de células no reator ( $m_x=g_{Ms}$ ) foi obtida pelo produto da concentração celular ( $C_x=g_{Ms}.L^{-1}$ ) pelo volume ( $V=L$ ) de meio no reator.  $C_x$  foi inferido *at line*, com medições de DO a cada 30 min. O volume de meio durante a fase de alimentação é atualizado automaticamente pelo *software* de monitoramento e controle (Eq. 12) a partir da vazão volumétrica do meio de alimentação ( $F=L.h^{-1}$ ) e do volume de amostras retiradas.

$$J_X = \frac{r_x}{C_X} = \frac{g_{Ms}.L^{-1}.h^{-1}}{g_{Ms}.L^{-1}} = h^{-1} \quad (10)$$

Pela definição de fluxo se verifica que o fluxo de biomassa é igual a velocidade específica de crescimento. Logo pelo balanço:

$$r_X V = \frac{dm_X}{dt}$$

$$\mu \cdot C_X \cdot V = \frac{dm_X}{dt}$$

$$\mu = \frac{1}{m_X} \frac{dm_X}{dt}$$

$$J_X = \mu = \frac{1}{m_X} \frac{dm_X}{dt} \quad (11)$$

$$V = V_{in} + \int F dt \quad (12)$$

Sendo  $V_{in}$  o volume de meio (L) no reator no início da alimentação.

Para determinação do fluxo de gás carbônico  $J_{CO_2}$  ( $mmol.g_{Ms}^{-1}.h^{-1}$ ) pela Eq. 13, a velocidade volumétrica de produção de  $CO_2$  ( $r_{CO_2}=mmol.L^{-1}.h^{-1}$ ) foi calculada pelo balanço para o  $CO_2$  na fase gasosa (Eq. 8) resultando na Eq. 14.  $Q_{gas,s}$  foi obtido pelo balanço para o gás nitrogênio e demais inertes resultando na Equação 15. Para todos os



balanços foi admitido estado pseudo-estacionário. A fração de CO<sub>2</sub> no gás de entrada é obtida mediante a Eq. 16.

$$J_{\text{CO}_2} = \frac{r_{\text{CO}_2}}{C_X} \quad (13)$$

$$r_{\text{CO}_2} = \frac{1}{V} \left( \frac{y_{\text{CO}_2,s} Q_{\text{gas},s} P_s}{RT_s} - \frac{y_{\text{CO}_2,e} Q_{\text{gas},e} P_e}{RT_e} \right) \quad (14)$$

$$Q_{\text{gas},s} = \frac{Q_{\text{gas},e} (1 - y_{\text{O}_2,e} - y_{\text{CO}_2,e})}{(1 - y_{\text{O}_2,s} - y_{\text{CO}_2,s})} \quad (15)$$

$$y_{\text{CO}_2,e} = \frac{(y_{\text{CO}_2,\text{ar}}) Q_{\text{ar}} + (y_{\text{CO}_2,\text{N}_2}) Q_{\text{N}_2}}{Q_{\text{gas},e}} \quad (16)$$

A variável  $y_{\text{CO}_2,s}$  foi medida pelo analisador de CO<sub>2</sub> na corrente de saída do gás. O termo  $y_{\text{O}_2,s}$  foi aferida pelo sensor de O<sub>2</sub> na corrente de saída do gás. A vazão de gás na entrada ( $Q_{\text{gas},e}$ ) é a soma das vazões volumétricas de N<sub>2</sub> industrial e de ar (L.h<sup>-1</sup>) fornecidas pelos fluxômetros, que operam em pressão ( $P_e$  - atm) e temperatura ( $T_e$  - K) dadas pela CNPT. A pressão da corrente de gás efluente ( $P_s$  - atm) é medida pelo sensor de pressão, e a temperatura de saída ( $T_s$  - K) é a mesma do cultivo. A fração  $y_{\text{CO}_2,\text{ar}}$  e  $y_{\text{CO}_2,\text{N}_2}$  são frações conhecidas do CO<sub>2</sub> no ar e no gás nitrogênio industrial.

Os fluxos de consumo de O<sub>2</sub> e de substrato selecionados foram empregados para manipular a vazão de alimentação e do fornecimento de oxigênio conforme detalhado nas modelagens descritas a seguir.

### 3.2.3.1 Controle do Fluxo de Oxigênio em Malha Aberta

Com base nos valores selecionados pela simulação para o fluxo de O<sub>2</sub> ( $J_{\text{O}_2} = \text{mmol} \cdot \text{g}_M^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) é possível estimar a velocidade volumétrica de consumo de O<sub>2</sub> ( $r_{\text{O}_2} = \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) pela Eq. 17, sendo  $C_X$  estimado pela aferição da densidade ótica, conforme já mencionado anteriormente.

$$r_{\text{O}_2} = J_{\text{O}_2} C_X \quad (17)$$

Pelo balanço molar para o oxigênio na fase gasosa, juntamente com a Eq. 15 de  $Q_{gas,s}$ , é possível determinar o valor da fração molar de  $O_2$  no gás alimentado ao biorreator de forma que  $r_{O_2}$  seja mantido no valor desejado (Eq. 18). Foi admitido estado pseudo estacionário para a solução do sistema de equações

$$y_{O_2,e} \frac{Q_{gas,e} P_e}{T_e R} - y_{O_2,s} \frac{Q_{gas,s} P_s}{T_s R} - r_{O_2} V = 0$$

$$y_{O_2,e} \frac{Q_{gas,e} P_e}{T_e R} - y_{O_2,s} \frac{Q_{gas,e} (1 - y_{O_2,e} - y_{CO_2,e})}{(1 - y_{O_2,s} - y_{CO_2,s})} \frac{P_s}{T_s R} - r_{O_2} V = 0$$

$$y_{O_2,e} = y_{O_2,s} \frac{(1 - y_{O_2,e} - y_{CO_2,e}) P_s T_e}{(1 - y_{O_2,s} - y_{CO_2,s}) T_s P_e} - r_{O_2} V \frac{T_e R}{Q_{gas,e} P_e}$$

Sendo  $R$  a constante dos gases

Isolando para fração de entrada e rearranjando se obtém a equação 18:

$$y_{O_2,e} = \frac{(1 - y_{O_2,s} - y_{CO_2,s}) r_{O_2} V T_e T_s + (1 - y_{CO_2,e}) y_{O_2,s} Q_{gas,e} T_e P_s}{(1 - y_{O_2,s} - y_{CO_2,s}) Q_{gas,e} T_s P_e + y_{O_2,s} Q_{gas,e} T_e P_s} \quad (18)$$

Conhecido o valor de  $y_{O_2,e}$ , as vazões de entrada de ar ( $Q_{ar}$ ) e  $N_2$  industrial ( $Q_{N_2}$ ) podem ser calculadas a partir de balanços materiais para a vazão total de alimentação do gás, gerando as Eq. 19 e 20, respectivamente.

$$Q_{gas,e} = Q_{ar} + Q_{N_2}$$

$$y_{O_2,e} Q_{gas,e} = y_{O_2,ar} Q_{ar} + y_{O_2,N} Q_{N_2}$$

$$y_{O_2,e} Q_{gas,e} = y_{O_2,ar} Q_{ar} + y_{O_2,N} (Q_{gas,e} - Q_{ar})$$

$$Q_{ar} = \frac{(y_{O_2,e} - y_{O_2,N}) Q_{gas,e}}{(y_{O_2,ar} - y_{O_2,N})} \quad (19)$$

$$Q_{N_2} = Q_{gas,e} - \frac{(y_{O_2,e} - y_{O_2,N}) Q_{gas,e}}{(y_{O_2,ar} - y_{O_2,N})} \quad (20)$$

Onde  $y_{O_2,ar}$  é a fração molar de  $O_2$  presente no ar e  $y_{O_2,N}$  é a fração molar de  $O_2$  presente no nitrogênio industrial, as quais foram medidas pelo analisador de  $O_2$  antes do início do experimento. Destaca-se ainda que  $Q_{gas,e}$  teve seu valor inicial definido no início do experimento para que o número de graus de liberdade do sistema fosse zero. O valor escolhido ( $2,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) foi o menor possível para que os dois fluxômetros pudessem operar juntos, ou seja, acima da vazão mínima fornecida por cada um.

### 3.2.3.2 Controle do Fluxo de Oxigênio em Malha Fechada

Para o sistema em malha fechada, o controle da vazão de gás foi proposto usando a relação dos gases ideais (Eq. 21 e Eq. 22) e a estimativa do quociente respiratório (Eq.31) de acordo com o descrito no item 3.2.5.

$$Q_{O_2,e} = \frac{n_{O_2,e} \cdot R \cdot T_e}{P_e} \quad (21)$$

$$Q_{O_2,e} = y_{O_2,N_2} Q_{N_2} + y_{O_2,Ar} Q_{Ar} \quad (22)$$

Combinando as equações 17, 21 e 22 tem-se a relação para atualização da vazão de ar (Eq. 19) e fração do oxigênio de entrada (Eq. 20).

$$Q_{Ar} = \left( \frac{J_{O_2} \cdot V \cdot C_X \cdot R \cdot T_e}{P_e} - y_{O_2,N_2} Q_{N_2} \right) \cdot \frac{1}{0,21} \quad (23)$$

$$y_{O_2,e} = \frac{y_{O_2,ar} Q_{ar} - y_{O_2,N_2} Q_{N_2}}{Q_{ar} + Q_{N_2}} \quad (24)$$

### 3.2.3.3 Controle do Fluxo de Substrato

Da mesma forma, a partir do valor para o fluxo de substrato ( $J_S = \text{mmol}\cdot\text{g}_M^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) selecionado é possível determinar a velocidade volumétrica de consumo de substrato ( $r_S = \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) pela Eq. 25.

$$r_S = J_S C_X \quad (25)$$

Durante a fase de alimentação,  $r_s$  (Eq. 26) pode ser estimado fazendo o balanço material para a concentração de substrato ( $C_s = g_{M_s} \cdot L^{-1}$ ). Assumindo a hipótese do estado pseudo-estacionário para  $C_s$ , temos:

$$\begin{aligned} \frac{d(C_s \cdot V)}{dt} &= F C_{SF} - r_s V - F_a C_s \\ V \frac{d(C_s)}{dt} + C_s \frac{d(V)}{dt} &= F C_{SF} - r_s V - F_a C_s \\ V \frac{d(C_s)}{dt} + C_s (F - F_a) &= F C_{SF} - r_s V - F_a C_s \\ V \frac{d(C_s)}{dt} &= F (C_{SF} - C_s) - r_s V \\ F (C_{SF} - C_s) - r_s V &= 0 \\ r_s &= J_s \cdot C_X = \frac{F (C_{SF} - C_s)}{V} \end{aligned} \quad (26)$$

Onde  $F$  é a vazão volumétrica de meio de alimentação ( $L \cdot h^{-1}$ ),  $C_{SF}$  é a concentração de substrato no meio de alimentação ( $g \cdot L^{-1}$ ) e  $F_a$  é a vazão de retirada de amostra.

A concentração de substrato pode ser correlacionada com o coeficiente de rendimento em biomassa ( $Y_{X/S}$ ), conforme mostra a Eq. 27.

$$Y_{X/S} = \frac{m_X - m_{X,in}}{m_{SF} - C_s V} \quad (27)$$

Onde  $m_X$  é a massa de células em suspensão durante a fase de alimentação (g);  $m_{X,in}$  é a massa de células presente no início da alimentação (g) e  $m_{SF}$  é massa de substrato fornecida durante a alimentação, que pode ser estimada por:

$$m_{SF} = C_{SF} \int F dt \quad (28)$$

Assumindo  $F$  constante, atualizado em intervalos de tempo  $\Delta t_F$  (por exemplo, a cada 0,5 h) e admitindo que a cada novo intervalo de tempo se tem o início de uma nova alimentação, as equações 26 a 28 podem ser combinadas para obtenção de um

polinômio de segunda ordem e resolvidas algebricamente, tornando F uma função do fluxo de substrato (Eq. 25).

$$\begin{aligned}
 Y_{X/S}(C_{SF} \cdot F \cdot \Delta t_F - C_s V) &= m_X - m_{X,in} \\
 Y_{X/S} \cdot C_s \cdot V &= Y_{X/S} \cdot C_{SF} \cdot F \cdot \Delta t_F - (m_X - m_{X,in}) \\
 C_{SF} - \frac{J_s \cdot C_X \cdot V}{F} &= C_s \\
 (C_{SF} - \frac{J_s \cdot C_X \cdot V}{F}) Y_{X/S} \cdot V &= Y_{X/S} \cdot C_{SF} \cdot F \cdot \Delta t_F - (m_X - m_{X,in}) \\
 F &= \frac{\left[ \left( \frac{m_X - m_{X,in}}{Y_{X/S}} \frac{1}{V} + C_{SF} \right) \right] - \sqrt{\left( \frac{m_X - m_{X,in}}{Y_{X/S}} \frac{1}{V} + C_{SF} \right)^2 - 4 \left( \frac{C_{SF} \Delta t_F}{V} \right) (C_X J_s V)}}{2 \left( \frac{C_{SF} \Delta t_F}{V} \right)} \quad (29)
 \end{aligned}$$

Admitindo que o processo não esteja em estado pseudo-estacionário o novo equacionamento será dado pela equação 30. Esta equação foi incorporada no segundo cultivo com a lógica em malha fechada. O termo derivativo da concentração de substrato foi adicionado como uma entrada e atualizado *at line* pelo uso de um aparelho medidor de glicemia OneTouch UltraMini.

$$\begin{aligned}
 V \frac{d(C_s)}{dt} &= F(C_{SF} - C_s) - r_s V \\
 C_{SF} - \frac{1}{F} (V \frac{d(C_s)}{dt} + r_s V) &= C_s \\
 F &= \frac{\left[ \left( \frac{m_X - m_{X,in}}{Y_{X/S}} \frac{1}{V} + C_{SF} \right) \right] - \sqrt{\left( \frac{m_X - m_{X,in}}{Y_{X/S}} \frac{1}{V} + C_{SF} \right)^2 - 4 \left( \frac{C_{SF} \Delta t_F}{V} \right) (C_X J_s V + V \frac{d(C_s)}{dt})}}{2 \left( \frac{C_{SF} \Delta t_F}{V} \right)} \quad (30)
 \end{aligned}$$

A FIGURA 7 e a FIGURA 8 ilustram e resumem as respectivas equações e lógicas de controle na forma de fluxogramas.

FIGURA 7 - Fluxograma para o sistema de controle em malha aberta

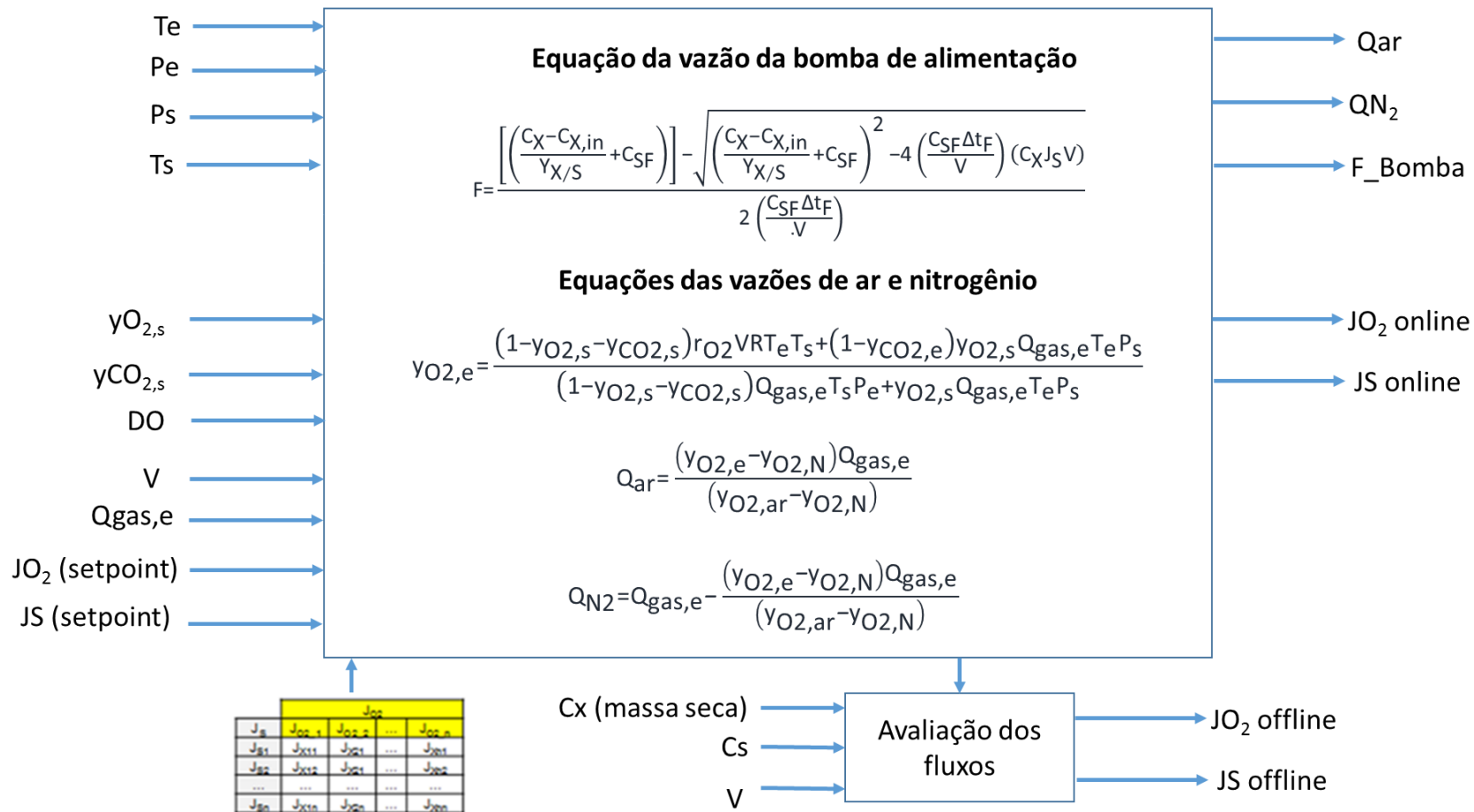
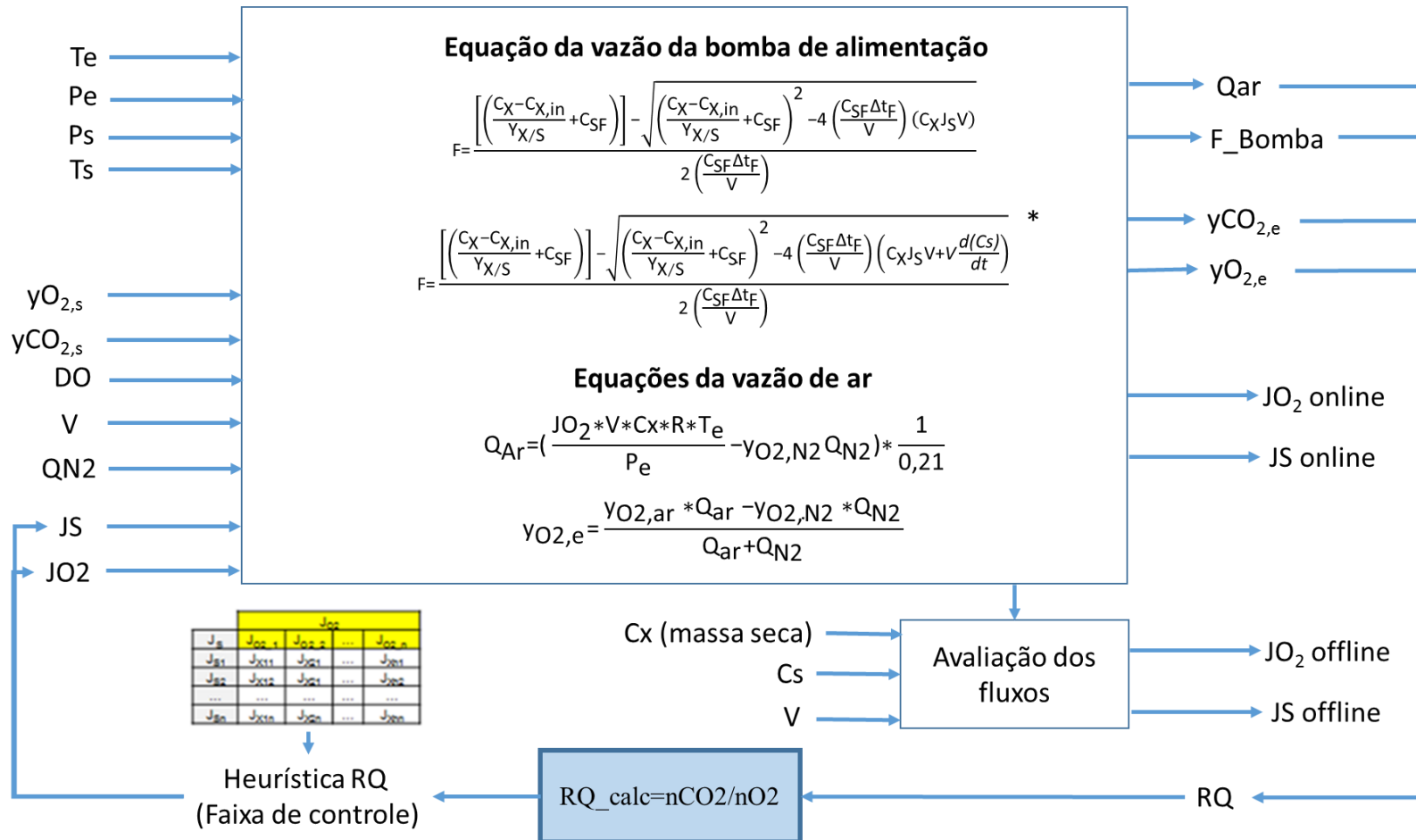


FIGURA 8 - Fluxograma para o sistema de controle em malha fechada



\*Equação de alimentação usada para experimento com lógica malha fechada com inclusão do termo derivativo

### 3.2.4 Ajustes do Controle e do *Softsensor*

Para a atuação do modelo proposto no caso das vazões de ar e nitrogênio industrial foram inseridas algumas condições na lógica já existente no sistema de controle SUPERSYS\_HCDC. A primeira modificação foi a inserção de um filtro de média móvel de 10 pontos proposto por Horta (2012) para as variáveis de entrada: pressão de entrada ( $P_e$ ), temperatura de saída ( $T_s$ ), fração de oxigênio no gás de saída ( $y_{O_2,s}$ ), fração de gás carbônico na saída ( $y_{CO_2,s}$ ), fração de oxigênio no gás de entrada ( $y_{O_2,e}$ ), fração de gás carbônico na entrada ( $y_{CO_2,e}$ ). O intuito do filtro foi diminuir o ruído proveniente da leitura dos respectivos sensores.

Também foi adicionado um atraso médio na atuação com  $\Delta t_{lag}=30s$ . Este valor se refere ao intervalo de tempo necessário para que uma determinada variação na vazão de gás de entrada percorra todo o sistema de tubulação e seja detectada nos sensores de oxigênio e gás carbônico. Esse valor foi obtido mediante testes prévios, nos quais os tempos de resposta do sensor mediante ao estímulo foram cronometrados. A condição está descrita no pseudocódigo da FIGURA 9.

FIGURA 9 - Pseudocódigo da atuação do controle de vazões

<p><b>PROCEDIMENTO:</b> Atraso na atuação da lógica</p> <p><b>Início</b></p> <p>Se (<math>t_{bat}</math>) <math>\leq</math> (<math>t_{cult}</math>)  <math>\Delta t_{lag}=1s</math>;</p> <p><b>Senão</b>  <math>\Delta t_{lag}=30s</math>;</p> <p><b>Fim</b></p> <p><b>Fim do programa</b></p>
--

$t_{bat}$  - tempo de batelada;  $t_{cult}$  - tempo de cultivo;  $\Delta t_{lag}$  - tempo de atraso

Como já citado, para o sistema em malha aberta, a vazão do gás de entrada ( $Q_{gás,e}$ ) é uma variável do modelo que necessita ser definida para que o sistema tenha como zero o número de graus de liberdade. Para garantir que ao longo do cultivo a vazão se mantenha próxima a inicial e não convirja a condições que não são interessantes, foi proposto o pseudocódigo da FIGURA 10.



FIGURA 10 - Pseudocódigo para vazão de gás de entrada

**PROCEDIMENTO:** Condicional para atualização das vazões

**Início**

$Q_{\text{gas,e}} = 2,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  
 $Q_{\text{in\_gás}} = Q_{\text{ar,calc}(n)} + Q_{\text{N2,calc}(n)}$ ;

**Se**  $0,99 * Q_{\text{gas,e}} < Q_{\text{in\_gás}} < Q_{\text{gas,e}} * 1,01$

$Q_{\text{ar,atua}(n)} = Q_{\text{ar,calc}(n)}$ ;  
 $Q_{\text{N2,atua}(n)} = Q_{\text{N2,calc}(n)}$ ;

**Senão**

$Q_{\text{ar,atua}(n)} = Q_{\text{ar,atua}(n-1)}$ ;  
 $Q_{\text{N2,atua}(n)} = Q_{\text{N2,atua}(n-1)}$ ;

**Fim**

**Fim do programa**

$Q_{\text{gas,e}}$  - gás de entrada;  $Q_{\text{in\_gás}}$  - somatório das vazões calculadas;  $Q_{\text{ar,calc}(n)}$  - vazão de ar calculada;  $Q_{\text{N2,calc}(n)}$  - vazão de nitrogênio calculada;  $Q_{\text{ar,atua}(n)}$  - vazão de ar enviada ao fluxômetro;  $Q_{\text{N2,atua}(n)}$  - vazão de nitrogênio enviada ao fluxômetro;  $Q_{\text{ar,atua}(n-1)}$  - vazão de ar enviada ao fluxômetros no passo anterior;  $Q_{\text{N2,atua}(n-1)}$  - vazão de nitrogênio enviada ao fluxômetros no passo anterior.

