



COPPE/UFRJ

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO DINÂMICO NA PRODUÇÃO
CONTÍNUA DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis*

Anna Carolina Rapôso Camêlo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): Tito Lívio Moitinho Alves
Maurício Bezerra de Souza Júnior

Rio de Janeiro
Março de 2009

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO DINÂMICO NA PRODUÇÃO
CONTÍNUA DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis*

Anna Carolina Rapôso Camêlo

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Anderson Wilson da Silva Henriques, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Prof. Nei Pereira Jr., Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2009

Camêlo, Anna Carolina Rapôso

Investigação do Comportamento Dinâmico na
Produção Contínua de Etanol por *Zymomonas mobilis*/
Anna Carolina Rapôso Camêlo. – Rio de Janeiro:
UFRJ/COPPE, 2009

XX, 157 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Tito Lívio Moitinho Alves

Maurício Bezerra de Souza Júnior

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Química, 2009.

Referências Bibliográficas: p. 118-128.

1. Comportamentos dinâmicos. 2. Modelagem
Matemática. 3. Fermentações Contínuas. I. Alves, Tito
Lívio Moitinho, *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III.
Titulo.

Sou o coração do folclore nordestino
Eu sou Mateus e Bastião do Boi Bumbá
Sou o boneco do Mestre Vitalino
Dançando uma ciranda em Itamaracá
Eu sou um verso de Carlos Pena Filho
Num frevo de Capiba
Ao som da orquestra armorial
Sou Capibaribe
Num livro de João Cabral
Sou mamulengo de São Bento do Una
Vindo no baque solto de Maracatu
Eu sou um alto de Ariano Suassuna
No meio da Feira de Caruaru
Sou Frei Caneca do Pastoril do Faceta
Levando a flor da lira
Pra Nova Jerusalém
Sou Luis Gonzaga
E eu sou mangue também

Eu sou mameluco, sou de Casa Forte
Sou de Pernambuco, sou o Leão do Norte

Sou Macambira de Joaquim Cardoso
Banda de Pifó no meio do Canavial
Na noite dos tambores silenciosos
Sou a calunga revelando o Carnaval
Sou a folia que desce lá de Olinda
O homem da meia-noite puxando esse cordão
Sou jangadeiro na festa de Jaboatão

(Leão do Norte - Lenine e Paulo César Pinheiro)

Dedico aos meus amados pais, Milton e Maria e irmão André.

Ao meu amor Marcos Motinaga.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Deus, que me move para o equilíbrio e tranquilidade.
- Aos professores Maurício e Tito, por toda orientação, ajuda, apoio e amizade nesses anos aqui no PEQ/COPPE/UFRJ.
- Ao meu amor Marcos Antonio Motinaga, pelo carinho, amor, apoio, companheirismo, paciência e ajuda.
- À Cândia Carneiro por toda ajuda e amizade e aos amigos do Laboratório de Bioprocessos, Dirceu, Indira e Juliana pela aprendizagem do conviver e dia-dia. À Rodrigo, Romi, Tati, Maira, Paola, Claudia e Daniel do LECC/Biomol pelas conversas, carinho e amizade.
- Aos amigos do Labpol, Alessandra, Amanda, Dani Bila, Gelma, Gustavo, Jardel, João, Jackson, Milena e especial a Simone Vendramel pela amizade, carinho e ajuda nas diversas discussões científicas e sobre a vida. Aos amigos do Nucatec, Biomol, LECC, LMSCP e TFD por tudo.
- Ao meu amigo Gustavo Krause (Gu), por ter sido o maior exemplo de vida, força e alegria nessa vida, levarei sempre comigo a sua pessoa.
- Aos professores Geraldo Lippel e Márcia Dezotti da UFRJ, Carlos Edison Lopes, Maria Los Angeles Palha e Alfredo Arnóbio da Gama da UFPE e Irapuan Pinheiro (UPE) que sempre me apoiaram.
- Ao Bob (PAM) por sempre estar disposto a ajudar nas mais diversas funções, Air, Antônio (gordinho), Célio e Macarrão (NUCAT), pela ajuda com o cromatógrafo que insistia sempre em dar algum problema.
- Ao amigo e irmão Isnaldo Francisco Júnior, por todo apoio quando aqui cheguei ao Rio, pela amizade, confiança e respeito.
- Aos amigos de Recife, Pedro Chabloz e Paulo Sales pela ajuda que sempre me foi dada nos dias mais felizes e mais difíceis aqui no Rio. Aos amigos Wilson Farias e Ana Paula pela amizade, carinho e apoio, estando presentes na minha vida e nessa minha conquista.
- Aos amigos Luisinho, Giselle, Luis Fernando, Daniele Catarizoni, Gabriel Vargas, Tales e Angélica que sempre me ajudaram nos momentos mais difíceis.
- Aos amigos que já saíram do PEQ, Dom Jota, Fabiano, Marcelo, Fabrício, Natália, Bianca, Silvia e Amaro pelos inesquecíveis momentos vividos aqui.
- Ao CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau em Doutor em Ciências (D.Sc.).

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO DINÂMICO NA PRODUÇÃO
CONTÍNUA DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis*

Anna Carolina Rapôso Camêlo

Março/2009

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Maurício Bezerra de Souza Júnior

Programa: Engenharia Química

Esta tese tem como objetivo a investigação experimental e por modelagem dos comportamentos dinâmicos em fermentações contínuas na produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, a partir de glicose, avaliando as principais variáveis de estado do sistema com o tempo e o perfil de proteínas. Oscilações foram obtidas experimentalmente nas condições nas quais a taxa de diluição (D) era $0,06 \text{ h}^{-1}$ e a concentração de glicose na alimentação (S_F) e no meio reacional (S_0), 200 g.L^{-1} . Observou-se que a adição de etanol inibiu o crescimento celular. A influência do etanol no comportamento dinâmico do sistema foi avaliada e observou-se que esta variável inibiu o crescimento celular, sendo um fator de grande importância juntamente com a glicose nos processos com comportamentos oscilatórios. Fez-se um estudo de comparação por gel SDS-PAGE das enzimas participantes da rota bioquímica de Entner-Doudoroff, procurando-se uma relação entre estas e os comportamentos dinâmicos observados. Com as eletroforeses foi possível a visualização de diferentes intensidades das bandas de proteínas nas diversas condições experimentais utilizadas. Um modelo matemático fenomenológico (LI *et al.*, 1997) foi implementado e modelos de inferência de substrato baseados em séries temporais lineares foram desenvolvidos. Com o modelo fenomenológico não foi possível um único conjunto de parâmetros para os comportamentos dinâmicos obtidos experimentalmente. Os modelos lineares mostraram-se adequados para monitoramento em linha do processo dinâmico, por serem capazes de prever a concentração de substrato um tempo de amostragem adiante a partir de dados passados e por apresentarem poucos parâmetros.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

INVESTIGATION OF THE DYNAMIC BEHAVIOR IN THE
CONTINUOUS PRODUCTION OF ETHANOL BY *Zymomonas mobilis*

Anna Carolina Rapôso Camêlo

March/2009

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Maurício Bezerra de Souza Júnior

Department: Chemical Engineering

This thesis aimed to investigate, through the use of models and experiments, the dynamic behavior of the continuous fermentations in the production of ethanol for *Zymomonas mobilis*, from glucose, evaluating the temporal profile of the main state variables of the system and the protein profile. Oscillations were experimentally obtained in conditions where the dilution rate (D) was $0,06 \text{ h}^{-1}$ and the glucose concentration in the feed (S_F) and in the reaction medium (S_0) was 200 g.L^{-1} . It was observed that the addition of ethanol inhibited cells growing. Thus, glucose concentration and ethanol addition were the most important factors determining the oscillatory behavior of the studied system. Using electrophoresis SDS-PAGE, the expression of the enzymes that take part of the biochemical route of Entner-Doudoroff was investigated aiming at stabilising a relationship between that expression and the observed dynamic behaviors. Different intensities of proteins band were found in all experimental conditions, showing some degree of correlation. A phenomenological mathematic model (LI et al, 1997) was implemented and substrate inference models based on linear time series were also developed. The phenomenological model was not able to provide a unique set of parameters for the dynamic behaviors observed experimentally. The linear models were used for on-line process monitoring, being able to predict the substrate concentration one sampling time ahead, based on past data and using only a small number of parameters.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xviii
LISTA DE NOMENCLATURA E SÍMBOLOS	xix
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos e Estrutura	3
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	5
2.1.1 A rota de Entner-Doudoroff.....	7
2.2 Modelagem de Fermentações	10
2.2.1 Modelos Cinéticos	11
2.2.1.1 Modelo de Limitação por Substrato	12
2.2.1.2 Modelo de Inibição por Produto	13
2.2.1.3. Modelo de Inibição por Substrato	14
2.2.1.4. Modelo de Inibição por Substrato e Produto.....	16
2.2.2 Modelagem Matemática de Processos Fermentativos com <i>Zymomonas mobilis</i>	17
2.3 Representações Matemáticas Lineares e Não Lineares de Tempo Discreto.	24
2.3.1 Definições e Conceitos Fundamentais	25
2.3.2 Representações Matemáticas Lineares	26
2.4 Dinâmica de Fermentações.....	27
2.4.1 Estados Estacionários	27
2.4.2 Comportamento Oscilatório.....	28
2.4.3 Uso da Teoria da Bifurcação	29
2.4.3.1 Estabilidade (LOPES, 2002)	30
2.4.3.2 Estabilidade Linear e Não-Linear	32
2.4.3.3 Tipos de bifurcação	35
2.5 Eletroforese.....	38
2.5.1 Fundamentos	38
2.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	39
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Microrganismo	41

3.2. Manutenção	41
3.3. Meio de Crescimento.....	41
3.4. Preparação do Inóculo	42
3.5. Equipamentos	42
3.6. Concentração de Células	43
3.7. Concentrações de Glicose e Etanol	45
3.8. Vazão Volumétrica	46
3.9. Controle de Contaminação	46
3.10 Eletroforese.....	47
3.10.1. Determinação da Concentração de Proteínas.....	47
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1 Diagramas de Bifurcação.....	49
4.2 Resultados Experimentais	56
4.2.1 Fermentações Descontínuas.....	56
4.2.2 Fermentações Contínuas	59
4.2.2.1 Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento de 100 g.L ⁻¹ de glicose e S _F variável	59
4.2.2.2 Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento de 150 g.L ⁻¹ de glicose e S _F variável	62
4.2.2.3. Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento (S ₀) de 200 g.L ⁻¹ de glicose e S _F variável.	66
4.2.2.4 Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento de 100 g.L ⁻¹ (S ₀) de glicose, S _F variáveis para estudo da influência do etanol.	76
4.3 Estudo das enzimas participantes da rota bioquímica de Entner -Doudoroff.....	85
4.4 Resultados Experimentais <i>online</i>	91
CAPÍTULO 5 - MODELAGEM MATEMÁTICA	94
5.1 Modelo Fenomenológico	94
5.2 Modelo de Séries Temporais Lineares	104
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	114
6.1 – Conclusões.....	114
6.2 – Sugestões para Trabalhos Posteriores.....	117
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

APÊNDICES	129
APÊNDICE A – I - Curva Padrão de Determinação de Peso Seco para a <i>Zymomonas Mobilis</i> Ag11	129
APÊNDICE A – II - Curva de Calibração da Concentração de Glicose.....	131
APÊNDICE A – IV - Protocolo de eletroforese (Gel de Poliacrilamida)	134
APÊNDICE A – V - Curva de calibração de Bradford	139
APÊNDICE A – VI - Determinação dos Coeficientes $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e Produtividade Volumétrica	140
APÊNDICE B – I - Dados Experimentais da Fermentação FD01 (Off-line).....	142
APÊNDICE B – II - Dados Experimentais da Fermentação FD02 (Off-line)	143
APÊNDICE B – III - Dados Experimentais da Fermentação FC01 (Off-line)	144
APÊNDICE B – IV - Dados Experimentais da Fermentação FC02 (Off-line).....	145
APÊNDICE B – V - Dados Experimentais da Fermentação FC03 (Off-line)	146
APÊNDICE B – VI - Dados Experimentais da Fermentação FC04 (Off-line).....	147
APÊNDICE B – VII - Dados Experimentais da Fermentação FC05 (Off-line).....	148
APÊNDICE B – VIII - Dados Experimentais da Fermentação FC06/FC08 (Off-line)	149
APÊNDICE B – IX - Dados Experimentais da Fermentação FC07 (Off-line).....	150
APÊNDICE B – X - Dados Experimentais da Fermentação FC09 (Off-line)	151
APÊNDICE B – XI - Dados Experimentais da Fermentação FC10 (Off-line).....	152
APÊNDICE B – XII - Dados Experimentais da Fermentação FC11 (Off-line).....	153
APÊNDICE C – I - Dados Experimentais da Fermentação FC01 (Online).....	154
APÊNDICE C – II - Dados Experimentais da Fermentação FC03 (Online).....	155
APÊNDICE C – III - Dados Experimentais da Fermentação FC04 (Online)	156
APÊNDICE C – IV - Dados Experimentais da Fermentação FC06/FC08 (Online)....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Microscopia da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11 (PALHA <i>et al.</i> , 2002).	5
FIGURA 2.2	Rota metabólica empregada pela <i>Zymomonas mobilis</i> no metabolismo da glicose (WILBERG, 1996).	8
FIGURA 2.3	Comportamento dinâmico de um sistema bidimensional em diferentes combinações de valores característicos. (FERRARA e PRADO, 1995)	34
FIGURA 2.4	Diagrama de bifurcação tipo sela-nó ou dobra (fold). (FERRARA e PRADO, 1995)	36
FIGURA 2.5	Bifurcação Transcrítica	37
FIGURA 2.6	Bifurcação de Forquilha. (a) supercrítica; (b) subcrítica.	37
FIGURA 2.7	Bifurcação de Hopf.	38
FIGURA 3.1	Esquema adotado no preparo do inóculo.	42
FIGURA 3.2	Fotografia do Sistema de Fermentação Constituído por: Fermentador B. Braun Biotech International, modelo BIOSTAT®B; T – 30°C, pH – 5,0, agitação – 150 rpm. (A) Frasco de alimentação; (B) Medidor de vazão; (C) Bombas peristálticas para alimentação de meio e retirada de meio fermentado; (D) Reator; e (E) Controlador do fermentador.	43
FIGURA 3.3	Esquema de cubeta de fluxo usada neste trabalho. (a) Tubo interno: destinado a adição de água para diluição aparente. (b) Tubo externo: passagem contínua do meio fermentativo.	44
FIGURA 3.4	Cromatograma de uma amostra de etanol obtido por cromatografia gasosa.	45
FIGURA 3.5	Sistema para medição da vazão volumétrica: a. processo de enchimento das mangueiras das linhas 1 e 2 e da pipeta; b. medição da vazão, com a mangueira da linha 1 fechada.	46
FIGURA 4.1	Diagrama de bifurcação (Condição Estado Estacionário) – X (g.L ⁻¹)	51
FIGURA 4.2	Diagrama de bifurcação (Condição Estado Estacionário) – S (g.L ⁻¹)	51
FIGURA 4.3	Diagrama de bifurcação (Condição Estado Estacionário) – P (g.L ⁻¹)	52
FIGURA 4.4	Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Amortecida) – X (g.L ⁻¹)	52
FIGURA 4.5	Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Amortecida) – S (g.L ⁻¹)	53
FIGURA 4.6	Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Amortecida) – P (g.L ⁻¹)	53

FIGURA 4.7	Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Sustentada) – X (g.L ⁻¹)	54
FIGURA 4.8	Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Sustentada) – S (g.L ⁻¹)	55
FIGURA 4.9	Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Sustentada) – P (g.L ⁻¹)	55
FIGURA 4.10	Fermentação Descontínua (FD01) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T - 30 °C, Agitação – 150 rpm, S ₀ = 200 g.L ⁻¹ , pH – 5,0.	56
FIGURA 4.11	Determinação da taxa específica de crescimento celular (Fermentação FD01).	57
FIGURA 4.12	Fermentação Descontínua (FD02) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T - 30 °C, Agitação – 150 rpm, S ₀ = 200 g.L ⁻¹ , pH – 5,0.	58
FIGURA 4.13	Fermentação Contínua (FC01) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 100 g.L ⁻¹ , S _F – 100 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , \bar{X}_{EE} = 0,68 g.L ⁻¹ , \bar{S}_{EE} = 1,58 g.L ⁻¹ , \bar{P}_{EE} = 34,45.	60
FIGURA 4.14	Fermentação Contínua (FC02) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 100 g.L ⁻¹ , S _F – 200 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , \bar{X}_{EE} = 0,88 g.L ⁻¹ , \bar{S}_{EE} = 1,50 g.L ⁻¹ , \bar{P}_{EE} = 44,10.	61
FIGURA 4.15	Fermentação Contínua (FC03) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 150 g.L ⁻¹ , S _F – 150 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , \bar{X}_{EE} = 0,87 g.L ⁻¹ , \bar{S}_{EE} = 1,44 g.L ⁻¹ , \bar{P}_{EE} = 51,46.	63
FIGURA 4.16	Fermentação Contínua (FC04) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 150 g.L ⁻¹ , S _F – 200 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , \bar{X}_{EE} = 1,64 g.L ⁻¹ , \bar{S}_{EE} = 9,28 g.L ⁻¹ , \bar{P}_{EE} = 58,07.	64
FIGURA 4.17	Fermentação Contínua (FC05) – (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 200 g.L ⁻¹ , S _F – 200 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ .	67
FIGURA 4.18	Demonstração do comportamento da concentração de células e glicose versus etanol.	67
FIGURA 4.19	Fermentação Contínua (FC06) - (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 200 g.L ⁻¹ , S _F – 200 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ .	68
FIGURA 4.20	Fermentação Contínua (FC07): (⊕) Células (X), (⊖) Glicose (S), (⊖) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 200 g.L ⁻¹ , S _{F1} – 200 g.L ⁻¹ , S _{F2} – 300 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ .	69

FIGURA 4.21	Confronto dos dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 com o diagrama de bifurcação na condição de estado estacionário – (a) Células (X), (b) Glicose (S) e (c) Etanol (P).	70
FIGURA 4.22	Confronto dos dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 com o diagrama de bifurcação na condição de oscilação amortecida – (a) Células (X), (b) Glicose (S) e (c) Etanol (P).	71
FIGURA 4.23	Confronto dos dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 com o diagrama de bifurcação na condição de oscilação sustentada – (a) Células (X), (b) Glicose (S) e (c) Etanol (P).	73
FIGURA 4.24	Rendimentos (\ominus) $Y_{X/S}$ e (\ast) $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC05 em função do tempo na etapa contínua do processo.	74
FIGURA 4.25	Rendimentos (\ominus) $Y_{X/S}$ e (\ast) $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC06 em função do tempo na etapa contínua do processo	75
FIGURA 4.26	Rendimentos (\ominus) $Y_{X/S}$ e (\ast) $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC07 em função do tempo na etapa contínua do processo	75
FIGURA 4.27	Fermentação Contínua (FC08): (\ominus) Células (X), (\boxminus) Glicose (S), (\triangleleft) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 200 g.L ⁻¹ , S_{F1} – 200 g.L ⁻¹ , S_{F2} – 300 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ .	78
FIGURA 4.28	Fermentação Contínua (FC09): (\ominus) Células (X), (\boxminus) Glicose (S), (\triangleleft) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 200 g.L ⁻¹ , S_{F1} – 200 g.L ⁻¹ , S_{F2} – 300 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , EtOH – Etanol Adicionado.	78
FIGURA 4.29	Fermentação Contínua (FC10): (\ominus) Células (X), (\boxminus) Glicose (S), (\triangleleft) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 200 g.L ⁻¹ , S_{F1} – 200 g.L ⁻¹ , S_{F2} – 300 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , EtOH- Etanol Adicionado.	80
FIGURA 4.30	Fermentação Contínua (FC11): (\ominus) Células (X), (\boxminus) Glicose (S), (\triangleleft) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 200 g.L ⁻¹ , S_{F1} – 200 g.L ⁻¹ , S_{F2} – 300 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ . EtOH – Etanol Adicionado.	80
FIGURA 4.31	Possíveis locais de alvo para a inibição do etanol (D'AMORE e STEWART, 1987).	84
FIGURA 4.32	Eletroforese das amostras da fermentação FC01 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 6 h, Coluna 3: Amostra 2 -12 h, Coluna 4: Amostra 3 – 27 h, Coluna 5: Amostra 4 - 39 h, Coluna 6: Amostra 5 – 57 h, Coluna 7: Amostra 6 – 78 h.	85

FIGURA 4.33	Eletrforese das amostras da fermentação FC02 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 6 h, Coluna 3: Amostra 2 - 12 h, Coluna 4: Amostra 3 – 25 h, Coluna 5: Amostra 4 - 57 h, Coluna 6: Amostra 5 – 99 h.	86
FIGURA 4.34	Eletrforese das amostras da fermentação FC03 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 12 h, Coluna 3: Amostra 2 - 19 h, Coluna 4: Amostra 3 – 42 h, Coluna 5: Amostra 4 - 56.	86
FIGURA 4.35	Eletrforese das amostras da fermentação FC04 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 15 h, Coluna 3: Amostra 2 - 38 h, Coluna 4: Amostra 3 – 59 h, Coluna 5: Amostra 4 – 79 h, Coluna 6: Amostra 5 – 92 h.	87
FIGURA 4.36	Eletrforese das amostras da fermentação FC05 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 24 h, Coluna 3: Amostra 2 - 51 h, Coluna 4: Amostra 3 – 70 h, Coluna 5: Amostra 4 - 76 h, Coluna 6: Amostra 5 – 84 h, Coluna 7: Amostra 6 – 96 h.	87
FIGURA 4.37	Eletrforese das amostras da fermentação FC06/FC08 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 28 h, Coluna 3: Amostra 2 - 52 h, Coluna 4: Amostra 3 – 76 h, Coluna 5: Amostra 4 - 94 h.	88
FIGURA 4.38	Eletrforese das amostras da fermentação FC07 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 22 h, Coluna 3: Amostra 2 - 52 h, Coluna 4: Amostra 3 – 79 h, Coluna 5: Amostra 4 - 102 h, Coluna 6: Amostra 5 – 121 h, Coluna 7: Amostra 6 – 142 h.	88
FIGURA 4.39	Eletrforese das amostras da fermentação FC09 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 11 h, Coluna 3: Amostra 2 - 17 h, Coluna 4: Amostra 3 – 34 h, Coluna 5: Amostra 4 - 44 h.	89
FIGURA 4.40	Eletrforese das amostras das fermentações FC10 e FC11 da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> . Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 31 h, Coluna 3: Amostra 2 - 51 h, Coluna 4: Amostra 3 – 73 h, Coluna 5: Amostra 4 - 102 h, Coluna 6: Amostra 5 – 31 h, Coluna 7: Amostra 2 - 51 h, Coluna 4: Amostra 8 – 73 h, Coluna 9: Amostra 4 - 102 h.	89
FIGURA 4.41	Fermentação Contínua (FC01) – Dados <i>online</i> : (☉) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S _o – 100 g.L ⁻¹ , S _F – 100 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , $\bar{X}_{EE} = 0,668$ g.L ⁻¹ , $\mu = 0,301$ h ⁻¹ .	91
FIGURA 4.42	Fermentação Contínua (FC03) – Dados <i>online</i> : (☉) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S _o – 150 g.L ⁻¹ , S _F – 150 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , $\bar{X}_{EE} = 0,859$ g.L ⁻¹ , $\mu = 0,262$ h ⁻¹ .	92
FIGURA 4.43	Fermentação Contínua (FC04) – Dados <i>online</i> : (☉) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S _o – 150 g.L ⁻¹ , S _F – 200 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , $\bar{X}_{EE} = 1,651$ g.L ⁻¹ , $\mu = 0,220$ h ⁻¹ .	92

FIGURA 4.44	Fermentação Contínua (FC06/FC08) – Dados <i>online</i> : (•) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S ₀ – 200 g.L ⁻¹ , S _F – 200 g.L ⁻¹ , D = 0,06 h ⁻¹ , μ=0.076 h ⁻¹ .	93
FIGURA 5.1	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC05 (Etapa Inicial) e o Modelo Fenomenológico.	99
FIGURA 5.2	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC06 (Etapa Inicial) e o Modelo Fenomenológico.	99
FIGURA 5.3	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC05 (Etapa Final) e o Modelo Fenomenológico.	100
FIGURA 5.4	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC06 (Etapa Final) e o Modelo Fenomenológico.	100
FIGURA 5.5	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC01 e o Modelo Fenomenológico.	101
FIGURA 5.6	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC02 e o Modelo Fenomenológico.	102
FIGURA 5.7	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC03 e o Modelo Fenomenológico.	102
FIGURA 5.8	Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC04 e o Modelo Fenomenológico.	103
FIGURA 5.9	Obtenção do Modelo MLST 441 confrontado com os dados experimentais da fermentação em batelada (FD02).	105
FIGURA 5.10	Configuração adotada para o modelo sem realimentação (a) e com realimentação (b).	106
FIGURA 5.11	MLST 141, MLST 141 Realimentado, MLST 141 Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FD02.	107
FIGURA 5.12	Configuração adotada para o sistema, com atualização de 3h modelo MLST corrigido.	108
FIGURA 5.13	MLST 141 versus Dados Experimentais da Fermentação FC02.	108
FIGURA 5.14	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC01.	109
FIGURA 5.15	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC02.	110

FIGURA 5.16	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC03.	110
FIGURA 5.17	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC04.	111
FIGURA 5.18	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC05.	111
FIGURA 5.19	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC06.	112
FIGURA 5.20	MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC07.	112
FIGURA AA-I	Curva de calibração em espectrofotômetro descontínuo, para a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11.	130
FIGURA AA-II	Curva de calibração em espectrofotômetro contínuo, para a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11.	130
FIGURA AA-III	Curva de calibração de glicose com Kit enzimático.	132
FIGURA AA-IV	Curva de calibração de etanol.	133
FIGURA AA-V	Curva de calibração de Bradford.	139
FIGURA AA-VI	Representação do Biorreator	140

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1	Composição do meio de crescimento de LI (1995)	41
TABELA 4.1	Parâmetros utilizados no modelo dinâmico em fermentações contínuas com <i>Zymomonas mobilisi</i> (LI <i>et al.</i> , 1997)	50
TABELA 4.2	Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FD01 e FD02.	9
TABELA 4.3	Condições operacionais da Fermentação Contínua 01 (FC01) e 02 (FC02)	60
TABELA 4.4	Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC01 e FC02.	62
TABELA 4.5	Condições operacionais para Fermentação Contínua 03 (FC03) e 04 (FC04)	63
TABELA 4.6	Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC03 e FC04	65
TABELA 4.7	Condições operacionais para Fermentação Contínua 05 (FC05), 06 (FC06) e 07 (FC07)	66
TABELA 4.8	Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC05, FC06 e FC07.	74
TABELA 4.9	Condições operacionais para Fermentação Contínua 08 (FC08) e 09 (FC09).	76
TABELA 4.10	Condições operacionais para Fermentação Contínua 10 (FC10) e 11 (FC11)	77
TABELA 4.11	Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC08, FC09, FC10 e FC11.	81
TABELA 4.12	Resumo das informações referentes às fermentações descontínuas e contínuas.	82
TABELA 4.13	Amostras das fermentações FC01 – FC11 utilizados para eletroforese.	85
TABELA 4.14	Massas moleculares das enzimas da rota bioquímica de Entner-Doudoroff da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> (AN <i>et al.</i> , 1991)	90
TABELA 5.1	Valores dos parâmetros utilizados no modelo para as fermentações FC05 e FC06 com <i>Zymomonas mobilis</i> .	98
TABELA 5.2	Valores dos parâmetros utilizados no modelo para as fermentações FC01, FC02, FC03 e FC04 com <i>Zymomonas mobilis</i> .	101
TABELA A-I	Quantidade de reativo utilizada	131
TABELA A-II	Dados experimentais para curva de calibração de etanol	133
TABELA A-III	Reagentes e Soluções utilizados no gel de corrida em diversas porcentagens	137
TABELA A-IV	Reagentes e Soluções utilizados no gel de nivelamento	138

LISTA DE NOMENCLATURA E SÍMBOLOS

FD01	Fermentação Descontínua 01
FD02	Fermentação Descontínua 02
FC01	Fermentação Contínua 01
FC02	Fermentação Contínua 02
FC03	Fermentação Contínua 03
FC04	Fermentação Contínua 04
FC05	Fermentação Contínua 05
FC06	Fermentação Contínua 06
FC07	Fermentação Contínua 07
FC08	Fermentação Contínua 08
FC09	Fermentação Contínua 09
FC10	Fermentação Contínua 10
FC11	Fermentação Contínua 11
FCs	Fermentações Contínuas
FDs	Fermentações Descontínuas
X_F ,	Concentração de Células no final da batelada
S_{Final}	Concentração de Glicose no final da batelada
P_F	Concentração de Etanol no final da batelada
t_F	Tempo para o término da batelada
X	Concentração de células ($g.L^{-1}$)
S	Concentração de glicose ($g.L^{-1}$)
S_F	Concentração de glicose na alimentação ($g.L^{-1}$)
S_o	Concentração de glicose abaixo da qual não ocorre inibição
P	Concentração de etanol ($g.L^{-1}$)
P_{ma}	Parâmetro da equação 3.8 relacionado à inibição do crescimento por etanol ($g.L^{-1}$)
P_{mb}	Parâmetro relacionado com a concentração S acima da qual não há crescimento de células ($g.L^{-1}$)
P_{me}	Parâmetro relacionado com a concentração acima da qual não há crescimento de células nem de etanol ($g.L^{-1}$)
P_{ob}	Parâmetro relacionado com a concentração mínima para inibição do crescimento por etanol ($g.L^{-1}$)
Z	Média ponderada de 2ª ordem da velocidade de variação da concentração de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
W	Média ponderada de 1ª ordem da velocidade de variação da concentração de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
t	Tempo (h)

D	Taxa de diluição (h^{-1})
$Y_{P/S}$	Coefficiente de rendimento de glicose em etanol (g.g^{-1})
$Y_{X/S}$	Coefficiente de rendimento de glicose em células (g.g^{-1})
Q_P	Taxa específica de produção de etanol ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
$Q_{P,\text{max}}$	Taxa específica de produção de etanol máxima ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Q^*_{VP}	Produtividade volumétrica ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
K_i	Parâmetro relacionado à inibição por substrato (g.L^{-1})
K_s	Parâmetro relacionado a saturação por substrato (g.L^{-1})
K_{mp}	Parâmetro de saturação de substrato para taxa de produção de etanol (g.L^{-1})
μ_{max}	Taxa específica de crescimento máxima (h^{-1})
$\mu(S, P, Z)$	Taxa específica de crescimento dinâmico (h^{-1})
$\mu(S, P)$	Taxa específica de crescimento instantâneo (h^{-1})
β	Parâmetro da equação que pondera o peso da história da velocidade (h^{-1})
α	Parâmetro da equação que pondera o peso da história da velocidade (h^{-1});
a e b	Parâmetros relacionados com a inibição de etanol no crescimento
f_μ	Função introduzida como aproximação para define o efeito de Z no crescimento das células
$\frac{S}{k_s + S}$	Proveniente do modelo de Monod, representa a limitação pelo substrato
$\left(1 - \left[\frac{P}{P_m}\right]^a\right)$	Relação parabólica do efeito de inibição pelo produto
P_{ma}	Parâmetro experimental que está relacionado ao efeito de inibição
$\left(\frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}}\right)$	Relação que define o efeito limitante de concentração de etanol, ou seja, se for menor do que P_{ob} , então esta relação é nula. Caso $P > P_{mb}$, então ela terá um valor unitário.
P_{ob}	Concentração acima da qual não há crescimento
P_{mb}	Concentração mínima para inibição do crescimento por etanol

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Introdução

Devido às constantes variações do preço do petróleo, que é bastante sensível por fatores sócio-econômicos, o mundo tem buscado novas alternativas energéticas. O álcool desponta como a principal promessa. O etanol combustível é produzido principalmente a partir de fontes renováveis, por meio da conversão de açúcares presentes nas culturas, por exemplo, de cana-de-açúcar, beterraba, uvas etc., ou de carboidratos provenientes do milho, trigo, batata, mandioca etc.

