

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

HERON DE CASTRO IBRAIM

Aplicação de transformada Z em modelagem de biorreator: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator *Airlift* e cinética de Monod e Verhulst.

OURO BRANCO - MG

2017

HERON DE CASTRO IBRAIM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Aplicação de transformada Z em modelagem de biorreator: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator *Airlift* e cinética de Monod e Verhulst.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito para a obtenção de título de Engenheiro de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

OURO BRANCO – MG

2017

RESUMO

As transformadas Z são técnicas matemáticas utilizadas para a resolução de equações diferenciais lineares discretas e contínuas, respectivamente. Na modelagem de processos, em grande parte dos casos, os modelos são representados por equações diferenciais, sendo que nem sempre dispomos de ferramentas numéricas (programas de computador, etc.) para resolução dessas equações, nesses casos essas técnicas são fundamentais para a resolução desses sistemas de equações diferenciais. Existem diferentes métodos analíticos para determinar o comportamento de uma reação química. A dificuldade de obtenção de um método mais preciso é decorrente da complexidade e das diversas reações presentes no metabolismo microbiano. Neste trabalho, o processo de fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator *Airlift* foi modelado utilizando a concentração de biomassa e o consumo de substrato obtidas experimentalmente. Utilizando a levedura liofilizada foi preparado 3 cultivos no biorreator. Foram utilizados dois modelos cinéticos descritos na literatura (Monod e Verhulst) e aplicou-se as transformadas Z e as transformadas de Laplace para a resolução dos sistemas e montagem do espaço de estados para cada modelo. Utilizando dados colhidos experimentalmente e as modelagens matemáticas de cada modelo, foi possível analisar a precisão de cada modelo, em relação aos dados coletados. Observou-se através dos resultados obtidos que os modelos de Verhulst e Monod não se ajustaram aos pontos experimentais para a modelagem da concentração de substrato nos experimentos testados. Entretanto, para a modelagem da concentração de células pode-se observar que os modelos se ajustaram apresentando o perfil de crescimento ao longo do cultivo. As equações discretas presentes nos modelos obtidos com as transformadas Z ajustaram com todos os pontos experimentais.

Palavras-Chaves: Modelos cinéticos, Monod, Verhulst, Bioprocessos, modelagem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tubo falcon depois de ser centrifugado e seco na estufa, a massa celular foi calculada utilizando a diferença da massa seca presente no tubo.....	22
Figura 2 – Biorreator utilizado no processo fermentativo, biorreator aerado, o cultivo foi realizado em batelada.....	23
Figura 3 – Glicosímetro, Accu-Chek® Active monitor utilizado.....	26
Figura 4 – Concentração de células pelo tempo, os pontos laranjas são os pontos práticos e a curva tracejada é a função exponencial do crescimento.....	28
Figura 5 – Variação do pH e da temperatura pelo tempo em horas. Pontos azuis valores de pH coletados e pontos laranjas valores de temperatura.....	29
Figura 6 – Gráfico do crescimento celular μ pela concentração de substrato, os valores calculados de μ são representados pelos pontos azuis, $\mu_{\max}=0,52$	32
Figura 7 – Gráfico da cinética de Monod, o modelo é representado pelas curvas e pontos experimentais são representados pelos “o” e “x”.....	33
Figura 8 – Gráfico da cinética de Verhulst, o modelo é representado pelas curvas azul e verde. Os pontos experimentais são representados como “o” para a concentração celular (C_x) e um “x” para a concentração de substrato (C_s).....	33
Figura 9 – Gráfico da concentração celular, os pontos são os pontos experimentais e a curva o resultado da modelagem utilizando a transformada de Laplace.....	34
Figura 10 – Gráfico do consumo de substrato, os pontos são os pontos experimentais e a curva o resultado da modelagem utilizando a transformada de Laplace.....	35
Figura 11 – Gráfico do consumo de substrato (roxo) e crescimento celular, (amarelo) explicado pela transformada Z ajustada a cinética de Monod, onde os pontos laranjas são os pontos experimentais de C_x e os pretos de C_s	35
Figura 12 – Concentração de células pelo tempo, regressão exponencial em pontilhado.....	37
Figura 13 – Crescimento celular em azul e o consumo de substrato em laranja.....	39
Figura 14- Gráfico do crescimento celular μ pela concentração de substrato, é possível traçar uma reta com o valor limite de μ onde retiramos o $\mu_{\max}$	40

Figura 15- Gráfico da cinética de Monod, o modelo é representado pelas curvas, os pontos experimentais são representados como “o” e “x”.....	41
Figura 16 – Cinética de Verhulst, o modelo é representado pelas curvas azul e verde. Os pontos experimentais são representados como “o” para a concentração celular (C_x) e um “x” para a concentração de substrato (C_s).....	42
Figura 17 – Crescimento celular, os pontos são os pontos experimentais e a curva o resultado da modelagem utilizando a transformada de Laplace.....	43
Figura 18 – Consumo de substrato, os pontos são os pontos experimentais e a curva é o resultado da modelagem da transformada de Laplace.....	43
Figura 19 – Consumo de substrato (roxo) e crescimento celular, (amarelo) explicado pela transformada Z ajustada a cinética de Monod, onde os pontos laranjas são os pontos experimentais da C_x e os azuis da C_s	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição e valores de μ em cada fase do crescimento celular.....	11
Tabela 2 - Valores de $\mu_{\max}$, K_s e os substratos limitantes para alguns micro-organismos cultivados em temperatura ótima.....	14
Tabela 3 – Massa e concentração de cada composto e perdas totais.....	23
Tabela 4 – Composição do meio utilizado no experimento 4.....	25
Tabela 5 – Dados obtidos utilizando uma balança de precisão para determinar a quantidade de cada composto no ultimo cultivo, a concentração foi obtida dividindo o peso pelo volume presente no reator.....	25
Tabela 6- Media dos dados obtidos experimentalmente das diferenças das massas de cada amostra e valores considerados de cada valor.....	27
Tabela 7 –valores de absorbância e glicose obtidos experimentalmente utilizando teste de ataque enzimático.....	30
Tabela 8 – Variação das concentrações de substrato e celular em intervalos de tempos.....	30
Tabela 9 – Variação das concentrações de substrato e celular em intervalos de tempos.....	36
Tabela 10– Variação das massas dos tubos falcons secos pesados sem amostra e com a amostra seca, a diferença das massas e o Cx encontrado dividindo a massa pelo volume das amostras.....	38
Tabela 11 – Variação das concentrações de substrato e celular em intervalos de tempos.....	39

SUMÁRIO

Resumo.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	10
3.1 Bioprocessos.....	10
3.2 Modelos cinéticos.....	11
3.2.1 Monod.....	12
3.2.2 Verhulst.....	14
3.3 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.4 Processos fermentativos	16
3.4.1 Batelada.....	16
3.4.2 Batelada alimentada.....	17
3.5 Transformadas.....	17
3.6 Espaço de estados.....	18
4. METODOLOGIA.....	21
5. RESULTADO E DISCUSSÕES.....	27
6. CONCLUSÃO.....	45
7. TRABALHOS FUTUROS.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	47

1- INTRODUÇÃO

O acúmulo de dados empíricos, a partir de experimentos práticos e fenômenos naturais, é a primeira tarefa a ser realizada em um dado campo do conhecimento. A teoria científica leva estes dados a um sistema coerente e procura por leis gerais inerentes aos fenômenos naturais. Usando o formalismo matemático, desenvolve-se modelos matemáticos uns mais adequados que outros, sendo possível estudar seus comportamentos, com as leis universais. Uma comparação do funcionamento destes modelos com a realidade gera uma indicação do grau de revelação das leis básicas do dado campo do conhecimento (EFREMOV, 2008).

Leveduras são fungos unicelulares, frequentemente ovais, arredondados ou elípticos, com comprimento de 5 a 16 μm (cinco vezes maiores que as bactérias). Elas se reproduzem assexuadamente por brotamento (multiplicação vegetativa) e de forma sexuada (sob estresse) por esporulação (LOPES, 2017).

Saccharomyces cerevisiae destaca-se como uma das espécies mais exploradas comercialmente entre as leveduras, sendo muito utilizada no Brasil e no mundo, nas indústrias de produção de etanol, cervejas, vinhos e panificação. Sua aplicação na indústria está ligada aos processos fermentativos, devido a sua capacidade (quando na fase anaeróbica) de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (NEVES, 2003).

A cinética microbiana envolvida no estudo do cultivo de micro-organismos afeta diretamente a eficiência do cultivo. Esta está ligada a formação de produtos e o crescimento microbiano. A formação de produto e o crescimento do micro-organismo é determinada por um complexo processo microbiológico e fatores essenciais controlados (CAO et al., 1998).

Assim, uma das maneiras mais eficazes de verificação de como entendemos a cinética microbiana deve ser feito a partir da construção de modelos matemáticos desses processos. Estes modelos possuem a variação das concentrações de células, substratos e produtos. Os modelos cinéticos Monod e Verhulst descrevem as concentrações de células, substratos e produtos, usando uma visão geral (SMAGIN e GLAGOLEV, 2001) e possuem valor vinculativo das intensidades (μ por exemplo) do respectivo processo generalizado. Tais modelos não levam em conta a possível limitação na coleta de dados envolvidos no cultivo. Ao mesmo tempo, o tempo discreto pode desempenhar um papel significativo para explicar as diferentes concentrações finais.

O objetivo do trabalho foi a modelagem matemática da cinética microbiana em um sistema anaeróbio, de uma levedura do gênero *Saccharomyces* cultivada em biorreator de forma batelada aerado. O problema específico a ser resolvido neste trabalho é a construção do modelo matemático, que descreve em pormenor processos microbiológicos de crescimento celular e consumo de substrato. A estratégia foi a utilização da transformada Z na análise dos pontos experimentais.

2- Objetivo

Construir vários modelos utilizando a cinética de Monod, Verhulst. Aplicar as equações diferenciais (Transformada Z e Transformada de Laplace) em Monod. Comparar diferentes modelos cinéticos teóricos com a transformada Z utilizando a modelagem computacional. Verificar qual melhor descreve os pontos experimentais.

Objetivos específicos

- Realizar o cultivo da levedura buscando obter como resultado os mesmos pontos experimentais em todos os cultivos, para comparação dos modelos e os cultivos.
- Construir um padrão experimental para replicação dos dados experimentais.
- Verificar o grau de representatividade de cada modelo.
- Comparar cada modelo buscando encontrar o que melhor se encaixa nos dados amostrais.
- Realizar estudos utilizando os modelos para determinar as condições ótimas de cultivo.

3- Revisão Bibliográfica

3.1 Bioprocessos

Podemos considerar como biotecnologia o desenvolvimento de métodos para manipulação dos seres vivos para um objetivo socialmente desejável. Tal objetivo pode ser a produção de um produto químico específico, ou a produção de melhores plantas ou sementes, terapia genética ou o uso de micro-organismos projetados para degradar resíduos. O elemento-chave é o uso de técnicas sofisticadas para manipulação genética. (LIU, 2017).

A engenharia de bioprocessos é um campo amplo. Ela abrange todos os campos das engenharias biológicas. Ela surgiu sozinha, não sendo uma ramificação interdisciplinar de outros campos do conhecimento. Ao contrário do termo "bioengenharia", o termo engenharia de bioprocessos é específico e bem definido. A engenharia do bioprocessamento enfatiza a engenharia e as ciências dos processos industriais de base biológicas. Como por exemplo: biocatálise, manipulação de micro-organismos para um objetivo sustentável e socialmente desejável e utilização de biomassa para um objetivo sustentável e socialmente desejável. A engenharia de bioprocessos não é baseada em um único substrato ou produto específico. Portanto, a engenharia de bioprocessos trata de processos químicos e biológicos envolvidos em todas as áreas. Assim, esta engenharia pode atuar nos campos das engenharias química, mecânica, elétrica, ambiental, médica e industrial, aplicando os princípios para a concepção e análise de processos baseados no uso de células ou de subcomponentes de tais células (SHULAR, 2005).

A engenharia de bioprocessos atua na microescala (escala celular e molecular) e na escala industrial. A ciência e a engenharia dos processos de conversão de biomassa para produtos químicos e energia são parte da engenharia de bioprocessos. Previsão e modelagem de comportamentos de sistemas, desenvolvimento de sensores, algoritmos de controle e estratégias de fabricação ou operação são apenas alguns dos desafios enfrentados pelos engenheiros de bioprocessos. Esta engenharia busca também estabelecer a cinética do processo e o design do biorreator. Nos focaremos principalmente na cinética e modelagem de reações envolvidas na Engenharia de bioprocessos. A modelagem matemática é a chave para os engenheiros. Os biólogos são geralmente melhores para formação de hipóteses testáveis a interpretação de dados. No início da era da biotecnologia, os engenheiros geralmente não estavam familiarizados com as técnicas e estratégias experimentais utilizadas pelos biólogos. No entanto, hoje os engenheiros de bioprocessos possuem técnicas e estratégias experimentais

ainda mais sofisticadas que os biólogos, devido à modelagem. Esta fornece aos engenheiros de bioprocessos uma vantagem (LIU, 2017).

