

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

Simulação e Controle do Processo de Produção de Levedura

Giann Braune Reis

SÃO CARLOS – SP
2009

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

Simulação e Controle do Processo de Produção de Levedura

Giann Braune Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

Orientador:
Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

SÃO CARLOS – SP
2009

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

R375sc

Reis, Giann Braune.

Simulação e controle do processo de produção de levedura / Giann Braune Reis. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Controle de processo. 2. Saccharomyces cerevisiae. 3. Fuzzy logic. 4. Automação. I. Título.

CDD: 660.2815 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **GIANN BRAUNE REIS** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE MARÇO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz
Orientador, PPG-EQ/UFSCar



Prof. Dr. Flavio Vasconcelos da Silva
FEQ/UNICAMP



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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iluminar este trabalho com alguns sinceros agradecimentos às pessoas que foram muito importantes para tornar este real. Cada um dos citados aqui, cada qual ao seu modo, marcou presença no meu dia a dia e fez com que pudesse obter mais esta conquista, portanto este trabalho dedico à todos vocês.

Antes de mais nada agradeço a Deus por toda glória alcançada e à minha família, papai Itamar, mamãe Eloisa, maninhas Kelly e Ellen, ao brother Allan, à pretinha querida Sandra, aos cunhados que amo de coração: Jean, Hector, Monique e Cris, tios, primos, avós, sem essa base toda estrutura ruiria, pessoas maravilhosas que deram toda a força necessária, sempre com muito amor, para continuar sempre em frente.

Um agradecimento especial ao Prof. Antonio por toda atenção dedicada na sua orientação deste trabalho e na minha formação acadêmica.

Agradeço também ao apoio financeiro oferecido pela CNPq, CAPES e FAPESP.

Gostaria também de agradecer aos grandes amigos de estrada: Léo, Cris, Lili, Nickeli, Dasci, Edson, Charles, Marcelo, Prof. Roberto, Silvaney, Alvaro, Clovis, Kaká, Ju, Tiago, Amadeus, à toda turma 2007/01: Ediane, Robinho, Nati, Aruana, Bruna, Renata, Danielle, Tati, Ana Maria, Ivana, Néstor, aos companheiros de pelada e de farra: Bettega, Lucas, Carioca, André, Romulo, Felicete, Marcos, Wellington, Eduardo, Tanabe, Romano, Douglas, Humberto, Willian, Marcelo, Tonho, Matheus, Vinicius e Lú.

Levo a lembrança de cada um de vocês comigo, é bom saber que passamos muitos momentos juntos e, que esses momentos fizeram toda a diferença nessa jornada.

Grande abraço a cada um de vocês.

Resumo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* encontra diversos empregos em bioprocessos. É amplamente empregada em processos anaeróbios para produção de bioetanol nas usinas brasileiras. Também encontra grande importância como levedura de panificação, onde o produto é a própria biomassa. Movido por esse interesse industrial o presente trabalho vem agregar conhecimento no aprimoramento de técnicas de controle aplicadas a bioprocessos tomando como estudo de caso o crescimento aeróbio desta levedura (processo de obtenção de biomassa).

Por meio deste trabalho se desenvolveu uma plataforma de supervisão para realizar a aquisição de dados e controle de processo de um biorreator de bancada. Como estudo de caso empregou-se cultivos do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* em condições aeróbias (com vistas a obtenção de biomassa).

Foi desenvolvido e avaliado um controlador *fuzzy* para controlar a vazão de alimentação de meio suplementar (glicose) ao biorreator tomando como variável de controle o quociente respiratório (RQ).

O sensor para a estimativa da concentração celular em tempo real foi avaliado e mostrou-se eficaz para aplicação, podendo fornecer informações para o algoritmo de controle.

Os dados experimentais obtidos foram empregados para validação de modelo da literatura. O resultado da simulação mostrou que o modelo descreveu satisfatoriamente o processo estudado.

Palavras-chave: Automação, Controle *fuzzy*, *Saccharomyces cerevisiae*, Bioprocessos.

Abstract

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be useful in several ways in bioprocesses. It is widely used in anaerobic processes for production of bioethanol at Brazilians plants. It is also of great importance as baker's yeast, where the product is the biomass. Moved by the industrial interest this work will aggregate knowledge in the improvement of techniques of control applied to bioprocesses, taking as a case study of aerobic yeast growth (process of obtaining biomass).

This study developed a supervisory platform to perform the data acquisition and process control of a laboratory scale bioreactor. As case study experiments with *Saccharomyces Cerevisiae* were performed under aerobic conditions (looking for biomass obtainment).

A fuzzy controller was developed and evaluated to control the input flow of supplemental medium (glucose) in bioreactor. The control variable was respiratory quotient (RQ).

A sensor for the estimation of cell concentration in real time was evaluated and it shown to be effective for the application. It could provide information to the control algorithm.

The experimental data obtained were used in the validation of a literature model. The result of simulation showed that the model satisfactorily described the studied process.

Key Words: Automation, Fuzzy logic, *Saccharomyces cerevisiae*, Bioprocess

Lista de Figuras

FIGURA 2.1. Glicólise: a glicose (molécula de seis carbonos) é transformada em ácido pirúvico (molécula de três carbonos). Fonte: Pelczar <i>et al.</i> , 1996.	12
FIGURA 2.2. Três possíveis destinos para o ácido pirúvico formado ao final da glicólise (adaptado de LEHNINGER <i>et al.</i> , 2002)	13
FIGURA 2.3. Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Cítrico	14
FIGURA 2.4. Restrição ou estrangulamento respiratório	18
FIGURA 2.5. Esquema simplificado do controle de uma planta	23
FIGURA 2.6. Controle de nível tipo liga – desliga de um tanque	25
FIGURA 2.7. Diagrama de blocos de um controlador do tipo liga-desliga (a), e liga-desliga com zona morta (b)	25
FIGURA 2.8. Comportamento dinâmico de um sistema com controlador liga-desliga com zona morta	25
FIGURA 2.9. Diagrama de blocos de um controle proporcional	26
FIGURA 2.10. Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional	26
FIGURA 2.11. Diagrama de blocos de um sistema com controle integral	27
FIGURA 2.12. Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional-integral (a) e diagrama simplificado (b)	29
FIGURA 2.13. Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional-derivativo	29
FIGURA 2.14. Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional-integral-derivativo	29
FIGURA 2.15. Função de pertinência triangular	32
FIGURA 2.16. Função de pertinência trapezoidal	33
FIGURA 2.17. Função de pertinência Gaussiana	34
FIGURA 2.18. Função de pertinência gaussiana	34
FIGURA 2.19. Exemplo de partição <i>fuzzy</i> de uma variável lingüística (Velocidade)	35
FIGURA 2.20. Estrutura básica de um controlador <i>fuzzy</i> (adaptada de GOMIDE e GUDWIN, 1994)	38
FIGURA 2.21. Perspectivas para a construção de modelos cinéticos do cultivo de microrganismos	42
FIGURA 3.1. Aparato experimental utilizado para os experimentos	50
FIGURA 3.2. Incremento da permissividade em função da massa celular, adaptado de Markx and Davey	51
FIGURA 3.3. Volume de controle utilizado para o balanço gasoso	51
FIGURA 3.4. Interface de supervisão e controle disponível ao operador	55
FIGURA 3.5. Tela de escolha e configuração para os controles disponíveis	56
FIGURA 3.6. Tela do editor <i>FIS</i> onde são definidas as variáveis lingüísticas e saídas do controlador <i>fuzzy</i> .	57
FIGURA 3.7. Visualizador de superfície que representa o conhecimento especialista humano em um mapeamento computacional	57

FIGURA 4.1. Comportamento do quociente respiratório (A) e da bomba de alimentação de meio suplementar (B) ao longo do experimento Exp1 (batelada alimentada)	60
FIGURA 4.2. Comportamento do quociente respiratório (A) e da bomba de alimentação de meio suplementar (B) ao longo do experimento Exp2 (batelada alimentada)	62
FIGURA 4.3. Comportamento do quociente respiratório (A) e da bomba de alimentação de meio suplementar (B) ao longo do experimento Exp3 (batelada alimentada)	63
FIGURA 4.4. Concentração de células, glicose e etanol medidas durante o experimento 4 (Exp4)	65
FIGURA 4.5. Variação da permissividade do meio de cultura ao longo do experimento 4 (Exp4)	65
FIGURA 4.6. Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) <i>versus</i> permissividade obtida no equipamento (FOGALE) no experimento 4 (Exp4)	66
FIGURA 4.7. Concentração celular, de glicose e etanol ao longo do experimento 5 (Exp5), cultivo realizado no modo batelada	67
FIGURA 4.8. Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) <i>versus</i> permissividade obtida no equipamento (FOGALE) no experimento 5 (Exp5)	67
FIGURA 4.9. Perfil de concentrações obtidas no experimento 6 (Exp6)	68
FIGURA 4.10. Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) <i>versus</i> permissividade obtida no analisador de células no experimento 6 (Exp6)	69
FIGURA 4.11. Perfil de concentrações obtidas no experimento 7 (Exp7)	70
FIGURA 4.12. Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) <i>versus</i> permissividade obtida no analisador de células no experimento 7 (Exp7)	70
4.13. Valores experimentais da concentração de células, glicose e etanol ao longo do experimento 8 (Exp8)	71
FIGURA 4.14. Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) <i>versus</i> permissividade obtida pelo analisador de células no experimento 8 (Exp8)	72
FIGURA 4.15. Valores experimentais da concentração de células, glicose e etanol ao longo do experimento 9 (Exp9)	73
FIGURA 4.16. Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) <i>versus</i> permissividade obtida pelo analisador de células no experimento 9 (Exp9)	73
FIGURA 4.17. Valores simulados para a concentração celular empregando o modelo proposto por Hall <i>et al.</i> (1978), para os dados experimentais do cultivo 6 (Exp6)	75

FIGURA 4.18. Valores simulados para a concentração de etanol empregando o modelo proposto por Hall <i>et al.</i> (1978), para os dados experimentais do cultivo 6 (Exp6)	75
FIGURA 4.19. Valores simulados para a concentração de glicose empregando o modelo proposto por Hall <i>et al.</i> (1978), para os dados experimentais do cultivo 6 (Exp6)	76
FIGURA 4.20. Valor do quociente respiratório (RQ) simulado pelo modelo de Hall <i>et al.</i> (1978); os pontos representam os valores calculados a partir de medidas do balanço gasoso. Dados referentes ao experimento 6 (Exp6)	76
FIGURA 4.21. Valores simulados para a concentração celular empregando o modelo proposto por Hall <i>et al.</i> (1978), para os dados experimentais do cultivo 7 (Exp7)	77
FIGURA 4.22. Valores simulados para a concentração de etanol empregando o modelo proposto por Hall <i>et al.</i> (1978), para os dados experimentais do cultivo 7 (Exp7)	77
FIGURA 4.23. Valores simulados para a concentração de glicose empregando o modelo proposto por Hall <i>et al.</i> (1978), para os dados experimentais do cultivo 7 (Exp7)	78
FIGURA 4.24. Valor do quociente respiratório (RQ) simulado pelo modelo de Hall <i>et al.</i> (1978); os pontos representam os valores calculados a partir de medidas do balanço gasoso. Dados referentes ao experimento 7 (Exp7)	78
FIGURA 4.25. MatLab Script Node dentro do ambiente de programação LabVIEW	80
FIGURA 4.26. Função de pertinência para a variável de entrada derivada da fração molar de CO ₂	81
FIGURA 4.27. função de pertinência para a variável de entrada RQ	81
FIGURA 4.28. Variável manipulada (vazão da bomba de meio suplementar) dada em mA.	81
FIGURA 4.29. função de pertinência para a variável erro	82
FIGURA 4.30. Função de pertinência para a variável diferença entre os fatores de crescimento celular real e o estimado	82
FIGURA 4.31. Desempenho da bomba frente ao comportamento do RQ para o experimento Exp4	83
FIGURA 4.32. Desempenho vazão da bomba suplementar e comportamento do RQ para o experimento Exp8	84
FIGURA 4.33. Valores experimentais do quociente respiratório (RQ) e da vazão da bomba de meio suplementar durante o experimento 9 (Exp9).	85

Lista de Tabelas

Tabela 4.1. Condições de cultivo utilizadas nos experimentos.	59
Tabela 4.2. Ajuste dos parâmetros do controlador P.	61
Tabela 4.3 – Valores ajustados para os parâmetros do modelo proposto por Hall <i>et al.</i> ,1978.	74

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURA	iii
LISTA DE TABELA	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Produção de Leveduras de Panificação	5
2.2. Aspectos Biológicos da Levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	6
2.3. Aspectos Metabólicos da Levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	8
2.3.1. Generalidades do Metabolismo	8
2.3.2. Questões Metabólicas no Crescimento da Levedura de Panificação	8
2.3.3. Fermentação	10
2.3.4. Respiração Celular	10
2.3.5. Glicólise – Via de Embden – Meyerhof – Parnas (EMP)	11
2.3.6. Metabolismo Fermentativo e Respiração Celular	15
2.3.7. Efeito Diáxico	15
2.3.8. Efeito Pasteur	16
2.3.9. Efeito Crabtree	16
2.3.10. Teoria da Capacidade respiratória Limitada	17
2.3.11. Repressão enzimática ou Capacidade respiratória Limitada	18
2.4. Otimização e Controle de Processos Fermentativos	19
2.5. Alguns Tipos de Controladores	23
2.5.1. Controle On-off	23
2.5.2. Controladores Proporcionais (P)	26
2.5.3. Controladores Integrais (I)	27
2.5.4. Controlador Proporcional-Integral (PI)	27
2.5.5. Controlador Proporcional-Derivativo (PD)	28
2.5.6. Controlador Proporcional-Integral-Derivativo (PID)	29
2.6. Sistemas Inteligentes	30
2.6.1. Fundamentos <i>Fuzzy</i>	30
2.6.2. Representação <i>Fuzzy</i> de Conhecimento	31
2.6.3. Funções de Pertinência	32
2.6.3.1. Funções de Pertinência Triangular	32
2.6.3.2. Funções de Pertinência Trapezoidal	33
2.6.3.3. Funções de Pertinência Gaussiana	33
2.6.3.4. Funções de Pertinência Sino	34
2.6.4. Variáveis Linguísticas	35
2.6.5. Sistemas de Controle e Inferência <i>Fuzzy</i>	36
2.6.6. Aplicações da Lógica <i>Fuzzy</i> em Bioprocessos	39
2.7. Modelagem Matemática	41
2.7.1. Modelo Proposto Por Hall <i>et al.</i> (1978)	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Microorganismo	47
3.2. Meios de Cultura	47
3.3. Métodos de Análise	48
3.4. Biorreator e Sistema de Aquisição de dados	49

3.5. Analisador de Concentração Celular	50
3.6. Método do Balanço Gasoso	51
3.7. Desenvolvimento da Interface de Supervisão em Plataforma LabVIEW	53
3.7.1 Ambiente de Programação LabVIEW	53
3.7.2 Instrumentos Virtuais	54
3.7.3 Construção do Painel de Controle	54
3.8. Implementação do Algoritmo <i>Fuzzy</i>	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1. Ajuste do Analisador de Células	63
4.2. Avaliação do Modelo Matemático Proposto por Hall <i>et al.</i>	74
4.3. Cultivos Utilizando Controlador <i>Fuzzy</i>	79
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem tido nos últimos anos um grande e rápido desenvolvimento com o aparecimento de novos processos industriais que utilizam microrganismos selvagens ou modificados geneticamente. Ao mesmo tempo, a grande oferta de recursos computacionais, cada vez mais baratos e velozes, está alterando radicalmente a prática das engenharias. Sua aplicação vem possibilitando desde o melhor entendimento da estrutura de biomoléculas até a automação e traz como consequência o incremento da produtividade dos bioprocessos.

No ano de 1994, a Federação Européia de Biotecnologia propôs a definição de Biotecnologia como sendo a integração das Ciências Naturais e das Ciências da Engenharia com vistas à aplicação industrial de microrganismos, células, partes destas e análogos moleculares para obtenção de produtos e serviços.

Genericamente os processos biotecnológicos podem se dividir em duas categorias: processos com reações de crescimento microbiano (reações microbiológicas) e processos com reações catalisadas por enzimas (reações bioquímicas) visando à produção de uma ampla variedade de produtos com diferentes interesses e valores comerciais. Esses produtos encontram ampla aplicação em setores tais como: agricultura, alimentos, química fina, farmacêutico, energia e meio ambiente. Cita-se, como exemplo, a síntese de compostos químicos intracelulares (proteínas) ou extracelulares (antibióticos, álcool), a produção de biomassa (levedura de panificação), de alimentos (bebidas), de energia (biogás, bioetanol) ou ainda a despoluição biológica de efluentes (degradação de matéria orgânica e outros compostos pela ação de microrganismos).

A utilização de computadores para controle de bioprocessos acelerou-se a partir da década de 90. O advento de microprocessadores velozes e de baixo custo causou enorme impacto nas aplicações em tempo real em biorreatores. Trabalhos integrados entre microbiologistas, bioquímicos, técnicos de bioprocessamento, engenheiros de controle, engenheiros químicos e matemáticos vêm permitindo viabilizar a implementação, em processos reais, de modernos algoritmos para identificação de tendências, inferência de variáveis (*soft sensors*), estimativa de parâmetros e controle dos processos biológicos.

A automação de bioprocessos passou a ser uma imposição do ambiente altamente competitivo em que se inserem os processos produtivos baseados em biotecnologia. Incluindo o monitoramento do processo, identificação de falhas, controle

por computador e otimização, de preferência em tempo real, a automação de bioprocessos é um campo de pesquisa em plena expansão. Os investimentos em instrumentação e sistemas de aquisição de dados (SAQ) em novas instalações piloto de desenvolvimento de produtos e processos duplicaram na última década (FERREIRA e FEYO DE AZEVEDO, 2006). O desenvolvimento extraordinário da tecnologia digital torna possível, tanto na indústria quanto no laboratório, a instalação de novos acessórios de aquisição de dados os quais permitem, juntamente com os SAQ, o acompanhamento da evolução do processo em tempo real, bem como tratamento e análise simultâneos dos mesmos. A maioria das ferramentas e técnicas de controle de processos comerciais empregadas nos processos químicos industriais pode ser aplicada nos bioprocessos (ALFORD, 2006).

A vantagem de operar um processo automatizado reside no fato de tornar possível, em tempo real, auferir informações sobre o estado metabólico do cultivo, detectar problemas de desvios de parâmetros do processo e permitir ações imediatas que busquem a correção de falhas durante o processo. Em laboratório, tem-se a possibilidade de realizar estudos no desenvolvimento e validação de algoritmos para o controle do processo empregando diferentes abordagens. Nesta área a pesquisa vem experimentando contínuo crescimento. RANI e RAO (1999) apresentam uma extensa revisão da literatura sobre várias técnicas de controle de biorreatores. ALFORD (2006) descreve sobre a evolução da indústria de bioprocessos desde a década de setenta, e aborda aspectos relativos às várias etapas dos bioprocessos (pré-inóculo, inóculo, produção e *dowstream*), medidas em bioprocessos, técnicas de controle, otimização de processo e outras funcionalidades dos sistemas de automação.

A partir do ano de 2003 as pesquisas nesta área ganharam novo fôlego. O fato que motivou esta retomada foi a publicação do PAT (*Process Analytical Initiative*, PAT 2004) pela agência de regulamentação americana, o FDA (*Food and Drug Administration*). O FDA define o PAT como sendo um mecanismo para projeto, análise e controle do processo de produção farmacêutico através de medidas de parâmetros críticos do processo e atributos de qualidade. Em outras palavras, agência regulatória americana passou a facilitar, a partir desta data, a aprovação de novos processos que utilizassem ferramentas tais como *soft sensors*, detecção de falhas por PCA (*Principal Components Analysis*), Análise de Grupos (*cluster analysis*), etc. Em publicações recentes (GANGULY e VOGEL, 2006; KAISER et al., 2007) empregam o PAT em estudos de monitoramento e controle de bioprocessos.

O caráter multidisciplinar da pesquisa neste campo foi encarado como um estímulo ao trabalho integrado entre duas áreas de pesquisa: a Engenharia Bioquímica e a Simulação e Controle de Processos. O tema, objeto de estudo deste mestrado, insere-se, portanto, em linha de pesquisa articulada entre os grupos de simulação e controle de bioprocessos e engenharia das biorreações do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

No DEQ/UFSCar já foram realizados trabalhos envolvendo o processo de produção de levedura de panificação. CAMPOS (2003) desenvolveu protocolo de comunicação entre o sistema supervisor e plataforma de comunicação (empregando linguagem orientada a objeto) para troca de informações em tempo real. Empregando rotina para o cálculo do quociente respiratório (RQ) foi possível avaliar algoritmo para controle da vazão de bomba de fornecimento de meio suplementar em cultivos em batelada alimentada. SILVA (2004) avaliou a utilização de redes neurais com o objetivo de inferir a concentração celular em cultivos da levedura de panificação. OLIVEIRA (2006) realizou um levantamento bibliográfico acerca de modelos e técnicas de controle aplicados ao processo de produção da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com a autora, com o rápido desenvolvimento das técnicas de controle, automação e otimização de processos, a produção de levedura incorpora novas tecnologias, apesar da dificuldade trazida pelo fato de que o sistema em questão envolve sistemas vivos, onde há um número alto de reações bioquímicas e fenômenos de transporte envolvidos. No trabalho de Oliveira, foram realizados experimentos em biorreator tipo tanque agitado e aerado com sistema de aquisição de dados, o que permitiu o cálculo em tempo real de dados do processo. Com base nestes experimentos, simulações empregando modelos da literatura foram realizadas, na busca de modelo que melhor descrevesse o processo para que técnicas de controle fossem aplicadas ao processo. Portanto, do ponto de vista da tecnologia de bioprocessos, torna-se importante a continuidade dos estudos experimentais iniciados.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* encontra diversos empregos em bioprocessos. É amplamente empregada em processos anaeróbios para produção de bioetanol nas usinas brasileiras. Também encontra grande importância como levedura de panificação, onde o produto é a própria biomassa. Movido por esse interesse industrial o presente trabalho vem agregar conhecimento no aprimoramento de técnicas de controle aplicadas a bioprocessos tomando como estudo de caso o crescimento aeróbio desta levedura (processo de obtenção de biomassa).

1.1. Objetivo

Este trabalho teve por objetivo desenvolver e implementar interface de supervisão e controle de processo e aplicá-la em cultivos da levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) realizados em biorreator convencional de bancada operado nos modos batelada e batelada alimentada. Nesta plataforma foi desenvolvida a comunicação com o programa MatLab de forma a possibilitar o estudo de estratégia de controle com vista a maximizar a produção de biomassa.

A estratégia de controle proposta baseia-se em um algoritmo *fuzzy*, programado em MatLab (*Tool Box FIS, Fuzzy Inference System*). As funções de pertinência do algoritmo foram ajustadas de forma empírica tomando por base conhecimentos a priori do processo. O algoritmo *fuzzy* foi incorporado ao programa de supervisão, programado em LabVIEW. Este foi avaliado em cultivos operados no modo batelada alimentada. O algoritmo *fuzzy* foi avaliado empregando diferentes variáveis do processo como informação de entrada. A atuação no processo se deu por meio do controle da vazão da bomba de meio suplementar (substrato adicionado ao meio de cultivo durante o processo).

As principais variáveis monitoradas pelo sistema de aquisição de dados foram: pH, oxigênio dissolvido, temperatura, vazão de ar, fração molar de oxigênio e dióxido de carbono nos gases de exaustão. Com base nas variáveis adquiridas, o sistema realiza o cálculo da velocidade de consumo de oxigênio (n_{O_2}), velocidade de produção de dióxido de carbono (n_{CO_2}) e do quociente respiratório (RQ).

Foi também realizada a calibração de sensor capacitivo com o objetivo de obter medidas em tempo real da concentração celular.

Os dados obtidos nos experimentos foram utilizados para avaliar modelo proposto na literatura para simular o processo de produção de levedura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item é apresentada uma revisão da literatura no que se refere a aspectos do metabolismo da levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), a descrição do processo, instrumentação e estratégias de controle aplicadas ao processo.

2.1. Produção de leveduras de panificação

O fermento de padaria, também conhecido como fermento fresco, é utilizado nas indústrias de panificação para fazer levedar a massa, é composto essencialmente de células vivas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O pão é um alimento democrático visto que a maioria das pessoas ao redor do mundo o conhece. A sua história está ligada diretamente a do Homem, sendo que a profissão de padeiro é uma das mais antigas e importantes do mundo. Ao que tudo indica os primeiros pães foram produzidos a cerca de 10 mil anos, na antiga Mesopotâmia, onde a farinha era usada somente em sopas e mingaus. Com o tempo foram acrescentados mel, ovos e carnes à mistura, formando “bolos” que antecederam o pão. Eles eram cozidos sobre pedras quentes ou debaixo de cinzas. Os egípcios foram os primeiros a usarem fornos e acrescentar líquido fermentado para deixar a massa mais leve e macia. O pão era o alimento básico no Egito e servia para pagar salário: um dia de trabalho valia três pães e duas jarras de cerveja. Na Roma antiga, o pão era feito, inicialmente, pelas mulheres em casa. Depois surgiram as padarias públicas (<http://www.fleischmann.com.br/padaria>).

Historicamente a cultura inicial para pães fermentados consistia na biota natural presente na massa do padeiro (pedaço de massa contendo uma porção do fermento guardada para ser utilizada na próxima fermentação). Essa massa normalmente continha uma mistura de leveduras e bactérias acidoláticas. A acidez é causada por ácidos produzidos por essas bactérias, sendo a levedura responsável pela ação fermentativa (JAY, 2005.)

Gradualmente o fermento do pão foi sendo substituído pelo fermento de destilarias, que apresentava maior capacidade fermentativa e proporcionava melhor sabor ao produto. O processo de fabricação do fermento (biomassa) foi sendo aperfeiçoado ao longo do século XIX, tendo ocorrido vários avanços tecnológicos, destacando-se entre eles dois principais: a introdução da aeração no processo e a alimentação gradual da fonte de carbono e energia ao reator aerado (conhecido como processo em batelada alimentada).

Com a operação do processo na forma de batelada alimentada, logo após a segunda Guerra Mundial, observou-se um maior rendimento em massa celular comparado com o processo em batelada (KARAKUZU *et al.*, 2006).

A forma de operação do processo em modo batelada alimentada foi definida como uma técnica usada em processos biotecnológicos na qual um ou mais nutrientes são supridos ao biorreator durante o cultivo até o final do processo; nada é removido do reator. A alimentação de nutrientes no meio é feita de forma programada. Com a introdução dessa técnica os processos de produção de levedura de panificação e de etanol puderam ser finalmente separados (VICENZI, 2009).

Hoje a produção de leveduras de panificação, em larga escala, é um processo realizado em batelada alimentada baseada principalmente na utilização de melaço. Nos países de clima tropical como o Brasil é utilizado o melaço de cana-de-açúcar. Ao terminar o cultivo é feito o tratamento do caldo em equipamentos de separação de forma a concentrar o creme de levedura por remoção de água. Para tanto são utilizados filtros e centrífugas. O creme concentrado é direcionado para um secador e a massa obtida é extrudada e embalada em blocos, os quais são armazenados a frio. O fermento está pronto para ser comercializado (VICENZI, 2009).

O termo fermentação é empregado neste trabalho para expressar a degradação anaeróbia da glicose ou de outro nutriente orgânico em produto (por exemplo, etanol) para obter energia conservada na forma de ATP.

2.2. Aspectos biológicos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares, ao contrário dos mofos, que são multicelulares. Contudo, esta não é uma definição precisa. Muitos fungos, na verdade considerados leveduras, podem produzir diferentes graus de micélio. As leveduras são diferenciadas das bactérias pela maior dimensão da sua célula, pelo formato oval e por possuírem um núcleo celular definido, leveduras podem ter o formato alongado, elíptico ou esférico. As células de leveduras típicas variam entre 5 e 8 μm de diâmetro, sendo algumas ainda maiores. Culturas ditas “velhas” de leveduras costumam possuir células menores. A maior parte das leveduras importantes em alimentos se multiplica por fissão ou brotamento (JAY, 2005).