Para malha fechada, os valores de  $J_{\text{O}_2}$  e  $J_s$  são atualizados de acordo com RQ (Eq. 31), calculado usando os balanços de material para gás carbônico (Eq. 8), oxigênio (Eq 9) e nitrogênio, dados de frações de saída e frações de entrada obtidos pelo sistema de aquisição. A heurística de controle proposta foi a utilizada no pseudocódigo presente na FIGURA 11. Vale ressaltar que RQ foi dividido em RQ online e offline. O RQ se refere ao valor calculado online usando os dados fornecidos pelo analisador de gases e balanços de massa (Eq. 8 e Eq. 9). O RQ offline usou as informações dos fluxos offline (seção 3.2.2 e seção 3.2.3).

$$RQ = \frac{r_{\text{CO}_2}}{r_{\text{O}_2}} = \frac{J_{\text{CO}_2}}{J_{\text{O}_2}} \quad (31)$$

FIGURA 11 - Pseudocódigo da heurística de controle proposta para a malha fechada.

```

PROCEDIMENTO: Heurística de controle do RQ

Início
RQ_calc=rCO2/rO2;
JO2_atual= f(RQ_calc);
JCO2_atual=f(rCO2;Cx);

Se RQ_menor ≤ RQ_calc ≤ RQ_maior
  JO2=f(RQ_calc);
  JS=f(JO2);
  Qar=f(JO2);
  F_bomba=f(JS);
Senão
  Se RQ_calc<RQ_menor
    Se JCO2_atual<JCO2_anterior
      JO2=JO2_anterior;
      JS=JS_anterior;
      Qar=Qar_anterior;
      F_bomba=f(JS);
    Senão
      JO2=JO2_atual-0,5;
      JS=f(JO2);
      Qar=f(JO2);
      F_bomba=f(JS);
    Fim
  Fim
  Se RQ_calc>RQ_maior
    JO2=JO2_atual+0,5;
    JS=f(JO2);
    Qar=f(JO2);
    F_bomba=f(JS);
  Fim
Fim
Fim do programa

```

RQ\_calc – RQ calculado; nCO<sub>2</sub> – número de mols produzido de CO<sub>2</sub>; nO<sub>2</sub> - número de mols consumidos de O<sub>2</sub>; RQ\_menor – limite inferior RQ; RQ\_maior - limite superior RQ; JO<sub>2</sub> - fluxo de O<sub>2</sub>; f(RQ) – função de RQ; JS – fluxo de substrato; f(JO<sub>2</sub>) – função de JO<sub>2</sub>; Qar – vazão de ar; F\_bomba – vazão da bomba de alimentação; f(JS) – função de substrato; JCO<sub>2</sub>\_atual – fluxo de JCO<sub>2</sub> da iteração atual; JCO<sub>2</sub>\_anterior - fluxo de JCO<sub>2</sub> da iteração anterior; JO<sub>2</sub>\_anterior - fluxo de JO<sub>2</sub> da iteração anterior; JS\_anterior - fluxo de substrato da iteração anterior; Qar\_anterior – vazão de ar da iteração anterior; JO<sub>2</sub>\_atual – fluxo de JO<sub>2</sub> calculado na iteração atual; Δ - decremento ou incremento;

### 3.2.5 Estudos *in silico*

Os estudos *in silico* foram conduzidos e acompanhados pela Dra. Cíntia Regina Sargo com auxílio do software livre Optflux 3.2.7 (ROCHA *et al.*, 2010), que dispõe de ferramentas e algoritmos para simulação e otimização das redes metabólicas. Diferentes fluxos de assimilação da fonte de carbono ( $J_s$ ) e de oxigênio ( $JO_2$ ) foram usados como dados de entrada, empregando-se o método de otimização *pFBA* (*parsimonious* Flux Balance Analysis) (LEWIS *et al.*, 2010). Foi usado o GSMM iND750 adaptado por Montaño (2013). Como fonte de carbono foi usada a glicose. Os fluxos estimados pelo modelo para produção de biomassa ( $J_x$ ),  $CO_2$  ( $J_{CO_2}$ ) e etanol ( $J_{EtOH-etanol}$ ) foram comparados com dados experimentais obtidos de cultivos. Foi utilizada a função objetivo para maximização da biomassa por esta representar melhor o comportamento real do microrganismo nas condições estabelecidas.

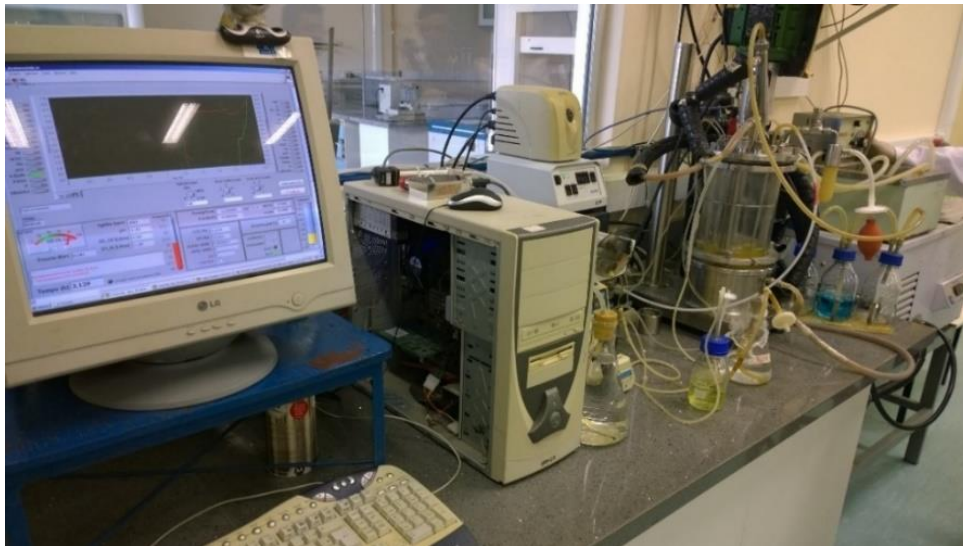
A partir das simulações, foi possível avaliar faixas de fluxos de assimilação da fonte de carbono ( $J_s$ ) e de oxigênio ( $JO_2$ ) que proporcionaram um elevado fluxo de etanol ( $J_{EtOH}$ ). Para obtenção dessas faixas, inicialmente o fluxo de substrato foi mantido constante e o fluxo de oxigênio foi gradativamente reduzido até o ponto que foi observado um decréscimo no fluxo de etanol, esse ponto anterior a diminuição foi determinado como fluxo máximo de etanol para as condições simuladas, sendo geradas as matrizes de fluxos (Anexo A, TABELA 11). Contudo os fluxos máximos de etanol foram obtidos a partir de fluxos muito baixos de consumo de oxigênio, tal condição dificultaria seu fornecimento e o seu controle em condições experimentais. Então, posteriormente foram selecionados os dados que representavam cerca de 90% do fluxo máximo de etanol (Anexo A, TABELA 12), esses pontos foram denominados de pontos ótimos de produção de etanol, e permitiram o fornecimento de um fluxo experimental de oxigênio. Esses agrupamentos de dados foram usados para obtenções das relações matemáticas utilizadas no programa. No caso dos chamados cultivos em malha fechada também se utilizaram os dados simulados próximos dos pontos ótimos (90% do fluxo máximo de etanol), selecionando pontos com RQ menores que 15 para obter as relações matemáticas.

### 3.2.6 Sistema de Aquisição

O sistema experimental (FIGURA 12 e FIGURA 13) para controle do reator foi formado pelos seguintes instrumentos: computador munido de software de controle (SUPERSYS\_HCDC);

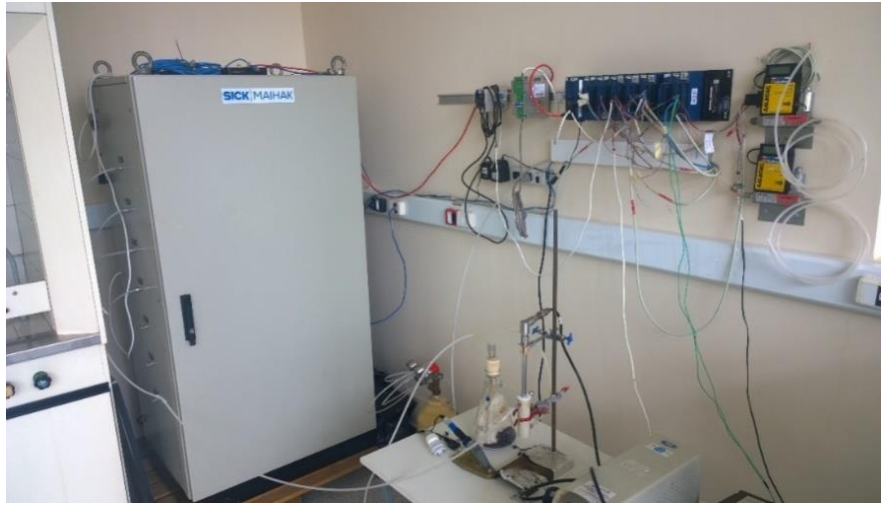
*compact Field Point* (cFP) da National Instruments, para conexão da maioria dos instrumentos ao computador; inversor de frequência controlando a velocidade de agitação, via computador/cFP; bomba de alimentação ISMATEC controlada via computador/cFP; pHmetro GLI com aquisição via cFP; dois eletrodos de oxigênio (InPRO 6800), um para medidas de oxigênio dissolvido no reator e outro para aferição da fração de saída de oxigênio; dois transmissores de oxigênio dissolvido (modelo CE, O2 4050) com aquisição via cFP, um para oxigênio dissolvido no reator e outro para a fração de oxigênio na saída do reator; analisador de gases (Sick/MAIHAK S710) com aquisição analógica via cFP; banho térmico controlado via interface NOVUS; termopar com aquisição via cFP; bombas de ácido e base (Masterflex) com controle on/off via computador/cFP; 2 fluxômetros de massa (GFC AALBORG) empregados para suprir ar, nitrogênio industrial e nitrogênio ultrapuro controlados via cFP. Todos os instrumentos listados apresentam dados com aquisição em tempo real, com intervalos de salvamento de 10 segundos (HORTA, 2012). Durante os três últimos cultivos, o sensor de capacitância (BIOMASS System – FOGALE NANOTECH) foi usado para monitorar a densidade de células viáveis. A frequência de referência foi de 10 MHz (sinal usado para compensar distúrbios), e a frequência para levedura foi de 2,076 MHz. O sinal de resposta, na forma de permissividade e condutividade, foi transferido para o computador via saída analógica com período de aquisição de um minuto.

FIGURA 12 - Sistema controle e aquisição



Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 13 - Analisador de Gases e cFP



Fonte: Acervo pessoal

### 3.3 Cultivos Batelada Alimentada de *S. cerevisiae* em Biorreator

Para avaliar o desempenho do sistema de controle proposto foram realizados cultivos em batelada alimentada usando a levedura comercial Itaiquara e o meio mínimo ( $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de uréia com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose como fonte de carbono).

Os cultivos foram realizados em duas etapas. A primeira etapa consistiu em realizar um processo batelada plenamente aerado para geração de biomassa até uma DO equivalente a concentração entre 8 a  $12 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ao atingir a concentração desejada, a segunda etapa referente a limitação de oxigênio teve início com a ativação da lógica de controle para a bomba de alimentação e para o controle das vazões de ar e nitrogênio industrial com aproximadamente 0,01% de  $\text{O}_2$ . Foram usadas mangueiras Norprene e de poliuretano em todos os cultivos para evitar interferência do oxigênio proveniente da difusão, e a agitação foi mantida constante em 400 rpm.

O modo batelada alimentada visou manter o fluxo de assimilação de substrato dentro da faixa desejada e, simultaneamente, impor o nível de limitação por oxigênio requerido para direcionar o metabolismo para a formação de etanol. Para o fornecimento do meio de alimentação, foi utilizada a bomba peristáltica ISMATEC-BVP. A concentração da fonte de carbono no meio de alimentação foi de  $300 \text{ g.L}^{-1}$ , todos os outros componentes foram preparados nas mesmas concentrações do meio batelada. O volume de meio utilizado foi de

3L para o controle em malha aberta e 3,5L para o controle em malha fechada, sendo adicionado a esses volumes 1 mL.L<sup>-1</sup> de antiespumante (polipropilenoglicol - PPG).

O biorreator usado foi tipo tanque agitado, encamisado e com aeração controlada, com capacidade de 5 litros. A temperatura foi mantida a 30°C e o em pH 4,5. O controle de pH foi feito pela adição automática de NH<sub>4</sub>OH 5% ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20% por intermédio de uma lógica já programada no SUPERSYS\_HCDC. O cultivo foi acompanhado em intervalos de 30 minutos, nos quais foram retirados cerca de 20 mL de amostra armazenados em tubos Falcon, que foram dispostos imediatamente em gelo. Uma alíquota foi usada para análise de densidade ótica, o restante foi centrifugado e o sobrenadante congelado para posterior análise de metabólitos.

Foram realizados também dois cultivos denominados tipo usina e estritamente anaeróbio, sem controle do fornecimento de oxigênio, para comparação. Esses dois cultivos utilizaram as mesmas condições dos cultivos anteriores e o perfil de alimentação reproduziu o utilizado no cultivo com malha fechada. O cultivo denominado tipo usina não teve uso de corrente de gás de entrada, mas foi mantido o controle pH e temperatura, com agitação constante em 400 rpm. O cultivo completamente anaeróbio teve como corrente de gás de entrada somente nitrogênio ultrapuro (0,5-1 L.min<sup>-1</sup>) para garantir a ausência de oxigênio no sistema

### 3.3.1 Obtenção dos parâmetros de desempenho dos cultivos

As velocidades específicas de produção de etanol para cada ponto do cultivo foram obtidas mediante balanço de massa, tanto para etanol quanto para glicérol, resultando na Eq. 32, sendo  $\mu_p$ , a produtividade específica de produção de produto. A velocidade específica de crescimento, usada para analisar o perfil em relação a concentração de etanol e representada na forma de gráficos, foi dada pela equação 11.

$$\begin{aligned} \frac{d(mp)}{dt} &= r_p V \\ \frac{d(mp)}{dt} &= C_X * \mu_p * V \\ \frac{d(mp)}{dt} \frac{1}{m_X} &= \mu_p \end{aligned} \tag{32}$$

A velocidade específica de crescimento, apresentada nas tabelas, foi estimada pela regressão linear ao se construir gráficos do logaritmo neperiano da massa de células (eixo Y) pelo tempo (eixo X), onde  $\mu$  será o coeficiente angular.

Os termos de rendimento, como  $Y_{P/S}$ , foram obtidos realizando uma regressão linear após serem construídos gráficos da massa do componente de interesse (eixo Y, por exemplo, massa de etanol) contra a massa de substrato (eixo X), no qual o coeficiente angular é o termo de rendimento. O rendimento pode ser representado pela Equação 36, tendo como exemplo rendimento para produtos.

A Eq. 33 representa a forma geral do cálculo do volume. Para um processo batelada alimentada,  $V_n$  é o volume do reator no instante n;  $V_{in}$  é o volume do reator logo antes do início da alimentação;  $V_{ad}$  é o volume adicionado acumulado; e  $V_{ret}$  é o volume retirado acumulado. No caso de um processo batelada, o termo de alimentação ( $V_{ad}$ ) é eliminado e  $V_{in}$  representa o volume inicial da batelada.

$$\begin{aligned} \frac{dV}{dt} &= F - F_a \\ V - V_{in} &= F \cdot \Delta t - F_a \cdot \Delta t \\ V_n &= V_{in} + V_{ad} - V_{ret} \end{aligned} \quad (33)$$

A Equação 34 e a Equação 35 são obtidas mediante integração das equações 6 e 7 respectivamente. Para a Eq. 34 e 35,  $m_s$  representa massa de substrato;  $m_p$  é a massa de produto; o índice subscrito “in” representa o instante que precede o início da alimentação; o índice subscrito “n” representa um instante no tempo; o índice subscrito “ad” representa massa adicionada; e o índice subscrito “0” representa o início do cultivo.

$$\begin{aligned} \frac{d(m_s)}{dt} &= F C_{SF} - r_s V \\ \Delta m_s &= F \cdot C_{SF} \cdot \Delta t - r_s \cdot V \cdot \Delta t \\ m_{s,n} - m_{s,in} &= m_{s,ad} - m_s \\ m_s &= m_{s,in} - m_{s,n} + m_{s,ad} \end{aligned} \quad (34)$$

De forma análoga para os produtos (etanol, glicerol e células):

$$\frac{d(m_p)}{dt} = r_p V$$

$$r_p \cdot V \cdot \Delta t = \Delta m_p$$

$$m_p = m_{p,n} - m_{p,0} \quad (35)$$

Usando as definições de rendimento e de concentração se obtém a Equação 36, que representa os cálculos realizados para rendimentos em produtos (BORZANI, 2008).

$$Y_P = \frac{m_P}{m_S}$$

$$Y_P = \frac{V_n \cdot C_{P,n} - V_{in} \cdot C_{P,0}}{V_{ad} \cdot C_{SF} + V_{in} \cdot C_{S,in} - V_n \cdot C_{S,n}} \quad (36)$$

No caso de uma batelada alimentada, o termo  $C_{P,0}$  representa a concentração de produto no início do cultivo;  $C_{P,n}$  é a concentração do produto no instante  $n$ ;  $C_{S,in}$  é a concentração de substrato logo antes da alimentação iniciar;  $C_{S,n}$  é a concentração do produto no instante  $n$ ; e  $C_{SF}$ . Como já citado, os cálculos para rendimento em células são análogos.

A produtividade volumétrica dos produtos foi determinada pela equação 37 (BORZANI, 2008).

$$Pr_p = \frac{V_n \cdot C_{P,n} - V_0 \cdot C_{P,0}}{V_n \cdot t_n} \quad (37)$$

### 3.4 Metodologia analítica

#### 3.4.1 Concentração Celular

O acompanhamento do crescimento celular foi feito pela medida da densidade ótica do caldo de cultivo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), bem como por medidas de massa seca.

O método consiste em realizar um acompanhamento da densidade ótica de alíquotas retiradas durante o cultivo e correlacioná-las com a massa de células presentes no meio de cultura. A cada 30 min foram retiradas cerca de 2 mL das amostras de 20 mL retiradas do



biorreator para leitura de DO. Parte das amostras coletadas foram submetidas à filtração em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  previamente secas e pesadas para determinação da massa seca. As membranas foram dispostas em estufa a 70°C por 24 h. Ao atingir massa constante, o conjunto de membrana biomassa foi novamente pesado. A diferença das massas forneceu a massa em gramas de biomassa que foi correlacionada com as leituras obtidas no espectro para obter a curva. Para manter a correlação linear, as amostras com DO's superiores a 1 foram diluídas antes da leitura.

Como já referido, o sensor de biomassa (FOGALE NANOTECH – Biomass System) foi usado nos três últimos cultivos para acompanhar a concentração de células viáveis. O sinal obtido pelo sensor é uma função das propriedades dielétricas das células vivas, ou seja, células viáveis apresentam membranas plasmáticas intactas que sofrem uma intensa polarização ao serem submetidas a um campo elétrico, comportando -se como pequenos capacitores. Essa característica permite aferir a concentração de células viáveis (MARKX e DAVEY, 1999; PRODAN, PRODAN, MILLER Jr, 2008)

Os dados de permissividade fornecidos pelo sistema do sensor de biomassa (0,004-0,02 Ampere, sinal analógico) foram multiplicados por um fator de calibração para conversão das leituras de ampere para picofarads ( $\text{pF}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). O sinal foi tratado com um filtro de média móvel de 80 pontos. Com os dados de permissividade tratados combinados com balanço de massa para células (Eq. 5), admitindo que a permissividade é proporcional a concentração de células viáveis, o fluxo de células ( $J_x$ ) foi estimado em tempo real e comparado com os fluxos simulados no Optflux.

### 3.4.2 Concentração de Açúcares e Metabólitos

Os sobrenadantes coletados ao longo dos cultivos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor UV PDA W996) a fim de avaliar o consumo da fonte de carbono e secreção de ácidos orgânicos, glicerol e etanol. Para isto, utilizou-se uma coluna de troca iônica (coluna Aminex HPX-87H - Bio-Rad), a 60 °C, com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5 mM) como fase móvel e vazão de 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

O detector de índice de refração diferencial (Waters 410) foi utilizado para análise dos açúcares e etanol, e os ácidos orgânicos foram determinados pelo detector de UV (Waters 486) a 210 nm de comprimento de onda.

A concentração de glicose também foi determinada pelo método enzimático glicose-oxidase (GOD-PAP, Laborlab, Brasil). Também foi usado o aparelho de glicemia OneTouch UltraMini para aferir a concentração de glicose.

#### 3.4.3 Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi realizada por microscopia ótica mediante contagem de células em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi diluída 10x em água e depois uma nova diluição de 2x com corante azul de metileno. Após 5 min de contato com o corante, 4  $\mu\text{L}$  foram dispostos na câmara e visualizadas no microscópio para contagem. As células coradas são as não viáveis e as não coradas são as que apresentam viabilidade celular. A relação entre o número de células viáveis e células totais forneceu a viabilidade em porcentagem.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos cultivos estão apresentados em função da estratégia de controle utilizada e comparados com as outras duas condições de fermentação sem controle (tipo usina e estritamente anaeróbio) estudadas, conforme descrito no item 3.3. Primeiramente foi avaliado o desempenho do cultivo com levedura de panificação submetida ao controle em malha aberta (CMA). Em seguida foram avaliados e comparados o desempenho dos cultivos com a levedura de panificação com controle em malha fechada (CMF1).

Também são apresentados dados das três estratégias de fermentação avaliadas: microaerado (CMF2), tipo usina (FTU) e estritamente anaeróbio (FEA). Os resultados foram avaliados e comparados. As barras de erro presentes nos gráficos são referentes aos desvios obtidos das médias das triplicatas de cada medida.

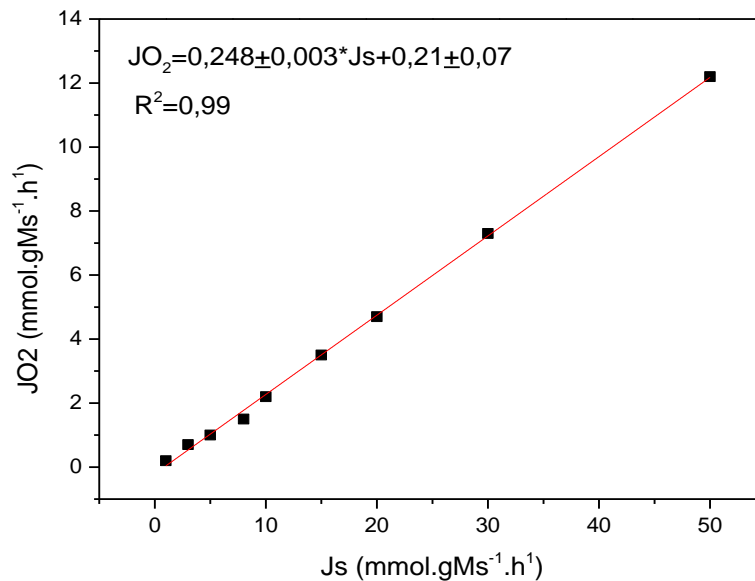
### 4.1 Desempenho das estratégias de controle

#### 4.1.1 Estratégia de Controle em Malha Aberta (CMA)

A partir das simulações feitas no Optflux, os pontos com melhor produção de etanol foram selecionados (seção 3.3.1 e Anexo A, TABELA 12). Foi possível obter um modelo linear (Eq. 38) para relacionar a variação do fluxo de oxigênio em função do fluxo de substrato representado na FIGURA 14.

$$JO_2=(0,248\pm 0,003)*J_s+(0,21\pm 0,07) \quad (38)$$

FIGURA 14 - Modelo linear para os pontos ótimos de produção de etanol



A FIGURA 15 e a FIGURA 16 representam a atuação do programa quanto aos *setpoints* estabelecidos de  $J_s=11,6 \text{ mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $JO_2=2,7 \text{ mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , bem como o fluxo real apresentado pela levedura calculado a partir dos dados experimentais (fluxo calculado off-line). Esses valores de fluxo off-line foram calculados pelo balanço de massa para os componentes em termos mássicos, levando em conta os valores atualizados de massa seca, volume e dados de concentração (Eq. 4 a 9).

O valor de fluxo de substrato *setpoint* foi selecionado levando em conta dados de fermentação em batelada habituais em condições fermentativas para levedura de panificação. O valor do fluxo de oxigênio *setpoint* foi obtido a partir do modelo previamente proposto.

FIGURA 15 - Fluxo de oxigênio durante a fase de alimentação até o fim do cultivo CMA: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), setpoint (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—).