3.2 Modelos cinéticos

Atualmente é necessário a utilização de modelos matemático razoavelmente precisos para o controle da reação de fermentação. Usando modelagem, podemos progredir e realizar um controle direto nos biorreatores. O desenvolvimento dos modelos de fermentação é auxiliado por informações de medidas realizadas durante a operação do processo (SHULAR, 2005).

Os modelos são relações matemáticas entre variáveis. Tradicionalmente, os modelos são baseados em equações "teóricas", que fornecem a estrutura do modelo, e observações experimentais, que fornecem os valores numéricos dos coeficientes. Para os processos biológicos, especificar a estrutura do modelo pode ser difícil por causa da complexidade dos processos celulares e do grande número de fatores ambientais, que afetam o crescimento celular. Normalmente, os modelos utilizados em bioprocessos são representações aproximadas, muito simplificadas, deduzidas a partir da observação. Como exemplo, dois modelos matemáticos usados com frequência em processos fermentativos em batelada são o de Monod e Verhulst (DORAN, 2013).

A Tabela 1 descreve as fases de crescimento de um micro-organismo em conjunto com sua descrição e taxa específica de crescimento (μ).

Tabela 1 - Descrição e valores de μ em cada fase do crescimento celular.

Fase	Descrição	Taxa de crescimento específica
Lag	Adaptação das células	$\mu \approx 0$
Log	Crescimento celular	$\mu \approx \mu_{\max}$
Estacionária	fim do crescimento celular	$\mu = 0$
Morte celular	Perda da viabilidade celular	$\mu < 0$

As células usam a fase lag para se adaptar ao seu novo ambiente, novas enzimas ou componentes estruturais podem ser sintetizados, mas a concentração de células não aumenta. Após a fase lag, um crescimento exponencial começa na fase log. No final desta fase, à medida que os nutrientes no meio de cultura se tornam escassos ou os produtos inibidores se acumulam,

o crescimento diminui. Após este período de transição, a fase estacionária é atingida e não ocorre mais o crescimento celular. Algumas culturas exibem uma fase de morte celular, uma vez que as células perdem viabilidade ou são destruídas pela lise celular. Durante a fase log, a taxa de crescimento celular é descrita pela Equação 1.

$$rx = \mu Cx \quad (1)$$

Onde rx é a taxa produção de biomassa pela concentração por unidade de tempo, Cx é a concentração celular e μ é a taxa de crescimento específica. A taxa de crescimento específica é descrita como um sobre tempo. O crescimento celular é uma autocatálise de primeira ordem. Em um sistema fechado onde o crescimento é o único processo que afeta a concentração celular, a taxa de crescimento, rx , é igual à taxa de variação da concentração celular pelo tempo, como é descrito na Equação 2.

$$rx = \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

Substituindo o rx na equações 1 pelo $\frac{dx}{dt}$ da equação 2 e integrando dos dois lados, reorganizando a equação de modo que esta possua a concentração celular, x , em função do tempo durante o crescimento em batelada, chegamos na Equação 3, onde Cx_0 é a concentração de células no tempo zero.

$$Cx = Cx_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

A equação 3 representa um crescimento exponencial. Ela é estritamente válida somente se μ é imutável, e é usada para avaliar se a taxa de crescimento específico é constante. Na fase log, μ é geralmente constante. Quando as concentrações celulares são plotadas em coordenadas lineares, o crescimento geralmente é lento no início da cultura. Podemos ser tentados a concluir que houve uma fase lag nas primeiras horas durante a cultura. No entanto, quando os mesmos dados são plotados exponencialmente, fica claro que a cultura não experimentou uma fase de atraso. O crescimento exponencial sempre aparece muito mais lento no início da cultura porque o número de células presentes é pequeno.

3.2.1 Monod

A cinética de Monod é utilizada para o crescimento celular e possui uma expressão para a taxa de consumo de substrato em função da concentração de biomassa. Durante a fase log da

fermentação em batelada, a taxa de crescimento específica das células depende da concentração de nutrientes no meio. Muitas vezes, um único substrato exerce uma influência dominante na taxa de crescimento. Este componente é conhecido como o substrato limitante. O substrato que limita o crescimento é muitas vezes a fonte de carbono ou nitrogênio, embora em alguns casos seja oxigênio ou algum nitrato. Durante a fase log, a taxa de crescimento específico está relacionada à concentração do substrato limitante, a Equação 4 é a de Monod.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} Cs}{Ks + Cs} \quad (4)$$

Na Equação 4, Cs é a concentração de substrato, $\mu_{\max}$ é a taxa de crescimento específico máxima e Ks é uma constante. Ks e $\mu_{\max}$ são parâmetros intrínsecos do sistema. Em algumas culturas, há pouca ou nenhuma formação de produto extracelular. Na ausência de síntese destes produtos, assumimos que todo o substrato que entra na célula é usado para funções de crescimento e manutenção. As taxas dessas atividades celulares estão relacionadas da maneira descrita na Equação 5.

$$rs = \frac{rx}{Y_{xs}} + \alpha Cx \quad (5)$$

Na Equação 5, rx é a mesma da Equação 1, Y_{xs} é o rendimento da biomassa sobre o substrato, α é o coeficiente de manutenção e Cx é a concentração de biomassa. Esta equação afirma que a taxa de absorção do substrato depende em parte da taxa de crescimento, mas também varia com a concentração celular. Quando o rx é expresso usando a Equação 1 e 5 obtemos Equação 6 para a variação de Cx e a Equação 7 para a variação de Cs .

$$\frac{dx}{dt} = \mu x = \frac{\mu_{\max} Cx}{Ks + Cs} \quad (6)$$

$$\frac{-ds}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{xs}} + \alpha Cx \quad (7)$$

Este modelo representa uma combinação das Equações 1, 4 e 5. A forma das equações foi determinada a partir da observação experimental de um grande número de sistemas de culturas diferentes. Em princípio, uma vez que os valores dos parâmetros $\mu_{\max}$, Ks , Y_{xs} e α são conhecidos, podemos usar o modelo para estimar a concentração de células (Cx) e a concentração de substratos (Cs) em função do tempo. Um problema comum com os modelos de fermentação é que os parâmetros do modelo podem ser difíceis de medir ou tendem a mudar

com o tempo durante a fermentação. A Tabela 2 descreve alguns valores de $\mu_{\max}$, K_s e os substratos limitantes para alguns micro-organismos.

Tabela 2 - Valores de $\mu_{\max}$, K_s e os substratos limitantes para alguns micro-organismos cultivados em temperatura ótima.

Microorganismo	Substrato Limitante	$\mu_{\max}, h^{-1}$	$K_s, mg/L$
E. Coli à 37 °C	Glicose	0,8 a 1,4	2 a 4
E. Coli à 37 °C	Glicerol	0,87	2
E. Coli à 37 °C	Lactose	0,8	20
S. cereviae à 30 °C	Glicose	0,5 a 0,6	25
Candida tropicalis à 30 °C	Glicose	0,5	25 a 75
Candida sp.	Oxigênio	0,5	0,045 a 0,45
	Hexadecano	0,5	
Klebsiella aerogenes	Glicose	0,85	9
Aerobacter aerogenes	Glicose	1,22	1 a 10

Fonte: Dados de H.W. Blanch and D.S, Biochemical Engineering, Marcel Dekker, Inc. New York, 1996.

3.2.2 Verhulst

O modelo de Verhulst (Equação 8) é uma modificação do modelo de Malthus que é válido apenas na fase de crescimento exponencial. Verhulst desenvolveu seu modelo em 1844 e incluiu um termo de inibição causado pela biomassa aparente.

$$rx = KCx \left(1 - \frac{Cx}{Cx_{\infty}} \right) \quad (8)$$

Na equação 8 Cx é a concentração celular, Cx_0 é a concentração celular no momento inicial, Cx_{∞} é a capacidade que o meio possui de comportar células e K é o coeficiente de capacidade de células no meio. Para um crescimento em batelada de volume constante, o balanço celular está sujeito à taxa de crescimento descrita pela Equação 9

$$X = \frac{Cx_0 e^{kt}}{1 - \frac{Cx_0}{Cx_{\infty}} (1 - e^{kt})} \quad (9)$$

A Equação 9 é denominada Equação Logística. O modelo de Verhulst é capaz de descrever a fase de crescimento exponencial (log) e a fase estacionária. Portanto, o modelo Verhulst (ou modelo logístico) é um modelo fenomenológico mais preciso do que o modelo de

Malthus. A fase estacionária começa no final da fase log, quando a taxa de crescimento líquido é zero (sem divisão celular) ou quando a taxa de crescimento é igual à taxa da mortalidade celular. Mesmo que a taxa de crescimento líquido seja zero durante a fase estacionária, as células ainda são metabolicamente ativas e produzem metabólitos secundários. Os metabólitos primários são produtos relacionados ao crescimento e os secundários não estão relacionados ao crescimento. De fato, a produção de certos metabólitos é aprimorada durante a fase estacionária (por exemplo, antibióticos e alguns hormônios) devido sua desregulação (SANDLER 2006).

3.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são micro-organismos eucarióticos predominantemente unicelulares e pertencentes ao Reino Fungi, elas possuem a habilidade de metabolizar eficientemente açúcares fermentescíveis. A levedura mais utilizada em processos de fermentação é a do gênero *Saccharomyces* da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Por ser fundamental neste processo, é extremamente importante que a cultura da levedura seja a mais pura possível, isto é, isenta de micro-organismos contaminantes como bactérias e leveduras selvagens. (TSCHOPE, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um micro-organismo anaeróbio facultativo, ou seja, produz energia a partir de compostos de carbono – carboidratos, tanto em condições aeróbias como em condições anaeróbias. Na presença do oxigênio as leveduras multiplicam-se e nas condições anaeróbias as células das leveduras incorporam açúcares simples, como glicose, e produzem dióxido de carbono e álcool como produtos residuais, além de ésteres, álcoois superiores, cetonas, vários fenóis e ácidos graxos, (TSCHOPE, 2001). A levedura se desenvolve melhor em um pH 4,5 a 5,0. A acidificação do meio é utilizada como forma de defesa impedindo que outros micro-organismos cresçam no meio. A acidificação de meios ricos em glicose ocorre na primeira etapa de adaptação das células (DORTA, 2006).

Existem duas formas de fornecimento das leveduras: seca e líquida. A levedura seca passou por um processo de desidratação a fim de facilitar o armazenamento. Ela pode ser comprada em pacotes de aproximadamente 11,5 g e deve ser reidratada antes do uso, para melhores resultados. As leveduras líquidas são vendidas em recipientes metalizados, contendo cerca de 50 mL, e não apresentam um número elevado de cepas quando comparado com os pacotes de leveduras secas, (TSCHOPE, 2001). A formação dos produtos desejáveis pode não ocorrer no crescimento exponencial. A produção destes pode ocorrer durante a fase estacionária.

3.4 Processos Fermentativos

A fermentação consiste em utilizar micro-organismos para transformação da matéria orgânica, em que essa reação é catalisada por enzimas. Desde 5.000 a.C. a humanidade utiliza processos fermentativos para fabricação de vinho, queijos e outros derivados do leite. Em 4.000 a.C. os egípcios já utilizavam a fermentação da cevada para fabricação de um tipo de cerveja, e a levedura desta era utilizada para a panificação. Hoje, diversos produtos são desenvolvidos por processos fermentativos, inclusive os biocombustíveis, tais como o etanol (NEVES, 2003).

As fermentações podem ser realizadas por três tipos de processos: processos em batelada, processos em batelada alimentada e processos contínuos. Sendo mais comuns os processos em batelada e batelada alimentada (SCHMIDT, 2005).

3.4.1 Batelada

O processo em batelada é cíclico com resultados repetíveis. Este gera uma quantidade finita de produto, diferenciando assim de um processo contínuo. Normalmente um processo em batelada possui os seguintes parâmetros (MARQUES, 2009):

- Informações sobre a matéria prima e ingredientes utilizados (quantidades, etc.);
- Procedimento passo-a-passo;
- Condições do processo;
- Equipamento utilizado no processo.

O processo em batelada pode ser considerado como um processo fechado, a não ser pela aeração e controle de pH (feito pela adição de ácidos e bases), todo o substrato é fornecido no início da operação. A principal desvantagem desse processo é que o crescimento celular ocorre somente durante uma fase do ciclo de fermentação, ou seja, esses processos possuem uma menor produtividade quando comparado aos outros, visto que não conseguem prolongar a fase de crescimento celular (NEVES, 2003).