O etanol oriundo da cana-de-açúcar, como também produzido por processo fermentativo, oferece vantagens como não ser poluente, o que contribui consideravelmente para a preservação do meio ambiente e por reduzir o teor de gás carbônico na atmosfera, quando em combustão, diminuindo assim o efeito estufa.

Embora o processo de fermentação alcoólica seja conhecido há milhares de anos, o aumento da eficiência deste processo permanece como o objetivo mais importante. Um dos assuntos envolvidos em fermentação alcoólica é a inibição que causa o término, algumas vezes prematuro, da fermentação (MARTINI *et al.*, 2004). Como resultado, a concentração de etanol obtida encontra-se em níveis baixos, a produtividade de instalações de fermentações alcoólicas industriais é significativamente reduzida e o custo para recuperação do produto permanece alto. Alguns investigadores buscaram definir o mecanismo de inibição gerado pelo produto final e desenvolver

tecnologia para aliviar esta inibição (BURRILL *et al.*, 1983, OSMAN e INGRAM, 1985, DASARI *et al.*, 1990, JARSEBSKI, 1992, MARTINI *et al.*, 2004).

A bactéria *Zymomonas mobilis* vem sendo muito estudada nos últimos 30 anos uma vez que: apresenta um alto potencial para o desenvolvimento de processos alternativos que aumentem a rentabilidade da produção microbiológica de etanol; possui um alto rendimento na produção de etanol; produz poucos produtos secundários e apresenta alta tolerância a elevadas concentrações de glicose e etanol. Apesar destas vantagens, a bactéria *Zymomonas mobilis* é vista ainda como imprópria para a produção industrial de etanol, primeiramente porque o crescimento desta espécie se dá em apenas três açúcares: D-glicose, D-frutose e sacarose, sendo esta propriedade para linhagens naturalmente ocorrentes, uma vez que há vários trabalhos que reportam a fermentação de xilose e arabinose com linhagens recombinantes desta bactéria. Seu crescimento em sacarose é acompanhado da formação extracelular de levana e sorbitol, com uma diminuição significativa no rendimento da produção de etanol (SPRENGER, 1996). Em segundo lugar, embora a bactéria *Zymomonas mobilis* seja geralmente considerada segura, conforme LIN e TANAKA (2006), sua biomassa não é geralmente aceitável para ser usada como alimentação animal, o que gera inevitável problema para a sua eliminação. E, finalmente, a fermentação alcoólica contínua com *Zymomonas mobilis* tende a ser oscilatória, causando uma diminuição na produção de etanol (LI *et al.*, 1997, MCLELLAN *et al.*, 1995).

É importante a realização de modelagem e controle de comportamentos dinâmicos (oscilações, múltiplos estados estacionários), porém, o mecanismo que

governa as oscilações em fermentação contínua com *Zymomonas mobilis* é pouco compreendido (LI, 1995).

1.2 Objetivos e Estrutura

Esta tese tem como objetivo a avaliação dos comportamentos dinâmicos (oscilação, múltiplos estados estacionários) das principais variáveis de estado (concentrações de células (X), glicose (S) e etanol (P)) e o perfil de proteínas, na produção contínua de etanol por *Zymomonas mobilis*, a partir de glicose. Diante do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- ✓ Estabelecimento de metodologia baseada em modelo fenomenológico e diagrama de bifurcação para determinação da condição operacional;
- ✓ Realização de experimentos nas condições estabelecidas pelos diagramas de bifurcação;
- ✓ Implementação da aquisição de dados em linha e desenvolvimento de modelos de inferência para permitir monitoramento do processo.
- ✓ Investigação do perfil protéico da bactéria *Zymomonas mobilis*, nas diferentes condições dinâmicas.;

Esta tese está dividida em sete capítulos e apêndices, contando com esta introdução. No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a bactéria *Zymomonas mobilis*; modelagem de fermentações; dinâmica de fermentações e eletroforese. O Capítulo 3 descreve os materiais utilizados na realização das fermentações contínuas e descontínuas, como também os métodos analíticos. O

Capítulo 4 relata os resultados experimentais e discussões das fermentações e eletroforeses. No Capítulo 5 é apresentado o estudo de modelagem matemática. No Capítulo 6 faz-se as conclusões e sugestões para futuros trabalhos, o Capítulo 7 consiste na lista das referências bibliográficas e finalmente os Apêndices.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química – COPPE/UFRJ e no Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos – Escola de Química (LSCP-EQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 A bactéria *Zymomonas mobilis*

A bactéria do gênero *Zymomonas*, da espécie *Zymomonas mobilis*, possui duas subespécies, *mobilis* e *pomacea*. São bactérias Gram-negativas cujas células apresentam-se em forma de bastonetes com terminações arredondas, ocasionalmente elipsoidais, formando pares ou não, com comprimento de 2 a 6 μm e diâmetro de 1 a 1,4 μm , conforme SWINGS e DE LEY (1977). Na Figura 2.1, é possível visualizar uma microscopia da bactéria *zymomonas mobilis* Ag11.



FIGURA 2.1: Microscopia da bactéria *Zymomonas mobilis* Ag11. (PALHA *et al.*, 2002).

A bactéria *Zymomonas mobilis* não forma esporos e em sua grande maioria não possui mobilidade, porém cerca de 30% são móveis com 1 a 4 flagelos polares, e algumas linhagens não mais possuem tal característica (FALCÃO DE MORAIS, 1982).

Conforme o trabalho de BELAICH e SENEZ (1965), as bactérias *Zymomonas mobilis* crescem em glicose ou frutose, podendo fermentar 1 mol de glicose a quase 1,6 moles de etanol, 1,8 moles de CO_2 e pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, ácido acético e outros.

As bactérias *Zymomonas mobilis* são quimioorganotróficas e necessitam de fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes para o funcionamento do metabolismo. Um dos importantes componentes para o “pool” enzimático e protéico das células, o nitrogênio, pode ser adicionado na forma de aminoácidos, peptona, sais de amônia, peptídeos. Segundo FRANÇA e RODRIGUES (1985), os sais de amônio e aminoácidos conduzem a um melhor crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis*, uma vez que não causam acúmulo de nitritos e nitratos. No trabalho de GALANI *et al.* (1985) é visto que sais como NH_4Cl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são as melhores fontes de nitrogênio para a *Zymomonas mobilis*.

O fósforo tem papel importante nas vias metabólicas que são iniciadas com uma fosforilação do substrato sendo elemento constituinte das moléculas de ATP que estão presentes no mecanismo energético das células. Os sais KH_2PO_4 e K_2HPO_4 são possíveis fontes de fósforo utilizadas pelas bactérias *Zymomonas mobilis* em seu metabolismo (JONES e GREENFIELD, 1985).

O enxofre, substância presente em todas as proteínas, consiste num constituinte estrutural da célula, podendo ser suprido por metionina, cisteína e sulfatos (FRANÇA e RODRIGUES, 1985), para a bactéria *Zymomonas mobilis*. O MgSO_4 é a melhor fonte de enxofre, por servir também, como fonte de magnésio, uma vez que o magnésio é um dos responsáveis pela estabilidade estrutural de diversas enzimas (GALANI *et al.*, 1985).

Estruturalmente, as enzimas possuem todas as características das proteínas, tendo seus centros ativos (região da sua estrutura responsáveis pela catálise). A manutenção da estrutura de uma enzima é de particular importância para a sua atividade:

esta pode ser perdida se a enzima é colocada em um meio em que fatores como o pH ou a temperatura não favoreçam a estabilidade estrutural da cadeia polipeptídica. Algumas enzimas necessitam da presença de outras espécies químicas, genericamente denominadas cofatores, para efectuar a catálise. A natureza química dos cofatores é muito diversa: podem ser íons metálicos, como o Mg^{2+} , o Zn^{+} ou o Fe^{2+} , moléculas orgânicas, como o NAD^{+} , $NADP^{+}$, FAD^{+} , fosfato de piridoxal ou a coenzima A, e ainda moléculas orgânicas contendo metais, como o grupo hemo (uma porfirina contendo ferro) ou a vitamina B_{12} (5'-desoxiadenosilcobalamina) (VOET e VOET, 1995).

Açúcares como glicose, sacarose e frutose são utilizados no meio para o crescimento da bactéria, porém é com a utilização da glicose que se tem maiores conversões de etanol.

No trabalho de SPRENGER (1996), é observado que a hidrólise da sacarose é extracelular e os açúcares resultantes, glicose e frutose são transportadas para o interior da célula via transporte de difusão facilitada. A hidrólise ocorre pela ação das enzimas levanasacarase e invertase, e o produto formado depende do acceptor de elétrons utilizado. No caso do acceptor ser a água, ocorre a hidrólise da sacarose, mas se o acceptor for a frutose, a levana é formada (DOELLE, 1982).

2.1.1 A rota de Entner-Doudoroff

Conforme EVELEIGH *et al.* (1983), acredita-se que a bactéria *Zymomonas mobilis* teve uma origem evolucionária recente, e ainda não teve tempo de desenvolver uma diversidade genética, ou então se trata de um gênero geneticamente muito estável. Esta afirmação foi fundamentada no estudo de 38 cepas realizado por SWING e DE LEY

(1977). Somente 3 cepas (aquelas produtoras da “doença da Sidra”) não se mostraram genética e fenotipicamente idênticas.

A bactéria *Zymomonas mobilis* é anaeróbia, porém, utiliza a rota de Entner–Doudoroff, que é usada por organismos estritamente aeróbios (Figura 2.2). Segundo SWING e DE LEY (1977), as linhagens da bactéria *Zymomonas mobilis* são geneticamente estáveis, fenotípicas e ecologicamente muito relacionadas às bactérias acético-acidofílicas, mais com as do gênero *Glucanobacter* do que com *Acetobacter*, por causa de seus flagelos polares, ciclo de Krebs incompleto entre outras características. As semelhanças se estendem à ocorrência natural (ambas as bactérias são observadas em nichos de sucos de plantas), crescimento em baixos valores de pH, tolerância a etanol e altas concentrações de glicose e baixo rendimento celular. *Zymomonas* e as bactérias acético-acidofílicas devem derivar de um ancestral aeróbio comum. As bactérias acidofílicas são diferenciadas das bactérias do gênero *Zymomonas* por seu crescimento estritamente aeróbio.

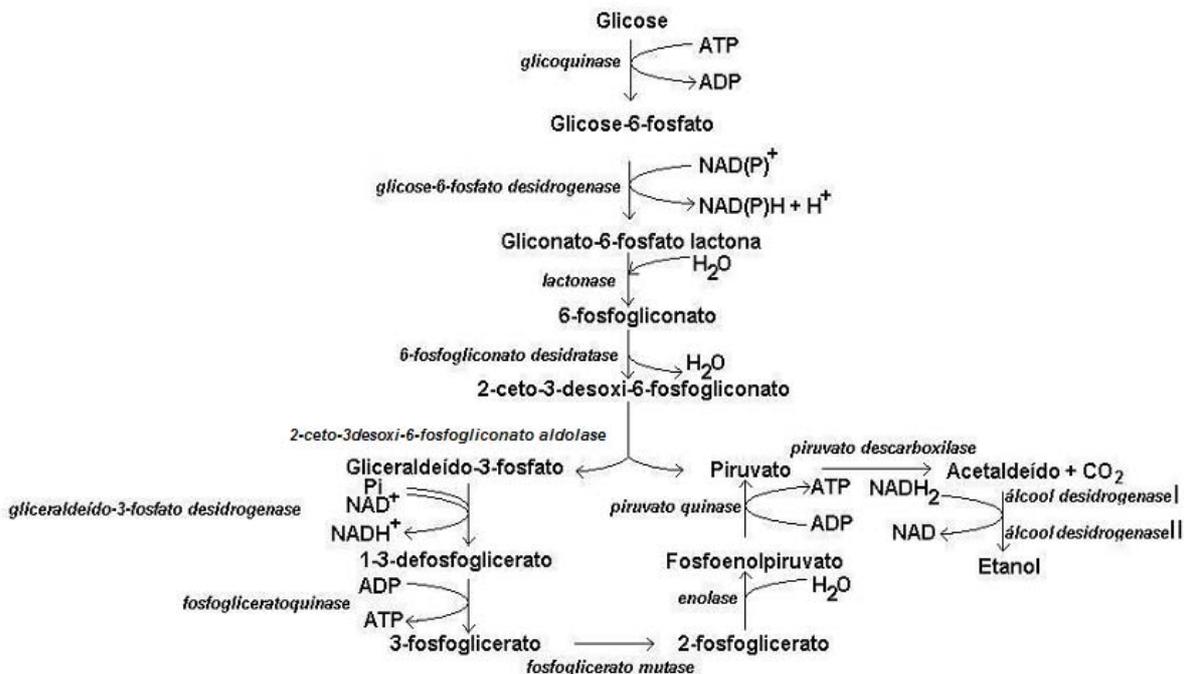


FIGURA 2.2: Rota metabólica empregada por *Zymomonas mobilis* no metabolismo da glicose (WILBERG, 1996).

Na rota metabólica da bactéria *Zymomonas mobilis*, a molécula de glicose é transportada para o interior da célula, sendo fosforilada com ATP (Glicose-6-fosfo-transferase) a glicose-6-fosfato através da ação da enzima *glicoquinase*.



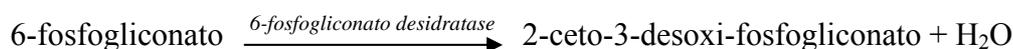
Na seqüência a glicose-6-fosfato é desidrogenada pela enzima *glicose-6-fosfato desidrogenase* formando o gliconato-6-fosfato lactona. Tal enzima age na presença da coenzima NAD (Nicotinamida-adenina dinucleotídeo), mas não é específica com respeito à NAD^+ , ou seja, tanto o NAD^+ quanto o NADP^+ são co-fatores para esta enzima.



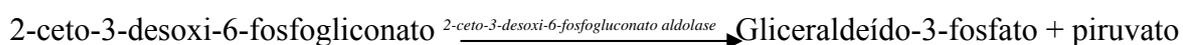
O gliconato-6-fosfato lactona sofre reação de hidratação, catalisada pela enzima *lactonase*, resultando na formação de 6-fosfogliconato:



O 6-fosfogliconato é desidratado pela ação da enzima *6-fosfogliconato desidratase* formando a molécula 2-ceto-3-desoxi-fosfogliconato.



O 2-ceto-3-desoxi-fosfogliconato é degradado em duas moléculas de 3 átomos de carbono cada: gliceraldeído-3-fosfato e piruvato. A enzima que catalisa esta reação é a *2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase*.



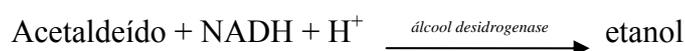
A molécula de gliceraldeído-3-fosfato pode ser utilizada na síntese de componentes celulares (anabolismo) ou pode sofrer as mesmas transformações da rota de

Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) na sua conversão para piruvato, sendo geradas neste processo duas moléculas de ATP e uma molécula de NADH₂. A enzima *piruvato descarboxilase* catalisa a descarboxilação de piruvato para acetaldeído e dióxido de carbono através da reação irreversível:



O *piruvato descarboxilase* requer Mg⁺⁺ e tiamina pirofosfato (TPP) como co-fatores. A reação é muito exotérmica e os produtos finais da fermentação alcoólica (etanol e CO₂) não podem ser reconvertidos a glicose.

A enzima *álcool desidrogenase* (*álcool:NAD⁺ oxidoreductase*) é específica ao co-fator NADH.



A redução de piruvato a etanol regenera NAD⁺ de tal forma que o potencial de óxido-redução está perfeitamente equilibrado.

A enzima *piruvato descarboxilase* é a enzima chave nesta rota, pois ela direciona o fluxo de piruvato para etanol. Embora a enzima *álcool desidrogenase* seja comum a muitos microorganismos, poucas bactérias têm *piruvato descarboxilase*.

2.2 Modelagem de Fermentações

A modelagem matemática é de uma forma geral uma ferramenta útil para o projeto, otimização e controle de processos químicos e bioquímicos e conforme LIMA (2008) consiste na construção e uso de modelos matemáticos do tipo: fenomenológico, que

se baseia na aplicação de princípios fundamentais; empírico, baseado em dados experimentais e híbrido, uma combinação das duas anteriores (LIMA, 2008).

A modelagem fenomenológica tem os princípios fundamentais - como conservação de massa, energia e quantidade de movimento - aplicados e as equações resultantes possuem termos com significados físicos e dimensões apropriadas. Desta forma se faz necessário o conhecimento sobre a cinética de reação, termodinâmica, propriedades físicas e de transporte. Este tipo de modelagem requer um maior esforço de análise para quem desenvolve o modelo.

No caso da modelagem empírica não se tem conhecimento suficiente do mecanismo envolvido no processo, sendo utilizadas correlações estatísticas entre os dados experimentais de entrada e saída do processo ou de outra forma de conhecimento qualitativo ou eminentemente heurístico (FEYO DE AZEVEDO *et al.*, 1997). Isso faz com que os termos das equações matemáticas possam não ter significado físico.

Há uma grande dificuldade na determinação de parâmetros que descrevem os processos biotecnológicos. Isso ocorre devido à complexa natureza do metabolismo microbiano e a não linearidade de sua cinética. Devido a essa dificuldade a modelagem híbrida se apresenta como uma forma alternativa de modelagem que combina conhecimentos prévios do processo, através de balanços materiais, com modelos empíricos que descrevem as cinéticas desconhecidas do processo.

2.2.1 Modelos Cinéticos

Algumas classificações são feitas para os modelos. A classe mais simples, *não-estruturada e não-segregada*, corresponde ao caso em que a célula é descrita por uma única

variável (freqüentemente a concentração total de células) e onde nenhuma segregação na população de células é considerada, isto é, a população de células é considerada completamente homogênea. O modelo da população celular pode ser *segregado*, onde segregação na população celular é considerada, através, por exemplo, de idade das células. Nos modelos *estruturados* a célula é descrita com mais de uma variável, isto é, diversos componentes na representação do crescimento celular são utilizados (BAILEY e OLLIS, 1986; RATLEADGE e KRISTIANSEN, 2001).

Várias são as formas de modelar a cinética de fermentações, conforme será mostrado a seguir.

2.2.1.1 Modelo de Limitação por Substrato

MONOD (1949) realizou um trabalho pioneiro sobre a teoria da fermentação contínua, propondo um modelo para representar a taxa específica de crescimento que leva em conta a concentração do substrato limitante e a taxa específica de crescimento máxima. Este modelo adapta-se bem a culturas descontínuas que operam em regime permanente, onde o efeito inibitório do substrato é raro. O modelo de Monod é dado pela equação:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{(k_s + S)} \quad 2.1$$

onde $\mu_{\text{máx}}$ é a taxa específica de crescimento máxima, quando $S \gg k_s$ e as concentrações de todos os outros nutrientes essenciais não são limitantes, k_s é a constante de saturação pelo substrato e S é a concentração do substrato limitante do crescimento. Conforme PINHEIRO (2001) o modelo de Monod é capaz de apresentar as características essenciais de crescimento em batelada de vários microrganismos, porém quando se trata de

fermentações contínuas o modelo de Monod mostra-se inadequado, quando inibições são observadas.

2.2.1.2 Modelo de Inibição por Produto

O efeito do etanol adicionado a uma cultura em crescimento foi analisado por AIBA e SHODA (1969) e, através deste estudo, equações matemáticas foram formuladas relacionando o efeito do produto e do substrato com as taxas específicas de crescimento e de formação do produto. No modelo de Aiba, tem-se que:

$$\mu = \left(\frac{\mu_0}{(1 + (P/k_p))} \right) \left(\frac{S}{(k_s + S)} \right) \quad 2.2$$

$$\gamma = \left(\frac{\gamma_0}{(1 + P/k_p')} \right) \left(\frac{S}{(k_s' + S)} \right) \quad 2.3$$

tal que μ consiste na taxa específica de crescimento celular, μ_0 na taxa específica de crescimento celular máxima, γ na taxa específica de produção de etanol, γ_0 na taxa específica de produção de etanol máxima, k_p , k_p' são as constantes de saturação pelo produto e k_s , k_s' são as constantes de saturação pelo substrato.

GHOSE e TYAGI (1979) e LOUNG (1985) observaram que repetidamente os gráficos de $1/\mu$ versus $1/S$ em diferentes concentrações de etanol apresentam retas com o mesmo valor para o ponto de convergência na abscissa, mostrando assim que o efeito de inibição por etanol afeta μ_{\max} mas não afeta K_s . Desta forma, algumas correlações entre μ_{\max} e a concentração de etanol produzido foram determinadas:

Relação Linear $\mu(S) = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \left(\frac{S}{K_s + S}\right)$ 2.4

Relação Exponencial $\mu(S) = \mu_{\max} \cdot e^{-K_1 P} \left(\frac{S}{K_s + S}\right)$ 2.5

Relação Hiperbólica $\mu(S) = \mu_{\max} \left(\frac{1}{1 + P/K_2}\right) \left(\frac{S}{K_s + S}\right)$ 2.6

Relação Parabólica $\mu(S) = \mu_{\max} \left(1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^\alpha\right) \left(\frac{S}{K_s + S}\right)$ 2.7

onde P_m , K_1 , K_2 e α são constantes empíricas. P_m é o valor de concentração de etanol acima da qual não há crescimento. Todas as relações apresentadas acima conseguem representar uma redução da taxa de crescimento com o aumento da concentração de etanol.

Existe uma concentração de etanol acima da qual o crescimento e a fermentação cessam. ROGERS *et al.* (1988) observaram que existe uma concentração de etanol abaixo da qual o efeito de inibição pode ser desprezado. Para levar em conta este fenômeno, costuma-se modificar a relação linear introduzindo o parâmetro P_i que indica o valor abaixo do qual se pode desprezar a inibição.

$$\mu(S) = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \cdot f(P) \quad 2.8$$

onde

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 - \frac{P - P_i}{P_m - P_i} && \text{se } P_i \leq P < P_m \\ f(P) &= 1 && \text{se } P \leq P_i \\ f(P) &= 0 && \text{se } P > P_m \end{aligned} \quad 2.9$$

2.2.1.3. Modelo de Inibição por Substrato

ANDREWS (1968) propôs uma modelagem matemática, tanto para culturas contínuas como para descontínuas, levando em conta a inibição por substrato. Com esta

modelagem observou-se que inibições em culturas descontínuas fazem com que haja um aumento de tempo na fase de latência. Assim:

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\text{máx}} \cdot S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_i}} \right) \quad 2.10$$

onde, k_s consiste na constante de saturação pelo substrato, k_i consiste na constante de inibição pelo substrato e $\mu_{\text{máx}}$ na taxa específica de crescimento celular máxima.

EDWARDS (1970) realizou um estudo detalhado da influência de altas concentrações de substrato. Várias relações foram propostas:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{(K_s + S)(1 + S/K_i)} \quad 2.11$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{máx}} S(1 + S/K)}{K_s + S + S^2/K_i} \quad 2.12$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{K_s + S + (S^2/K_i)(1 + S/K)} \quad 2.13$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{máx}} S \exp(-S/K_i)}{(K_s + S)} \quad 2.14$$

$$\mu(S) = \mu_{\text{máx}} (\exp(-S/K_i) - \exp(-S/K_s)) \quad 2.15$$

onde S é a concentração de substrato e $\mu_{\text{máx}}$, K , K_i e K_s são constantes. Tanto para inibição por produto (etanol) quanto para inibição por substrato, existe um valor de concentração abaixo do qual o efeito de inibição pode ser desprezado (ROGERS *et al.*, 1988, LEE e ROGERS, 1983, VEERAMALLU e AGRAWAL, 1990).

2.2.1.4. Modelo de Inibição por Substrato e Produto

Durante as fermentações alcoólicas ocorre um efeito combinado dos dois tipos de inibição (BRUCE *et al.*, 1991, JARZEBSKI, 1992), sendo necessário uma modelagem realista que deve considerar ambos os processos de inibição. LEE e ROGERS (1983) propuseram a seguinte equação para representar a inibição por substrato e por produto em fermentações com a bactéria *Z. mobilis*.

$$\mu(S) = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \cdot f(P) \cdot g(S) \quad 2.16$$

onde $f(P)$ é dado pela equação 2.9 e $g(S)$ é dado por:

$$g(S) = \begin{cases} \left(\frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i) + (S - S_i)} \right) & \text{se } S \geq S_i \\ 1 & \text{se } S < S_i \end{cases} \quad 2.17$$

onde S_i é a concentração de substrato abaixo da qual não ocorre inibição e K_i é um parâmetro relacionado à inibição por substrato.

ROGERS *et al.* (1982) observaram desacoplamento da produção de etanol em relação ao crescimento celular em fermentações com a bactéria *Z. mobilis*. Em outras palavras, o consumo de glicose e a produção de etanol permanecem temporariamente inalterados quando a taxa de crescimento diminui.

LEE e ROGERS (1983) propuseram um modelo para a inibição da taxa específica de produção de etanol pela ação inibitória do produto e de substrato.

$$Q_P = Q_{P_{\max}} \left(\frac{S}{K'_s + S} \right) \cdot \left(\frac{K'_i}{K'_i + S} \right) \cdot f(P) \quad 2.18$$

onde $f(P)$ é dado pela equação 2.9.

VEERAMALLU E AGRAWAL (1990) propuseram um modelo para combinar os efeitos de inibição por etanol e por substrato em fermentações com a bactéria *Z. mobilis* ATCC 10988.

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{ma}} \right)^a \right) \cdot f(P)}{k_s + \frac{S}{g(S)}} \quad 2.19$$

onde $g(S)$ é dada pela equação 2.17 e $f(P)$ é dado por:

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 && \text{se } P \leq P_{ob} \\ f(P) &= 1 - \left(\frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}} \right)^b && \text{se } P_{ob} \leq P < P_{mb} \\ f(P) &= 0 && \text{se } P > P_{mb} \end{aligned} \quad 2.20$$

e tal que P_m é a concentração acima da qual não há crescimento, P_{ob} é a concentração mínima para inibição do crescimento por etanol, P_{ma} , a e b são parâmetros relacionados à inibição do crescimento por etanol.

2.2.2 Modelagem Matemática de Processos Fermentativos com *Zymomonas mobilis*

No estudo de modelagem matemática de fermentações contínuas e descontínuas com a bactéria *Zymomonas mobilis*, efeitos como inibição por substrato, inibição por etanol e limitação por substrato devem ser levados em consideração.

OSMAN e INGRAM (1985) investigaram o efeito de etanol na fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* e concluíram que o etanol causa a inibição nas enzimas envolvidas na produção de etanol, uma vez que há o aumento no escape através da membrana plasmática de cofatores e coenzimas.

JÖBSES *et al.* (1985) estudaram o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 10998 em processos contínuos a 30° e 35°C, observando que a taxa específica de consumo de substrato foi maior na temperatura mais alta. Estes autores propuseram ainda dois modelos matemáticos: um não estruturado, que apresentou boa descrição no processo a 35 °C, mas não a 30 °C; e um modelo bi-compartimentado estruturado, que descreveu bem o processo nas duas temperaturas.

Conforme NAMBA *et al.* (1987), o histórico da concentração de etanol em fermentações em batelada com *Saccharomyces cerevisiae* pode ser responsável pela inibição do crescimento. Foi proposto assim que o efeito de inibição é uma função da “concentração integrada de etanol” que indica que a taxa específica de crescimento e a taxa de produção são afetadas pelo efeito acumulativo do etanol produzido e do tempo decorrido (história da concentração de etanol).

HOBLEY e PAMMENT (1994) observaram que durante a adição de etanol e quando comparadas duas culturas da bactéria *Zymomonas mobilis*, em iguais concentrações de etanol, a cultura sujeita à maior taxa de adição de etanol possuía maior viabilidade. Eles concluíram que a perda de viabilidade com rápida produção de etanol (através da adição externa de etanol) depende principalmente da concentração de etanol e do tempo de exposição (história da concentração de etanol) e não da taxa de variação da

concentração de etanol. LI (1995) analisou os resultados experimentais de HOBLEY e PAMMENT (1994) sobre o efeito da taxa de variação da concentração de etanol sobre *Zymomonas mobilis* e deu uma nova interpretação, uma vez que concluiu que as taxas de variação da concentração de etanol empregadas nos experimentos excederam certo limite de capacidade de adaptação das células e observou ainda que as taxas de desativação foram praticamente iguais apesar de uma cultura ter sido exposta ao etanol por mais tempo que a outra. O autor concluiu que o tempo de exposição ao etanol e a taxa de variação da concentração de etanol foram confundidas nos experimentos de HOBLEY e PAMMENT (1994) e que é difícil diferenciar qual fator teve efeito dominante na *Zymomonas mobilis* nos experimentos destes.

LI (1995) estudou a inibição causada pela exposição ao etanol ao longo do tempo e pela taxa de variação da concentração de etanol e propôs um modelo matemático que representasse os diversos comportamentos dinâmicos obtidos em fermentações contínuas com a bactéria *Zymomonas mobilis*. O autor concluiu a partir dos experimentos realizados que o efeito pela exposição ao etanol ao longo do tempo foi insignificante, enquanto o efeito da taxa de variação da concentração de etanol tem um importante efeito inibitório na bactéria.

DASARI *et al.* (1990) pesquisaram sobre o efeito da taxa de variação da concentração de etanol na cinética de fermentações de *S. cerevisiae*. Adicionando etanol com diferentes taxas, observou-se uma rápida perda de viabilidade devido a altas taxas de variação da concentração extracelular de etanol. A perda de viabilidade foi atribuída à incapacidade das células em se adaptar rapidamente às mudanças do meio. Com os resultados obtidos estes autores concluíram que não é simplesmente o tempo de exposição

que provoca o efeito de toxicidade do etanol, mas também a taxa com que varia a concentração extracelular do etanol.

No trabalho de LEE e HUANG (2000), um modelo matemático foi proposto para fermentações alcoólicas por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, tendo glicose e frutose no meio de crescimento. Quando frutose e glicose eram ambas utilizadas no meio de crescimento, o modelo foi capaz de prever o consumo de glicose e frutose como também a formação de célula, etanol e sorbitol por *Z. mobilis*.

Durante períodos de oscilação, muito comuns em determinadas condições de fermentação, verifica-se uma redução da produção de etanol e um acúmulo de substrato, que resulta na redução do rendimento $Y_{X/S}$. Para caracterizar esta situação em que as células exibem uma taxa de crescimento menor ou igual à taxa correspondente a condições normais de cultura, foram propostos por diferentes autores os conceitos de taxa de crescimento dinâmica, que consiste no produto da taxa de crescimento instantânea $\mu(S, P)$ pela função $f_{\mu}(Z(t))$ (MCLELLAN *et al.*, 1999). A função $f_{\mu}(Z(t))$ tem um comportamento hiperbólico e representa o efeito da média ponderada de segunda ordem, $Z(t)$, no crescimento celular.

A taxa de crescimento instantânea consiste na combinação do efeito de inibição e limitação por substrato e inibição por produto e com base nesta taxa, vários modelos cinéticos dinâmicos foram propostos para descrever a componente transiente das concentrações de célula, de substrato e de etanol. Esses modelos têm sido utilizados com sucesso para descrever resultados experimentais relativos às fermentações com *Zymomonas mobilis* e também para resultados de experiências com oscilações forçadas (MCLELLAN *et al.*, 1999; XIU *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1997; JÖBSES *et al.*, 1986).