Usualmente para os engenheiros químicos o crescimento microbiano é definido como o aumento de material celular expresso em termos de massa celular ou em termos do número de células. A reprodução da *S. cerevisiae* ocorre com a formação de um

broto (também chamado de gêmula). Quando este broto cresce até determinado tamanho ele se separa da célula mãe originando uma nova célula. Ocorre duplicação de células aproximadamente a cada três horas. Nesta velocidade, tendo como origem uma única célula, após três dias de reprodução, chega-se a quase 17 bilhões de células. Esta forma de reprodução é chamada de brotamento, gemulação ou cissiparidade. Em condições adversas a reprodução pode ocorrer de forma sexuada, através da esporulação, e ainda por fissão (POSTEN e COONEY, 1991).

O crescimento dos microrganismos é função de diversas variáveis da natureza física do meio (temperatura, pH, viscosidade) bem como da natureza química do meio (nutrientes - fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono e outros). A interação entre meio de cultura e os microrganismos pode ser influenciada pelo tempo de alimentação do meio no reator e pela remoção do meio de cultura. Diferentes modos de operação podem ser obtidos com diferentes vantagens em pesquisa e nos processos produtivos, por exemplo, a operação em batelada, batelada alimentada e contínua. As medidas de massa celular podem ser feitas por contagem direta com auxílio de microscópio, obtendo o número de células viáveis (e outras informações como índice de brotamento, por exemplo) ou através de métodos como gravimétrico (massa seca), turbidez, análise por imagem, etc (POSTEN e COONEY, 1991).

A fabricação de insumos via rota fermentativa, utilizando-se das leveduras, é comum desde os tempos mais remotos. Os microrganismos são cultivados em destilarias para produção de etanol (por exemplo, álcool combustível) a partir do açúcar da cana. São também cultivadas a partir do melaço da cana-de-açúcar sendo o produto a própria célula (biomassa). Assim, são de extrema importância para a produção de álcool (álcool combustível e bebidas alcoólicas), além de outros produtos de grande interesse industrial para a saúde e alimentação animal (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Levedura>).

O emprego de leveduras na alimentação animal aumenta a resistência a infecções, pelo fato de possuírem componentes que aumentam a resposta imunológica. As leveduras também têm sido utilizadas pelo seu alto conteúdo de nutrientes facilmente disponíveis e de alto valor nutricional, sendo um excelente componente alimentar para todos os animais jovens. Existe ainda na levedura o componente de função anti-stress aliviando o stress natural das operações de: desmame, vacinação, transporte etc. muito importantes para qualquer tipo de criação (<http://www.glucosinternacional.com/levedura/levedura.php>).

2.3. Aspectos Metabólicos da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1. Generalidades do metabolismo

No cultivo de células microbianas, animais e vegetais em laboratório, tais como as leveduras, é necessário, para se conhecer suas características/propriedades, determinar seu crescimento, bem como monitorar suas conversões. Uma variedade de nutrientes é utilizada para os fins acima referidos, incluindo-se fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, vitaminas e sais minerais (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Após procedimento de inoculação, a célula desenvolve seu metabolismo, a fim de produzir energia para suportar suas reações biossintéticas e de manutenção energética. As moléculas-combustíveis (carboidratos, lipídios, proteínas) utilizadas pela célula contêm elevado nível de energia química, devido ao seu alto grau de ordem estrutural, apresentando, relativamente, baixa entropia. Durante o catabolismo, essas substâncias são degradadas a moléculas menores, como dióxido de carbono, água, alcoóis, etc. Como resultado dessa transformação, a molécula-combustível sofre uma perda do seu conteúdo de energia livre (forma de energia capaz de realizar trabalho a temperatura e pressão constantes). A energia livre liberada durante as reações do catabolismo, e por isso chamadas de exoergônicas, é conservada na forma de energia química nas ligações covalentes de certos compostos, como nas moléculas de adenosina tri-fosfato, ATP (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Os processos biossintéticos (anabolismo), transporte ativo através da membrana e mobilidade celular envolvem reações endoergônicas (carentes de energia). As células têm suas necessidades atendidas através da energia produzida durante o catabolismo (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

2.3.2. Questões Metabólicas no Crescimento da Levedura de Panificação

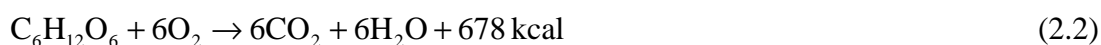
A levedura *Saccharomyces cerevisiae* cresce em glicose segundo três importantes vias metabólicas, podendo, contudo ocorrer outras vias dependendo das condições do meio de cultura.

Na presença de altas concentrações de glicose (ou na ausência de oxigênio) ocorre a chamada fermentação da glicose ou crescimento fermentativo com produção de etanol e dióxido de carbono. Esta etapa é relativamente pouco eficiente, apresentando um rendimento energético de aproximadamente duas moléculas de ATP (adenosina tri-

fosfato) por molécula de glicose (LIEVENSE, 1984 apud FERREIRA, 1995). A conversão glicose a etanol é descrita pela equação (2.1):



A oxidação da glicose é predominante em culturas aeróbias para concentrações de baixas de glicose. É uma via energética mais eficiente que a anterior, apresentando rendimento energético de 38 moléculas de ATP por molécula de glicose oxidada. Esta via oxidativa também conhecida como crescimento respiratório, pode ser representada pela equação (2.2) (LIEVENSE, 1984 apud FERREIRA, 1995):



O etanol formado pela via fermentativa é consumido por via oxidativa, como substrato, após a exaustão da glicose.

Para concentrações de glicose superiores ao valor crítico (esse valor pode variar dependendo da cepa) a via respiratória e a fermentativa podem ocorrer paralelamente, caracterizando neste caso um regime respiro-fermentativo. No interior da célula a glicose é metabolizada. Os organismos liberam e armazenam energia de moléculas orgânicas por meio de uma série de reações controladas, ao invés de ocorrer uma única liberação de energia. Para extrair energia de compostos orgânicos e armazenar na forma química, os organismos passam elétrons de um composto a outro por meio de uma série de reações de oxidação e redução (LIDÉN, 1993).

Uma seqüência de reações químicas catalisadas enzimaticamente, ocorrendo em uma célula é chamada de via metabólica. O catabolismo dos carboidratos (especialmente a glicose), quebra da molécula orgânica para produzir energia é, portanto, de grande importância para a compreensão do metabolismo celular (TORTORA *et al.*, 2005).

Para uma melhor compreensão do metabolismo de consumo de glicose pelas leveduras de panificação, segue no texto uma revisão dos caminhos metabólicos possíveis de consumo de glicose: fermentação (meio anaeróbio) e respiração celular (meio aeróbio). Além disso, ao se descrever o metabolismo da glicose em um meio contendo leveduras, são mencionados freqüentemente dois efeitos de regulação

metabólica chamados: efeito Pasteur e efeito Crabtree, também denominado na literatura de efeito glicose (embora este termo não seja muito usual).

Estes efeitos nem sempre são muito bem explicados na literatura e algumas vezes os significados deles variam entre autores diferentes. Uma discussão mais aprofundada sobre estes dois efeitos pode ser encontrada em LIDÉN (1993).

2.3.3. Fermentação

A fermentação compreende um conjunto de reações controladas por enzimas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, liberando energia. Como ponto de partida para a fermentação a glicose é uma das substâncias mais empregadas, mas proteínas e gorduras, por exemplo, podem servir também como combustível energético. Nas fermentações os produtos da degradação ainda são capazes de liberar energia. Para cada molécula de glicose degradada há liberação de dois ATP's (adenosina tri-fosfato). Sabe-se, hoje, que a glicólise ocorre em praticamente todos os seres vivos, o que sugere que a fermentação seja o primeiro mecanismo eficiente de produção de energia das células vivas. Embora a maioria dos seres vivos utilize a respiração como meio de obtenção de energia, as reações básicas da glicólise estão acopladas ao processo respiratório (AMABIS e MARTHO, 1996).

2.3.4. Respiração celular

A respiração aeróbia é uma etapa essencial no processo de degradação das moléculas orgânicas, porém reduzindo a molécula orgânica inicial a produtos que praticamente não têm mais energia a liberar. Em termos energéticos a respiração aeróbia é muito mais eficiente que a fermentação.

Para cada molécula de glicose degradada há liberação de 38 moléculas de ATP, uma quantidade, portanto, dezenove vezes maior que a liberada na fermentação.

A respiração aeróbia é um processo muito mais complexo que a fermentação. A degradação da glicose na respiração celular ocorre em três etapas fundamentais: glicólise, ciclo de Krebs, cadeia respiratória.

Existem dois tipos de respiração, dependendo se um organismo é aeróbio ou anaeróbio. Na respiração aeróbia o aceptor final de elétrons é o oxigênio. Na respiração anaeróbia o aceptor final de elétrons é uma molécula inorgânica que não o oxigênio molecular ou raramente uma molécula orgânica (TORTORA *et al.*, 2005; PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

2.3.5. Glicólise - Via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

A glicólise é a via de degradação mais comum entre os organismos quimioheterotróficos (PELCZAR *et al.*, 1996). Dentro da célula inicia-se o processo com a ativação da glicose, que recebe em reações sucessivas, dois fosfatos energéticos, fornecidos por duas moléculas de ATP, que se transformam em ADP. Esta oxidação da glicose é geralmente a primeira etapa no catabolismo dos carboidratos. A palavra glicólise significa quebra do açúcar e é exatamente o que ocorre. As enzimas de glicólise quebram a molécula da glicose. A glicose se transforma na molécula de frutose 1,6-difosfato que em seguida é quebrada em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. Os gliceraldeídos 1,3-difosfato são formados pela adição de mais um fosfato, o que é viável pela sua baixa energia. Os quatro fosfatos energéticos são, em seguida, transferidos a quatro moléculas de ADP, produzindo quatro moléculas de ATP (PELCZAR *et al.*, 1996; TORTORA *et al.*, 2005), Figura 2.1.

Ao final destas reações cada gliceraldeído se transforma em ácido pirúvico. Em resumo, na etapa de glicólise, uma molécula de glicose é degradada formando duas moléculas de ácido pirúvico, com rendimento líquido energético de dois ATP's. Neste processo são liberados quatro hidrogênios, que se combinam dois a dois com o receptor de hidrogênios NAD. Ao receber hidrogênios, cada molécula de NAD se transforma em NADH₂ e a energia liberada é suficiente para a formação dos dois ATP's (PELCZAR *et al.*, 1996).

A maior parte da glicose é convertida então a piruvato em um processo de vários estágios catalisado por enzimas: a via metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) algumas vezes também chamada de via hexose difosfato ou simplesmente de glicólise (TORTORA *et al.*, 2005).

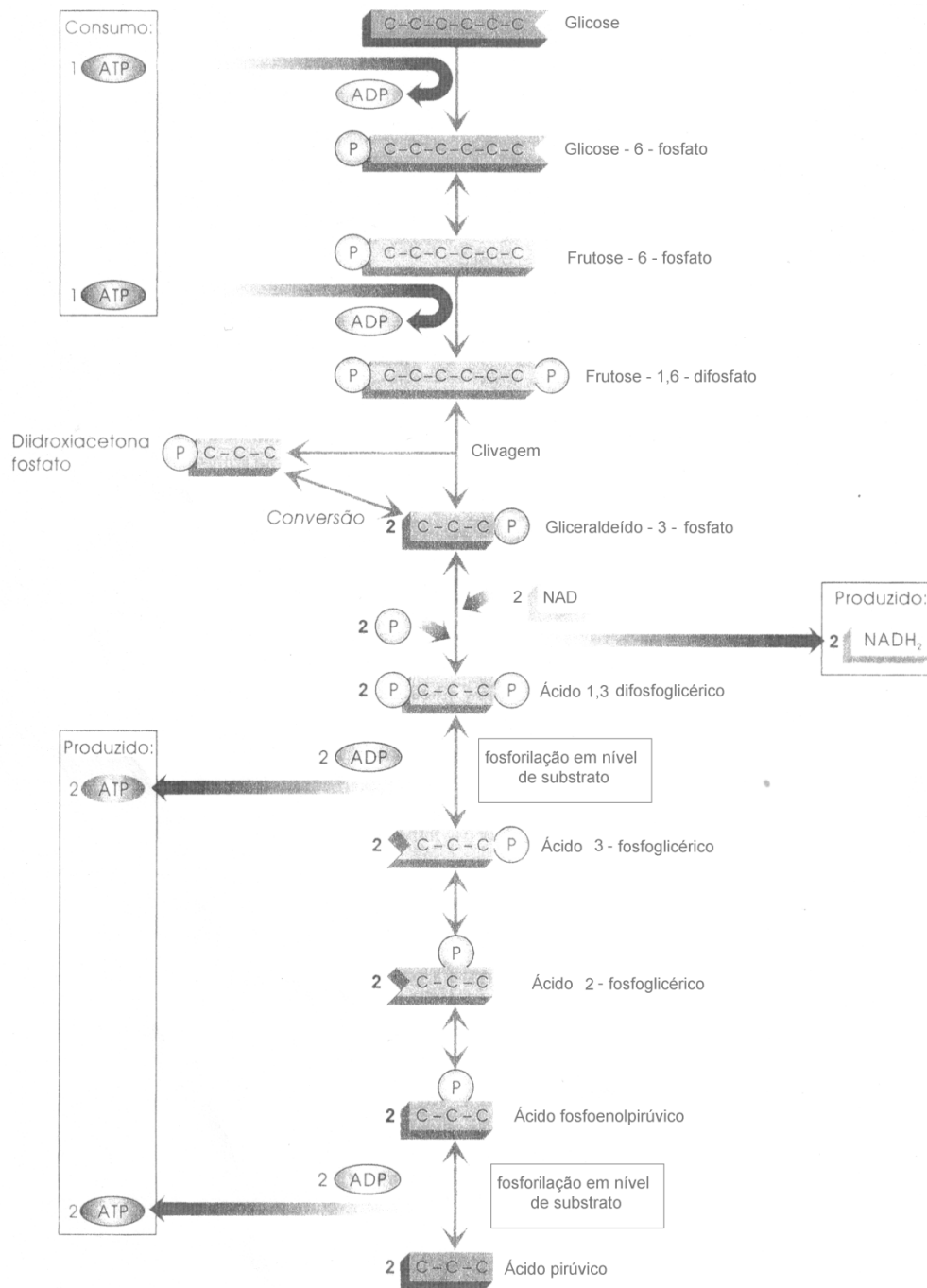


Figura 2.1. Glicólise: a glicose (molécula de seis carbonos) é transformada em ácido pirúvico (molécula de três carbonos). Fonte: Pelczar *et al.*, 1996.

O ácido pirúvico formado ao final da glicólise pode seguir três destinos catabólicos (Figura 2.2).

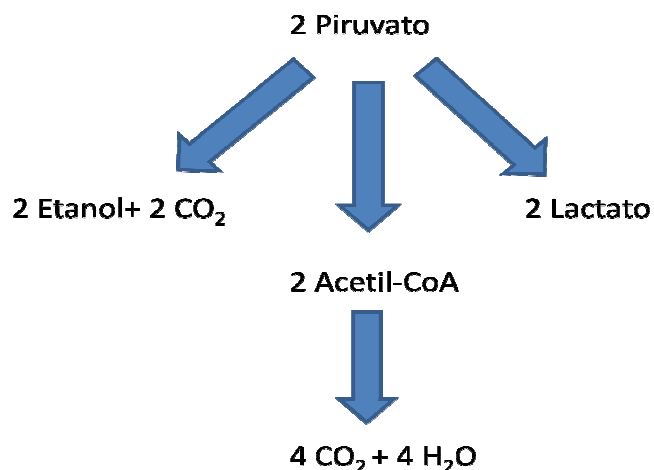


Figura 2.2 – Três possíveis destinos para o ácido pirúvico formado ao final da glicólise (adaptado de LEHNINGER *et al.*, 2002)

- **Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tri-Carboxílico**

O ácido pirúvico produzido na etapa de glicólise penetra no interior das mitocôndrias da *S. cerevisiae*, onde ocorre a respiração propriamente dita. Cada ácido pirúvico reage com uma molécula da substância conhecida como coenzima A originando três produtos: acetil coenzima A, dióxido de carbono e hidrogênio. Os hidrogênios são captados por uma molécula de NAD formando NADH₂. Em seguida cada molécula de acetil coenzima A reage com uma molécula de ácido oxalacético, resultando em ácido cítrico e coenzima A. A coenzima A é restaurada neste passo, ou seja, ela funciona como um anexador do grupo acetil coenzima A ao ácido oxalacético, sintetizando o ácido cítrico.

Cada ácido cítrico passa por uma via metabólica cíclica denominada ciclo do Ácido Cítrico (TCA) ou ciclo de Krebs (Figura 2.3), durante o qual se transforma em outros compostos. Os oito hidrogênios liberados pelo ciclo de Krebs reagem com duas substânciasceptoras de hidrogênio, o NAD e o FAD, que os conduzirão até a cadeia respiratória, onde fornecerão energia para a síntese de ATP. No próprio ciclo ocorre, para cada acetil que reage, a formação de uma molécula de ATP.

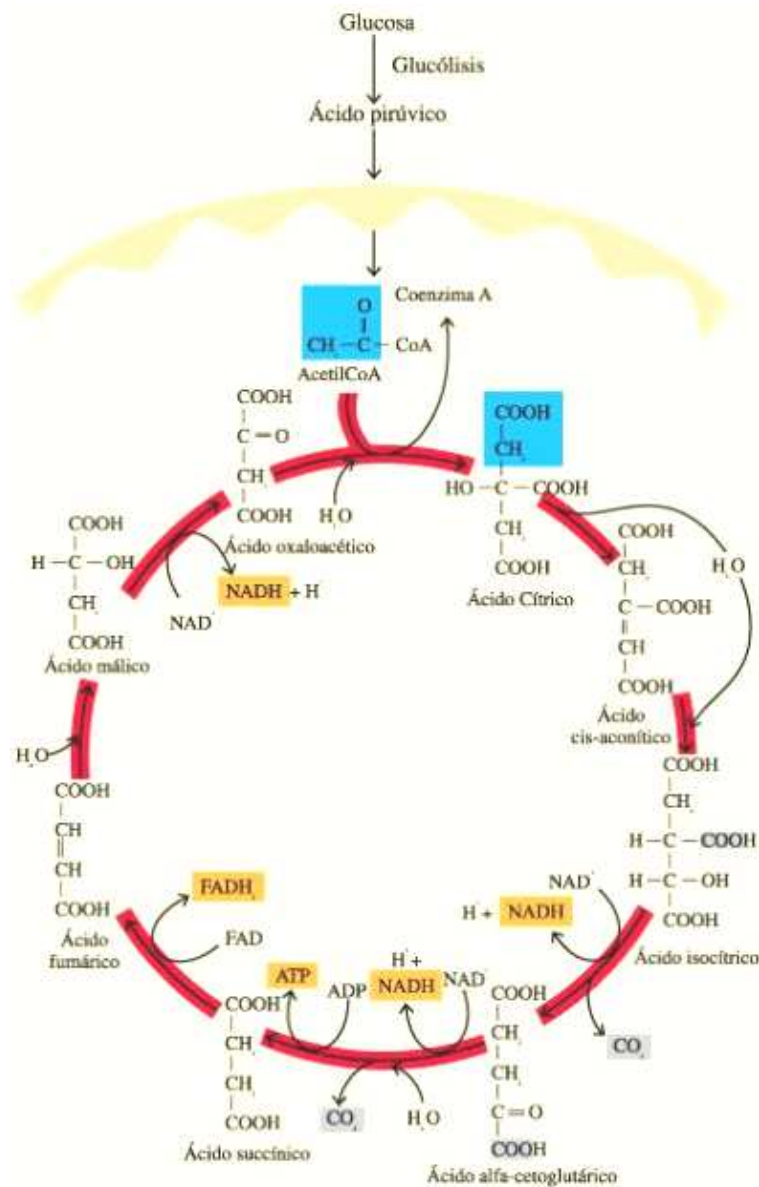


FIGURA 2.3 – Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Cítrico

Referência: (http://www.fisicanet.com.ar/biologia/metabolismo/ap08_respiracion.php)

- **Cadeia Respiratória**

Os hidrogênios liberados na glicólise e no ciclo de Krebs são os responsáveis diretos pela obtenção de energia na cadeia respiratória. Durante a glicólise foram liberados quatro hidrogênios, formando duas moléculas de NADH_2 e na reação de cada ácido pirúvico com a coenzima A formam-se mais duas moléculas de NADH_2 .

No ciclo de Krebs, dos oito hidrogênios liberados, seis se combinam com três moléculas de NAD^+ e formam três NADH_2 e dois se combinam com o outro aceptor, o FAD , formando uma molécula de FADH_2 . Sabe-se hoje, através de métodos bioquímicos que os hidrogênios capturados pelos aceptores se combinam com átomos de oxigênio. Dessa

combinação resultam moléculas de água. Antes de reagirem com o oxigênio, entretanto, os hidrogênios percorrem uma longa e complexa trajetória, na qual se combinam sucessivamente com diversas substâncias aceptoras intermediárias, até encontrar o aceptor final (aceptor definitivo). Esse conjunto de reações é chamado de cadeia respiratória.

2.3.6. Metabolismo Fermentativo e Respiração Celular

Diante do exposto em relação à quebra da glicose e posterior continuação do metabolismo, nota-se que o piruvato (originado do ácido pirúvico) representa um ponto de junção importante no catabolismo dos carboidratos. As primeiras células a surgirem durante a evolução viviam em uma atmosfera quase que desprovida de oxigênio e tiveram que desenvolver estratégias para desenvolver a glicólise sob condições anaeróbias. A maioria dos organismos modernos reteve a habilidade de regenerar continuamente o NAD⁺ durante a glicólise aeróbica pela transferência de elétrons do NADH para formar um produto final reduzido, como o lactato e o etanol (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Na respiração anaeróbia, o aceptor final de elétrons é uma substância inorgânica diferente do oxigênio. Algumas bactérias realizam este tipo de respiração, sendo em muitos casos essencial para os ciclos de enxofre e nitrogênio que ocorrem na natureza. A quantidade de ATP gerada varia de acordo com o microrganismo e com a via metabólica.

A supressão da atividade fermentativa pela respiração foi um dos primeiros efeitos regulatórios descobertos na levedura. Sua ligação com o metabolismo energético é bem aceita, mas os aspectos bioquímicos relacionados com a cinética observável e outros sistemas regulatórios ainda estão sob discussão (LAGUNAS *et al.*, 1982).

2.3.7. Efeito Diáuxico

Em uma cultura aeróbia conduzida na forma de batelada, quando existem duas fontes de carbono diferentes, e pode ocorrer um crescimento em duas fases, em que há o consumo de dois tipos de substratos diferentes, sendo que a célula consome preferencialmente a fonte de carbono de mais fácil assimilação. Este tipo de efeito é chamado de diauxia. No caso da levedura, a glicose é inicialmente consumida com formação de etanol, biomassa, dióxido de carbono e outros subprodutos (por exemplo, ácido acético e glicerol). Ao término do consumo de glicose, após uma fase de

transição, o etanol formado passa a ser consumido e então mais biomassa e dióxido de carbono são formados (LIDÉN, 1993).

A primeira fase é caracterizada por uma alta velocidade de crescimento e um baixo rendimento em biomassa ao passo que durante a fase de consumo de etanol a velocidade de crescimento é pequena e o rendimento em biomassa é maior. A primeira fase é denominada respiro-fermentativa (ou de oxi-redução) e o crescimento em etanol é denominado respiração (via oxidativa).

2.3.8. Efeito Pasteur

O efeito Pasteur tem sido definido como a inibição da glicólise pela respiração (definição mecanística), mas poderia igualmente ser definido fenomenologicamente como um decréscimo na velocidade específica de respiração na presença de oxigênio. Pasteur, em seus estudos, verificou uma diminuição da eficiência de fermentação na presença de ar (oxigênio). Vale ser dito que o efeito Pasteur só faz sentido para organismos capazes de produzir etanol em condições aeróbicas (LIDÉN, 1993).

O efeito Pasteur está relacionado com o crescimento anaeróbio da levedura: a fermentação é inibida pela respiração e concomitantemente a glicose é menos utilizada que na situação de crescimento anaeróbio. Louis Pasteur descobriu que a velocidade de fermentação (e a quantidade total de glicose por ela consumida) é muito maior em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas. O rendimento em ATP da glicólise sob condições anaeróbicas (2 ATP's por molécula de glicose) é muito menor do que o obtido na oxidação completa da glicose sob condições aeróbicas (38 ATP's). Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP é necessário consumir 19 vezes mais glicose em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas (LEHNINGER *et al.*, 2002).

2.3.9. Efeito Crabtree

O efeito Crabtree é sempre colocado como explicação para as duas fases de crescimento observadas em uma cultura em batelada de *Saccharomyces cerevisiae*. O efeito Crabtree é usado no sentido de explicar a produção de etanol sob condições aeróbicas - definição fenomenológica - referindo-se a repressão do metabolismo oxidativo (respiração) quando o meio reacional apresenta quantidades elevadas concentrações de glicose (quantidade superior a um determinado valor crítico).

A diminuição da capacidade de oxidação (capacidade de respiração) provoca uma alteração no metabolismo, resultando na formação de etanol, mesmo na presença

de oxigênio. Este efeito é também conhecido como efeito glicolítico apesar deste efeito repressivo ter sido observado também em meios contendo outros tipos de açúcares (CROCOMO e GUTIERREZ, 1975; LIDÉN, 1993).

2.3.10. Teoria da Capacidade Respiratória Limitada

SONNLEITNER e KAPELLI (1986) propuseram com base na limitação da capacidade respiratória observada nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um conceito diferenciado e novo para a regulação do metabolismo deste microrganismo. Os autores propuseram um mecanismo para explicar a formação de etanol em um meio reacional de crescimento de leveduras, mesmo na presença de oxigênio. O mecanismo explica a formação de etanol como resultado de um sobre-fluxo de glicose na glicólise, que excede a capacidade respiratória das células. Havendo excesso de glicose no meio a glicólise (etapa do metabolismo), o piruvato será produzido em uma quantidade maior do que o sistema respiratório da célula consegue metabolizar. Este piruvato em excesso será utilizado, então, para produção de etanol.

SONNLEITNER e KAPELLI (1986) combinaram a teoria da capacidade respiratória limitada e o sobre fluxo do metabolismo em um modelo matemático para descrever o crescimento celular aeróbio do *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores ilustraram este modelo de capacidade respiratória limitada, através da Figura 2.4 onde se observa a restrição ou estrangulamento respiratório.

Para melhor compreensão da ilustração, são apresentados alguns conceitos elaborados pelos autores:

- a. Fluxo subcrítico: o fluxo total de substratos que passa pela restrição, isto é pela capacidade oxidativa da célula, e os substratos são metabolizados por meio de oxidação.
- b. Fluxo crítico: o fluxo total de substratos que preenche completa e exatamente à restrição, ou seja, à capacidade oxidativa das células.
- c. Fluxo supracrítico: o fluxo total de substratos excede a restrição. Em relação ao fluxo supracrítico duas situações podem ocorrer, de acordo com o modelo dos autores: a primeira ocorrendo um fluxo de glicose supracrítico (parte da glicose) que não consegue passar pela restrição é metabolizada através de redução, com conseqüente produção de etanol.

O modelo matemático proposto por estes dois autores é um marco nos estudos de modelagem e simulação do processo de produção de leveduras de panificação.

Diversos outros modelos propostos tomaram como ponte de partida este modelo de restrição ou estrangulamento da capacidade respiratória.

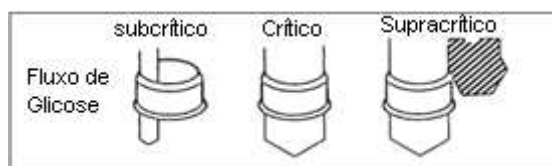


FIGURA 2.4 - Restrição ou estrangulamento respiratório. Adaptado de BEUDEKER *et al.*, 1990.

2.3.11. Repressão Enzimática ou Capacidade Respiratória Limitada

A glicose é transportada para dentro da célula, geralmente por difusão facilitada e, ao entrar na célula, imediatamente passa por um processo de fosforilação. Pode ocorrer também outro mecanismo que não o da difusão facilitada, porém é interessante notar que a velocidade de transporte dentro da célula é mais que um milhão de vezes maior do que se poderia esperar de uma difusão normal (LIDÉN, 1993).

Existem diversas possibilidades para o piruvato após este ter sido formado na via EMP:

- a. Pode ser formado acetaldeído a partir do piruvato por descarboxilação;
- b. O piruvato pode ser desidrogenado e descarboxilado numa reação com acetil coenzima (CoA) e subseqüentemente oxidado no ciclo do ácido tri-carboxílico;
- c. O piruvato pode ser carboxilado para formar produtos intermediários para o ciclo do ácido tri-carboxílico;
- d. Finalmente o piruvato pode ser excretado da célula.