O uso de meios com altas concentrações de açúcares em fermentações batelada podem gerar o *Efeito Crabtree*, inibição crescimento celular e a levedura somente faz fermentação alcoólica. Nesse processo a formação de biomassa vai depender da concentração inicial de substrato no reator, do crescimento e da eficácia do microrganismo em converter o substrato em material celular (NEVES, 2003).

3.4.2 Batelada Alimentada

Os processos em batelada alimentada são indicados para a grande maioria dos processos fermentativos. Nesses processos, em especial os com alta densidade celular, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando o *Efeito Crabtree* e permitindo sua adição em momentos adequados da fermentação.

Os processos em batelada alimentada se dividem em dois tipos básicos: o de volume fixo e o de volume variável. No processo em volume fixo o substrato é alimentado sem que haja diluição do meio de cultura (o volume pode ser mantido constante pela alimentação do substrato na forma de líquido concentrado ou por diálise). Nos sistemas com volume variável, o volume se altera de acordo com o tempo propício para o substrato alimentado. A alimentação do substrato pode ser feita a vazão constante, vazão crescente, decrescente, entre outros (NEVES, 2003).

A glicose presente no cultivo em batelada pode ser quantificada em amostras retiradas do meio. As amostras do meio obtidas no cultivo de levedura contendo a glicose normalmente são analisadas com o auxílio de um kit enzimático (Glicose Oxidase). Todavia existe um outro método de quantificação da glicose rápido, seguro, barato, bastante eficiente e relativamente preciso. O dosador de glicose eletrônico ou glicômetro geralmente utilizado por diabéticos foi projetado para determinar a glicose no sangue. Ele pode ser utilizado em soluções de fermentação como uma alternativa com as vantagens já mencionadas previamente (EUGENIO, 2001).

3.5 Transformadas

A transformada de Laplace é um método simples e elegante, capaz de resolver equações diferenciais, transformando elas em equações algébricas. A cinética de Monod pode ser representada como um conjunto de equações diferenciais.

A transformada Z permite transformar sinais no domínio do tempo discreto para o domínio Z, é utilizada da mesma forma que a transformada de Laplace é aplicada para tempo contínuo. O sinal em tempo discreto, obtido a partir de um contínuo, pode ser apresentado com uma sequência de impulsos de amplitudes iguais a do sinal contínuo nos tempos de amostragem (CUNHA e MACHADO, 2017).

3.6 Espaço de Estados

Uma característica básica da representação em espaço de estados é o fato dela descrever a relação entre várias variáveis (entradas e saídas). Esse tipo de representação descreve o sistema no domínio do tempo e é mais conveniente para representar sistemas não lineares e multivariáveis do que a função ou matriz de transferência (AGUIRRE, 2015). Um modelo linear típico em espaço de estados tem a seguinte forma:

$$\dot{x} = Ax + Bu \quad (10)$$

$$y = Cx + Du, \quad (11)$$

Sendo que $x \in \mathbb{R}^n$ é o vetor do estado n -dimensional, o ponto indica a derivada temporal, ou seja, $\dot{x} = dx/dt$; $u(t) \in \mathbb{R}^r$ é o vetor de entradas formado por r funções temporais; $y(t) \in \mathbb{R}^m$ é o vetor m -dimensional de saídas medidas e A, B, C e D são matrizes constantes. O modelo será multivariável se $r > 1$ e/ou $m > 1$. Caso haja apenas uma entrada $r = 1$ e uma saída $m = 1$, o modelo é monovariável (AGUIRRE, 2015).

Duas informações importantes:

- O conhecimento do vetor de estado em qualquer instante t_0 especifica o estado ou condição do sistema nesse instante;
- A representação de espaço de estados não é única, pode-se representar o mesmo sistema com modelos diferentes no espaço de estados.

A seguir é demonstrado o balanço de massa de Cx e Cs e posteriormente o Espaço de Estado obtido neste processo:

Utilizando as equações 12 e 13 como pontos iniciais para determinação das concentrações celular e de substrato respectivamente. O desenvolvimento matemático a partir de 12 e 13 foi realizado para utilização das equações em espaço de estados (Equação 29). Em que Cx_0 é a concentração celular inicial e Cx a concentração celular, V é o volume do biorreator, F e F_0 são os valores das vazões e são dependentes de V e μ é o crescimento celular. Cs é a concentração de substrato, α e β constantes e x a massa celular. Substituindo o valor de r da Equação 14 na Equação 12, obtemos a equação 15. Na Equação 15 dividimos os dois lados por V e aplicamos a transformada Z. A Equação 17 possui o resultado da transformada Z para $\frac{dCx}{dt}$. Substituindo $\frac{dCx}{dt}$ pelo $Cx_{n+1} - Cx_n$ e o Cx pelo Cx_n aplicamos a transformada Z (Equação 18).

Para reescrever a função em espaço de estados a equação tem que estar com o Cx_{n+1} em evidencia de um lado e Cx_n, Cx_0 em evidencia do outro(Equação 20). O mesmo raciocínio na Equação 12 é realizado na Equação 13. Conhecendo a transformada de $\frac{dCx}{dt}, \frac{dCs}{dt}, x$ substituímos os valores (Equação 23). Para utilizar o espaço de estado é necessário, colocar em evidencia Cs_{n+1}, Cx_0, Cx_n e Cs_n (Equação 27). As matrizes de espaço de estados (Equação 29) foram construídas usando as variáveis em evidencia das equações 20 e 27.

$$\frac{VdCx}{dt} = Cx_0 * F_0 - F * Cx + r * V \quad (12)$$

$$\frac{-dCs}{dt} = \frac{\alpha * dx}{dt} + \beta * x \quad (13)$$

$$r = \mu * Cx \quad (14)$$

$$\frac{VdCx}{dt} = Cx_0 * F_0 - F * Cx + \mu * Cx * V \quad (15)$$

$$\frac{Cx}{dt} = \frac{F}{V} Cx_0 - \frac{F}{V} * Cx + \mu * Cx \quad (16)$$

$$\frac{dCx}{dt} = Cx_{n+1} - Cx_n \quad (17)$$

$$Cx_{n+1} - Cx_n = \frac{F}{V} Cx_0 - \frac{F}{V} * Cx_n + \mu * Cx_n \quad (18)$$

$$Cx_{n+1} = \frac{F}{V} Cx_0 - \frac{F}{V} * Cx_n + \mu * Cx_n + Cx_n \quad (19)$$

$$Cx_{n+1} = \frac{F}{V} Cx_0 - Cx_n \left(\frac{F}{V} - \mu - 1 \right) \quad (20)$$

$$\frac{-dCs}{dt} = \frac{\alpha * dx}{dt} + \beta * x \quad (21)$$

$$\alpha = \frac{1}{Y_{XS}} \quad (22)$$

$$\frac{dCs}{dt} = \frac{-\alpha * dx}{dt} - \beta * x \quad (23)$$

$$Cs_{n+1} - Cs_n = \alpha (Cx_{n+1} - Cx_n) - \beta * Cx_n \quad (24)$$

$$Cs_{n+1} = \alpha \left(\frac{F}{V} Cx_0 - Cx_n \left(\frac{F}{V} - \mu - 1 \right) - Cx_n \right) - \beta * Cx_n + Cs_n \quad (25)$$

$$Cs_{n+1} = Cx_0 \left[-\alpha \frac{F}{V} \right] + Cx_n \left[\alpha \left(\frac{F}{V} - \mu \right) - \beta \right] + Cs_n \quad (26)$$

$$Cs_{n+1} = Cx_0 \left[-\alpha \frac{F}{V} \right] + Cx_n \left[\alpha \frac{F}{V} - \alpha \mu - \beta \right] + Cs_n \quad (27)$$

$$\dot{Y} = Ax + B\mu \quad (28)$$

$$\begin{bmatrix} Cx_{n+1} \\ Cs_{n+1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\left(\frac{F}{V} + \mu + 1\right) & 0 \\ \left(\alpha \frac{F}{V} - \alpha \mu - \beta\right) & 1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} Cx_n \\ Cs_n \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \frac{F}{V} \\ -\alpha * \frac{F}{V} \end{bmatrix} \quad (29)$$

4- Metodologia

O trabalho pode ser dividido em duas partes, uma prática e outra computacional. A parte prática se resume em coletar os dados, dos cultivos em batelada, para utilizá-los na parte computacional. A parte computacional é realizada depois do fechamento da parte experimental. Ela consiste primeiramente em tratar os dados obtidos no laboratório e depois comparar os dados práticos com os modelos matemáticos.

Foram realizados três experimentos e apenas dois foram analisados mais profundamente, um cultivo não possuía dados insuficientes, para realização da modelagem. Todos os experimentos foram realizados no laboratório biotecnológico da UFSJ no Campus Alto Paraopeba. Em todos os cultivos a levedura utilizada estava foi a *Saccharomyces Cerevisiae* liofilizada da estirpe UFLA CA-11.

Todos os experimentos foram realizados em um reator *airlift*. O fluxo de ar era gerado por um compressor em um trabalho constante que gerava 5 Kgf/cm², ele passava por um filtro de papel, que impedia a passagem de possíveis contaminantes. O reator também possuía uma jaqueta conectada a um banho maria que permitia controlar a temperatura do meio. Este foi ajustado para 36°C durante todos os experimentos.

No primeiro experimento a levedura foi inoculada diretamente e no segundo foi realizado inóculo antes de ser adiciona ao reator. A utilização do inóculo tinha como objetivo facilitar a coleta de dados, para a adaptação da levedura eliminando a fase *lag*, iniciando o cultivo na fase *log*. O terceiro cultivo também foi realizado uma ativação da levedura primeiramente no inóculo.

Para determinação da concentração celular foi realizado a comparação das massas dos tubos falcon. Estes tubos foram secos em estufa a 50°C durante 3 dias, no final deste procedimento a massa de cada tubo foi anotada e cada um recebeu uma marcação referente ao horário de coleta. No primeiro experimento foram adicionados em cada tubo 15 mL, no segundo e terceiro a quantidade de volume retirada do cultivo foi de 25 mL. Depois de receber o volume do cultivo eles foram resfriados a 4°C e levado a centrifugação a uma rotação constante de 5000RPM gerando 3250xg durante vinte minutos. A centrifugação acelerou o processo de sedimentação, sendo possível separar a parte líquida contendo o substrato da parte sólida contendo a massa celular. Os tubos falcon agora contendo a parte solida foram submetidos a 50°C em uma estufa durante uma semana (Figura 1). Por fim foram pesados e a massa de cada tubo anotada, a

diferença da massa inicial com a final seria entendido como a massa celular. Sabendo a massa de um determinado volume retirado do cultivo é possível construir uma tabela contendo a concentração celular pelo tempo.

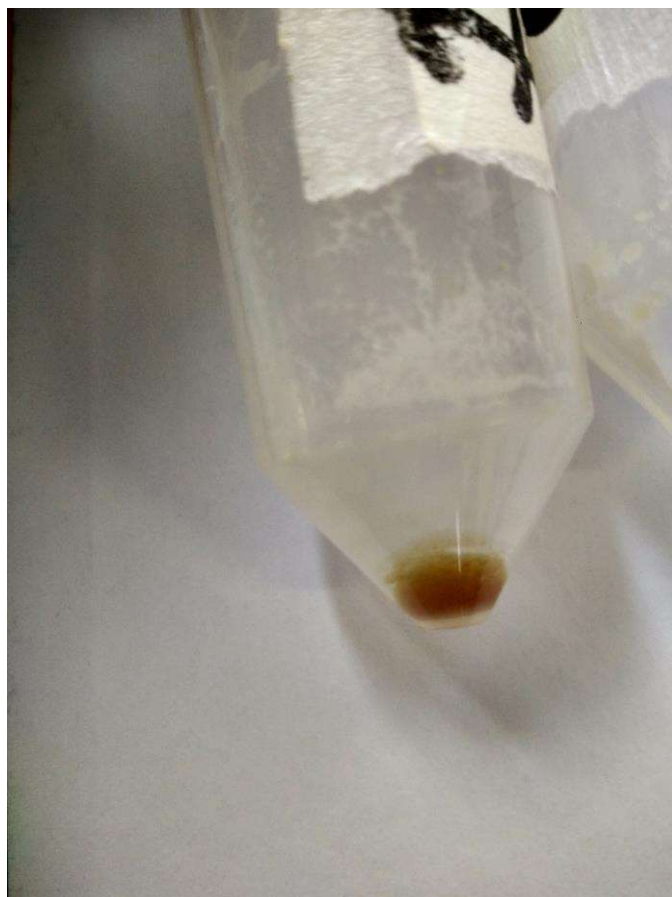


Figura 1 – Tubo falcon depois de ser centrifugado e seco na estufa, a massa celular está presente no fundo do tubo.