LI *et al.* (1997) desenvolveram um modelo onde a inibição depende da taxa de variação de concentração de etanol. Este modelo é formado por cinco equações diferenciais, sendo as três primeiras resultantes do balanço material, considerando a operação em modo contínuo e as outras duas resultantes da diferenciação de $Z(t)$ com relação a t , tendo $W(t)$ como uma variável intermediária. $Z(t)$ é a média ponderada de segunda ordem da taxa de variação da concentração de etanol. O modelo proposto encontra-se descrito abaixo:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu(S, P, Z) - D) \cdot X \quad 2.21$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_F - S) - \frac{Q_P(S, P) \cdot X}{Y_{P/S}} \quad 2.22$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_P(S, P) \cdot X - D \cdot P \quad 2.23$$

$$\frac{dZ}{dt} = \beta \cdot (W - Z) \quad 2.24$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta \cdot (Q_P(S, P) \cdot X - D \cdot P - W) \quad 2.25$$

onde a taxa específica de crescimento dinâmica é

$$\mu(S, P, Z) = \mu(S, P) \cdot f_\mu(Z(t)) \quad 2.26$$

a taxa específica de crescimento instantânea é dada por

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{ma}}\right)^a\right) \cdot f(P)}{k_s + \frac{S}{g(S)}} \quad 2.27$$

$$f_\mu(Z(t)) = \frac{1}{2} \cdot \left(1 - \frac{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} - e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} + e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}\right) \quad 2.28$$

onde $g(S)$ é dado pela equação 2.17 e $f(P)$ é dado pela equação 2.20. A taxa específica de produção de etanol é dada por

$$Q_P = \frac{Q_{P_{\max}} \cdot S}{k_{mP} + S} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{me}} \right)^\alpha \right) \quad 2.29$$

Muitos investigadores têm relatado a presença de oscilações em sistemas contínuos. Conforme trabalho de GARHYAN e ELNASHAIE (2004), o modelo matemático utilizado pelos autores, prediz as oscilações experimentais e muitos outros fenômenos complexos em determinadas regiões dos parâmetros. Um fato muito importante, do ponto de vista da dinâmica não-linear, é que estas oscilações manifestam-se em fenômenos mais complexos como caos, com mudança nos valores de alguns parâmetros.

Diversos trabalhos utilizam o recurso da geração de diagramas de bifurcação, através dos quais é possível investigar comportamentos dinâmicos diversos, uma vez que modelos matemáticos estejam disponíveis (GARHYAN & ELNASHAIE, 2004, 2005, ZHANG *et al.*, 2002, AGRAWAL *et al.*, 1982).

GARHYAN e ELNASHAIE (2005) desenvolveram um modelo matemático estruturado, não-segregado simplificado para processo em um fermentador contínuo perfeitamente agitado com a bactéria *Zymomonas mobilis* e glicose com a finalidade de explorar a possibilidade de aumentar a conversão do açúcar e a produtividade do etanol. Através dos experimentos realizados continuamente, os valores experimentais das variáveis do estado apresentam boa coerência com os valores simulados.

Diversos outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como o trabalho de PORRO *et al.* (1988), onde foi observada que oscilações ocorreram em faixas bem definidas de taxas de diluição e concentrações de oxigênio e o período das oscilações está relacionado com período de duplicação da massa celular.

A abordagem chamada de “cibernética”, em que se postula que as células são organismos orientados por objetivos e que mudam seus níveis enzimáticos internos em resposta a mudanças ambientais, apareceu como alternativa de modelagem (NANJOSHI & RAMKRISHNA, 2005).

KUMAR *et al.* (2008), investigaram o efeito de diferentes parâmetros na região de multiplicidade para determinar as condições de funcionamento que permitiriam a verificação experimental dessas predições. Dois modelos diferentes, o modelo de KOMPALA *et al.* (1986) e BALOO e RAMKRISHMA (1991) foram estudados. A teoria da bifurcação e a análise de estabilidade foram aplicadas para determinar como o número e as estabilidades dos estados estacionários dependem da taxa da diluição e da composição de alimentação (glicose-xilose).

GARHYAN *et al.* (2003) utilizaram um modelo de quatro dimensões, em um processo anaeróbio de um fermentador CSTR, na investigação de bifurcações estática/dinâmicas e no comportamento caótico deste fermentador. Estes concluíram que a análise das regiões periódicas e caóticas mostra que a conversão do açúcar, o rendimento de etanol e a taxa de produtividade podem ser mais elevados do que para valores de estado estacionário instáveis, mostrando assim a importância do uso de análises de bifurcação.

Em 2004, GARHYAN e ELNASHAIE, exploraram as condições para aumentar a produtividade e o rendimento do etanol em fermentações usando modelagem matemática e a análise não-linear. Um aumento possível da conversão do açúcar e da produtividade do etanol usando a operação periódica e caótica em concentrações elevadas do açúcar foi investigado em fermentadores CSTR com e sem membranas álcool-seletivas. Os resultados obtidos mostraram que o efeito de inibição do etanol produzido, pode ser superado quando removido continuamente do processo. A remoção do etanol causa uma mudança nas características estáticas e dinâmicas do sistema, assim aumentando o rendimento e a produtividade do etanol.

2.3 Representações Matemáticas Lineares e Não Lineares de Tempo Discreto.

Identificação de sistemas, segundo AGUIRRE (2000), é a área de conhecimento que estuda e desenvolve técnicas e algoritmos para identificação de modelos de sistemas dinâmicos a partir de dados gerados pelo próprio sistema, ou seja, são procedimentos que permitem desenvolver modelos matemáticos a partir de dados e sinais observados.

O grande apelo da modelagem empírica se deve principalmente à dificuldade na obtenção de um tratamento matemático genérico para sistemas não lineares, pois é praticamente impossível representar adequadamente todo tipo de conhecimento em sistemas não lineares. Outro problema é que, mesmo que algum conhecimento sobre o sistema esteja disponível, relacioná-lo corretamente a uma descrição dinâmica do sistema contínuo no tempo (isto é, em termos de equações diferenciais), pode ser uma tarefa extremamente difícil. Portanto, a opção de escolher a modelagem empírica não é incomum, mesmo quando certo nível de conhecimento sobre o sistema está disponível. Mas, um bom

entendimento sobre as leis físicas que regem o comportamento do sistema é sempre útil e facilita bastante o processo de identificação. Tal conhecimento pode estar relacionado à ordem do sistema, à dinâmica principal do sistema, à frequência de amostragem adequada, às características de estabilidade, à faixa de operação em que se pretende operar o sistema, tempos de atraso, grau de não linearidade, entre outros (AGUIRRE, 2000).

2.3.1 Definições e Conceitos Fundamentais

Os chamados sistemas lineares podem ser formalmente definidos como todo sistema que satisfaz o *princípio da superposição* (KALMAN *et al.*1969, AGUIRRE, 2000). O *princípio da superposição* pode ser resumido da seguinte forma: seja um sistema que ao ser excitado pela entrada $u_1(t)$ produz uma saída $y_1(t)$ e quando é excitado pela entrada $u_2(t)$ produz $y_2(t)$. Se tal sistema satisfizer tal princípio $au_1(t)+bu_2(t)$, sua saída será $ay_1(t)+by_2(t)$, sendo a e b constantes reais.

De acordo com NORGAARD *et al.*(2000), um sistema discreto é denominado linear se for possível representá-lo através de um modelo que assume a seguinte forma:

$$y(t) = G(q^{-1})u(t) + H(q^{-1})v(t) \quad 2.30$$

onde G e H são funções de transferência definidas no operador de atraso, q^{-1} , e $v(t)$, é um sinal de ruído branco que é independente das entradas passadas e que pode ser caracterizado por alguma função de densidade probabilística. O operador de atraso atua sobre o sinal conforme descrito a seguir:

$$q^{-d}x(t) = x(t - d) \quad 2.31$$

onde d é um múltiplo do período de amostragem.

2.3.2 Representações Matemáticas Lineares

Os tipos de representações matemáticas utilizadas com mais frequência na identificação de sistemas lineares utilizando-se algoritmos já estabelecidos para estimação de parâmetros podem ser vistos abaixo:

- Modelo de Resposta Finita ao Impulso (FIR);
- Modelos com Funções de Base Ortogonal (OBF);
- Modelo Auto-Regressivo com Entradas Externas (ARX) e
- Modelo Auto-Regressivo com Média Móvel e Entradas Externas (ARMAX)

A estrutura do modelo ARX (utilizada nesta tese) corresponde à equação 2.32:

$$A(q^{-1})y(k) = q^{-d} \frac{B(q^{-1})}{F(q^{-1})} u(k) + \frac{C(q^{-1})}{D(q^{-1})} v(k) \quad 2.32$$

com $C(q^{-1}) = D(q^{-1}) = F(q^{-1}) = 1$ e $A(q^{-1})$ e $B(q^{-1})$ como polinômios arbitrários, resultando em:

$$A(q^{-1})y(k) = B(q^{-1})u(k) + v(k) \quad 2.33$$

Pelo fato do ruído $v(k)$ aparecer explicitamente na equação 2.33, o modelo ARX classifica-se como pertencente à classe dos modelos com erros na equação (AGUIRRE, 2000).

O modelo ARMAX corresponde à equação 2.32:

com $D(q^{-1}) = F(q^{-1}) = 1$ e $A(q^{-1})$, $B(q^{-1})$ e $C(q^{-1})$ como polinômios arbitrários, resultando em:

$$A(q^{-1})y(k) = B(q^{-1})u(k) + C(q^{-1})v(k) \quad 2.34$$

Assim como o modelo ARX, o modelo ARXMAX também é classificado como um modelo de erro na equação. Neste caso, o erro é modelado como um processo de média móvel e o ruído adicionado à saída, $e(k)$ (não branco), é modelado como um ruído branco filtrado por um filtro ARMA (AGUIRRE, 2000).

2.4 Dinâmica de Fermentações

2.4.1 Estados Estacionários

O trabalho de Liapunov foi o pioneiro na engenharia na investigação da estabilidade dos estados estacionários, surgindo daí a necessidade de um confronto similar com os reatores bioquímicos, uma vez que sistemas biológicos têm uma tendência natural para periodicidade (AGRAWAL *et al.*, 1982). Para muitos, o trabalho pioneiro na exploração da estabilidade em sistemas de reação química foi o de VAN HEERDEN (1953), no qual se investigou a dinâmica de reatores contínuos de mistura perfeita com uma reação exotérmica de primeira ordem. Neste estudo foi possível observar a multiplicidade de estados estacionários.

De fato, o primeiro trabalho, que explorou a questão da estabilidade em sistemas de reação química foi o de LILJENROTH (1918), com o estudo da estabilidade de reações de oxidação da amônia e reações similares. Os trabalhos de LILJENROTH (1918) e VAN HEERDEN (1953), são os marcos iniciais e propulsores dos estudos de estabilidade de sistemas da engenharia.

O formalismo necessário para a determinação do número de possíveis estados estacionários e a estabilidade destes só foi consolidado com os trabalhos de AMUNDSON *et al.* (1955, 1958 a, b, c). Eles desenvolveram um critério para determinação da direção da bifurcação e estudaram a estabilidade dos ciclos limites.

PAWLOWSKY & HOWEEL (1973) e CHI *et al.* (1974, 1976) realizaram estudos do comportamento teórico e experimental de um CSTR sujeito a inibição por fenol, observando multiplicidade de estados estacionários do sistema de malha aberta com um estado estacionário de baixa conversão tendo crescimento de células somente na parede do reator.

CHEN *et al.* (1990 a, b) investigaram o comportamento dinâmico de biorreatores contínuos quando submetido a diversas condições de operações (taxa de alimentação, concentração de glicose na alimentação, concentração de amônio na alimentação, oxigênio dissolvido e pH) e observaram multiplicidade de soluções para o sistema, sendo uma oscilatória e a outra estacionária.

2.4.2 Comportamento Oscilatório

AMUNDSON *et al.* (1955, 1958 a,b,c) foram os primeiros a obterem resultados teóricos sobre o comportamento periódico em reatores químicos. O comportamento dinâmico de culturas contínuas e em batelada para dois conjuntos de modelos (estruturado e não-estruturado) foram estudados por RAMKRISHNA *et al.* (1967).

GILLEY e BUNGAY (1967) observaram oscilações na concentração celular de uma mistura de microorganismos quando sujeita a variações na concentração de

substrato na alimentação e na taxa de diluição e concluíram, diante das respostas oscilatórias, que a glicose deve afetar o mecanismo de controle para o crescimento, mas somente no período transiente.

PINHEIRO (2001) observou oscilações teóricas em culturas de *Zymomonas mobilis* CP4. Tais oscilações foram explicadas pela hipótese de que o coeficiente de rendimento de substrato em células é uma função da concentração de substrato. Já o coeficiente de rendimento de substrato em produto pode levar a oscilações se a taxa de crescimento for somente função do substrato e do produto.

COSTA *et al.* (2001) observaram comportamento oscilatório ao realizar fermentações contínuas de sacarose na concentração de 20 %, taxa de diluição de 0.11 h^{-1} com *Z. mobilis* ATCC 29191. Enquanto que com concentração de sacarose de 10 % e taxas de diluição de 0,11, 0,21 e $0,28 \text{ h}^{-1}$ a cultura atingiu estado estacionário, sendo com a taxa de 0.21 h^{-1} a maior produção de etanol ($38,1 \text{ g.L}^{-1}$).

No trabalho de CAMÊLO (2004), estados estacionários e oscilação sustentada foram observadas em fermentações contínuas com *Zymomonas mobilis* Ag11, cuja concentração de glicose no meio reacional e de alimentação era de 200 g.L^{-1} . A taxa de diluição utilizadas foi de $0,0675 \text{ h}^{-1}$.

2.4.3 Uso da Teoria da Bifurcação

Equações diferenciais não lineares resultantes de diversos modelos de processos químicos e bioquímicos, não possuem solução analítica e são de difícil interpretação. A avaliação do potencial destes modelos torna-se ineficaz quando se faz uso

exclusivo de simulação dinâmica. Desta forma, para investigar estes sistemas recorre-se ao estudo qualitativo das equações diferenciais que procura identificar as características importantes das soluções sem resolvê-las.

Os diagramas de bifurcação são ferramentas poderosas no estudo qualitativo das equações diferenciais, por obter uma caracterização mais eficiente e completa do comportamento do modelo. Várias características importantes do modelo são identificadas via diagrama de bifurcação, tais como as limitações do modelo, capacidade de representar multiplicidade de estados estacionários e ocorrência de comportamento oscilatório. Além disso, os diagramas de bifurcação permitem estudar as influências dos parâmetros do modelo na formação e na estabilidade dos ramos de soluções estacionárias.

ZHANG e HENSON (2001) estudaram o comportamento dinâmico de três modelos contínuos do biorreatores que exibem estado estacionário complexo e comportamento transiente. Diversas características importantes, assim como as limitações potenciais, que são difíceis de verificar através da simulação dinâmica foram determinadas com a análise da bifurcação. Os resultados motivaram o uso da análise da simulação dinâmica e da bifurcação como ferramentas complementares para analisar o comportamento não-linear de modelos do biorreator.

2.4.3.1 Estabilidade (LOPES, 2002)

Considerando um sistema de equações diferenciais do tipo:

$$\dot{u}(t) = f(u(t), \lambda), u(t) \in R^n \quad \dot{u} \equiv \frac{du}{dt} \quad 2.35$$

onde λ é chamado de parâmetro de continuação. Diversas soluções distintas para a equação (2.38) podem ser encontradas variando o parâmetro λ . Dentre as soluções encontradas, algumas categorias de estabilidades são usualmente referidas.

Seja $P^* = (u^*, \lambda^*)$ um ponto fixo do sistema de EDO (Eq.2.35), dizemos que (u^*, λ^*) é assintoticamente estável se a resposta do sistema a uma pequena perturbação aproxima-se de (u^*, λ^*) quando $t \rightarrow \infty$, ou seja, se $\left((u(t), \lambda) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} (u^*, \lambda^*) \right)$ então o ponto fixo (u^*, λ^*) é nesse caso *atrator*.

Um ponto de equilíbrio é chamado *estável* (também chamada estabilidade neutra ou estabilidade *Lyapunov*) se a resposta do sistema a pequena perturbação permanece pequena quando $t \rightarrow \infty$. Um ponto de equilíbrio (u^*, λ^*) é *instável* se a perturbação cresce quando $t \rightarrow \infty$. Neste caso dizemos que este ponto é um *repulsor* e que sua origem resulta em um *ciclo limite*.

Existe outro tipo de estabilidade chamada estrutural, para a qual, campos vetoriais suficientemente próximos têm retratos de fases equivalentes. Este tipo de estabilidade significa a robustez de um ponto no espaço dos campos vetoriais, entendendo-se robustez como a propriedade que o sistema apresenta de reter as características qualitativas da sua dinâmica, relativamente a pequenas perturbações ou mudanças nas funções envolvidas na sua definição.

Genericamente, a perda de estabilidade estrutural é denominada uma bifurcação.

2.4.3.2 Estabilidade Linear e Não-Linear

Seja um sistema linear bidimensional do tipo:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= ax + by = f(x, y) \\ \dot{y} &= cx + dy = g(x, y)\end{aligned}\tag{2.36}$$

onde \dot{x} e \dot{y} são, $\frac{dx}{dt}$ e $\frac{dy}{dt}$, respectivamente. Este sistema possui um ponto de equilíbrio

(solução estacionária do sistema) em $(x^*, y^*) = (0, 0)$ e uma solução particular do tipo:

$$\begin{aligned}X(t) &= x_0 e^{\lambda t} \\ Y(t) &= y_0 e^{\lambda t}\end{aligned}\tag{2.37}$$

Desta forma, substituindo 2.37 em 2.36, obtém-se o sistema

$$\begin{aligned}(a - \lambda).x_0 + b.y_0 &= 0 \\ c.x_0 + (d - \lambda).y_0 &= 0\end{aligned}\tag{2.38}$$

A solução da equação 2.38 não é trivial, assim é necessário utilizar o determinante da matriz dos coeficientes e este deve ser nulo, assim:

$$\det \begin{bmatrix} (a - \lambda) & b \\ c & (d - \lambda) \end{bmatrix} = 0\tag{2.39}$$

No caso de n dimensões, basta reescrever 2.37 - 2.38 em notação vetorial.

Definindo que $\vec{x}(t) = (x(t), y(t))$ e $\dot{\vec{x}}(t) = (\dot{x}(t), \dot{y}(t))$, a matriz fica:

$$\begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \partial f / \partial x & \partial f / \partial y \\ \partial g / \partial x & \partial g / \partial y \end{bmatrix} = J\tag{2.40}$$

denominada *matriz Jacobiana* do sistema. Na forma vetorial

$$\dot{\vec{x}} = J \vec{x}(t) \quad 2.41$$

cuja solução particular é:

$$\vec{x}(t) = e^{\lambda t} \vec{x}_0 \quad 2.42$$

tem-se:

$$(J - \lambda I) \vec{x}_0 = 0 \quad 2.43$$

onde I é a matriz identidade e λ e \vec{x}_0 são, respectivamente, os autovalores e os autovetores da matriz Jacobiana. Para a determinação dos autovalores devemos resolver:

$$\det(J - \lambda I) = 0 \quad 2.44$$

Resolvendo a equação 2.36, temos que:

$$(a - \lambda)(d - \lambda) - bc = 0 \quad 2.45$$

tendo-se assim duas raízes λ_1 e λ_2 , onde estas duas raízes determinarão a estabilidade do ponto de equilíbrio $P^* = (0, 0)$.

Seja $\lambda = \text{Re}(\lambda) + i \text{Im}(\lambda)$, onde Re e Im correspondem, respectivamente, as partes real e imaginária do autovalor. Assim, a estabilidade depende essencialmente da parte real dos valores característicos. Portanto:

Se $\text{Re}(\lambda) > 0 \rightarrow e^{\text{Re}(\lambda)t}$ cresce continuamente e $x(t) \rightarrow \infty$ quando $t \rightarrow \infty$

Se $\text{Re}(\lambda) < 0 \rightarrow e^{\text{Re}(\lambda)t}$ decresce continuamente e $x(t) \rightarrow 0$ quando $t \rightarrow \infty$

De forma resumida, na Figura 2.3, encontra-se a classificação das soluções estacionárias de um sistema bidimensional linear para todas as possíveis combinações dos valores característicos (FERRARA e PRADO, 1995).

Autovalores	Sinal da parte real	Representação no plano complexo	Ponto fixo	Exemplo	Estabilidade
$\lambda_1 \neq \lambda_2,$ $\lambda_1, \lambda_2 \neq 0$ $\lambda_1, \lambda_2 \in \mathbb{R}$	$\lambda_1, \lambda_2 > 0$ $\lambda_1, \lambda_2 < 0$		nó (hiperbólico)		assintoticamente estável
	$\lambda_1, \lambda_2 > 0$ $\lambda_1, \lambda_2 < 0$		nó (hiperbólico)		instável
	$\lambda_1, \lambda_2 < 0$		sela (hiperbólica)		instável
$\lambda_1 = \lambda_2^*$ (Complexos conjugados)	positiva		foco (hiperbólico)		instável
	negativa		foco (hiperbólico)		assintoticamente estável
	nula		centro (elíptico) CASO DEGENERADO		estável (não assintoticamente)
$\lambda_1, \lambda_2 = 0$	nula	CASOS DEGENERADOS (elípticos)			
$\lambda_1 = \lambda_2 \neq 0 \in \mathbb{R}$	positiva		"Inflected node" (hiperbólico)		instável
	negativa		"Inflected node" (hiperbólico)		assintoticamente estável

Figura 2.3 – Comportamento dinâmico de um sistema bidimensional linear em diferentes combinações de valores característicos. (FERRARA e PRADO, 1995)

Seja o sistema de equações diferenciais não-lineares:

$$\dot{x} = ax + by = f(x, y) \quad 2.46$$

$$\dot{y} = cx + dy = g(x, y) \quad 2.47$$

com ponto de equilíbrio em $P^* = (x^*, y^*)$. Escrevem-se as expansões em série de Taylor das equações diferenciais não-lineares que formam o sistema como:

$$\dot{x} = f(x, y) = f(x^*, y^*) + \frac{\partial f}{\partial x}(x^*, y^*) \cdot (x - x^*) + \frac{\partial f}{\partial y}(x^*, y^*) \cdot (y - y^*) + \text{termos de ordem superior} \quad 2.48$$

$$\dot{y} = g(x, y) = g(x^*, y^*) + \frac{\partial g}{\partial x}(x^*, y^*) \cdot (x - x^*) + \frac{\partial g}{\partial y}(x^*, y^*) \cdot (y - y^*) + \text{termos de ordem superior} \quad 2.49$$

A definição das variáveis $\tilde{x} = x - x^*$ e $\tilde{y} = y - y^*$ e a partir da observação que

$\tilde{\dot{x}} = \dot{x}$, $\tilde{\dot{y}} = \dot{y}$ e $f(x^*, y^*) = g(x^*, y^*) = 0$, leva à linearização das equações 2.48 e 2.49, quando

se desprezam os termos de ordem superior:

$$\tilde{\dot{x}} = \frac{\partial f}{\partial x} \Big|_* \tilde{x} + \frac{\partial f}{\partial y} \Big|_* \tilde{y} = a\tilde{x} + b\tilde{y} \quad 2.50$$

$$\dot{\tilde{x}} = \left. \frac{\partial g}{\partial x} \right|_{x^*} \tilde{x} + \left. \frac{\partial g}{\partial y} \right|_{y^*} \tilde{y} = \tilde{c}\tilde{x} + \tilde{d}\tilde{y} \quad 2.51$$

onde as derivadas são calculadas no ponto fixo $P^* = (x^*, y^*)$. A matriz dos coeficientes é chamada de matriz jacobiana dada pela equação 2.40, calculada no ponto fixo. A resolução de 2.48 e 2.49 fornece $\tilde{x}(t)$ e $\tilde{y}(t)$ que são as aproximações de primeira ordem para as distâncias entre os pontos $(x(t), y(t))$ da trajetória e o ponto fixo.

Esta aproximação mostra a evolução do sistema quando as condições iniciais são próximas do ponto de equilíbrio. GUCKENHEIMER & HOLMES (1983) demonstraram que a estabilidade de um equilíbrio hiperbólico não é afetada pela linearização, ao contrário dos casos de pontos elípticos, onde a análise linear não permite obter conclusões sobre estabilidade do ponto de equilíbrio, FERRARA e PRADO, (1995). A linearização faz com que as soluções sejam aproximadas e com validade para pequenas distâncias em torno do ponto de equilíbrio.

Como já foi dito, uma vez que haja uma perda de estabilidade estrutural o sistema sofre bifurcação. Existem vários tipos de bifurcações, que serão apresentadas a seguir.

2.4.3.3 Tipos de bifurcação

Bifurcação Sela-Nó ou de dobra (*Fold*): Observa-se neste tipo de bifurcação que o estado estacionário é estável no ramo superior, chamado de *nó* e é instável no ramo inferior, chamado de *sela* (Figura 2.4). Para melhor demonstração têm-se como exemplo, a seguinte equação diferencial:

$$\frac{dx}{dt} = \mu - x^2 \quad 2.52$$

Neste caso, para $\mu \geq 0$ existe solução para o sistema acima e o ponto $(\mu, x) = (0, 0)$ é um ponto de retorno. A análise da estabilidade recai no estudo do sinal em cada um dos dois ramos de soluções estacionárias. Assim, conclui-se que o ramo superior é estável e o inferior instável. Análise da estabilidade:

$$\left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=+\sqrt{\mu}} = -2\sqrt{\mu} \qquad \left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=-\sqrt{\mu}} = +2\sqrt{\mu}$$

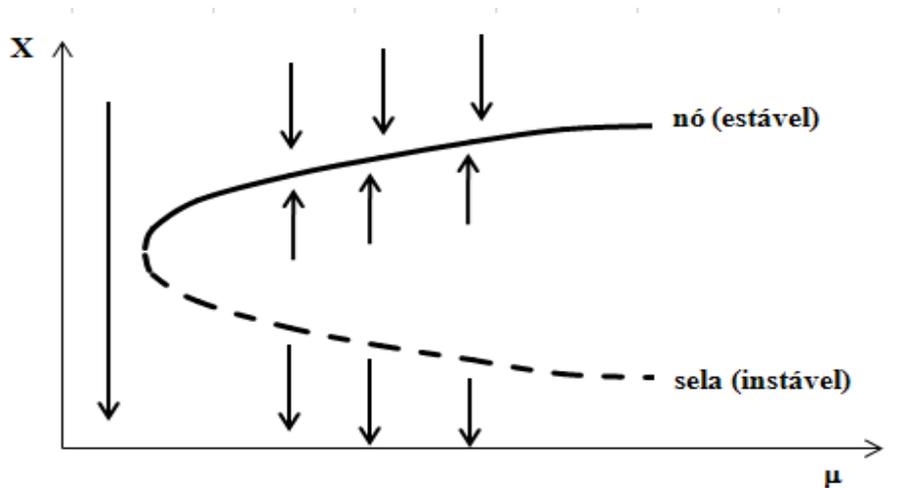


Figura 2.4 - Diagrama de bifurcação tipo sela-nó ou dobra (fold). (FERRARA e PRADO, 1995)

Bifurcação transcítica: Há situações em que dois pontos de equilíbrio devem existir para todos os valores de um parâmetro, embora as estabilidades destes pontos sejam trocadas quando o parâmetro passa por um ponto crítico (FERRARA e PRADO, 1995). A bifurcação transcítica é o mecanismo associado a esse tipo de mudança (Figura 2.5).

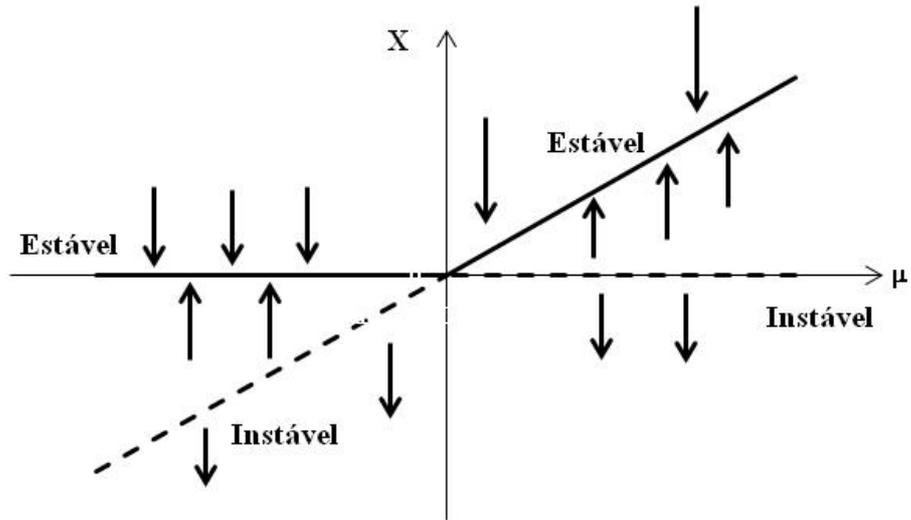


Figura 2.5: Bifurcação Transcritica.

Bifurcação de Forquilha: Esta bifurcação aparece em sistemas físicos que apresenta algum tipo de simetria, em tais sistemas um par de pontos de equilíbrio de mesma estabilidade pode aparecer ou desaparecer simultaneamente, quando o parâmetro de controle passa por um valor crítico (FERRARA e PRADO, 1995). Este tipo de bifurcação pode ser apresentado na forma de bifurcação de forquilha supercrítica (Figura 2.6-a) ou na forma de bifurcação de forquilha subcrítica (Figura 2.6-b).

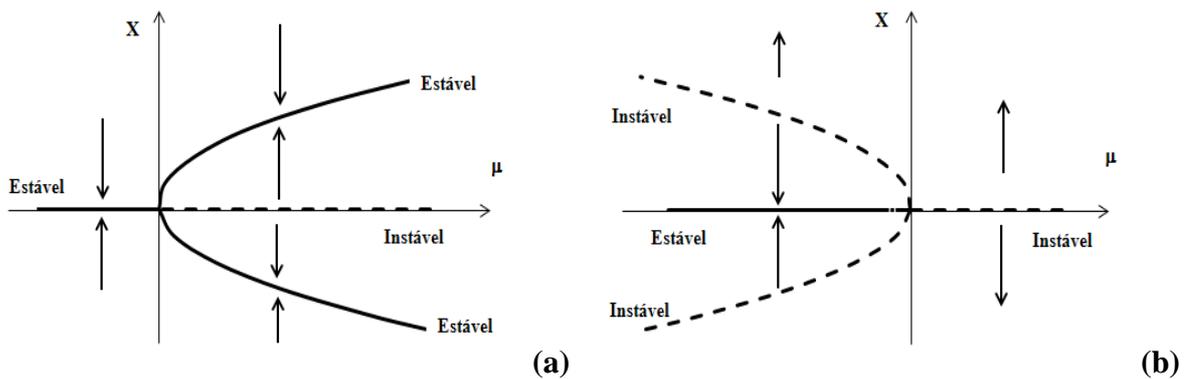


Figura 2.6: Bifurcação de Forquilha. (a) supercrítica; (b) subcrítica.

Bifurcação de HOPF: Bifurcação de Hopf é a bifurcação de um equilíbrio (solução estacionária do problema) para uma oscilação periódica. A matriz Jacobiana no ponto de bifurcação de Hopf tem um par de valores característicos puramente imaginários

(característica da bifurcação de Hopf). A bifurcação de Hopf liga um equilíbrio a um movimento periódico (FERRARA e PRADO, 1995).

Considerando um exemplo de sistema de equações diferenciais escrita em coordenadas polares, do tipo:

$$\begin{aligned}\dot{r} &= r(\mu - r^2) \\ \dot{\theta} &= 1\end{aligned}\tag{2.53}$$

Ao gerar o diagrama conforme Figura 2.7 observa-se uma órbita periódica de raio $r = \sqrt{\mu}$. Para $\mu = 0$ há troca de estabilidade, para $\mu < 0$ a solução é assintoticamente estável e à medida que $\mu > 0$ ocorre ciclo limite.

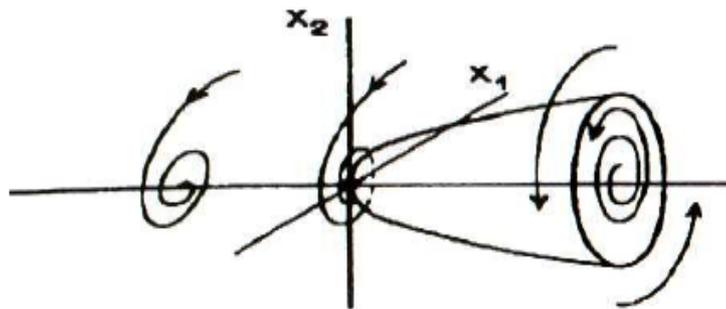


Figura 2.7: Bifurcação de Hopf.