Todavia a membrana celular não é muito permeável ao piruvato e apenas pequenas quantidades saem efetivamente da célula. O que então determina se o piruvato será oxidado no ciclo do ácido tri-carboxílico ou se reduzirá a etanol? De um ponto de vista energético, a célula poderia oxidar o máximo possível visto que esta opção resulta em formação de maior número de ATP's formado por mol de glicose consumido (LIDÉN, 1993).

Nos esforços que têm sido feitos na tentativa de tentar explicar a formação de etanol em cultivos aeróbios de *Saccharomyces cerevisiae* distinguem-se duas principais linhas de pensamento.

A primeira linha de pensamento, mais clássica, propõe a repressão - principalmente das enzimas respiratórias, mas também das enzimas do ciclo do ácido tri-carboxílico - como explicação para a formação de etanol. Na teoria, a inibição da respiração (isto é, inibição da atividade enzimática e não da quantidade de enzimas) poderia ser proposta como uma explicação, porém a repressão tem sido mais aceita como explicação. No entanto, a distinção entre repressão e inibição nem sempre está muito clara. A repressão proposta não é necessariamente causada pelo efeito glicolítico em si, mas por alguns catabólitos produzidos, e por isso o termo repressão catabólica tem sido freqüentemente usado. Têm sido verificados muitos efeitos similares a este acontecendo também com outros açúcares como a galactose, frutose e outros se sugerindo assim que o termo efeito glicolítico também não está se enquadrando como o mais adequado.

A segunda linha de pensamento propõe as teorias cinéticas do gargalo ou funil, que apresentam a célula como tendo uma capacidade respiratória limitada simbolizada pelo gargalo, e não a célula como tendo sua capacidade respiratória reprimida. Os defensores desta teoria têm sido principalmente os engenheiros químicos. Em altos fluxos de glicose, a concentração de piruvato aumenta como consequência da capacidade respiratória limitada, levando a um sobre fluxo da reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, resultando na formação de etanol. Isto está de acordo com o fato de que a enzima piruvato desidrogenase tem maior afinidade pelo piruvato do que a enzima piruvato descarboxilase (LIDÉN, 1993).

Em ambas as linhas de pensamento a repressão das enzimas e a capacidade respiratória limitada são muito importantes para a compreensão da formação de etanol em cultivos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4. Otimização e Controle de Processos Fermentativos

A implementação da tecnologia de controle e otimização em processos bioquímicos é difícil devido ao fato destes processos estarem associados a um grande número de reações bioquímicas complexas e processos de transporte. A medida de parâmetros fisiológicos e bioquímicos é muito difícil, senão impossível de se realizar, tendo como consequência a falta de sensores para quantificar em linhas variáveis importantes do processo.

Os avanços neste campo envolvem o desenvolvimento de novos sensores ou estudos que visam extrair conhecimento do processo a partir das variáveis medidas em linha, correlacionando-as e inferindo as variáveis não disponíveis em linha.

Outra dificuldade encontra-se na existência de mecanismos regulatórios internos dos próprios microrganismos, que realizam sua própria regulação e otimização.

Uma busca na literatura sobre a aplicação de computadores em processos bioquímicos revela que, antes de 1971, ela estava focalizada no uso *off-line*, ou seja, construção de modelos cinéticos microbianos a partir de dados experimentais e de estimativas de parâmetros (AIBA, 1979).

O cultivo da levedura de panificação através de controle *on-line* já era citado por AIBA (1979), como uma aplicação promissora, utilizando-se analisadores de oxigênio e dióxido de carbono nos gases de exaustão de um biorreator acoplado a um computador e conectado a uma bomba para controlar a velocidade de alimentação de glicose ao sistema.

Como descrito anteriormente, a complexidade operacional dos bioprocessos requer a utilização de recursos de modelagem, simulação, monitoramento e controle.

O Controle automático tem desempenhado um papel importante no avanço da engenharia e da ciência. Além de sua extrema importância para os veículos espaciais, para os sistemas de guiamento de mísseis, sistemas robóticos e similares, o controle automático tornou-se parte importante e integrante dos processos industriais e de manufatura modernos, é essencial nas operações de controle de pressão, temperatura, umidade, viscosidade, vazão, dentre outros.

Os engenheiros e cientistas, em sua maioria, devem possuir um bom conhecimento no campo do controle automático tendo em vista o avanço que ele propicia para atingir um desempenho ótimo dos sistemas dinâmicos, além de melhoria da produtividade, e alívio no trabalho enfadonho de muitas operações manuais repetitivas e muito mais.

Para melhor entendimento do controle de processo apresenta-se a seguir algumas definições (OGATA, 1998):

Variável controlada e variável manipulada:

- A variável controlada é a grandeza ou condição que é medida e controlada. A variável manipulada é a grandeza ou a condição variada pelo controlador de modo a afetar o valor da variável controlada. A variável controlada normalmente

é a grandeza de saída do sistema. Controlar significa medir o valor da variável manipulada ao sistema de modo a corrigir ou limitar o desvio entre o valor medido e o valor desejado da variável controlada.

Sistemas a Controlar:

- Um sistema a controlar é uma parte de um equipamento, eventualmente um conjunto de itens de uma máquina que funcionam juntos e cuja finalidade é desempenhar uma determinada operação, pode-se entender por sistema a controlar sendo qualquer objeto físico a ser controlado (tal como o biorreator).

Processos.

O Dicionário Merriam-Webster define processo como uma operação ou desenvolvimento natural, que evolui progressiva e continuamente, caracterizado por uma série de mudanças graduais que se sucedem umas às outras, de modo relativamente fixo e objetivando um resultado particular ou meta; ou, uma operação artificial ou voluntária que evolui progressivamente e se constitui de uma série de ações controladas ou de movimentos sistematicamente dirigidos para se alcançar um determinado resultado ou meta.

Sistemas:

- Um sistema é uma combinação de componentes que atuam em conjunto e realizam certo objetivo. Um sistema não é limitado apenas a algo físico. O conceito de sistema pode ser aplicado a fenômenos abstratos, dinâmicos, como os encontrados na Economia. A palavra sistema deve, por conseguinte, ser interpretada para designar sistemas físicos, biológicos, econômicos, e outros.

Distúrbios

- Um distúrbio ou perturbação é caracterizado por um sinal que tende a afetar de modo adverso o valor da variável de saída de um sistema. Se um distúrbio for gerado internamente no sistema, ele é dito um distúrbio interno; ao passo que o distúrbio externo produzido fora do sistema e se comporta como um sinal de entrada no sistema.

Atuadores:

- A função do atuador é transformar o sinal do controlador, de baixa potência, num sinal ou força de alta potência, suficiente para modificar o estado da planta. Os sensores ou elementos de medida transformam a saída da planta (estado) que pode ser posição, pressão, voltagem, etc., em outro tipo de sinal que seja compatível com a forma utilizada pelo controle. Em geral os sistemas de controle necessitam de um suprimento externo de energia para poderem operar.

Controle:

- OLIVEIRA (2005) explica que controlar é comparar o resultado das ações com padrões previamente estabelecidos, com a finalidade de corrigi-las se necessário.

Controle com Retroação:

- Controle com Retroação ou a Malha Fechada se refere a uma operação que, em presença de distúrbios, tende a diminuir a diferença entre o sinal saída de um sistema e o sinal de referência, e que opera com base nesta diferença.

Controlador (CARRARA, 1998)

Um controlador de um sistema é um dispositivo eletrônico, pneumático, hidráulico ou mecânico que compara a situação atual da planta (o estado da planta, dado pela sua posição, velocidade, tensão, etc.) que se quer controlar, determina a seguir o desvio ou erro com relação a uma referência fornecida e produz um sinal de controle no atuador que, por sua vez, leva o sistema a reduzir ou anular este erro.

Em um sistema controlado pode haver um conjunto de atuadores que transformam o sinal do controlador numa ação exercida na planta, e um conjunto de sensores, que medem o estado da planta e condicionam esta medida para o controlador. Observa-se na figura 2.5 que o controlador define uma malha fechada, isto é, ele avalia a atuação para modificar o estado da planta a partir do estado dela. Embora os controladores em malha fechada sejam mais comuns, existem casos de controladores em malha aberta, que não necessitam conhecer o estado da planta.

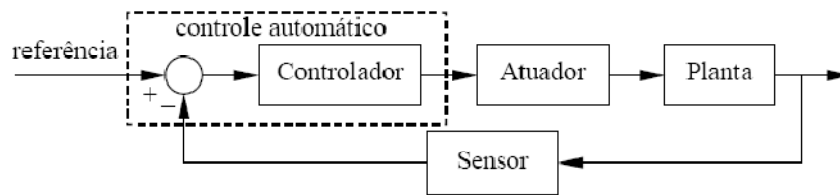


FIGURA 2.5 – Esquema simplificado do controle de uma planta.

2.5. Alguns Tipos de Controladores

A teoria envolvendo a forma como o controlador transforma o erro (ou então as informações do estado e da referência num sinal de controle é bastante vasta e são inúmeros os tipos de controladores diferentes (*On-off*, PID, robusto, não linear, adaptativo, escalonado, *fuzzy* ou lógica nebulosa, neural, etc.). Porém, os principais tipos de controle utilizados na indústria, e que se adaptam facilmente a sistemas lineares são:

- a) Controladores *on-off*, de duas posições, ou também conhecidos como *bang-bang*
- b) Controladores proporcionais (P)
- c) Controladores integrais (I)
- d) Controladores proporcionais-integrais (PI)
- e) Controladores proporcionais-derivativos (PD)
- f) Controladores proporcionais-integrais-derivativos (PID)

2.5.1. Controle *on-off*

Num sistema de controle liga-desliga o elemento de atuação pode assumir apenas dois estados, ou duas posições; em geral ligado e desligado. Uma variação do controle liga-desliga é o controle *bang-bang*, no qual há uma terceira possibilidade: ligado, desligado ou invertido.

Nos controladores liga-desliga a atuação é obtida em função do sinal do erro, por exemplo:

$$u(t) = u_1 = \text{const}, \text{ para } e(t) > 0, \quad (2.3)$$

$$u(t) = u_2 = \text{const}, \text{ para } e(t) \leq 0, \quad (2.4)$$

ou ainda:

$$u(t) = U = \text{const}, \text{ para } e(t) > 0, \quad (2.5)$$

$$u(t) = 0, \text{ para } e(t) = 0, \quad (2.6)$$

$$u(t) = -U, \text{ para } e(t) < 0. \quad (2.7)$$

Exemplos destes controladores são válvulas pneumáticas operadas por solenóides elétricos, válvulas hidráulicas, chaves elétricas, etc. Considere, por exemplo, um sistema de controle de nível como indicado na figura 2.6 e seu respectivo diagrama de blocos pela figura 2.7. Quando o nível do tanque é baixo a bóia provoca o fechamento do interruptor elétrico, causando a abertura da válvula operada pelo solenóide, e liberando assim a entrada de líquido. Se o fornecimento de água (vazão de entrada) for maior do que a retirada (vazão de saída), então a altura de líquido no tanque irá subir. Quando for atingido o nível de operação, a bóia sobe e abre a chave, o que fecha o fornecimento de água. Um problema bastante comum em controladores do tipo liga-desliga é o rápido chaveamento que ocorre quando o erro está próximo de zero, ou seja, quando o sistema está operando perto do ponto de operação. Nesta situação, pequenos deslocamentos fazem com que o atuador (válvula) ligue e desligue em intervalos curtos de tempo, o que provoca um desgaste rápido do atuador. Para evitar este chaveamento rápido, introduz-se uma zona morta ou uma lacuna diferencial no ponto de operação, fazendo com que o controle fique desligado sempre que o estado estiver próximo (e não apenas igual) do ponto de operação. O controle passa a ser dado então por:

$$u(t) = u_1, \text{ para } e(t) > \varepsilon_1, \quad (2.8)$$

$$u(t) = u_2, \text{ para } e(t) > \varepsilon_2, \quad (2.9),$$

onde ε_1 e ε_2 são constantes escolhidas com base na frequência desejada de chaveamento. Em geral ε_1 é positivo e ε_2 é negativo. A representação por diagrama de blocos de um controlador com zona morta.

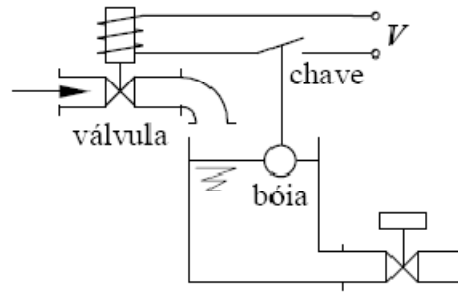


FIGURA 2.6 – Controle de nível tipo liga – desliga de um tanque.

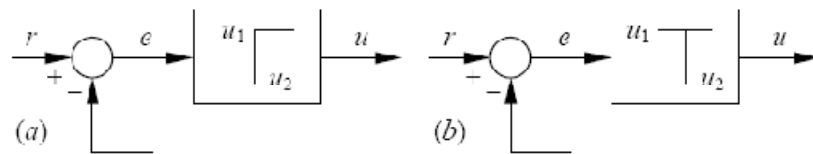


FIGURA 2.7 - Diagrama de blocos de um controlador do tipo liga-desliga (a), e liga-desliga com zona morta (b).

Em um sistema com controlador liga-desliga com zona morta, a resposta fica oscilando entre os valores mínimo e máximo da zona morta, e entre os extremos o sistema segue a sua própria dinâmica, uma vez que não há atuação dentro da zona morta. A figura 2.8 mostra o comportamento típico de um sistema sujeito a um controle liga-desliga com zona morta. No exemplo do controlador de nível, se h_0 for a altura a ser controlada, o controle com zona morta seria na forma: ligar se $h < h_0 - \varepsilon$, e desligar se $h > h_0 + \varepsilon$.

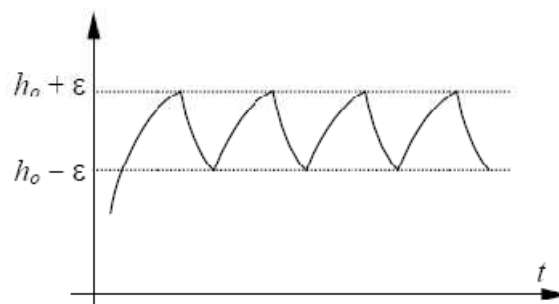


FIGURA 2.8 - Comportamento dinâmico de um sistema com controlador liga-desliga com zona morta.

2.5.2. Controladores Proporcionais (P)

Em um controlador com ação proporcional de controle, a atuação é proporcional ao sinal do erro $e(t)$, ou seja, quanto maior o erro, maior será a atuação. Se o sinal do controle for representado por $u(t)$, então num controle proporcional tem-se:

$$u(t) = K_p e(t) \quad (2.10)$$

ou, aplicando a transformada de Laplace:

$$U(s) = K_p E(s) \quad (2.11)$$

onde K_p é uma constante conhecida como ganho proporcional.

A figura 2.9 representa o diagrama de bloco de um controlador proporcional. Um sistema controlado por um controlador proporcional e cuja função de transferência é dada por $G(s)$ possui um diagrama de blocos semelhante ao mostrado na figura 2.10, a função resultante do sistema controlado fica então:

$$\frac{C(s)}{R(s)} = \frac{K_p G(s)}{1 + K_p G(s)} \quad (2.12)$$

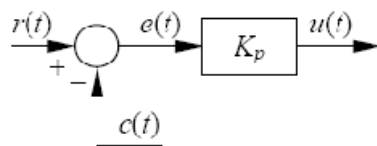


FIGURA 2.9 – Diagrama de blocos de um controle proporcional

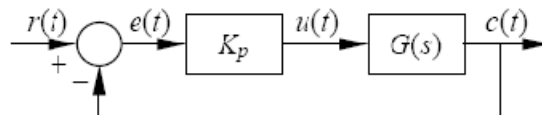


FIGURA 2.10 - Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional

2.5.3 Controladores Integrais (I)

A ação de um controlador integral muda de forma proporcional ao sinal de erro, ou seja:

$$\frac{du(t)}{dt} = K_i e(t), \quad (2.13)$$

cujas transformada de Laplace vale:

$$sU(s) = K_i E(s), \quad (2.14)$$

onde K_i é também constante, conhecida como ganho integral. Em termos de diagrama de blocos, o controlador integral, num sistema com função de transferência $G(s)$, fica como mostrado na figura 2.11.

A função de transferência do sistema controlado fica:

$$\frac{C(s)}{R(s)} = \frac{K_i G(s)}{s + K_i G(s)} \quad (2.15)$$

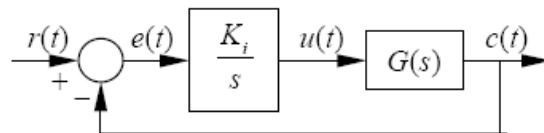


FIGURA 2.11 - Diagrama de blocos de um sistema com controle integral.

2.5.4. Controlador Proporcional-Integral (PI)

Pode-se agrupar os dois tipos de controladores vistos até agora em um único controlador. Este controle é denominado de proporcional-integral (PI) e a atuação é a soma das atuações proporcional e integral, ou seja:

$$u(t) = K_p e(t) + K_i \int e(t) dt \quad (2.16)$$

É conveniente expressar o ganho integral K_i em termos do tempo integral, T_i , dado pela relação entre K_p e K_i . Neste caso o controle fica:

$$u(t) = K_p e(t) + \frac{K_p}{T_i} \int e(t) dt \quad (2.17)$$

Aplicando a transformada de Laplace, tem-se:

$$\frac{U(s)}{E(s)} = K_p \left(1 + \frac{1}{T_i s} \right) \quad (2.18)$$

O diagrama de blocos de um controle proporcional integral de uma planta cuja função de transferência vale $G(s)$ é apresentado na figura 2.12(a). A figura 2.12(b) mostra uma simplificação do controle do diagrama anterior. A função de transferência do sistema controlado fica:

$$\frac{C(s)}{R(s)} = \frac{K_p(1+T_i s)G(s)}{T_i s + K_p(1+T_i s)G(s)} \quad (2.19)$$

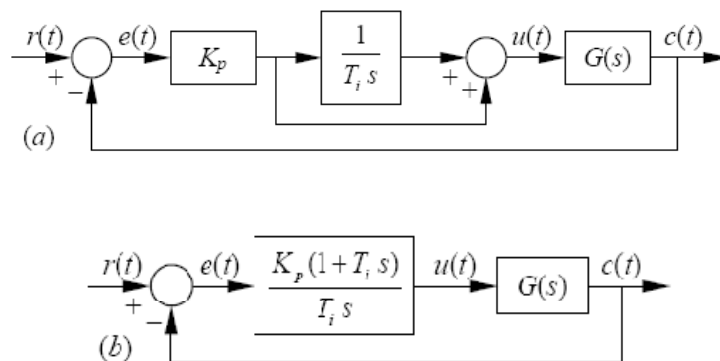


FIGURA 2.12 - Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional-integral (a) e diagrama simplificado (b).

2.5.5. Controlador Proporcional-Derivativo (PD)

A ação do controle derivativo é proporcional à variação do erro, isto é, quanto maior for a taxa de variação do erro, ou a velocidade com que o erro varia, maior será a ação derivativa. O controle PD agrupa o controle proporcional, adicionado ao controle derivativo, na forma

$$u(t) = K_p e(t) + K_d \frac{de(t)}{dt} \quad (2.20)$$

O ganho derivativo, K_d , pode ser posto em função do ganho proporcional e do tempo derivativo, $T_d = K_d / K_p$. A transformada de Laplace do controlador PD é dada por

$$\frac{U(s)}{E(s)} = K_p(1+T_d s) \quad (2.21)$$

O diagrama de blocos mostrado na figura 2.13 representa um controlador PD de uma planta com função de transferência dada por $G(s)$. A função de transferência do sistema completo é:

$$\frac{C(s)}{R(s)} = \frac{K_p(1+T_d s)G(s)}{1+K_p(1+T_d s)G(s)} \quad (2.22)$$

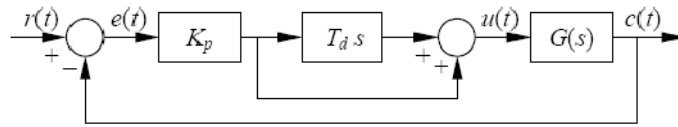


FIGURA 2.13 - Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional-derivativo

2.5.6. Controlador Proporcional-Integral-Derivativo (PID)

O controlador PID é o mais abrangente dos controladores proporcionais, porque engloba as ações proporcional, integral e derivativa. A ação do PID é dada por:

$$u(t) = K_p e(t) + \frac{K_i}{T_i} \int e(t) dt + K_p T_d \frac{de(t)}{dt} \quad (2.23)$$

Cuja função de transferência fica:

$$\frac{U(s)}{E(s)} = K_p \left(1 + T_d s + \frac{1}{T_i} \right) \Rightarrow \frac{U(s)}{E(s)} = K_p \frac{T_d T_i s^2 + T_i s + 1}{T_i s} \quad (2.24)$$

Na forma de diagrama de blocos o controle PID é mostrado na figura 2.14, cuja função de transferência do sistema controlado fica dada por:

$$\frac{C(s)}{R(s)} = \frac{K_p (T_d T_i s^2 + T_i s + 1) G(s)}{1 + K_p (T_d T_i s^2 + T_i s + 1) G(s)} \quad (2.25)$$

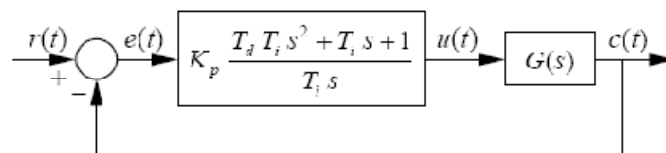


FIGURA 2.14 - Diagrama de blocos de um sistema com controle proporcional-integral-derivativo.

2.6. Sistemas Inteligentes

Inteligência Computacional é uma área emergente de pesquisa fundamental e aplicada que explora algumas tecnologias avançadas de processamento da informação. Seus principais componentes são as redes neurais, a tecnologia de conjuntos nebulosos e a computação evolucionária (NELLES, 2001).

Os pontos-chave dos sistemas inteligentes são: a) habilidade para usar o conhecimento para desempenhar tarefas ou resolver problemas; b) capacidade para aproveitar associações e inferência para trabalhar com problemas complexos que se assemelham a problemas reais (REZENDE, 2005).

Entre as habilidades inteligentes está a habilidade para armazenar e recuperar eficientemente grande quantidade de informação, para resolver problemas ou tomar decisões e para conectar nossos pensamentos e nossas idéias de maneira não-linear, ou seja, de modo associativo (REZENDE, 2005).

Processos bioquímicos industriais são inerentemente complexos apresentando, tipicamente, comportamento não linear.

A lógica *fuzzy* é tida como um sistema inteligente que oferece um ambiente muito propício para aproximar o raciocínio, num esforço para modelar o pensamento humano. Sistemas nebulosos adquirem o conhecimento de especialistas e o codificam em termos de regras SE... ENTÃO..., empregando tais regras num método de interpolação e simulando o raciocínio para responder a novas questões (MEDEIROS *et al.*, 2001).

2.6.1. Fundamentos FUZZY

O termo *fuzzy* em língua inglesa pode ter diversos significados, de acordo com o contexto de interesse, mas o conceito básico deste adjetivo passa sempre pelo vago, indistinto, incerto. As tentativas de tradução para o português ainda não encontraram uma unanimidade: nebuloso e difuso são os exemplo mais populares na área de engenharia (REZENDE, 2005).

Seres humanos são capazes de lidar com processos bastante complexos, tomando por base informações imprecisas ou aproximadas. A estratégia adotada pelos operadores humanos é também de natureza imprecisa e geralmente possível de ser expressa em termos lingüísticos.

A teoria de conjuntos *fuzzy* e os conceitos de lógica *fuzzy* podem ser utilizados para traduzir em termos matemáticos a informação imprecisa expressa por um conjunto

de regras lingüísticas. Se um operador humano for capaz de articular sua estratégia de ação como um conjunto de regras da forma se ... então, um algoritmo a ser implementado em computador pode ser construído. O resultado é um sistema de inferência baseado em regras, no qual a teoria de conjuntos *fuzzy* e lógica *fuzzy* fornecem toda ferramenta matemática para se lidar com as tais regras lingüísticas.

No mundo real (e em grande parte das aplicações de interesse na área de engenharia) existem propriedades que são vagas, incertas ou imprecisas e, portanto, impossíveis de serem caracterizadas por predicados da lógica clássica bivalente. Entretanto, Zadeh propôs uma caracterização mais ampla, generalizando a função característica de modo que ela pudesse assumir um número infinito de valores no intervalo de $[0,1]$. Um conjunto *fuzzy* A em um universo X é definido por uma função de pertinência $\mu_A(x) : X \rightarrow [0,1]$, e representado por um conjunto de pares ordenados $A = \{\mu_A(x)/x\}$, $x \in X$, onde $\mu_A(x)$ indica o quanto x é compatível com o conjunto A . Um determinado elemento pode pertencer a mais de um conjunto *fuzzy*, com diferentes graus de pertinência (REZENDE, 2005).

2.6.2. Representação *Fuzzy* de Conhecimento

Quando um ser humano está resolvendo um problema complexo, ele tenta primeiro estruturar o conhecimento sobre esse problema em conceitos gerais e, depois observa as relações essenciais entre esses conceitos. Este processo de modelagem *top-down* permite que se convertam relações essencialmente gerais e imprecisas, obtidas no primeiro momento, em algoritmos operacionais mais detalhados, numa segunda fase.

Essa perspectiva essencialmente humana de encarar um problema geralmente não permite a definição precisa de uma solução, em termos de números exatos, por exemplo, mas conduz uma classificação ou agregação qualitativa em categorias gerais ou conjuntos de possíveis soluções. A capacidade de classificar de modo impreciso as variáveis de um problema, em termos de conceitos qualitativos em vez de quantitativos, traduz a idéia de uma variável lingüística. O processo de representação *fuzzy* de conhecimento aqui descrito depende fundamentalmente deste conceito (REZENDE, 2005).

2.6.3. Funções de Pertinência

Um conjunto *fuzzy* é caracterizado por uma função de pertinência que assume valores dentro do intervalo [0,1]. Enquanto na teoria clássica de conjuntos a função de pertinência assume apenas os valores zero indicando que o elemento não pertence ao conjunto ou um indicando que o elemento pertence ao conjunto, na teoria de conjuntos *fuzzy* os elementos podem estar associados a graus de pertinência entre zero e um indicando que os mesmos podem pertencer parcialmente a mais de um conjunto.

A princípio, qualquer função que associe valores entre zero e um a elementos de um dado conjunto, pode ser tomada como função de pertinência. Entretanto, na escolha de tais funções, deve-se levar em conta o contexto no qual estas serão utilizadas na representação das variáveis lingüísticas. Neste sentido, tanto o número quanto o formato das funções de pertinência devem ser escolhidos de acordo com o conhecimento sobre o processo que se quer estudar (AMENDOLA, 2005).

2.6.3.1. Funções de Pertinência Triangular

As funções de pertinência triangulares são caracterizadas por uma terna (a, b, c) , onde a e c determinam o intervalo dentro do qual a função de pertinência assume valores diferentes de zero e b é o ponto onde a função de pertinência é máxima. A figura 2.15 exibe uma função de pertinência triangular.

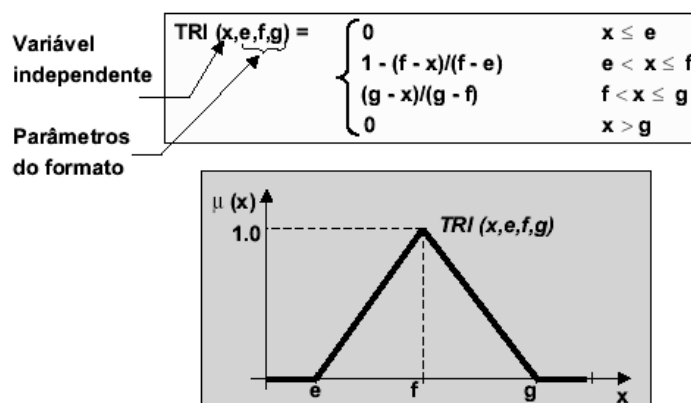


Figura 2.15 – Função de pertinência triangular

Na ordenada desta figura, encontram-se os valores da função de pertinência e na abscissa os valores da variável que se quer estudar (AMENDOLA, 2005).