No primeiro experimento não utilizou inóculo, com a adição dos compostos diretamente no reator e o volume foi completado em seguida. Todos os instrumentos utilizados foram esterilizados com álcool 70% (v/v), para evitar contaminações.

Utilizando uma balança de precisão foram pesados os compostos presentes na Tabela 3 com as seguintes massas e adicionados em um reator batelada aeróbico (Figura 2). Com a adição de 4 litros de água destilada, o reator chegou aos 4,107 litros e as concentrações de cada composto também são apresentados na Tabela 3. Ao final do experimento foi pesado todos os compostos que permaneceram no biorreator depois do meio ser descartado, eles foram classificados como perdas totais.

Tabela 3 – Massa e concentração de cada composto e perdas totais.

Composto	g	g/L
$C_6H_{12}O_2$	20,063	4,885
Extrato de levedura	10,065	2,451
$(NH_4)_2SO_4$	17,993	4,381
KH_2PO_4	20,003	4,871
$MgSO_4$	0,9945	0,242
Levedura	8,0298	1,955
perdas totais	1,0051	-



Figura 2 – Biorreator aerado utilizado no processo fermentativo, o cultivo foi realizado em batelada.

O cultivo foi realizado por 6 horas onde foram recolhidas 9 amostras em triplicada em tubo falcon de 15mL, para determinação da massa celular usando o procedimento já descrito anteriormente. Foi coletando 15mL de meio utilizando uma pipeta, em intervalos de meia hora durante as primeiras 3 horas e posteriormente, o intervalo de coleta passou a ser de hora em hora. Durante os intervalos de coleta foram obtidos dados de pH e temperatura do meio. Depois de centrifugado os tubos a parte sólida no fundo foi separada da parte líquida e esta foi transferida para um tubo falcon de 50 mL. Os tubos com o sólido foram levados para estufa a 50°C para que toda umidade fosse retirada e os tubos com o líquido foram congelados na geladeira a -4°C. As massas dos tubos menores foram anotadas, depois de uma semana.

Utilizando um kit enzimático (Glicose oxidase) foi possível verificar a concentração de substrato. O kit utilizado foi a Glicose Enzimática Líquida Sistema Enzimático para Determinação da Glicose no Soro, Plasma e demais Líquidos Biológicos. Com o kit é possível quantificar a concentração de glicose, normalmente utilizado para verificar a concentração da glicose no sangue humano.

Ao adicionar glicose e uma solução padrão presente no kit e uma solução tampão de fosfatos, contendo p-Hidroxibenzoato, 4-Aminoantipirina (4-AAP), Glicose Oxidase e Peroxidase ocorre a formação da 4-Antipirilquinonimina. Ela tem uma coloração avermelhada e pode ser medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm. Utilizando um espectrofotômetro foi medido a absorbância neste comprimento de onda, primeiramente da solução padrão já preparada para calibrar o equipamento e foram anotados os valores para cada amostra.

Com o término do primeiro cultivo foram realizados mais dois cultivos utilizando um inóculo contendo 10% (v/v) do volume total do reator. Os inóculos utilizando possuíam a concentração de glicose 7 g/L e extrato de levedura 5g/L. Foram coletadas amostras de 25 mL de meio em duplicata, utilizando tubos falcon de 50 mL.

O segundo cultivo foi realizado utilizando um inóculo contendo 10% (v/v) do volume total do reator com uma concentração de células de 16 g/L, a elevada concentração celular levou as células a morte celular dificultando sua quantificação. A mesma técnica de quantificação da concentração celular do primeiro experimento foi realizada, porém foram coletados os dados de cada amostra foram realizados em duplicata e o volume de cada amostra aumentou 10 mL. Sendo assim, utilizou-se tubos falcon de 50 mL, cada um contendo 25 mL. A quantidade de cada composto presente no reator está presente na Tabela 4 e foi adicionado água destilada até completar o volume de 4 L no biorreator.

O cultivo durou cinco horas e como foram coletados dados em duplicata. No cultivo em questão não foram realizadas análises quantitativas de glicose, porque o crescimento celular não foi explicado pelos modelos propostos.

Tabela 4 – Composição dos compostos no meio utilizado no segundo experimento.

Composto	Peso Molecular	Quantidade Utilizada(g)
D-Glicose anidra (Dextrose) P.A.	180,16	28
Extrato de Levedura Puríssima	Não possui	9,96
Sulfato de Amônia (NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	18,06
Fosfato de Potássio Monobásico anidro (KH ₂ PO ₄)	136,09	20,03
Sulfato de Magnésio MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	1,02

O último (terceiro) cultivo foi realizado utilizando parâmetros muito parecidos com o quarto, porém adicionando 0,1mL/L (98%v/v) de ácido sulfídrico para correção do pH no reator e preparando um inóculo com uma concentração de 8 g/L. O pH foi medido utilizando uma fita depois da adição do inóculo no meio de cultivo no reator já preparado.

O inóculo foi preparado adicionando 4,02 g de levedura liofilizada e 3,58 g de glicose em um erlenmeyer de 1 L. O volume foi completado com água até a marca de 500 mL. No meio presente no reator foram adicionados os compostos presentes na tabela 5 e o volume total do reator foi de 4,95 L.

Tabela 5 – Dados obtidos utilizando para determinar a quantidade de cada composto no terceiro cultivo.

Meio	g	g/L
Glicose	31,5001	6,3
Extrato de levedura	11,2534	2,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,2518	4,1
KH ₂ PO ₄	22,8222	5,6
MgSO ₄	1,1290	0,23
Levedura		0,6



Figura 3 – Glicosímetro, Accu-Chek® Active monitor utilizado.

Para quantificar a concentração de glicose no meio, foi utilizado o glicosímetro presente na Figura 3. Respeitando os limites do equipamento, as primeiras amostras foram diluídas 50%(v/v) em água destilada utilizando uma pipeta de 25 mL. A diluição se fez necessária porque a concentração de glicose do meio era maior que a resolução do equipamento. Mesmo o equipamento sendo usado para determinar a concentração de açúcar no sangue, ele apresenta uma boa resolução para esse tipo de experimento. Utilizando um conta gotas foi possível adicionar uma gota por amostra no circuito de cada fita obtendo uma resposta do monitor. Os dados obtidos pelo equipamento foram anotados.

5- Resultados e discussões

Utilizando os dados obtidos no primeiro experimento foi possível construir a Tabela 6. Sabendo que as amostras presentes na nesta tabela foram obtidas em triplicada utilizando tubos de 15 mL de meio, foi possível determinar as diferenças das massas inicial e final para cada ensaio. A média simples das diferenças foi obtida calculando uma média de todas as três diferenças, essas obtidas experimentalmente para cada amostra. O valor considerado por sua vez foi obtido utilizando a média dos dois resultados mais próximos. Quando a diferença da massa do tubo foi dividida pela média simples e o intervalo do resultado foi maior que 1,15 e menor que 0,85 ou negativo, esse valor foi desconsiderado. A amostra 4 não possui um valor considerado, porque as 3 diferenças das massas foram desconsideradas. A concentrações celular em cada intervalo de tempo pode ser calculada utilizando os valores considerados da Tabela 6 dividido pelo volume da amostra que foi 15 mL.

Tabela 6- Média dos dados obtidos experimentalmente das diferenças das massas de cada amostra e valores considerados de cada valor.

Amostra	Média simples (g)	Valor considerado (g)
0	0,021167	0,02
1	0,0189	0,0202
2	0,023933	0,0212
3	0,023933	0,0212
4	0,0213	-
5	0,0234	0,0224
6	0,027433	0,0281
7	0,029033	0,0293
8	0,0312	0,0304
9	0,033067	0,0338

Utilizando os valores considerados na Tabela 6 foi possível plotar um gráfico da variação da concentração de células (g/L) pelo tempo. Utilizando um software foi possível criar uma função exponencial dos dados presentes no gráfico. Este está presente na Figura 4, em que a linha de tendência é uma curva exponencial pontilhada laranja e os pontos experimentais (valores considerados/15 mL) são os pontos laranjas.

Com o auxílio do gráfico, fica evidente que a levedura passa por uma fase *lag* de adaptação do meio nas primeiras duas horas. O comportamento de adaptação realizado pela célula ao meio do biorreator proporciona uma mudança na metodologia dos próximos

experimentos, onde um inoculo contendo 10% (v/v) do meio deve ser preparado para diminuir o tempo de cultivo. Como o objetivo do trabalho é a construção de um modelo matemático da fase de crescimento exponencial da célula, diminuir o tempo de adaptação desta e diminuir o tempo de cultivo são características desejáveis. Traçando uma linha de tendência utilizando os valores obtidos experimentalmente, chegamos a uma função exponencial que se assemelha muito com a equação de Monod (Equação 3) e podemos fazer a seguinte afirmação (Equação 30) considerando o valor de μ uma constante. Substituindo Cx_0 pelo valor obtido experimentalmente (1,9553 g/L) e μ por 0,0937(h⁻¹) chegamos na Equação 30 por meio da regressão dos pontos experimentais, que possui um R² de 0,9597.

$$Cx = Cx_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

$$Cx = 1,9553 \text{ (g/L)} e^{0,0937 \text{ (h}^{-1}\text{)} t} \quad (30)$$

Em um modelo mais simples com o crescimento celular constante podemos observar um R² aceitável, indicando um bom modelo. O R² descreve quanto o modelo está condizente com os pontos obtidos no experimento pratico, em que um R²=1 seria o melhor resultado possível. Utilizando a literatura podemos afirmar que um modelo ideal possui um R²≥0,95.

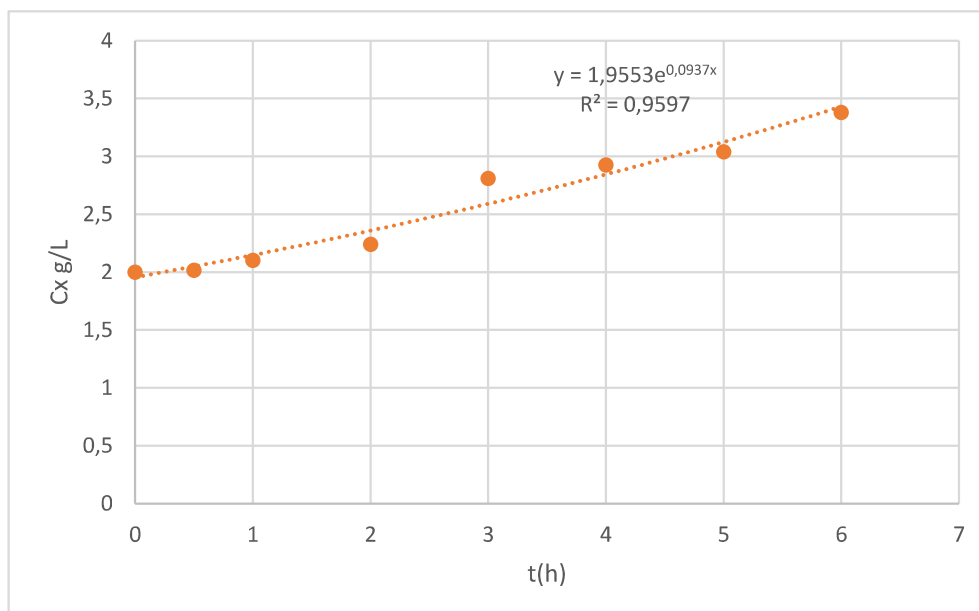


Figura 4 – Concentração de células pelo tempo, os pontos laranjas são os pontos práticos e a curva tracejada é a função exponencial do crescimento.

O ideal seria trabalhar em temperatura e pH constantes para simplificar o sistema. Como o modelo matemático considera apenas a concentração de células e a de substrato outras variáveis podem diminuir a precisão do sistema. Porém, como não possuíamos dados sobre a levedura no início do processo e a temperatura não estava constante obtivemos os seguintes resultados presentes na Figura 5. Os dados da Figura 5 foram obtidos utilizando um pH de baixa precisão e um termômetro dentro do reator, sem a necessidade de coletar amostras. Nos próximos experimentos a temperatura conseguiu ser constante durante todo o procedimento.

Analisando a Figura 5 e realizando uma interpretação conjunta com a Figura 4, podemos observar que a levedura começa a crescer expressivamente quando o pH está perto de 5, pelo conhecimento já obtido sobre o cultivo de leveduras já é sabido que elas se desenvolvem melhor em um pH mais ácido. A utilização do gráfico nos indica uma estabilização do pH em 4,7. Possivelmente a levedura tem a necessidade de acidificar o meio antes de realizar a multiplicação celular.