2.5 Eletroforese

2.5.1 Fundamentos

A eletroforese é a denominação dada ao fenômeno em que uma dispersão coloidal é submetida à ação de um campo elétrico, fazendo com que haja migração de partículas carregadas.

A eletroforese, ferramenta amplamente utilizada no meio científico, baseia-se na técnica onde há separação de partículas em um determinado gel de acordo com sua massa e carga. As maneiras como a substância adquirem carga são várias, uma delas é pela ionização, outra pela dissociação, ou ainda pela associação com outras substâncias carregadas (SILVA JÚNIOR, 2001).

A eletroforese pode ser utilizada para fracionamento e caracterização de ácidos carboxílicos, aminoácidos, glicoproteínas, lipoproteínas, nucleotídeos, peptídeos, proteínas, RNA e DNA. A relação existente entre a carga e o massa molecular para migrantes de formas similares é determinante de seus comportamentos eletroforéticos (SILVA JÚNIOR, 2001).

2.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

No uso de gel de poliacrilamida, inicialmente usava-se apenas um único gel, denominado gel fracionador. Posteriormente, outro tipo de gel, denominado gel de concentração ou gel de poro largo, que antecedia o gel fracionador foi introduzido (OAKLEY *et al.*, 1980).

O gel de poliacrilamida forma uma malha constituída por uma rede de polímeros que permite a migração de moléculas. Moléculas de menor massa molecular terão mais facilidade em atravessar a malha do gel, posicionando-se assim mais próximas do catodo; enquanto as moléculas com maior massa molar apresentam maior dificuldade e se posicionam mais próximas do anodo. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel.

Conforme trabalho de AN *et al.* (1991), as 13 enzimas principais que compõem a via fermentativa glicolítica da bactéria *Zymomonas mobilis* são particularmente abundantes e as amostras que foram utilizadas em tal estudo foram retiradas na fase exponencial do processo. O gel utilizado foi o de poliacrilamida com uma e duas dimensões para o mapeamento de 12, destas enzimas e foram feitas comparações com proteínas puras.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi à bactéria *Zymomonas mobilis* linhagem Ag11 DAUFPE 198, fornecida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Esta linhagem foi escolhida por não flocular (PALHA, 1987).

3.2. Manutenção

O microrganismo foi mantido em geladeira a 4°C, após crescimento em estufa a 30°C por 24 horas em meio SDL (20 g.L⁻¹ de glicose e 5g de extrato de levedura) sendo repicado mensalmente.

3.3. Meio de Crescimento

O meio de crescimento usado nas fermentações em estudo foi o mesmo usado por LI (1995), cuja composição é apresentada na Tabela 3.1. A glicose, o extrato de levedura e os sais foram dissolvidos separadamente em água destilada e esterilizados a 121°C por 15 minutos, após serem resfriadas até a temperatura ambiente, as soluções foram misturadas. Para a formulação dos meios com diferentes concentrações de glicose, os outros componentes foram determinados a partir da glicose.

TABELA 3.1: Composição do meio de crescimento de LI (1995)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
GLICOSE (VETEC)	165
EXTRATO DE LEVEDURA(VETEC)	15
KH ₂ PO ₄ (VETEC)	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (VETEC)	1,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O (VETEC)	0,75

3.4. Preparação do Inóculo

A linhagem Ag11 foi inoculada em 10 mL de meio de crescimento e incubada por 18 horas a 30°C. Após esse tempo, transferiu-se para um frasco contendo um volume correspondente a 10% do volume final a ser utilizado no reator nas mesmas condições descritas anteriormente e, depois de 18 horas, transferiu-se para o fermentador contendo 90% de volume de meio de crescimento (Figura 3.1). O volume total de meio utilizado nas fermentações foi de 1L.

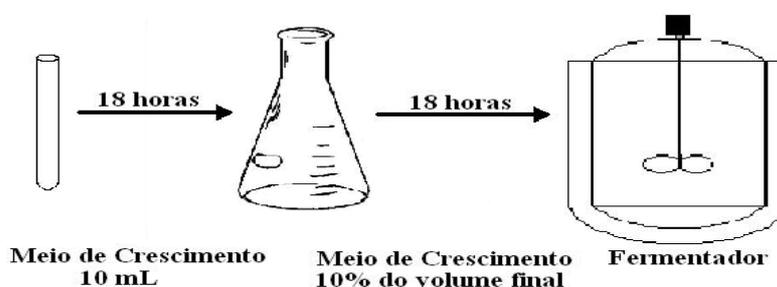


FIGURA 3.1 – Esquema adotado no preparo do inóculo.

Nos experimentos onde o meio de crescimento tinha a concentração de glicose de 200 g.L^{-1} , o inóculo foi preparado da seguinte maneira: a concentração de glicose no meio no frasco de 10 mL era de 100 g.L^{-1} , onde era repicado para outro frasco cujo meio tinha 150 g.L^{-1} de glicose e por fim o frasco contendo meio de crescimento com 10% do volume final era de 200 g.L^{-1} de glicose.

3.5. Equipamentos

As fermentações descontínuas foram realizadas em “*Shaker*” (Nova Ética - Incubadora 430), à temperatura constante de 30°C e agitação de 150rpm. Já as fermentações contínuas foram realizadas no reator B. Braun Biotech International, modelo BIOSTAT[®]B com 2L de volume útil (Figura 3.2). O fermentador possui

controle de agitação, de temperatura e de pH. Esses parâmetros foram mantidos em 150 rpm, 30 °C e 5,0 respectivamente. O pH foi controlado com adição de KOH (1M), uma vez que durante o crescimento da bactéria *Z. mobilis*, o pH tende a diminuir.

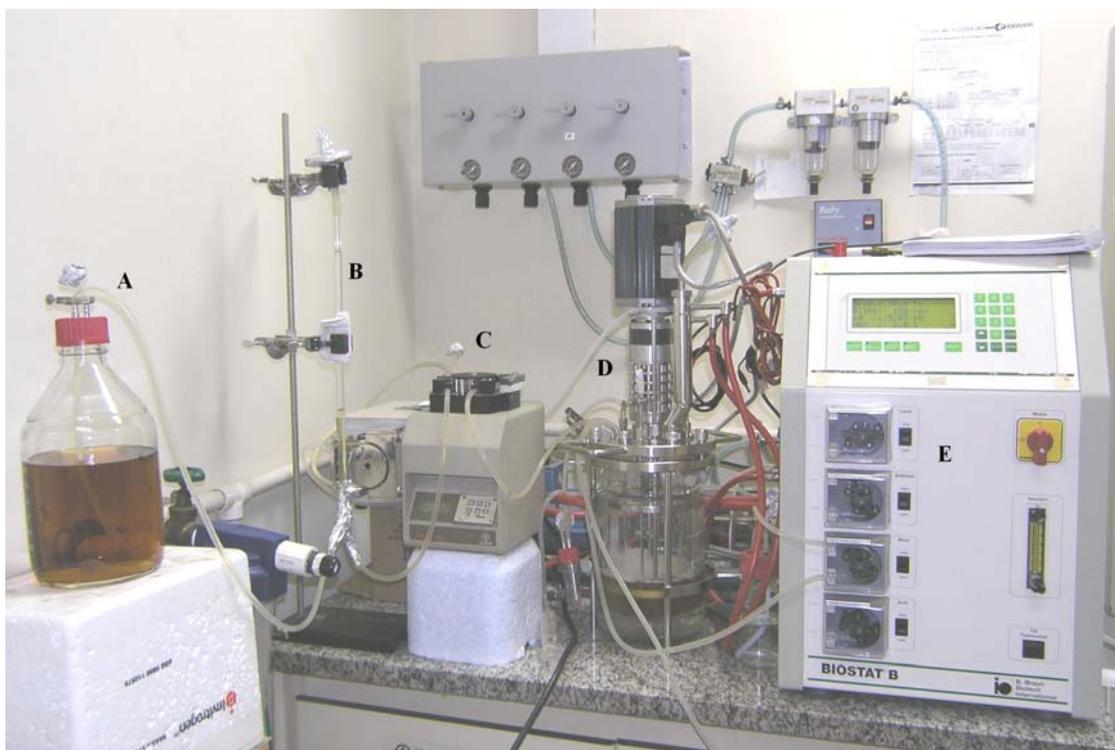


FIGURA 3.2: Fotografia do sistema de fermentação constituído por: Fermentador B. Braun Biotech International, modelo BIOSTAT®B; T – 30 °C, pH – 5,0, agitação – 150 rpm. (A) Frasco de alimentação; (B) Medidor de vazão; (C) Bombas peristálticas para alimentação do meio e retirada do meio fermentado; (D) Reator e (E) Controlador do fermentador.

3.6. Concentração Celular

A concentração celular foi monitorada de forma descontínua através da absorbância no espectrofotômetro UV Mini 1240 – UV – Vis Spectrophotometer, Shimadzu e de forma contínua com a absorbância no espectrofotômetro Spectronic 20D, num comprimento de onda de 660 nm para os dois casos. O espectrofotômetro Spectronic 20D foi adaptado para receber uma cubeta de fluxo (Figura 3.3).

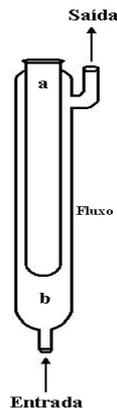


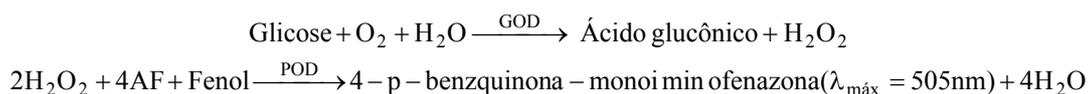
FIGURA 3.3: Esquema da cubeta de fluxo usada neste trabalho. a. Tubo interno: destinado a adição de água para diluição aparente. b. Tubo externo: passagem contínua do meio fermentativo.

A confecção da cubeta seguiu as idéias de diluição aparente apresentadas por LEE e LIM (1980). Na cubeta de fluxo confeccionada, a entrada e a saída do fluxo eram realizadas pela parte inferior e superior da mesma, respectivamente. Este modelo de cubeta teve como objetivo principal realizar uma diluição aparente do meio de crescimento, para expandir a faixa de concentração que pode ser monitorada. A confecção da cubeta foi feita fundindo-se dois tubos concêntricos na parte superior, de forma que o diâmetro do tubo externo fosse igual ao da cubeta original do espectrofotômetro. No tubo interno adicionou-se água para uma diluição aparente. Os dados experimentais foram armazenados em arquivo a cada 1 minutos. O processo de aquisição se deu da seguinte maneira: a tensão de saída (analógica) do espectrofotômetro é convertida em digital por um conversor e é enviada a uma placa de aquisição PCL - 711 instalada dentro de um computador. O *software Labtech Notebook* foi utilizado para o armazenamento dos valores de absorvância, transmitância e o tempo. Através deste *software* pode-se acompanhar o ensaio em tempo real que as reações ocorreram. Uma curva de calibração foi construída para correlacionar célula e absorvância (Apêndice A-I).

3.7. Concentrações de Glicose e Etanol

O método utilizado para a determinação da concentração de glicose consistiu no método enzimático-colorimétrico (GOD-POD), segundo TRINDER (1969).

Tal método é baseado nas seguintes reações:



onde as siglas GOD, POD e 4AF consistem nas enzimas Glicose Oxidase, Peroxidase e 4-aminofenazona, respectivamente. Uma curva de calibração foi construída, conforme o Apêndice A-II.

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa (Cromatógrafo CG37). A coluna utilizada foi Carbowax-20-W sobre Chromosorb, sendo o nitrogênio o gás de arraste. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram respectivamente, 160°, 220° e 150°C.

Nessas condições, o tempo de retenção do etanol foi de 1,023 minutos (Figura 3.4). Antes de serem injetadas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e filtradas em membrana com 13 mm de diâmetro e poros de 0,2 µm (marca MFS). A curva de calibração construída encontra-se no Apêndice A-III.

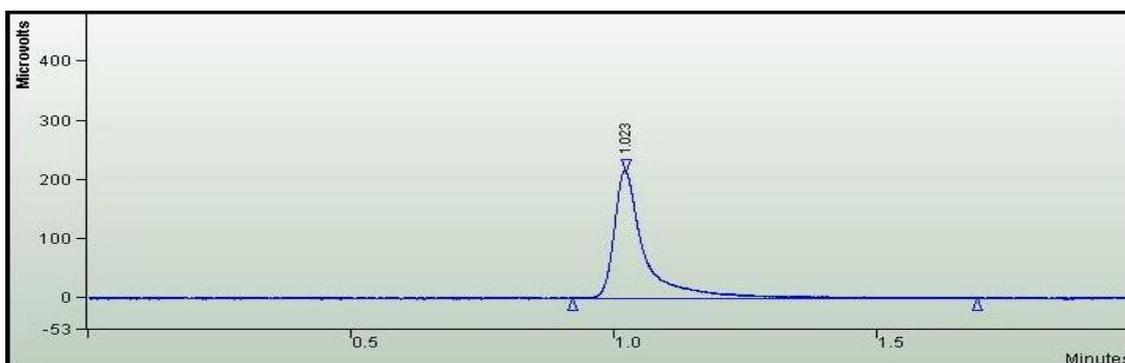


Figura 3.4: Cromatograma de uma amostra de etanol obtido por cromatografia gasosa.

3.8. Vazão Volumétrica

O fermentador foi alimentado através de uma bomba peristáltica instalada entre o medidor de vazão e o fermentador. A vazão foi conferida através de um sistema que contou com uma pipeta, um filtro de ar, mangueiras de silicone e conexões. Na extremidade superior da pipeta foi acoplado um filtro de ar e na extremidade inferior uma conexão tipo "Y" com uma saída ligada ao frasco com o meio de alimentação e a outra ligada ao reator (Figura 3.5 a.). Para determinar a vazão, a mangueira entre o frasco contendo o meio de alimentação e a pipeta foi interrompida (Figura 3.5 b.) e sem desligar a bomba peristáltica a variação do volume na pipeta foi acompanhada com um cronômetro.

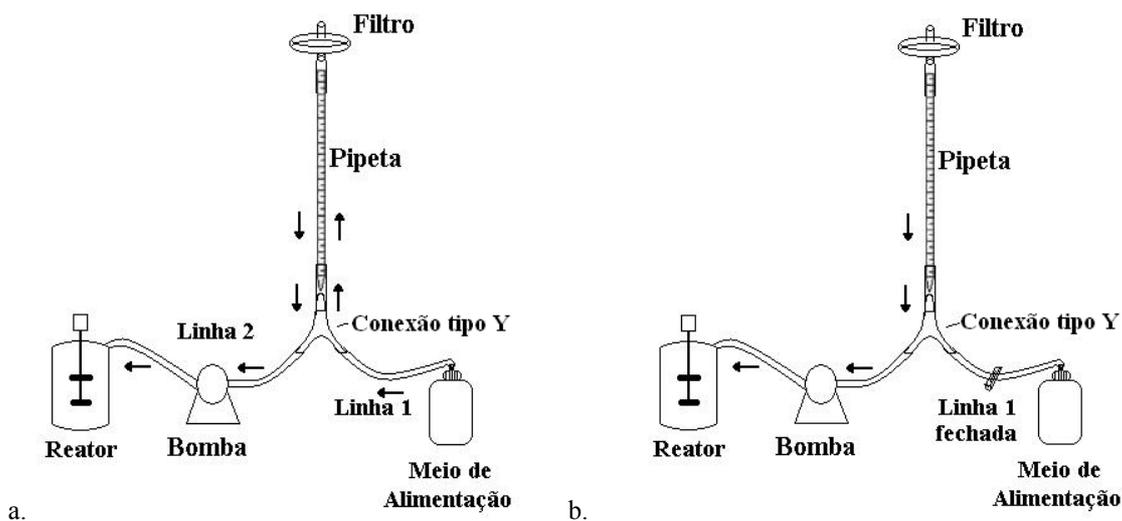


FIGURA 3.5: Sistema para medição da vazão volumétrica: a. Processo de enchimento das mangueiras das linhas 1 e 2 e da pipeta; b. Medição da vazão, com a mangueira da linha 1 fechada.

3.9. Controle de Contaminação

Foram realizados ensaios de controle de contaminação através de plaqueamento em meio sólido AN (Ágar Nutritivo - 10 g.L⁻¹ de Peptona, 3 g.L⁻¹ de Extrato de Carne, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 15 g.L⁻¹ de agar e pH entre 6,9 e 7,1). Para avaliar a

presença de contaminantes, a amostra em estudo era inoculada em meio sólido AN e mantida por 48 horas a 33 °C. A bactéria *Zymomonas mobilis* não cresce neste meio. Testes de contaminação foram realizados em todas as fermentações.

3.10 Eletroforese

As análises das proteínas expressas foram feitas em Gel de Eletroforese Desnaturante de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), em corridas a 100V por 1h e meia em cuba Bio-Rad (modelo Mini-Protean® 3 Cell). Foram empregados géis de corrida para separação das proteínas por massa molecular contendo 12% m/v de poliacrilamida, assim como géis de concentração com 5% m/v de poliacrilamida.

A quantificação e determinação da massa molecular de cada proteína expressa foi feita empregando padrão All Blue (Bio-Rad), contendo as bandas de 10, 15, 20, 25, 37 50, 75, 100, 150 e 250 KDa, que engloba os tamanhos de todas as enzimas envolvidas na Rota de Entner-Duoduroff. Foram aplicadas 10g/L de proteína do extrato total de cada amostra empregando tampão de amostra, após aquecimento da mistura por 10min a 95°C. As proteínas retidas nos géis foram coradas com solução Corante I, durante 15 horas sob agitação branda. Após, os géis foram submetidos à solução Descorante, por 5 horas. Os cuidados que se deve ter com os reagentes e a preparação das soluções encontram-se no Apêndice A-IV.

3.10.1. Determinação da Concentração de Proteínas

O volume de amostra utilizado foi determinado pela quantidade de proteína obtida, desta forma para a quantificação de proteína utilizou-se o método de BRADFORD (1976). As amostras retiradas durante as fermentações, foram

centrifugadas e os sobrenadantes removidos, as células foram ressuspensas em água por três vezes e posteriormente postas em contato com solução de CTAB (Brometo de Hexadecil – N,N,N – Trimetilamônio) (0,04g/g de células) por 45 minutos em agitação de 250 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado e utilizado na determinação da concentração de proteínas.

A metodologia de Bradford emprega uma solução corante de azul brilhante de Coomassie G, para complexar as proteínas. A solução corante é preparada dissolvendo 100 mg de azul brilhante de Coomassie G (Sigma) em 50 mL de etanol a 95%, sob vigorosa agitação e misturando-se, em seguida, com 100 mL de ácido fosfórico a 85%. A mistura resultante é diluída com água para 1L de solução e filtrada para remoção de corante não dissolvido. A solução assim preparada é estável por 1 (um) mês, no entanto, quando se observa uma precipitação do corante, a solução deve ser filtrada novamente e o procedimento deve ser repetido (READ e NORTHCOTE, 1981). Uma curva de calibração foi feita e utilizou-se BSA como padrão (Apêndice A–V).

3.11 Programas Utilizados

Utilizou-se para a geração dos diagramas de bifurcação, o software de código livre AUTO 97 (DOEDEL *et al.*, 1997), obtido na internet (<ftp://ftp.cs.concordia.ca/pub/doedel.auto.auto.tar.Z>) - para células(X), substrato (S) e produto (P). Também foram empregados, para realizar as simulações do sistema, softwares como Maple 7 e Matlab 6.5.

Capítulo 4 - Resultados e Discussões

4.1 Diagramas de Bifurcação

Diagramas de bifurcação são gráficos resultantes de um estudo paramétrico de um modelo representativo de um sistema. Estes gráficos apresentam o comportamento dinâmico em função de um parâmetro de operação também chamado de parâmetro de continuação.

Os diagramas de bifurcação permitem avaliar a influência dos parâmetros de operação, como por exemplo, taxa de diluição, sobre as soluções previstas pelo modelo considerado.

Diagramas de bifurcação foram gerados e analisados com o objetivo de se determinar a taxa de diluição a ser utilizada nos experimentos e de se analisar os possíveis comportamentos dinâmicos antes da realização dos experimentos.

O modelo matemático de LI *et al.* (1997), que será investigado no Capítulo 5, foi utilizado nesta tese. Os parâmetros estimados pelos autores para o modelo (Tabela 4.1) variaram com o comportamento dinâmico observado experimentalmente.

Tabela 4.1: Parâmetros utilizados no modelo dinâmico em fermentações com *Zymomonas mobilis* (LI *et al.*, 1997).

Parâmetros	Condição		
	Estado Estacionário	Oscilação Amortecida	Oscilação Sustentada
μ_{\max}	0,41	0,41	0,41
P_{ob}	59	59	59
P_{ma}	217	217	217
P_{mb}	108	108	108
P_{me}	120	120	120
S_i	80	80	80
S_f	150	187	200
k_i	200	200	200
k_s	0,5	0,5	0,5
K_{mp}	0,2	0,2	0,2
a	0,6216	0,6216	0,3142
b	0,5516	0,5516	1,415
α	2,60	8,26	8,77
β	0,0767	0,0767	0,0366
λ	3,80	21,05	21,05
δ	7,80	0,8241	0,8241
$Y_{p/S}$	0,495	0,495	0,495
Q_{pmax}	4,20	3,150	2,613

Nas Figuras 4.1 – 4.3 são mostrados os diagramas de bifurcação da condição Estado Estacionário. É possível observar que existem sempre dois ramos de soluções. As linhas contínuas representam estabilidade e as linhas descontínuas, instabilidade. O ramo representado pela reta horizontal, que consiste nas soluções triviais onde ocorre arraste celular ($X = 0$ g/L, $S = S_f$ g/L e $P = 0$ g/L) e outro ramo que representa os estados estacionários não triviais.

Para a condição Estado Estacionário (Tabela 4.1), a taxa de diluição que limita a existência de um ou dois ramos de soluções é $D_{L1} = 0,272$ h⁻¹. Para taxas de diluição menores que D_{L1} o arraste celular é instável e o ramo de soluções não-triviais apresenta pelo menos uma solução estável. É possível observar nas Figuras 4.1 – 4.3, que numa faixa estreita de taxas de diluição, próxima a D_{L1} (antes e depois), há três soluções não triviais previstas, sendo duas estáveis e uma instável. Para taxas de

diluição maiores que D_{L1} , o arraste celular é estável, já que nestas condições a velocidade de retirada de células é maior que a velocidade de crescimento.

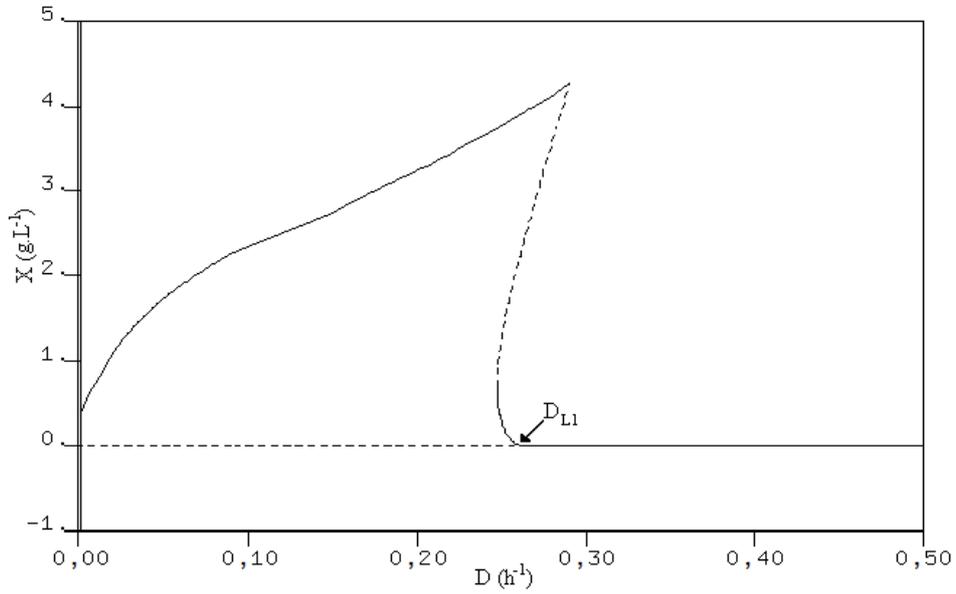


Figura 4.1: Diagrama de bifurcação (Condição Estado Estacionário) – X ($g.L^{-1}$)

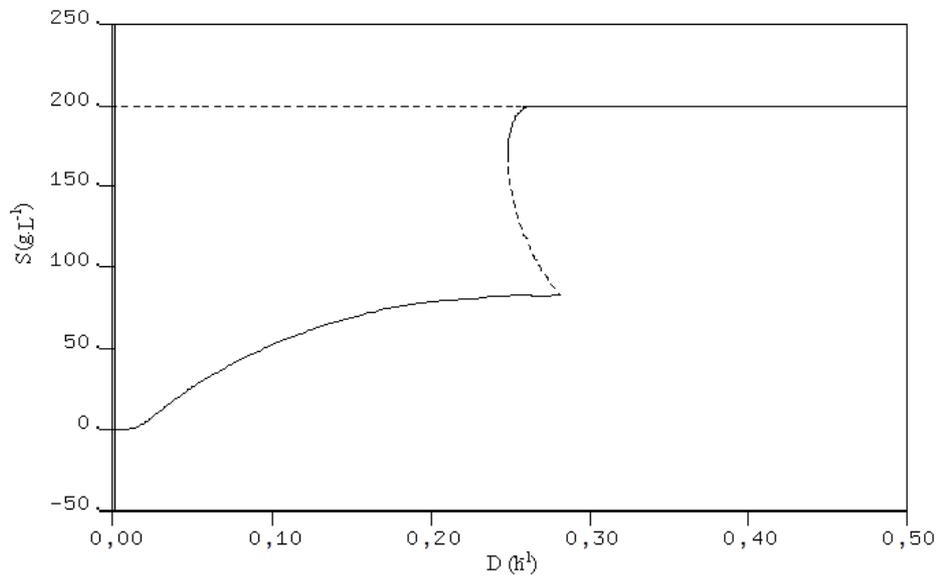


Figura 4.2: Diagrama de bifurcação (Condição Estado Estacionário) – S ($g.L^{-1}$)

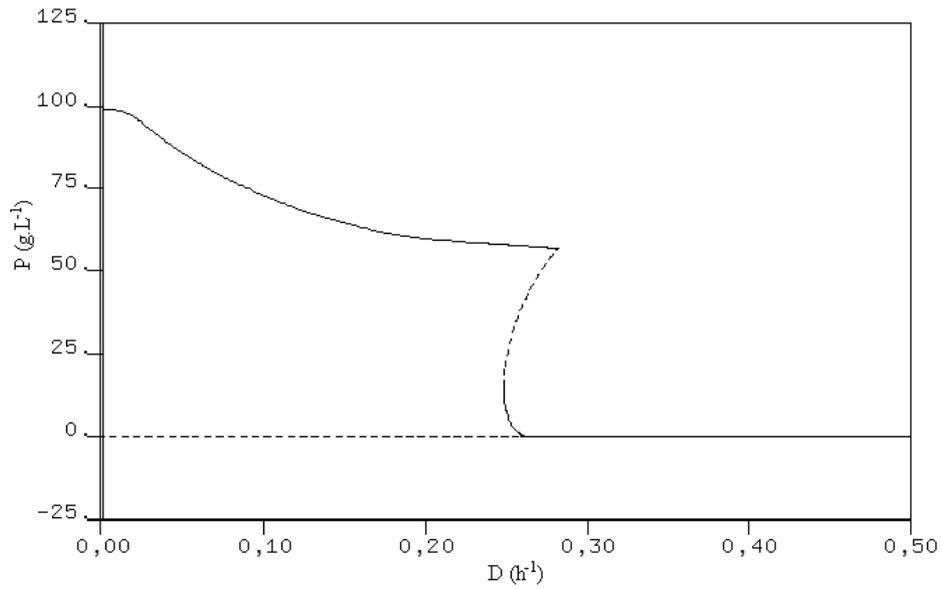


Figura 4.3: Diagrama de bifurcação (Condição Estado Estacionário) – P (g.L⁻¹)

Os diagramas de bifurcação obtidos com os parâmetros da condição Oscilação Amortecida (Tabela 4.1) apresentam os mesmos perfis de comportamentos observados nos diagramas obtidos com os parâmetros da condição Estado Estacionário (Figuras 4.4 - 4.6). A taxa de diluição que limita a existência de um ou dois ramos de soluções é $D_{L2}=0,211 \text{ h}^{-1}$.

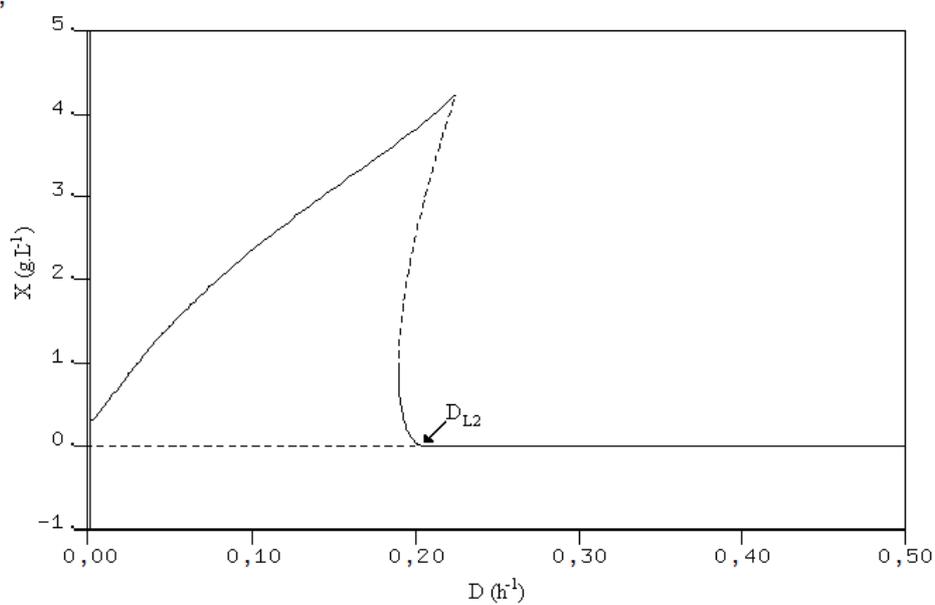


Figura 4.4: Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Amortecida) – X (g.L⁻¹)

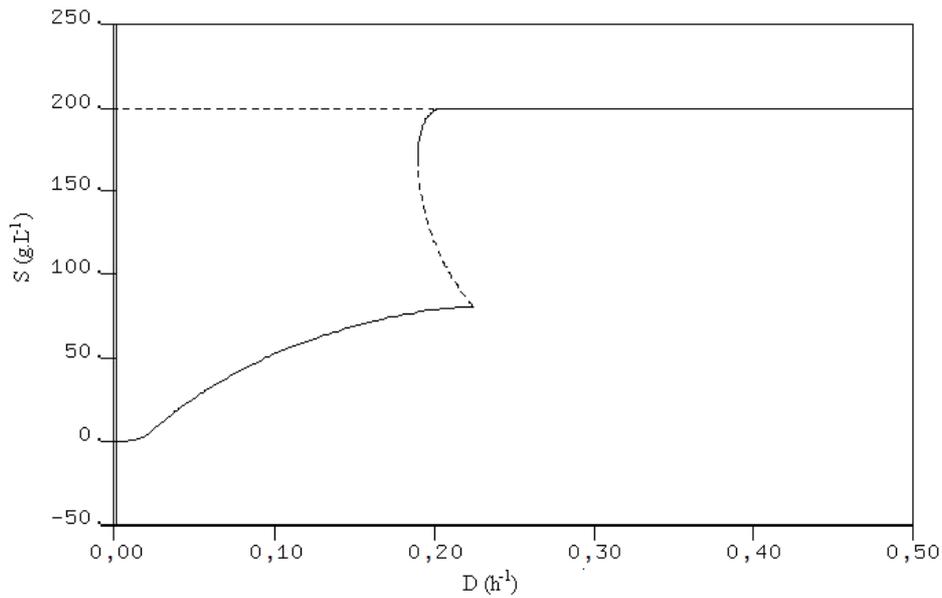


Figura 4.5: Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Amortecida) – S (g.L⁻¹)

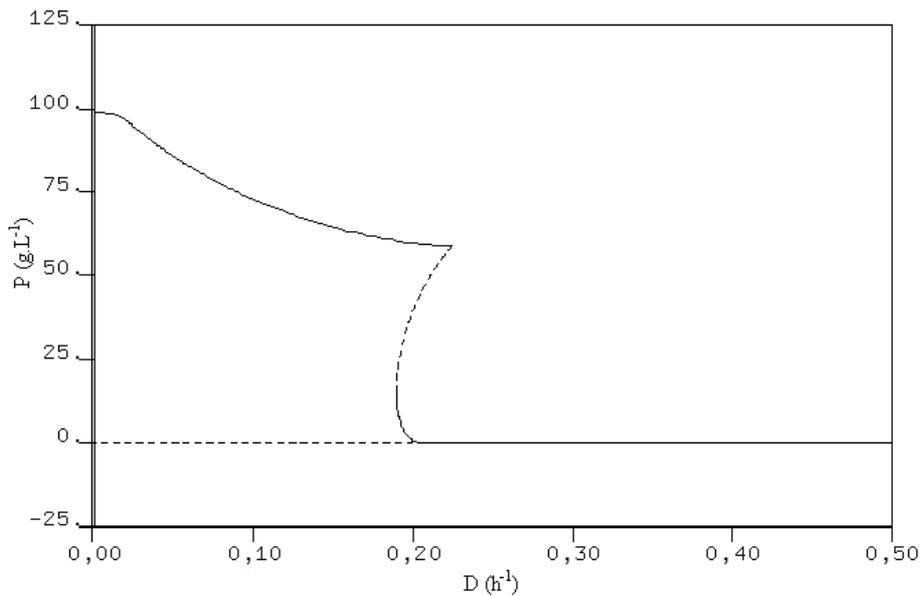


Figura 4.6: Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Amortecida) – P (g.L⁻¹)

Observa-se ainda que o valor de D_{L2} é menor do que o valor de D_{L1} , este fato pode ser explicado uma vez que o aumento da concentração de substrato na alimentação da condição Estado Estacionário, para a condição de Oscilação Amortecida, implica em uma maior inibição por etanol e glicose e conseqüentemente, menor valor de taxa de diluição a partir da qual ocorre a lavagem do biorreator (D_L).