2.6.3.2. Funções de Pertinência Trapezoidal

Nesta função é possível representar todo um intervalo de pontos de máximo, conforme a equação (2.26).

$$f(x) = \begin{cases} y_{\min}, & x \leq i \text{ ou } x \geq f \\ y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) \times \frac{x-i}{m1-i}, & i < x < m1 \\ y_{\max}, & m1 \leq x \leq m2 \\ y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) \times \frac{f-x}{f-m2}, & m2 < x < f \end{cases}, \quad (2.26)$$

onde y_{\min} é o menor valor possível para a função, y_{\max} o maior valor, i o início do trapézio, m_1 o início do intervalo de máximo, m_2 o fim do intervalo de máximo, e f o final do trapézio. A figura 2.16 representa a função de pertinência trapezoidal.

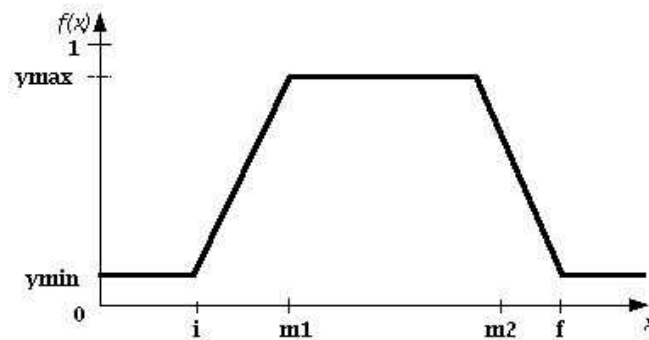


FIGURA 2.16 - Função de pertinência trapezoidal

2.6.3.3. Funções de Pertinência Gaussiana

As funções de pertinência gaussianas são caracterizadas pela sua média (**m**) e seu desvio padrão (**s**). Este tipo de função de pertinência tem um decaimento suave e tem valores diferentes de zero para todo domínio da variável estudada. A figura 2.17 exhibe uma função de pertinência Gaussiana. Nesta figura encontram-se no eixo vertical os valores da função de pertinência e no eixo horizontal os valores da variável que se deseja estudar (AMENDOLA, 2005).

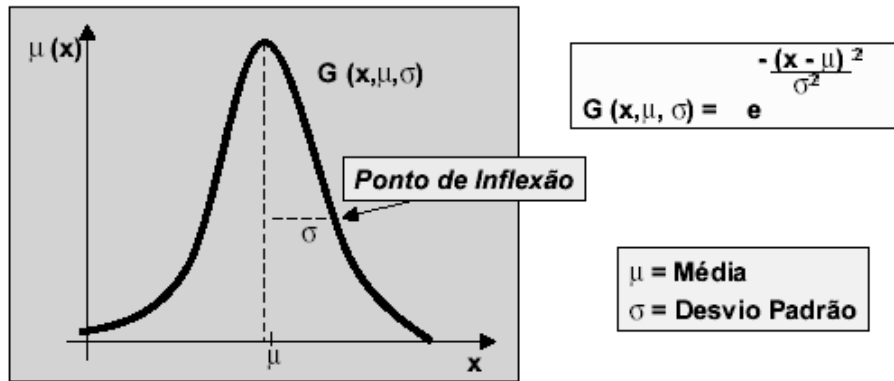


FIGURA 2.17 – Função de pertinência Gaussiana

2.6.3.4. Funções de Pertinência Sino

O perfil da função de pertinência do tipo sino é bem parecido com a função gaussiana, entretanto, seu esforço computacional é bem menor por não envolverem exponenciais (MEDEIROS *et al.*, 2003).

A função sino pode ser expressa pela equação (2.27) (Figura 2.18), onde a variável “a” define a largura, “b” define o decaimento e a variável “c” define o centro da função de pertinência.

$$f(x; a, b, c) = \frac{1}{1 + \left| \frac{x-c}{a} \right|^{2b}} \quad (2.27)$$

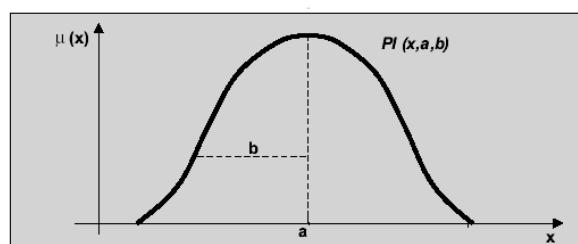


FIGURA 2.18 – Função de pertinência gaussiana

2.6.4. Variáveis Lingüísticas

GOMIDE e GUDWIN (1994) destacam um conceito de fundamental importância no campo da lógica *fuzzy*: as variáveis lingüísticas. Uma variável lingüística é definida como uma entidade utilizada para representar de modo impreciso e, portanto, lingüístico, um conceito ou uma variável de um dado problema. Ela admite como valores apenas expressões lingüísticas, como por exemplo: frio muito grande, aproximadamente alto, etc. Estes valores contrastam com os valores assumidos por uma variável numérica, que admite apenas valores precisos (ou seja, numéricos).

Um termo primário de uma dada variável lingüística pode ser representado por um conjunto *fuzzy* existente no universo de discurso no qual esta variável está definida. Assim, cada conjunto *fuzzy* definido neste universo é associado a um conceito lingüístico que classifica ou define um valor impreciso para uma variável em questão. Para um dado elemento x do universo de discurso, o valor de pertinência $\mu_A(u)$ representa o quanto este elemento satisfaz o conceito representado pelo conjunto *fuzzy* A (REZENDE, 2005).

Os termos primários definidos para uma dada variável lingüística formam a sua estrutura de conhecimento, chamada de partição *fuzzy* desta variável. Na figura 2.19, é mostrado um exemplo de partição *fuzzy* de uma variável lingüística (Velocidade). O universo de discurso utilizado é um segmento de escala em quilômetros por hora (km/h), entre 0 e 100 km.

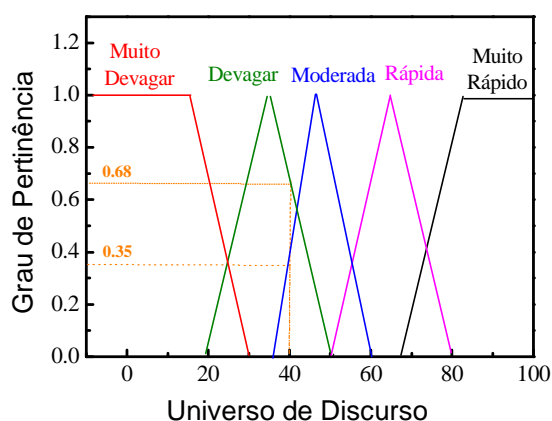


FIGURA 2.19 – Exemplo de partição *fuzzy* de uma variável lingüística (Velocidade), (NUCCI, 2005)

A forma de utilização das variáveis lingüísticas depende basicamente da definição das propriedades sintáticas e semânticas que vão reger o comportamento do sistema de conhecimento *fuzzy*. Mais detalhadamente, as propriedades sintáticas definem o formato em que serão armazenadas funções lingüísticas *fuzzy*. Elas proporcionam a criação de uma base de conhecimento contendo sentenças estruturadas, sistematizando os processos de armazenamento, busca e processamento dos dados existentes. Por outro lado, as propriedades semânticas vão especificar de que modo é extraído e processado o conhecimento, armazenado na forma de declarações condicionais *fuzzy* ou regras de produção *fuzzy*, contido na estrutura definida pelas propriedades sintáticas.

2.6.5. Sistema de Controle e Inferência *Fuzzy*

Como sistemas capazes de processar eficientemente informações imprecisas e qualitativas de forma geral, os modelos de inferência *fuzzy* são especialmente adequados em processos que exigem tomadas de decisão por parte de operadores e gerentes de operação. Aplicações deste tipo representam o conhecimento e a experiência existentes sobre um determinado estado do processo ou da situação e, a partir da entrada de dados sobre os seus estados atuais, podem inferir sua evolução temporal, as variações importantes que ocorreram ou mesmo gerar sugestões sobre as próximas ações a serem tomadas (GOMIDE e GUDWIN, 1994).

Na implementação do controlador nebuloso é necessário um protocolo de controle, caracterizando as principais propriedades da adequada estratégia de controle. O protocolo de controle nada mais é do que o conhecimento do operador humano. A estratégia de controle de um operador humano pode ser representada como um conjunto de relações condicionais *fuzzy* que formam um conjunto de regras de decisão. Cada regra *fuzzy* é composta (na mesma forma como na lógica clássica) por uma parte antecedente (a parte "SE") e uma parte conseqüente (a parte "ENTÃO") resultando em uma estrutura do tipo:

SE (antecedentes) **ENTÃO** (conseqüentes)

O antecedente é composto por um conjunto de condições que, quando satisfeitas (mesmo que parcialmente), determinam o processamento do conseqüente da regra por um mecanismo de inferência *fuzzy*. O processo acima descrito denomina-se disparo da

regra. Entretanto, o conseqüente é composto de um conjunto de ações ou diagnósticos que são gerados com o disparo da regra. Os conseqüentes das regras disparadas são processados em conjunto para gerar uma resposta determinística para cada variável de saída do sistema (REZENDE, 2005).

O crescente interesse pela aplicação da teoria de conjunto *fuzzy* em controle de processos deve-se ao fato de os processos industriais complexos apresentarem dificuldades significativas no controle automático em razão das não-linearidades, do comportamento variante no tempo, da baixa qualidade das medidas disponíveis, dos altos níveis de ruídos, etc. Em geral, nesses sistemas, controlam-se apenas variáveis primárias, ou seja, aquelas que podem ser medidas diretamente e controladas (temperatura, pressão, pH, oxigênio dissolvido, fração molar de CO₂, etc), deixando a cargo do operador o controle global da qualidade e quantidade de produto produzido.

Segundo KING e MANDANI (1977), até meados da década de 1980, o projeto de controle era baseado quase exclusivamente nas teorias clássicas e modernas da época, apresentado uma grande desvantagem pelo fato de ter um amplo conhecimento do comportamento da planta a ser controlada por meio de modelos matemáticos.

Atualmente, o uso de computadores tem permitido a utilização de técnicas modernas de controle, inclusive com o emprego de modelos matemáticos, apresentando bons resultados para problemas lineares de natureza determinística ou estocástica.

A estrutura de um processo controlado por um controlador *fuzzy* é mostrada na figura 2.20 enfatizando-se seus componentes básicos como: a interface de *fuzzificação*, regras/base de conhecimento, o procedimento de inferência e a interface de *defuzzificação* (GOMIDE e GUDWIN, 1994).

Na *fuzzificação*, são realizadas as análises do ambiente, pois é de extrema importância conhecer: o problema a ser manipulado, como o especialista trabalha e como ele entende sua realidade, qual a linguagem usada pelo especialista para tratar os problemas, quais as decisões e quando elas são tomadas. A partir da aquisição deste conhecimento, pode-se saber em qual contexto o sistema baseado em lógica *fuzzy* será aplicado. Nesta etapa são definidos os conjuntos *fuzzy*, escolhendo qual o tipo de conjunto a ser adotado (triangular, sino, gaussiana), as variáveis lingüísticas e as funções de pertinência (RAMOS, 1999).

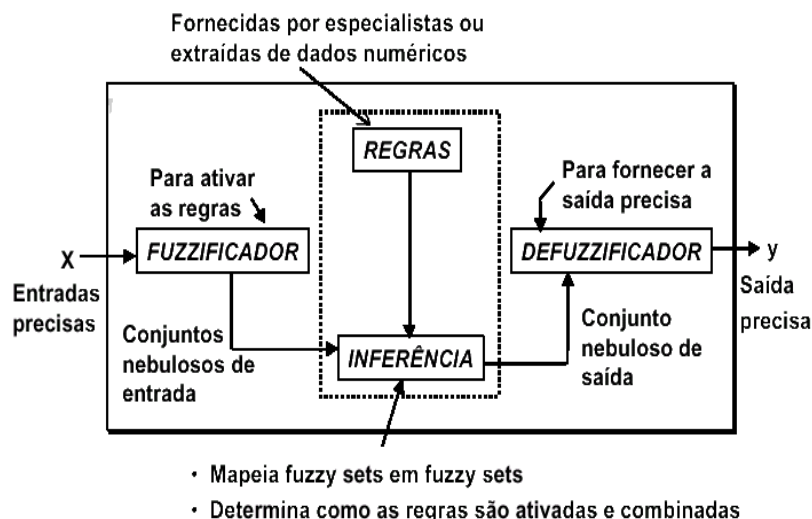


FIGURA 2.20 – Estrutura básica de um controlador *fuzzy* (adaptada de GOMIDE e GUDWIN, 1994)

As *regras* podem ser fornecidas por especialistas, em forma de sentenças lingüísticas, e se constituem em um aspecto fundamental no desempenho de um sistema de inferência *fuzzy*. Novamente tomando o exemplo de um controlador *fuzzy*, este só terá um bom desempenho se as regras que definem a estratégia de controle forem consistentes. Extrair regras de especialistas na forma de sentenças do tipo *SE... ENTÃO...*, pode não ser uma tarefa fácil. Alternativamente ao uso de especialistas para a definição da base de regras, existem métodos de extração de regras de dados numéricos. Estes métodos são particularmente úteis em problemas de classificação e previsão de séries temporais (REZENDE, 2005; GOMIDE e GUDWIN, 1994).

Na *inferência* é que são definidas as regras, com base no conhecimento adquirido no ambiente. A proposição do tipo $x \text{ is } A$ indica qual o grau de pertinência de x no conjunto *fuzzy* A . O valor verdade desta proposição é usado para criar ou atualizar os espaços de solução *fuzzy*. O espaço de solução *fuzzy* final é gerado através da agregação das proposições *fuzzy* correlacionadas. O processo de correlação se baseia na aplicação dos operadores *and* e *or*, definidos nas regras, os quais conectam as proposições. A execução das regras em paralelo produz espaços de saída que contém informação de todas as proposições, então é necessário realizar a composição destes espaços num espaço de saída *fuzzy*.

Os dois métodos principais de inferência em sistemas *fuzzy* são o método *min-max* e o *aditivo*. Estes métodos diferem na forma de representar a saída. No método *min-max*, a região conseqüente é restringida ao mínimo. A região de saída é obtida por

calcular o máximo das mínimas regiões. A diferença do método *aditivo* para o *min-max* está na obtenção da região de saída, pois ao invés de obter o valor máximo entre as regiões mínimas, o método aditivo calcula o mínimo entre 1 e a soma das funções de pertinências (RAMOS, 1999).

Segundo GOMIDE e GUDWIN (1994) existem vários métodos de “defuzzificação” na literatura: dois dos mais empregados são o centro de gravidade e a média dos máximos. Na média dos máximos a saída precisa é obtida tomando-se a média entre os dois elementos extremos no universo que correspondem aos maiores valores da função de pertinência do conseqüente. Com o centro de gravidade, a saída é o valor no universo que divide a área sob a curva da função de pertinência em duas partes iguais.

2.6.6. Aplicações da Lógica *Fuzzy* em Bioprocessos

Durante os últimos anos, a inferência *fuzzy* tem sido aplicada em vários bioprocessos. Alguns autores utilizaram o controle *fuzzy* em processos fermentativos. YAMADA *et al.* (1991) publicaram uma aplicação de controle *Fuzzy* para fermentação em batelada alimentada da coenzima Q₁₀, onde se utilizou a limitação do suprimento de oxigênio. O controlador *fuzzy* usado por estes autores apresentava 70 regras *Fuzzy*. Os autores destacaram a alta eficiência do algoritmo durante os processos fermentativos.

ALFAFARA *et al.* (1993) utilizou um sistema *fuzzy* para o controle da concentração de etanol e também para identificar a máxima produção de um peptídeo (GSH) em uma cultura de batelada alimentada utilizando uma levedura. Este controle, além de manter constante a concentração de etanol, também tinha a função de verificar “estado emergencial da glicose”, como por exemplo, acumulação ou deficiência. Resultados mostraram que a taxa específica crítica de crescimento μ_c corresponde a uma taxa de produção de GSH. Assim, o controle de μ para μ_c poderia ser feito indiretamente mantendo uma concentração de etanol constante, ou seja, zero formação de etanol manipulando a taxa de alimentação de glicose.

SHIBA *et al.* (1994) utilizaram um sistema *fuzzy* no controle da glicose e do etanol para a melhoria da produção de α -amilase em uma cultura em batelada alimentada da *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores relatam que o controlador foi desenvolvido para o controle simultâneo da glicose (0,15 g/L) e do etanol (2 g/L). Os Resultados mostraram que a atividade e a atividade específica foram duas e três vezes

maiores, respectivamente, se comparados com a situação onde somente a glicose era controlada.

KITSUTA e KISIMOTO (1994) estudaram o controle da produção de ácido glutâmico por espécies de *Brevibacterium*. Em seus estudos um ótimo modelo determinístico não pôde ser construído facilmente por causa do atraso de informações quantitativas no efeito da concentração de açúcar e do mecanismo de produção de ácido glutâmico. Em particular, a produção de ácido glutâmico foi reduzida significativamente pela falta de açúcar no começo da fase de produção. Entretanto, um esquema supervisorio de controle *fuzzy* foi desenvolvido para resolver este problema. A transição do período da fase de produção para o período posterior foi identificada usando inferência *fuzzy* no sistema de controle.

Outro sistema de controle lógico *fuzzy* baseado em regras foi desenvolvido e simulado para o controle da concentração de penicilina em um reator manipulado em batelada alimentada por NYTTLE e CHIDAMBARAM (1993). O controle do erro na concentração do produto e a taxa de alimentação de nutriente F foram usados como variáveis lingüísticas e F foi manipulada pelo controle da concentração de produto (P). Depois de algumas simulações, um conjunto de seis regras foi construído. Para testes e robustez do sistema de controle *fuzzy* alguns parâmetros foram variados: a taxa inicial de alimentação, volume inicial do reator e o tempo de amostragem. Seguindo todo este trabalho, os autores indicam um simples controle *fuzzy* para o caso de medidas de P *on-line*.

SOUZA Jr e ALMEIDA (2001) utilizaram a lógica *fuzzy* na implementação de um controle *Fuzzy* para a determinação do momento em que deve ser iniciada a adição da sacarose a um sistema fermentativo para produção de cefalosporina C em regime de batelada alimentada. Os autores conseguiram identificar com precisão o momento para início da Batelada alimentada durante as fermentações, tendo como variáveis para o algoritmo *fuzzy*, o tempo de cultivo e a fração molar de CO_2 .

NUCCI *et al.* (2005) implementaram um algoritmo baseado na teoria da Lógica *Fuzzy* (Fortran ®) com o objetivo de identificar o momento da máxima concentração de enzima durante os cultivos por *Bacillus megaterium*, ou seja, o momento de finalizar o cultivo. Os resultados obtidos mostraram ser o algoritmo eficiente na identificação da máxima concentração de PGA, tanto na fase de ajuste dos parâmetros quanto na etapa de validação com dados não utilizados anteriormente.

FERNANDES *et al.* (2007) desenvolveram um algoritmo, que através de lógica *fuzzy*, conseguiram controlar o início da vazão de meio suplementar e do término da corrida durante o cultivo *Bacillus megaterium*.

JIN *et al.* (1996) utilizaram redes neurais artificiais e controle baseado em lógica *fuzzy* para cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante em modo batelada-alimentada.

HISBULLAH e RAMACHANDRAN (2003) desenvolveram um controlador baseado em lógica *fuzzy* para regular a taxa de alimentação de substrato de um fermentador operado em modo batelada-alimentada para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* voltado para a indústria de panificação.

O' CONNOR *et al.* (2002) integraram um controlador baseado em lógica *fuzzy* ao processo de fermentação da indústria cervejeira.

KARAKUZU *et al.* (2006) desenvolveram dois *soft sensors* para estimação da concentração de biomassa e do crescimento celular específico no processo de produção de levedura da indústria de panificação. Fizeram uso de um controlador baseado na lógica *fuzzy* para atuar no processo fermentativo para corrigir a taxa de substrato injetado no fermentador, assim como também o fluxo de ar que alimentava a batelada alimentada.

KASPERSKI e MISKIEWICZ (2008) fizeram uso de um controlador baseado na lógica *fuzzy* para a otimização da taxa de alimentação de um reator operado em modo batelada-alimentada para a produção de biomassa voltada para a indústria de panificação.

2.7. Modelagem Matemática

Altos custos associados com muitos processos fermentativos tornam a otimização do desempenho do biorreator bastante desejável. Devido a este fato, modelos matemáticos são formulados com o intuito de estudar os processos fermentativos e estabelecer estratégias de controle para que os mesmo desempenhem um melhor rendimento (REHM, 1993)

Para se alcançar bons resultados em cultivo de microrganismos, algumas estratégias de otimização do processo devem ser consideradas. Muitas das estratégias disponíveis são baseadas no uso de modelos matemáticos do crescimento celular. Os modelos quantificam a relação entre a velocidade específica de crescimento do

microrganismo e a concentração de substrato limitante, além de relacionarem o consumo de substrato ao coeficiente de rendimento do produto.

O estudo da influência das condições de cultivo na velocidade de crescimento se mostrou de fundamental importância, pois é a partir da expressão desta velocidade que se pode simular a produtividade em biorreatores. Como já descrito anteriormente, existem diferentes tipos de modelos, dos mais complexos, representados por modelos estruturados que descrevem as principais reações dentro das células, aos mais simples, os não-estruturados, que procuram uma equação geral para descrever o crescimento. Os modelos podem ser ainda, segregados (distinguem os diferentes tipos de células presentes no reator) ou não segregados (consideram uniforme a população de um cultivo). Os modelos estruturados segregados são os mais realísticos, porém são também muito complexos computacionalmente (SHULER e KARGI, 2001). A figura 2.21 apresenta a ordem de complexidade dos modelos cinéticos.

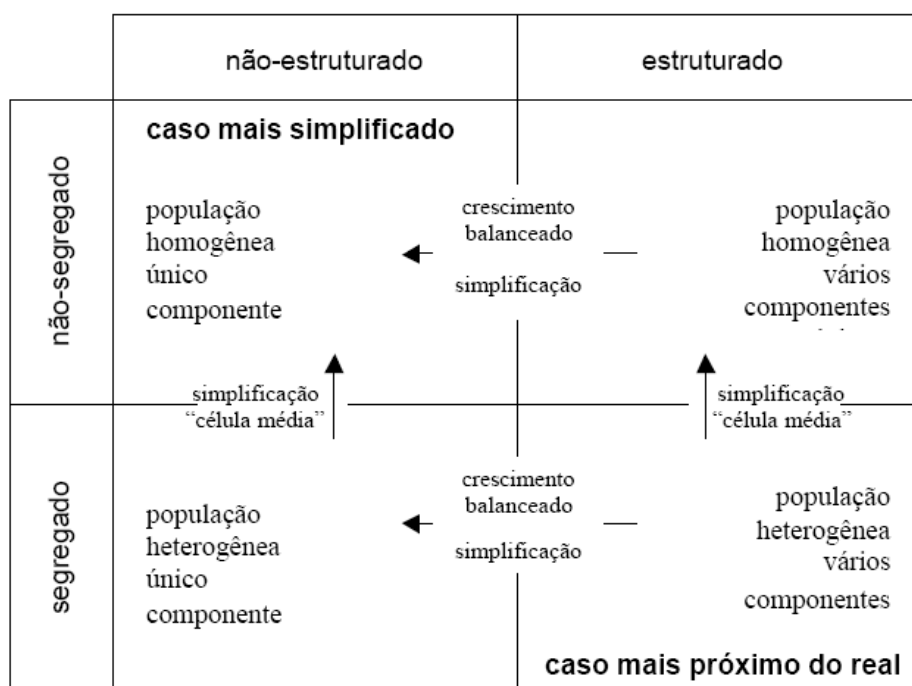


FIGURA 2.21 - Perspectivas para a construção de modelos cinéticos do cultivo de microrganismos (BAILEY e OLLIS, 1986).

De acordo com NIELSEN e VILLADSEN (1994) em modelos não-estruturados, a cinética de crescimento é modelada normalmente por apenas uma reação. Já os modelos estruturados são de certa forma melhorias nos modelos não-estruturados, na medida em que alguns mecanismos básicos do comportamento celular são incorporados

ao menos qualitativamente. Em modelos estruturados, todos os componentes da biomassa são agrupados indiscriminadamente em algumas variáveis chaves, que são supostamente representativas do comportamento celular. Desta forma a atividade microbiana se torna uma função não apenas das variáveis abióticas, que podem mudar em pequenos e constantes intervalos de tempo, mas também da composição celular, e desta maneira depende das condições do meio às quais as células foram submetidas. Existem muitas aproximações que visam estruturar a biomassa e que se subdividem em: Modelos estruturados simples, nos quais apenas alguns poucos componentes celulares são considerados; e Modelos altamente estruturados nos quais são considerados mais de 20 componentes intracelulares.

A complexidade das reações metabólicas é tamanha que mesmo em modelos altamente estruturados os componentes celulares inclusos no modelo representam *pools* de enzimas diferentes, metabólitos, ou outros componentes celulares. As reações celulares consideradas em modelos estruturados são conseqüentemente, empíricas desde que não podem representar a conversão entre componentes verdadeiros. Devido a essa natureza empírica, os modelos estruturados são baseados normalmente em alguns mecanismos celulares bem conhecidos, e assim, estes modelos têm a habilidade de simular muito bem algumas características dos experimentos (NIELSEN e VILLADSEN, 1994).

2.7.1. Modelo Proposto Por HALL *et al.* (1978)

Este modelo postula que a levedura pode usar tanto a via respiratória, em que a glicose é convertida a dióxido de carbono e massa celular, ou a via fermentativa que resulta na formação de etanol, dióxido de carbono e células. Quando a velocidade de crescimento do microrganismo é pequena, o metabolismo é completamente realizado pela via oxidativa, o coeficiente respiratório assume valor próximo da unidade e o coeficiente estequiométrico de conversão célula a substrato, Y_{XS} , é 0,5 g célula/g glicose. Esta situação se mantém até um determinado valor de glicose (valor crítico) a partir do qual o metabolismo se torna fermentativo (BLANCH e CLARCK, 1997). Na via fermentativa o coeficiente de rendimento decresce e há um aumento na velocidade específica de produção de dióxido de carbono e etanol. Esta velocidade crítica de crescimento é apenas um pouco maior do que a velocidade máxima de crescimento da levedura em etanol. Existe uma mudança no perfil de concentração de enzimas no meio que reflete a troca das vias metabólicas, da respiração para a fermentação. Em baixas

velocidades de crescimento um baixo número de enzimas glicolíticas é encontrado no meio.

Na via fermentativa o coeficiente de rendimento diminui e há um aumento na velocidade específica de produção de dióxido de carbono e etanol. No caso do processo de produção de leveduras tais subprodutos são indesejáveis (BLANCH e CLARCK, 1997).

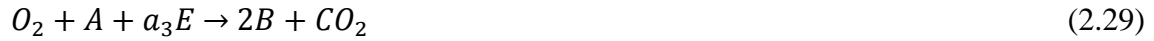
À medida que aumenta a velocidade de crescimento específico a quantidade de células que se dividem aumenta quase que linearmente. Utilizando-se esta relação linear e o tempo médio de geração de uma célula, o tempo de subdivisão da célula pode ser calculado. Existe uma pequena variação na velocidade de crescimento em diferentes etapas do crescimento da célula.

O modelo em questão baseia-se no fato de que a divisão celular ocorre em dois estágios. A extensão do primeiro estágio depende da disponibilidade de substrato limitante e assume-se que a extensão da segunda fase é independente da concentração de substrato.

Considera-se que a massa celular é composta de duas partes: parte A (composta por células que consomem substrato do meio e produzem energia) e parte B (composta por células que realizam a reprodução e divisão celular). As células do tipo B se convertem em células do tipo A com velocidade constante ao passo que as células do tipo A consomem substrato e geram células do tipo B a velocidade variável.

O modelo aborda a questão da regulação dos metabolismos de respiração e de fermentação. A repressão das enzimas respiratórias pela glicose (chamada de Efeito Crabtree) foi inicialmente pensada como se a glicose agisse como um repressor do catabolismo. Evidências mais recentes sugerem que um grande fluxo catabólico é a causa direta da inibição da respiração e que a concentração de glicose age num campo secundário. O modelo propõe ainda que ambos – glicólise e a respiração - possam ocorrer com células do tipo A e que ambos podem prover energia para o crescimento dos microorganismos (BLANCH e CLARCK, 1997).