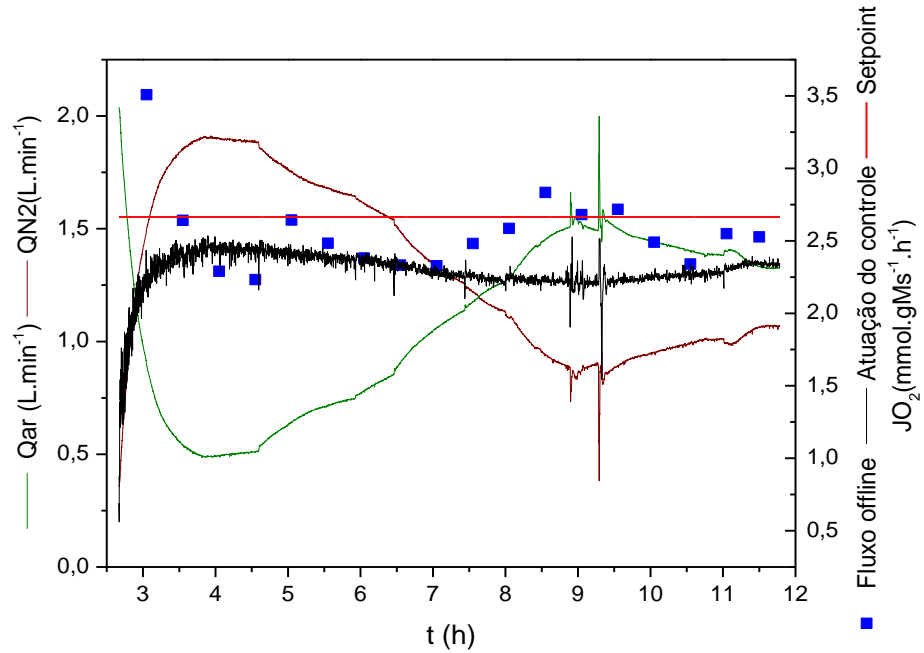
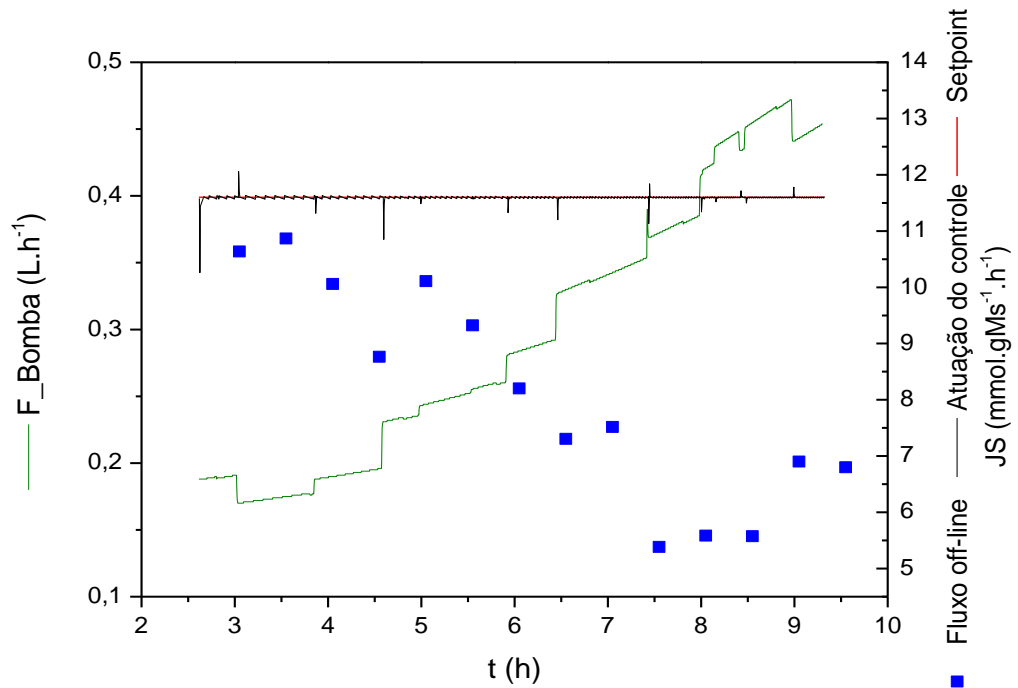


FIGURA 16 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo CMA: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), setpoint (—) e vazão da bomba de alimentação (—).

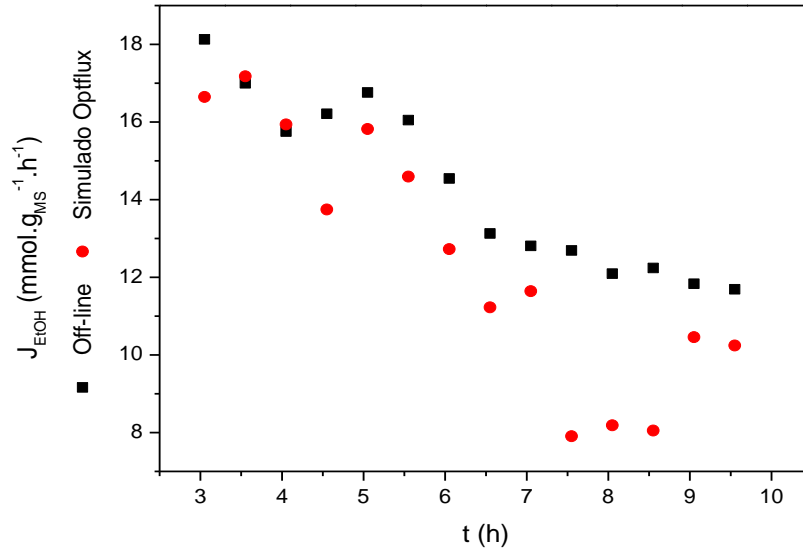


O fluxo de oxigênio calculado online apresentou um erro sistemático em relação ao setpoint. Tal comportamento é devido à característica de malha aberta, ou seja, não há realimentação da saída e conseqüentemente não há ação de controle para minimizar o erro. Nesse caso as entradas são usadas como sinais de referência onde se espera que se atinja a saída desejada (OGATA, 2011; CASTRUCCI, SALES e BITTAR, 2011). A atuação do controle teve início às 2,55 horas de cultivo e permaneceu ativa até o fim do cultivo (FIGURA 15). A resposta da levedura, ou fluxo corrigido off-line (usando as informações atualizadas de massa seca e volume) teve um  $JO_2$  médio de  $2,6 \pm 0,4 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$  até 6,05 horas de cultivo, que sofreu uma redução para  $2,5 \pm 0,2 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$  até o fim do experimento. O fluxo controlado online por sua vez foi de  $2,3 \pm 0,2 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$ . Dessa forma o fluxo off-line se manteve bem próximo frente ao  $JO_2$  controlado.

O erro sistemático quanto ao fluxo de substrato foi menor, porém a levedura apresentou uma resposta mais lenta quando comparado ao fluxo de oxigênio. A lógica para alimentação iniciou após 2,55 horas de cultivo e permaneceu ativa até o fim do meio de alimentação que se deu por volta de 9,35 horas de cultivo (FIGURA 16).  $J_s$  real (recalculado off-line) teve um valor médio de  $10 \pm 1 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$ , que apresentou uma queda após 6,05 horas de cultivo atingindo um novo valor médio  $6,4 \pm 0,9 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$ . Já o fluxo controlado (atuação do controle) apresentou um valor médio de  $11,59 \pm 0,03 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$ .

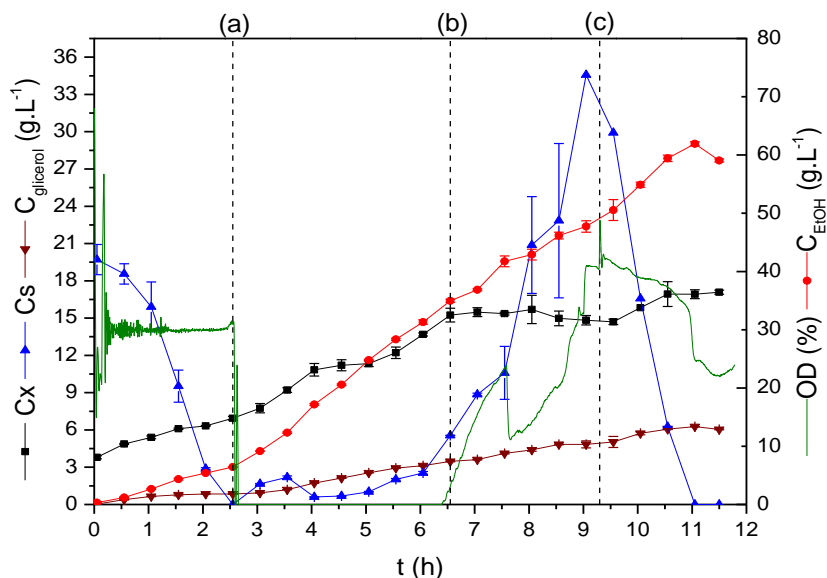
Pode ser notado que o fluxo de oxigênio foi responsável por manter o fluxo de substrato em  $10 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$  durante 3,5 horas de alimentação. Logo, as respostas apresentadas pela levedura se mantiveram próximas ao que foi proposto pelo modelo linear durante esse período de atuação, pois para o  $J_s$  observado o  $JO_2$  correspondente seria  $2,3 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$ . Quanto ao  $J_{\text{etanol}}$  (FIGURA 17), o valor observado médio de  $16 \pm 1 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$  foi próximo ao simulado  $15,6 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1} \cdot h^{-1}$  de acordo com o modelo de pontos ótimos de produção de etanol.

FIGURA 17 – Perfil do fluxo de etanol no cultivo CMA. Sendo (■) fluxo off-line e (●) fluxos simulados pelo Optflux



A partir de 6,55 horas de cultivo, como indicado anteriormente, o fluxo de substrato sofreu uma redução que coincidiu com o aumento da concentração de glicose e oxigênio dissolvido no meio (FIGURA 18). O modelo utilizado nas simulações é um modelo estequiométrico, não sendo capaz de prever possíveis efeitos de toxicidade e inibição. Assim a redução observada do  $J_s$  pode ser admitida como um dos fatores que contribuíram para o acúmulo de glicose no reator, pois não houve correção da vazão de alimentação para o novo fluxo observado, o que levou à alimentação de uma quantidade de substrato maior do que a consumida pelas células. O mesmo vale para o fluxo de oxigênio que não sofreu correção, causando o aumento na concentração de oxigênio dissolvido observada.

FIGURA 18 - Perfil do cultivo CMA sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação.



A tolerância ao etanol, relacionada com fatores nutricionais e fisiológicos, pode ter sido fator que contribuiu para a redução do fluxo de substrato e o consequente acúmulo de glicose. As leveduras começam a sentir e alterar seu metabolismo devido ao etanol, quando este atinge concentrações de 0,75 a 1,10 M (34,5 g.L<sup>-1</sup> a 50,7 g.L<sup>-1</sup>) (THOMAS e ROSE, 1979; LEAO e VAN UDEN, 1982; CARLSEN, DEGN e LLOYD, 1991).

A resistência aos efeitos do etanol é dependente, entre outros fatores, da composição do meio de cultivo: quanto mais deficiente for o meio, mais sensível será a levedura. A presença de componentes para síntese de ácidos graxos e esteroides é essencial para manutenção da célula, pois estes compõem a parede celular. You *et. al* (2003) e Fornairon-Bonnefond *et al.* (2003) observaram que a tolerância das leveduras frente ao etanol está relacionada com o conteúdo de ácidos graxos nas células. A suplementação do meio de cultivo pela adição de tween 80 e ergosterol ou a manutenção de nível adequado de aeração são recursos que podem ser utilizados para garantir a síntese desses componentes. Logo o fluxo de substrato pode ter diminuído devido à redistribuição dos fluxos na rede metabólica, ou devido à produção insuficiente de componentes metabólicos essenciais ou ainda à desaceleração da velocidade específica de crescimento devido à inibição pelo etanol. Tal insuficiência, por sua vez, pode ser advinda da necessidade da levedura de remodelar o transcriptoma de 352 genes quando realiza a passagem de um estado de plena respiração para



um próximo ao plenamente fermentativo (LAI *et al.*, 2006; WIEBE *et al.*, 2008; MA e LIU, 2010).

Outro fator que pode influenciar e reduzir a velocidade de crescimento é o acúmulo de etanol intracelular. Este tem suas maiores concentrações nas etapas iniciais do processo de fermentação, além de ser acumulado muito rapidamente caso a fermentação seja rápida e intensa. Isso se deve ao fato da levedura não ser capaz de secretá-lo na mesma velocidade em que ele é produzido, e por fim este etanol endógeno acaba sendo mais tóxico que aquele presente no meio extracelular (D'AMORE E STEWART, 1987).

Foi observada também a formação de glicerol durante o cultivo. Esse metabólito é produzido e secretado pelas células como forma de oxidar NADH produzido em excesso e fechar o balanço redox, ou seja, é usado como forma de diminuir o desequilíbrio redox e evitar um posterior estresse oxidativo (FRANZÉN, 2003; GIBSON *et al.*, 2007). Mesmo com a geração de biomassa, a levedura de panificação recorreu à produção de glicerol.

Nota-se que a velocidade específica de crescimento e a produtividade específica de etanol (calculados pelo balanço de massa em cada ponto. Eq. 11 e Eq. 32) decaem com aumento da concentração de etanol (FIGURA 19). Ao atingir o valor próximo de 0,75 M de etanol ( $t=6,5$  h, FIGURA 18), observa-se que a velocidade específica de produção de etanol se mantém praticamente constante e próximo a  $0,58 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , enquanto a velocidade específica de produção de biomassa continua diminuindo. Durante a etapa de alimentação, analisando por meio do logaritmo da massa pelo tempo (FIGURA 20), foi possível identificar duas fases de crescimento e estimar suas velocidades específicas de crescimento, a primeira com  $\mu = (0,22 \pm 0,01) \text{ h}^{-1}$  e a segunda com  $\mu = (0,062 \pm 0,004) \text{ h}^{-1}$ .

Como já referido, comportamento semelhante, com a presença de duas fases de crescimento, foi observado no trabalho de Alfenore *et al.* (2003) e Fromanger *et al.* (2009). Na primeira etapa, a biomassa é produzida simultaneamente com o etanol e na segunda etapa a formação de biomassa sofre uma redução até tornar-se constante. Na segunda fase, a energia gerada seria suficiente apenas para suprir as necessidades de manutenção da célula. A produtividade específica de glicerol sofreu pouca variação ao longo do cultivo.

FIGURA 19 - Produtividade específica de etanol (●), glicerol (▼) e  $\mu$  (■) no CMA. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação

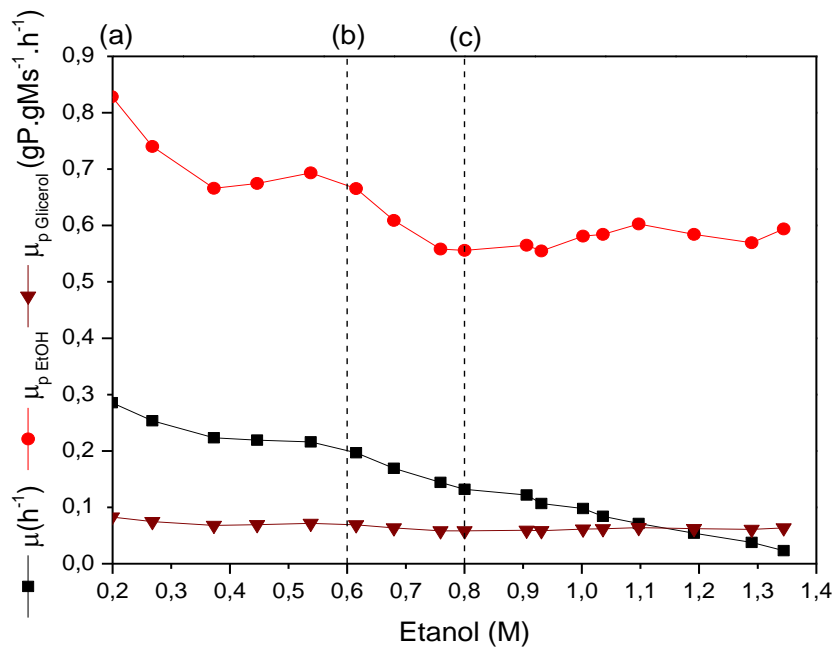
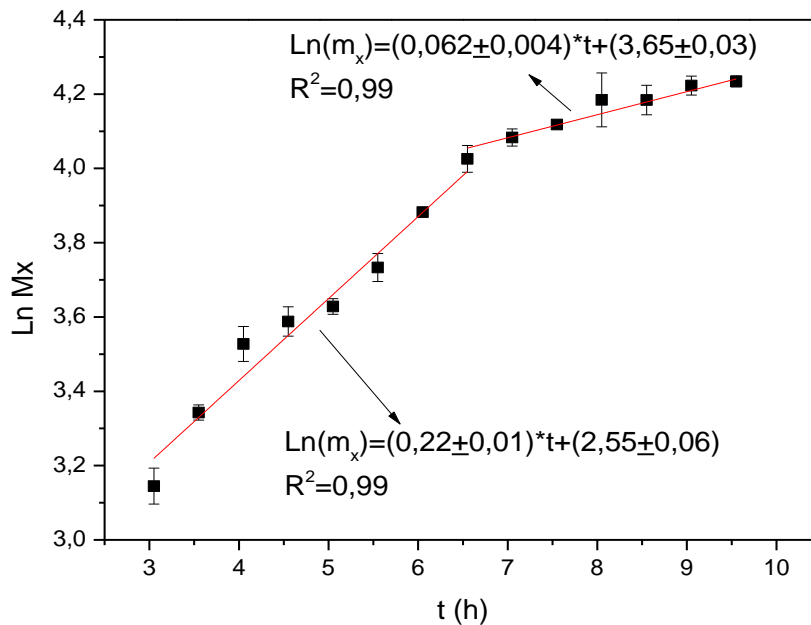


FIGURA 20 - Logaritmo da massa seca de células com tempo durante alimentação no CMA.



Ao fim da batelada as concentrações de etanol e biomassa (TABELA 2) foram de 6,43 g.L<sup>-1</sup> e 7 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ao fim da etapa de alimentação a concentração de etanol foi 49 g.L<sup>-1</sup>, enquanto a de células foi de 14,7 g.L<sup>-1</sup>. No final do cultivo a concentração

de etanol atingiu  $61,9 \text{ g.L}^{-1}$  e a biomassa  $17,1 \text{ g.L}^{-1}$ . Quanto a concentração de glicerol, ela sofreu um aumento de  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$  da etapa batelada para  $5,6 \text{ g.L}^{-1}$  da etapa de alimentação.

TABELA 2 - Concentrações em cada estágio do CMA

Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Final Batelada	Final Batelada alimentada	Fim do cultivo
Biomassa	$7,0 \pm 0,2$	$14,7 \pm 0,2$	$17,1 \pm 0,2$
Etanol	$6,43 \pm 0,01$	$49 \pm 2$	$61,9 \pm 0,4$
Glicerol	$0,84 \pm 0,02$	$5,6 \pm 0,4$	$6,26 \pm 0,01$

Os resultados do cultivo CMA podem ser avaliados também em termos dos parâmetros cinéticos globais (seção 3.3.1, Eq. 36) descritos pela TABELA 3. A velocidade específica de crescimento global sofreu redução ao longo do cultivo em relação a etapa batelada, sendo uma redução de 1,8 vezes para etapa de alimentação. O rendimento de células por substrato consumido teve um ligeiro incremento e o rendimento de etanol em substrato teve aumento de 1,75 vezes. Nota-se que durante a etapa de limitação da aeração e adição de meio suplementar houve uma redução no crescimento para aumento do rendimento do produto de interesse. Apesar do acúmulo, o rendimento global em etanol ( $0,48 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ ) manteve um valor acima de 90% do valor teórico máximo ( $Y_{p/s} = 0,51 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ ) para *S. cerevisiae* em meio mínimo durante a etapa batelada alimentada (SHULER e KARGI, 2002).

TABELA 3 - Parâmetros cinéticos globais do CMA

Parâmetros	Batelada	Batelada alimentada	Pós- alimentação
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0,30 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
$Y_{x/s}$ ( $\text{g células} \cdot \text{g substrato}^{-1}$ )	$0,09 \pm 0,01$	$0,111 \pm 0,006$	$0,06 \pm 0,03$
$Y_{\text{EtOH}/s}$ ( $\text{g etanol} \cdot \text{g substrato}^{-1}$ )	$0,28 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,02$
$Y_{\text{GOH}/s}$ ( $\text{g glicerol} \cdot \text{g Substrato}^{-1}$ )	$0,03 \pm 0,01$	$0,049 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,001$

A produtividade (Eq. 37) (TABELA 4) de etanol apresentou um incremento, sendo  $Pr_{p,etanol}=5,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  durante a alimentação. A produtividade de células atingiu  $Pr_x= 1,20 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  na etapa batelada e sofreu um ligeiro aumento nas etapas posteriores, enquanto a produtividade de glicerol se manteve em  $Pr_{p,Glicerol}= 0,53 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Esse perfil ajuda a visualizar o investimento realizado pelo microrganismo em produzir energia pela formação de etanol em detrimento da produção de biomassa.

TABELA 4 - Produtividades médias do CMA

<b>Produtividade média (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Batelada</b>	<b>Batelada alimentada</b>	<b>Pós- alimentação</b>
$Pr_x$	1,20±0,08	1,29±0,02	1,27±0,02
$Pr_{p,Etanol}$	2,40±0,05	5,2±0,2	5,12±0,02
$Pr_{p,Glicerol}$	0,32±0,05	0,53±0,05	0,524±0,007

Quanto ao quociente respiratório (FIGURA 21 e FIGURA 22), este se manteve, durante a etapa batelada, entre 1 e 2, e acima, entre 6 e 4, durante o uso da lógica de controle, caindo a zero quando a glicose no meio foi esgotada, apresentando um perfil decrescente a partir da 4ª hora de cultivo. Analisando os dados das velocidades de produção de CO<sub>2</sub> e consumo de O<sub>2</sub>, nota-se que a queda contínua em RQ é explicada tanto pelo aumento de  $r_{O_2}$  como pela diminuição de  $r_{CO_2}$  a partir da 4ª hora, que coincide com o momento no qual a vazão de ar passa a aumentar e a de N<sub>2</sub> a diminuir.

FIGURA 21 – Comparação do quociente respiratório com vazões de CMA. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim do meio de alimentação. São apresentados RQ (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—).

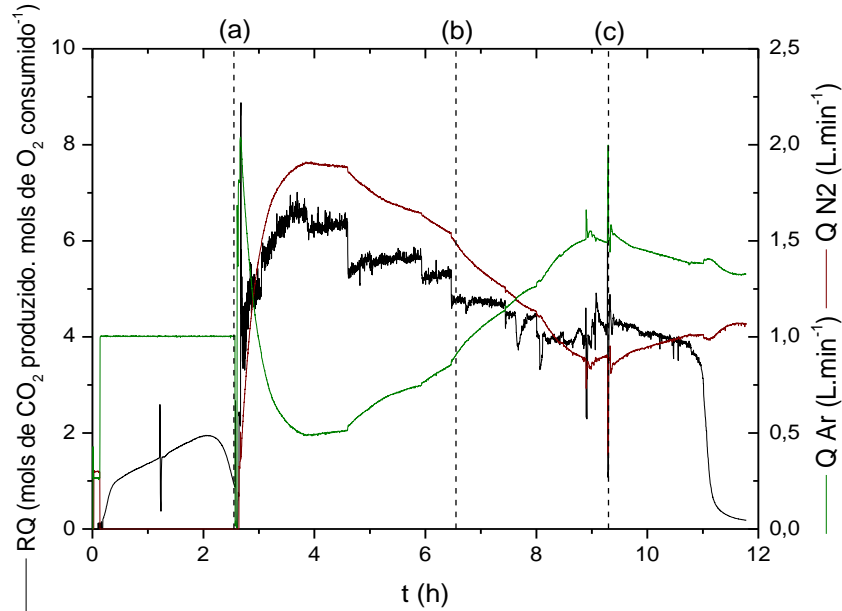
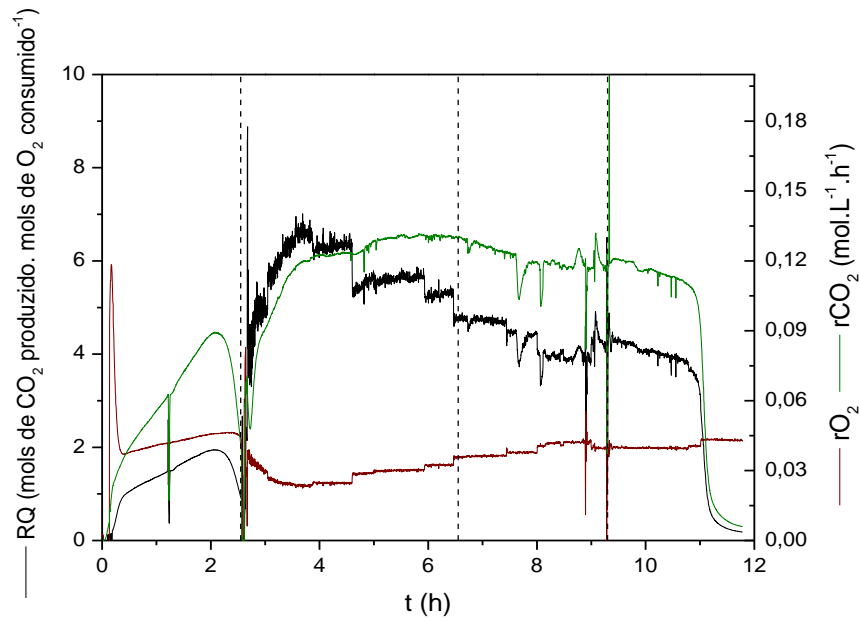


FIGURA 22 - Comparação do quociente respiratório com  $r_{O_2}$  e  $r_{CO_2}$  no CMA. São apresentados RQ (—), velocidade de consumo de  $O_2$  (—) e velocidade de produção de  $CO_2$  (—).



Franzén (2003), ao realizar uma análise metabólica de *S. cerevisiae*, obteve que em  $RQ=6$  o rendimento global de glicerol em glicose era muito pequeno, enquanto o rendimento de etanol atingia cerca de  $0,37 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  e de células atingia cerca de  $0,17 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$

<sup>1</sup>. Ao aumentar o RQ para 12, o rendimento de etanol aumentou para  $0,43 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ , o rendimento de células foi reduzido para  $0,15 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ , e rendimento de glicerol aumentou para um máximo de  $0,04 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ .

Bideaux *et al.* (2006) através de um PID para controle da vazão de alimentação em cultivo, manteve RQ em uma faixa de 4 e 5 e obtiveram uma concentração final de glicerol de  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , mas um rendimento de etanol de  $0,36 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ , enquanto no cultivo que denominaram de microaerado o rendimento foi de  $0,46 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  porém a concentração final de glicerol foi  $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

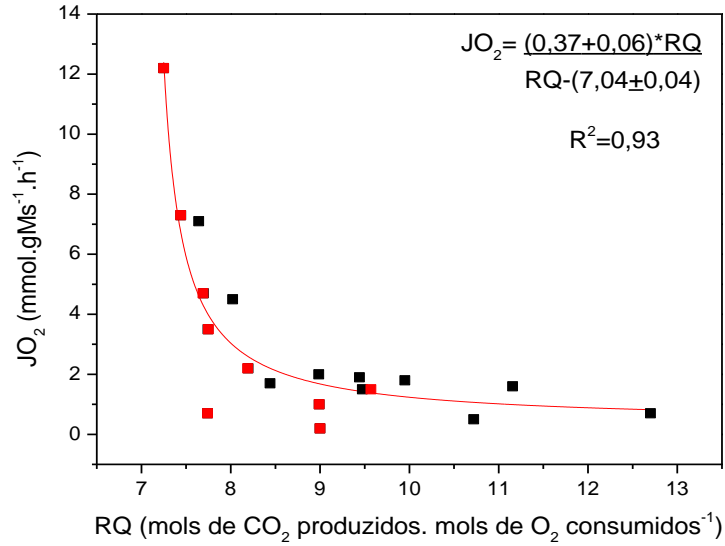
Vale notar que os resultados obtidos para a estratégia de cultivo em malha aberta apresentaram algumas vantagens em termos de rendimento da produção de etanol, contudo se verificou a necessidade de correção e atualização dos dados de entrada para evitar o acúmulo do oxigênio dissolvido alterando o estado de microaeração.