Os diagramas de bifurcação obtidos com a condição oscilação sustentada (Tabela 4.1) apresentam pontos de bifurcação de Hopf, a partir dos quais surgem soluções oscilatórias (Figuras 4.7 – 4.9). O ponto 1 ($D = 0,1115 \text{ h}^{-1}$), é chamado, particularmente, de ponto de Hopf supercrítico, pois há uma perda de estabilidade da solução sendo acompanhada pelo aparecimento de oscilações com amplitudes pequenas.

Entre os pontos 1 e 2, que corresponde a duas condições de operação, são previstas soluções periódicas estáveis. A bifurcação que ocorre no ponto 2 ($D = 0,0423 \text{ h}^{-1}$) é classificada de bifurcação de Hopf subcrítica, caracterizada pelo aparecimento de oscilação de amplitudes grandes (CAMÊLO, 2004). Os pontos 3 e 4 representam bifurcação de dobra no ciclo limite. Eles correspondem à taxa de diluição na qual a solução periódica muda de estabilidade. Para taxas de diluição entre $0,0423 \text{ h}^{-1}$ e $0,0357 \text{ h}^{-1}$ (pontos 2 e 3) coexistem soluções periódicas estáveis e instáveis. Para taxas de diluição menores que $0,0357$ (ponto 3) o modelo prevê estados estacionários (CAMÊLO, 2004).

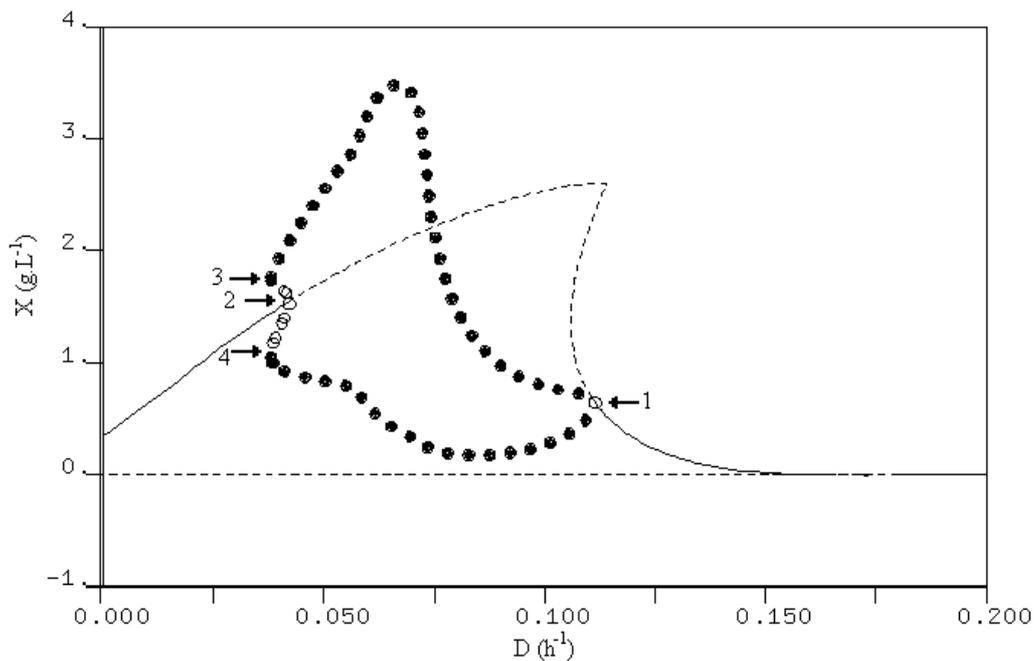


Figura 4.7: Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Sustentada) – $X \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$

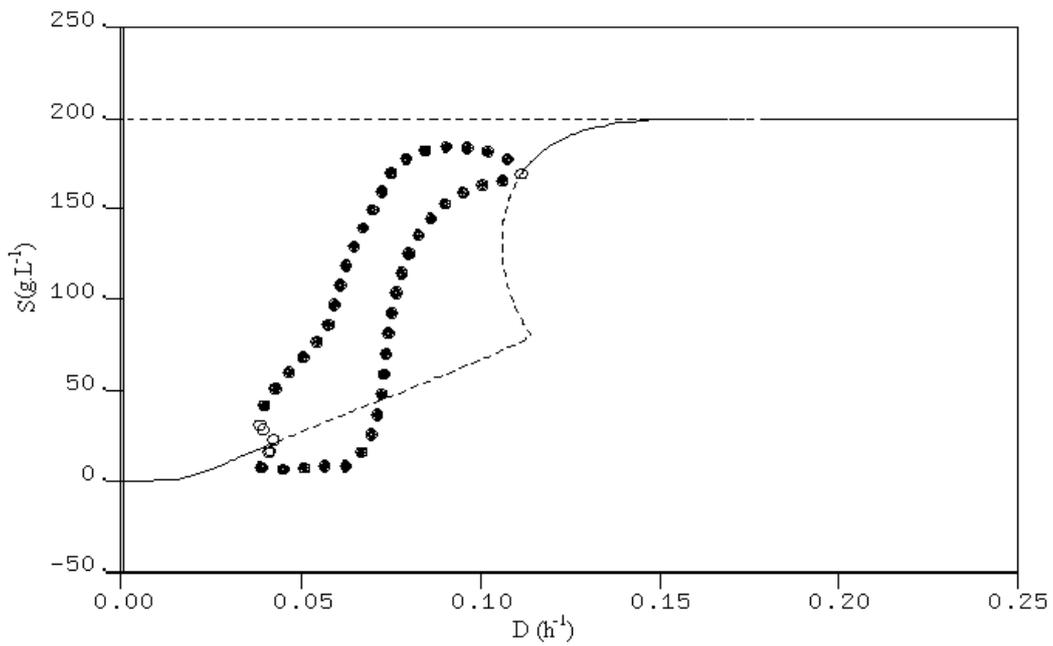


Figura 4.8: Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Sustentada) – S (g.L⁻¹).

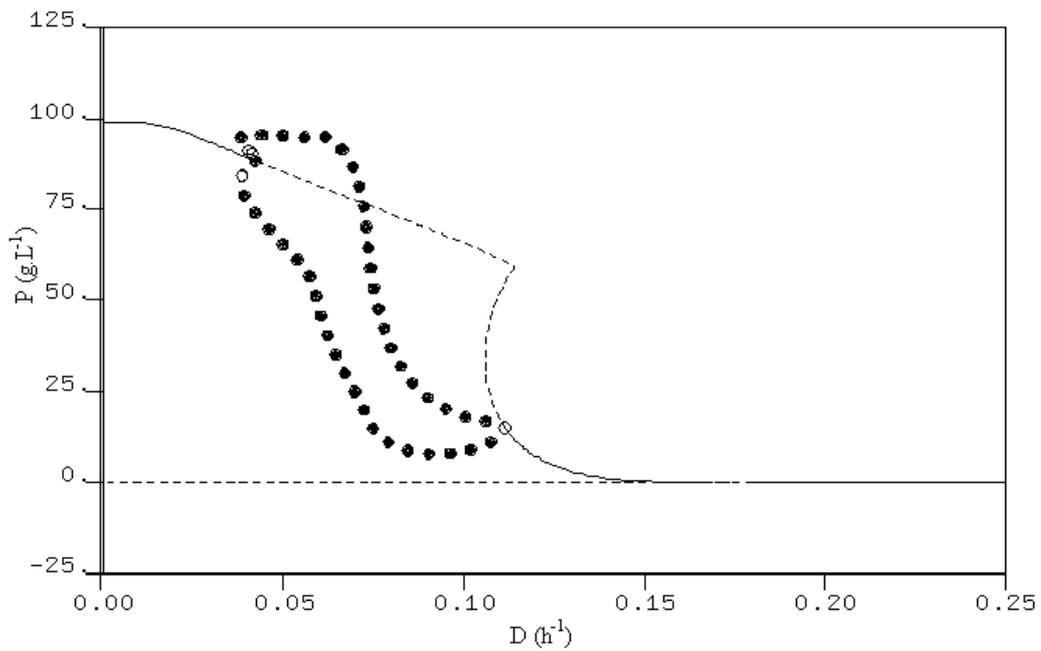


Figura 4.9: Diagrama de bifurcação (Condição Oscilação Sustentada) – P (g.L⁻¹).

Desta forma, o valor da taxa de diluição (D) escolhido foi de $0,06h^{-1}$, onde estados estacionários e oscilações podem ser atingidos. Com este valor de taxa de diluição, variou-se apenas a concentração do meio reacional (S_o) e de alimentação (S_F).

4.2 Resultados Experimentais

4.2.1 Fermentações Descontínuas

Inicialmente, foram realizadas fermentações descontínuas em duplicata, denominadas FD01 e FD02, com o intuito de se verificar o comportamento dinâmico das fermentações com a bactéria *Zymomonas mobilis*, de acordo com a metodologia apresentada no Capítulo 3.

Na Figura 4.10 apresentam-se as curvas de concentrações de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FD01, acompanhada por 27 horas. A concentração inicial de glicose do meio utilizada nas fermentações FD01 e FD02 foi de 200 g.L^{-1} .

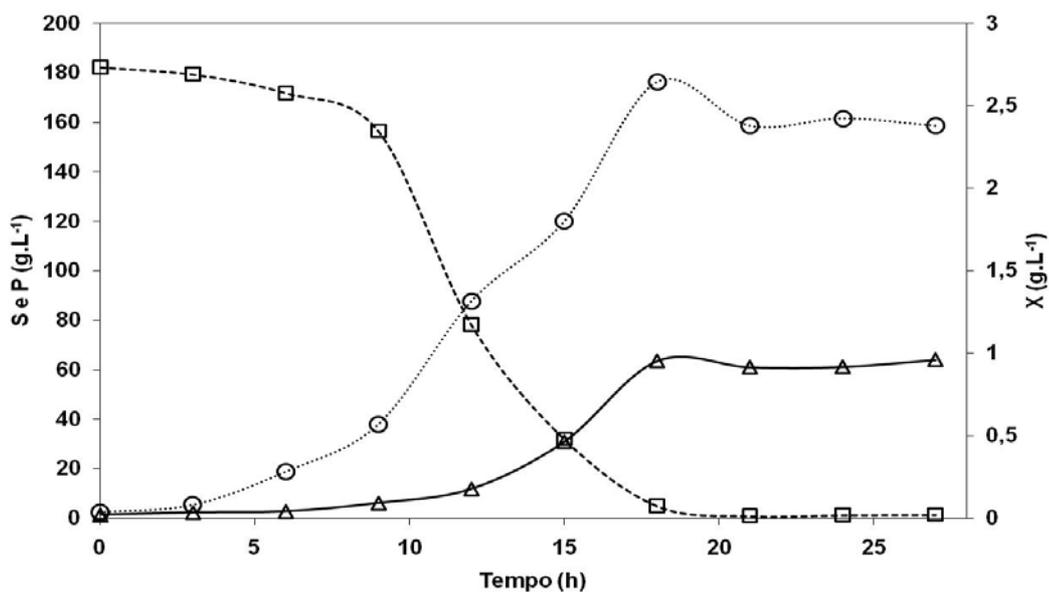


FIGURA 4.10: Fermentação Descontínua (FD01) – (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T - 30 °C, Agitação - 150 rpm, $S_0 = 200 \text{ g.L}^{-1}$, pH - 5,0.

Conforme alguns trabalhos (CAMÊLO, 2004, LI *et al.*, 1997), em fermentações contínuas com concentração de glicose no meio de 200 g.L^{-1} , há ocorrência de oscilações, mas nem sempre a adaptação da célula a esta concentração

ocorre de forma favorável, sendo necessária repicagem de células em gradativas concentrações do meio. Como todas as fermentações contínuas realizadas nesta tese foram iniciadas após a observação da fase estacionária da concentração de células (X) ter sido atingido numa fermentação em batelada, adotou-se esta concentração para a realização das fermentações FD01 e FD02 e assim foi possível visualizar a adaptação das células nestas condições. Todas as concentrações iniciais apresentadas nas fermentações a seguir são nominais, ou seja, os valores que se desejou obter durante o preparo do meio.

As taxas específicas de crescimento celular de todas as fermentações foram obtidas através da determinação do coeficiente angular da reta ajustada à curva $\ln X/X_0$ versus tempo (Figura 4.11). A taxa específica de crescimento celular da fermentação FD01 foi de $0,306 \text{ h}^{-1}$, taxa esta que se apresenta superior às taxas obtidas ($0,260 \text{ h}^{-1}$ e $0,116 \text{ h}^{-1}$) por PINHEIRO (2001) e CAMÊLO (2004), como *Zymomonas mobilis* CP4 e Ag11 em glicose a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

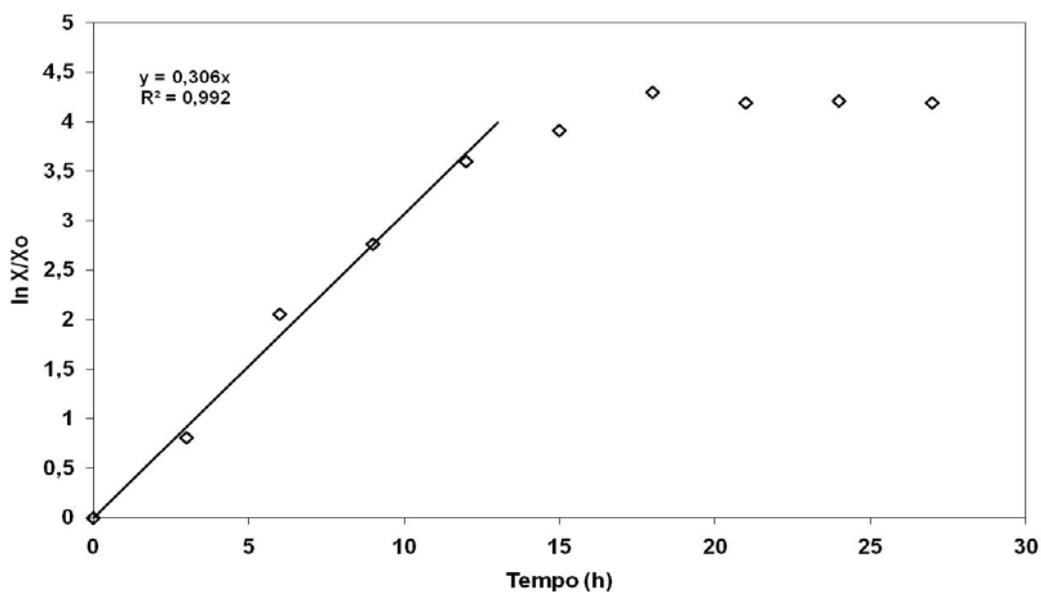


FIGURA 4.11: Determinação da taxa específica de crescimento celular (Fermentação FD01).

A fermentação FD02 foi realizada nas mesmas condições operacionais da FD01, tendo sido obtida a taxa específica de crescimento celular de $0,309 \text{ h}^{-1}$, valor este compatível com o obtido na fermentação FD01 e mostra que a bactéria estava bem adaptada ao meio formulado (Figura 4.12).

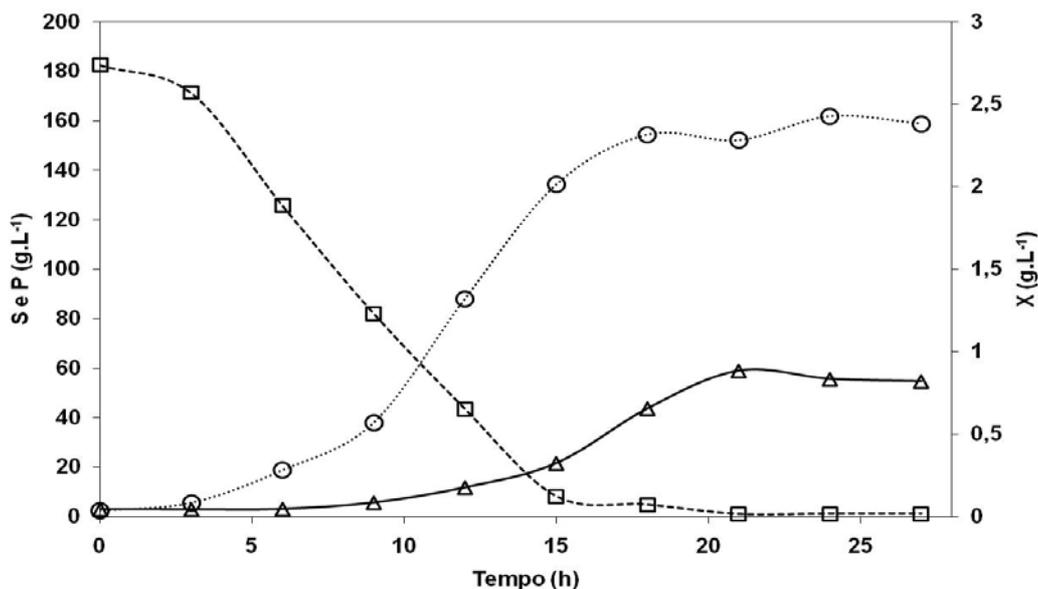


FIGURA 4.12 – Fermentação Descontínua (FD02) – (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T = 30 °C, Agitação = 150 rpm, So = 200 g.L⁻¹, pH = 5,0.

Nas fermentações FD01 e FD02 foram observadas fases estacionárias similares das concentrações de células (X), glicose (S) e etanol (P), a partir de 18 horas de fermentação.

Apesar da similaridade das concentrações observa-se que os perfis de glicose são bem distintos, uma vez que após 9 horas de fermentação 33,2% de glicose já havia sido consumido na fermentação FD02, enquanto que na fermentação FD01 apenas 14,2%. Esta diferença de 19% de consumo de glicose na FD02, é diminuída após 15 horas, onde o consumo de glicose era de 82,5% para FD01 e de 95,5% para FD02. Após 18 horas a diferença das concentrações de glicose era mínima.

Na Tabela 4.2 estão reunidas os valores dos coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ e das taxas específicas de crescimento celular. Os rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ e as produtividades volumétricas de todas das fermentações foram calculados, conforme descrito no APÊNDICE A-IV. Os dados experimentais das fermentações FD01 e FD02 encontram-se no Apêndice B – I e B-II, respectivamente.

Tabela 4.2: Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FD01 e FD02

Ferm	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
FD01	0,015	0,350	0,306
FD02	0,013	0,309	0,309

4.2.2 Fermentações Contínuas

As fermentações contínuas foram realizadas com o objetivo de se observar possíveis comportamentos dinâmicos, diante de condições diversas, como concentração de glicose no meio de crescimento (S) e de alimentação (S_F) e adição de etanol (P_{ad}), para análise do efeito de tais condições nas proteínas da bactéria *Zymomonas mobilis*.

Em todas as fermentações realizadas a taxa de diluição utilizada foi de 0,06 h⁻¹, cuja vazão foi de 1 mL.min⁻¹, como já estabelecido no item 4.1 desta tese.

4.2.2.1 Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento de 100 g.L⁻¹ de glicose e S_F variável

Foram realizadas fermentações contínuas, cujas condições operacionais encontram-se na Tabela 4.3. A concentração de glicose no meio de crescimento (S_o) utilizado em cada fermentação foi de 100 g.L⁻¹ e no meio de crescimento na alimentação (S_F) foram de 100 g.L⁻¹ e 200 g.L⁻¹ de glicose, respectivamente.

TABELA 4.3: Condições operacionais da Fermentação Contínua 01 (FC01) e 02 (FC02)

Fermentações	Tempo (h)	D (h ⁻¹)	S ₀ (g.L ⁻¹)	S _F (g.L ⁻¹)	Modo de Operação
FC01	0,00 -- 18,00	0,00	100	0	Batelada
	18,00 – 81,00	0,06	-	100	Contínuo
FC02	0,00 – 22,00	0,00	100	0	Batelada
	22,00 –99,00	0,06	-	200	Contínuo

A fermentação FC01 transcorreu como batelada por 18 horas, quando foi iniciada a alimentação contínua do meio (100 g.L⁻¹ de glicose, D = 0,06 h⁻¹). O tempo de residência foi de 16,7 horas. A fermentação contínua foi conduzida por 63 horas totalizando 3,8 tempos de residência. O comportamento dinâmico observado das concentrações de células (X), glicose (S) e etanol (P) foi de estado estacionário, conforme a Figura 4.13. Observou-se ainda que a taxa de diluição estava baixa, o tempo de residência está alto e a glicose foi praticamente toda consumida.

Observa-se ainda na Figura 4.13 que uma vez iniciada a etapa contínua do processo, levou-se um tempo (tempo transiente) de aproximadamente 21 horas para que o estado estacionário fosse atingido.

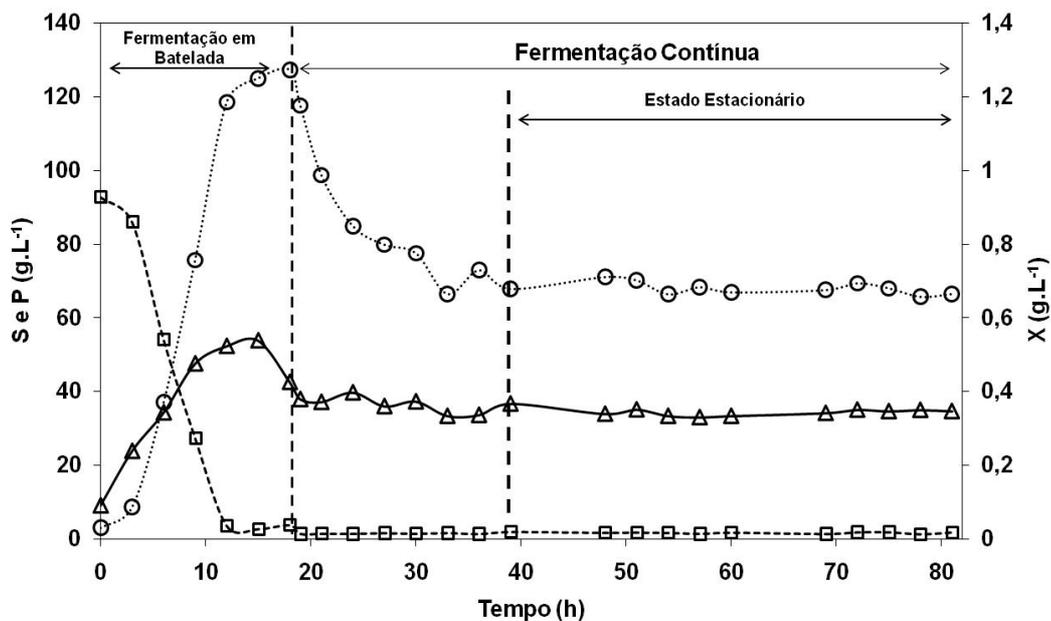


FIGURA 4.13 – Fermentação Contínua (FC01) – (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T = 30 °C, Agitação = 150 rpm, pH = 5,0, S₀ = 100 g.L⁻¹, S_F = 100 g.L⁻¹, D = 0,06 h⁻¹, \bar{X}_{EE} = 0,68 g.L⁻¹, \bar{S}_{EE} = 1,58 g.L⁻¹, \bar{P}_{EE} = 34,45.

Realizou-se a fermentação FC02, que transcorreu como batelada por 22 horas e foi iniciada a alimentação contínua do meio (200 g.L⁻¹ de glicose, D = 0,06 h⁻¹) (Figura 4.14).

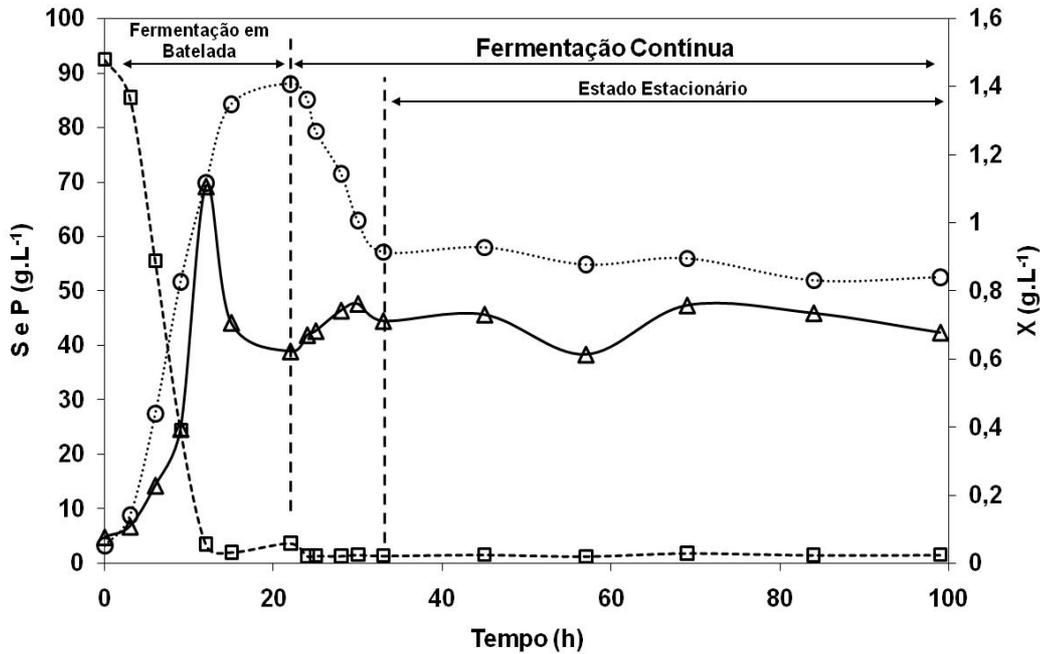


FIGURA 4.14: Fermentação Contínua (FC02) – (●) Células (X), (□) Glicose (S), (▲) Etanol (P), T = 30 °C, Agitação = 150 rpm, pH = 5,0, S₀ = 100 g.L⁻¹, S_F = 200 g.L⁻¹, D = 0,06 h⁻¹, \bar{X}_{EE} = 0,88 g.L⁻¹, \bar{S}_{EE} = 1,50 g.L⁻¹, \bar{P}_{EE} = 44,10.

A fermentação contínua foi conduzida por 77 horas totalizando 4,6 tempos de residência. Como observado na fermentação FC01, após o início da alimentação, levou-se um tempo (tempo transiente) de aproximadamente 11 horas (tempo mais curto), para que o estado estacionário fosse atingido. O comportamento dinâmico observado das concentrações de células (X), glicose (S) e etanol (P) foi de estado estacionário conforme a Figura 4.14. As produtividades volumétricas de etanol obtidas nas fermentações FC01 e FC02 foram de 2,202 g.L⁻¹.h⁻¹ e 2,670 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Os coeficiente, Y_{X/S} e Y_{P/S} foram calculados para etapa de batelada e contínua, e encontram-se na Tabela 4.4 juntamente com a taxa específica de

crescimento celular obtida (etapa de batelada). Os dados experimentais das fermentações FC01 e FC02 encontram-se no Apêndice B – III e B-IV, respectivamente.

TABELA 4.4: Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC01 e FC02.

Ferm	$\mu_{\text{bat}} (\text{h}^{-1})$	Batelada		Contínua	
		$Y_{X/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_{P/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_{X/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_{P/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
FC01	0,299	0,014	0,497	$6,907 (\pm 0,175)\cdot 10^{-3}$	$3,500 (\pm 0,110)\cdot 10^{-1}$
FC02	0,288	0,014	0,384	$4,437 (\pm 0,198)\cdot 10^{-3}$	$2,219 (\pm 0,165)\cdot 10^{-1}$

Com a mudança da concentração de glicose no meio de alimentação (S_F) para $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ na fermentação FC02, observou-se um aumento tanto na concentração celular quanto na concentração de etanol na etapa contínua e uma diminuição do valor dos coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$. A concentração de etanol no estado estacionário da fermentação contínua FC02 era de $44,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ enquanto que na fermentação FC01 era de $34,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O valor mais elevado em FC02 pode ter causado inibição no sistema (uma vez que a concentração de etanol encontra-se numa faixa que ocorrência de inibição é bem representativa, conforme ROGERS *et al.* (1980), assim justificando a diminuição dos coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$). Este efeito é confirmado ainda com os dados do início da fermentação contínua, onde a concentração de etanol em FC01 era de $42,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e FC02 de $38,94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, e pelo fato da concentração em FC02 ser inferior, ao ser alimentado o processo, houve crescimento celular e aumento da produção de etanol.

4.2.2.2 Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e S_F variável

Novas fermentações contínuas foram realizadas, cujas condições operacionais podem ser observadas na Tabela 4.5. O meio de crescimento (S_0) utilizado em cada fermentação foi de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e o meio de alimentação (S_F) de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose.

TABELA 4.5: Condições operacionais para Fermentação Contínua 03 (FC03) e 04 (FC04)

Fermentações	Tempo (h)	D (h ⁻¹)	S ₀ (g.L ⁻¹)	S _F (g.L ⁻¹)	Modo de Operação
FC03	0,00 -- 16,00	0,00	150	0	Batelada
	16,00 – 71,00	0,06	-	150	Contínuo
FC04	0,00 – 24,00	0,00	150	0	Batelada
	24,00 – 95,00	0,06	-	200	Contínuo

A fermentação FC03 transcorreu como batelada por 16 horas. A fermentação contínua foi mantida por 55 horas totalizando 3,3 tempos de residência (150 g.L⁻¹ de glicose, D = 0,06 h⁻¹). O comportamento dinâmico observado da concentração de células (X), glicose (S) e etanol (P) foi de estado estacionário conforme a Figura 4.15.