A equação (2.28) mostra o metabolismo fermentativo. A equação (2.29) mostra o metabolismo de respiração. A equação (2.30) mostra a divisão celular - célula do tipo B se transformando em célula do tipo A.



A quantidade total de células do tipo A somadas às células do tipo B dá o total de massa celular por unidade de volume, C_X . A concentração de etanol do meio está representada por C_E , e a concentração de substrato por C_S . São assumidas no modelo as equações de velocidade conforme descrito nas equações (2.31) a (2.33).

$$r_A = k_1 C_A \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (2.31)$$

$$r_B = k_2 C_A \frac{C_S}{K_E + C_E} \quad (2.32)$$

$$r_C = K C_B \quad (2.33)$$

Assume-se neste modelo que o processo de divisão das células (células do tipo A se transformando em células do tipo B) ocorre à velocidade constante visto que os mecanismos de respiração e fermentação seguem a cinética de Monod (BAILEY e OLLIS, 1986). Partindo destas considerações pode ser escrito um balanço de massa para cada uma das espécies consideradas no modelo. As equações (2.34) a (2.37) apresentam estes balanços.

$$\frac{dC_B}{dt} = 2r_A + 2r_B - r_C \quad (2.34)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = r_C - r_A - r_B \quad (2.35)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = a_2 r_A - a_3 r_B \quad (2.36)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -a_1 r_A \quad (2.37)$$

As equações (2.38) e (2.39) mostram as equações para o cálculo de velocidades específicas de consumo de oxigênio e de produção de dióxido de carbono, assim como a equação (2.40) mostra a velocidade de crescimento celular.

$$q_S = -\frac{1}{C_X} \frac{dC_S}{dt} = -\frac{a_1 r_A}{C_X} \quad (2.38)$$

$$q_E = \frac{1}{C_X} \frac{dC_E}{dt} = -\frac{a_2 r_A - a_3 r_B}{C_X} \quad (2.39)$$

$$\mu = \frac{1}{C_X} \frac{dC_X}{dt} \quad (2.40)$$

A velocidade de consumo de oxigênio é proporcional à velocidade de crescimento celular (respiração). A velocidade específica de produção de dióxido de carbono pode ser encontrada através de um balanço para o carbono. As equações (2.41) e (2.42) são as equações propostas para a velocidade específica de consumo de oxigênio e a velocidade específica de produção de dióxido de carbono.

$$q_{O_2} (\text{mol/gm.h}) = \frac{0,048 r_B}{C_X} \quad (2.41)$$

$$q_{CO_2} = \frac{0,04 q_S - 0,052 q_E - 0,48 \mu}{12} \quad (2.42)$$

Com base nas equações (2.41) e (2.42) apresentadas acima o quociente respiratório, RQ, pode ser calculado pela equação (2.43).

$$RQ = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}} = \frac{CER}{OUR} \quad (2.43)$$

As constantes do modelo foram obtidas a partir de ajustes com base nos dados experimentais. O modelo proposto por HALL *et al.* (1978) descreve de forma razoável o metabolismo de consumo do carbono e de produção de energia. A estrutura deste modelo baseada em dois estágios de divisão celular tem como consequência que a fração de massa celular (células do tipo B) aumenta linearmente e a fração de células (células do tipo A) decrescem com a velocidade de crescimento específico. BLANCH e CLARCK (1997) também apresentam o modelo de crescimento celular proposto por estes autores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item apresenta-se a metodologia experimental para execução dos experimentos em escala de laboratório. Descrevem-se os equipamentos experimentais existentes no laboratório de Simulação e Controle de Processos do DEQ/UFSCar, como biorreator e acessórios de medida, sistema de aquisição de dados, bem como os meios de cultura, condições experimentais e as metodologias analíticas utilizadas. São apresentadas as ferramentas de programação e as técnicas para implementação dos modelos matemáticos do processo utilizados para o processo de produção de levedura.

3.1. Microrganismo

Os experimentos foram realizados empregando fermento comercial fresco (adquirido no comércio local, marca Fleishmann). O fermento consistia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* contendo 70% de umidade, em média.

3.2. Meios de Cultura

- **Cultivos em Batelada e Batelada Alimentada**

Para os experimentos realizados em batelada e em batelada alimentada, o meio de cultura continha a seguinte composição:

- Levedura de panificação (Fleischmann) com concentração inicial de 1,0 g/l
- fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 5,0g/l
- sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 4,5g/l
- sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,5g/l
- extrato de levedura 30,0 g/l
- anti-espumante (surfanol) 1,0 ml por litro de meio.

Com relação à concentração de glicose ou AR (concentração de açúcar redutor) do meio a informação consta da Tabela 4.1.

3.3. Métodos de Análise

- **Análise da Concentração Celular**

Método da massa seca. Esse método consiste em fazer o monitoramento da concentração celular total existente dentro do biorreator. Retirava-se 20,0 ml do meio reacional. Essa amostra era centrifugada por 20 minutos a 8000-g. O sobrenadante do material centrifugado era coletado e armazenado para análise posterior. A massa sedimentada era colocada em pequenos recipientes metálicos previamente pesados (balança de precisão) e colocados em estufa para secagem a 100 °C até obtenção de massa constante. Os recipientes eram novamente pesados e a diferença entre os pesos representava a massa celular da amostra. A partir dessa massa e do volume obtinha-se a concentração celular.

- **Análise da Concentração de Glicose**

Método de cromatografia líquida de alta eficiência. As concentrações de etanol e glicose de alguns cultivos foram feitas por este método de análise, que implica na análise das amostras em um sistema provido com injeção de 20 µL de amostra por meio de bombas Waters modelo 510 utilizando uma coluna de troca iônica modelo KS-801 × 1,3 cm, detector Waters 410, usando como eluente (fase móvel da coluna) água deionizada a uma vazão de 1 mL/min e temperatura controlada de 80°C.

Método enzimático para análise da concentração de glicose. Foi utilizado um kit para análise enzimática gentilmente cedido pela empresa Laborlab Produtos para Laboratório LTDA (Henry *et al.*, 1974).

- **Análise da Concentração de Etanol**

Método de cromatografia líquida de alta eficiência. A descrição é a mesma para a apresentada para a análise de glicose.

Método de oxidação pelo Dicromato método desenvolvido por Goslyn (1980).

- **Viabilidade Celular**

A determinação da concentração de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer empregando a técnica de coloração com azul de metileno (Antonini, 2004).

- **Gases e Efluentes**

A determinação da concentração do gás oxigênio e do dióxido de carbono foi possibilitada pela utilização de um analisador de gases da fabricante Sick|Maihak modelo S-710.

3.4. Biorreator e Sistema de Aquisição de Dados

Reator tipo tanque agitado e aerado modelo 5 L (Comercial Metalúrgica LTDA, São Carlos, SP).

Controlador Lógico Programável (CLP) – National Instruments, modelo cFP 2020, utilizado na aquisição e controle das variáveis operacionais como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, velocidade de agitação, vazão de ar e fração molar dos gases de exaustão do biorreator.

Os cultivos foram realizados em modo batelada e batelada alimentada, empregando levedura de panificação (levedura comercial marca Fleischmann). Os meios de cultivo eram compostos por melaço diluído e meio sintético composto por glicose.

Mais detalhes podem ser vistos na Figura 3.1 que vem ilustrar o aparato experimental utilizado na realização dos experimentos tratados neste trabalho.

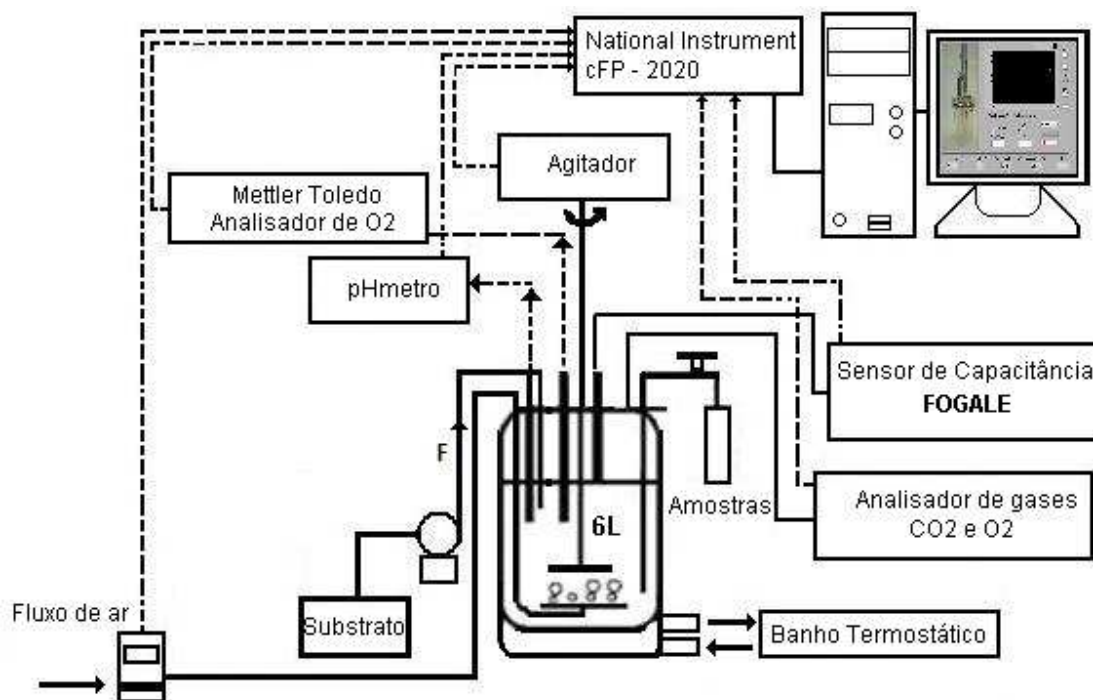


FIGURA 3.1 – Aparato experimental utilizado para os experimentos.

3.5. Analisador de Concentração Celular

Foi empregado um sensor capacitivo do fabricante Fogale nanotech (modelo BIOMASS System, Los Angeles, EUA).

Este equipamento uma vez calibrado fornecia medidas da concentração celular em tempo real. Todo procedimento de calibração e os resultados obtidos serão apresentados no capítulo 4 (Resultados e Discussão).

O princípio de funcionamento do equipamento se baseia no fato de que as células viáveis funcionam como um capacitor caso suas membranas celulares estejam intactas. Usando frequências entre 0,1 e 10,0 MHz o equipamento fazia o monitoramento da permissividade dielétrica (ϵ , em pF/cm), que era diretamente proporcional à concentração de células viáveis como pode ser visto na figura 3.2 (NEVES *et al.*, 2000).

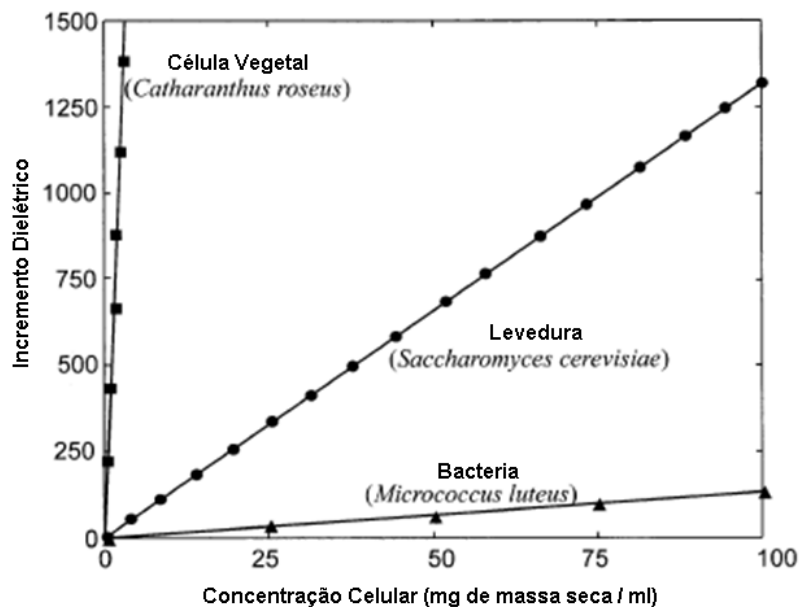


FIGURA 3.2 – Incremento da permissividade em função da massa celular, adaptado de Markx and Davey, 1999

3.6. Método do balanço gasoso

O biorreator foi tomado como volume de controle para a realização do balanço gasoso. A Figura 3.3 mostra o volume de controle. As frações molares dos gases de saída do biorreator ($Y_{O_2}^S$ e $Y_{CO_2}^S$) são quantificadas através de analisadores de gás (paramagnético para o oxigênio e infravermelho para o dióxido de carbono). A partir da vazão molar de entrada de ar (medida pelo medidor de vazão) e com as frações molares dos gases de saída do biorreator é possível determinar a vazão molar do gás de saída.

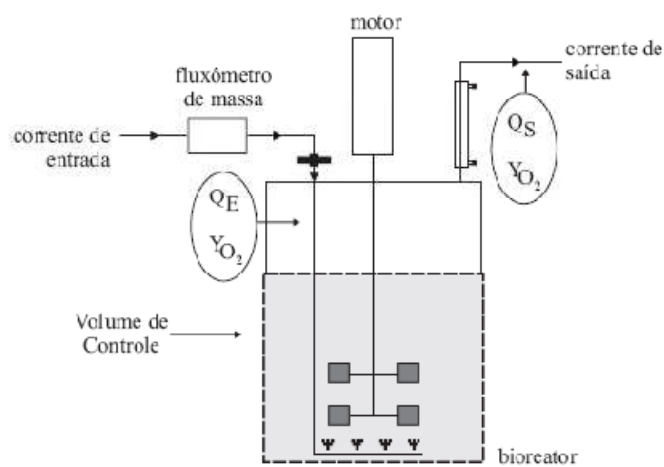


FIGURA 3.3 – Volume de controle utilizado para o balanço gasoso.

Considera-se que o ar de entrada é seco, sendo constituído de 79% de N_2 e 21% de O_2 e que o gás de saída do reator é constituído de N_2 , O_2 e CO_2 . Através deste balanço gasoso é possível determinar a fração molar de nitrogênio na corrente de saída a partir das frações de oxigênio e gás carbônico, medidas experimentalmente. A fração é dada pela equação (3.1):

$$Y_{N_2}^S = 1 - Y_{O_2}^S - Y_{CO_2}^S \quad (3.1)$$

É feito um balanço molar para o nitrogênio que é um gás inerte, indicando que a taxa mássica de nitrogênio na corrente de entrada do biorreator é a mesma da corrente de saída. A fração molar de N_2 na corrente de entrada é considerada como sendo de 0,79. A vazão molar de saída (Q_s) pode ser calculada:

$$Q_s = \frac{Y_{N_2}^e Q_e}{1 - Y_{O_2}^S - Y_{CO_2}^S} \quad (3.2)$$

A quantidade total de CO_2 gerada ao longo do cultivo pode ser calculada pela equação (3.3):

$$nCO_2 = \int_{t=0}^{t=t_f} Q^S Y_{CO_2}^S dt \quad (3.3)$$

Substituindo Q_s encontra-se:

$$nCO_2 = \int_{t=0}^{t=t_f} \left(\frac{Q^e Y_{N_2}^e}{1 - Y_{O_2}^S - Y_{CO_2}^S} \right) Y_{CO_2}^S dt \quad (3.4)$$

A quantidade total de O_2 consumida no cultivo pode ser determinada também de forma análoga ao que foi feito para o CO_2 .

$$nO_2 = \int_{t=0}^{t=t_F} \left(Q^e Y_{O_2}^e - \left(\frac{Q^e Y_{N_2}^e}{1 - Y_{O_2}^s - Y_{CO_2}^s} \right) Y_{O_2}^s \right) dt \quad (3.5)$$

Se forem conhecidos os valores de nCO_2 e nO_2 é possível calcular o quociente respiratório (RQ) definido por:

$$RQ_{global} = \frac{n_{CO_2}}{n_{O_2}} \quad (3.6)$$

Este será o RQ no cultivo como um todo, desde o tempo inicial até o tempo final. No entanto para efeito de controle, é melhor que seja utilizado o RQ pontual, isto é, em pontos discretos ao longo do processo.

É possível determinar também a velocidade de respiração do microorganismo com os dados obtidos no balanço gasoso, volume do meio de cultivo (V), vazão molar de gás na entrada (Q_E) e as frações molares de O_2 e CO_2 na saída do biorreator ($Y_{O_2}^s$ e $Y_{CO_2}^s$).

$$RC_x = \frac{1}{V} \left[Q_E Y_{O_2}^E - \left(\frac{Y_{N_2}^E Q_E}{1 - Y_{O_2}^s - Y_{CO_2}^E} \right) Y_{O_2}^s \right] \quad (3.7)$$

3.7. Desenvolvimento da Interface de Supervisão em Plataforma LabVIEW

3.7.1 Ambiente de Programação LabVIEW

O LabVIEW (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*) usa uma linguagem de programação chamada G. Essa linguagem possui diretivas como PASCAL e C, mas que ao invés de utilizar comandos na forma de texto para gerar as linhas de código, usa uma linguagem de programação gráfica, ou seja, o programa é feito na forma de um diagrama de blocos.

Utilizando uma estrutura de programação orientada pelo fluxo de dados e hierárquica, o LabVIEW torna simples a implementação de sistemas complexos que englobem aquisição e manipulação de dados ou ainda o controle de equipamentos através do computador. Além disso, o LabVIEW inclui diversas bibliotecas compostas por

componentes contendo funções para aplicações específicas (algoritmos de análise estatística, processamento e geração de sinais, etc.) (*LabVIEW Tutorial Manual*, 1996).

3.7.2 Instrumentos Virtuais

Qualquer programa feito em LabVIEW é chamado de instrumento virtual (VI – *virtual instrument*) já que sua aparência e operação assemelham-se às de instrumentos reais. Um VI, assim como um programa usual, é composto por um conjunto de instruções que fazem a manipulação e fluxo dos dados, e por uma interface com o usuário, na qual se encontram as entradas e saídas necessárias. Basicamente pode-se identificar em um VI duas partes que o compõem:

- **Diagrama de blocos** – é a estrutura do programa propriamente dita que contém o código fonte construído de forma gráfica;
- **Painel frontal** – constitui a interface com o usuário, apresentando de forma visual todos os controles, gráficos e indicadores formando uma tela que simula o painel físico de um instrumento. Este pode ser formado por botões, *leds*, *knobs* e indicadores que permitem a interação através do *mouse* ou do teclado do computador.

3.7.3 Construção do painel de controle

Para a construção do painel frontal, painel de supervisão e controle dos experimentos, foi estudado a melhor forma de disposição das principais variáveis do processo e a facilidade com que o operador teria acesso aos comandos.

Esta interface usuário-processo foi construída com gráficos indicando o comportamento de cada variável em relação ao tempo, botões de liga-desliga, sinais visuais indicadores de operação dentre outros componentes. O resultado obtido com a elaboração dessa interface pode ser vista na Figura 3.4.

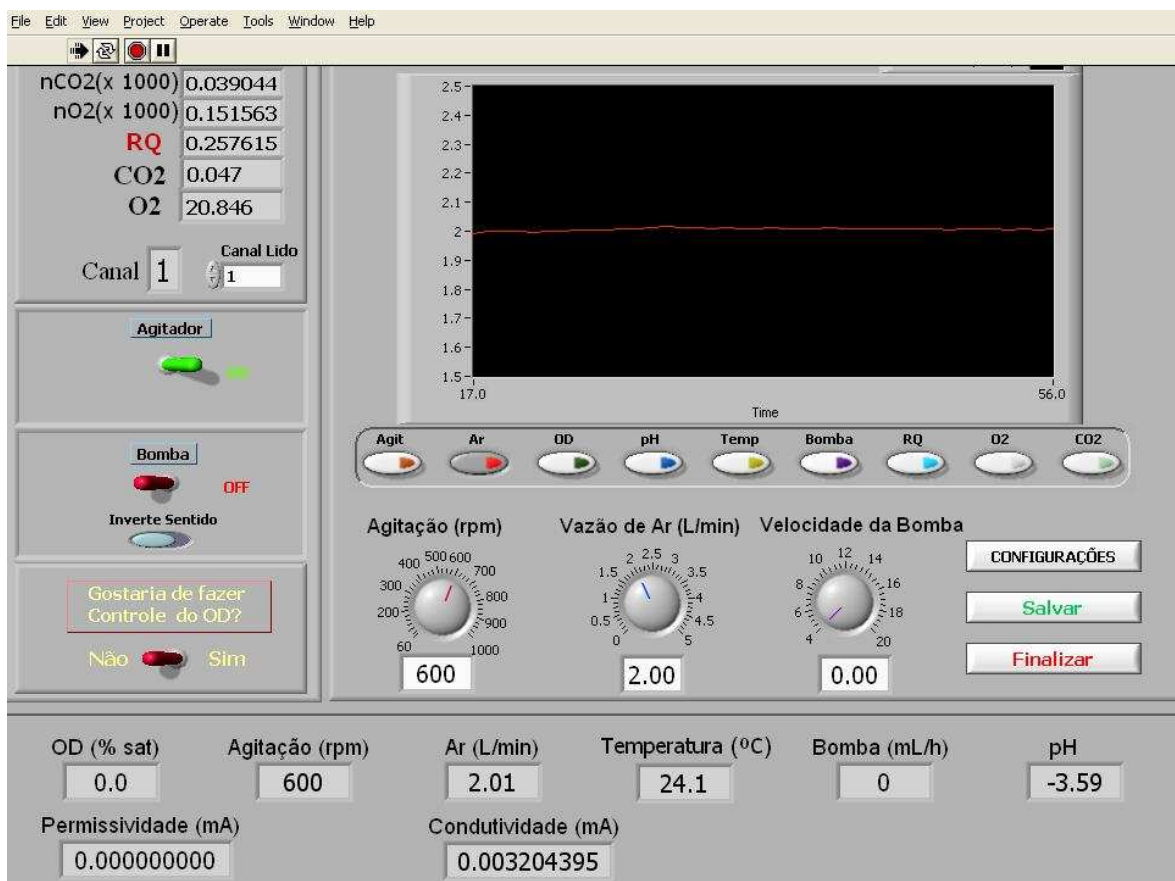


FIGURA 3.4 – Interface de supervisão e controle disponível ao operador

Por meio dessa interface o operador do equipamento poderia também acionar a opção “CONFIGURAÇÕES”, nela encontraria todas as opções necessárias para escolher o tipo de controle a ser acionado no processo, além de realizar as devidas configurações do controle a ser acionado. Esta tela de configuração de controle pode ser observada pela Figura 3.5.

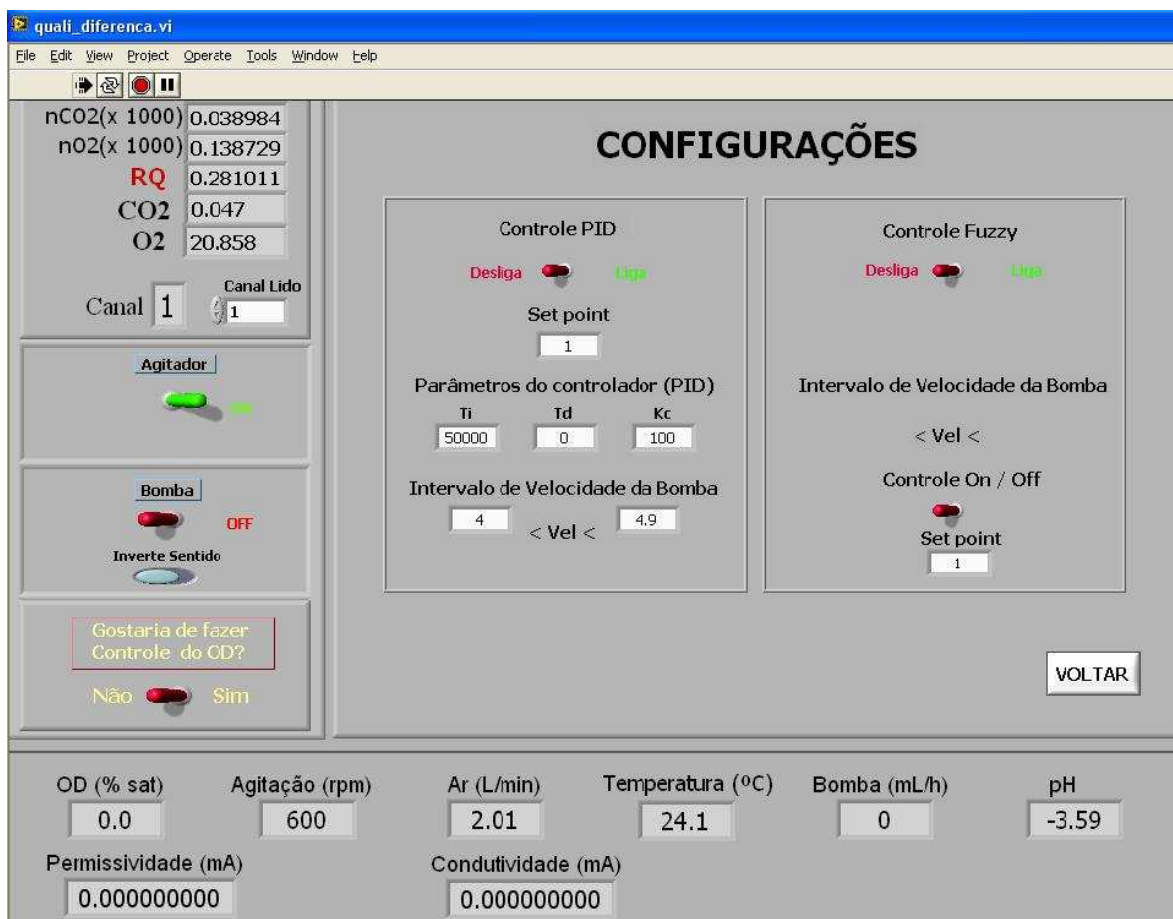


FIGURA 3.5 – Tela de escolha e configuração para os controles disponíveis

3.8. Implementação do Algoritmo Fuzzy

O algoritmo *fuzzy* foi implementado por meio da ferramenta existente no programa MatLab (versão 6.5) para essa finalidade (*FIS- FUZZY INFERENCE SYSTEM*).

O *FIS* do *Matlab* foi a ferramenta escolhida para implementação, pois ela traz vários recursos gráficos que auxiliam na construção de sistemas *fuzzy*. Um dos recursos é o editor *FIS*, onde são definidos a quantidade e os nomes das variáveis lingüísticas, escolha do método de inferência e método de defuzzificação do sistema (Figura 3.6).

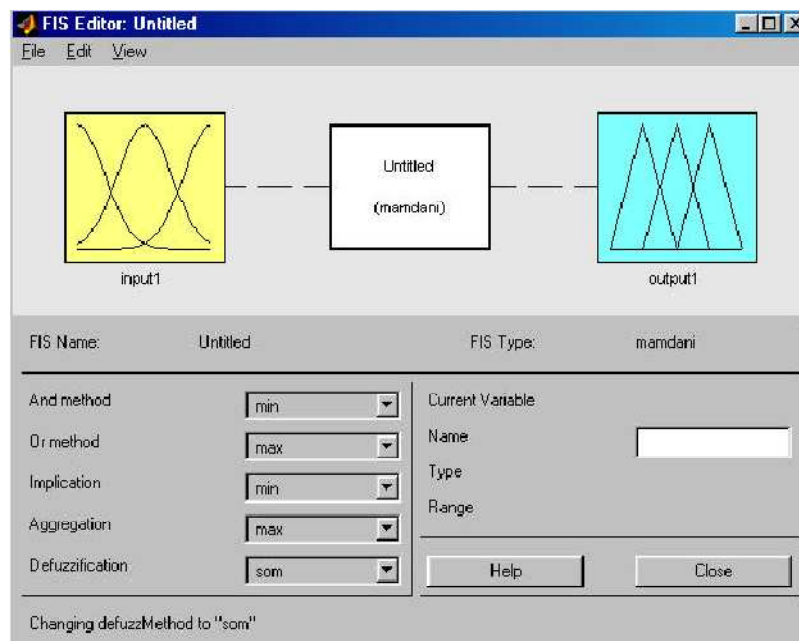


FIGURA 3.6 – Tela do editor *FIS* onde são definidas as variáveis lingüísticas e saídas do controlador *fuzzy*.

Outras funcionalidades são o editor de funções de pertinência, editor de regras *fuzzy* e visualizador de superfície, que representam o conhecimento especialista humano em um mapeamento computacional, como exemplificado na Figura 3.7.