#### 4.1.2 Estratégia de Controle em Malha Fechada (CMF1)

Para a nova estratégia, foi proposto um novo modelo que estabelecesse uma relação entre os pontos simulados no Optflux de RQ e  $\text{JO}_2$  (FIGURA 23) para a região próxima dos 90% do fluxo máximo de etanol prevista pelas simulações do modelo metabólico (Anexo A, TABELA 11 e TABELA 12). O modelo obtido foi uma hipérbole (Eq. 39) e foi usado para atualizar valores de vazão de ar ( $Q_{\text{ar}}$ ) e fluxo de oxigênio ( $\text{JO}_2$ ). A vazão de nitrogênio foi alterada de  $0,5$  a  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  durante o cultivo, a fim de aumentar a vazão do gás de saída e minimizar problemas de leitura pelo detector de gases devido à baixa vazão de ar requerida para essa nova estratégia. Uma faixa de controle de RQ de  $7,6$  a  $8,4$  foi estabelecida para a lógica, sendo o limite superior devido à limitação dos fluxômetros, que não conseguem fornecer a uma vazão inferior a  $0,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  de gás.

$$\text{JO}_2 = \frac{(0,37 \pm 0,06) \cdot \text{RQ}}{\text{RQ} - (7,04 \pm 0,04)} \quad (39)$$

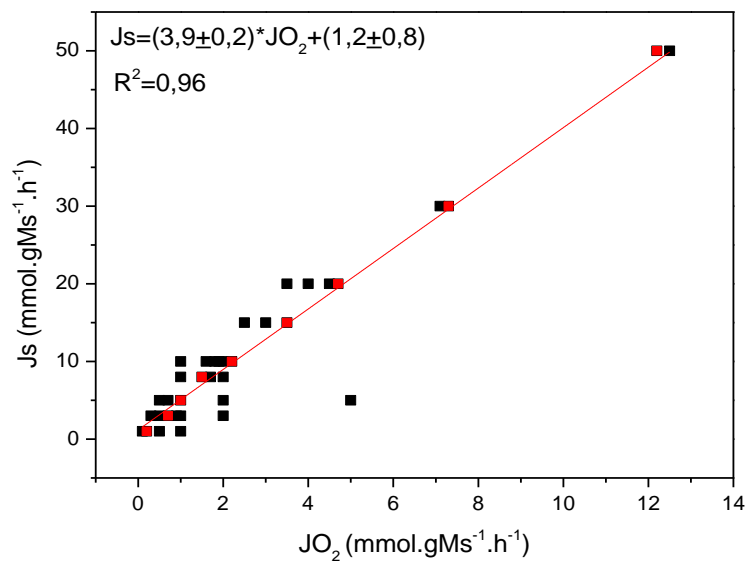
FIGURA 23 - Modelo para fluxo de oxigênio. Pontos simulados (■). Pontos simulados de fluxo ótimo de etanol (■) em destaque



O modelo linear para o fluxo de substrato e de oxigênio também foi atualizado e a nova equação é a descrita pela Equação 40 e apresentada pela FIGURA 24.

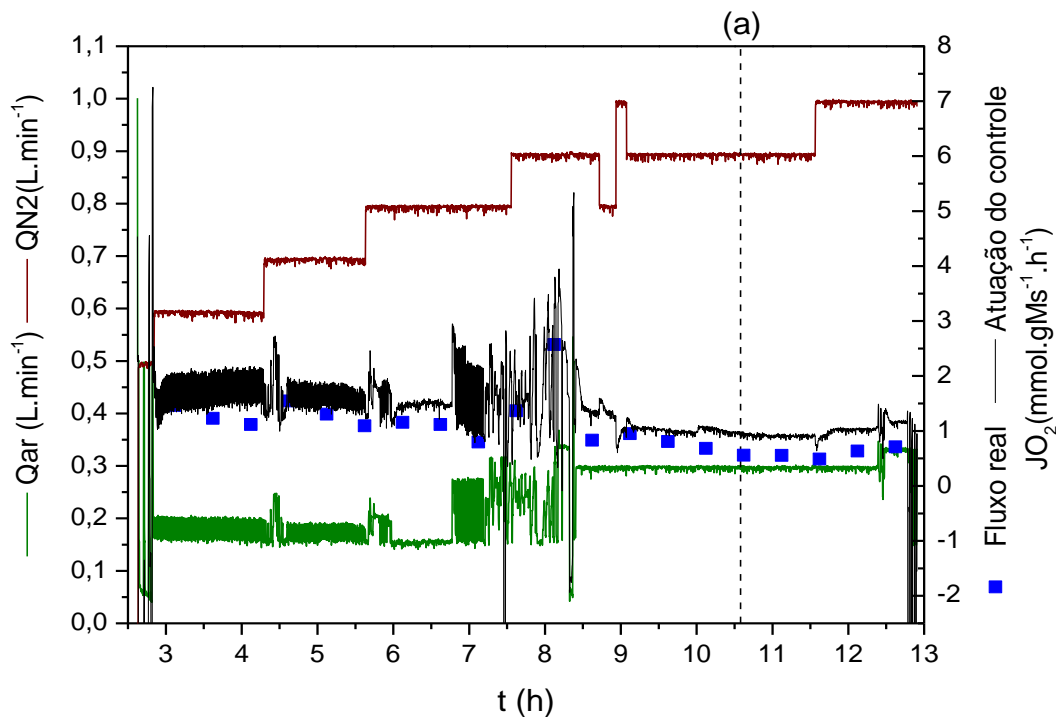
$$Js = (3,9 \pm 0,2) * JO_2 + (1,2 \pm 0,8) \quad (40)$$

FIGURA 24 - Modelo linear para relação Js em função de JO<sub>2</sub>. Pontos simulados (■). Pontos simulados com fluxo ótimo de etanol (■), em destaque.



Os resultados obtidos adotando-se a nova estratégia de controle em malha fechada são discutidos a seguir. O  $JO_2$  médio offline (FIGURA 25) foi de  $(1,3 \pm 0,2)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até 6,6 h de cultivo. Após 7 horas o fluxo foi reduzido para  $(1,1 \pm 0,7)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . O fluxo controlado online médio se manteve em  $(1,6 \pm 0,4)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até 6,6 h, sofrendo redução para  $(1,2 \pm 0,8)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Os valores experimentais dos fluxos de  $O_2$ , portanto, se mantiveram próximos aos estabelecidos pelo controlador, apesar de apresentarem uma maior diferença absoluta até 6,6 horas de cultivo.

FIGURA 25 - Fluxo de oxigênio durante a fase de alimentação no CMF1 até o fim do cultivo: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) fim do meio de alimentação.

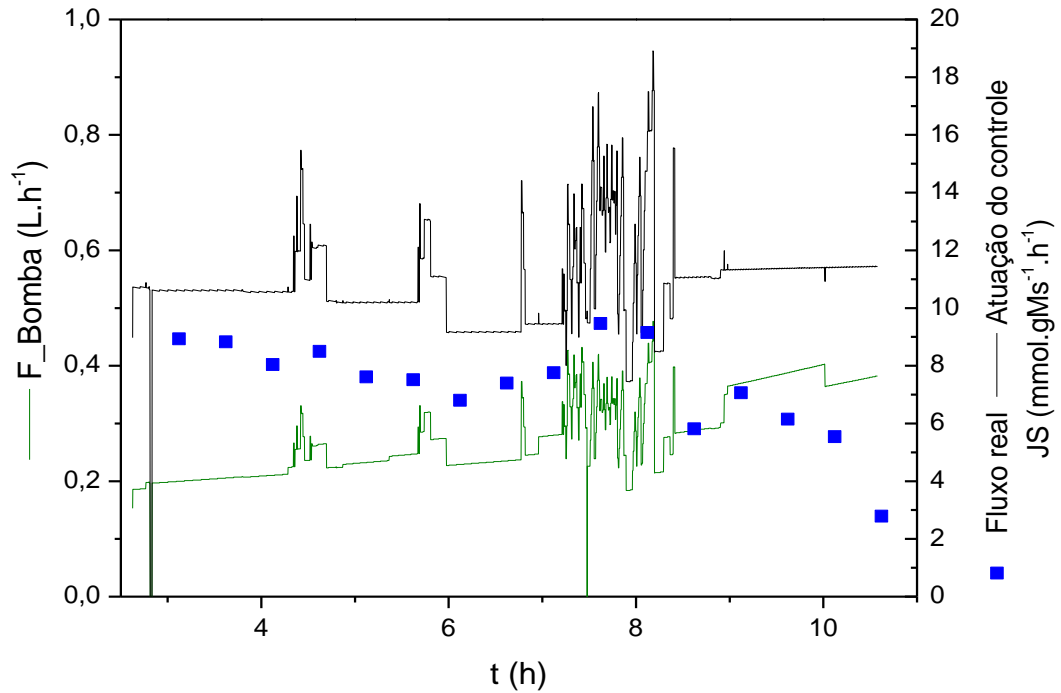


Quanto ao fluxo de substrato ( $J_s$ ) médio (FIGURA 26) para a levedura quando recalculado offline foi de  $(7,8 \pm 0,7)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até 6,6 horas, e depois das 7h foi reduzido para  $6,7 \pm 2$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Para o valor calculado online, o  $J_s$  foi de  $(10 \pm 1)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até as 6,6 e depois foi mantido com um valor médio de  $(11 \pm 2)$   $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Assim como o observado na malha aberta, o microrganismo apresentou consumo de substrato mais lento do que os valores simulados. A diferença entre os fluxos experimentais e simulados de substrato foi menor quando comparado ao sistema em malha aberta e o perfil dos pontos até 6,6 horas



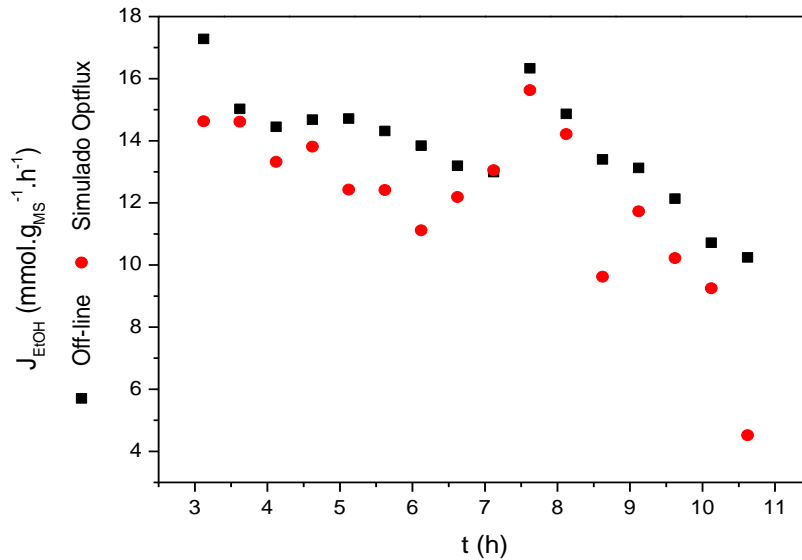
foi semelhante. Nota-se também que o fluxo de oxigênio aparenta ter sido suficiente para modulação do fluxo de substrato, assim como observado no experimento anterior.

FIGURA 26 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo CMF1: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■) e vazão da bomba de alimentação (—).



Para um  $J_s$  médio offline de  $(7,5 \pm 1)$   $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , o modelo proposto pela simulação apresentou valores de  $J_{O_2} = 1,67$   $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Por sua vez, o fluxo de etanol médio (FIGURA 27) durante o cultivo foi  $(13,9 \pm 0,9)$   $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , enquanto o valor do  $J_{\text{etanol}}$  simulado para a condição foi de  $12$   $\text{mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Esse sistema de controle, de acordo com os dados obtidos durante toda a etapa de atuação da lógica, mostrou ser capaz de manter os valores de fluxos próximos aos estimados pelo modelo.

FIGURA 27 - Perfil do fluxo de etanol no cultivo CMF1. Sendo (■) fluxo off-line e (●) fluxos simulados pelo Optflux



Para o RQ (FIGURA 28 e FIGURA 29), observou-se que os valores calculados off-line seguiram o comportamento apresentado pelos valores obtidos online, mantendo-se dentro dos limites estipulados até cerca de 7,5 h de cultivo. Os valores online também foram mantidos próximos ao limite inferior para RQ de 7,6 mols de CO<sub>2</sub> produzidos. (mols de O<sub>2</sub> consumidos)<sup>-1</sup> até 7,5 h de cultivo. O instante (b) apresentado pela figura coincide com a adição de antiespumante (PPG), que provocou um rápido decréscimo de RQ logo após 6,6 h, causada pela interferência do anti-espumante na tensão superficial e na solubilidade dos gases. Contudo, o RQ rapidamente assumiu valores acima do limite inferior do controle. Próximo às 7h e 7,5 h de cultivo, os valores de RQ apresentaram oscilações, e depois de 7,5 h ele se manteve acima do limite superior de 8,4 mols de CO<sub>2</sub> produzidos. (mols de O<sub>2</sub> consumidos)<sup>-1</sup> só decaindo ao fim do cultivo. O valor de RQ médio para levedura (off-line) até 6,6h de cultivo foi de  $7,8 \pm 0,2$  mols de CO<sub>2</sub> produzidos. (mols de O<sub>2</sub> consumidos)<sup>-1</sup>, sendo que a partir de 7h esse valor sofreu aumento para  $11 \pm 3$  mols de CO<sub>2</sub> produzidos. (mols de O<sub>2</sub> consumidos)<sup>-1</sup>. O RQ online médio até 7h foi  $7,2 \pm 0,6$  mols de CO<sub>2</sub> produzidos. (mols de O<sub>2</sub> consumidos)<sup>-1</sup> e então sofreu aumento para  $12 \pm 3$  mols de CO<sub>2</sub> produzidos. (mols de O<sub>2</sub> consumidos)<sup>-1</sup>.

FIGURA 28 - Comparação do quociente respiratório com vazões de gases no CMF1: RQ calculado online (—), RQ calculado offline (■), limite inferior do controle (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) início da lógica de controle, (b) adição do PPG e (c) fim do meio de alimentação.

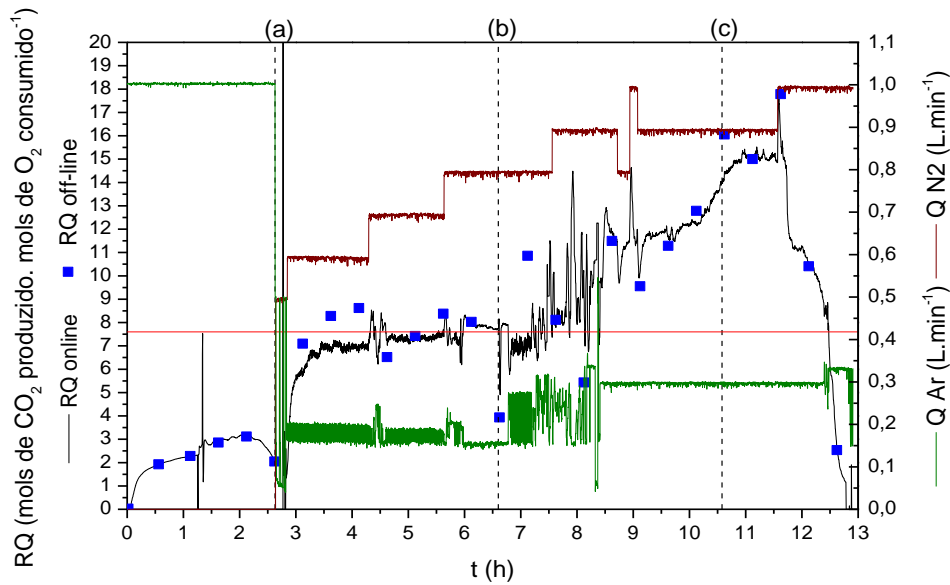
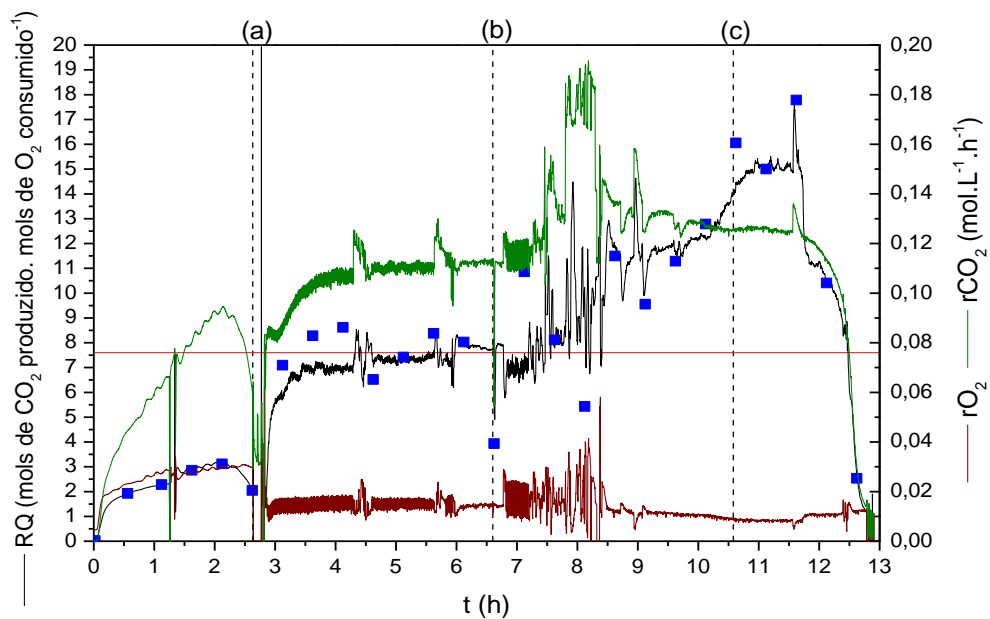


FIGURA 29 - Comparação do quociente respiratório com  $rO_2$  e  $rCO_2$  no CMF1. São apresentados RQ (—), velocidade de consumo de  $O_2$  (—) e velocidade de produção de  $CO_2$  (—).



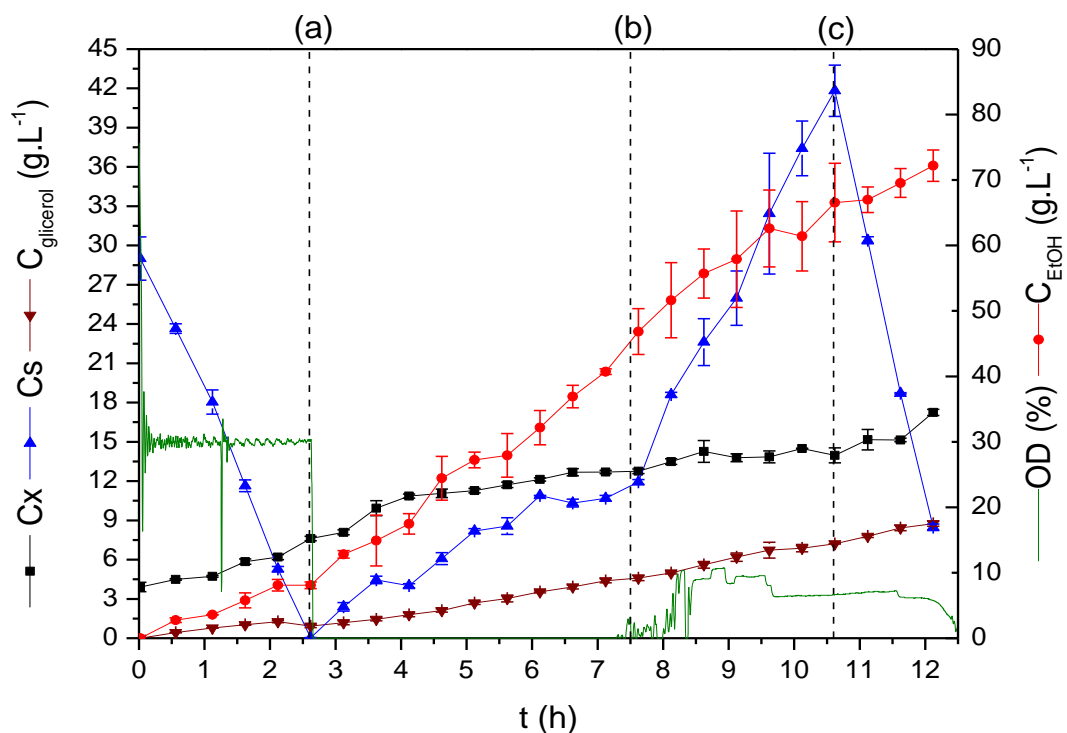
A concentração de oxigênio dissolvido (FIGURA 30) apresentou um aumento depois de 7,5h de cultivo. Esse comportamento foi semelhante ao observado com sistema de controle em malha aberta e também está inserido no intervalo de tempo em que o RQ começou a sofrer

maiores flutuações nos valores. A COD atingiu valor máximo de 11% da saturação, sofrendo uma redução para 6,1% após 9,5h devido à diminuição da agitação de 400 para 250 rpm.

No cultivo, a concentração de substrato residual foi maior quando comparado ao cultivo com malha aberta, mantendo-se em torno de  $(10 \pm 1)$  g.L<sup>-1</sup> entre 5,5h e 7,5 h de cultivo. Tal perfil pode ser resultante do fluxo de substrato ter sido sobrestimado, porém tal comportamento garantiu que a fonte de carbono não fosse fator limitante no cultivo. O ponto de 7,5 h também coincidiu com aumento da concentração de substrato no meio de cultivo, atingindo uma concentração de 40 g.L<sup>-1</sup> que foi imediatamente consumido com o término do meio de alimentação.

Ao observar o comportamento das FIGURA 25 e FIGURA 30 nota-se que mesmo na presença de excesso de oxigênio o fluxo de oxigênio não sofreu aumento, e sim pequena redução. Tal comportamento pode estar relacionado aos fatores já citados de inibição parcial pelo etanol e atendimento dos requisitos energéticos.

FIGURA 30 - Perfil do cultivo CMF1 em sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação



A quantidade de massa (FIGURA 31) produzida durante o cultivo manteve crescimento mesmo nas condições com limitação no fornecimento de oxigênio. Segundo Hahn-Hägerdal e colaboradores (2007) a capacidade de produção de biomassa mesmo em condições que limitem o crescimento reflete a viabilidade celular. Dessa forma é possível inferir que a perda da viabilidade pode ter contribuído para o comportamento observado de acúmulo, mas se manteve em um nível adequado.

Para a etapa de alimentação (FIGURA 32) até às 7h de cultivo (pode-se identificar duas velocidades específicas de crescimento)  $\mu$  apresentou um valor igual a  $(0,13 \pm 0,01) \text{ h}^{-1}$ , após 7h o valor de  $\mu$  reduziu para  $(0,126 \pm 0,005) \text{ h}^{-1}$ . O perfil de crescimento foi mais reduzido e controlado quando comparado ao sistema em malha aberta, apresentando menor variação devido ao acúmulo de oxigênio dissolvido no reator em comparação ao experimento anterior. A descontinuidade observada na FIGURA 32 ( $t=7\text{h}$ ) é referente à retirada de um litro de amostra para continuidade da alimentação do meio fresco.

FIGURA 31 - Massa produzida ao longo do cultivo CMF1

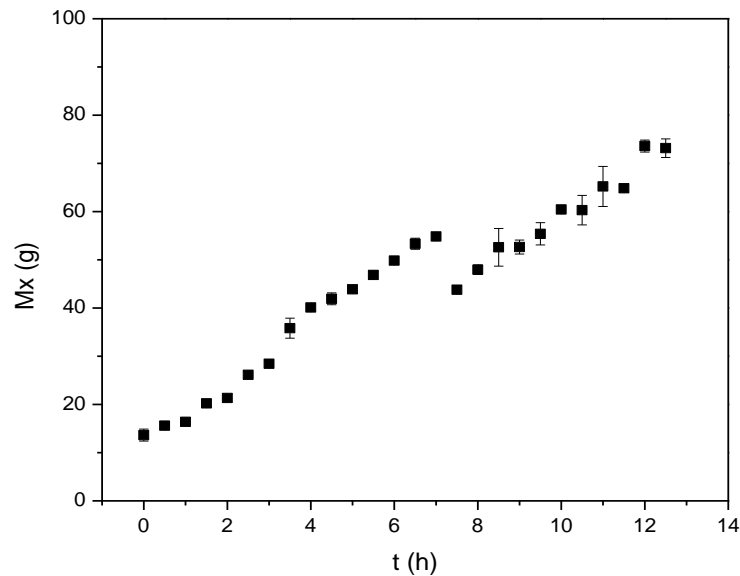
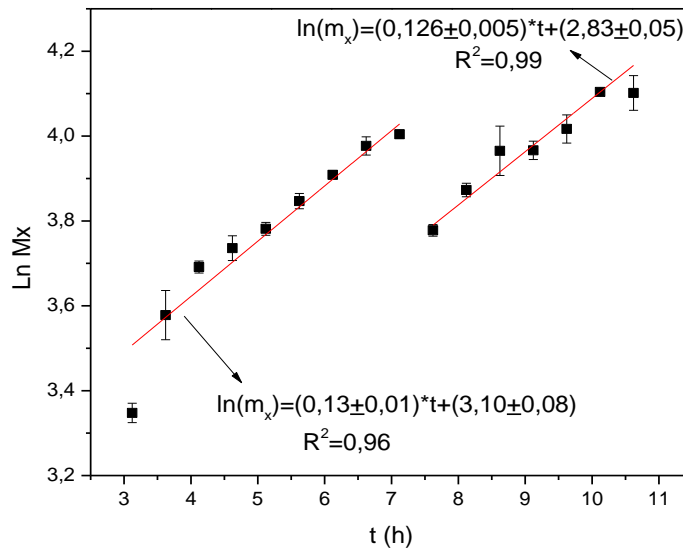
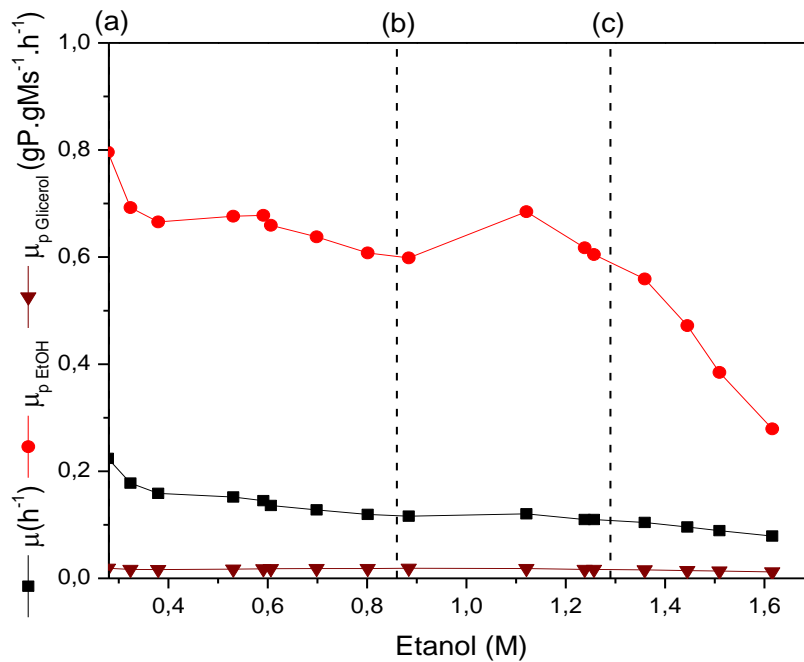


FIGURA 32 - Logaritmo da massa seca de células com tempo durante alimentação no CMF1



Assim como observado no sistema com malha aberta, a velocidade específica de crescimento e a produtividade específica de etanol apresentaram tendência de diminuir à medida que a concentração de etanol aumenta (Eq. 11 e Eq.32) (FIGURA 33). A velocidade específica de crescimento sofreu uma redução mais intensa no início do cultivo e continuou a diminuir até o fim do cultivo. A produtividade específica de etanol manteve um valor médio de  $(0,57 \pm 0,09) \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  após a concentração de etanol ter atingido 0,86 M (7,5 h, FIGURA 30). A produtividade de glicerol se manteve com valor médio de  $(0,017 \pm 0,003) \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ao longo do cultivo.