Observa-se na Figura 4.15, que uma vez iniciada a etapa contínua do processo, um tempo transiente de aproximadamente 13 horas existiu para que o estado estacionário fosse atingido, fato este também observado nas fermentações FC01 e FC02.

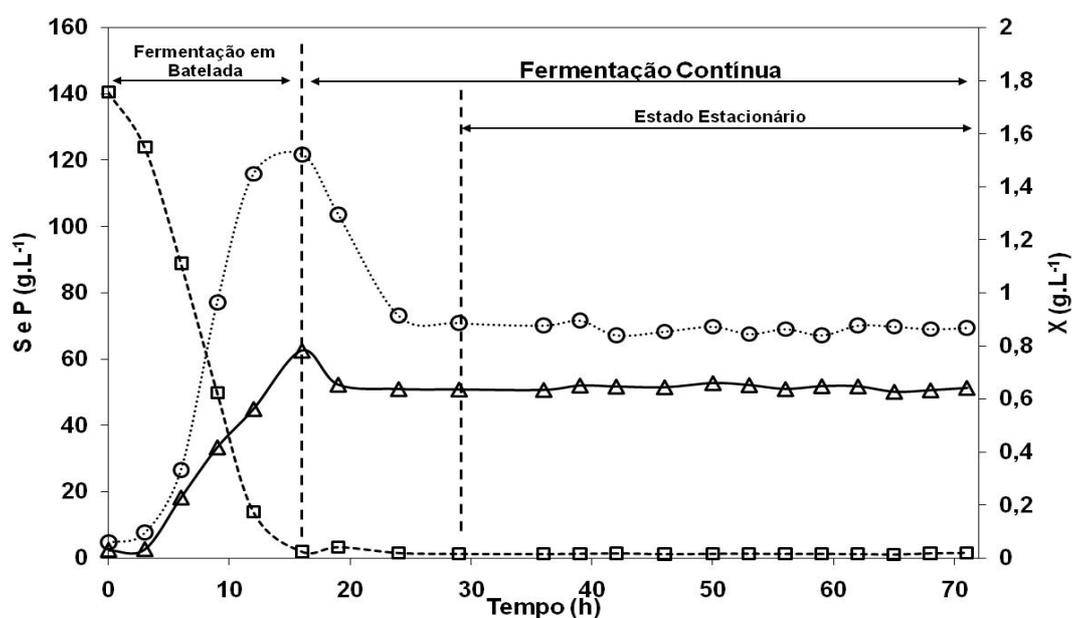


FIGURA 4.15: Fermentação Contínua (FC03) – (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T = 30 °C, Agitação = 150 rpm, pH = 5,0, S₀ = 150 g.L⁻¹, S_F = 150 g.L⁻¹, D = 0,06 h⁻¹, \bar{X}_{EE} = 0,87 g.L⁻¹, \bar{S}_{EE} = 1,44 g.L⁻¹, \bar{P}_{EE} = 51,46.

A fermentação FC04 transcorreu como batelada por 24 horas e a fermentação contínua (200 g.L^{-1} de glicose, $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$) por 71 horas totalizando 4,3 tempos de residência. O comportamento dinâmico observado da concentração de células, glicose e etanol foi de estado estacionário conforme a Figura 4.16.

Observa-se na Figura 4.16, que uma vez iniciada a etapa contínua do processo, um tempo transiente de aproximadamente 14 horas existiu para que o estado estacionário fosse atingido. As produtividades volumétricas de etanol obtidas nas fermentações FC03 e FC04 foram de $3,170 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $3,462 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Os rendimentos, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ foram calculados para etapa de batelada e contínua, e encontram-se na Tabela 4.6 juntamente com a taxa específica de crescimento celular obtida (etapa de batelada).

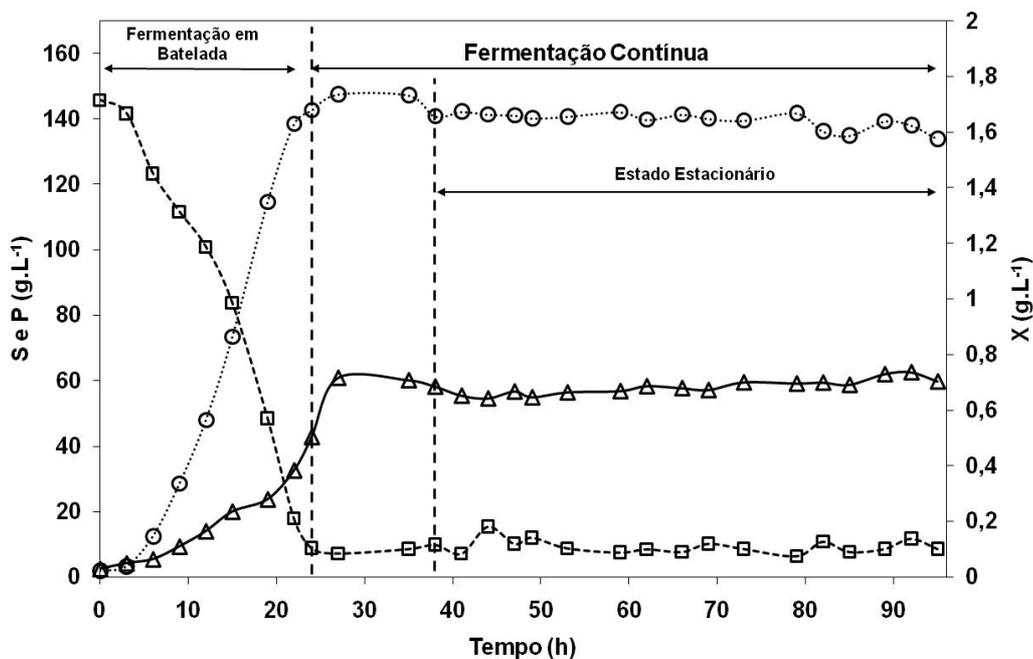


FIGURA 4.16: Fermentação Contínua (FC04) – (●) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Agitação – 150 rpm, $\text{pH} = 5,0$, $S_0 = 150 \text{ g.L}^{-1}$, $S_F = 200 \text{ g.L}^{-1}$, $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$, $\bar{X}_{EE} = 1,64 \text{ g.L}^{-1}$, $\bar{S}_{EE} = 9,28 \text{ g.L}^{-1}$, $\bar{P}_{EE} = 58,07$.

TABELA 4.6: Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC03 e FC04.

Ferm	$\mu_{\text{bat}} (\text{h}^{-1})$	Batelada		Contínua	
		$Y_{X/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_{P/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_{X/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_{P/S} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
FC03	0,281	0,011	0,336	$5,852 (\pm 0,115)*10^{-3}$	$3,464 (\pm 0,051)*10^{-1}$
FC04	0,263	0,013	0,235	$8,612 (\pm 0,192)*10^{-3}$	$3,045 (\pm 0,113)*10^{-1}$

Com a mudança da concentração de glicose no meio de alimentação (S_F) para $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, observou-se na fermentação FC04 um aumento tanto na concentração celular quanto na concentração de etanol na etapa contínua e uma diminuição dos valores dos rendimentos $Y_{P/S}$. Este fato também foi observado na fermentação FC02.

Analisando ainda as fermentações FC01-FC04, observou-se que na fermentação FC04 houve um aumento considerável da concentração de glicose no estado estacionário ($\bar{S}_{EE} = 9,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Fato bastante interessante, uma vez que no início da fermentação contínua a concentração de glicose era de $8,712 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, desta forma este resultado confirma a justificativa dada para a redução dos coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$. Os dados experimentais das fermentações FC03 e FC04 encontram-se no Apêndice B–V e B–VI, respectivamente.

Ratificando o que foi observado nos diagramas de bifurcação – que previam apenas estados estacionários nas condições adotadas neste item - não foi obtido comportamento oscilatório. Decidiu-se então utilizar o meio de crescimento (S_0) com a concentração de glicose em $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ na etapa de batelada e contínua, concentração esta utilizada em alguns trabalhos na literatura onde oscilações sustentadas e amortecidas foram obtidas e que pelos diagramas de bifurcação oscilações também seriam obtidas. (GHOMMIDH *et al.*, 1989, BRUCE *et al.* 1991, LI *et al.*, 1997, CAMÊLO, 2004).

Observa-se que a escolha da taxa de diluição de $0,06 \text{ h}^{-1}$, que corresponde a um tempo de residência de 16,7 horas, leva o sistema contínuo a tender para uma batelada. Nesta situação a célula reduz a sua taxa específica de crescimento e é razoável que taxa de consumo de substrato também diminua, daí o acúmulo de glicose no meio (oferta maior do que a demanda). Este acúmulo por outro lado, poderia induzir a formação de solutos compatíveis, como glicerol (intermediário da via de *Entner-Doudoroff*) ou sorbitol (produzido após isomerização da glicose a frutose e posterior redução ao poliol). Estes solutos compatíveis poderiam também sinalizar para a retomada do processo de produção de etanol.

4.2.2.3. Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento (S_0) de 200 g.L^{-1} de glicose e S_F variável.

Na Tabela 4.7 encontram-se as condições operacionais utilizadas nas fermentações FC05, FC06 e FC07. O meio de crescimento (S_0) utilizado em cada fermentação foi de 200 g.L^{-1} de glicose e o meio de alimentação (S_F) foi de 200 g.L^{-1} para FC05 e FC06 e 200 e 300 g.L^{-1} de glicose para FC07. É importante citar neste caso que a fermentação FC06 foi realizada para confirmação e reprodutibilidade do processo uma vez que oscilação foi observada na FC05.

TABELA 4.7: Condições operacionais para Fermentação Contínua 05 (FC05), 06 (FC06) e 07 (FC07)

Fermentações	Tempo (h)	D (h^{-1})	S_0 (g.L^{-1})	S_F (g.L^{-1})	Modo de Operação
FC05	0,00 – 36,50	0,00	200	0	Batelada
	36,50 – 104,50	0,06	-	200	Contínuo
FC06	0,00 – 37,00	0,00	200	0	Batelada
	37,00 – 94,00	0,06	-	200	Contínuo
FC07	0,00 – 63,00	0,00	200	0	Batelada
	63,00 – 124,00	0,06	-	200	Contínuo
	124,00 – 147,00	0,06	-	300	Contínuo

A fermentação FC05 transcorreu como batelada por 36,5 horas e como contínua por 68 horas (200 g.L^{-1} de glicose, $D = 0,06 \text{ g.L}^{-1}$), totalizando 4,1 tempos de residência. O comportamento dinâmico observado da concentração de células (X), glicose

(S) e etanol (P) foi de oscilação conforme mostra a Figura 4.17. Gráficos da concentração de células (X) e glicose (S) versus P foram gerados e observou-se a variação da concentração de células e glicose juntamente com a concentração de etanol Figura 4.18.

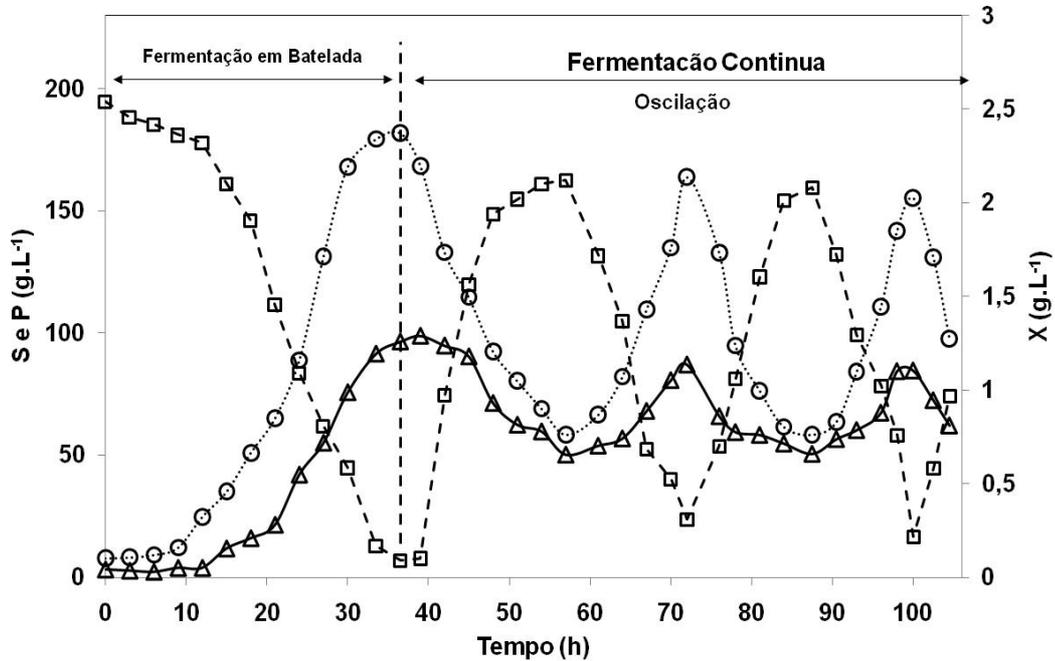


FIGURA 4.17: Fermentação Contínua (FC05) – (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S₀ – 200 g.L⁻¹, S_F – 200 g.L⁻¹, D = 0,06 h⁻¹.

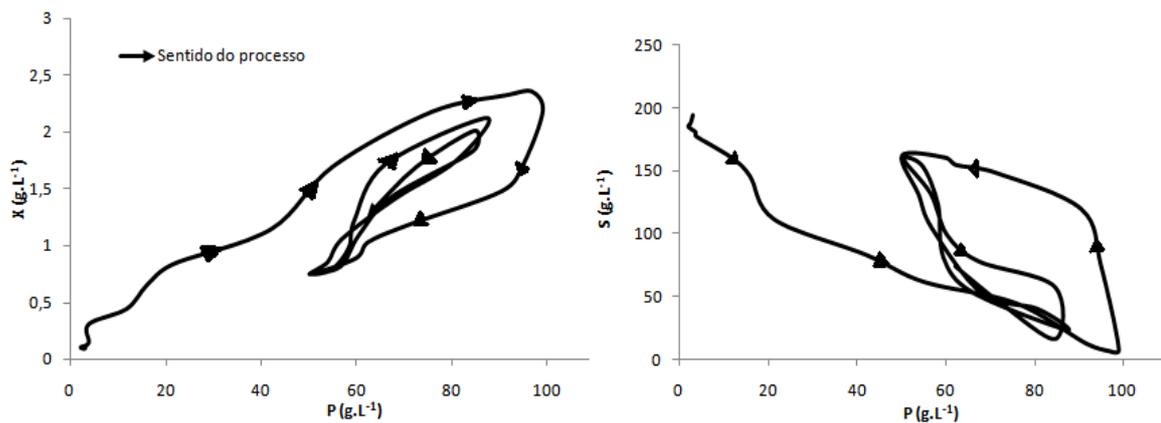


Figura 4.18: Demonstração do comportamento da concentração de células e glicose versus etanol.

Analisando a faixa onde há oscilação (Figura 4.17), é observado que com o passar do tempo há uma suave diminuição da amplitude da concentração de células e etanol e do período da oscilação das três variáveis analisadas (X, S e P). Tal

comportamento indica que o estado estacionário poderia eventualmente ser atingido caso o processo fosse mantido por mais tempo, possibilitando assim a suposição de que se trata de uma oscilação amortecida.

A fermentação FC06 transcorreu como batelada por 37 horas e contínua por 57 horas totalizando 3,4 tempos de residência (200 g.L^{-1} de glicose, $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$). O comportamento dinâmico observado da concentração de células (X), glicose (S) e etanol (P) foi de oscilação conforme a Figura 4.19. Tal fermentação representa bem a reprodutibilidade do ponto de vista qualitativo do processo, uma vez que quantitativamente há diferenças significativas. Foi possível observar que também nesta fermentação a concentração de etanol apresentou-se num valor bastante elevado quando iniciada a fermentação contínua.

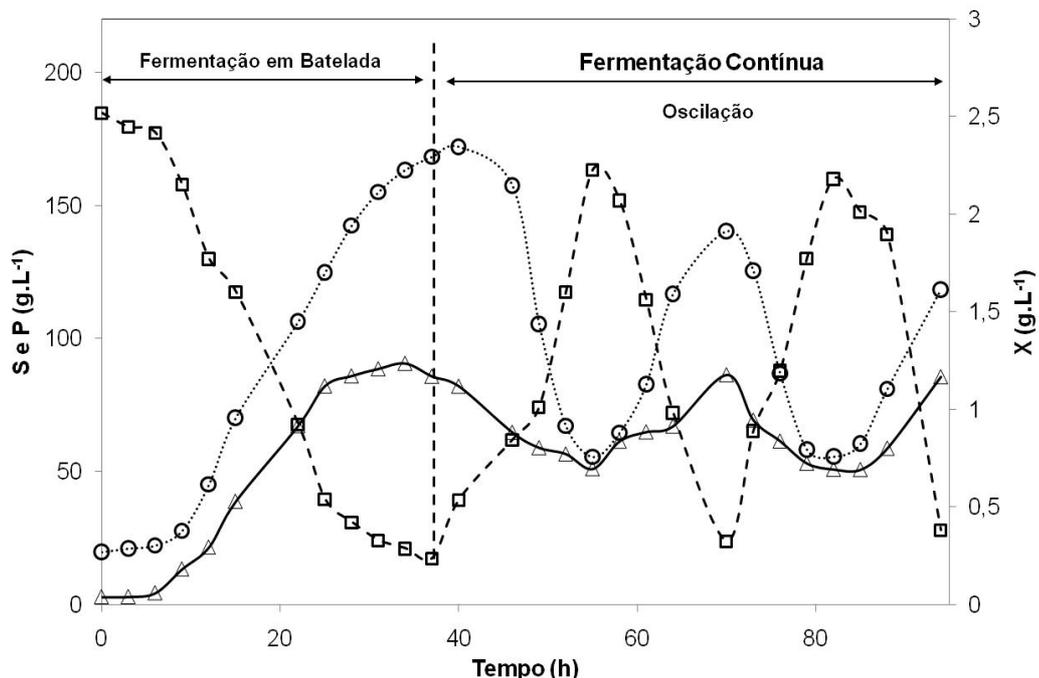


FIGURA 4.19: Fermentação Contínua (FC06) - (○) Células (X), (-□-) Glicose (S), (-△-) Etanol (P), $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Agitação - 150 rpm, $\text{pH} = 5,0$, $S_0 = 200 \text{ g.L}^{-1}$, $S_F = 200 \text{ g.L}^{-1}$, $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$.

De forma análoga a fermentação FC05, na fermentação FC06 também se observou a diminuição da amplitude e do período com o passar do tempo. Diante da

reprodutibilidade da obtenção de oscilação esta fermentação foi continuada em condições mostradas na fermentação FC08.

Na fermentação FC07, a alimentação contínua do meio (S_0) (200 g.L^{-1} de glicose, $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$) foi iniciada após 63 horas de fermentação em batelada, devido a problemas operacionais. A fermentação contínua com meio de alimentação (S_{F1}) de 200 g.L^{-1} foi mantida por 61 horas totalizando 3,7 tempos de residência. Durante este período de alimentação, observou-se um comportamento oscilatório sustentável da concentração de células (X), substrato (S) e etanol (P) conforme a Figura 4.20.

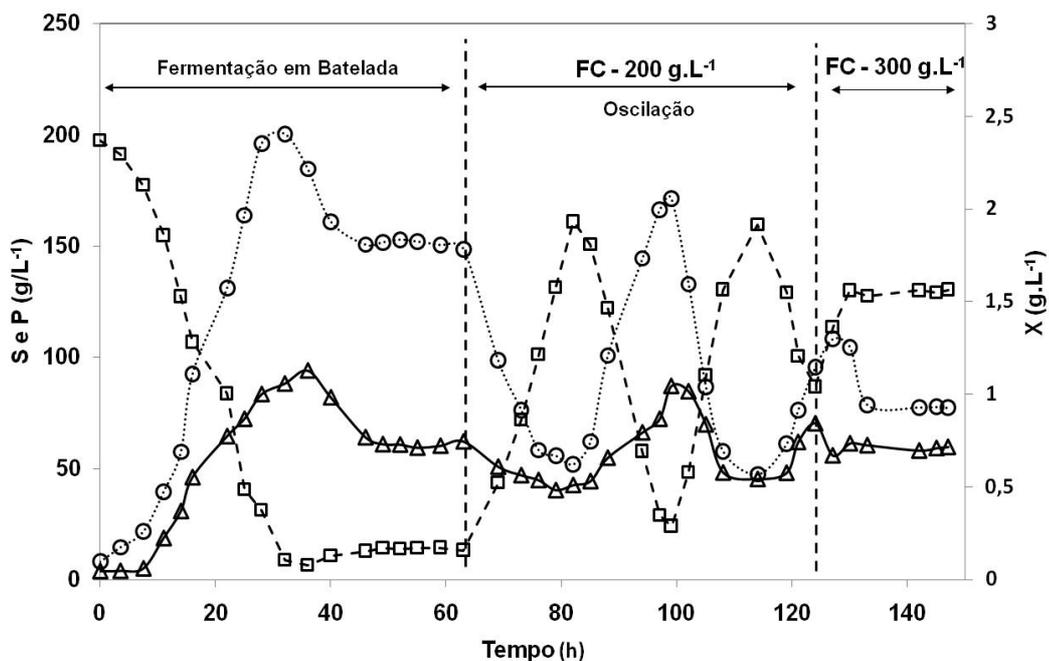
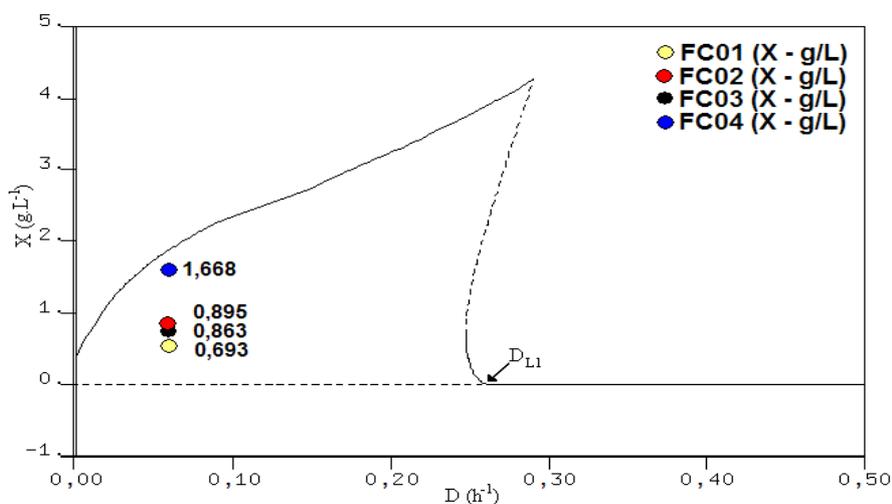


FIGURA 4.20: Fermentação Contínua (FC07): (●) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Agitação $- 150 \text{ rpm}$, $\text{pH} = 5,0$, $S_0 = 200 \text{ g.L}^{-1}$, $S_{F1} = 200 \text{ g.L}^{-1}$, $S_{F2} = 300 \text{ g.L}^{-1}$, $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$.

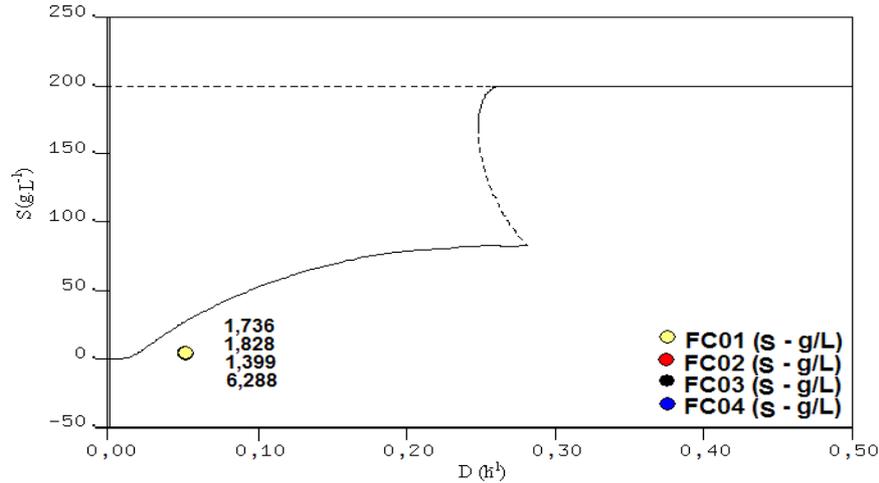
Após 61 horas de alimentação com meio S_{F1} foi iniciada a alimentação contínua do meio (S_{F2}) com 300 g.L^{-1} de glicose, mantendo a vazão inicial de alimentação. Este aumento da concentração de S_F , ocorreu com o intuito de se observar a influência da glicose no processo onde se obtinha oscilação e com isso observar o comportamento da amplitude da oscilação. A fermentação contínua com meio de

alimentação (S_{F2}) de 300 g.L^{-1} foi mantida por 23 horas totalizando 1,38 tempos de residência. O comportamento dinâmico observado da concentração de células (X), glicose (S) e etanol (P) durante as 23 horas restantes do processo foi de estado estacionário. Os dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 encontram-se no Apêndice B–VII, B–VIII e B-IX, respectivamente.

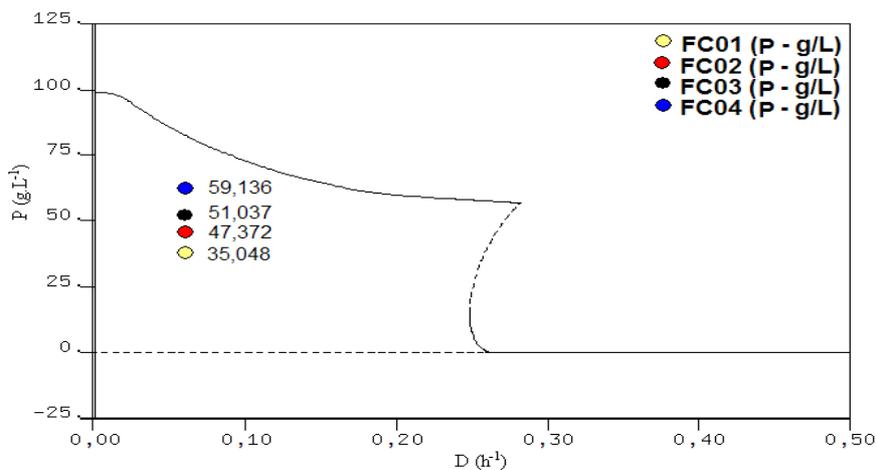
Confrontaram – se os dados experimentais das fermentações FC01 - FC07 com os diagramas de bifurcação gerados nas condições dinâmicas já descritas (Tabela 4.1). Na Figura 4.21, pode-se observar os dados experimentais das fermentações FC01 – FC04. A fermentação FC03, cuja condição de meio reacional e de alimentação foi idêntica à utilizada por LI *et al.* (1997), não se apresentou próxima à curva não trivial do diagrama de bifurcação na condição de estado estacionário, porém, como previsto pelo diagrama, estados estacionários foram obtidos. O dado experimental da fermentação FC04 foi o único que se apresentou mais próximo do ramo não trivial. Por se tratar de uma linhagem diferente da que foi utilizada no trabalho de LI *et al.* (1997) era esperado alguma diferença nesse tipo de confronto.



(a)



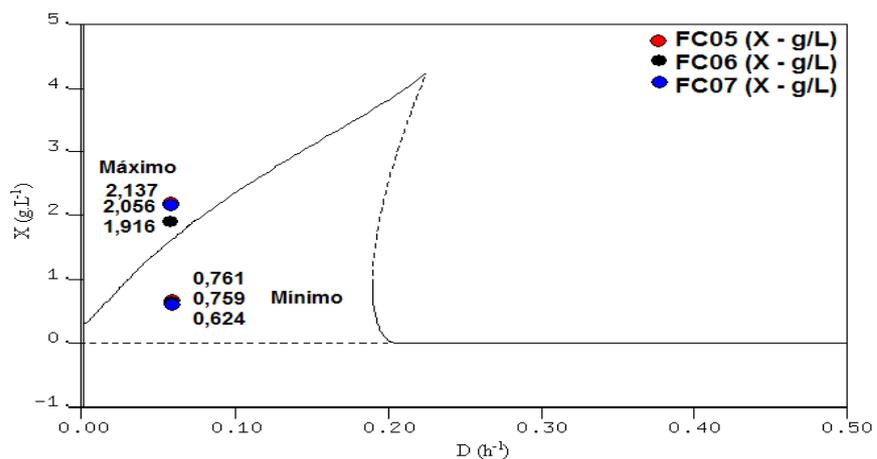
(b)



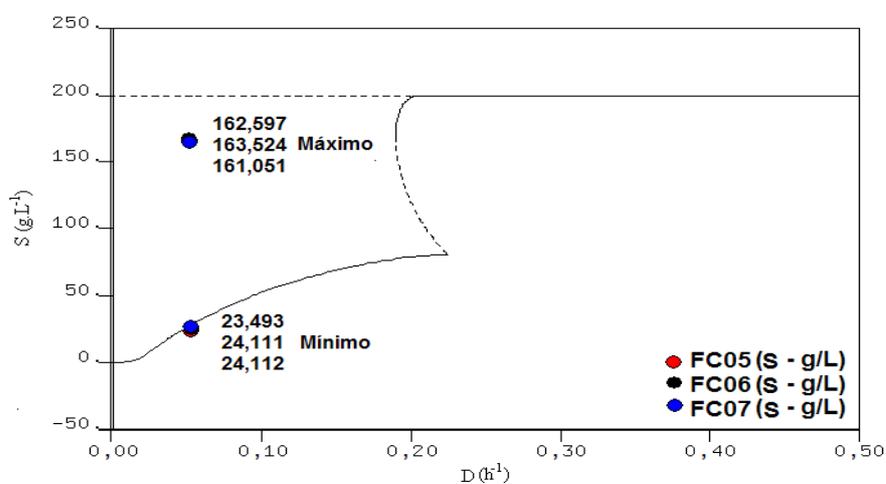
(c)

FIGURA 4.21 Confronto dos dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 com o diagrama de bifurcação na condição de estado estacionário – (a) Células (X), (b) Glicose (S) e (c) Etanol (P).

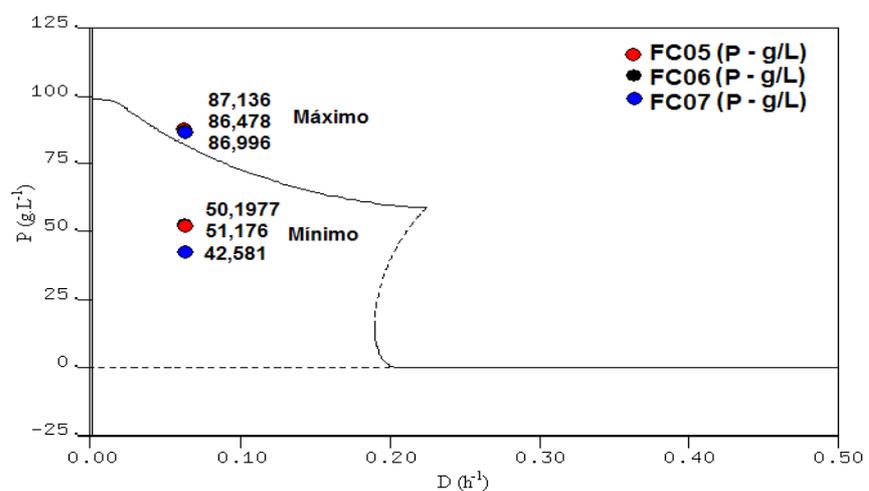
Na figura 4.22 foram confrontados os dados experimentais das fermentações FC05 - FC07 com os diagramas de bifurcação da condição oscilação amortecida. Observa-se que os dados experimentais das oscilações nos pontos máximos da amplitude, apresentaram uma boa concordância com os diagramas de bifurcação (Figura 4.21 (a), (b) e (c)). Esta análise se torna bastante interessante quando considerado que as oscilações obtidas são amortecidas e que com o passar do tempo o processo atingiria estado estacionário. Já os dados experimentais nos pontos mínimos da amplitude encontram-se bem fora do ramo não trivial (Figura 4.22 (a), mas deve-se ser levado em consideração que a concentração de glicose na alimentação (S_F) foi diferente da utilizada nesta tese.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 4.22 Confronto dos dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 com o diagrama de bifurcação na condição de oscilação amortecida – (a) Células (X), (b) Glicose (S) e (c) Etanol (P).