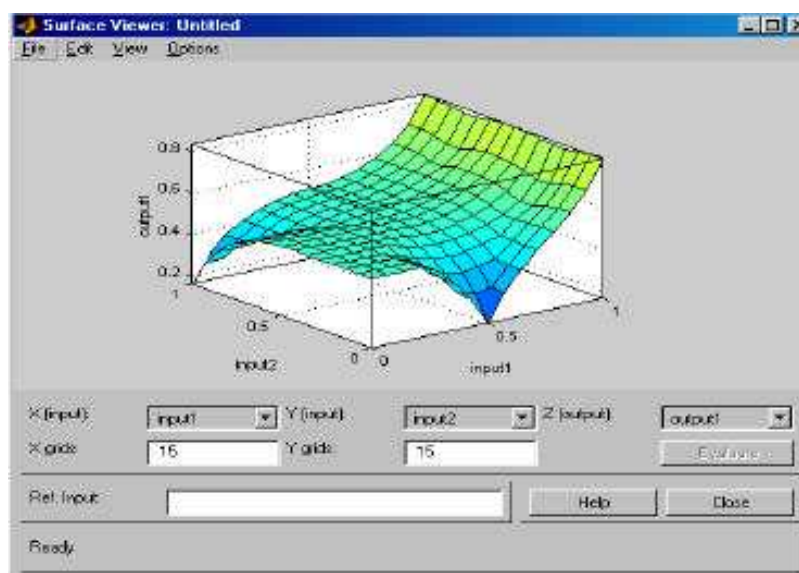


FIGURA 3.7 – Visualizador de superfície que representa o conhecimento especialista humano em um mapeamento computacional.

Cada controlador *fuzzy* consistia de várias funções de pertinência, onde as variáveis lingüísticas (variáveis de entrada) eram tratadas via funções de pertinência e regras de tomada de decisão, para então se ter a vazão de alimentação da bomba de meio suplementar como saída desse mesmo controlador. As funções de pertinência para cada algoritmo de controle será vista com maiores detalhes no capítulo 4 deste trabalho (Resultados e Discussões).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizados nove cultivos, sendo três no modo batelada e seis cultivos em batelada alimentada, com as condições apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Condições de cultivo utilizadas nos experimentos.

	Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	Exp5	Exp6	Exp7	Exp8	Exp9
Modo de operação	BA*	BA*	BA*	BA*	B**	B**	B**	BA*	BA*
Controle usado	<i>On-off</i>	P	<i>Fuzzy</i>	<i>Fuzzy</i>	---	---	---	<i>Fuzzy</i>	<i>Fuzzy</i>
Concentração inicial de glicose/AR (g/L)	5,0	5,0	5,0	1,1	5,2	5,5	8,5	0,5	0,5
Concentração celular inicial (g/L)	1,0g/L	1,0g/L	1,0g/L	1,5g/L	1,3g/L	1,0g/L	1,0g/L	1,7g/L	1,5g/L
Volume inicial (L)	2,0	2,0	2,0	4,0	---	---	---	4,0	4,0
Volume final (L)	5,0	5,0	5,0	6,0	5,0	5,0	5,0	6,0	6,0
Volume do meio suplementar (L)	3,0	3,0	3,0	2,0	---	---	---	2,0	2,0L
Concentração de glicose/AR no meio suplementar (g/L)	30,0	30,0	30,0	11,5	---	---	---	11,5	11,5

** B - Batelada

* BA - Batelada Alimentada

A concentração inicial de glicose foi programada para 5 g/l, no entanto, como o consumo celular era lento devido a baixa concentração celular, fazia com que o controlador demorasse um tempo relativamente alto para começar a atuar na bomba de meio suplementar, assim, para que o tempo de atuação do controlador fosse maximizado, a concentração de glicose inicial foi reduzida para 0,5 g/l.

Os primeiros pontos de amostras foram retirados após 5 minutos a partir do início do cultivo, isso para que as células pudessem já terem passado pela fase *lag* (fase de adaptação celular).

Os primeiros cultivos (Exp1 a Exp3) foram feitos com meio suplementar formado por caldo de cana diluído (gentilmente cedido por Usina de Açúcar e Álcool da região de São Carlos). Nos demais experimentos o meio de cultivo foi substituído pela utilização de meio sintético empregando glicose como fonte de carbono e energia de forma a manter a reprodutibilidade dos cultivos.

Os primeiros testes de controle foram feitos com este meio de cultivo (caldo de cana). Problemas ocorreram e nestes ensaios não foi possível obter os valores

experimentais da concentração celular, glicose e etanol. Serão apresentados apenas os dados da aquisição em tempo real (quociente respiratório). Estes ensaios foram úteis para ajustar a plataforma de aquisição de dados elaborada no programa LabVIEW. Foram realizados três ensaios, os experimentos Exp1, Exp2 e Exp3 em modo batelada alimentada.

No primeiro experimento (Exp.1) foi utilizada a estratégia de controle “*on-off*”. A Figura 4.1 apresenta os resultados do quociente respiratório (RQ) e da bomba de meio suplementar durante o experimento. Neste ensaio, ajustou-se como *set-point* o valor de RQ em 1,0. A bomba peristáltica que adicionava o meio suplementar era acionada quando o valor de RQ encontrava-se abaixo 1,0 e desligada quando o RQ encontrava-se acima de 1,0. Há de se ressaltar que esta estratégia foi utilizada para avaliar a comunicação entre o sistema supervisor e a bomba peristáltica, devido à sua simplicidade de implementação.

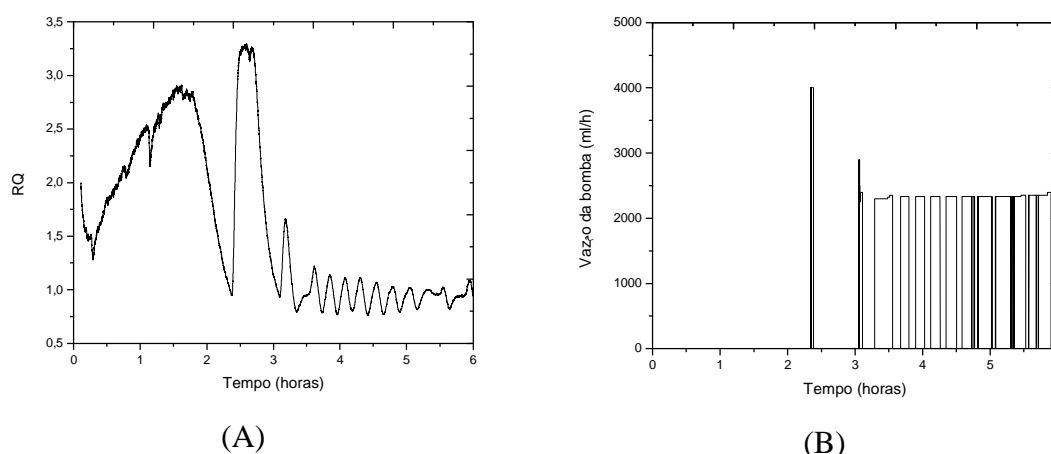


FIGURA 4.1 – Comportamento do quociente respiratório (A) e da bomba de alimentação de meio suplementar (B) ao longo do experimento Exp1 (batelada alimentada com controlador on-off).

No segundo experimento (Exp2) avaliou-se o algoritmo de controle P no controle da bomba de suplementação. A Figura 4.2 apresenta os valores do quociente respiratório (RQ) e da bomba de meio suplementar ao longo do cultivo. O valor do *set-point* de RQ foi ajustado em 1,0. Os parâmetros do controle PID foram: constante proporcional (K_c) igual a 60, constante integral (T_i) igual a $2 \cdot 10^6$ e constante derivativa (T_d) igual a zero, logo os melhores parâmetros encontrados levaram a utilização de um

controle P ao invés de um PID. Estes parâmetros foram definidos a partir de vários testes realizados em experimentos preliminares, para tanto foram utilizados mais de 9 cultivos apenas para esta finalidade, tais testes eram extremamente necessários, principalmente porque havia um atraso muito grande na leitura dos gases, esse atraso se devia principalmente pelo comprimento dos dutos de coleta do efluente gasoso até o analisador de gases e se dava também à própria dinâmica do processo (o consumo de glicose pelas leveduras era bastante lento, devido à baixa concentração de levedura, portanto ao dar um “pulso” de glicose no reator demorava-se em torno de 1 minuto até que se verificasse uma mudança na leitura do analisador de gases), os parâmetros do controlador P analisados podem ser vistos pela Tabela 4.2.

A sintonia desses parâmetros era feita da seguinte forma, preparava-se o cultivo normalmente e, ao iniciar o cultivo, escolhia-se valores bastante discrepantes para cada parâmetro, a priori procurava-se zerar as constantes integral e derivativa e, ao conseguir um resultado satisfatório com o parâmetro proporcional modificava-se os demais até que o ajuste conseguisse ser o melhor possível. Quando se passava em torno de duas horas e meia à três horas de cultivo já não se fazia mais a sintonia, pois este tempo inicial é o tempo crítico, é onde o controlador é mais difícil de ser ajustado devido a sua dinâmica mais agressiva, após esse tempo um novo cultivo deveria ser preparado.

Neste experimento salienta-se que houve um problema com a aquisição de sinal da bomba de meio suplementar a partir de 2 horas, sendo este contornado após 30 minutos. O controlador foi acionado a partir do momento em que o RQ caiu a um valor menor que 1 pela primeira vez (em torno de 2h e 15 min após o início do cultivo).

Tabela 4.2 – Ajuste dos parâmetros do controlador P.

Teste	Ti (s)	Td (s)	Kc
1	1E+77	0	10
2	1E+77	0	70
3	2	0,5	3,6
4	1E+6	0	80
5	3E+6	0	80
6	5E+6	0	80
7	3E+6	0,01	80
8	2E+6	0	80
9	2E+6	0	60

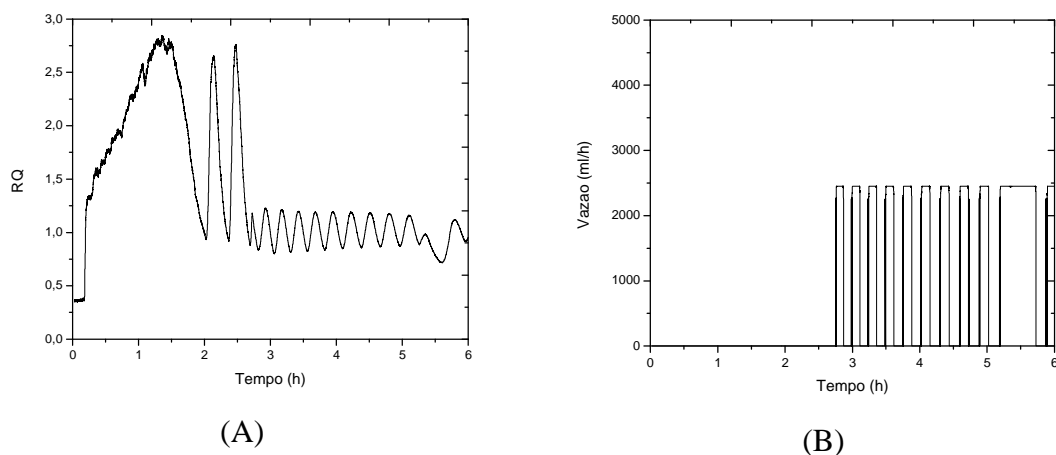


FIGURA 4.2 – Comportamento do quociente respiratório (A) e da bomba de alimentação de meio suplementar (B) ao longo do experimento Exp2 (batelada alimentada).

No terceiro experimento (Exp3) objetivou-se avaliar o algoritmo de controle baseado na lógica *fuzzy*. Este controlador *fuzzy* teve como variáveis de entrada o quociente respiratório RQ e a derivada da fração molar de dióxido de carbono (Y_{CO_2}).

A derivada da fração molar foi escolhida devido ao seu importante comportamento de representar fielmente a atitude do RQ.

Foi escolhida a derivada da fração molar do dióxido de carbono ao invés da própria derivada do RQ, pelo fato de que o RQ, por ser a razão entre a fração molar de dióxido de carbono e oxigênio, naturalmente apresenta mais ruídos em seu sinal. Portanto a fração molar do dióxido de carbono supre bem este papel no lugar do RQ.

A Figura 4.3 apresenta os valores do quociente respiratório (RQ) e da bomba de meio suplementar ao longo do cultivo.

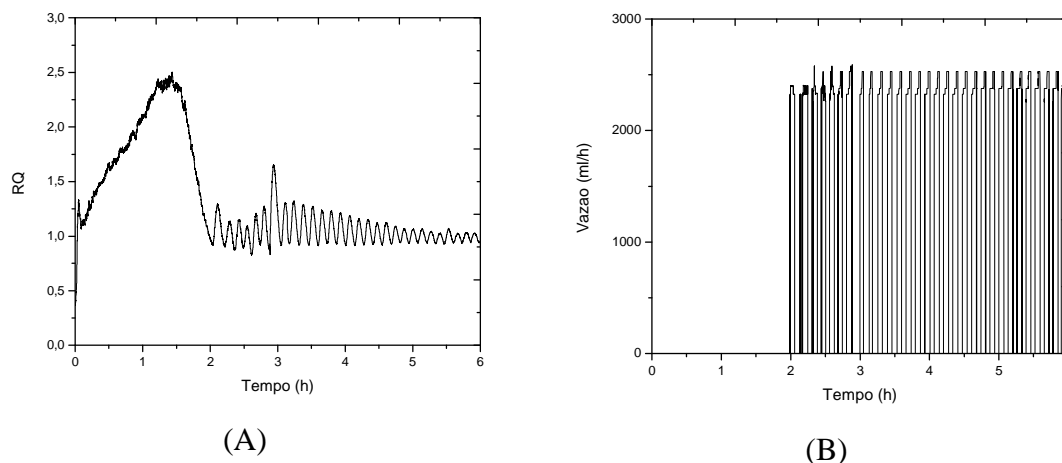


FIGURA 4.3 - Comportamento do quociente respiratório (A) e da bomba de alimentação de meio suplementar (B) ao longo do experimento Exp3 (batelada alimentada).

Observando as Figuras 4.1 a 4.3 depreende-se que a oscilação nos dados da variável RQ foi mais intensa no Exp1 que nos demais. No Exp2 a oscilação perdura por um tempo menor que no Exp1 e com uma ligeira queda na oscilação. No experimento Exp3 a oscilação é bem menor que nos dois primeiros experimentos, estabilizando em torno do *set-point* em um tempo bem mais curto. Contudo, a frequência de oscilação da bomba peristáltica foi bem mais acentuada. Ainda assim, pode-se dizer que o algoritmo de controle *fuzzy* mostrou-se mais eficiente que os controladores *on-off* e PID no controle de vazão da bomba de meio suplementar. Apesar dos problemas ocorridos na parte analítica (Exp1 a Exp3) e operacional (Exp2), salienta-se que estes experimentos foram úteis para o teste preliminar da plataforma de aquisição de dados e controle implementada no programa LabVIEW.

4.1. Ajuste do Analisador de Células

O sensor capacitivo fornecia um sinal analógico durante os experimentos. Esse sinal está diretamente relacionado com a leitura da concentração de células viáveis presente no meio de cultivo. O sinal era enviado para o sistema de aquisição de dados (por meio de corrente elétrica, 4-20 mA). De acordo com o fabricante, o sinal enviado consiste na permissividade elétrica (ϵ) do meio de cultura, o qual está diretamente relacionado com a concentração de células viáveis do meio de cultivo.

Para estabelecer a relação entre a permissividade elétrica do meio de cultivo e a concentração de células viáveis, foram usados os dados dos experimentos Exp4, Exp5, Exp6, Exp7, Exp8 e Exp9.

O quarto cultivo (Exp4), realizado em batelada alimentada, foi conduzido da seguinte forma: utilizou-se estratégia de controle *fuzzy* com sistema de inferência do tipo mandani empregando como parâmetros o valor do quociente respiratório, RQ, obtido em tempo real e a diferença entre um valor de referência para o crescimento celular específico (μ) e o calculado em tempo real a partir dos dados provenientes do analisador de células, para o método de *defuzzificação* foi utilizado o centróide.

O valor de referência para o fator de crescimento específico (μ) foi escolhido baseado em cultivos anteriores. Observou-se que, de acordo com a mudança na dinâmica de crescimento celular do cultivo, o valor de referência tinha que ser ajustado, não sendo assim uma constante durante todo cultivo. Esse valor de referência ficou na faixa de 0,06 e 0,1 h⁻¹. A diferença entre o valor medido pelo equipamento e este valor de referência formava o segundo parâmetro de controle que alimentava o controlador *fuzzy*. O controle *fuzzy*, por sua vez, fornecia o valor de atuação (vazão) da bomba de alimentação do meio suplementar.

A Figura 4.4 apresenta os resultados obtidos neste cultivo (Exp4). As amostras foram retiradas em quadruplicata, sendo assim, o ajuste da permissividade pela massa celular viável desse experimento foi feito pela média das amostras de massa celular.

O ajuste entre a massa celular e o sinal adquirido pelo analisador de células foi feito da seguinte forma: primeiro foi feito um tratamento do sinal adquirido do analisador de massa celular devido ao alto nível de ruído que o sinal apresentava, para este tratamento foi utilizado um polinômio de ajuste à curva obtida pelo equipamento, com este polinômio se tinha uma média do sinal trabalhado, atenuando assim o ruído deste sinal. O gráfico da Figura 4.5 ilustra o sinal adquirido do equipamento analisador da concentração celular ao longo do cultivo.

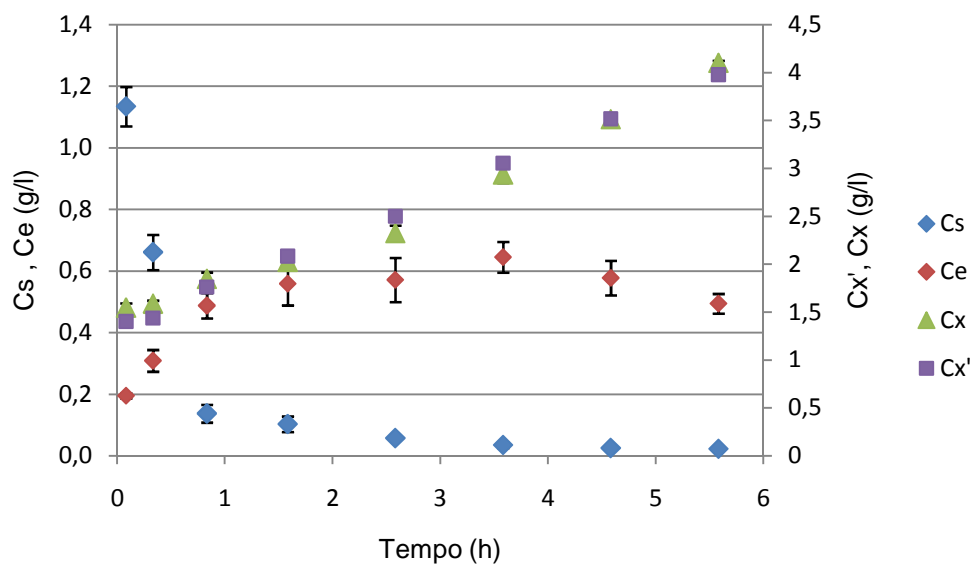


FIGURA 4.4 – Concentração de células em tempo real (Cx') e amostrada (Cx), glicose (Cs) e etanol (Ce), medidas durante o experimento 4 (Exp4).

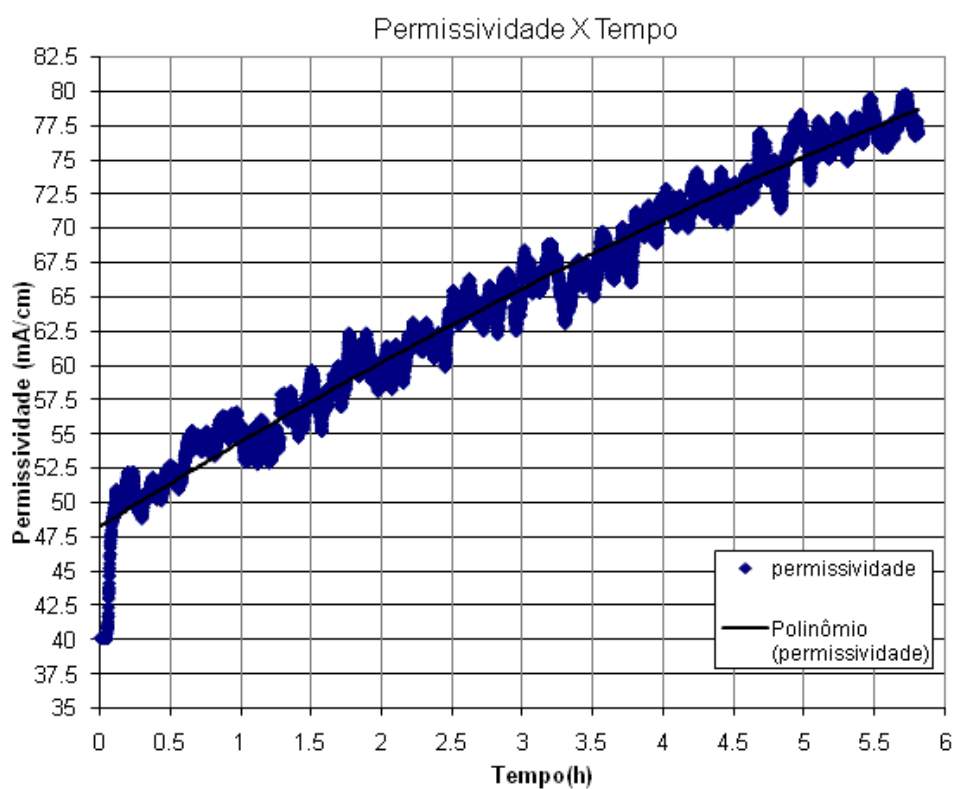


FIGURA 4.5 – Variação da permissividade do meio de cultura ao longo do experimento 4 (Exp4). Dados obtidos a partir do analisador de células.

A correlação entre o valor medido pelo analisador de células (permissividade) e o valor médio de cada ponto amostrado (concentração celular medida pelo método da massa secas) foi elaborada, gerando a curva de calibração apresentada na Figura 4.6.

A viabilidade celular neste experimento foi superior a 97% (em todas as amostras retiradas). Observa-se uma relação linear entre a permissividade e a concentração celular na faixa em que foi realizado o experimento.

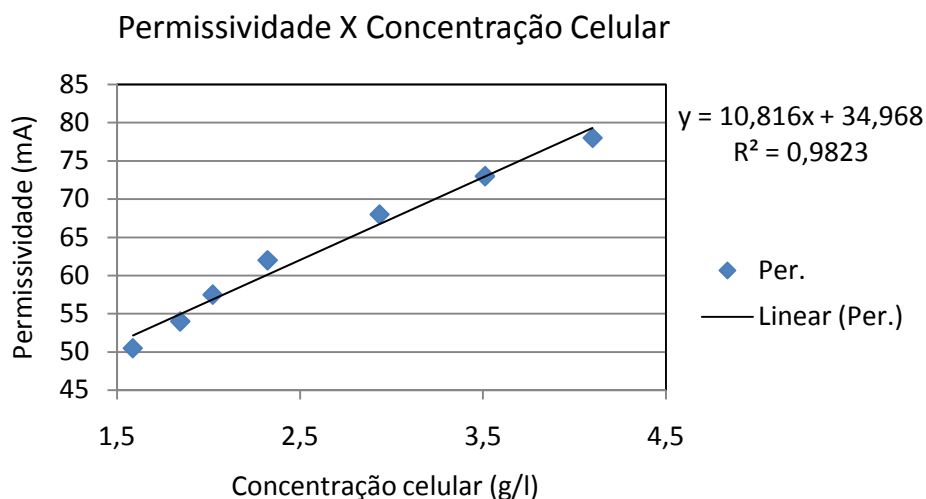


FIGURA 4.6 – Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) *versus* permissividade obtida no equipamento (FOGALE) no experimento 4 (Exp4)

A equação (4.1) apresenta a equação desta curva de calibração relacionando a concentração de células viáveis (C_x) com a permissividade (ϵ) fornecida pelo analisador de células por meio do experimento Exp4.

$$C_x = 0,029 \cdot \epsilon - 3,23 \quad (4.1)$$

Este mesmo procedimento foi repetido para os demais experimentos a fim de comparar os resultados obtidos com os ajustes lineares e, a partir daí, estabelecer uma relação que represente com fidelidade a massa celular dentro do biorreator a partir do sinal de permissividade elétrica fornecido pelo analisador de células.

O experimento Exp5 foi realizado em modo batelada, e os valores das concentrações de células para este experimento podem ser vistos no gráfico da Figura 4.7, onde, C_s é o perfil da concentração de glicose, C_x é o perfil da concentração de

massa celular obtida pelo método de massa seca e C_e é o perfil da concentração de etanol no meio de cultivo. Essa nomenclatura é adotada para todos os experimentos abordados neste trabalho.

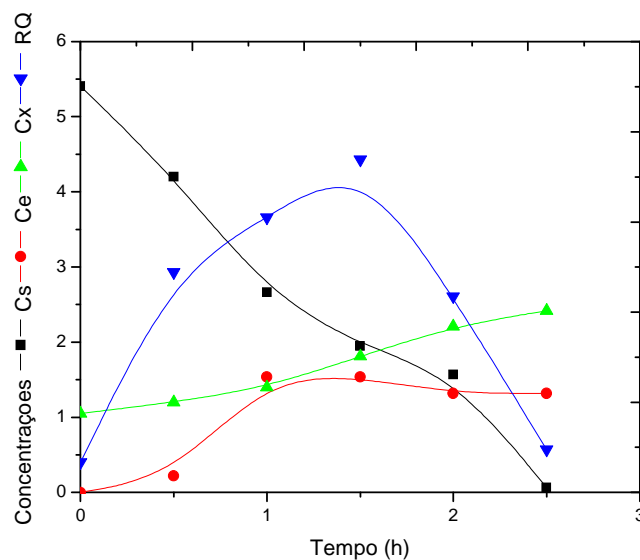


FIGURA 4.7 – Concentração celular (C_x), de glicose (C_s) e etanol (C_e) e RQ (quociente respiratório) ao longo do experimento 5 (Exp5), cultivo realizado no modo batelada.

O mesmo procedimento foi realizado para obter a curva de calibração para este experimento. O resultado pode ser visto na figura 4.8.

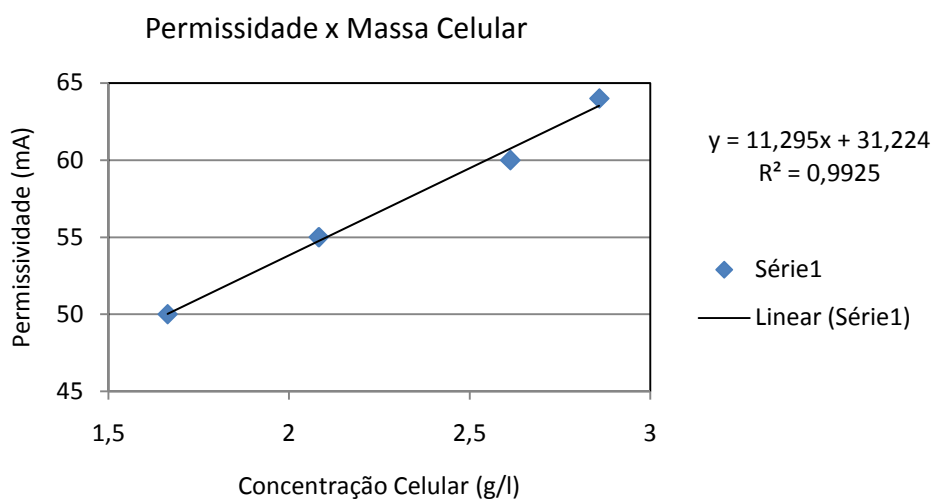


FIGURA 4.8 – Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) *versus* permissividade obtida no equipamento (FOGALE) no experimento 5 (Exp5)

A curva de calibração entre a concentração de células viáveis (C_x) e o sinal proveniente do analisador de células, a permissividade (ϵ), do experimento Exp5 é apresentada na equação (4.2).

$$C_x = 0,032\epsilon - 2,76 \quad (4.2)$$

O mesmo procedimento foi realizado para o experimento 6, Exp6, cujo perfil de concentrações pode ser visto na Figura 4.9.