FIGURA 33 - Produtividade específica de etanol (●), glicerol (▼) e  $\mu$  (■) no CMF1. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação



Para o CMF1, a concentração de etanol e biomassa (TABELA 5) foram de 8,1 g.L<sup>-1</sup> e 7,6 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, ao fim da etapa batelada. Ao fim da etapa de alimentação a concentração de etanol atingiu uma concentração de 66 g.L<sup>-1</sup> e a de biomassa chegou a 14 g.L<sup>-1</sup>.

Ao fim do cultivo, a concentração de etanol era de 72 g.L<sup>-1</sup> e a de biomassa 17,2 g.L<sup>-1</sup>. As proporções das concentrações observadas foram próximas quando comparadas ambas estratégias de controle. Para o glicerol foi obtido uma concentração de 7,56 g.L<sup>-1</sup> na etapa de alimentação e 9 g.L<sup>-1</sup> ao fim o cultivo.

TABELA 5 - Concentrações em cada estágio do CMF1

Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Final da Batelada	Final da Batelada alimentada	Fim do cultivo
Biomassa	7,6±0,2	14±0,6	17,2±0,4
Etanol	8,1±0,5	66±6	72±2
Glicerol	0,9±0,1	7,56±0,01	9,00±0,02

A velocidade específica de crescimento global (TABELA 6) diminuiu da etapa batelada para etapa de alimentação, assim como o observado no sistema malha aberta. O rendimento de células por substrato consumido se manteve por volta de  $0,128 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  e o rendimento de etanol em substrato aumentou para  $0,48 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  durante a fase de alimentação. O rendimento de glicerol também sofreu um incremento para  $0,076 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  durante a etapa de alimentação. Logo o perfil de maior investimento na produção de energia pela geração do etanol foi observado também no sistema em malha fechada indicando que houve um deslocamento do fluxo de carbono para a via metabólica de interesse, mas uma certa quantidade ainda foi direcionada à formação de glicerol.

TABELA 6 - Parâmetros globais do CMF1

Parâmetros	Batelada	Batelada alimentada	Pós-alimentação
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0,22 \pm 0,03$	$0,128 \pm 0,003$	$0,10 \pm 0,04$
$Y_{x/s}$ ( $\text{g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )	$0,10 \pm 0,01$	$0,096 \pm 0,008$	$0,06 \pm 0,03$
$Y_{\text{EtOH}/s}$ ( $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )	$0,32 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,1$
$Y_{\text{GOH}/s}$ ( $\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )	$0,051 \pm 0,005$	$0,076 \pm 0,002$	$0,032 \pm 0,001$

Quanto a produtividade de células ( $Pr_x$ ) (TABELA 7), ao fim da etapa batelada ela foi da ordem de  $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Para a etapa de atuação da lógica com alimentação,  $Pr_x$  foi reduzido em 1,4 vezes. Após o fim do meio de alimentação,  $Pr_x$  obtida foi de  $1,12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . A produtividade de etanol foi incrementada para  $6,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , um aumento de 2 vezes comparada à etapa inicial com 30% da saturação de oxigênio. A produtividade no final do cultivo se manteve próxima à observada, porém a produtividade de glicerol no mesmo período também sofreu um aumento  $0,37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para  $0,690 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .



TABELA 7 - Produtividades médias do CMF1

<b>Produtividade média (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Final da Batelada</b>	<b>Final da Batelada alimentada</b>	<b>Pós- alimentação</b>
Pr <sub>x</sub>	1,5±0,2	1,08±0,06	1,12±0,04
Pr <sub>p,Etanol</sub>	3,2±0,2	6,3±0,6	6,0±0,2
Pr <sub>p,Glicerol</sub>	0,37±0,02	0,690±0,002	0,701±0,001

Comparando os dados obtidos (TABELA 8), a concentração de etanol durante a atuação da lógica foi incrementada em 20 % quando comparada à proposta anterior. Em relação ao sistema CMA, a concentração de glicerol ao fim do cultivo foi 40 % maior.

TABELA 8 - Comparação dos diversos parâmetros do cultivo ao fim da alimentação de ambas estratégias

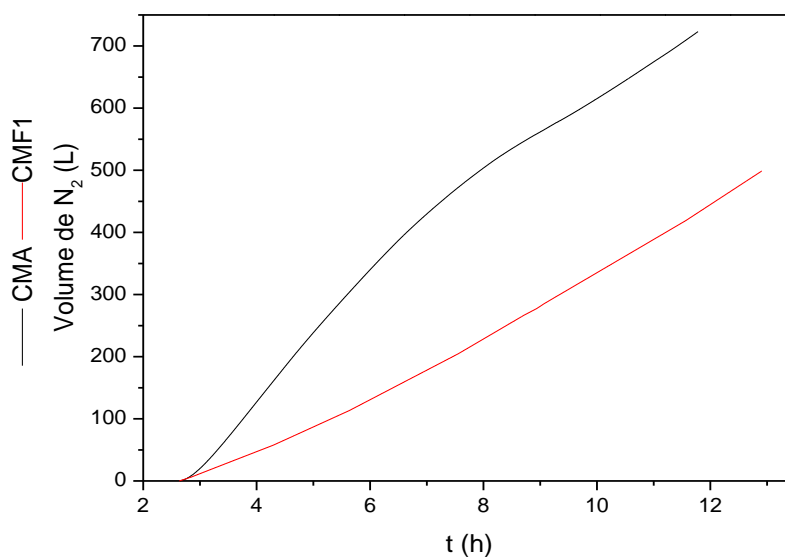
<b>Parâmetros</b>	<b>CMA</b>	<b>CMF1</b>
Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	49±2	66±6
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	5,6±0,4	7,56±0,01
μ (h <sup>-1</sup> )	0,15±0,01	0,128±0,003
Y <sub>x/s</sub> (g <sub>células</sub> . g <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> )	0,111±0,006	0,096±0,008
Y <sub>EtOH/s</sub> (g <sub>etanol</sub> . g <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> )	0,48±0,01	0,48±0,01
Y <sub>GOH/s</sub> (g <sub>glicerol</sub> . g <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> )	0,049±0,001	0,076±0,002
Pr <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	1,29±0,02	1,08±0,06
Pr <sub>p,Etanol</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	5,2±0,2	6,3±0,6
Pr <sub>p,Glicerol</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,53±0,05	0,690±0,002

Enquanto a lógica de controle do CMF1 esteve ativa, os rendimentos de etanol se mantiveram próximos ao observado do CMA, mas os rendimentos de células e taxa de crescimento sofreram um decréscimo quando comparados ao sistema anterior. Em relação ao CMA, a produtividade de células durante a atuação da lógica foi reduzida em 16%, em contrapartida a produtividade de etanol teve um ligeiro aumento 20%. O CMF1 proporcionou condições de menor formação de biomassa, porém o rendimento de glicerol por substrato foi maior que o observado no CMA.

O aumento da concentração e rendimento do glicerol observado para o sistema em malha fechada está correlacionado às condições de cultivo. O RQ superior a 10 está relacionado a um aumento da produção de glicerol, assim como observado no trabalho Franzén (2003). Um aumento do RQ de 6 para 12 provocou um aumento do  $Y_{p/s}$  de 0,01  $\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  para cerca de 0,04  $\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$  em uma taxa de diluição de  $0,35 \text{ h}^{-1}$ . O aumento do quociente respiratório pode proporcionar uma condição de aumento na quantidade de cofatores que necessitam ser reoxidados estimulando a produção de glicerol.

A FIGURA 34 ilustra o volume de nitrogênio usada para compor o gás de entrada. Integrando as curvas de vazão de nitrogênio (FIGURA 15 e FIGURA 25), é possível observar uma redução do volume usado do gás nitrogênio de cerca de 725 L usados no CMA para 499 L usados no CMF1.

FIGURA 34 – Volume usado de nitrogênio



## 4.2 Desempenho das estratégias de fermentação

Como descrito anteriormente, foram realizados 3 cultivos posteriores para comparação das estratégias de fermentação.

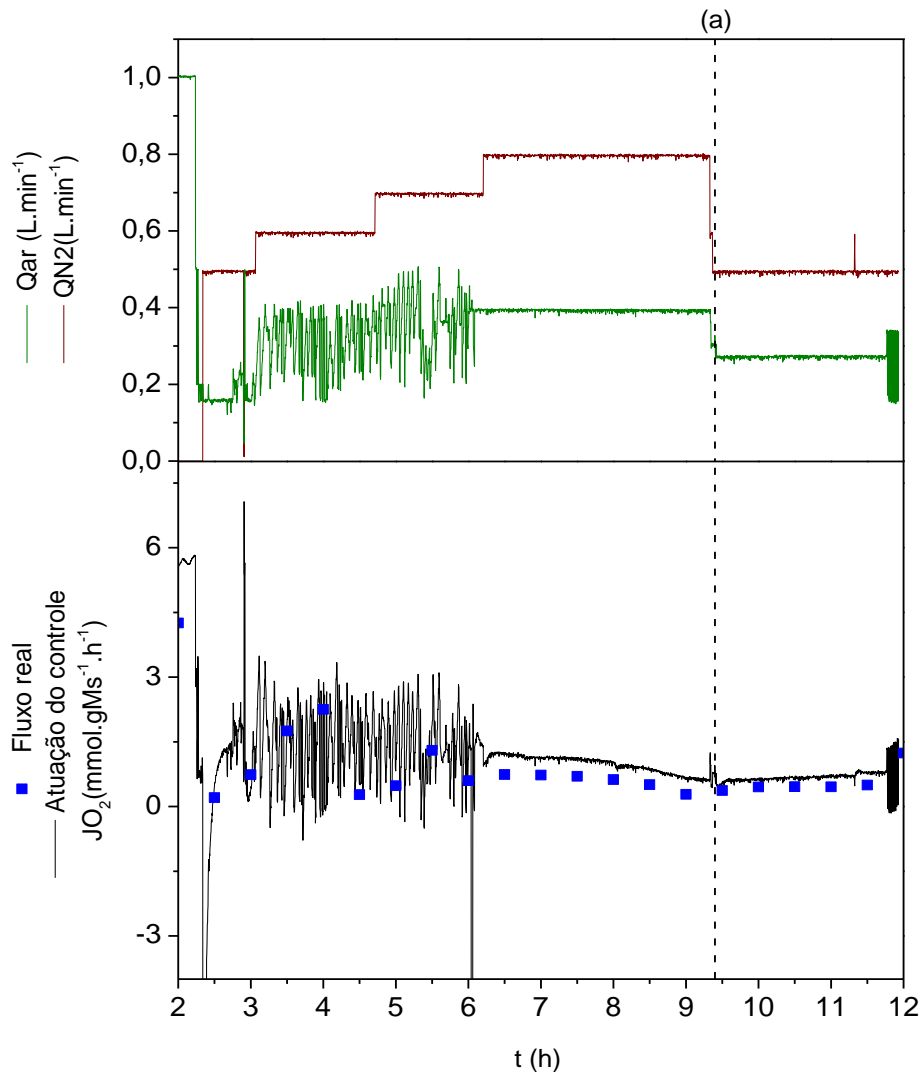
O primeiro cultivo consistiu em uma repetição da condição de microaeração implementada em malha fechada (CMF1), sendo feitas modificações no equacionamento do fluxo de substrato com adição do termo derivativo (CMF2). O perfil de alimentação implementado pelo controlador no cultivo CMF2 foi aproximado por um modelo matemático e usado nos cultivos FTU e FEA, os quais foram conduzidos sem controle do fluxo de oxigênio.

O segundo cultivo foi uma reprodução dos processos usados em usinas sucroalcooleiras (FTU). Nesse cultivo não foi utilizada uma fase gasosa contínua, dessa forma o gás de saída é composto somente pelo gás carbônico produzido na fermentação.

O terceiro cultivo por sua vez usou como fase gasosa nitrogênio ultrapuro (99,999%) para garantir completa anaerobiose (FEA). Os resultados das três estratégias são apresentados e discutidos a seguir.

O fluxo de oxigênio ( $JO_2$ ) médio calculado off-line (FIGURA 35) para CMF2 foi de  $(1,5 \pm 0,7)$   $\text{mmol.g}_{\text{Ms}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até 6 h de cultivo. Após 6,5 h até 9,4 h, o fluxo foi reduzido para  $(0,65 \pm 0,09)$   $\text{mmol.g}_{\text{Ms}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Para a atuação do controle, o valor médio foi de  $(1,5 \pm 0,8)$   $\text{mmol.g}_{\text{Ms}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até 6 h de cultivo, sofrendo redução para  $(1 \pm 0,8)$   $\text{mmol.g}_{\text{Ms}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Os valores que foram obtidos off-line se mantiveram bem próximos aos controlados pela lógica proposta.

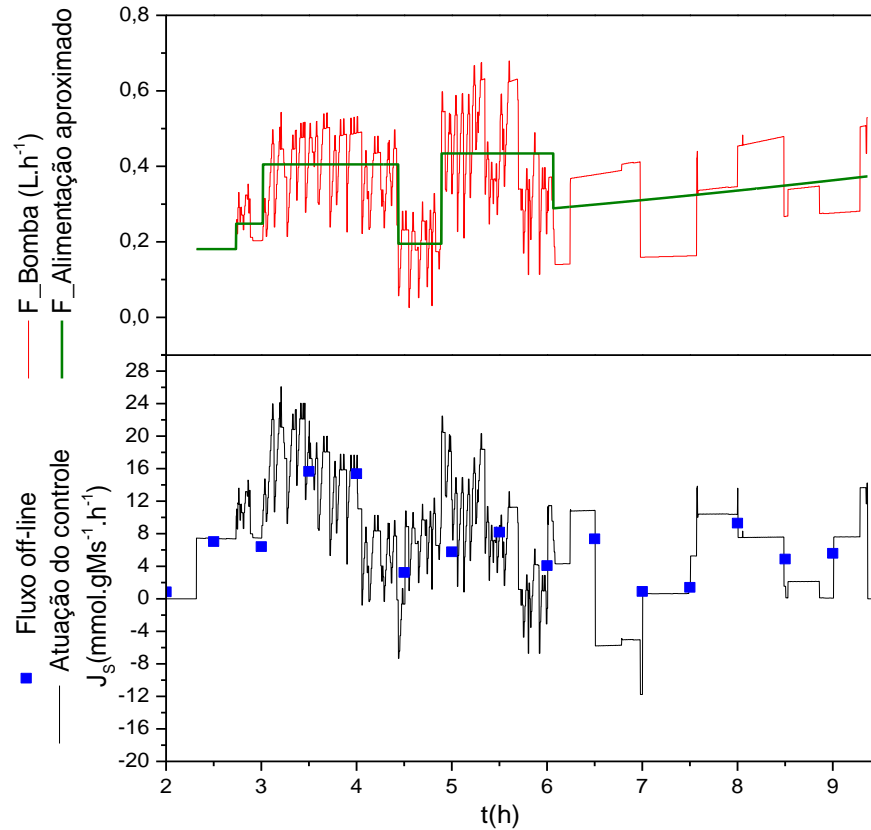
FIGURA 35 - Fluxo de oxigênio no cultivo CMF2. Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) fim do meio de alimentação.



Para o fluxo de substrato ( $J_s$ ) (FIGURA 36) no cultivo CMF2, o valor médio para os valores corrigidos off-line foi de  $(7 \pm 1) \text{ mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até o mesmo período de 6 h de cultivo. Após esse ponto, o valor de  $J_s$  médio sofreu uma redução para  $(4 \pm 2) \text{ mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . O valor do fluxo de substrato médio para a atuação do controle foi de  $(10 \pm 6) \text{ mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$  até 6 h, sendo reduzido até  $(6 \pm 4) \text{ mmol.gMs}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Nota-se que a adição do termo derivativo ajudou a reduzir o erro sistemático observado nos cultivos anteriores, ou seja, permitiu aproximar os pontos corrigidos off-line com o comportamento obtido pela atuação do controle.

A FIGURA 36 também apresenta o perfil de alimentação que foi aproximado (destacado em verde) e utilizado nos cultivos posteriores (FTU e FEA). Essa aproximação foi realizada para garantir que os três cultivos estivessem sendo conduzidos sob as mesmas condições de fornecimento de substrato.

FIGURA 36 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo CMF2: Atuação do controle (—), fluxo off-line (■), vazão da bomba de alimentação (—) e perfil de alimentação aproximado (—).



A análise de fluxo de substrato também pode ser feita para os cultivos FTU e FEA. Para o FTU (FIGURA 37), os dados corrigidos off-line apresentaram um valor médio de  $(13\pm 4)$   $\text{mmol}\cdot\text{gMs}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ao longo de toda a fase de alimentação. Para FEA (FIGURA 38), o valor médio dos dados off-line para toda fase de alimentação foi de cerca de  $(12\pm 4)$   $\text{mmol}\cdot\text{gMs}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Nos cultivos CMF1, CMF2 e CMA, os fluxos de substratos foram menores quando comparados com as outras duas estratégias de fermentação FTU e FEA. Isso pode ser por causa do  $C_x$  ligeiramente mais alto nos cultivos submetidos à lógica de controle (CMF1, CMF2, CMA), já que o crescimento é maior justamente por causa da microaeração, por conseguinte fornecendo um fluxo menor.

FIGURA 37 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo FTU: Fluxo off-line (■) e vazão da bomba de alimentação (—).

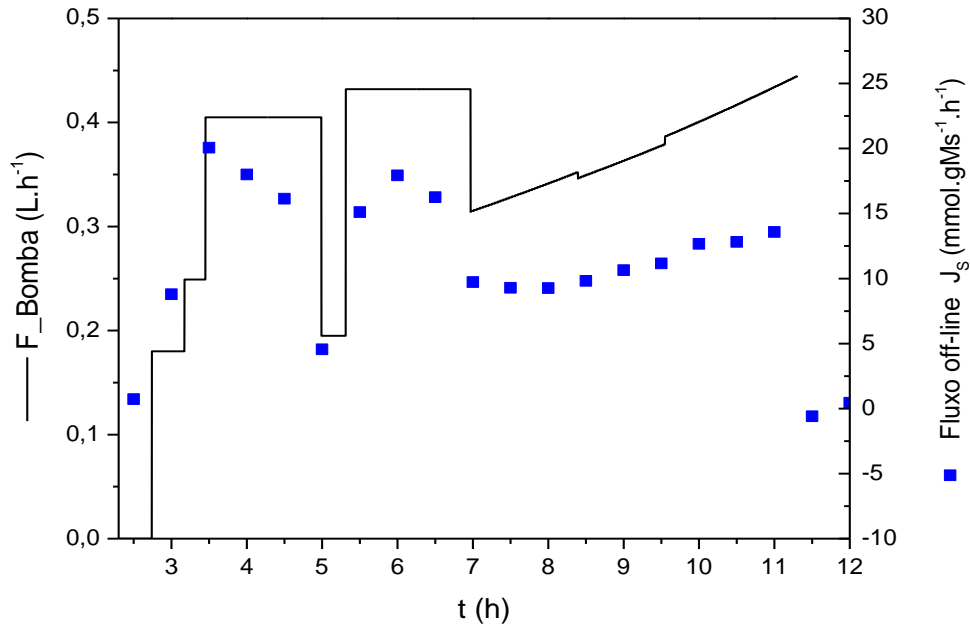
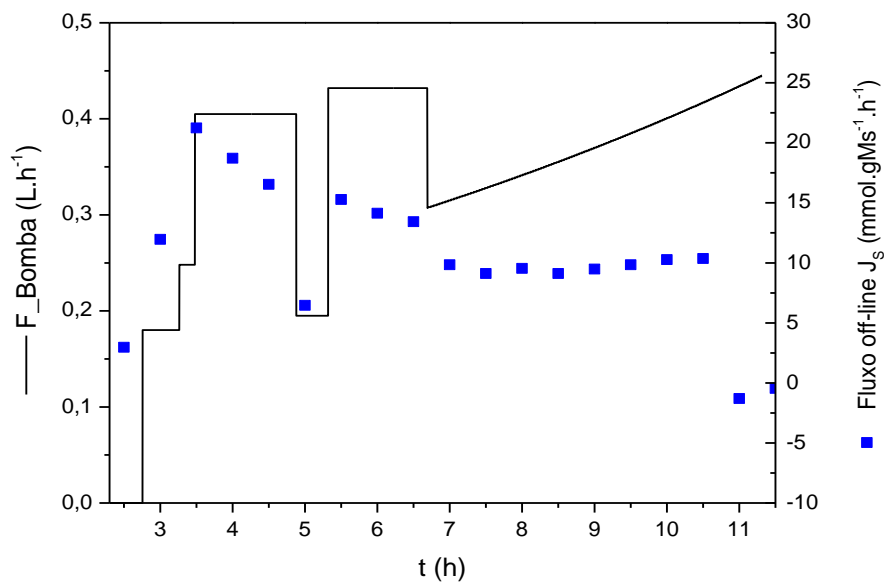
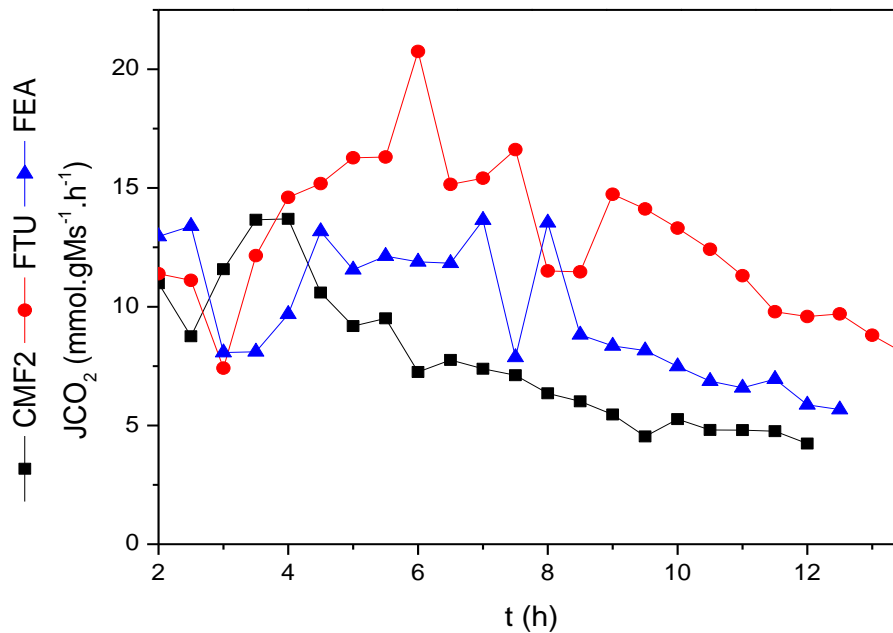


FIGURA 38 - Fluxo de substrato durante a fase de alimentação no cultivo FEA: Fluxo off-line (■) e vazão da bomba de alimentação (—).



O comportamento observado para os fluxos de substrato é corroborado e refletido nos fluxos de  $\text{CO}_2$  que foram obtidos (FIGURA 39). Por ter concentrações celulares menores, o cultivo FTU apresentou os maiores fluxos de gás carbônico, enquanto o cultivo FEA apresentou um perfil intermediário, e por fim o CMF2 apresentou os menores fluxos

FIGURA 39 - Comparação dos fluxos de  $\text{CO}_2$



Quanto ao quociente respiratório (FIGURA 40 e FIGURA 41), para o experimento CMF2, os pontos calculados off-line se mantiveram próximos aos obtidos mediante a atuação do controle (online) e ambos se mantiveram acima do limite de controle ao longo da alimentação, decaindo ao fim do cultivo. De 2 a 6 h de cultivo, o RQ médio off-line foi de  $(9 \pm 4)$  mols de  $\text{CO}_2$  produzidos.(mols de  $\text{O}_2$  consumidos)<sup>-1</sup>, após 6,5 h até 9,5 h, o RQ se manteve com valor médio de  $(12 \pm 3)$  mols de  $\text{CO}_2$  produzidos.(mols de  $\text{O}_2$  consumidos)<sup>-1</sup>. O RQ online médio para o mesmo período, ou seja, até 6h foi de  $(9 \pm 4)$  mols de  $\text{CO}_2$  produzidos.(mols de  $\text{O}_2$  consumidos)<sup>-1</sup>, e após 6,5h até 9,5h foi cerca de  $12 \pm 4$  mols de  $\text{CO}_2$  produzidos.(mols de  $\text{O}_2$  consumidos)<sup>-1</sup>.