Na figura 4.23 observa-se o confronto dos dados experimentais das fermentações FC05 - FC07 com os diagramas de bifurcação da condição oscilação sustentada. Observa-se que os dados experimentais nos pontos mínimos da amplitude,

apresentaram uma boa concordância com os diagramas de bifurcação (Figura 4.23 (a), (b) e (c)). Porém, os dados nos pontos máximos da amplitude encontram-se numa região muito distante do ramo oscilatório da solução não trivial.

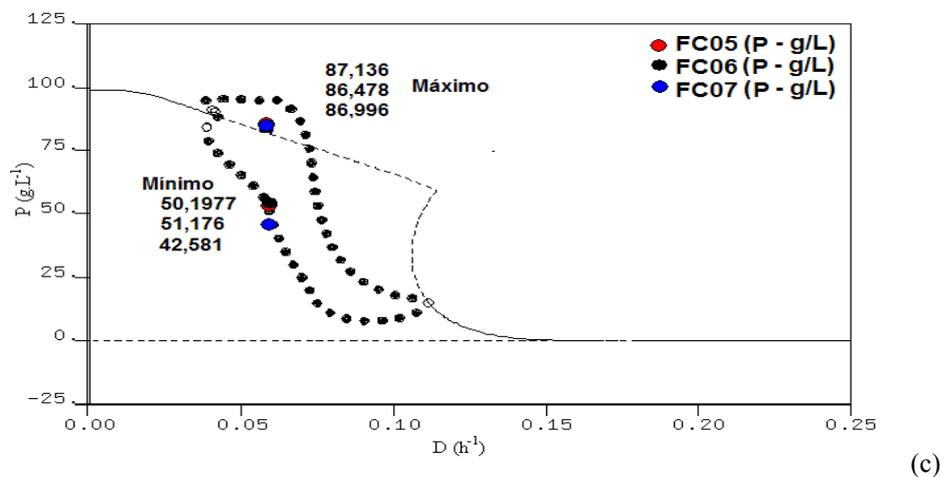
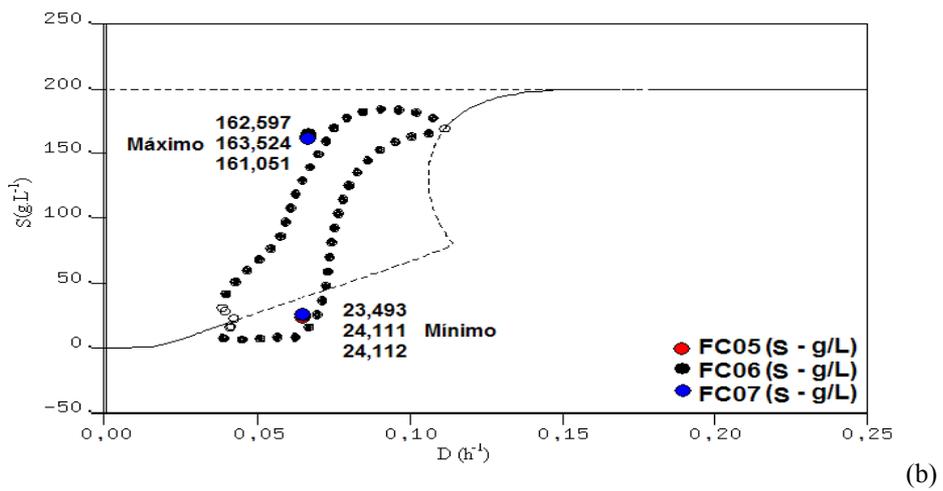
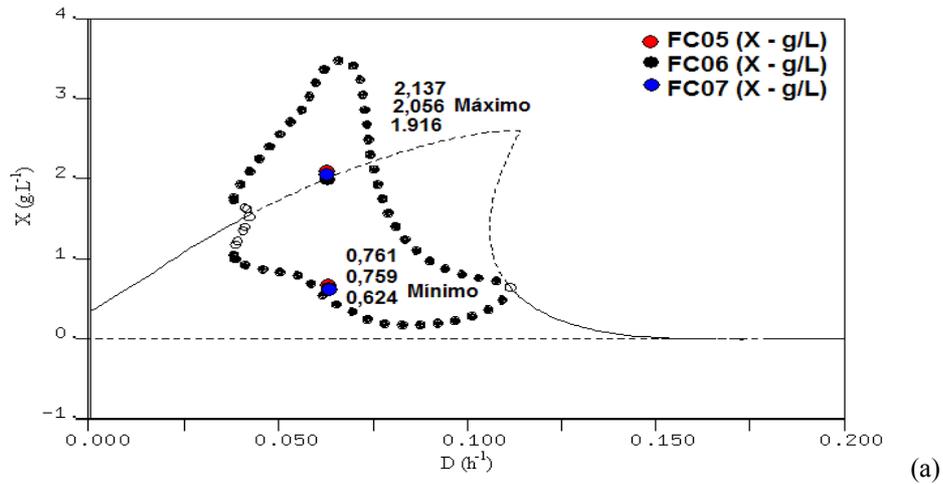


FIGURA 4.23 Confronto dos dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 com o diagrama de bifurcação na condição de oscilação sustentada – (a) Células (X), (b) Glicose (S) e (c) Etanol (P).

A análise dos diagramas com os dados experimentais mostra como essa ferramenta é importante no estudo de comportamentos dinâmicos complexos do ponto de vista qualitativo, uma vez que apenas simulações dinâmicas não refletem todas as possibilidades de comportamentos dinâmicos complexos possíveis.

A taxa específica de crescimento celular obtida, como também os rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ para a etapa de batelada foram calculados e encontram-se na Tabela 4.8.

TABELA 4.8: Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC05, FC06 e FC07.

Ferm	$Y_{X/S}(g.g^{-1})$	$Y_{P/S}(g.g^{-1})$	$\mu_{bat} (h^{-1})$
Batelada			
FC05	0,014	0,486	0,102
FC06	0,012	0,534	0,093
FC07	0,014	0,477	0,145

Para a etapa contínua das fermentações FC05, FC06 e FC07, as taxas específicas de crescimento foram determinadas ponto a ponto e observou-se que tais valores variavam e que os rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ também não eram constantes (Figuras 4.24 - 4.26).

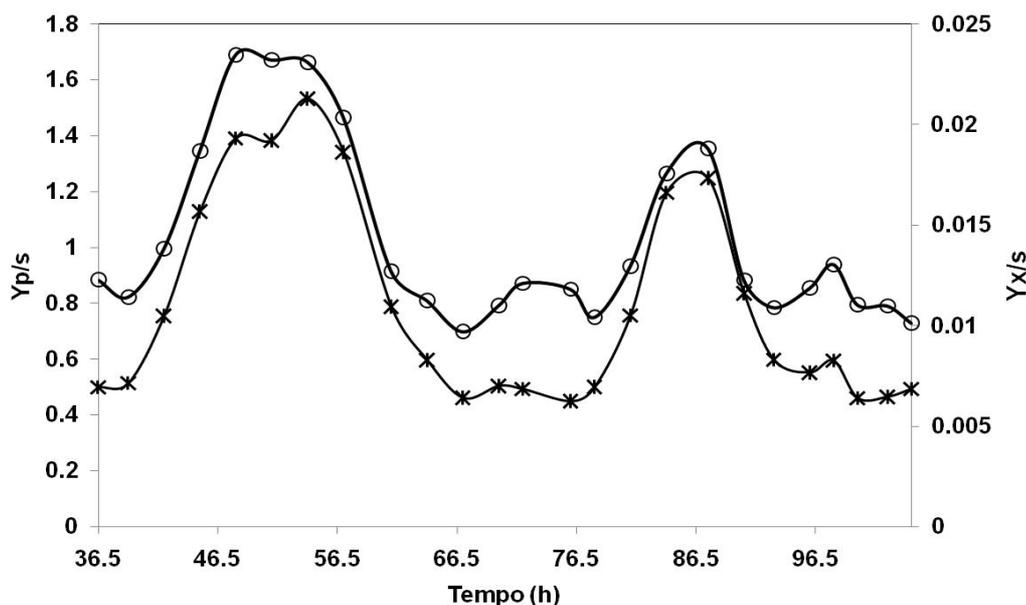


FIGURA 4.24: Rendimentos (\circ) $Y_{X/S}$ e ($*$) $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC05 em função do tempo na etapa contínua do processo.

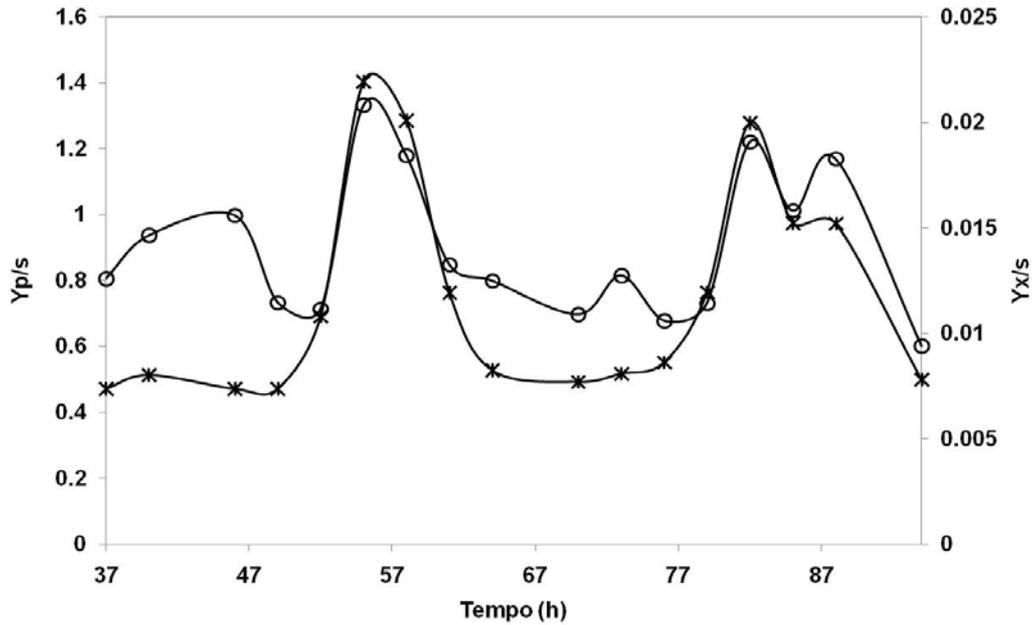


FIGURA 4.25: Rendimentos (\bigcirc) $Y_{X/S}$ e (\ast) $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC06 em função do tempo na etapa contínua do processo.

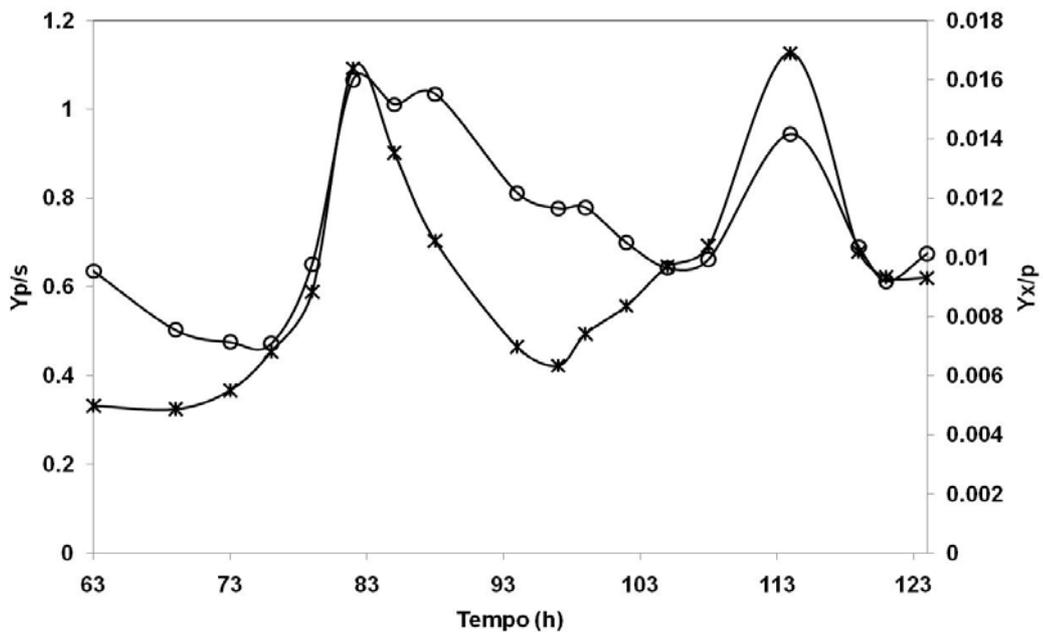


FIGURA 4.26: Rendimentos (\bigcirc) $Y_{X/S}$ e (\ast) $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC07 em função do tempo na etapa contínua do processo.

Diante dos experimentos realizados, se observou a influência do etanol nos comportamentos dinâmicos em processos fermentativos. Assim novos experimentos foram realizados para se verificar se o fator tempo de exposição ao alto teor de etanol gerado nas fermentações com meio de 200 g.L^{-1} de glicose estaria vinculado aos

comportamentos dinâmicos como oscilações ou apenas o alto teor de etanol gerado nas fermentações com 200 g.L^{-1} de glicose seria responsável pelos comportamentos dinâmicos.

4.2.2.4 Fermentações Contínuas com Meio de Crescimento de 100 g.L^{-1} (S_o) de glicose, S_F variáveis para estudo da influência do etanol.

Diante das hipóteses citadas novas fermentações (FC08, FC09, FC10 e FC11) foram realizadas, cujas condições operacionais, podem ser observadas nas Tabelas 4.9 e 4.10.

TABELA 4.9: Condições operacionais para Fermentação Contínua 08 (FC08) e 09 (FC09).

Fermentações	Tempo (h)		Funcionamento da Bomba para adição de Etanol	
			ON	OFF
FC08	0,00 – 37,00		Fermentação em Batelada	
	37,00 – 130,00		Fermentação Contínua	
	94,00 – 103,00		X	
	103,00 – 130,00			X
	Dados	Valores	OBS: A adição de etanol ocorreu com o uso de bomba peristáltica.	
	S_F (g.L^{-1})	200		
	S_o (g.L^{-1})	200		
	D (h^{-1})	0,06		
D_{Etanol} (h^{-1})	0,02			
P_{Etanol} (% v/v)	99,5			
FC09	0,00 – 22,00		Fermentação em Batelada	
	22,00 – 125,00		Fermentação Contínua	
	40,00 – 44,00		OBS: A adição do etanol ocorreu após 40 horas de fermentação contínua e teve duração de 4 horas, sendo adicionado diretamente no reator, sem uso de bomba.	
	44,00 – 125,00			
	S_F (g.L^{-1})	200		
	S_o (g.L^{-1})	100		
	D (h^{-1})	0,06		
	D_{Etanol} (h^{-1})	-		
P_{Etanol} (% v/v)	75			

TABELA 4.10: Condições operacionais para Fermentação Contínua 10 (FC10) e 11 (FC11)

Fermentações	Tempo (h)		Funcionamento da Bomba para adição de Etanol	
			ON	OFF
FC10	0,00 – 23,00		Fermentação em Batelada	
	23,00 – 133,00		Fermentação Contínua	
	48,00 – 65,00		X	
	65,00 – 133,00			X
	S_F (g.L ⁻¹)	100	OBS: A adição de etanol ocorreu com o uso de bomba peristáltica.	
	S_0 (g.L ⁻¹)	100		
	D (h ⁻¹)	0,06		
	D_{Etanol} (h ⁻¹)	0,02		
	P_{Etanol} (% v/v)	75		
FC11	0,00 – 23,00		Fermentação em Batelada	
	23,00 – 133,00		Fermentação Contínua	
	48,00 – 65,00		X	
	65,00 – 133,00			X
	S_F (g.L ⁻¹)	200	OBS: A adição de etanol ocorreu com o uso de bomba peristáltica.	
	S_0 (g.L ⁻¹)	100		
	D (h ⁻¹)	0,06		
	D_{Etanol} (h ⁻¹)	0,02		
	P_{Etanol} (% v/v)	75		

A fermentação FC08 consiste na fermentação FC06 que foi continuada com adição de etanol como já citado anteriormente. Após 94 horas de fermentação, adicionou-se etanol a 99,5% v/v, numa taxa de diluição de 0,02 h⁻¹. A concentração de etanol utilizada foi muito elevada e após 9 horas de adição, a bomba foi desligada uma vez que a concentração de etanol no reator possuía um valor bastante alto sendo letal para as células (Figura 4.27). Diante de tal adição, o sistema atingiu o *wash-out*, tornando-se o meio transparente.

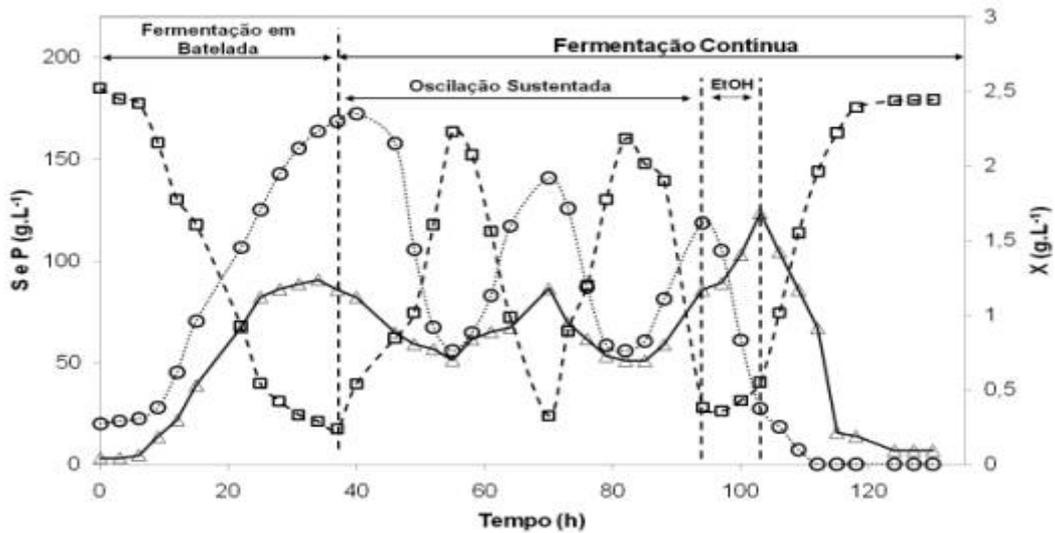


FIGURA 4.27: Fermentação Contínua (FC08): (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T = 30 °C, Agitação = 150 rpm, pH = 5,0, S₀ = 200 g.L⁻¹, S_F = 200 g.L⁻¹, D_{Etanol} = 0,02h⁻¹, D = 0,06 h⁻¹, EtOH = Etanol Adicionado.

A fermentação FC09 foi mantida em batelada por 22 horas, quando foi iniciada a alimentação contínua do meio (200 g.L⁻¹ de glicose, D = 0,06 h⁻¹). A fermentação contínua foi mantida por 103 horas. O comportamento dinâmico observado da concentração de células, substrato e etanol foi de estado estacionário, conforme mostra a Figura 4.28. A concentração de etanol utilizada na fase de alimentação foi de 75% v/v, a concentração de glicose no reator(S₀) de 100 g.L⁻¹ e a concentração do meio de alimentação (S_F) de 200 g.L⁻¹. Não observou-se nenhum efeito no sistema.

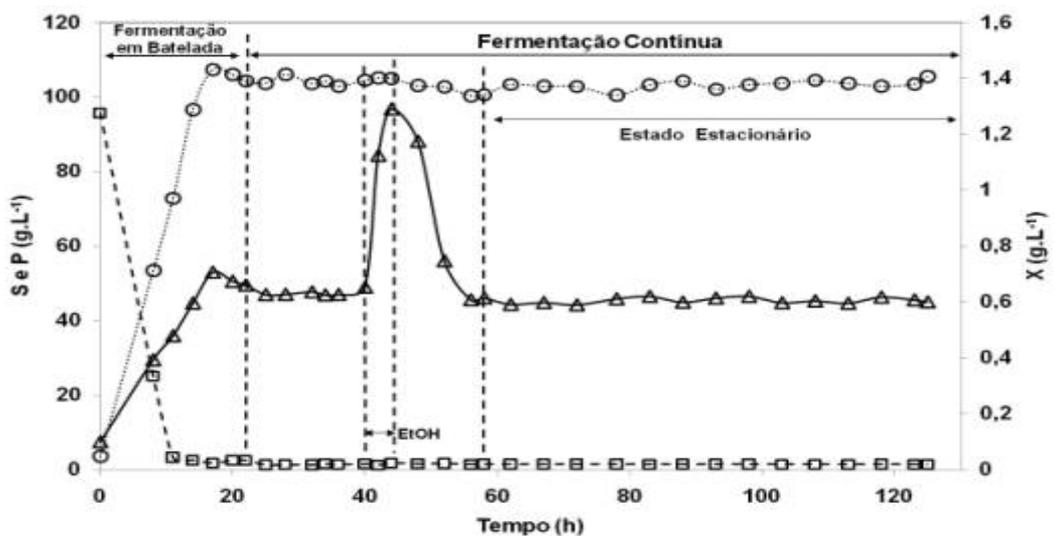


FIGURA 4.28: Fermentação Contínua (FC09): (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T = 30 °C, Agitação = 150 rpm, pH = 5,0, S₀ = 100 g.L⁻¹, S_F = 200 g.L⁻¹, D = 0,06 h⁻¹, EtOH = Etanol Adicionado.

A fermentação FC09 foi realizada para observação do fator tempo de exposição (período curto) ao alto teor de álcool e, como já observado na literatura não seria interessante obter um valor acima de 100 g.L^{-1} , pois, nesta condição, o fator inibição estaria fortemente presente. A adição de etanol foi realizada a cada duas horas (totalizando 4 horas de adição) e, mesmo havendo aumento na concentração de etanol (forçadamente), houve uma pequena mudança na dinâmica nas concentrações de células. Após aproximadamente 16 horas do fim da adição de etanol o estado estacionário foi novamente atingido pela concentração de etanol.

Já na fermentação FC10 a concentração de etanol utilizada foi de 75% v/v e a concentração de glicose do meio de alimentação de 100 g.L^{-1} . A fermentação contínua foi iniciada após 23 horas de fermentação em batelada, sendo mantida por 110 horas.

A adição de etanol foi mantida por 17 horas (período longo). Quando o valor da concentração de etanol ficou muito elevado, aproximadamente 100 g.L^{-1} , a bomba foi desligada e a adição de etanol foi descontinuada. Durante a adição de etanol, foi observado que a concentração de células aumentou até que a concentração de etanol ficou em torno de 80 g.L^{-1} . Na Figura 4.29, é mostrada a ampliação na curva da concentração da glicose, na região referente ao tempo de adição de etanol, para que assim fosse observado com mais detalhes o consumo da glicose.

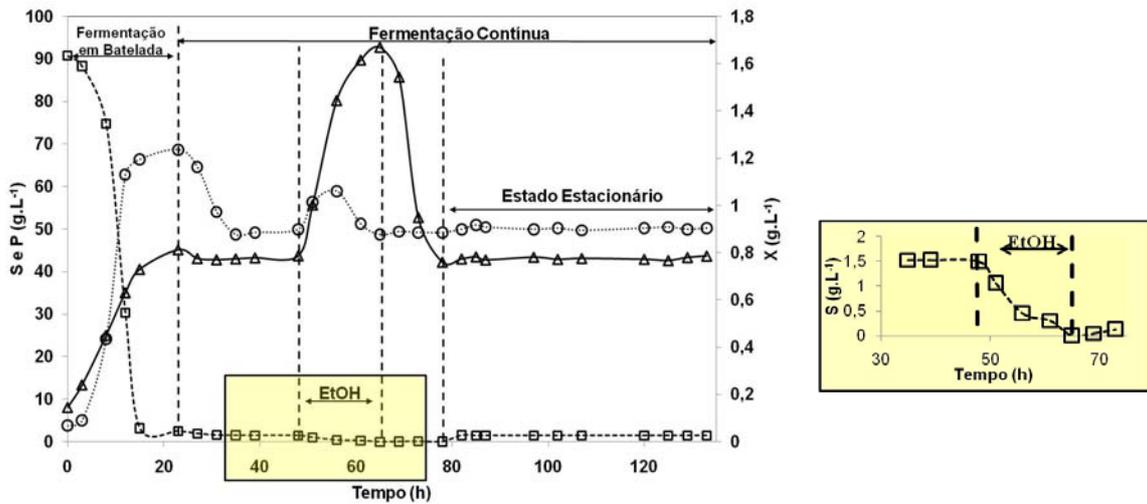


FIGURA 4.29: Fermentação Contínua (FC10): (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 100 g.L⁻¹, S_F – 100 g.L⁻¹, D_{Etanol} = 0,02h⁻¹, D = 0,06 h⁻¹, EtOH – Etanol Adicionado.

Na fermentação FC11, a alimentação contínua do meio (200 g.L⁻¹ de glicose, D = 0,06 h⁻¹) foi iniciada após 23 horas de fermentação em batelada. A fermentação contínua foi mantida por 96 horas. A adição de etanol foi mantida por 17 horas (período longo), como realizado na fermentação FC10 quando o valor da concentração de etanol se encontrava aproximadamente em 100 g.L⁻¹, a bomba foi desligada. Durante a adição de etanol, foi observado novamente que a concentração de células sofreu um aumento à medida que a concentração de etanol estava sendo elevada e uma inibição quando a concentração de etanol ficou em torno de 83,5 g.L⁻¹.

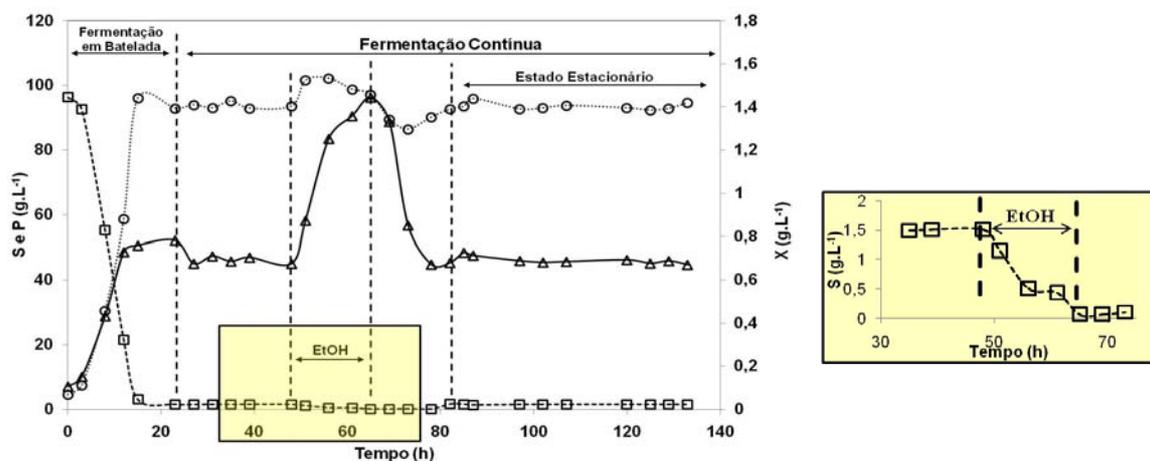


FIGURA 4.30: Fermentação Contínua (FC11): (○) Células (X), (□) Glicose (S), (△) Etanol (P), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 100 g.L⁻¹, S_F – 200 g.L⁻¹, D_{Etanol} = 0,02h⁻¹, D = 0,06 h⁻¹. EtOH – Etanol Adicionado.

Na Figura 4.30, foi feita uma ampliação na curva da concentração da glicose, na região referente ao tempo de adição de etanol, para que assim fosse observado com mais detalhes o consumo da glicose.

A taxa específica de crescimento celular obtida, como também os rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{S/P}$ para a etapa de batelada foram calculados e encontram-se na Tabela 4.11. As produtividades volumétricas, ao final da etapa em batelada, obtidas nas fermentações FC09, FC10 e FC11 foram $2,789 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $2,587 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $2,737 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os valores dos rendimentos $Y_{P/S}$ nas fermentações encontram-se coerentes com as obtidas na literatura por PINHEIRO (2001) e por LI *et al.* (1997).

TABELA 4.11: Valores de μ , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC08, FC09, FC10 e FC11.

Ferm	$Y_{X/S}(\text{g.g}^{-1})$	$Y_{P/S}(\text{g.g}^{-1})$	$\mu_{\text{bat}} (\text{h}^{-1})$
	Batelada		
FC08	0,012	0,495	0,093
FC09	0,014	0,463	0,247
FC10	0,018	0,447	0,247
FC11	0,015	0,467	0,223

Diante dos resultados obtidos, na Tabela 4.12 encontra-se um resumo dos rendimentos, taxas de crescimento entre outras informações sobre as fermentações descontínuas e contínuas realizadas. Temos na Tabela 4.12 que as concentrações de glicose do meio e da alimentação são representadas como $S_o (\text{g.L}^{-1})$ e $S_F (\text{g.L}^{-1})$, respectivamente. Esses valores variaram entre 100 e 300 g.L^{-1} . X_F , S_{Final} e P_F são as concentrações de células, glicose e etanol no final da batelada; t_F corresponde ao tempo para o término da batelada; $Y_{X/S}$ é o rendimento de substrato em células e o $Y_{P/S}$ é o rendimento de substrato em produto, tais valores foram calculados na etapa de batelada em todos os experimentos. μ corresponde à taxa específica de crescimento.

Tabela 4.12: Resumo das informações referentes às fermentações descontínuas e contínuas

Ferm	S(g.L⁻¹)	S_F (g.L⁻¹)	t_F (h)	Y_{X/S}	Y_{P/S}	μ (h⁻¹)	X_F (g.L⁻¹)	S_{Final} (g.L⁻¹)	P_F (g.L⁻¹)
FC01	100	100	18	0,014	0,497	0,319	1,251	2,607	53,815
FC02	100	200	22	0,014	0,384	0,264	1,348	1,994	44,192
FC03	150	150	16	0,011	0,336	0,291	1,449	13,988	44,988
FC04	150	200	24	0,014	0,422	0,257	1,629	17,730	32,570
FC05	200	200	36,5	0,014	0,486	0,113	2,340	12,674	91,580
FC06	200	200	37	0,012	0,495	0,093	2,230	21,329	90,776
FC07	200	200/300	63	0,014	0,477	0,115	2,404	8,810	88,115
FC08	200	200	37	0,012	0,495	0,093	2,230	21,329	90,776
FC09	100	200	22	0,014	0,463	0,247	1,412	2,485	50,522
FC10	100	100	23	0,018	0,447	0,222	0,849	1,325	39,734
FC11	100	200	23	0,015	0,467	0,247	1,394	1,540	52,150

Conforme ainda com a Tabela 4.12 é possível observar que os valores da taxa específica de crescimento nas fermentações onde o meio de crescimento tinha a concentração de glicose em 200 g.L⁻¹ (FC05, FC06, FC07) são menores (como a FC08 consiste na continuação da FC06, os valores descritos a fermentação FC08 são apenas uma repetição de dados). A diminuição do valor da taxa específica de crescimento pode ser explicada uma vez que inibições e limitações com substrato são bem conhecidas em condições de alta concentração de glicose e etanol. Os dados experimentais das fermentações FC05, FC06 e FC07 encontram-se nos Apêndices B-X, B-XI e B-XII, respectivamente.