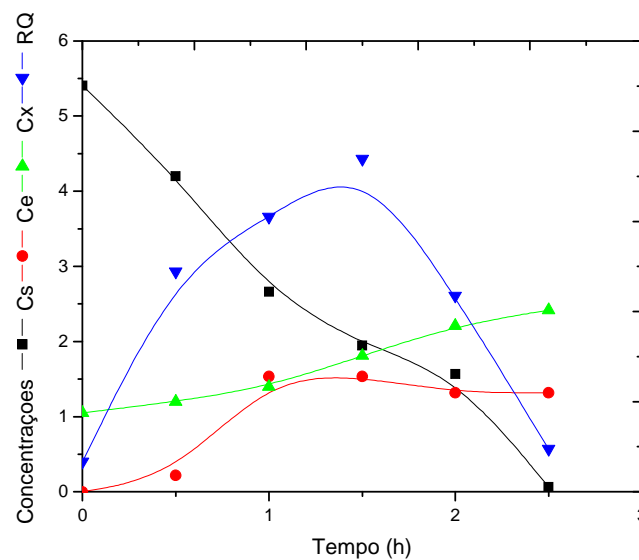


FIGURA 4.9 – Concentração celular (C_x), de glicose (C_s) e etanol (C_e) e RQ (quociente respiratório) obtidas no experimento 6 (Exp6)

O resultado obtido com o ajuste linear entre o sinal de permissividade elétrica do meio e a massa celular analisada pelo método da massa seca desse experimento pode ser visto na Figura 4.10.

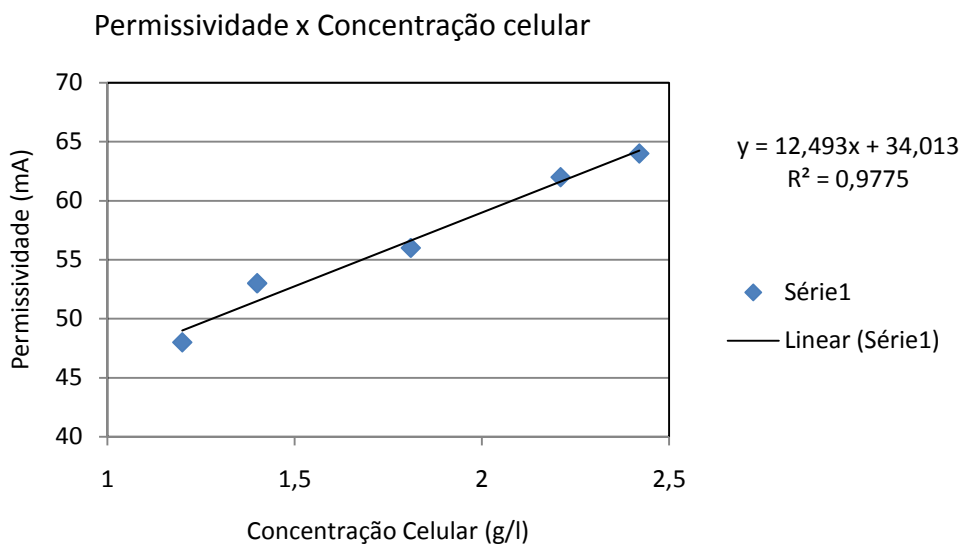


FIGURA 4.10 – Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) *versus* permissividade obtida no analisador de células no experimento 6 (Exp6)

A curva de calibração entre a concentração de células viáveis (C_x) e o sinal proveniente do analisador de células, a permissividade (ϵ), do experimento Exp6 é apresentada na equação (4.3).

$$C_x = 0,029 \cdot \epsilon - 2,72 \quad (4.3)$$

O procedimento de ajuste apresentado para os experimentos Exp4, Exp5 e Exp6, foram aplicados aos experimentos restantes, Exp7, Exp8 e Exp9, e o resultado é apresentado na seqüência.

A Figura 4.11 mostra o perfil de concentrações obtidos no experimento Exp7.

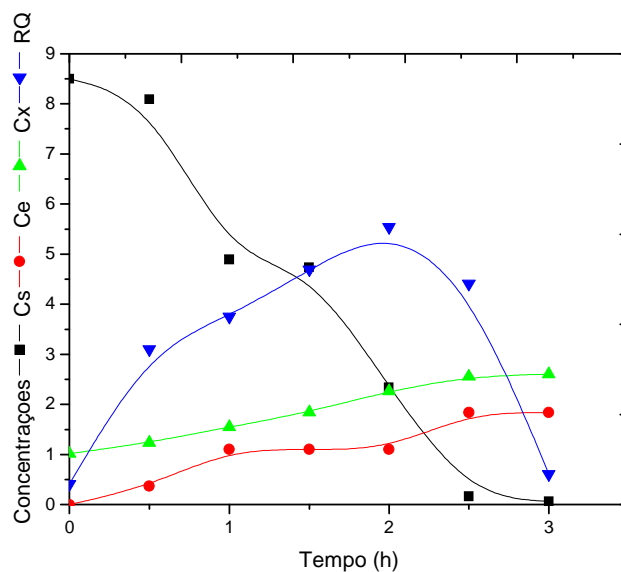


FIGURA 4.11 – Concentração celular (Cx), de glicose (Cs) e etanol (Ce) e RQ (quociente respiratório) obtidas no experimento 7 (Exp7)

O resultado obtido com o ajuste linear entre o sinal de permissividade elétrica do meio e a massa celular analisada pelo método da massa seca desse experimento pode ser visto na Figura 4.12.

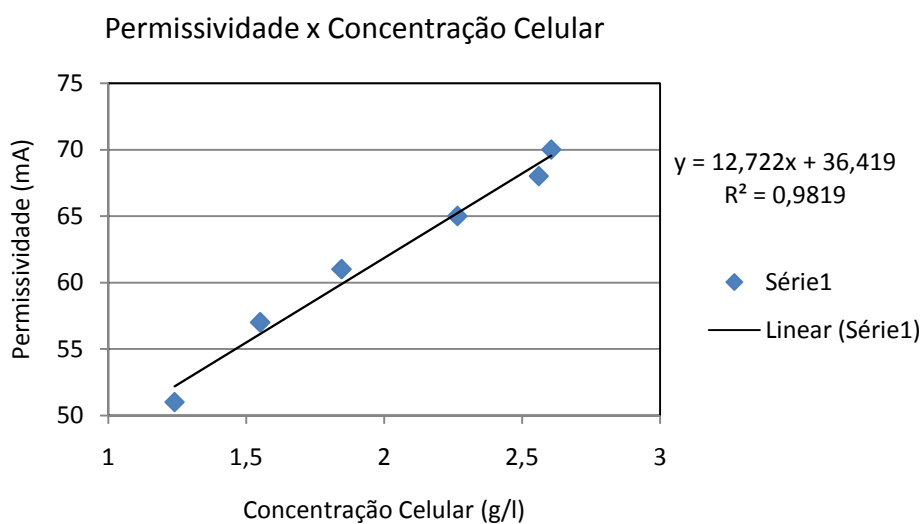


FIGURA 4.12 – Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) *versus* permissividade obtida no analisador de células no experimento 7 (Exp7)

A curva de calibração entre a concentração de células viáveis (C_x) e o sinal proveniente do analisador de células, a permissividade (ϵ), do experimento Exp7 é apresentada na equação (4.4).

$$C_x = 0,027\epsilon - 2,86 \quad (4.4)$$

Para o experimento Exp8 (batelada alimentada) foi obtido o resultado ilustrado pela figura 4.13.

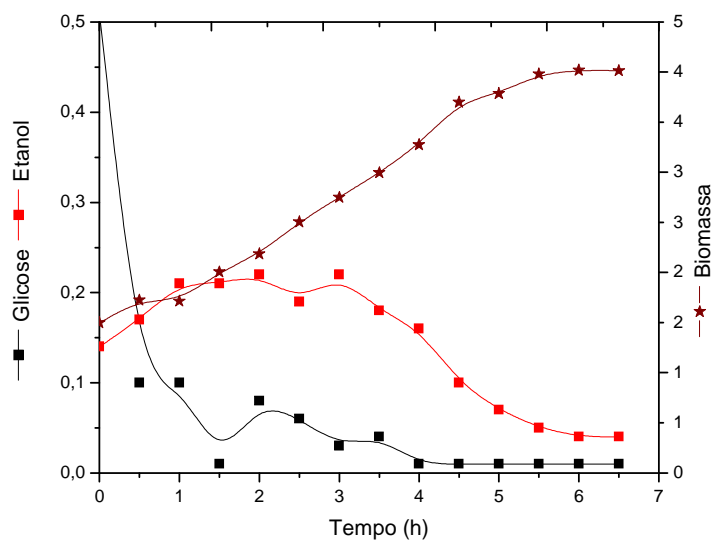


FIGURA 4.13 – Valores experimentais da concentração de células, glicose e etanol ao longo do experimento 8 (Exp8).

O resultado obtido com o ajuste linear entre o sinal de permissividade elétrica do meio e a concentração celular analisada pelo método da massa seca desse experimento pode ser visto na Figura 4.14.

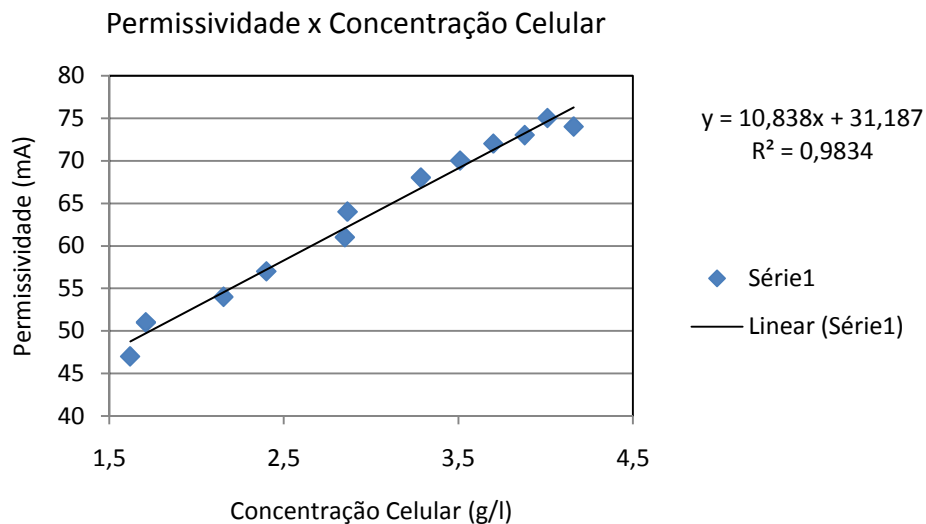


FIGURA 4.14 – Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) *versus* permissividade obtida pelo analisador de células no experimento 8 (Exp8)

A curva de calibração entre a concentração de células viáveis (C_x) e o sinal proveniente do analisador de células, a permissividade (ϵ), do experimento Exp8 é apresentada na equação (4.5).

$$C_x = 0,032\epsilon - 2,88 \quad (4.5)$$

Por fim, para o experimento Exp9 (batelada alimentada) foram obtidos os resultados ilustrados na Figura 4.15. A figura 4.16 apresenta o ajuste linear entre a permissividade e a concentração celular.

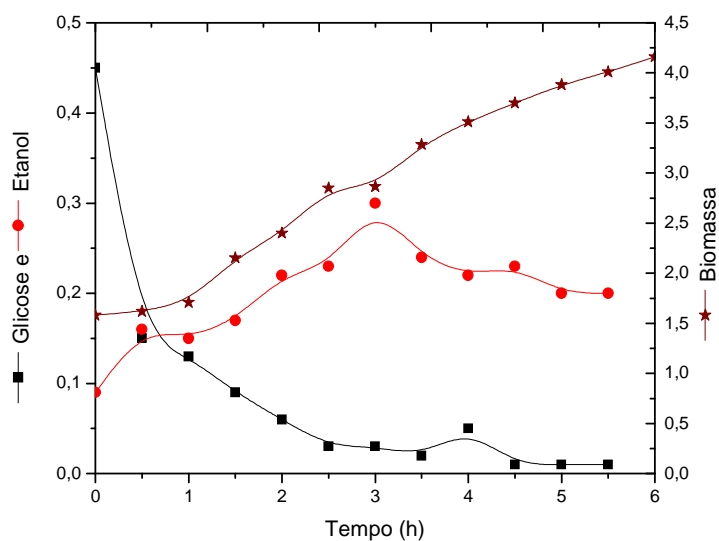


FIGURA 4.15 – Valores experimentais da concentração de células, glicose e etanol ao longo do experimento 9 (Exp9).

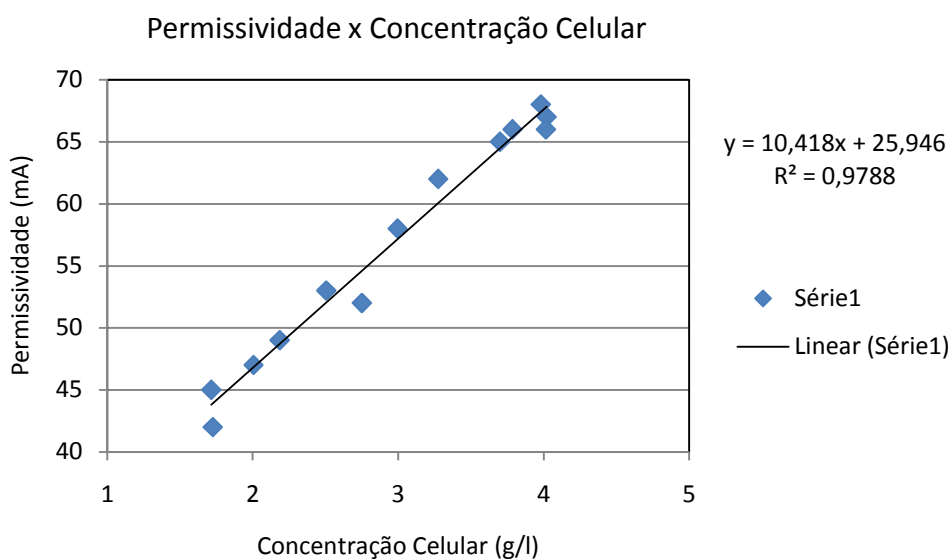


FIGURA 4.16 – Relação entre a concentração celular (viabilidade superior a 97% em todas as amostras) *versus* permissividade obtida pelo analisador de células no experimento 9 (Exp9)

A curva de calibração entre a concentração de células viáveis (C_x) e o sinal proveniente do analisador de células, a permissividade (ϵ), do experimento Exp9 é apresentada na equação (4.6).

$$Cx = 0,038\varepsilon - 2,49 \quad (4.6)$$

Após todo esse processo para os experimentos mostrados anteriormente pode-se notar que as equações de ajuste obtidas são bastante semelhantes, isso vem nos mostrar que é viável a utilização de uma equação de conversão direta do valor da permissividade para a massa celular em tempo real. Isso permite com que esse dado possa ser tratado e usado como um parâmetro de controle, além de permitir que o usuário do equipamento possa acompanhar a leitura correspondente da concentração celular na tela do computador em todo instante do cultivo.

As pequenas diferenças nos coeficientes de ajuste das equações obtidas nos experimentos podem ser atribuídas ao ruído presente no sinal de permissividade. Outro fato a ressaltar é que as medidas foram realizadas próximas do limite inferior do analisador (faixa de medida do analisador: 0 a 280 g/L). Contudo, há de se observar a linearidade entre a permissividade e a concentração celular.

4.2. Avaliação do Modelo Matemático Proposto por Hall *et al.*,1978

Os dados experimentais obtidos neste trabalho foram utilizados para avaliar o modelo proposto por Hall *et al.* (1978). Para o ajuste dos parâmetros do modelo foram utilizados os dados do sexto cultivo, em batelada (Exp6 apresentado pela Figura 4.9).

Neste experimento obteve-se o valor experimental do coeficiente de rendimento célula-substrato ($Y_{x/s}$) de 0,25. Um ajuste visual dos parâmetros do modelo proposto por Hall *et al.* (1978) são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Valores ajustados para os parâmetros do modelo proposto por Hall *et al.*,1978.

Parâmetro	Hall et al.	Ajustado para este trabalho.
k1 (h ⁻¹)	5,0	5,0
K (h ⁻¹)	0,51	0,47
k2 (h ⁻¹)	0,3	0,5
Ks (g/L)	0,5	0,51
a1 (-)	6,67	5,8
a2 (-)	2,8	2,8
a3 (-)	2,22	2,22
KE (g/L)	0,02	0,02

As Figuras 4.17 a 4.19 ilustram os valores experimentais e simulados da concentração celular, de etanol e glicose, respectivamente. A Figura 4.20 apresenta o valor simulado para o quociente respiratório (RQ) ao longo do experimento.

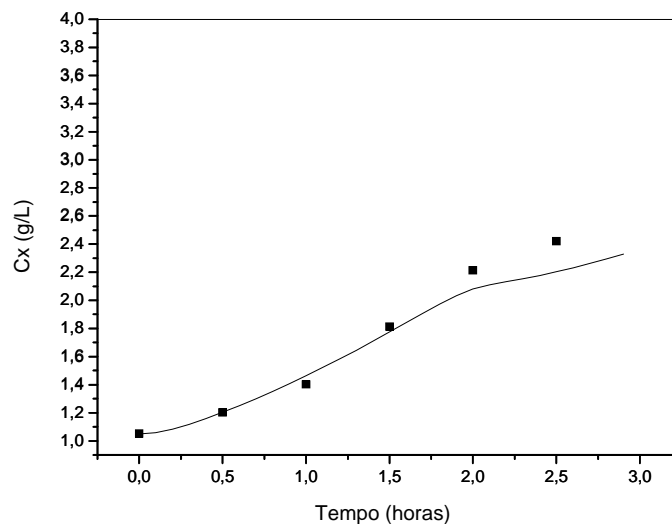


FIGURA 4.17 – Valores simulados para a concentração celular empregando o modelo proposto por Hall *et al.* (1978), para os dados experimentais do cultivo 6 (Exp6).

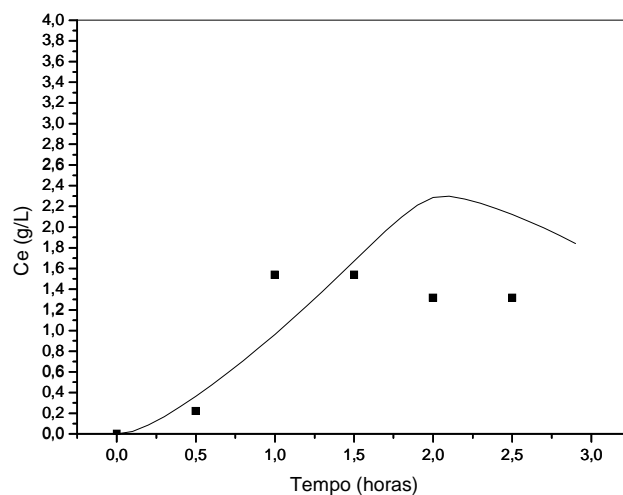


FIGURA 4.18 – Valores simulados para a concentração de etanol empregando o modelo proposto por Hall *et al.* (1978), para os dados experimentais do cultivo 6 (Exp6).

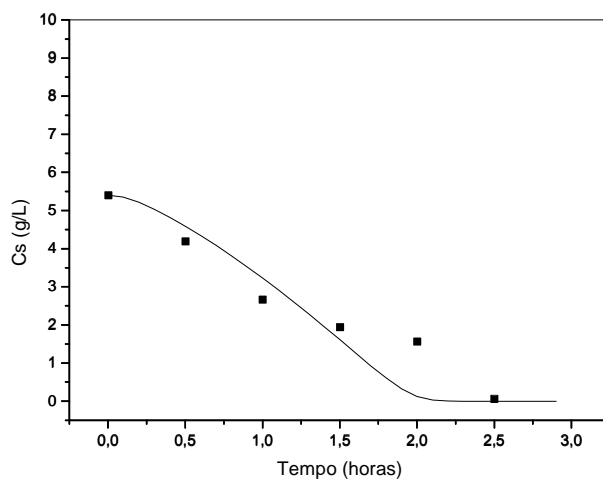


FIGURA 4.19 – Valores simulados para a concentração de glicose empregando o modelo proposto por Hall *et al.* (1978), para os dados experimentais do cultivo 6 (Exp6).

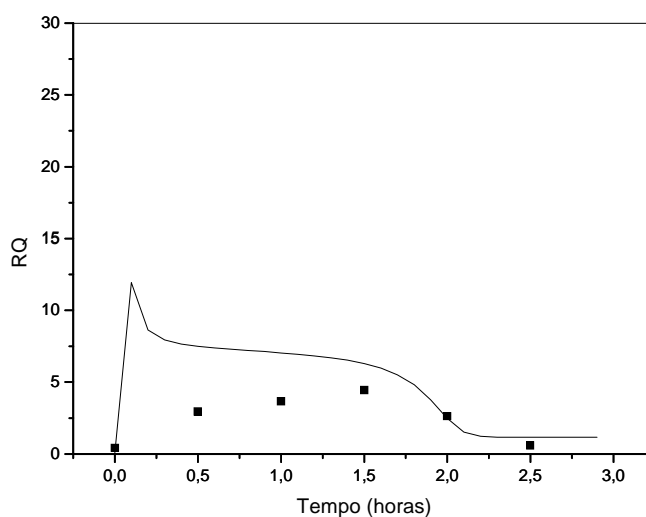


FIGURA 4.20 – Valor do quociente respiratório (RQ) simulado pelo modelo de Hall *et al.* (1978); os pontos representam os valores calculados a partir de medidas do balanço gasoso. Dados referentes ao experimento 6 (Exp6).

Com os mesmos valores dos parâmetros listados na Tabela 4.3 procedeu-se a simulação do modelo proposto por Hall *et al.* (1978) empregando os dados experimentais do experimento 7 (Exp7, Figura 4.11). Neste experimento obteve-se o valor experimental do coeficiente de rendimento célula-substrato ($Y_{x/s}$) de 0,21.

As Figuras 4.21 a 4.23 ilustram os valores experimentais e simulados da concentração celular, de etanol e glicose, respectivamente. A Figura 4.24 apresenta o valor simulado para o quociente respiratório (RQ) ao longo do experimento. Os mesmos valores dos parâmetros listados na Tabela 4.3 foram utilizados nestas simulações.

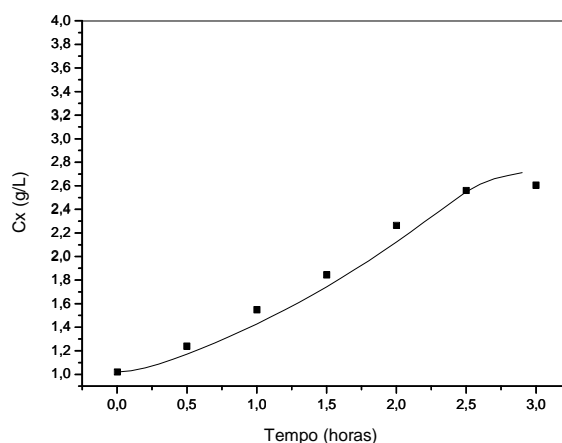


FIGURA 4.21 – Valores simulados para a concentração celular empregando o modelo proposto por Hall *et al.* (1978), para os dados experimentais do cultivo 7 (Exp7).

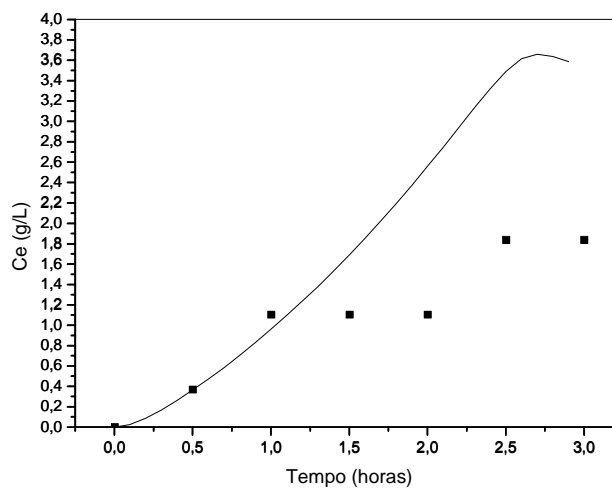


FIGURA 4.22 – Valores simulados para a concentração de etanol empregando o modelo proposto por Hall *et al.* (1978), para os dados experimentais do cultivo 7 (Exp7).

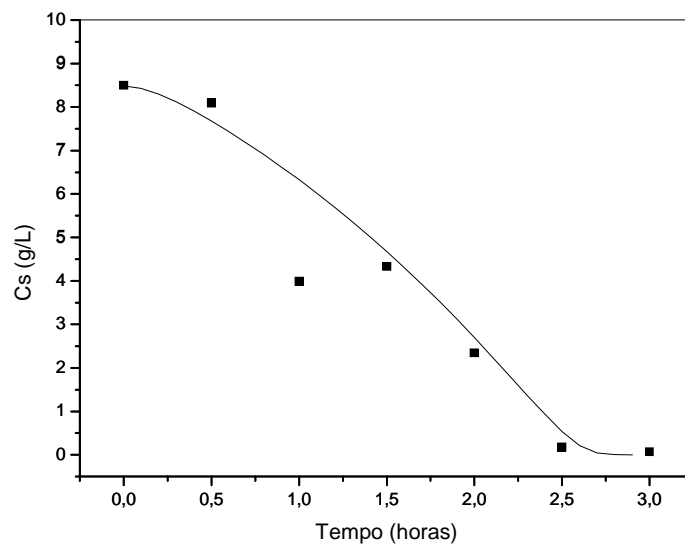


FIGURA 4.23 – Valores simulados para a concentração de glicose empregando o modelo proposto por Hall *et al.* (1978), para os dados experimentais do cultivo 7 (Exp7).

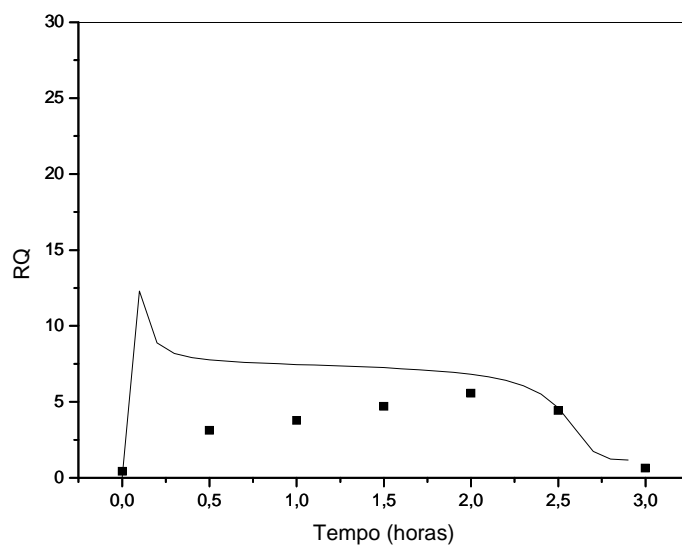


FIGURA 4.24 – Valor do quociente respiratório (RQ) simulado pelo modelo de Hall *et al.* (1978); os pontos representam os valores calculados a partir de medidas do balanço gasoso. Dados referentes ao experimento 7 (Exp7).

Pode dizer que o modelo proposto por Hall *et al.* (1978) foi capaz de representar de forma satisfatória os valores da concentração celular, de glicose e etanol. Já na estimativa do quociente respiratório, o modelo foi capaz de prever o comportamento desta variável para concentrações de glicose abaixo de 1,5-1,0 g/L. Estudos complementares nesta faixa de concentração poderiam ser realizados para melhorar a estimativa desta variável e posteriormente avaliar o emprego deste modelo para fins de controle do processo.

4.3. Cultivos Utilizando Controlador *Fuzzy*

Foram realizados quatro cultivos para avaliar o controlador *Fuzzy* desenvolvido. Este foi programado em MatLab empregando o *toolbox* de programação *Fuzzy*. Após elaboradas as regras de inferência *Fuzzy* no programa MatLab as mesmas foram salvas no arquivo FIS (*Fuzzy Inference System*). As rotinas desenvolvidas foram inseridas dentro do programa de supervisão construído no LabVIEW.

Neste trabalho foram realizados quatro cultivos em batelada alimentada empregando o controlador *Fuzzy* (Exp3, Exp4, Exp8 e Exp9). Três diferentes grupos de variáveis de entrada para o algoritmo de inferência *Fuzzy* foram avaliados.