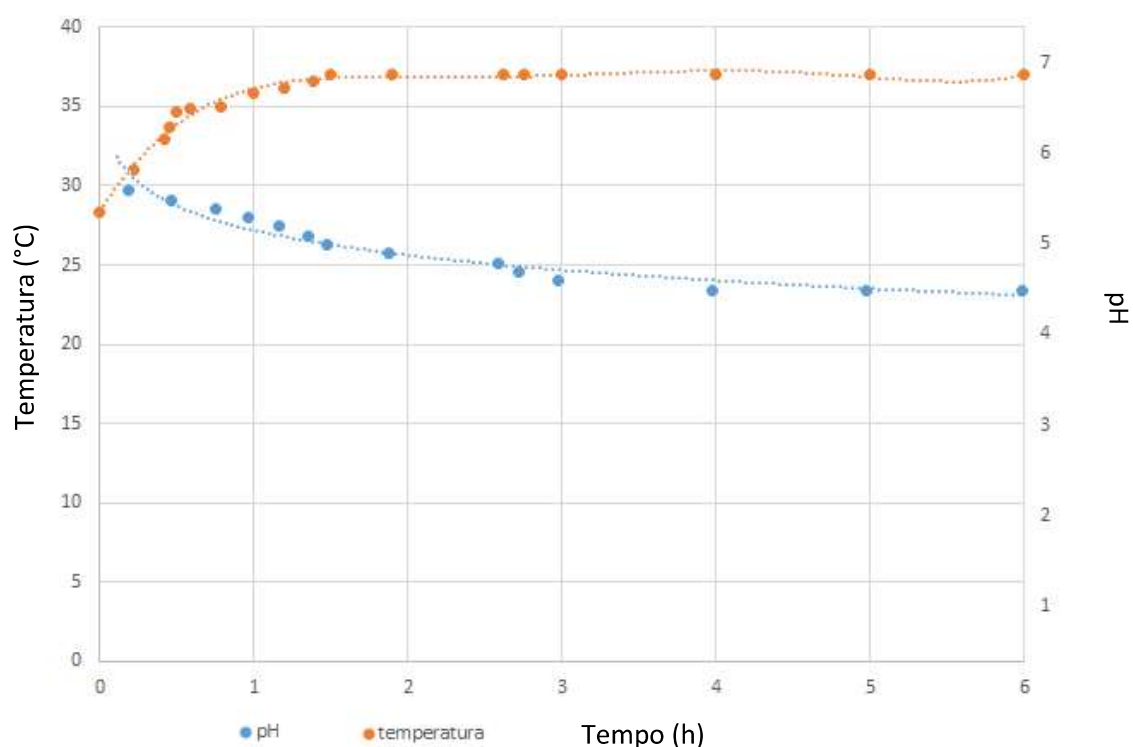


Figura 5 – Variação do pH e da temperatura pelo tempo em horas. Pontos azuis valores de pH coletados e pontos laranjas valores de temperatura.

Para os próximos cultivos o controle do pH passa a ser uma questão levantada como forma de aumentar a taxa de crescimento e o tempo do experimento. No terceiro, a adição de ácido sulfídrico no preparo de meio não conseguiu estabilizar o pH em 4,7. Com ácido no meio

foi realizado uma medição utilizando uma fita onde o valor obtido foi de pH 5. Observando a Figura 5 chegamos à conclusão que mesmo que o pH não seja 4,7 o valor inicial próximo a 5 já significa um menor gasto da levedura em acidificar o meio, consequentemente uma diminuição do tempo de adaptação celular.

A Tabela 7 descreve valores de absorbância e glicose obtidos experimentalmente utilizando o kit enzimático. É possível verificar valores pouco consistentes, já que o equipamento não possui uma boa resolução em valores de absorbância acima de 1,5. A Tabela 8 descreve a variação das concentrações celular e de substrato nos intervalos de tempos.

Tabela 7 – Valores de absorbância e a concentração de glicose obtidos experimentalmente utilizando kit enzimático.

Tempo(h)	Abs 510nm	Glicose(mg/dL)	g/L
Padrão	0,321		
0	1,878	585,047	5,85
0,5	1,894	590,031	5,9
1	1,752	545,794	5,458
1,5	1,605	500	5
2	1,367	425,857	4,259
2,5	0,95	295,95	2,96
3	0,062	19,3146	0,193
4	0,035	10,9034	0,109
5	0,022	6,85358	0,069
6	0,017	5,29595	0,053

Tabela 8 – Variação das concentrações celular e de substrato nos intervalos de tempos.

Tempo(h)	Cs(g/L)	Cx(g/L)
0	5,85	2
0,5	5,9	2,015
1	5,458	2,12
1,5	5	2,12
2	4,259	2,13
2,5	2,96	2,24
3	0,193	2,81
4	0,109	2,925
5	0,069	3,04
6	0,053	3,38

Utilizando os dados obtidos das concentrações celular e do substrato é possível a construção de uma tabela para a visualização das variações das concentrações pelo tempo. Utilizando esses dados presentes na Tabela 8 é possível estimar os valores de $\mu_{\max}$ e K_s . Os valores de Y_{xs} e outras constantes podem ser obtidos pelos dados da Tabela 7.

Utilizando a Equação 14 é possível determinar o Y_{xs} . Um gráfico de μ pela concentração de substrato foi traçado (Figura 6) utilizando a Equação 4 e a C_s presentes na Tabela 8 para determinar o μ , em cada tempo. Para plotar o gráfico μ pela C_s (Figura 6), foi inicialmente utilizados valores de $\mu_{\max}$ e K_s retirados da literatura. Como o valor de μ dependia das duas constantes, elas foram variando e utilizando o R^2 presente no gráfico (Figura 6), foi escolhido os valores de $\mu_{\max}$ e K_s que mais aproximaram R^2 à 1.

$$Y_{xs} = \frac{Cx - Cx_0}{Cs_0 - Cs} \quad (14)$$

$$Y_{xs} = \frac{Cx - Cx_0}{Cx_0 - Cs} = \frac{3,38 - 2,00}{5,85 - 0,053} = 0,238 \quad (31)$$

No primeiro experimento coletamos valores das concentrações de células e de substrato pelo tempo, com isso foi possível determinar um valor de $\mu_{\max}$ e K_s . Utilizando um gráfico da variação do crescimento celular (μ) pela concentração de substrato (C_s) (figura 6) é possível determinar o $\mu_{\max}$, já que esse é o maior valor assumido por μ e o K_s , sendo a concentração de substrato quando o valor de μ é igual a metade do valor de $\mu_{\max}$.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_s}{K_s + C_s} \quad (4)$$

Os valores de $\mu_{\max}$, K_s e Y_{xs} (Equação 31) encontrados foram 0,52, 0,24 e 0,238 respectivamente, utilizando esses valores foram modelados modelos utilizando a cinética descrita por Monod (Figura 7) e Verhulst (Figura 8). Em relação aos valores de Cx presentes na Tabela 8, são utilizados como parâmetros para estimar os valores de mais adequados para serem utilizados no modelo de Monod, assim como os valores de C_s .

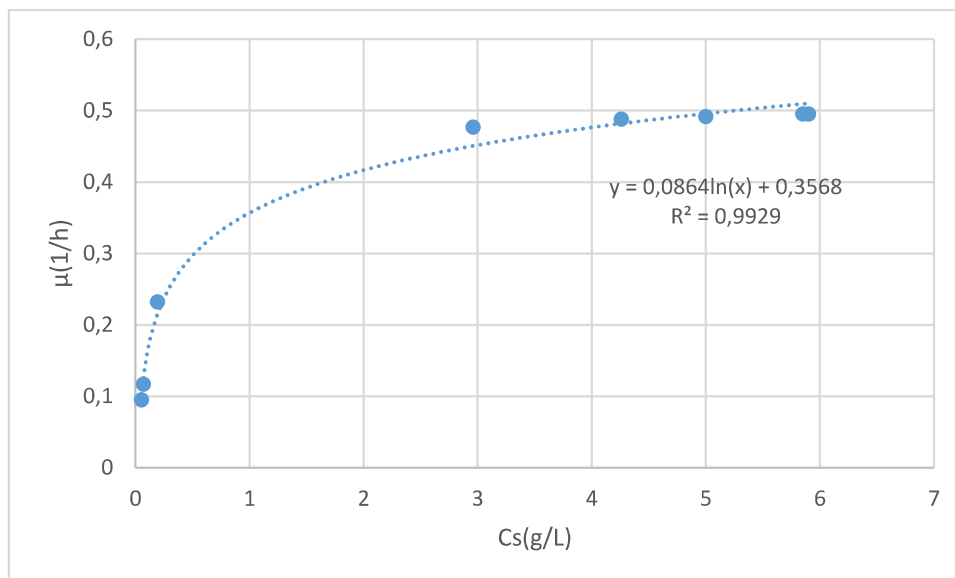


Figura 6 – Gráfico do crescimento celular μ pela concentração de substrato, os valores calculados de μ são representados pelos pontos azuis, $\mu_{\max}=0,52$.

É possível observar que o modelo de Verhulst possui uma maior descrição das posições dos dados experimentais, esse modelo é mais complexo. O fato de utilizarmos um μ variável acaba aumentando a influência de C_s no C_x , diminuindo o tempo de reação de Monod. Na Figura 7 podemos observar que o modelo de Monod não consegue explicar a fase *lag* de adaptação do micro-organismo. A cinética em Monod ocorre mais rápida que os dados observados experimentalmente. Para encaixar os dados de C_x na Figura 8, o consumo de substrato teve que ser desprezado. Utilizando a constante (β) presente na equação do C_s é possível interferir nas curvas gerados pelos dois modelos, porém existe um balanço desejado que melhor representa C_x e C_s em $\beta=0$ (valor utilizado de β). Os dois modelos demonstraram um consumo de substrato mais rápido, que o observado no experimento.

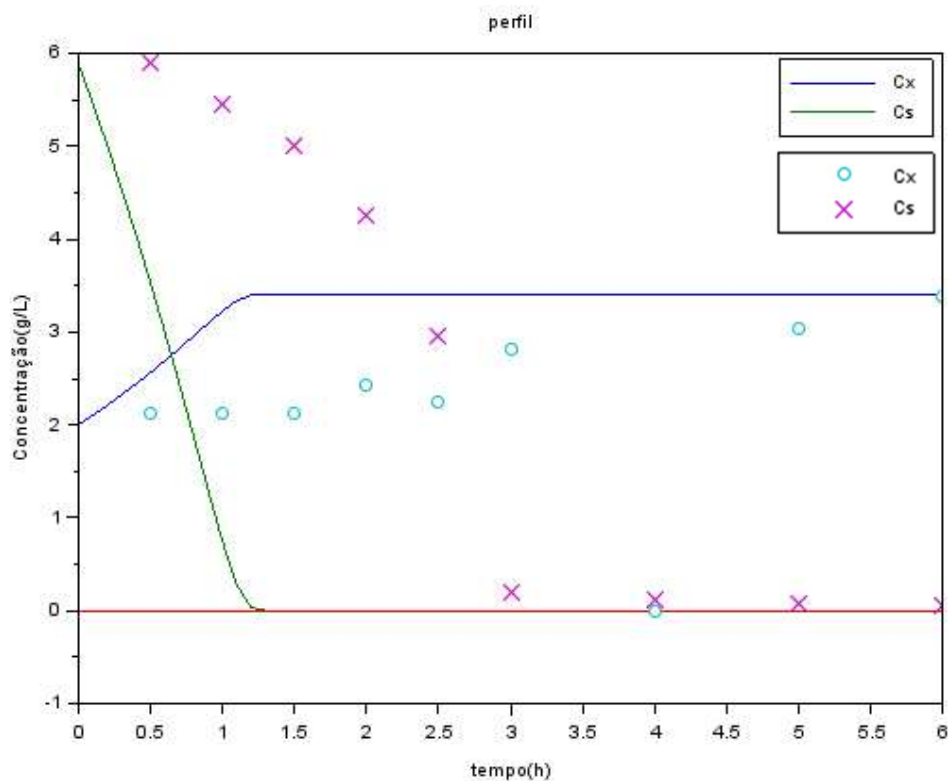


Figura 7 – Gráfico da cinética de Monod, o modelo é representado pelas curvas e pontos experimentais são representados pelos “o” e “x”.