A queda do RQ observada logo antes de 9,5h, ocorreu devido à redução manual da vazão de nitrogênio, por causa disso o RQ atingiu momentaneamente valores abaixo do limite inferior, o que permitiu atualização e redução da vazão de ar. Porém, o RQ retornou e se manteve acima de 10 mols de  $\text{CO}_2$  produzidos.(mols de  $\text{O}_2$  consumidos)<sup>-1</sup> assim como

observado no cultivo malha fechada (CMF1) e com perfil decrescente até o final do cultivo. Essa redução observada no RQ após 9,5 h foi decorrente da diminuição do  $r\text{CO}_2$  e aumento do  $r\text{O}_2$  (Figura 40).

FIGURA 40 - Comparação do quociente respiratório com vazões de gases no cultivo CMF2: RQ calculado online (—), RQ calculado offline (■), limite do controle (—), vazão de ar (—) e vazão de nitrogênio (—). Sendo (a) início da lógica de controle e (b) fim do meio de alimentação.

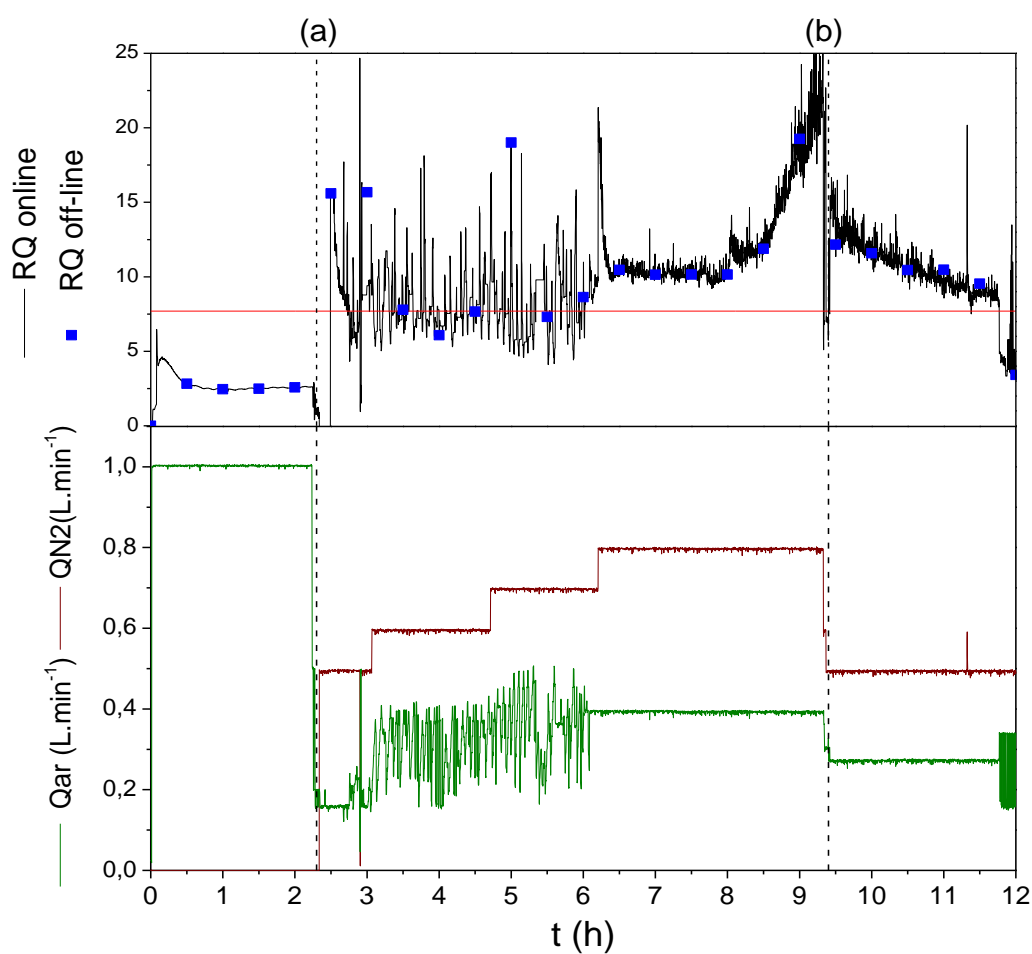
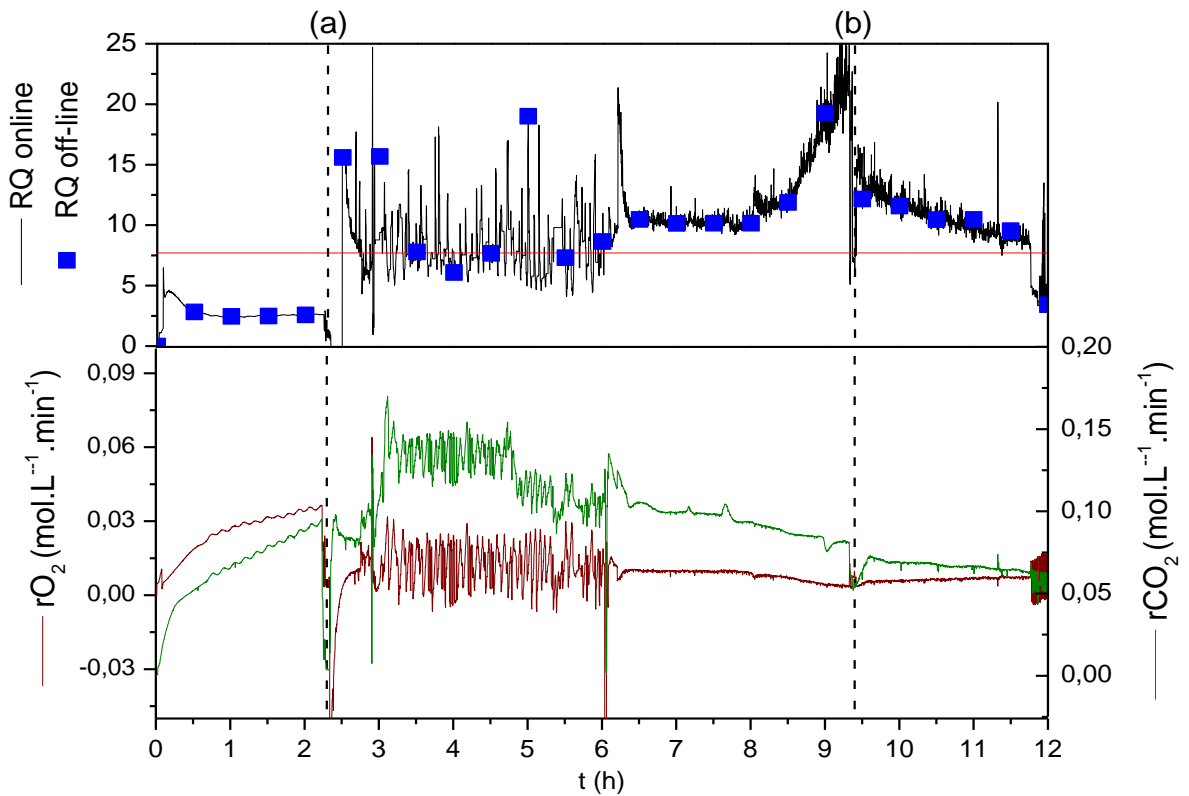




FIGURA 41 - Comparação do quociente respiratório com  $rO_2$  e  $rCO_2$  no cultivo CMF2. São apresentados RQ (—), velocidade de consumo de  $O_2$  (—) e velocidade de produção de  $CO_2$  (—).

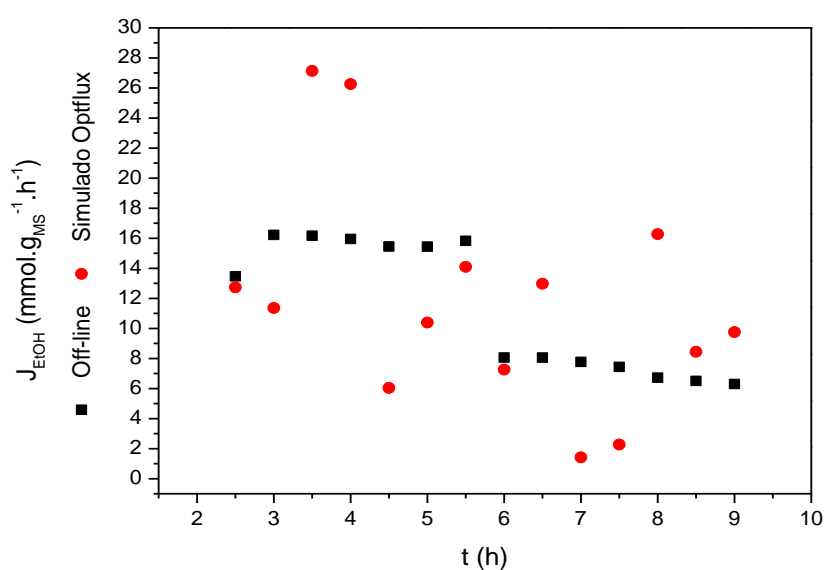


É possível, então, comparar as simulações do Optflux com os fluxos experimentais obtidos no cultivo CMF2. Do início da alimentação até 6 h de cultivo, para um  $JO_2$  de  $(1,5 \pm 0,7)$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , o modelo propõe um fluxo de substrato de  $J_s = 7$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , sendo o fluxo experimental  $JO_2 = (7,3 \pm 1)$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . O fluxo de etanol (FIGURA 42) por sua vez apresentou como valor simulado  $J_{EtOH} = 12,7$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , sendo o valor médio experimental  $J_{EtOH} = (14 \pm 1)$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Para o fluxo de gás carbônico o valor obtido pelo modelo foi  $J_{CO_2} = 14$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , próximo do valor médio experimental de  $(12 \pm 1)$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Por fim RQ simulado para essas condições é de 9,5 mols de  $CO_2$  produzidos.(mols de  $O_2$  consumidos) $^{-1}$ , enquanto o obtido experimentalmente foi de  $9 \pm 4$  mols de  $CO_2$  produzidos.(mols de  $O_2$  consumidos) $^{-1}$ .

Realizando a mesma análise para o período de 6,5 h até 9,5 h, para um  $JO_2$  de 0,65  $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , o modelo propõe um fluxo de substrato de  $J_s = 3,5$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , sendo que nesse período o valor médio experimental para esse fluxo foi  $J_s = (4 \pm 2)$   $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Comparando o fluxo de etanol (FIGURA 42), o valor simulado é reduzido para 5,2  $\text{mmol.g}_{M_s}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

$^1.h^{-1}$ , enquanto o valor experimental também é reduzido para  $(7\pm 1) \text{ mmol.g}_{MS}^{-1}.h^{-1}$ . O valor simulado do fluxo de gás carbônico foi  $J_{CO_2}=5,1 \text{ mmol.g}_{MS}^{-1}.h^{-1}$ , sendo que o fluxo experimental se manteve próximo, com o valor médio de  $J_{CO_2}=(7\pm 1) \text{ mmol.g}_{MS}^{-1}.h^{-1}$ . Já o RQ simulado foi de 9,2 mols de  $CO_2$  produzidos.(mols de  $O_2$  consumidos) $^{-1}$ , enquanto o RQ experimental se manteve em  $(12\pm 3)$  mols de  $CO_2$  produzidos.(mols de  $O_2$  consumidos) $^{-1}$ .

FIGURA 42 - Perfil do fluxo de etanol no cultivo CMF2. Sendo (■) fluxo off-line e (●) fluxos simulados pelo Optflux



Nota-se que os dados experimentais se mantiveram próximos aos estimados pelas simulações, demonstrando novamente a viabilidade da proposta enquanto o modelo for válido. Contudo, deve-se lembrar que as simulações obtidas não preveem possíveis efeitos inibitórios podendo gerar desvios não esperados. Tal efeito pode ser observado nos dados referentes aos perfis de cultivos obtidos para CMA, CMF1 e CMF2 (FIGURA 43), na forma de um aumento na concentração de oxigênio dissolvido e um maior acúmulo de substrato.

A FIGURA 43 representa o perfil obtido no cultivo CMF2. É possível perceber o mesmo comportamento que foi notado nos cultivos CMA e CMF1. Em um determinado momento do cultivo, nesse caso a partir das 6 h, há um aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio, causada pela estagnação do crescimento quando a concentração de etanol atinge  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . Após 6 h, a concentração de oxigênio dissolvido permanece em cerca de 12 % da saturação, fora das condições de microaeração descritas por Zeng e Deckwer (1996), onde a saturação de oxigênio deve ser de até 1,5%. Contudo o consumo de oxigênio apresentado

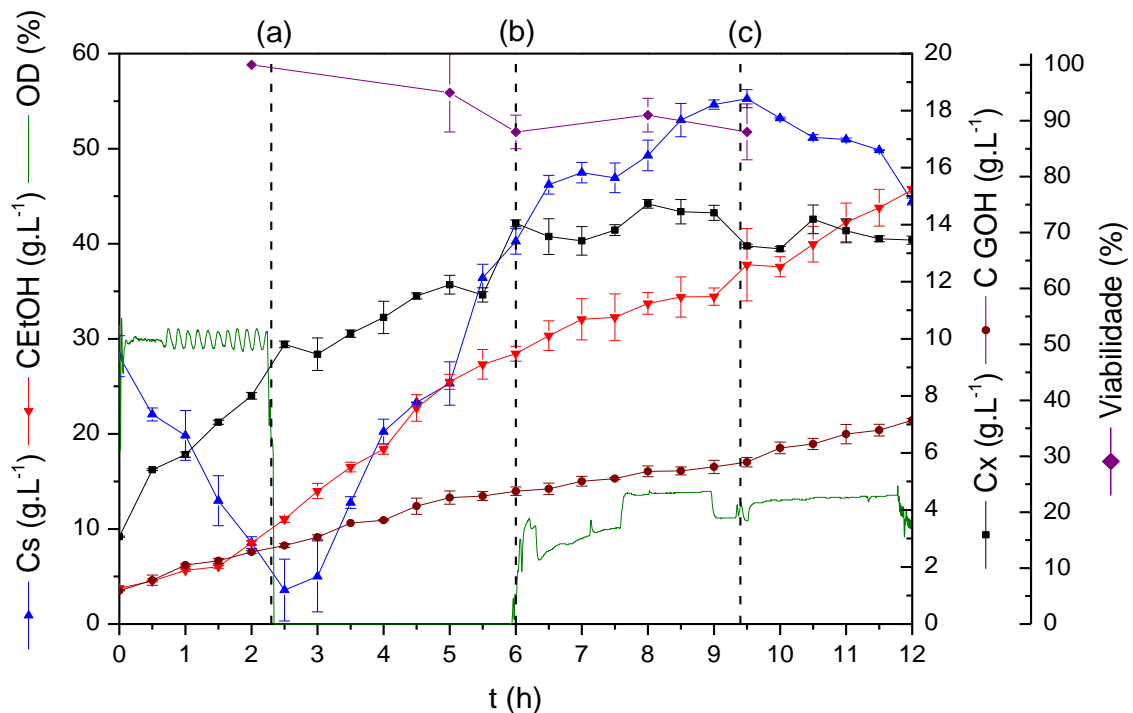
pelo microrganismo se mantém como se este continuasse em condições de limitação de oxigênio (FIGURA 35)

A concentração de substrato no meio apresenta um perfil de acúmulo desde o início da alimentação, que pode ser atribuído em parte a um erro na equação de calibração da bomba de alimentação (que acabou fornecendo uma quantidade maior de substrato ao cultivo, cerca de 21% adicionais), pois foi necessário realizar a troca da mangueira de alimentação e nova calibração durante cultivo, e, em parte, aos possíveis efeitos inibitórios do etanol (após 6 h).

O cultivo foi interrompido em 12h, 2,5h depois de a bomba de alimentação. O novo termo derivativo adicionado à lógica de alimentação permitiu obter um perfil mais suave de alimentação, mas não reduziu o acúmulo de substrato. A alteração de  $Y_{x/s}$  também não exerceu influência suficiente para evitar esse acúmulo. Quanto a viabilidade, essa foi mantida em torno de 90% até o fim do meio de alimentação.

A concentração final de glicerol nesse cultivo atingiu  $(7,14 \pm 0,06)$  g.L<sup>-1</sup>, enquanto o etanol ao fim das 12 h de cultivo atingiu  $(50,5 \pm 0,4)$  g.L<sup>-1</sup>. A concentração de células foi menor que obtida nos cultivos CMF1 e CMA, sendo cerca de  $(13,5 \pm 0,1)$  g.L<sup>-1</sup>.

FIGURA 43 - Perfil do cultivo CMF2 sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo de O<sub>2</sub> dissolvido e (c) fim da lógica de alimentação



A manutenção do fluxo de oxigênio em níveis muito baixos (entre 0,65 e 1,5 mmol.g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> – FIGURA 35), mesmo na ausência de limitação por oxigênio (após 6 h de cultivo), pode ser explicada pelas modificações nas células quando expostas à minimização dos fluxos no ciclo TCA e, conseqüentemente, no suprimento das necessidades energéticas. Dentre as modificações com a minimização da rota aeróbia, como descrito anteriormente, as células não são capazes de retornar ao pleno funcionamento da via aeróbia em um curto espaço de tempo

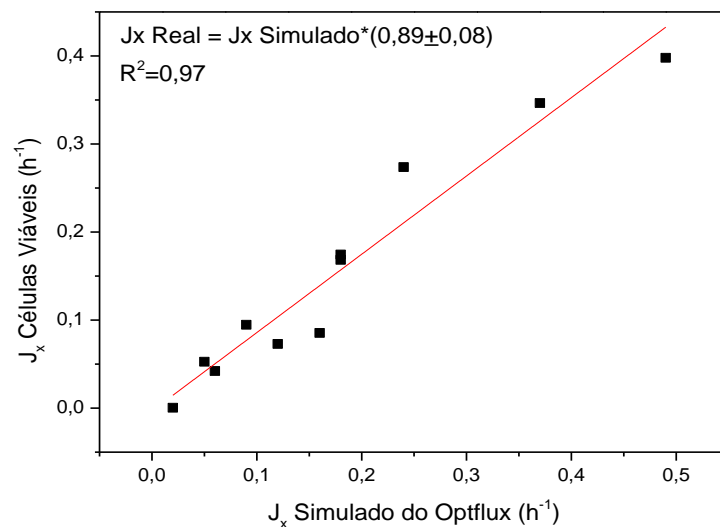
Em relação a distribuição de fluxos, de acordo com o trabalho de Jouhten *et al.* (2008), no qual foi estudada a influência do oxigênio nas vias metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A, quando a fração de oxigênio no gás da corrente de entrada era 1% a 0,5% a via respiratória era severamente restringida, diminuindo os fluxos na direção do ciclo do ácido cítrico e aumentando na direção das vias fermentativas. Em uma condição de 0,5% de oxigênio na corrente de entrada, a via aeróbia ainda supria 25% da demanda de ATP, e os rendimentos de produtos foram maiores que os de células. Também foi notado que existe uma correlação positiva nos níveis transcricionais de enzimas metabólicas e os fluxos em diferentes condições de oxigenação na via respiratória.

Rintala *et al.* (2009) relatou comportamento semelhante ao operar um quimiostato com diferentes níveis de fornecimento de oxigênio. Condições intermediárias de fornecimento de oxigênio (1%-0,5% da composição do gás de entrada) apresentaram uma maior expressão dos genes responsáveis por enzimas da via respiratória e da atividade enzimática dessa via quando comparado com plena aerobiose e anaerobiose. Essas condições também sugerem uma regulação pós-transcricional. Segundo os autores, esse perfil distinto nas condições de limitação de oxigênio sugere um mecanismo regulatório dos genes, sendo uma resposta celular para melhorar a eficiência na produção de energia. Também é notado que cada nível de aeração forneceu um nível de proteoma diferente com comportamentos fisiológicos distintos.

O uso de um sensor de biomassa que forneça o sinal adequado de células viáveis, como o “Biomass System” (FOGALE NANOTECH), pode ajudar a minimizar o aumento observado nas concentrações de oxigênio e substrato, e refinar a lógica de controle pela incorporação em tempo real da estimativa da velocidade específica de crescimento (HORTA *et al.*, 2015) que reflete os possíveis efeitos de inibição por etanol e da perda de viabilidade. O modelo metabólico não é capaz de descrever a perda de viabilidade de células nem a inibição do crescimento por metabólitos acumulados, o que leva à superestimativa dos fluxos e contribui para o acúmulo de substrato e oxigênio.

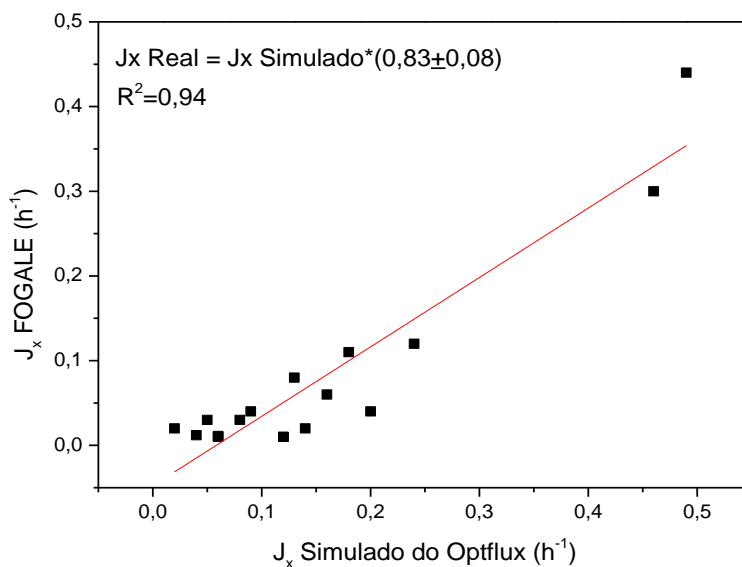
Essa diferença pode ser ilustrada realizando uma análise dos fluxos de células, calculados a partir da concentração celular levando em conta a viabilidade (usando balanço de massa para células), e representando os fluxos de biomassa corrigidos pela viabilidade (medida nas amostras retiradas durante o cultivo) em função dos fluxos obtidos a partir de simulações do modelo metabólico, usando como dados de entrada os fluxos de oxigênio e de substrato obtidos no cultivo CMF2 (FIGURA 44). Pelo gráfico é obtido um fator de correção de 89% do valor obtido das simulações para se aproximarem do valor real observado nos cultivos

FIGURA 44 - Comparativo entre os fluxos de células simulados e de células viáveis



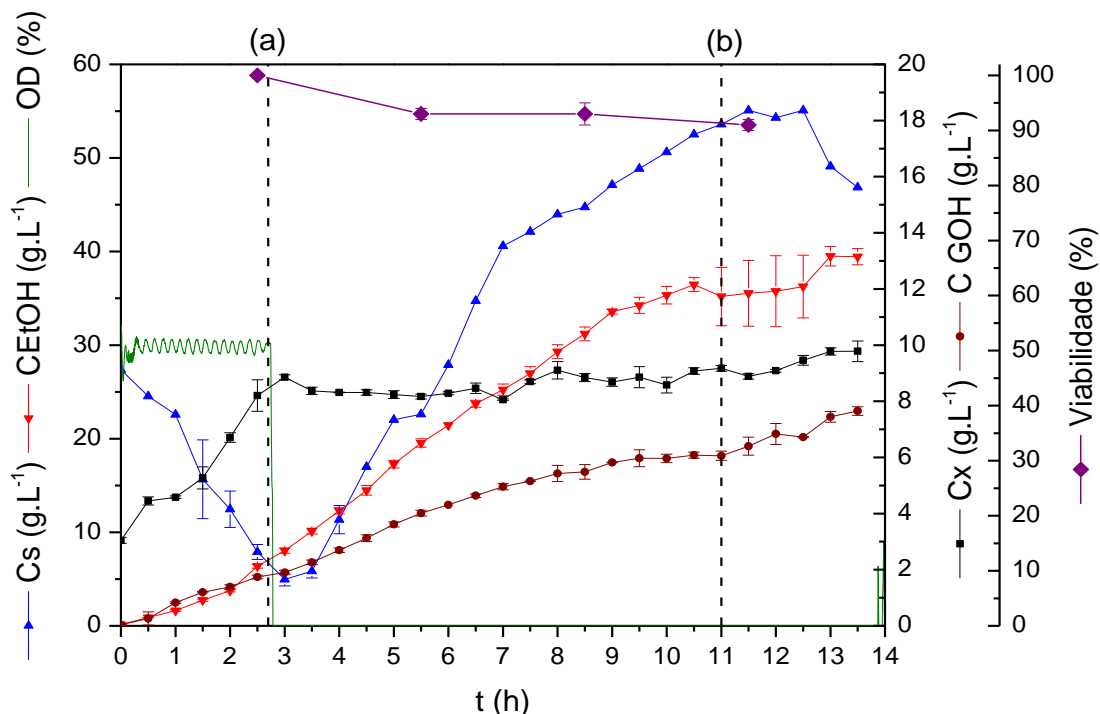
No cultivo CMF2 também foi usado o sensor de biomassa (Biomass System – FOGALE NANOTECH). Os dados de permissividade foram usados para estimar os fluxos de células (FIGURA 45). Nesse caso, é sugerido um fator de correção próximo a 83% para fluxos simulados. Logo, essa correção poderia auxiliar na melhoria da lógica de controle proposta.