Para o primeiro cultivo (Exp3) foi usado um controlador *fuzzy* que tinha como variáveis de entrada o RQ e a derivada da fração molar de CO₂ dos gases de exaustão. Este experimento foi essencial para comparar o desempenho do controlador *fuzzy* frente aos outros tipos de controladores aqui abordados (*On-Off* e PID). Os demais experimentos que faziam uso de controladores *fuzzy* foram construídos a fim de analisar o desempenho do algoritmo frente a diferentes variáveis de entrada.

No segundo cultivo (Exp4) foi usado como variáveis de entrada a diferença entre o valor de referência para o crescimento celular específico (μ) e o valor estimado μ' em tempo real a partir dos dados provenientes do analisador de células.

No terceiro cultivo em batelada alimentada empregando o controlador *fuzzy* (Exp8) foi utilizado com variáveis de entrada o valor de RQ e derivada da fração molar de CO₂ nos gases de exaustão, ambos valores estimados em tempo real.

O quarto cultivo (Exp9) foi feito para se testar a robustez do controlador *fuzzy*. Empregou-se como informações de entrada a variável erro, definida pela equação (4.7) e o valor de RQ. Esta variável traz um erro cumulativo no decorrer do cultivo, por não considerar o aumento da concentração celular ao longo do cultivo. Os resultados obtidos neste experimento não foram satisfatórios, no entanto, serão apresentados.

$$erro = (nCO_2 - nO_2)_i - (nCO_2 - nO_2)_{i-1} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

O controlador *Fuzzy* é acionado pelo LabVIEW que executa uma rotina em um bloco de comunicação com o MatLab chamado “Matlab Script Node”. Seu funcionamento é simples, esse bloco de comunicação recebe as informações pelo LabVIEW do RQ, vazão molar de CO₂ e vazão molar de O₂. A partir destes dados o *script* calculava a diferença entre as vazões molares dos gases e vai armazenando os resultados na forma de vetor, em seguida é acionado o sistema de inferência *Fuzzy* do MatLab que faz o cálculo da vazão necessária para corrigir o erro entre o RQ medido e o *set-point* ajustado.

A figura 4.25 ilustra o diagrama de blocos usado na programação dentro do ambiente LabVIEW.

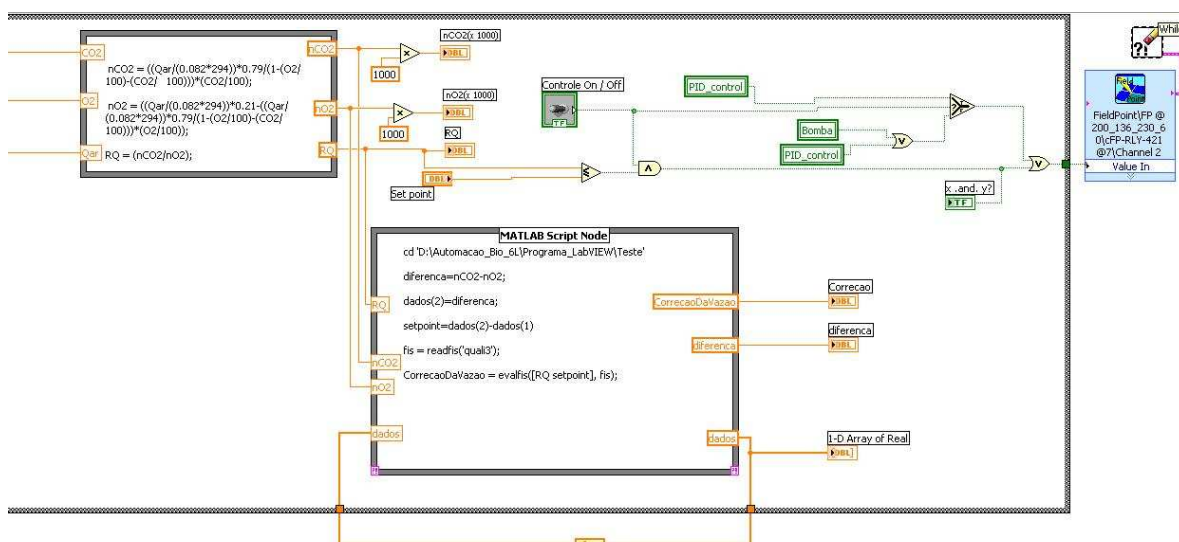


FIGURA 4.25 - MatLab Script Node dentro do ambiente de programação LabVIEW.

Diferentes funções de pertinência foram testadas ao longo do trabalho. As que melhor se adaptaram foram as funções triangulares e trapezoidais. As funções de pertinência para a variável de entrada dada pela derivada da fração molar de CO₂ consistiam na seguinte estrutura ilustrada pela figura 4.26.

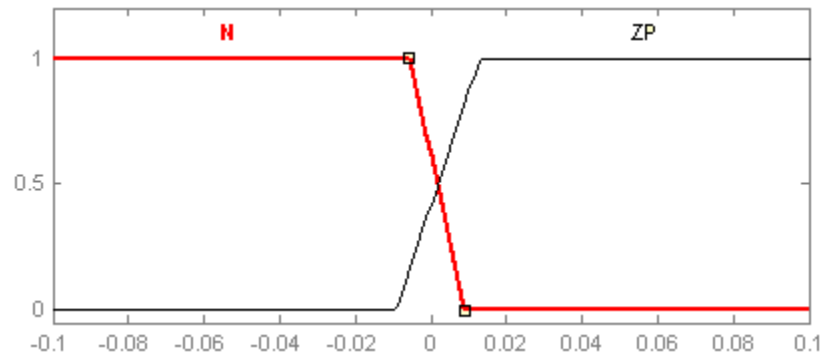


FIGURA 4.26- Função de pertinência para a variável de entrada derivada da fração molar de CO_2 .

As funções de pertinência para a variável de entrada RQ eram formadas pelas funções de pertinência apresentadas pela figura 4.27.

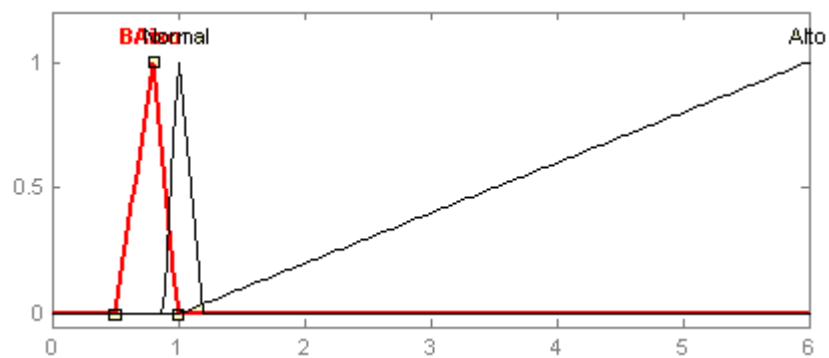


FIGURA 4.27 – função de pertinência para a variável de entrada RQ.

A variável manipulada, a vazão da bomba de meio suplementar, era calculada por meio da função de pertinência apresentada pela figura 4.28.

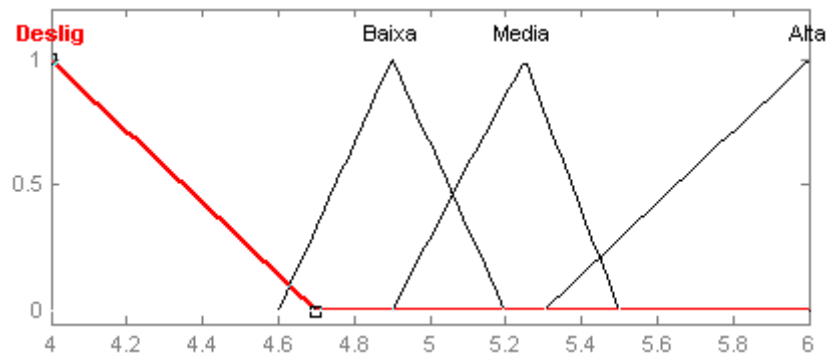


FIGURA 4.28- Variável manipulada (vazão da bomba de meio suplementar) dada em mA.

O parâmetro RQ era comum para os cultivos em batelada alimentada, porém para o terceiro cultivo a derivada da fração molar de CO₂ foi substituída pela variável erro definida pela equação (4.7).

A função de pertinência para o erro é apresentada pela figura 4.29.

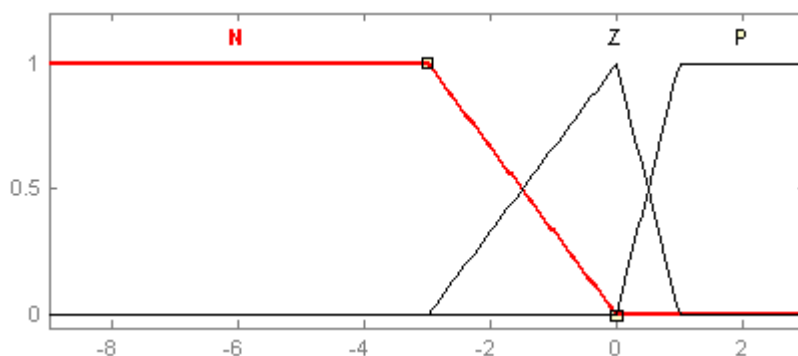


FIGURA 4.29- função de pertinência para a variável erro.

A função de pertinência referente à variável de controle dada pela diferença entre o valor de referência para a velocidade específica de crescimento celular (μ) e a calculada em tempo real (μ'), estimada a partir dos dados do analisador da concentração celular é apresentada pela figura 4.30.

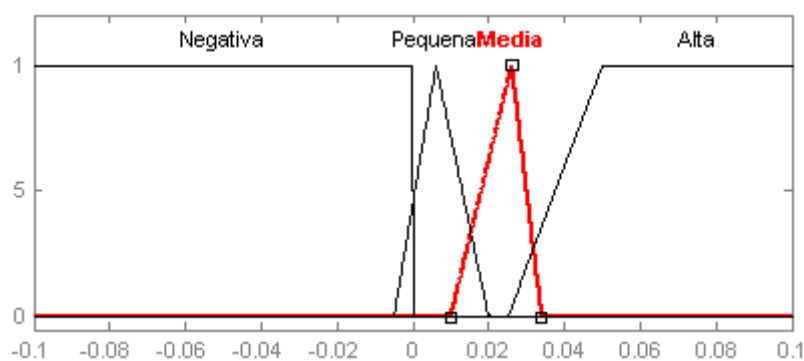


FIGURA 4.30- Função de pertinência para a variável diferença entre os fatores de crescimento celular real e o estimado.

O desempenho do controlador *fuzzy* empregando as diferentes variáveis lingüísticas de entrada é apresentado nos gráficos das figuras 4.31 (Exp4), 4.32 (Exp8) e 4.33 (Exp9). Nestas figuras podem ser observados os perfis da variável RQ e da vazão da bomba de meio suplementar. Por meio do comportamento do RQ é verificado qualitativamente se o controlador teve um bom desempenho. Quanto mais rápido RQ estabiliza em torno do *set-point* desejado (1,0) e quanto menor a amplitude de oscilação desse sinal, melhor é o desempenho do controlador.

A Figura 4.31 ilustra o desempenho da bomba frente ao comportamento do RQ obtido com o controlador projetado para o experimento Exp4. Neste experimento observa-se um comportamento oscilatório da variável RQ ao longo de todo cultivo. Contudo, esta oscilação é reduzida a partir de 3 horas de cultivo. Neste experimento a concentração de etanol obtida no meio de cultura atingiu valores da ordem de 0,6 g/L (Figura 4.4 já apresentada anteriormente).

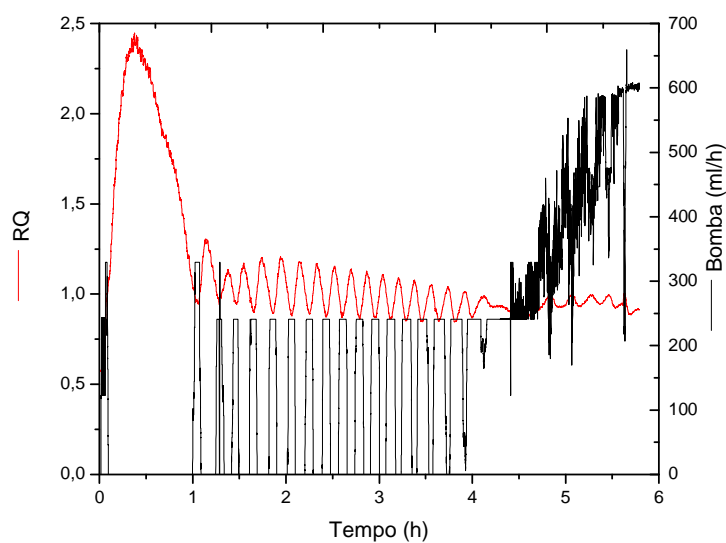


FIGURA 4.31 – Desempenho da bomba (variável manipulada) frente ao comportamento do RQ para o experimento Exp4

A Figura 4.32 apresenta o valor estimado do quociente respiratório (RQ) e da vazão da bomba de meio suplementar ao longo do experimento 8 (Exp8). Neste experimento observa-se que o controle *fuzzy* obteve um bom desempenho durante o período entre 0,5 e 2,5 horas. O valor de RQ permaneceu próximo ao *set-point* ajustado. Após 2,5 horas, o controlador *fuzzy* iniciou um comportamento oscilatório. A concentração de etanol

neste experimento não ultrapassou 0,2 g/L (menor concentração de produto dos ensaios em batelada alimentada), Figura 4.13.

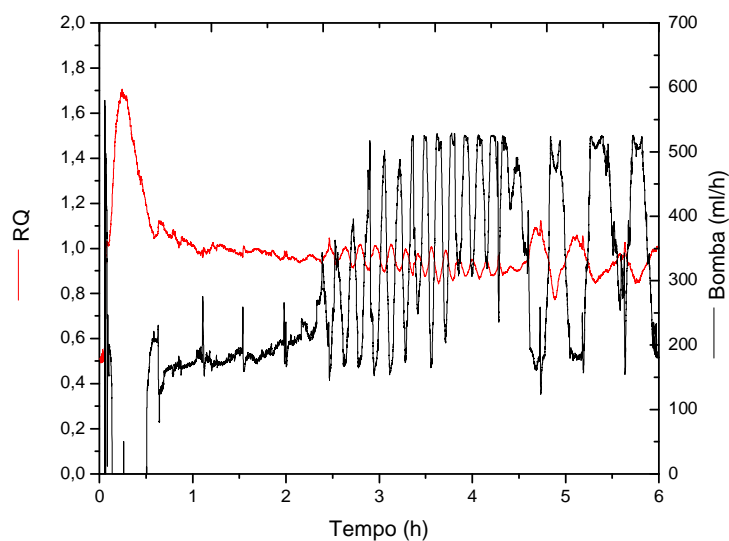


FIGURA 4.32 – Desempenho vazão da bomba suplementar e comportamento do RQ para o experimento Exp8.

A Figura 4.33 apresenta o valor estimado do quociente respiratório (RQ) e da vazão da bomba de meio suplementar ao longo do experimento 9 (Exp9). Neste experimento o valor de RQ manteve-se próximo do *set-point* entre 1,00 e 1,25 (aproximadamente). Isto vem mostrar que mesmo sob as piores condições o controlador *Fuzzy* conseguiu controlar o desempenho da vazão da bomba de meio suplementar de modo satisfatório. Neste ensaio o valor da concentração de etanol atingiu valores da ordem de 0,25 g/L (Figura 4.15).

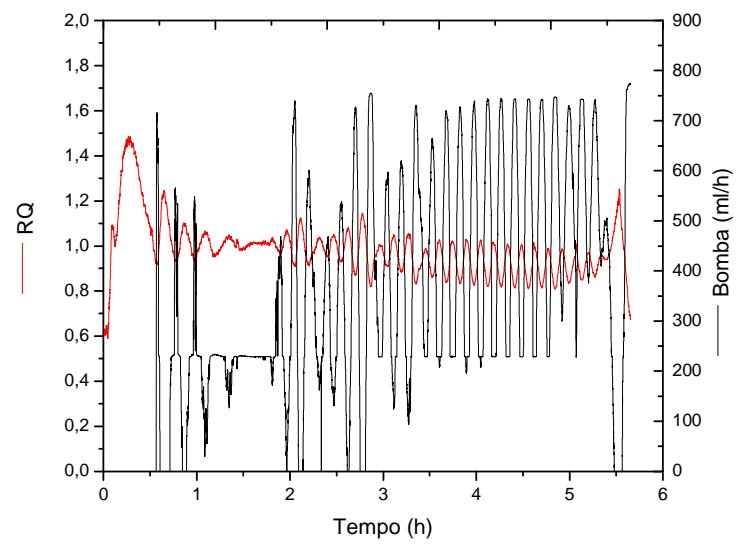


FIGURA 4.33 – Valores experimentais do quociente respiratório (RQ) e da vazão da bomba de meio suplementar durante o experimento 9 (Exp9).

5. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões são apresentadas:

- Desenvolveu-se plataforma de supervisão no programa LabVIEW para monitorar e controlar cultivos realizados em biorreator convencional em escala de bancada. Em todos os experimentos a plataforma desenvolvida apresentou boa estabilidade;
- Os algoritmos para o cálculo de parâmetros em tempo real (velocidade de produção de dióxido de carbono, velocidade de consumo de oxigênio e quociente respiratório) desenvolvidos no programa MatLab foram inseridos dentro da plataforma de supervisão do LabVIEW, possibilitando avaliar a utilização de variáveis estimadas como informações de entrada para o controlador *fuzzy*;
- Foram realizados cultivos nos modos batelada e batelada alimentada para avaliar o comportamento dos controladores implementados (*on-off*, PID e *fuzzy*). O controlador *fuzzy* teve um comportamento melhor que os controladores *on-off* e PID devido à menor produção de etanol pela levedura e por manter o RQ bem próximo ao *setpoint* (RQ=1);
- Os dados experimentais dos cultivos conduzidos no modo batelada foram empregados para ajuste de modelo matemático proposto por Hall et al. (1978). Obteve-se um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.
- O analisador de células utilizado forneceu estimativas condizentes da concentração celular. Foi utilizada informação obtida diretamente de sua saída analógica para estimativa da concentração celular, o que tornou desnecessária a utilização do programa fornecido pelo fabricante com o equipamento.

6. REFERÊNCIAS

AIBA, S., 1919, *Review of process control and optimization in fermentation. Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v. 9, p. 269–281.

ALFAFARA, C.G.; MIURA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, K.-I.S.; SUZULI, K., 1993, *Fuzzy control of ethanol concentration and its application to maximum glutathione production in yeast-batch culture. Biotechnology and Bioengineering*, v.41, p. 493 – 501.

ALFORD, J. S., 2006, *Bioprocess control: Advances and challenges. Computers and Chemical Engineering*, 30: 1464-1475.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R., 1996, *Biologia das células*. São Paulo: Moderna.

AMENDOLA, M.; SOUZA, A.L.; BARROS, L.C., 2005, *Manual do Uso da Teoria dos Conjuntos Fuzzy no MatLab 6.5*. FEAGRI & IMECC/ UNICAMP, 44 p..

ANTONINI, S.R.C., 2004, *Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratórios de destilaria*. Dept. Tecnologia industrial e Sócio-Economia Rural Centro de Ciências Agrárias –Campus Araras.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 984 p.

BEUDEKER, R. F.; van DAM, H. W.; van DER PLAAT, J. B., 1990, *Developments in baker's yeast production*. In: VERACHTERT, H.; MOT, R. de (Ed.). *Biotechnology and Biocatalysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.

BLANCH, H. W.; CLARCK, D. S., 1997, *Biochemical Engineering*. New York: Marcel Dekker.

CARRARA, VALDEMIR, 1998, *Análise e Controle de Sistemas Lineares. Apostila de Engenharia de Controle e Automação* - Universidade Braz Cubas.

CROCOMO, O. J.; GUTIERREZ, L. E., 1975, *Caminhos metabólicos*. In: BORZANI, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. (Ed.). *Engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, p. 300.

FERNANDES, P. L.; NUCCI, E .R.; JESUS, C. D. F.; GIORDANO, R. L. C.; CAMARGO, H. A.; GIORDANO, R. C., 2007, *Controle do início da vazão de meio suplementar e do término da corrida durante o cultivo Bacillus megaterium por algoritmo Fuzzy*. Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba.

FERREIRA, E. M. de F. C., 1995, *Identificação e Controle Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. 276 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) — Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto, Porto.

FERREIRA, E. C. e FEYO de AZEVEDO, S., 2006, *Modelação, monitorização e controle de reactores biológicos*. /In:/ Reactores Biológicos, Eds, Fonseca. M. M. e Teixeira, J. A. , Cap.8, Lidel, Lisboa.

FÍSICANET.COM, 2009. Acessado em 15 de março de 2009. Disponível pelo site: <http://www.fisicanet.com.ar/biologia/metabolismo/ap08_respiracion.php>

FLEISCHMANN, 2009. Acessado em 05 de março de 2009. Disponível pelo endereço eletrônico: <<http://www.falecomfleischmann.com.br>>.

GANGULY, J. e VOGEL, G., 2006, *Process Analytical Technology (PAT) and Scalable Automation for Bioprocess Control and Monitoring*. A Case Study. *Pharmaceutical Engineering*, 26(1).

GOSLYN, M. A., 1980, *Methods in food analysis*, Academic Press, 2. Ed.

GOMIDE, F. A. C.; GUDWIN, R. R., 1994, *Modelagem, controle, sistemas e lógica Fuzzy*. *Controle e Automação*, v. 4, n. 3, p. 97 – 115.

GLUCOSINTERNACIONAL, 2009. Acessado em 06 de março de 2009. Disponível pelo site: <<http://www.glucosinternacional.com/levedura/levedura.php>>.

HISBULLAH, M. A. H.; RAMACHANDRAN, K. B., 2003, *Design of a Fuzzy Logic Controller for Regulating substrate feed to Fed-batch Fermentation*. *Institution of Chemical Engineers*, Vol 81, Part C.

HALL, R. J.; PAMMENT, N. B.; BARFORD, J. P., 1978, *Mathematical modeling of lag phases in microbial growth*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 20, n. 3, p. 349–381.

HENRY, R. J. CANNON, D.C. WINKELMAN, J., 1974, *Clinical Chemistry Principles and Techniques*, 2 ed. Harper and Row Publishers Inc. N.Y. p. 1288.

JAY, J. M., 2005, *Microbiologia de Alimentos*. *Artmed*. 6. Ed.

JIN, S.; YE, K.; SHIMIZU, K.; NIKAWA, J., 1996, *Application of Artificial Neural Network and Fuzzy Control for Fed-Batch Cultivation of Recombinant Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , Vol 81, nº5, 412-421.

KAISER, C.; PEUKER, T.; BAUCH, T.; ELLERT, A.; LUTTMAN, R., 2007, *PAT – Process Analytical Technology in Cultivation Processes with Recombinant Escherichia coli*. / 10th International IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology, 1: 263-268.

KARAKUZU, C.; TURKER, M., ÖZURKS., 2006, *Modelling, on-line state estimation and fuzzy control of production scale fed-batch baker's yeast fermentation*. *Control Engineering Practice*, 14, 959-974, DOI:10.1016/j.conengprac.2005.05.007.

KASPERSKI, A.; MISKIEWICZ, T., 2008, *Optimization of pulsed feeding in a Baker's yeast process with dissolved oxygen concentration as a control parameter*. *Biochemical Engineering Journal*, Doi:10.1016/j.bej.2008.01.002.

KING, P.J.; MAMDANI, E.H., 1977, *The Application of Fuzzy Control Systems to industrial process*. *Automatica* 13, 235-242 p.

KITSUTA Y, KISHIMOTO M., 1994, *Fuzzy Supervisory Control of Glutamic Acid Production*. *Biotechnology and Bioengineering*;44:87–94.

LABVIEW Tutorial Manual, 1996, National Instruments Corporation.

LAGUNAS, R. et al., 1982, *Mechanisms of appearance of the pasteur effect in Saccharomyces cerevisiae: inactivation of sugar transport systems*. *Journal of Bacteriology*, v. 152, n. 1, p. 19–25.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M. M., 2002, *Princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier. 975 p.

LIEVENSE, J. C., 1984, *An investigation of the aerobic, glucose-limited growth and dynamics of Saccharomyces cerevisiae*. 384 p. Tese (Doutorado) — Purdue University, Indiana.

LIDÉN, G., 1993, *On-Line Monitoring Techniques for the Study of Yeast Physiology. Some Studies on the Yeasts Pichia stipitis and Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado) — Department of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Denmark.

MARKX, G.H.; DAVEY, C.L., 1999, *The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: Applications in biotechnology*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 161–171.

MEDEIROS, A. V.; SOUZA, F. E. C.; MAITELLI, A. L., 2001, *Implementação de um Sistema de Extração de Conhecimento de Redes Neuro-Fuzzy*. In: *Anais do V Simpósio Brasileiro de Automação Inteligente*, Canela – RS.

NELLES, O., 2001, *Nonlinear System Identification* – Springer, Germany.

NEVES, A.A., PEREIRA, D.A., VIEIRA, L.M., MENEZES, J.C., 2000, *Real time monitoring biomass concentration in Streptomyces clavuligerus with industrial media using a capacitance probe*. *Journal of Biotechnology*, 84: 45-52.

NUCCI, E. R.; SILVA, R. G.; GOMES, T. C.; GIORDANO, R. C; CRUZ, A. J. G., 2005, *A Fuzzy Logic Algorithm for Identification of The Harvesting Threshold During PGA Production by Bacillus megaterium*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, p. 521-527.

NYTTLE VG, CHIDAMBARAM M., 1993, *Fuzzy Logic Control of Fed-Batch Fermentor*. *Bioprocess Engineering*. 9, p.115–118.

O'CONNOR, B.; RIVEROL, C.; KELLEHER, P.; PLANT, N.; BEVAN, R.; HINCHY, E.; D'ARCY, J., 2002, *Integration of Fuzzy Logic Based Control Procedures in Brewing*, Food Control, 23-31.

OGATA, K., 1998, *Engenharia de Controle Moderno*. 2.ed. Universidade de Minnesota, Minnesota.

OLIVEIRA, D. P. R., 2005, *Sistemas, organização e métodos: uma abordagem gerencial*. 15. ed. São Paulo: Atlas. ISBN 85-224-4185-5. Obtido em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Controle_%28administra%C3%A7%C3%A3o%29.

PAT, 2004. <http://www.fda.gov/cder/guidance/6419fnl.htm>. Consultado em 15/maio/2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., 1996, *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron Books.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., 2008, *Tecnologia de Bioprocessos*, Escola de Química/UFRJ.

POSTEN, C. H.; COONEY, C. L., 1991, *Growth of microorganisms*. In: REHNM, H. J. et al. (Ed.). 2. ed. Weinheim: VCH Verlag, (Biotechnology - A Multi-Volume Comprehensive Treatise, v. 1).

RAMOS, P.G., 1999, *Uma Investigação das Redes Neuro-Fuzzy aplicada à Mineração de Dados*. 61 f. Trabalho de Graduação – Universidade Federal do Ceará 1999.

RANI, Y. e RAO, R., 1999, *Control of fermentors – A review*. Bioprocess Engineering, 21: 77-88.

REHM, H. J., REED, G., PÜHLER, A., STADLER, P., 1993, *Biotechnology – A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, Vol 3.

REZENDE, S. O., 2005, *Sistemas Inteligentes – Fundamentos e Aplicações*, Manole.

SHULER, M. L., KARGI, F., 2001, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall PTR, 2nd ed.

SHIBA, S., NISHIDA, Y., PARQUE, Y.S., IJIMA, S., KOBAYASHI, T., 1994, *Improvement of cloned α -amilase gene-expression in fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by regulation both glucose and ethanol concentrations using a Fuzzy controller*. Biotechnology and Bioengineering, v. 44, pp. 1055 – 1063.

SONNLEITNER, B.; KAPELLI, O., 1986, *Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis*. Biotechnology and Bioengineering, v. 28, p. 927–937.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., 2005, *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed. 894 p.

VICENZI, R. *Biotecnologia de Alimentos*, acessado em 05 de março de 2009, disponível pelo endereço eletrônico: <http://www.scribd.com/doc/6703108/Apostila-Biotecnologia-de-Alimentos>.

YAMADA, Y., HANEDA, K., MURAYAMA, S., Shiomi, S., 1999, *Aplication of Fuzzy system to coenzyme Q10 fermentation*. Journal of Chemical Enginnering of Japan. v. 24, pp.94 –99.