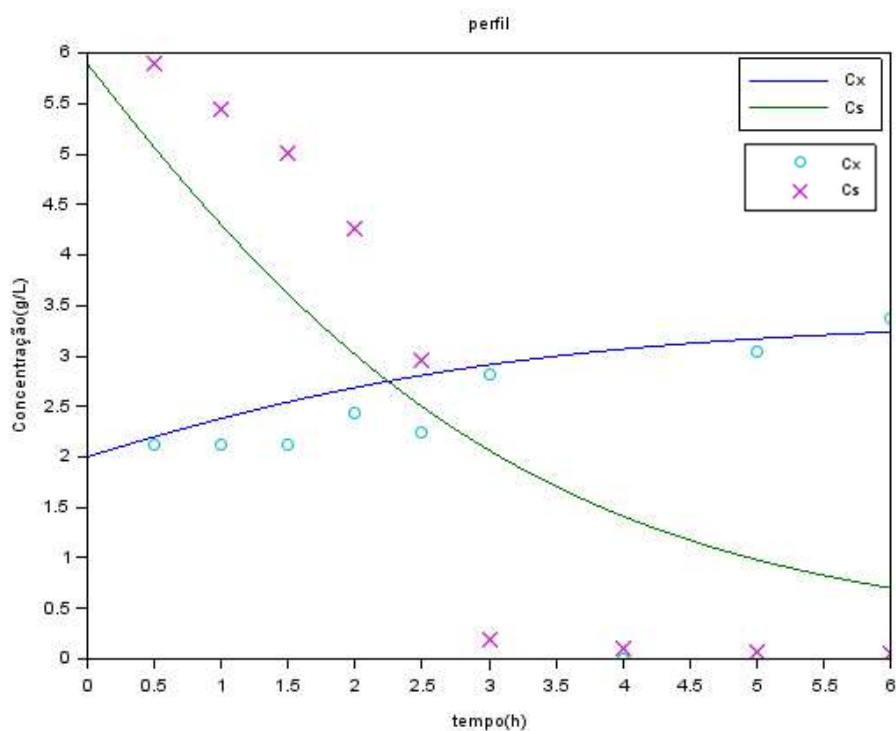


Figura 8 – Gráfico da cinética de Verhulst, o modelo é representado pelas curvas azul e verde. Os pontos experimentais são representados como “o” para a concentração celular (Cx) e um “x” para a concentração de substrato (Cs).

Como o primeiro experimento não possuía inóculo o tempo de adaptação da célula foi crucial nos modelos utilizando transformada de Laplace (figuras 9 e 10). Esse tipo de modelo comumente utilizado em cultivo contínuo, quando presente no cultivo em batelada demonstrou uma cinética acelerada, em que todo o substrato foi consumido em poucas horas.

O modelo utilizando a transformada Z presente na Figura 11 possui um comportamento discreto. Esse comportamento aumenta a compatibilidade com os dados experimentais. Como já descrito anteriormente as fases *lag* e a *log* proporcionaram duas equações distintas dentro do mesmo experimento, modificando drasticamente os comportamentos das duas concentrações analisadas.

Tanto a transformada Z como Laplace foram realizadas utilizando a cinética de Monod, como ponto de partida. Como a cinética de Monod não tinha apresentado bons resultados, já era esperado esse comportamento nas figuras 9, 10 e 11. O modelo de Monod é conhecido como um modelo que só consegue explicar a fase de crescimento exponencial.

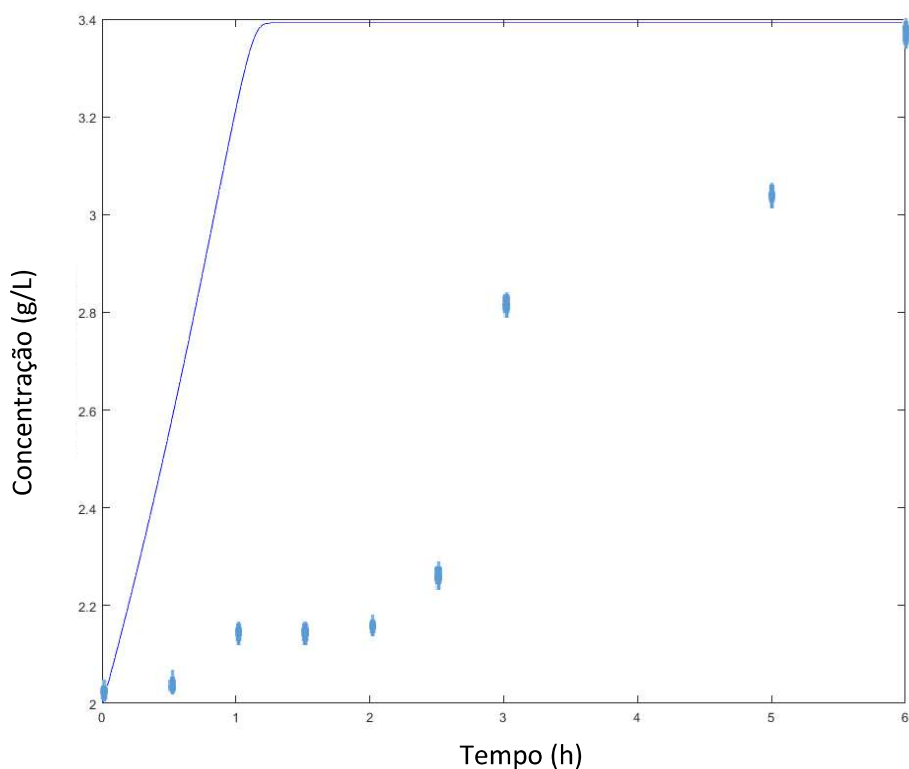


Figura 9 – Gráfico da concentração celular, os pontos são os pontos experimentais e a curva o resultado da modelagem utilizando a transformada de Laplace.

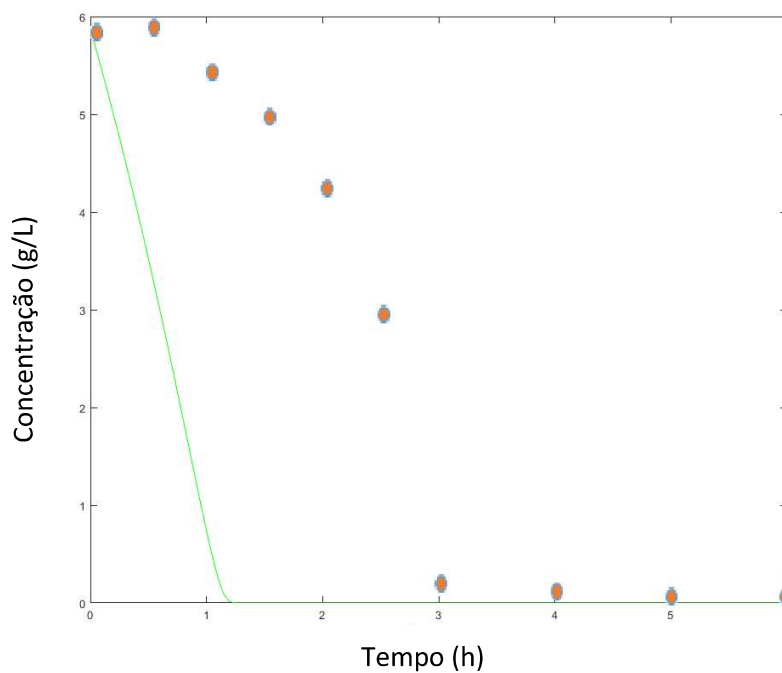


Figura 10 – Gráfico do consumo de substrato, os pontos são os pontos experimentais e a curva o resultado da modelagem utilizando a transformada de Laplace.

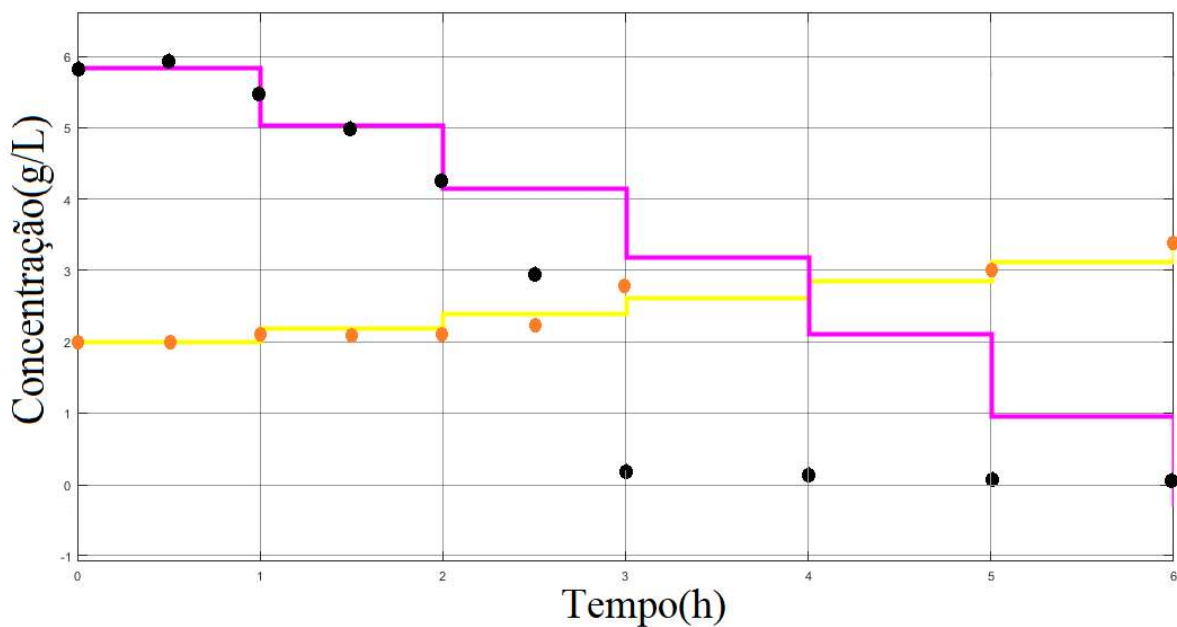


Figura 11 – Gráfico do consumo de substrato (roxo) e crescimento celular, (amarelo) explicado pela transformada Z ajustada a cinética de Monod, onde os pontos laranjas são os pontos experimentais de Cx e os pretos de Cs.

No segundo experimento foi feito um inoculo com uma concentração celular de 16 g/L e a quantidade de volume de cada amostra aumentou para 25 mL. Essa nova estratégia surtiu efeito e praticamente todos os tubos falcon possuíam valores coerentes. As diferenças dos valores da massa divididos pelas 25 mL pelo tempo estão na Tabela 9, com esses valores foi possível construir o gráfico da Figura 12.

Tabela 9 – Variação das concentrações de celular em intervalos de tempos.

Tempo(h)	Cx(g/L)
0,0	1,630
0,5	1,378
1,0	1,406
1,5	5,268
2,0	6,344
2,5	1,888
3,0	4,368
4,0	2,278
5,0	2,082

Observando o gráfico do crescimento celular (Figura 12) nota-se que ocorre uma variação de Cx muito abrupta. Como a concentração no inóculo foi muito alta, várias células morreram no inoculo. As células mortas ocasionaram em um acúmulo de células no fundo do biorreator. Essas em suspensão interferiram na medição da concentração celular (Cx). Utilizando a cinética de Monod com um valor de μ constante podemos observar um $R^2=0,8516$, significando que a equação 32 não possui uma representação dos pontos experimentais.

$$Cx = Cx_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

$$Cx = 0,6487 (g/L) e^{1,18(h^{-1})t} \quad (32)$$

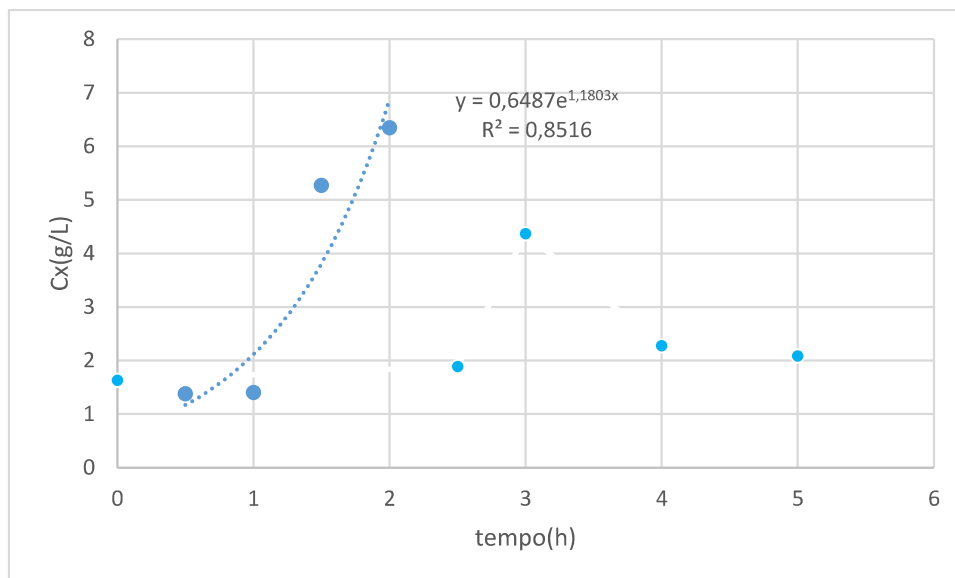


Figura 12 – Concentração de células pelo tempo, regressão exponencial em pontilhado.