FIGURA 45 - Comparativo entre os fluxos de células simulados e fluxos calculados pelos dados do FOGALE



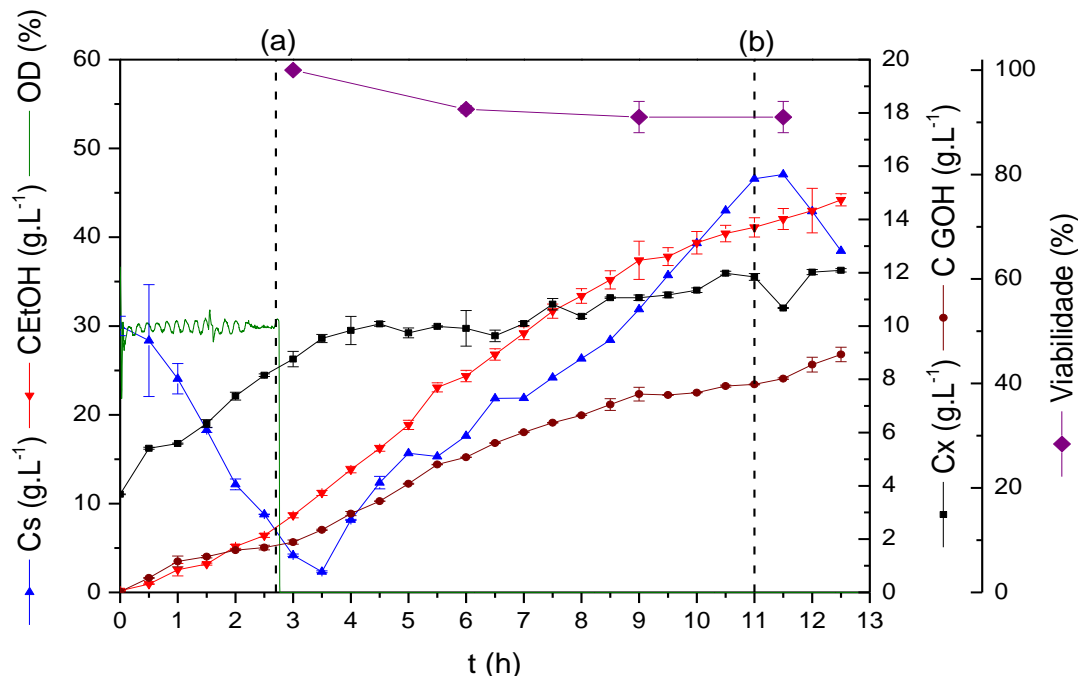
O cultivo FTU (FIGURA 46) apresentou crescimento celular menor do que o observado nos cultivos CMF2 e FEA, levando ao menor acúmulo de células. Esse comportamento pode ter sido consequência de inibição causada pelo gás carbônico dissolvido no meio de cultivo, cuja concentração foi mais alta já que não havia fase gasosa contínua para retirá-lo. Esse fenômeno pode então ter acarretado a redução na produção de células, sendo a concentração final de células  $(9,8 \pm 0,4) \text{ g.L}^{-1}$ . A concentração de substrato residual ao final desse cultivo foi de cerca de  $45 \text{ g.L}^{-1}$ . A concentração de etanol atingiu um valor final de  $(39,5 \pm 0,9) \text{ g.L}^{-1}$ . O cultivo se manteve em anaerobiose assim que a aeração da fase de crescimento celular foi cessada. A concentração final de glicerol atingiu um valor superior ao obtido no CMF2, alcançando  $(7,7 \pm 0,2) \text{ g.L}^{-1}$ . A viabilidade se manteve em 92% ao longo da fase de alimentação, apresentando variação semelhante à observada no cultivo CMF2.

FIGURA 46 - Perfil do cultivo FTU sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica e (b) fim da lógica de alimentação



O cultivo FEA (FIGURA 47) apresentou uma concentração final de células intermediária de  $(12,1 \pm 0,1)$  g.L<sup>-1</sup> entre os cultivos CMF2 e FTU, bem como uma concentração final intermediária de etanol de  $(44,2 \pm 0,4)$  g.L<sup>-1</sup>. O cultivo FEA, contudo, apresentou uma maior concentração final de glicerol de cerca de  $(9 \pm 0,3)$  g.L<sup>-1</sup>. A concentração residual final de glicose foi de cerca de 39 g.L<sup>-1</sup> e a viabilidade também se manteve por volta de 91%, próximo à viabilidade observada nos outros dois cultivos. A manutenção da viabilidade nos cultivos nesse caso é uma característica das cepas comerciais de levedura voltadas para panificação, que devem ser capazes de se manter viáveis por tempos de prateleira longos. Comparando os três cultivos, nota-se que a microaeração apresentou efeitos benéficos para a produção de etanol em meio mínimo, e também para diminuição da concentração final de glicerol, já que parte da regeneração dos cofatores pode ter sido dada mediante respiração

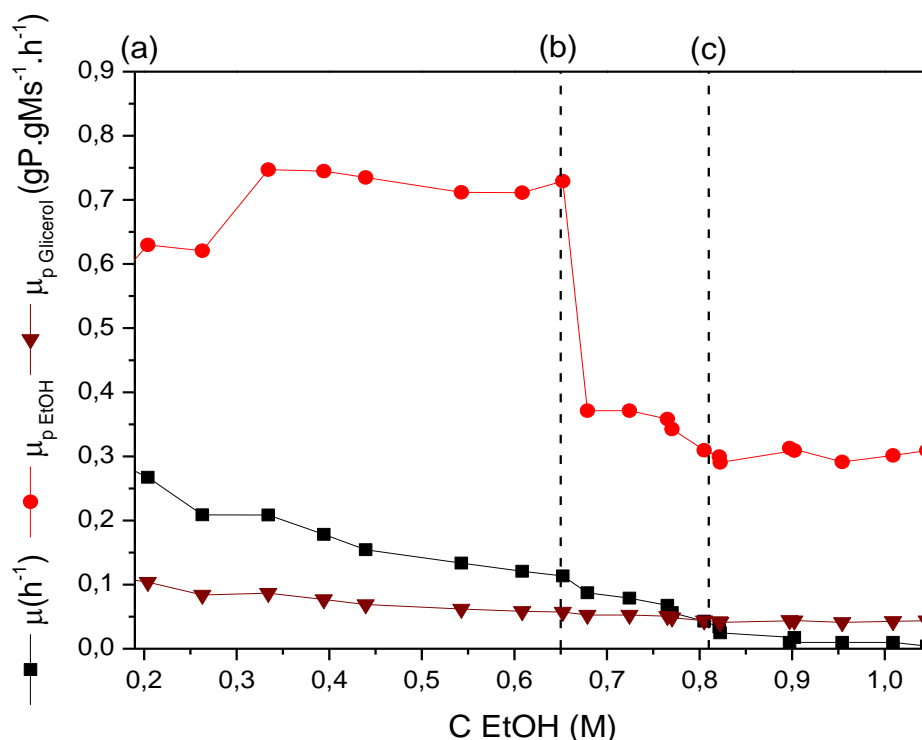
FIGURA 47 - Perfil do cultivo FEA sendo biomassa (■), etanol (●), glicerol (▼), glicose (▲), oxigênio dissolvido (—). Sendo (a) início da atuação da lógica e (b) fim da lógica de alimentação



Analisando os termos de velocidade específica de crescimento e produtividade específica de etanol e glicerol (obtidos por meio do balanço de massa em termos mássicos e calculados em cada ponto, Eq. 11 e Eq. 32), o comportamento do cultivo CMF2 (FIGURA 48) é semelhante ao observado nos cultivos CMA e CMF1. Contudo para o CMF2, a redução observada da produtividade específica de etanol foi maior, saindo de um valor médio de  $(0,72 \pm 0,04) \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para  $(0,33 \pm 0,03) \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  após atingir uma concentração de 0,65 M de etanol. A produtividade específica de glicerol mantém um valor médio de  $(0,06 \pm 0,01) \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . A redução da velocidade específica de etanol no CMF2 se deu em um ponto de concentração de etanol um pouco menor que as observadas no CMA e CMF1, enquanto a produtividade específica de glicerol aumentou. Esse comportamento pode ser devido a uma maior sensibilidade das células empregadas no cultivo CMF2 ao etanol (em comparação com as células utilizadas no cultivo CMF1), consequentemente a produtividade de glicerol pode ter aumentado para viabilizar a regeneração dos cofatores.



FIGURA 48 - Produtividade específica de etanol (●), glicerol (▼) e  $\mu$  (■) no cultivo CMF2. Sendo (a) início da atuação da lógica, (b) início do acúmulo e (c) fim da lógica de alimentação



A TABELA 9 apresenta os parâmetros cinéticos globais (seção 3.3.1, Eq.36) dos cultivos CMF2, FTU e FEA obtidos durante o estágio de batelada alimentada. Para o cultivo CMF2 foram observadas duas regiões diferentes: a primeira que corresponde ao intervalo de tempo anterior ao aumento da concentração oxigênio dissolvido (2h-6h) e a segunda ao intervalo de tempo onde esse aumento ocorreu (6,5h -9,5h de cultivo).

A velocidade específica de crescimento se manteve próximo para os três cultivos, sendo que para o período I do CMF2 foi o que apresentou maior valor absoluto. O rendimento em células foi maior para CMF2 no período I, sendo reduzido para o mesmo rendimento em células do FEA no valor de  $0,071 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ . O cultivo FTU apresentou o menor rendimento em células quando comparado com as outras estratégias.

O rendimento de produto para o período I do CMF2 foi de  $0,48 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ , sendo semelhante ao obtido nos cultivos CMA e CMF1. Contudo no período II do CMF2 o rendimento foi reduzido para  $0,32 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ , que foi o mesmo rendimento encontrado para as outras duas estratégias de fermentação. Já o rendimento em glicerol durante o período I do CMF2 foi menor em termo absoluto comparado com os outros dois cultivos (FTU e FEA), e no período II esse rendimento é reduzido para  $0,42 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ .

TABELA 9 - Comparativo dos parâmetros das estratégias de fermentação

Parâmetros	CMF2		FTU	FEA
	I	II	III	III
$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,12±0,02	0,09±0,01	0,097±0,003	0,115±0,007
$Y_{X/S}$ ( $\text{g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )	0,10±0,01	0,071±0,006	0,048±0,003	0,071±0,005
$Y_{\text{EtOH}/S}$ ( $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )	0,48±0,02	0,32±0,02	0,326±0,003	0,325±0,005
$Y_{\text{GOH}/S}$ ( $\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )	0,056±0,003	0,042±0,001	0,060±0,002	0,061±0,002

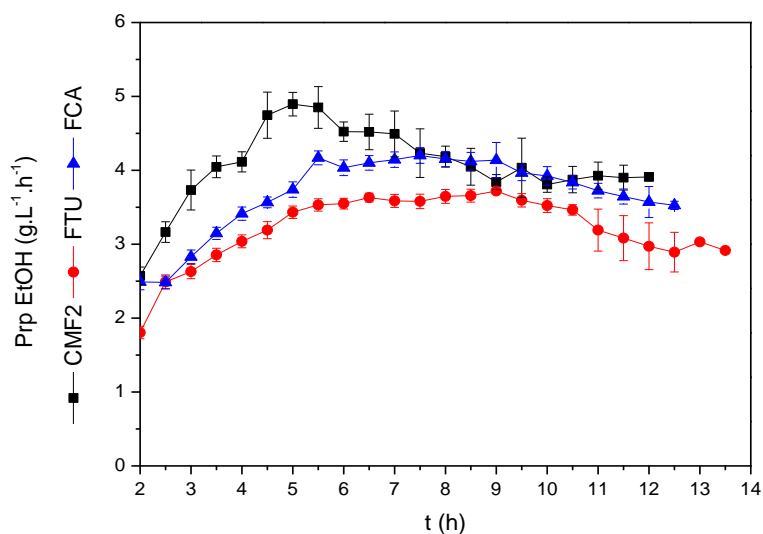
I-Período do início da fase de alimentação até 6h de cultivo (antes do acúmulo - CMF2);

II- Período após 6h de cultivo até fim da fase de alimentação (durante acúmulo -CMF2);

III-calculado para toda fase de alimentação;

As produtividades locais foram calculadas pela relação da variação da concentração do componente pelo intervalo de tempo e os respectivos erros propagados (Eq. 37). Os dados então foram organizados em gráficos para comparação. Em relação às produtividades de etanol (FIGURA 49), o cultivo CMF2 apresentou os maiores valores de produtividades locais até 6,5 horas, atingindo o valor de  $(4,85 \pm 0,08) \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ . A partir desse ponto a produtividade de etanol do cultivo CMF2 se aproximou da obtida no cultivo FEA. As menores foram observadas no cultivo FTU.

FIGURA 49 - Comparativo entre produtividades de etanol das estratégias de fermentação. Sendo (■) CMF2, (●) FTU e (▲) FEA



As produtividades de glicerol (FIGURA 50) para o CMF2 foi a menor entre as três estratégias de fermentação investigadas, enquanto o cultivo FEA apresentou a maior produtividade ( $0,868 \pm 0,002 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Para a produtividade de células (FIGURA 51), o cultivo CMF2 também apresentou os maiores valores. O cultivo FTU apresentou as menores produtividades de células, apresentando após 8h uma produtividade média de  $0,65 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{Ms}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$

FIGURA 50 - Comparativo entre produtividades de glicerol das estratégias de fermentação. Sendo (■) CMF2, (●) FTU e (▲) FEA

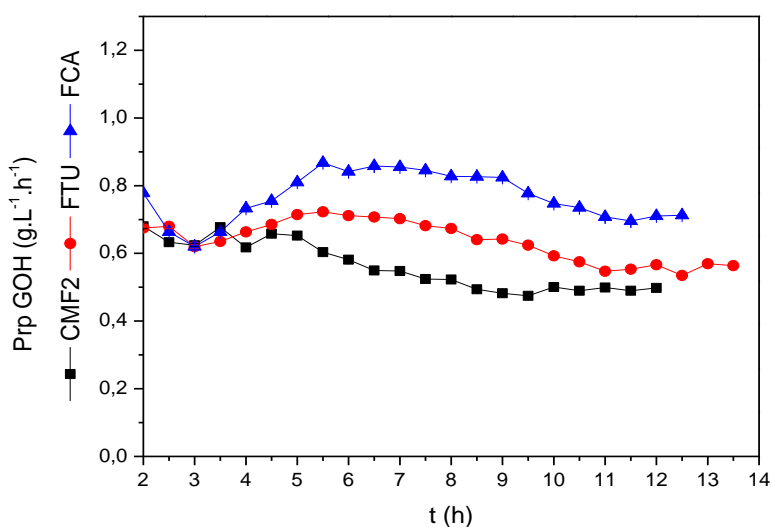
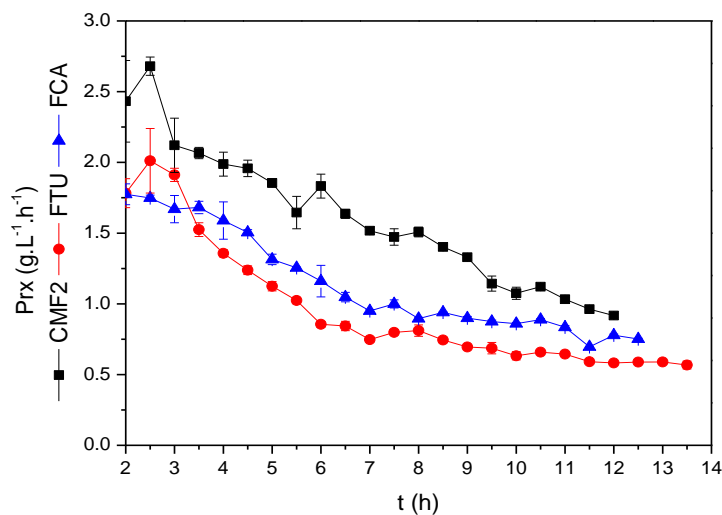


FIGURA 51 - Comparativo entre produtividades de células das estratégias de fermentação. Sendo (■) CMF2, (●) FTU e (▲) FEA



Os resultados obtidos podem ser comparados com resultados apresentados na literatura e são apresentados na TABELA 10.

MARTINS (2009) realizou diversos ensaios em escala industrial de processos de fermentação típicos de usina. O volume útil das dornas era de 360 m<sup>3</sup>. Nesse trabalho foi variado o período de alimentação (2h, 4h, 5h e 6h) e concentração de inóculo inicial ou “pé de cuba” (2%, 4%, 5%, 7%, 9%, 11%, 14%(v/v)). A melhor condição obtida foi com um período de 5h de alimentação de mosto e inóculo com cerca de 11% base úmida. Nessas condições, rendimento de 0,45 g<sub>etanol</sub>.g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup> e produtividade de 7,5 g<sub>etanol</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> foram estimados. Segundo Amorim *et al.* (2011), em processos industriais usuais, o tempo de fermentação é de 6 a 12h em tanques fermentadores com volumes que variam de 500 a 3000 m<sup>3</sup>, sendo as concentrações finais de etanol cerca de 7 a 11% (v/v), portanto as produtividades industriais de etanol se encontram próximas a uma faixa de 5 a 10 g<sub>etanol</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Os cultivos submetidos à lógica de controle apresentaram produtividades próximas (Prp<sub>CMF1</sub>=6,2 g<sub>etanol</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e Prp<sub>CMF2</sub>=4,8 g<sub>etanol</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) em meio mínimo e rendimentos de 0,48 g<sub>etanol</sub>.g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>.

TABELA 10 – Comparativo dos resultados obtidos com dados da literatura

<b>Cultivo</b>	<b>Yp/s</b> (g <sub>etanol</sub> .g <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> )	<b>Pr<sub>P, EtOH</sub></b> (g <sub>etanol</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	<b>Meio</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Levedura</b> ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>CMA</b>	0,48	5,2	Mínimo	Glicose	30	Itaiquara
<b>CMF1</b>	0,48	6,3	Mínimo	Glicose	30	Itaiquara
<b>CMF2- Período I</b>	0,48	4,9	Mínimo	Glicose	30	Itaiquara
<b>FTU</b>	0,32	3,5	Mínimo	Glicose	30	Itaiquara
<b>FEA</b>	0,32	4,0	Mínimo	Glicose	30	Itaiquara
<b>Martins (2009)</b>	0,45	7,5	Complexo	Sacarose	35	Industrial
<b>Brandberg et al. (2007)</b>	0,47	~0,1	Mínimo	Glicose	30	ATCC 96581
<b>Joannis-cassan et al. (2014)</b>	0,45	2,3	Complexo	Sacarose	30	C10
<b>Deesuth et al. (2016)</b>	0,49	2,7	Complexo	Sacarose	30	NP01

Brandberg, Gustafsson e Frazén (2007), usando *S. cerevisiae* ATCC 96581 em condições de microaerobiose (0,5% de oxigênio no gás de entrada) em um reator com recirculação de células e limitação da fonte de nitrogênio, alcançaram um rendimento de  $0,47 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ . Usando um controle feedback de RQ, mantendo-o no intervalo de 20 a 25, o rendimento foi de  $0,45 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ . Também foi observado que a condição de microaeração teve menor produção de glicerol.

Jouhten *et al.* (2008), usando *S. cerevisiae* CEN.PK113-1A, alcançaram fluxo de etanol de  $2 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e de substrato  $2,13 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , com uma vazão de gás na corrente de entrada com 1% de oxigênio na composição. Com 0,5% de oxigênio, o fluxo de etanol aumentou para  $2,91 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e o de substrato para  $2,78 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Os maiores fluxos foram encontrados para o estado completamente anaeróbio, sendo de etanol  $9,47 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e substrato  $6,58 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , essa condição também estimulou a produção de glicerol. Quando comparados com os fluxos obtidos no cultivo CMF2, os fluxos obtidos pela estratégia proposta pelo trabalho dos autores foram menores, e somente nas condições de anaerobiose que os fluxos se aproximaram.

Joannis-cassan *et al.* (2014) procuraram otimizar a produção de etanol a partir de xarope de beterraba com *S. cerevisiae* C10 utilizando diferentes estratégias de cultivos diferentes. Uma dessas estratégias experimentais consistiu em uma batelada alimentada com três etapas: a primeira é uma batelada designada para propagação da levedura; a segunda é o início da batelada alimentada propriamente dita visando à produção de etanol; e a terceira teve início com fim do meio de alimentação, retornando a um processo batelada voltado para a exaustão da fonte de carbono. Com tempo final dos cultivos variando de 57 – 74h e uma aeração de 1vvh, os autores conseguiram alcançar uma concentração de cerca de 15% (v/v) de etanol a partir de  $327 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de sacarose, representando uma produtividade de  $2,3 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Deesuth, Laopaiboon, Laopaiboon (2016) identificaram como condições ideais de aeração uma vazão de ar de 0,31 vvm por um período 12h para produção de etanol em fermentações VHG (Very High Gravity) de caldo de sorgo usando *S. cerevisiae* NP 01. Usando  $280 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de açúcares redutores totais com as condições ótimas de aeração ( $0,31 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  para 1L de meio), foi alcançada uma concentração final de etanol de  $127,80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (16,7 % (v/v)), uma produtividade de  $2,7 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e rendimento de etanol em substrato de  $0,49 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ .

## 5 CONCLUSÃO

A proposta de controle usando as informações inferidas pelo *softsensor* com base em modelos metabólicos foi implementada com sucesso. Para a abordagem em malha aberta, os fluxos experimentais calculados offline de  $J_s=10\pm 0,1 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ,  $J_{\text{O}_2}=2,0\pm 0,1 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $J_{\text{etanol}}=16\pm 1 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  apresentaram comportamento coerente com o previsto pelas simulações do modelo metabólico até o início do acúmulo de oxigênio dissolvido no meio, levando à boa produção de etanol. Quanto à abordagem CMF1, também foi capaz de atuar, mantendo os valores de RQ na faixa desejada até o acúmulo de oxigênio dissolvido no meio. Para esse sistema, os fluxos observados de  $J_s=7,3\pm 0,7 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ,  $J_{\text{O}_2}=1,3\pm 0,2 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $J_{\text{etanol}}=13,9\pm 0,9 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  também se mostraram coerentes com os resultados obtidos pelas simulações. O mesmo pode ser dito para o cultivo CMF2, onde os fluxos obtidos de etanol, substrato,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  e RQ se mantiveram coerentes com as simulações e as relações propostas para o controle se mostraram válidas.

As condições simuladas no Optflux e aplicadas para a lógica de controle permitiram uma produtividade de etanol superior ( $\text{Prp}_{\text{CMA}}=5,2 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ;  $\text{Prp}_{\text{CMF1}}=6,2 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $\text{Prp}_{\text{CMF2}}=4,9 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) aos experimentos sem controle ( $\text{Prp}_{\text{FTU}}=3,5 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $\text{Prp}_{\text{FEA}}=4,0 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e baixa produtividade de glicerol ( $\text{Prp}_{\text{CMA}}=0,53 \text{ g}_{\text{glicerol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ;  $\text{Prp}_{\text{CMF1}}=0,69 \text{ g}_{\text{glicerol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $\text{Prp}_{\text{CMF2}}=0,65 \text{ g}_{\text{glicerol}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) ao longo da atuação da lógica. Em malha fechada, dois modelos de correlação entre os parâmetros de entrada foram gerados. A combinação do uso de RQ como variável controlada com a manutenção dos fluxos, nos valores previamente estabelecidos pelas simulações do modelo metabólico, permitiu superar as limitações técnicas encontradas para implementação da estratégia inovadora de controle proposta.

O *softsensor* incorporado ao sistema de supervisão SuperSys\_HCDC foi capaz de estimar fluxos metabólicos ( $J_s$  e  $J_{\text{O}_2}$ ) online. As considerações de atraso e atuação da lógica foram suficientes para manter o sistema de controle estável enquanto os modelos metabólicos simulados eram válidos. Os modelos fenomenológicos e algoritmos propostos para o *softsensor* e incorporados no LabView permitiram a geração de novas informações de entrada para o controle. A adição do termo cumulativo no CMF2 para a alimentação permitiu um perfil de alimentação mais suave e redução do erro sistemático, contudo não reduziu o acúmulo de substrato observado.

Para os fluxos de oxigênio e substrato, o controle foi capaz de manter a resposta da levedura próxima aos valores ótimos estabelecidos pelas simulações do modelo metabólico. A levedura respondeu de maneira mais eficiente à disponibilidade de oxigênio viabilizada pela microaeração.

Os parâmetros cinéticos obtidos refletem o importante papel desempenhado pelo fornecimento de oxigênio durante processos fermentativos. Os rendimentos, as produtividades e concentrações de etanol observadas foram maiores nos cultivos submetidos ao controle de fluxos metabólicos (mesmo em malha aberta) quando comparados às estratégias de fermentação tipo usina e completamente anaeróbio. O  $Y_{P/S} = 0,48 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ , acima de 90% do valor teórico máximo observado para os cultivos controlados, é indicador da viabilidade do processo. O controle em malha fechada, por sua vez foi capaz de reduzir a taxa de crescimento celular durante a etapa de alimentação e manter o sistema próximo às condições determinadas. Porém ainda são necessários ajustes para minimizar acúmulo de oxigênio e substrato, e lidar com possíveis efeitos de inibição e perda de viabilidade, não previstos pelo modelo metabólico. O uso de um sensor de biomassa viável pode auxiliar a reduzir parte do acúmulo observado.



## 6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE

É proposto a realização de cultivos semelhantes ao CMF2, FTU e FEA com uma cepa industrial de levedura mais resistente ao etanol. Também se propõe usar um sensor de biomassa para refinar o controle de fluxos metabólicos, e avaliar o desempenho e o perfil do cultivo. A avaliação do desempenho do sistema de controle proposto para diferentes fontes de carbono também se faz necessária, o que requer a adequação dos modelos e relações matemáticas para cada fonte de carbono, por exemplo, xilose, frutose e até fontes de carbono diferentes, como a sacarose, melão ou hidrolisados. A atualização da lógica na interface do LabView também é necessária para o funcionamento correto do controle. Aplicar lógicas computacionais mais complexas, como lógicas neurais, fuzzy, e neuro-fuzzy, auxiliariam no processo de controle por permitir varrer uma região maior de fluxos e do perfil do controle. Pode-se propor a geração do controle ótimo para controle de fluxos metabólicos. Todas essas propostas podem ser implementadas para outros microrganismos e produtos, que possam ser produzidos de maneira mais eficiente em condições de limitação do fornecimento de oxigênio.