No terceiro e último experimento a questão do pH e da alta concentração de células no inóculo foi alterada. O pH de trabalho da levedura conhecido era 4,7 com a adição de 0,1ml/L de ácido sulfídrico foi obtido um pH de 5 no meio do biorreator com o auxílio de uma fita. O inóculo possuía 8 g/L ou 4 g de levedura. Quando a levedura foi inoculada no biorreator a concentração esperada seria de pouco mais de (Cx_0) 0,8 g/L, porém o valor encontrado inicialmente (Cx_0) foi de 0,568 g/L. Mesmo diminuindo a massa de levedura no inóculo, possivelmente ocorreu morte celular no inóculo. Foram recolhidas 10 amostras em duplicada do meio de cultivo. A utilização de 25ml de meio por amostra diminuiu o erro relacionado a massa do tubo seco. A redução do volume do meio no biorreator não era desejada, a escolha de coletar dados em duplicata não afetava o volume de forma significativa. Como cada ponto pratico foi determinado utilizando a média dos dois pontos, valores inconsistentes (o valor amostral dividido pelo valor da média menor que 0,85 ou maior de 1,15) ou negativos foram descartados. Com as massas dos tubos no início e no final, calculamos a diferença, a diferença dividida pelo volume coletado (25 mL) é a concentração celular, (Cx) todos esses dados estão presentes na tabela 10. Durante os experimentos ocorreram fenômenos não esperados, um deles é a perda de massa dos tubos, seja pela diferença da umidade ou outro material volátil presente nos tubos. Na Tabela 10 podemos observar alguns tubos que diminuíram suas massas com a adição de meio.

Tabela 10– Variação das massas dos tubos falcons secos pesados sem amostra e com a amostra seca, a diferença das massas e o Cx encontrado dividindo a massa pelo volume das amostras.

Amostra	Falcon de 50ml vazio(g)	Falcon de 50ml seco(g)	Diferença(g)	Cx(g/L)
0.1	13,3218	13,3360	0,0142	0,568
0.2	13,0883	13,1018	0,0135	0,540
1.1	13,1873	13,2061	0,0188	0,752
1.2	13,0079	13,0253	0,0174	0,696
2.1	13,7965	13,8207	0,0242	0,968
2.2	12,8133	12,8348	0,0215	0,860
3.1	12,9774	12,8660	-0,1114	-4,456
3.2	13,3830	13,5406	0,1576	6,304
4.1	13,3335	13,3573	0,0238	0,952
4.2	13,1434	13,1667	0,0233	0,932
5.1	13,3637	13,4512	0,0875	3,500
5.2	13,8403	13,6800	-0,1603	-6,412
6.1	13,3404	13,3743	0,0339	1,356
6.2	13,4864	13,5097	0,0233	0,932
7.1	13,4155	13,0204	-0,3951	-15,80
7.2	13,7923	13,7266	-0,0657	-2,628
8.1	12,8645	12,9078	0,0433	1,732
8.2	13,0302	13,0767	0,0465	1,860
9.1	13,6962	13,7620	0,0658	2,632
9.2	13,4106	13,4390	0,0284	1,136
10.1	12,8643	12,9137	0,0494	1,976
10.2	13,5402	13,5832	0,0430	1,720

A Tabela 10 forneceu um panorama geral para construção da Tabela 11. Na Tabela 11 foram organizados todos os dados necessários para estudo dos modelos matemáticos. Utilizando a tabela 11 foi possível traçar a Figura 13 onde podemos observar as concentrações celulares e do substrato pelo tempo. Traçando uma linha de tendências utilizando os dados do crescimento celular obtemos uma função exponencial (Equação 33) que pode ser entendida como Monod. Mesmo o μ constante, o valor de R^2 é igual a 0,9437 menor de 0,95.

$$Cx = 0,6312 (g/L)e^{0,2103(h^{-1})t} \quad (33)$$

Tabela 11 – Variação dos pontos experimentais, Cx e Cs nos intervalos de tempos.

Tempo(h)	Cx(g/L)	Cs(g/L)
0	0,554	6,34
0,5	0,724	5,93
1	0,914	6,04
1,5	-	5,48
2	0,942	5,26
2,5	-	4,60
3	1,144	4,05
4	-	1,98
5	1,796	-

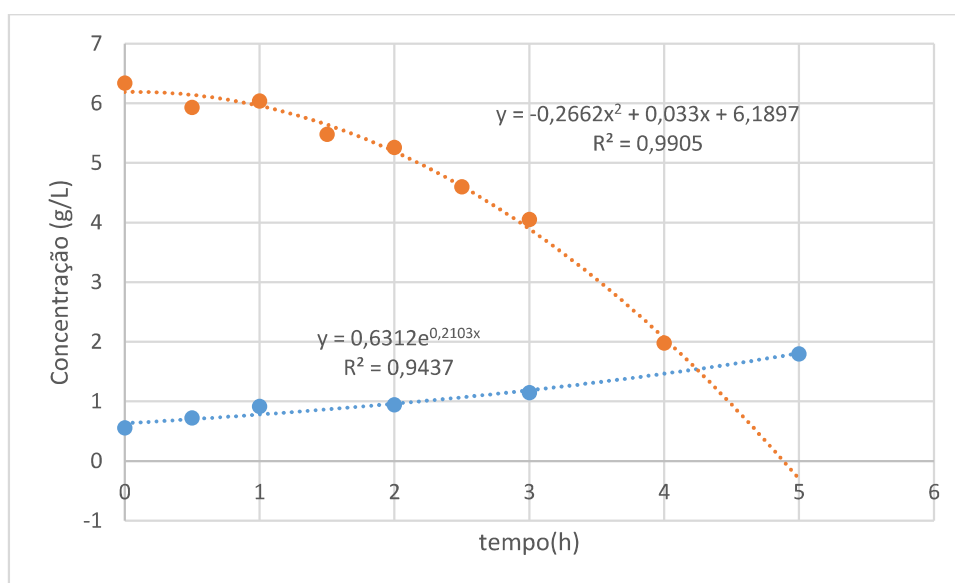


Figura 13 – Crescimento celular em azul e o consumo de substrato em laranja.

Utilizando a mesma técnica que a utilizada no primeiro experimento chegamos no gráfico de μ pelo C_s (Figura 14) e obtemos os valores de $\mu_{\max}$ e K_s $0,25 \text{ h}^{-1}$ e $0,14 \text{ g/L}$ respectivamente. O valor de Y_{xs} é calculado utilizando a Equação 34. Y_{xs} é igual a $0,196$.

$$Y_{xs} = \frac{Cx - Cx_0}{Cs_0 - Cs} \quad (14)$$

$$Y_{xs} = \frac{Cx - Cx_0}{Cs_0 - Cs} = \frac{1,796 - 0,554}{6,34 - 0,01} = 0,196 \quad (34)$$

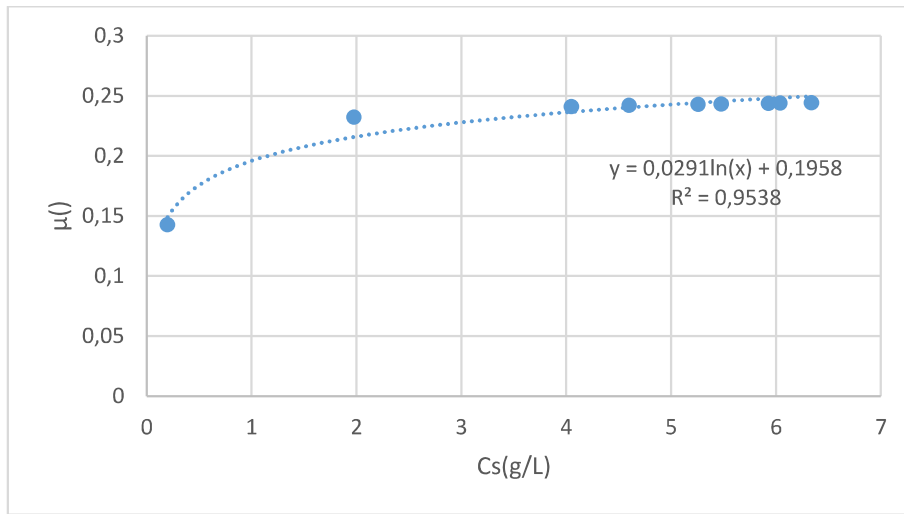


Figura 14 – Gráfico do crescimento celular μ pela concentração de substrato, é possível traçar uma reta com o valor limite de μ onde retiramos o $\mu_{\max}$.

Considerando $\beta=0$ e utilizando os valores de $\mu_{\max}$, K_s , Y_{xs} , Cx_0 e Cs_0 já mencionados anteriormente foi possível a utilização dos modelos matemáticos abaixo. A Figuras 15, possui o modelo de Monod. A Figura 16, o modelo de Verhulst e as figuras 17 e 18 possuem a transformada de Laplace no modelo de Monod.

No modelo de Monod (Figuras 15) e transformada de Laplace (figuras 17 e 18) podemos observar que os dados são precisos, porém não exatos, não há crescimento celular de 1 a 1,5 horas e o não decaimento da concentração do substrato proporcionou esse comportamento. Essa cinética não pode ser descrita por uma função exponencial como Monod ou Verhulst (figura 16). A função discreta presente na transformada Z (Figura 19) consegue descrever com maior exatidão os dados obtidos experimentalmente. A utilização de um μ dinâmico proporcionou uma representação exagerada do modelo de Verhulst onde o consumo de substrato foi maior que o observado. O inóculo diminuiu o tempo de adaptação da levedura no cultivo, isso

impactou em uma melhora do modelo de Monod, consequentemente a transformada Z e Laplace conseguiram se adequar mais nos pontos experimentais.

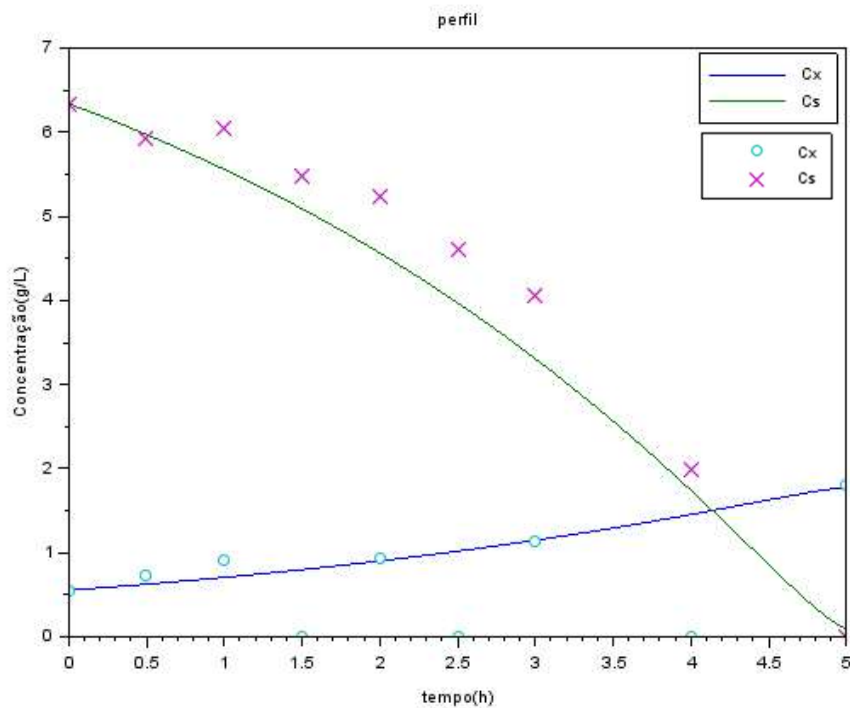


Figura 15 – Gráfico da cinética de Monod, o modelo é representado pelas curvas, os pontos experimentais são representados como “o” e “x”.