**REFERÊNCIAS**

- AGREN, R.; OTERO, J. M.; NIELSEN, J. Genome-scale modeling enables metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, p. 735-747, 2013.
- ALFENORE, S. et al. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 537-542, 2004.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, v. 6, p. 286-299, 2011.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ARO, E.-M. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. **Ambio**, v. 45, p. 24-31, 2016.
- AYRES, R. U.; AYRES, E. H. **Crossing the energy divide: moving from fossil fuel dependence to a clean-energy future**. 1. ed. New Jersey: Pearson Inc, 2010.
- AZEVEDO, S. F.; PIMENTA, P.; OLIVEIRA, F. Computer-based studies on bioprocesses engineering: I-Tools for process analysis. In: MOREIRA, A. R.; WALLACE, K. K. **Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 305, 1996. Cap. 1.
- BARBOSA, A. H.; FREITA, M. S. R.; NEVES, F. A. Confiabilidade estrutural utilizando o método de Monte Carlo e redes neurais. **Rem: Rev. Esc. Minas**, v. 58, n. 3, p. 247-255, 2005.
- BIDEAUX, C. et al. Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2134-2140, 2006.
- BORGES, E. R.; PEREIRA JR., N. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, n. 8, p. 1001-1011, 2011.
- BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* or production of chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 9, p. 609-620, 2014.
- BORZANI, W. Calculation of fermentation parameters from the results of a fed-batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 51, n. 3, p. 441-446, 2008.
- BOURDREAU, M. A.; MCMILLIAN, G. K. **New directions in bioprocess modeling and control: maximizing process analytical technology benefits**. 1. ed. New York: ISA, 2007.
- BRANDBERG, T.; GUSTAFSSON, L.; FRANZÉN, C. J. The impact of severe nitrogen limitation and microaerobic conditions on extended continuous cultivations of

- Saccharomyces cerevisiae with cell circulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 583-593, 2007.
- BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: science and practice**. 1. ed. Cambridge: CRC Press, 2004.
- BRO, C. et al. In silico aided metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for improved bioethanol production. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 2, p. 102-111, 2006.
- BUNGAY, H. R. Introduction to artificial intelligence. In: MOREIRA, A. R.; WALLACE, K. K. **Computer and information science applications in bioprocess engineering**. 1. ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 305, 1996. Cap. 5.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J.; GUTIÉRREZ, L. F. **Process synthesis for fuel ethanol production**. 1. ed. New York: CRC Press, 2010.
- CARIUS, L. et al. Model-based derivation, analysis and control of unstable microaerobic steady-states—Considering Rhodospirillum rubrum as an example. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 4, p. 734-747, 2014.
- CARLSEN, H. R.; DEGN, H.; LLOYD, D. Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. **Journal of General Microbiology**, n. 137, p. 2979-2883, 1991.
- CASCANTE, M. et al. Fluxomics. In: ORESIC, M.; VIDAL-PUIG, A. **A system biology approach to study metabolic syndrome**. Dordrecht: Springer, 2014. Cap. 12.
- CASTRO, E. Other Ethanologenic Microorganisms. In: FARACO, V. **Lignocellulose conversion: enzymatic and microbial tools for bioethanol production**. Heidelberg: Springer, 2013. Cap. 8.
- CASTRUCCI, P. L.; SALES, R. M.; BITTAR, M. **Controle automático**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.
- CHEESMAN, O. D. Overview. In: CHEESMAN, O. D. **Environmental impacts of sugar production: the cultivation and processing of sugarcane and sugar beet**. 1. ed. London: CABI Publishing, 2004. Cap. 2.
- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1412-1421, 2010.
- CHU, H. S. et al. Direct fermentation route for the production of acrylic acid. **Metabolic Engineering**, 2015. 23-29.
- CURLEY, R. (Ed.). **Fossil fuels energy: past, present and future**. 1. ed. New York: Britannica Educational Publishing, 2012.
- CVIJOVIC, M.; BORDEL, S.; NIELSEN, J. Mathematical models of cell factories: moving towards the core of industrial biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 572-584, 2011.
- D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of baker's yeast. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 9, p. 322-330, 1987.

- DEESUTH, O.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. High ethanol production under optimal aeration conditions and yeast composition in a very high gravity fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial crops and products**, v. 92, p. 263-270, 2016.
- DENIZ, I.; IMAMOGLU, E.; VARDAR-SUKAN, F. Aeration-enhanced bioethanol production. **Biochemical engineering journal**, v. 92, p. 41-46, 2014.
- DOBSON, P. et al. Further developments towards a genome-scale metabolic model of yeast. **BMC Systems Biology**, v. 4, p. 145, 2010.
- DOCHAIN, D. What are the challenges for the control of bioprocesses? In: DOCHAIN, D. **Automatic control of bioprocesses**. 2. ed. Wiltshire: ISTE Ltd. & John Wiley & SONS, Inc., 2008. Cap. 1.
- DUARTE, N. C.; HERRGÄRD, M. J.; PALSSON, B. O. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. **Genome Res.**, v. 14, n. 7, p. 1298-1309, 2004.
- FAIRLEY, P. Next generation biofuels. **Nature**, v. 474, p. 1-5, 2011.
- FARRELL, A. E. et al. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science**, v. 311, p. 506-507, 2006.
- FARRELL, P. et al. The use of dissolved oxygen-controlled, fed-batch aerobic cultivation for recombinant protein subunit vaccine manufacturing. **Vaccine**, v. 33, n. 48, p. 6752–6756, 2015.
- FORNAIRON-BONNEFOND, C. et al. Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 496-503, 2003.
- FRANCKE, C.; SIEZEN, R. J.; TEUSINK, B. Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 11, p. 550-558, 2005.
- FRANZÉN, C. J. Metabolic flux analysis of RQ-controlled microaerobic ethanol production by *Saccharomyces Cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, p. 117-132, 2003.
- FRÁNZEN, C. J.; ALBERS, E.; NIKLASSON, C. Use of the inlet gas composition to control the respiratory quotient in microaerobic bioprocesses. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 13, p. 3391-3402, 1996.
- FROMANGER, R. et al. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 437-445, 2010.
- FURLAN, F. F. et al. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers & Chemical Engineering**, v. 43, p. 1-9, 2012.
- GARCIA-ALBARNOZ, M.; NIELSEN, J. Application of genome-scale metabolic models in metabolic engineering. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 203-214, 2013.

- GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, p. 535-569, 2007.
- GOLDEMBERG, J. The Role of Biomass in the World's Energy System. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011. Cap. 1.
- HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007.
- HEIDER, R. L.; MAY, M. M. A. Neural network industrial process applications. In: BOUDREAU, M. A.; MCMILLIAN, G. K. **New directions in bioprocess modeling and control: maximizing process analytical technology benefits**. 1. ed. New York: ISA, 2007. Cap. 7.
- HEIN, L.; LEEMANS, R. The Impact of First-Generation Biofuels on the Depletion of the Global Phosphorus Reserve. **AMBIO**, v. 41, p. 341-349, 2012.
- HERRERO, E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1217-1235, 2008.
- HERRGÄRD, M. J. et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. **Nat Biotechnol.**, v. 26, n. 10, p. 1155-1160, 2008.
- HERRGÄRD, M. J.; PALSSON, B. O. Genome-scale models of metabolic and regulatory networks. In: RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. **Systems biology: Networks, Models and Applications**. New York: Oxford University Press, v. 2, 2007. Cap. 8.
- HITZMANN, B.; STANKE, M. Automatic control of bioprocess. In: MANDENIUS, C.-F.; TITCHENER-HOOKER, N. J. **Measurement, monitoring, modelling and control of bioprocesses**. 1. ed. Berlin: Springer, 2013. Cap. 2.
- HJERSTED, J. L.; HENSON, M. A.; MAHADEVAN, R. Genome-scale analysis of *Saccharomyces cerevisiae* metabolism and ethanol production in fed-batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1190-1204, 2007.
- HORTA, A. C. L. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de E. coli recombinante**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 172. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química).
- HORTA, A. C. L. et al. A supervision control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 45-468, 2014.
- HORTA, A. C. L. et al. On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 4, p. 821-829, 2015.
- IRVINE, J. E. Sugarcane agronomy. In: JAMES, G. L. **Sugarcane**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2004. Cap. 6.
- JAMES, G. L. An introduction to sugarcane. In: JAMES, G. L. **Sugarcane**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2004. Cap. 1.

- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 320-326, 2006.
- JIN, Y.; JEFFRIES, T. W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 6, p. 229-238, 2004.
- JOANNIS-CASSAN, C. et al. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 165-173, 2014.
- JOBÉ, A. M. et al. Generally applicable fed-batch culture concept based on the detection of metabolic state by on-line balancing. **Biotechnol Bioeng**, v. 82, n. 6, p. 627-639, 2003.
- JOUHTEN, P. et al. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. **BMC Systems Biology**, v. 2, n. 60, p. 1-19, 2008.
- KUNZE, W. **Technology of brewing and malting**. 3. ed. Berlin: VLB Berlin, 2004.
- LAI, L.-C. et al. Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 9, p. 14689-1489, 2006.
- LANTZ, A. E. et al. Online monitoring of fermentation processes in lignocelluloses-to-bioalcohol production. In: WALDRON, K. **Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass**. Oxfors: CRC Press, v. 3, 2010. Cap. 12.
- LEÃO, C.; VAN UDEN, V. Effects of Ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 2601-2604, 1982.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.
- LEE, J. W. et al. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 370-378, 2011.
- LEE, S. Y. et al. Genome-Scale Network Modeling. In: WITTMAN, C.; LEE, S. Y. **Systems Metabolic Engineering**. Dordrecht: Springer, 2012. Cap. 1.
- LEIGH, J. R. **Control theory: guided tour**. 2. ed. London: Institution of Electrical Engineers, 2004.
- LEWIS, N. E. et al. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. **Mol Syst Biol**, v. 6, n. 390, 2010.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass: current state and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 69, p. 627-642, 2006.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M. et al. Operational strategies for producing bioethanol in a continuous single-stage reactor. **Bioprocess Biosys Eng**, v. 36, p. 1929-1937, 2013.
- MA, M.; LIU, L. Z. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 829-845, 2010.

- MARKX, G.; DAVEY, C. L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 161-171, 1999.
- MARTHOS, B. V. et al. Capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1: from strain selection to fed-batch cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 24, p. 10447-10456, 2015.
- MARTINS, C. A. P. **Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 86. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).
- MAY, A. et al. A modified pathway for the production of acetone in *Escherichia coli*. **Metab. Eng.**, 2013. 218-225.
- MO, M. L.; PALSSON, P. B. O.; HERRGARD, M. J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. **BMC Systems Biology**, v. 3, p. 37, 2009.
- MONTAÑO, I. D. C. **Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para produção de etanol de segunda geração**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 125. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Química).
- NAIK, S. B. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578–597, 2010.
- NANDIKOLLA, S. K. et al. Emerging trends in various fields with systems biology approach. **J Comput Sci Syst Biol**, v. 13, p. 1-6, 2011.
- NELLES, O. **Non-linear system identification: from classical approaches to neural networks and fuzzy models**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NICOLETTI, M. C.; JAIN, L. C.; GIORDANO, R. C. Computational intelligence techniques as tools for bioprocess modelling, optimization, supervision and control. In: NICOLETTI, M. C.; JAIN, L. **Computational intelligence techniques for bioprocess modelling, supervision and control**. 1. ed. Berlin: Springer, v. 218, 2009. Cap. 1.
- NILSSON, A.; TAHERZADEH, M. J.; LIDÉN, G. Use of dynamic step response for control of fed-batch conversion of lignocellulosic hydrolyzates to ethanol. **J Biotechnol**, v. 89, n. 1, p. 41-53, 2001.
- OGATA, K. **Modern control engineering**. 5. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010.
- OKUDA, N. et al. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *E. coli* KO11. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 350-357, 2007.
- ÖSTERLUND, T.; NOOKAEW, I.; NIELSEN, J. Fifteen years of large scale metabolic modeling of yeast: Developments and impacts. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 979-988, 2012.



- PIRES, E.; BRÁNYIK, T. **Biochemistry of beer fermentation**. 1. ed. London: Springer, 2015.
- PITKÄNEN, J.-P. et al. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p. 16-31, 2003.
- POLKE, M. **Process control engineering**. 1. ed. Weinheim: VCH, 1994.
- PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 944-956, 1994.
- PRODAN, E.; PRODAN, C.; MILLER JR., J. The Dielectric Response of Spherical Live Cells in Suspension: An Analytic Solution. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 9, p. 4174-4182, 2008.
- RENÓ, M. L. G. et al. Sugarcane biorefineries: Case studies applied to the Brazilian sugar-alcohol industry. **Energy Conversion and Management**, v. 86, p. 981-991, 2014.
- RINTALA, E. et al. Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics**, v. 461, n. 10, p. 1-19, 2009.
- ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC Systems Biology**, v. 4, p. 45, 2010.
- ROLDÃO, A.; KIM, I.-K.; NIELSEN, J. Bridging omics technologies with synthetic biology in yeast industrial biotechnology. In: WITTMANN, C.; LEE, S. Y. **Systems Metabolic Engineering**. Dordrecht: Springer, 2012. Cap. 9.
- ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Chemspider: search and share chemistry. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6646.html>>. Acesso em: 04 de novembro de 2015.
- SANTOS, F. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, W. D.; GÓMEZ, E. O.; BUCKERIGDE, M. S. Bioenergy and the Sustainable Revolution. In: BUCKERIGDE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Routes to cellulosic ethanol**. 1. ed. New York: Springer, 2011. Cap. 2.
- SCHOBERT, H. **Chemistry of fossil fuel and biofuels**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2013.
- SEBORG, D. E. et al. **Process dynamics and control**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002.
- SILVA, J. P. A. et al. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 151-156, 2011.

- SILVA, J. P. A. et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259-265, 2012.
- SILVA, R. et al. Optimization of fermentation conditions for the production of human soluble catechol-O-methyltransferase by *Escherichia coli* using artificial neural network. **Journal of Biotechnology**, v. 160, p. 161-168, 2012.
- SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1570–1580, 2010.
- SINGH, B. R.; SINGH, O. Global trends of fossil fuel reserves and climate change in the 21st century. In: KHAN, S. **Fossil fuel and environment**. 1. ed. Croatia: InTech Open, 2012.
- SONNLETINER, B. Automated measurement and monitoring of bioprocesses: key elements of the M3C strategy. In: MANDENIUS, C.-F.; TICHENER-HOOKER, N. J. **Measurement, monitoring, modelling and control of bioprocesses**. 1. ed. Berlin: Springer, 2013. Cap. 1.
- STANKE, M.; HITZMANN, B. Automatic Control of Bioprocesses. In: MANDENIUS, C.-F.; TICHENER-HOOKER, N. J. **Measurement, monitoring, modelling and control of bioprocesses**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. Cap. 2.
- STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering: principles and methodologies**. London: Academic Press, 1998.
- STEYNEY, J.-P.; GÉNOVÉSI, A.; HARMAND, J. Tools for Fault Detection and Diagnosis. In: DOCHAIN, D. **Automatic control of bioprocesses**. 2. ed. London: JOHN, 2008. Cap. 8.
- SUAREZ, C. G. **Otimização da produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, p. 165. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química).
- SUNDSTRÖM, H.; ENFORS, S. O. Software sensors for fermentation processes. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 31, n. 2, p. 145-152, 2008.
- SUNGRANT. Biorefinery Overview. **SunGrant Bioweb**: An online resource for bioenergy and bioproducts. Disponível em: <<http://bioweb.sungrant.org/Technical/Bioproduct>>. Acesso em: 02 de novembro de 2015.
- TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 69, n. 3, p. 330-338, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. California: Sinauer Associates, 2002.
- TAKAGI, M. et al. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 182-188, 2005.
- TALEBNIA, F. Bioethanol from lignocellulosic wastes: current status and future prospects. In: KARIMI, K. **Lignocellulose-based products**. Switzerland: Springer, v. 1, 2015. Cap. 5.
- TANKIEWICZ, M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M. Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography–flame-

ionization detector (GC–FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 117-123, 2013.

TENGE, C. Yeast. In: ESSLINGER, H. M. **Handbook of brewing: processes, technology, markets**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. Cap. 5.

THOMAS, D. S.; ROSE, A. H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. **Arch. Microbiol**, v. 122, p. 49-55, 1979.

VAN DE WATERBEEMD, B. et al. Improved Production Process for Native Outer Membrane Vesicle Vaccine against *Neisseria meningitidis*. **PLOS one**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2013.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 14, p. 391-418, 2006.

VERBELEN, P. J. et al. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 1, n. 82, p. 1143-1156, 2009.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. **Biorreaction engineering principles**. 3. ed. New York: Springer Science+Business, 2011.

WALKER, G. M. **Bioethanol: science and technology of fuel alcohol**. 1. ed. Scotland: Walker & Ventus Publishing ApS, 2010.

WATANABE, T. Introduction: potential of cellulosic ethanol. In: FARACO, V. **Lignocellulose conversion: enzymatic and microbial tools for bioethanol production**. Heidelberg: Springer, 2013. Cap. 1.

WIEBE, M. G. et al. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 140-154, 2008.

WINTER, G.; KRÖMER, J. O. Fluxomic - connecting 'omic analysis and phenotypes. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1901-1916, 2013.

WORLD BANK. World Bank Open Data, 2015. Disponível em: <data.worldbank.org>. Acesso em: 17 de Outubro de 2015.

YE, L. et al. Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. **Bioresource technology**, v. 132, p. 138-144, 2013.

YOU, K. M.; ROSENFEL, C.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1499-1503, 2003.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZENG, A.-P. et al. Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 1107-1114, 1994.

ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. Bioreaction techniques under microaerobic conditions: from molecular level to pilot plant reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 10, p. 2305-2314, 1996.

ZHANG, F.; RODRIGUEZ, S.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 775-783, 2011.

ZHANG, H. Software Sensors and Their Applications in Bioprocess. In: NICOLETTI, M. C.; JAIN, L. C. **Computational intelligence techniques for bioprocess modelling, supervision and control**. Berlin: Springer, v. 218, 2009. Cap. 2.

## ANEXO A – RESULTADOS OBTIDOS PELAS SIMULAÇÕES

TABELA 11 - Resultado dos estudos *in silico* realizados pela Dra. Cíntia Sargo, utilizando o modelo metabólico IND750 (DUARTE, HERRGÂRD e PALSSON, 2004). Análise da influência do fluxo de consumo de oxigênio nos fluxos de produção de biomassa, CO<sub>2</sub> e etanol (neste caso considerando um fluxo de glicose de 3 mmol.g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). \*Destaque para o fluxo denominado de ótimo de consumo de oxigênio para produção de etanol.

Simulação	Fluxos de Entrada (mmol g <sub>MS</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Fluxos de Resposta (mmol g <sub>MS</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			
	Fluxo de glicose	Fluxo de O <sub>2</sub>	Biomassa	Fluxo de CO <sub>2</sub>	Fluxo de Etanol	RQ
1	-3	-8	0,28	8,1	0	1,01
2	-3	-7,3	0,29	7,51	0,002	1,03
3	-3	-7	0,28	7,41	0,21	1,06
4	-3	-3	0,16	6,14	3,03	2,05
5	-3	-1	0,1	5,51	4,44	5,51
6	-3	-0,5	0,084	5,36	4,8	10,72
7	-3	-0,1	0,068	5,28	5,11	52,80
8	-3	-0,05	0,065	5,28	5,12	105,60
<b>*9</b>	<b>-3</b>	<b>-0,005</b>	<b>0,062</b>	<b>5,28</b>	<b>5,15</b>	1056,00
10	-3	-0,003	0,054	4,61	4,41	1536,67
11	-3	-0,0005	0,009	1,88	0,73	3760,00
12	-3	-0	0,0	1,45	0	∞

TABELA 12 – Produção de etanol ao adotar diferentes fluxos de consumo de oxigênio (considerando um fluxo de glicose  $3 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). \* Em destaque o fluxo de  $\text{O}_2$  que proporcionou uma produção de 90% em relação ao fluxo máximo de etanol.

Simulação	Fluxos de entrada ( $\text{mmol g}_{\text{MS}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )		Fluxo de EtOH ( $\text{mmol g}_{\text{MS}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	% EtOH em relação ao $\text{EtOH}_{\text{máx}}$
	Fluxo de glicose	Fluxo de $\text{O}_2$		
1	-3	-1	4,44	86,21
<b>*2</b>	<b>-3</b>	<b>-0,7</b>	<b>4,66</b>	<b>90,49</b>
3	-3	-0,5	4,8	93,20
4	-3	-0,1	5,11	99,22
5	-3	-0,05	5,12	99,42
6	-3	-0,005	5,15*	100,00

**APÊNDICE A – CORRELAÇÕES LINEARES ENTRE CONCENTRAÇÃO CELULAR E DENSIDADE ÓTICA**

FIGURA 52 - Relação linear concentração celular e DO para CMA

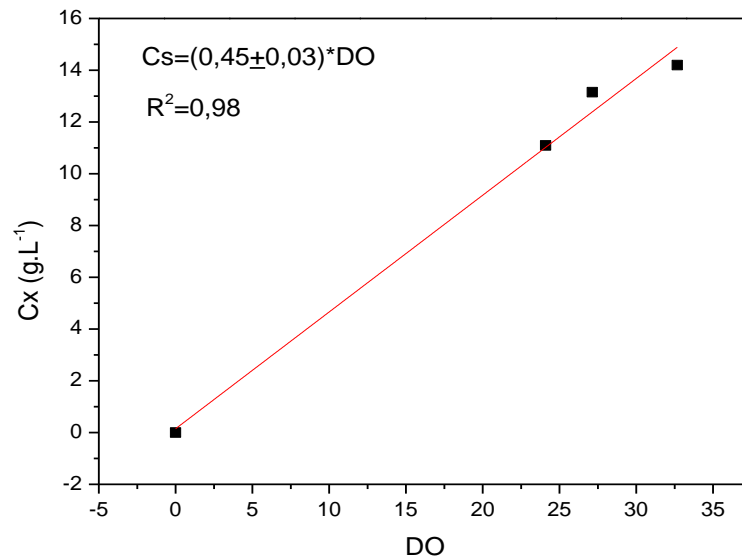


FIGURA 53 - Relação linear concentração celular e DO para CMF1

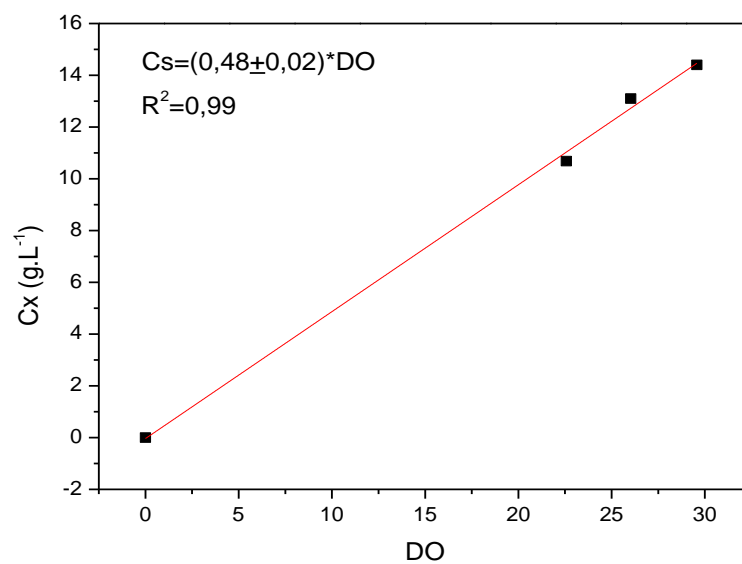


FIGURA 54 - Relação linear concentração celular e DO para CMF2

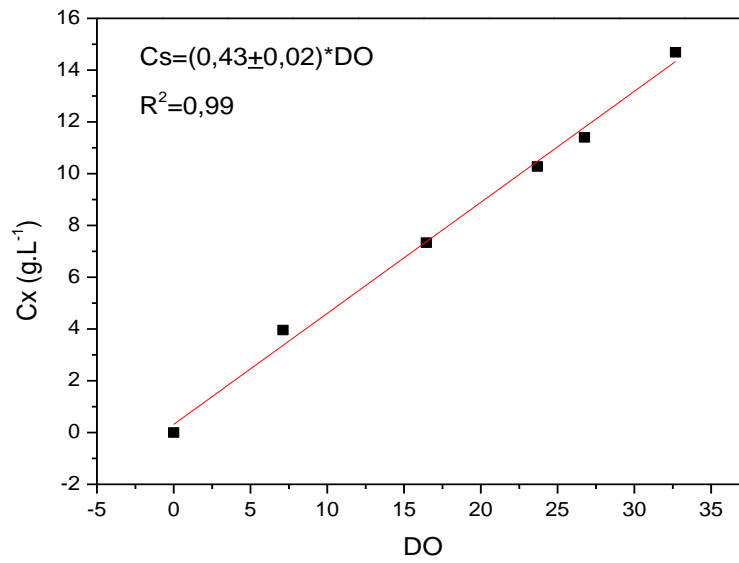


FIGURA 55 - Relação linear concentração celular e DO para FTU

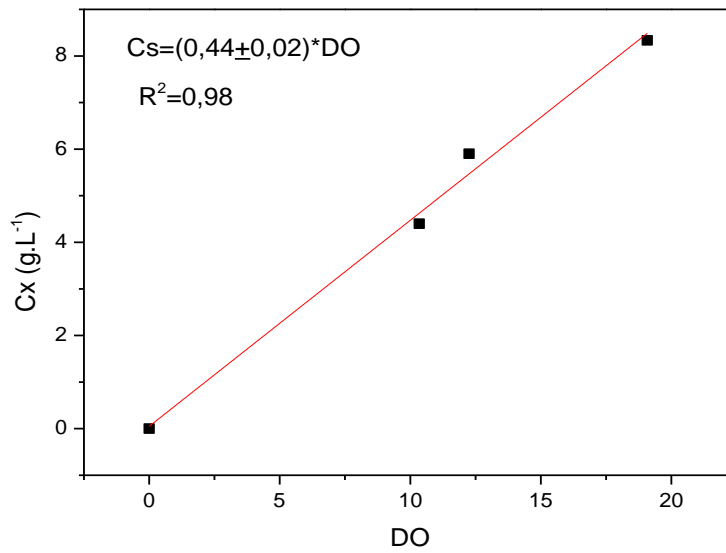




FIGURA 56 - Relação linear concentração celular e DO para FEA