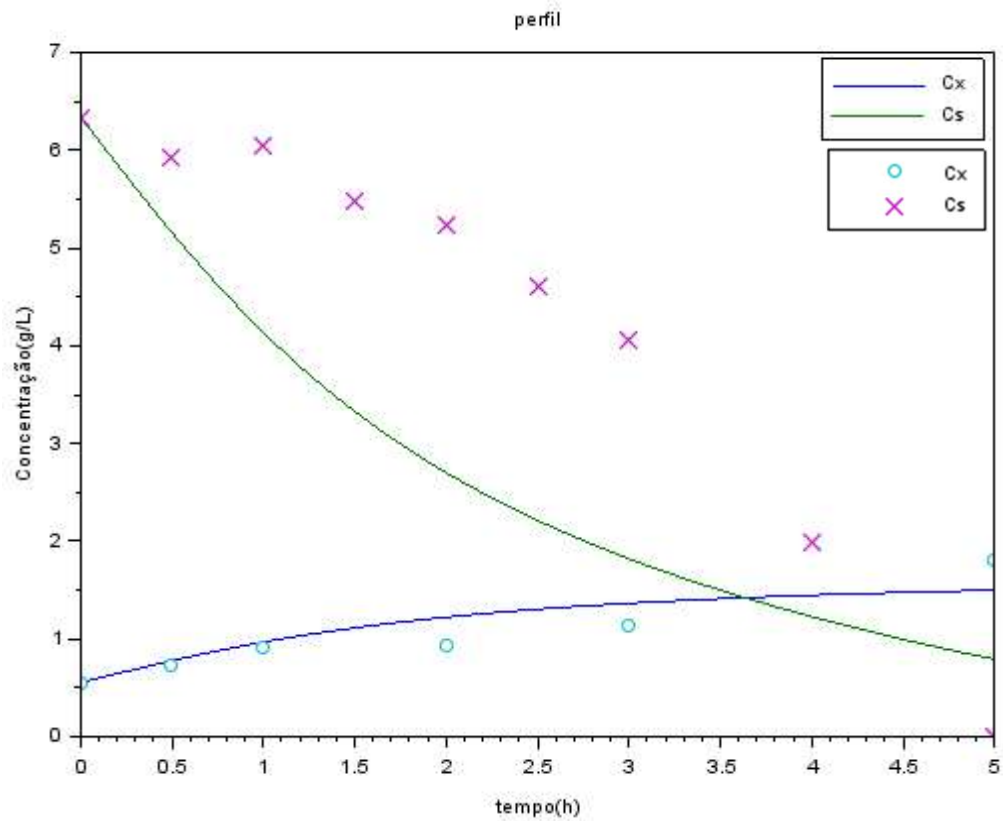


Figura 16 – Cinética de Verhulst, o modelo é representado pelas curvas azul e verde. Os pontos experimentais são representados como “o” para a concentração celular (C_x) e um “x” para a concentração de substrato (C_s).

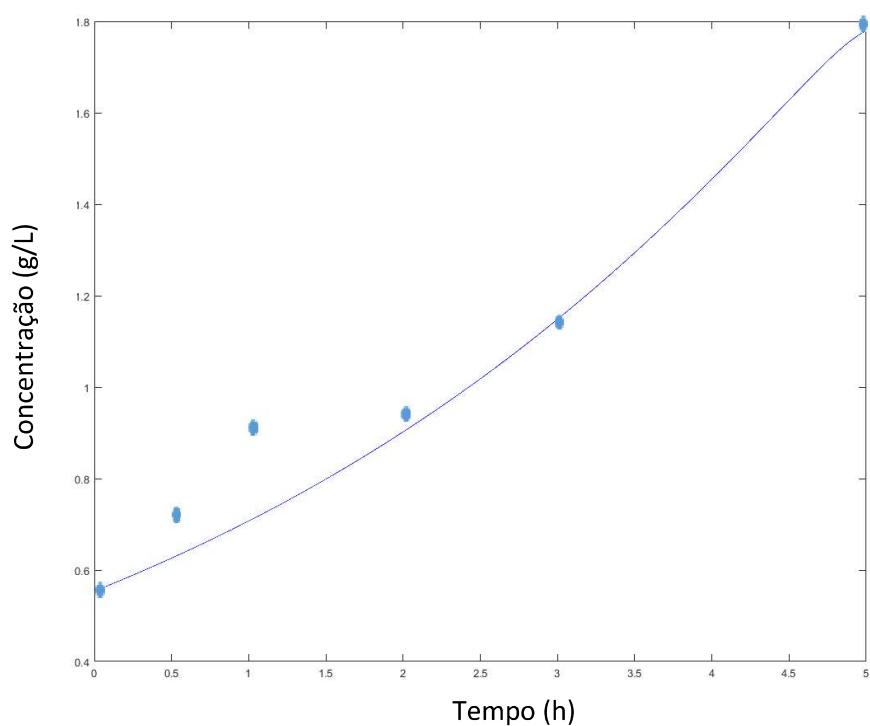


Figura 17 – Crescimento celular, os pontos são os pontos experimentais e a curva o resultado da modelagem utilizando a transformada de Laplace.

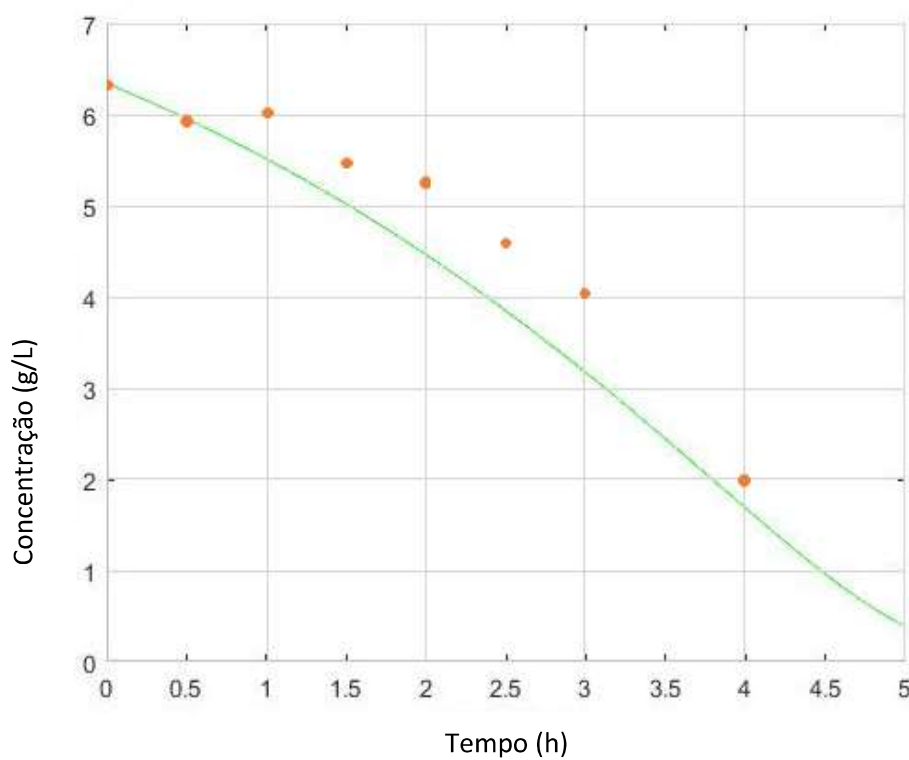


Figura 18 – Consumo de substrato, os pontos são os pontos experimentais e a curva é o resultado da modelagem da transformada de Laplace.

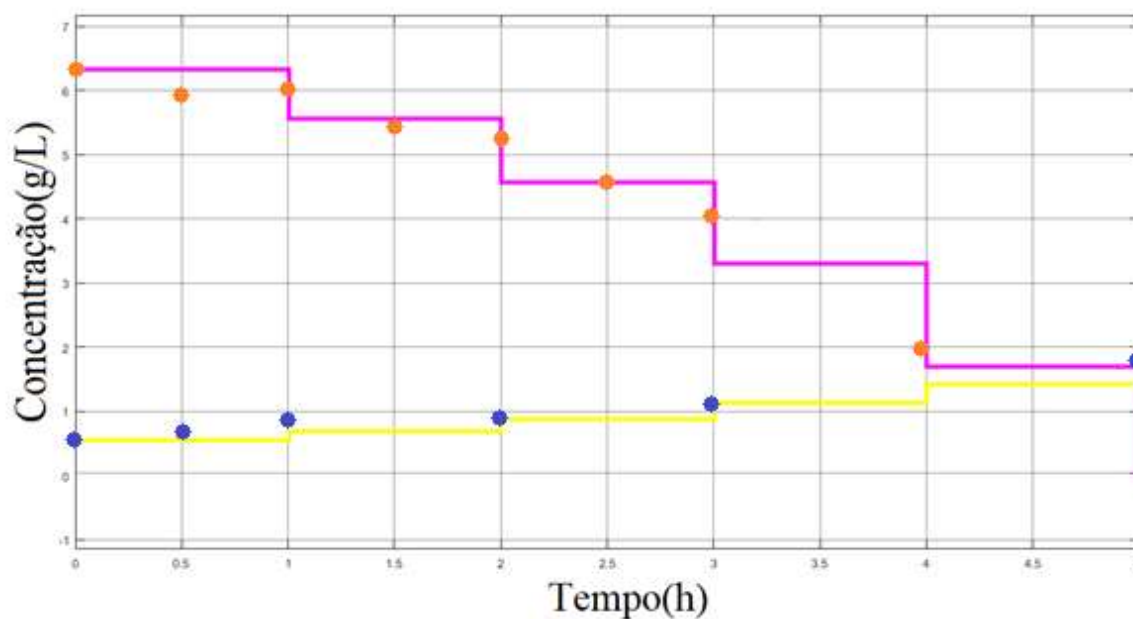


Figura 19 – Consumo de substrato (roxo) e crescimento celular, (amarelo) explicado pela transformada Z ajustada a cinética de Monod, onde os pontos laranjas são os pontos experimentais da C_x e os azuis da C_s .

Um dos objetivos iniciais era a otimização do processo, e isso não foi possível. Todos os modelos possuem entrada e saída linear, ou seja, o crescimento celular não depende da concentração inicial de células, dependendo exclusivamente da concentração inicial de substrato. O consumo de substrato é independente. Não é possível chegar em valores ótimos de C_{x0} e C_{s0} .

6- Conclusão

- É possível observar que ocorre crescimento celular sem variação de substrato, indicando que os modelos cinéticos estudados possuem limitações;
- Foi possível também estimar os parâmetros cinéticos: $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_s ;
- Os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente, foram próximos aos presentes na literatura;
- Embora os modelos matemáticos lineares sejam relativamente simples, estes podem ser utilizados para prever o comportamento do crescimento celular e do consumo de substrato no processo de fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pelo menos durante o crescimento exponencial;
- Quando modificamos as variáveis presentes para adequá-las aos dados do crescimento celular, desajustamos o consumo de substrato ou o oposto;
- O modelo de Monod ajustou melhor nos cultivos com inoculo, e o de Verhulst o cultivo sem inoculo;
- A função discreta consegue se destacar e possivelmente é o modelo que melhor descreve a cinética do nosso micro-organismo;
- Não era possível otimizar o cultivo com os dados recolhidos experimentalmente.

7- Trabalhos futuros

Provavelmente a levedura necessita de um pH próximo a 4,7 para começar o crescimento, como o controle de pH foi realizado apenas no último experimento seria interessante realizar os próximos cultivos fazendo esse controle inicial. Outro ponto importante também na parte de cultivo está relacionado a morte celular presente em todos os cultivos. Como todos os experimentos utilizaram uma concentração celular elevada o baixo crescimento celular foi seguido de uma alta taxa de morte celular, cultivos com uma baixa concentração inicial de células podem apresentar melhores resultados. Como não foram realizados, vários experimentos com as mesmas condições iniciais a baixa confiança nos dados e dificultou a análise dos resultados. A falta de indicadores estatísticos como R^2 impossibilitou a quantificação da precisão dos modelos.

8- Referencia Bibliográfica

AGUIRRE, L. A. **Introdução a identificação de sistemas**: Editora UFMG, 2013.

SHULAR, MICHAEL A., KARGI, FIKRET, **Bioprocess engineering- Basic concepts**; Prentice Hall of India, 2005.

CAO M., GREGSON K., MARSHALL S. **Atmospheric Environment**, 32,3293-3299. 1998.

CUNHA, V. e MACHADO, T. **Modelação e Controlo de sistemas dinâmicos**: Transformada Z e sistemas de tempo discreto. Instituto Superior Tecnico de Engenharia do Porto. Porto, Portugal, 2017.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**: UEP.Rio Claro, SP, 2006.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**: 2ºed. Oxford, UK:Ed. Elsevier, 2013.

EFREMOV, I. V. **Modelagem dos sistemas solo-planta**: Moscou, RU LKI.2008.

EUGENIO, C. D. SIMON, J. A. **Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul**: Ciência Rural, Santa Maria, RS. 2001.

SHULAR, H. S., **Elements of Chemical Reaction Engineering**: 4ºed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ. 2006.

LIU, S. **Bioprocess engineering Kinetics, Sustainability, and Reactor Design**: 2ºed. Syracuse, NY, USA: Elsevier B.V. 2017.

LOPES. J. J. C. Centro de Ciências Agrárias. Dissertação de Mestrado. UFSCar, 2017