Com os resultados obtidos nas fermentações FC08-FC11, sugere-se que o etanol adicionado juntamente com o etanol produzido pelo processo, inibiu o crescimento celular e ainda levando-se em consideração as condições de concentração de glicose

utilizadas, o etanol adicionado não foi responsável por oscilações. Tais comportamentos também foram observados no trabalho de LI *et al.* (1997), onde a taxa de variação da concentração do etanol foi investigada, porém em processo em batelada.

No estudo de LI *et al.* (1997) duas fermentações simultâneas foram realizadas. No final da batelada convencional, um dos fermentadores foi diluído com água estéril, tendo suas concentrações de células, glicose e etanol designadas como X_1 , S_1 e P_1 , respectivamente. As concentrações de células, glicose e etanol do segundo fermentador foram designadas como X_2 , S_2 e P_2 . Após a diluição, P_1 foi reduzido a 58 g.L^{-1} , enquanto que P_2 permaneceu em 85 g.L^{-1} . Num período de duas horas, 45 mL de etanol foi adicionado ao primeiro fermentador aumentando linearmente a concentração de etanol P_1 até 85 g.L^{-1} . Terminado este processo, diferentes concentrações de glicose foram adicionadas aos fermentadores, fazendo com que a concentração de células, glicose e etanol se tornassem iguais nos dois fermentadores. Este experimento teve como objetivo proporcionar as culturas 1 e 2 diferentes velocidades de variação da concentração de etanol, embora a concentração de P_1 tenha sido sempre menor ou igual a P_2 durante todo o processo. Após os experimentos, os autores concluíram que a taxa de variação da concentração de etanol tem um importante efeito inibitório na bactéria, enquanto que o efeito da história da concentração de etanol foi insignificante.

Com os experimentos realizados de forma contínua, foi possível analisar nas condições onde comportamentos dinâmicos fossem observados, o efeito de inibição do etanol. LI *et al.* (1997) realizou um trabalho similar apenas com fermentações em batelada e o efeito do etanol foi também observado. A questão de inibição por etanol intra e extracelular vem sendo cada vez mais estudada, e conforme o trabalho de BAI *et al.* (2008), observa-se que as células microbianas expostas ao etanol sofrem um ajuste no seu

metabolismo e isto é referido como a inibição ao etanol. A inibição por etanol tem efeitos múltiplos e complexos. A Figura 4.31 mostra alguns possíveis locais nas células em que o etanol poderia exercer uma influência significativa (D'AMORE e STEWART, 1987).

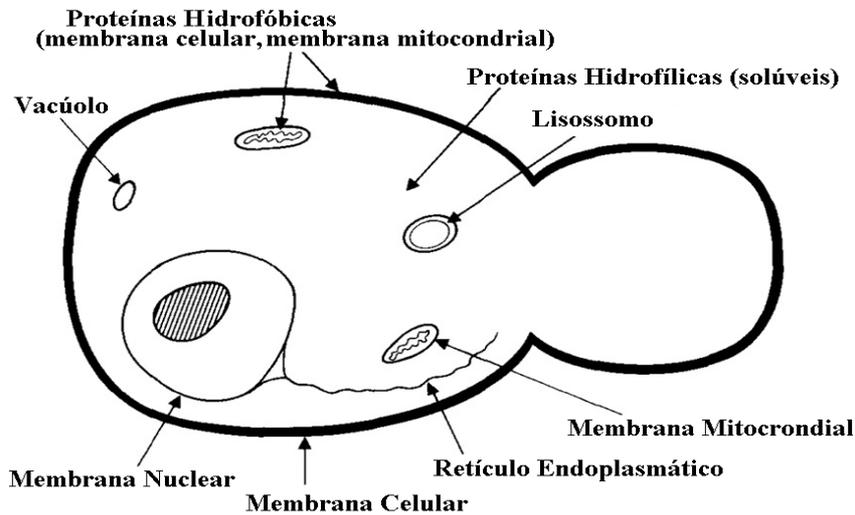


Figura 4.31: Possíveis locais de alvo para a inibição do etanol (D'AMORE e STEWART, 1987).

Algumas enzimas chaves da rota glicolítica, tais como o hexoquinase e o ADH, podem ser afetadas pelo etanol, e este pode igualmente afetar o consumo de nutrientes e o potencial da membrana, diminuindo a atividade do ATP (CASEY e INGLEDEW, 1986; LARUE *et al.*, 1984). Embora muitas discrepâncias existam entre os estudos dos mecanismos da inibição do etanol, aceita-se geralmente que as membranas de algumas organelas e células são os principais alvos do ataque do etanol (D'AMORE e STEWART, 1987).

Em muitos casos, a inibição do etanol é agravada pela presença de outros subprodutos da fermentação tais como o acetaldeído e o acetato, e outros fatores como altas temperaturas (JONES, 1988).

4.3 Estudo das enzimas participantes da rota bioquímica de Entner -Doudoroff

Um estudo das enzimas participantes da rota bioquímica de Entner-Doudoroff foi realizado, nas diversas condições de fermentações contínuas estudadas. Para tal estudo, utilizou-se eletroforese SDS-PAGE, como descrito no capítulo 3. As amostras retiradas nas fermentações FC01-FC011 para a realização da eletroforese encontram-se na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Amostras das fermentações FC01 – FC11 utilizados para eletroforese.

Amostra:	FC01	FC02	FC03	FC04	FC05	FC06/FC08	FC07	FC09	FC10	FC11
1	6 h	6 h	12h	15h	24h	28h	22h	11h	31h	31h
2	12 h	12 h	19h	38h	51h	52h	52h	17 h	51h	51h
3	27 h	25 h	42h	59h	70h	76h	79h	34h	73h	73h
4	39 h	57 h	56h	79h	76h	94h	102h	44h	102h	102h
5	57 h	99 h	-	92h	84h	-	121h	-	-	-
6	78 h	-	-	-	96h	-	142h	-	-	-

Os géis com as amostras das fermentações FC01 e FC02 podem ser observados nas Figuras 4.32 e 4.33. As amostras tiveram suas concentrações estabelecidas em 10 g.L^{-1} de proteína.

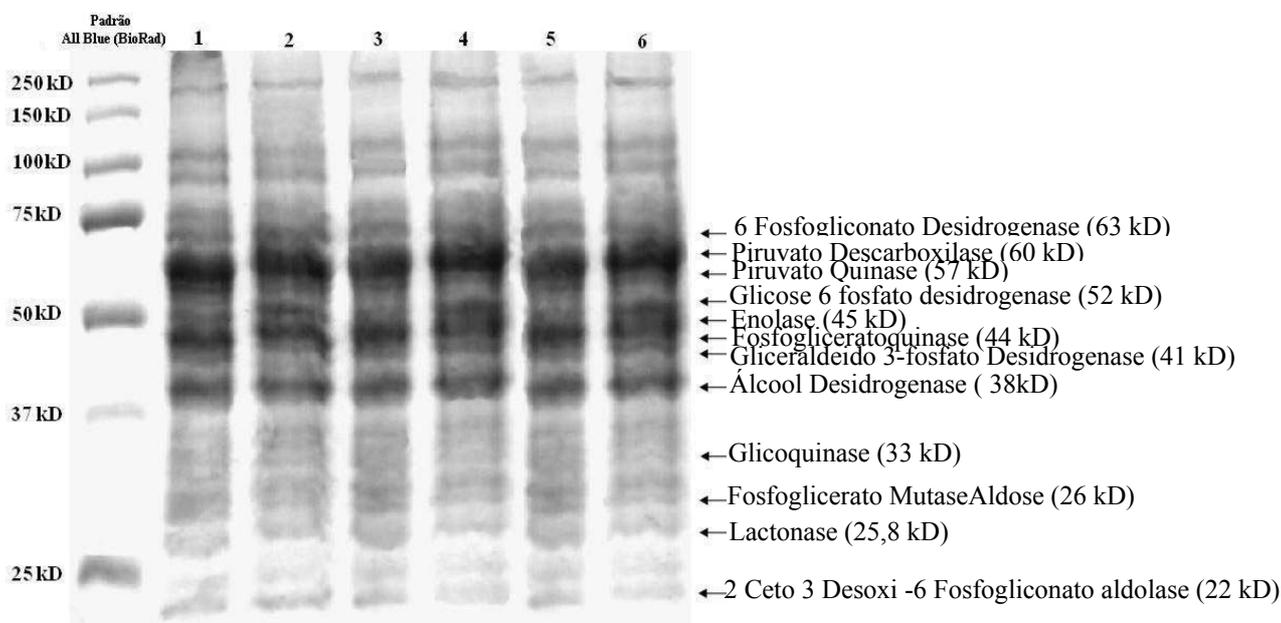


FIGURA 4.32: Eletroforese das amostras da fermentação FC01 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 6 h, Coluna 3: Amostra 2 -12 h, Coluna 4: Amostra 3 – 27 h, Coluna 5: Amostra 4 - 39 h, Coluna 6: Amostra 5 – 57 h, Coluna 7: Amostra 6 – 78 h.

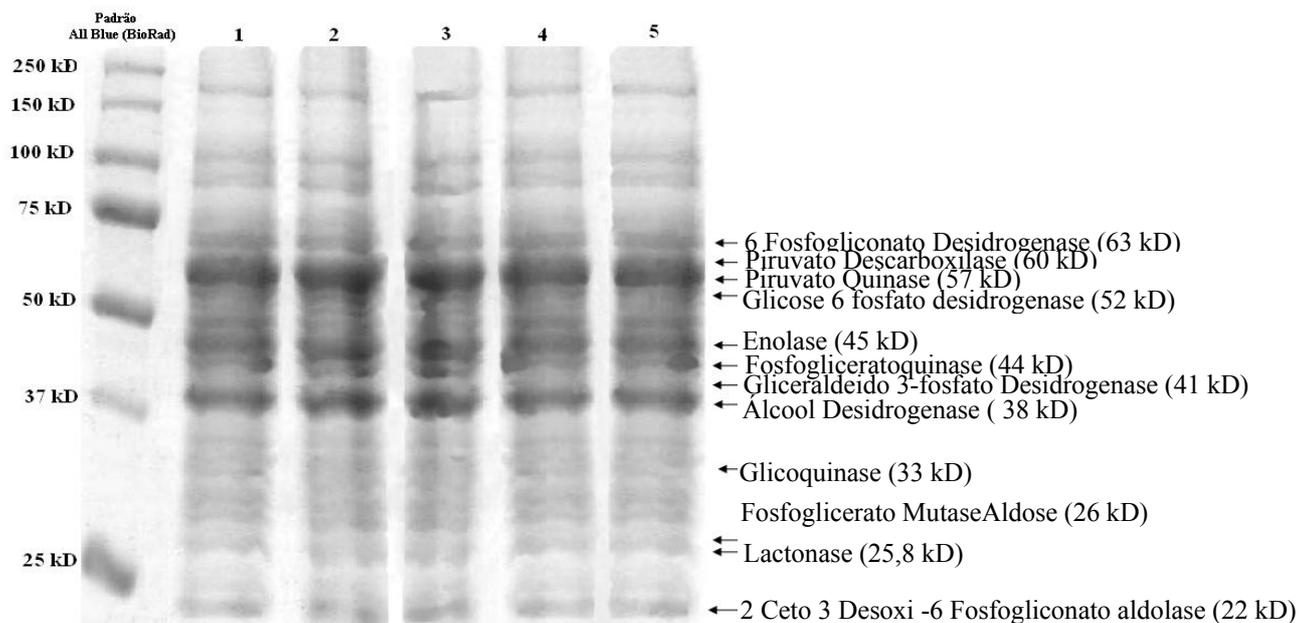


FIGURA 4.33: Eletroforese das amostras da fermentação FC02 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 6 h, Coluna 3: Amostra 2 - 12 h, Coluna 4: Amostra 3 – 25 h, Coluna 5: Amostra 4 - 57 h, Coluna 6: Amostra 5 – 99 h.

Os géis com as amostras das fermentações FC03 e FC04 podem ser observados nas Figuras 4.34 e 4.35.

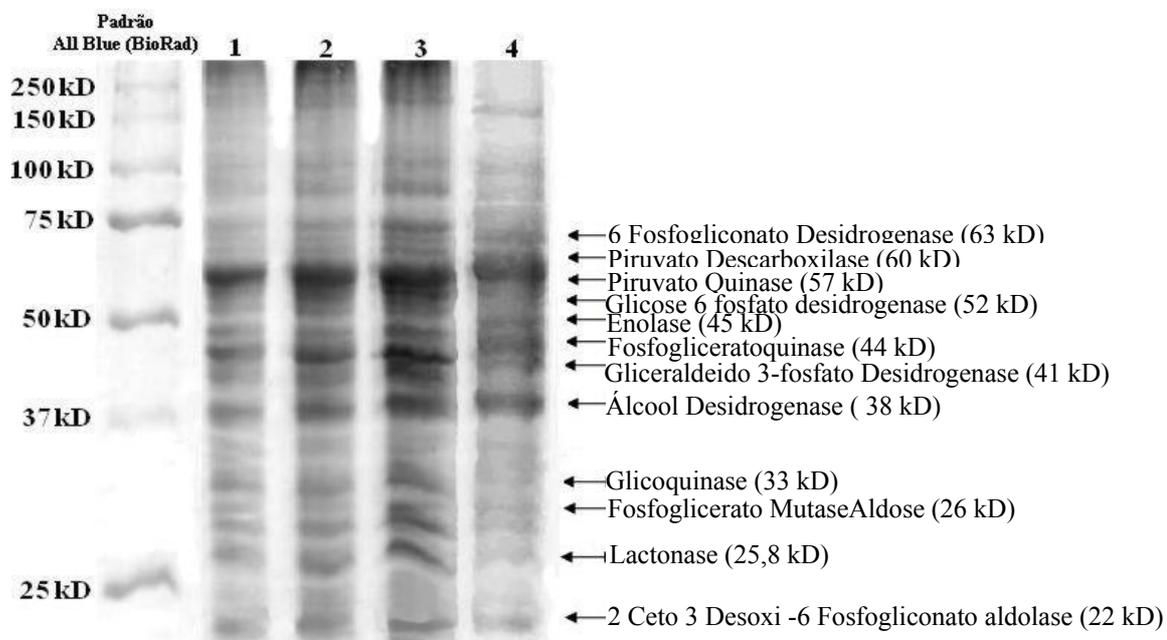


FIGURA 4.34: Eletroforese das amostras da fermentação FC03 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 12 h, Coluna 3: Amostra 2 - 19 h, Coluna 4: Amostra 3 – 42 h, Coluna 5: Amostra 4 - 56.

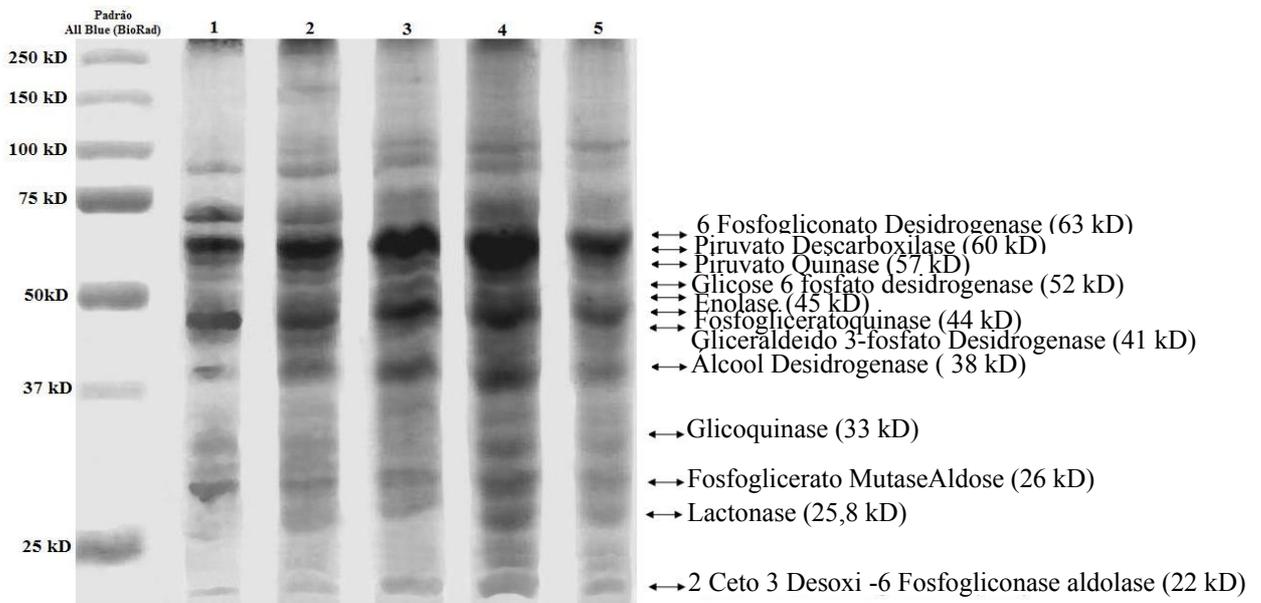


FIGURA 4.35: Eletroforese das amostras da fermentação FC04 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 15 h, Coluna 3: Amostra 2 - 38 h, Coluna 4: Amostra 3 – 59 h, Coluna 5: Amostra 4 – 79 h, Coluna 6: Amostra 5 – 92 h.

Os géis com as amostras das fermentações FC05, FC06/FC08 e FC07 podem ser observados nas Figuras 4.36 - 4.38. As amostras da fermentação FC06/ FC08 foram colocadas em um mesmo gel.

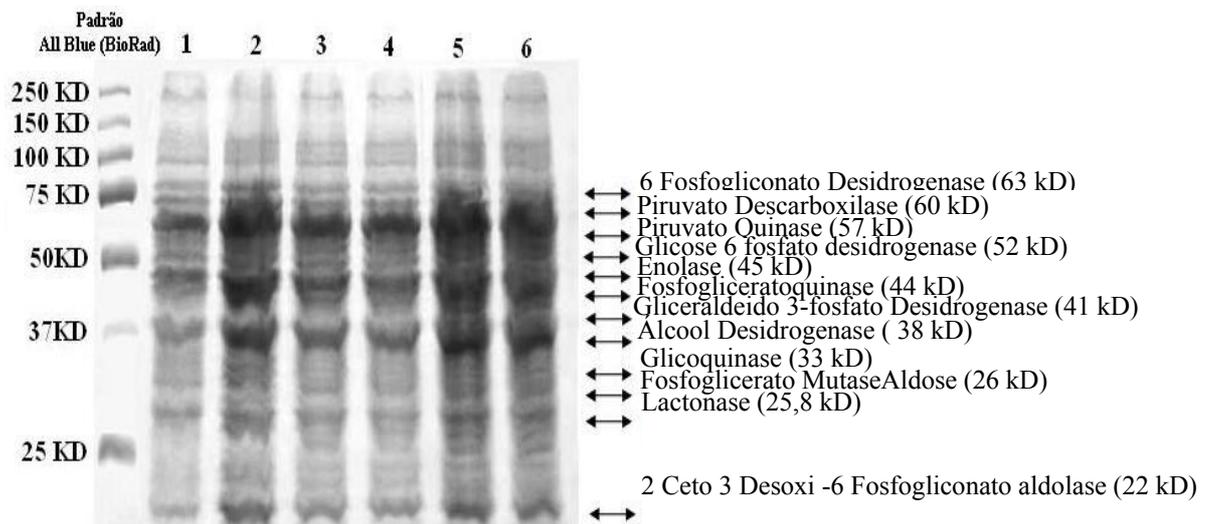


FIGURA 4.36: Eletroforese das amostras da fermentação FC05 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 24 h, Coluna 3: Amostra 2 - 51 h, Coluna 4: Amostra 3 – 70 h, Coluna 5: Amostra 4 - 76 h, Coluna 6: Amostra 5 – 84 h, Coluna 7: Amostra 6 – 96 h.

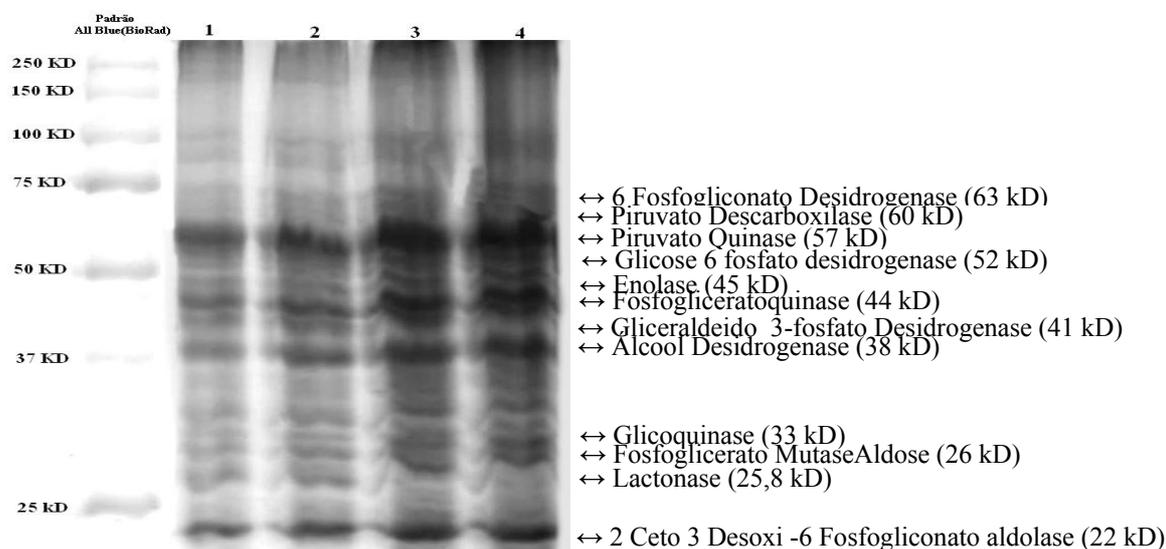


FIGURA 4.37: Eletroforese das amostras da fermentação FC06/FC08 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 28 h, Coluna 3: Amostra 2 - 52 h, Coluna 4: Amostra 3 – 76 h, Coluna 5: Amostra 4 - 94 h.

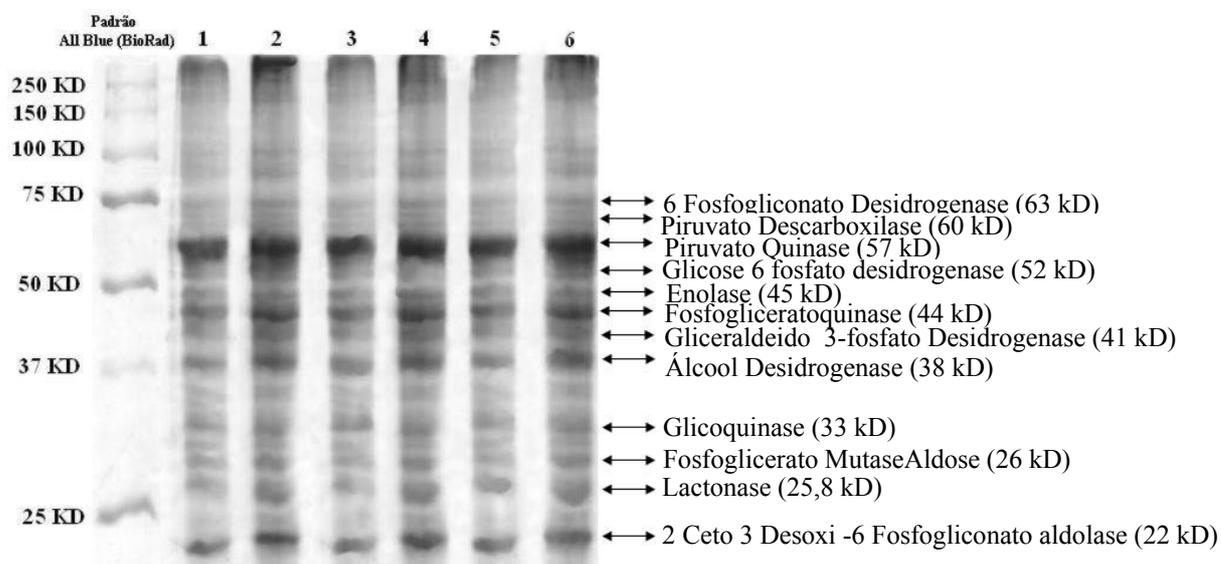


FIGURA 4.38: Eletroforese das amostras da fermentação FC07 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 22 h, Coluna 3: Amostra 2 - 52 h, Coluna 4: Amostra 3 – 79 h, Coluna 5: Amostra 4 - 102 h, Coluna 6: Amostra 5 – 121 h, Coluna 7: Amostra 6 – 142 h.

Os géis com as amostras das fermentações FC09, FC10 e FC11 podem ser observados nas Figuras 4.39 e 4.40. As amostras da fermentação FC10 E FC11 foram colocadas num mesmo gel.

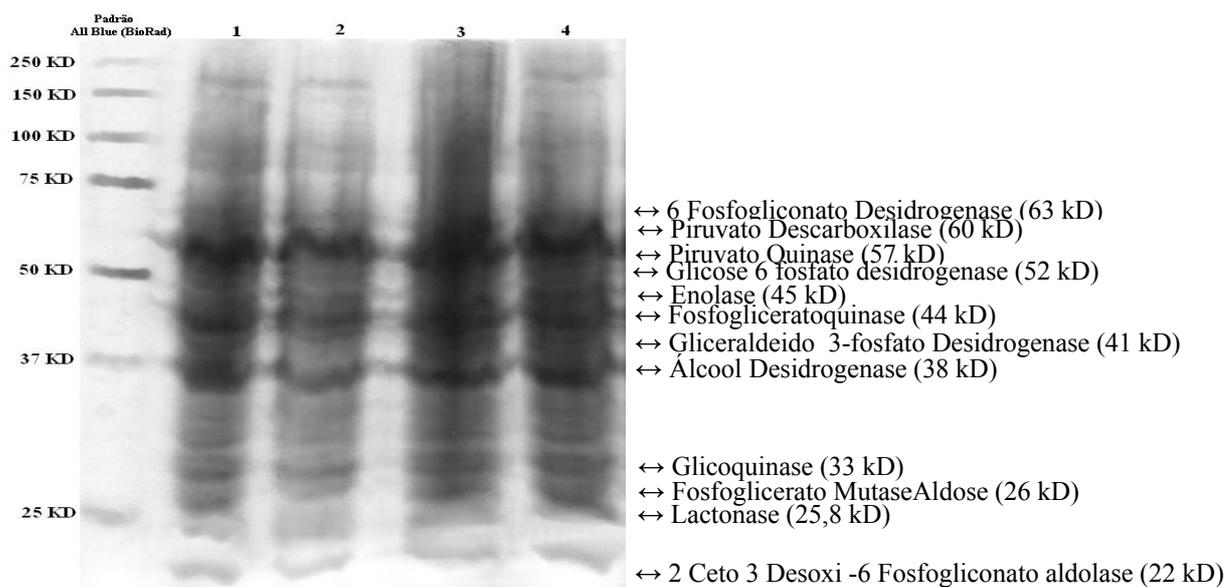


FIGURA 4.39: Eletroforese das amostras da fermentação FC09 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 11 h, Coluna 3: Amostra 2 - 17 h, Coluna 4: Amostra 3 – 34 h, Coluna 5: Amostra 4 - 44 h.

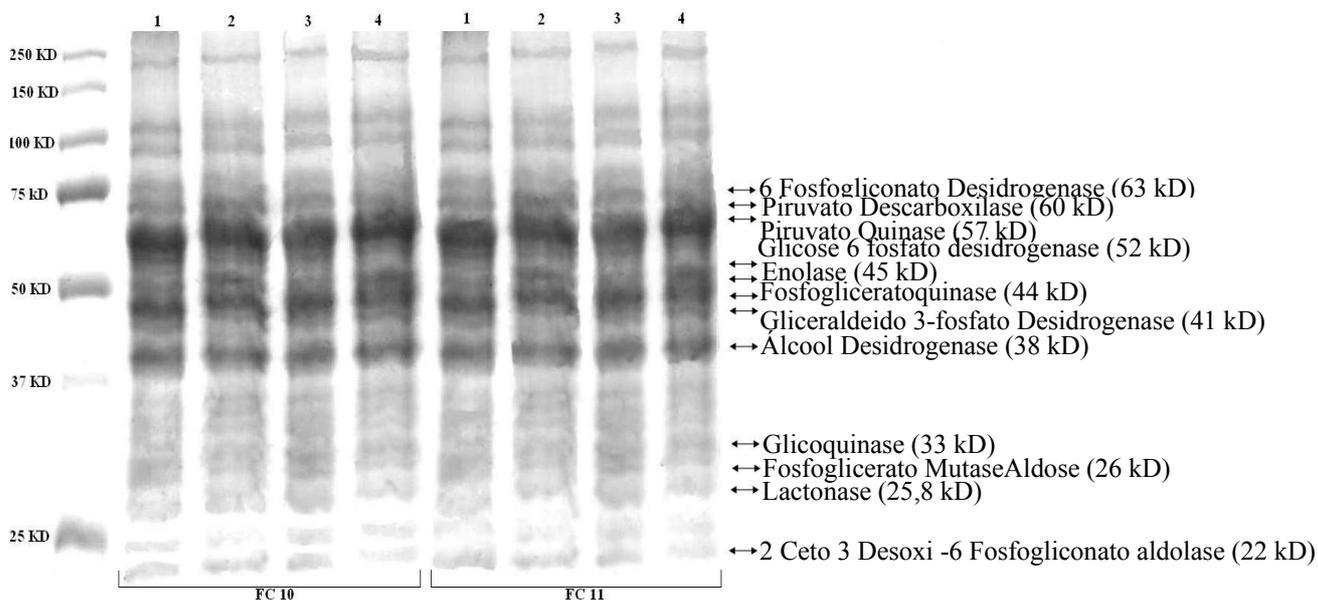


FIGURA 4.40: Eletroforese das amostras das fermentações FC10 e FC11 da bactéria *Zymomonas mobilis*. Coluna 1: Padrão All Blue (BioRad), Coluna 2: Amostra 1 – 31 h, Coluna 3: Amostra 2 - 51 h, Coluna 4: Amostra 3 – 73 h, Coluna 5: Amostra 4 - 102 h, Coluna 6: Amostra 5 – 31 h, Coluna 7: Amostra 2 - 51 h, Coluna 8: Amostra 8 – 73 h, Coluna 9: Amostra 4 - 102 h

As principais enzimas, da rota bioquímica da bactéria *Zymomonas mobilis* apresentam massa moleculares conforme a Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Massas moleculares das enzimas da rota bioquímica de Entner-Doudoroff da bactéria *Zymomonas mobilis* (AN *et al.*, 1991)

ENZIMAS	Massa molecular (D)
<i>glicoquinase</i>	33,000
<i>glicose-6-fosfatodesidrogenase</i>	52,000
<i>lactonase</i>	26,600
<i>6-fosfogliconato desidratase</i>	63,000
<i>2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase</i>	22,000
<i>gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>	41,000
<i>fosfogliceratoquinase</i>	44,000
<i>fosfogliceratomutase</i>	26,000
<i>enolase</i>	45,000
<i>piruvato quinase</i>	57,000
<i>piruvato descaboxilase</i>	59,998
<i>álcool desidrogenase</i>	38,000

Comparando-se os géis desta tese com os de AN *et al.* (1991) pode-se observar que nas fermentações onde oscilações foram observadas, houve uma intensificação da banda relativa à enzima 2 Ceto 3 Desoxi - 6 Fosfogliconato aldolase. Analisando a rota metabólica seguida pela bactéria *Zymomonas mobilis*, mostrada na Figura 2.2, observa-se que a enzima 2-Ceto-3-Desoxi-6-Fosfogliconato aldolase atua na rota onde a molécula é convertida em piruvato e na seqüência em etanol ou na síntese de componentes celulares, podendo tal enzima ser um limitante no processo.

Uma vez que na literatura não foi encontrado nenhum trabalho que relacione tais enzimas nas diversas condições e comportamentos obtidos, o estudo realizado foi inédito, mas faz-se necessário uma investigação mais detalhada, com ferramentas mais precisas, como eletroforese 2D e isolamento das enzimas, não sendo o objetivo desta tese.

4.4 Resultados Experimentais *online*

As concentrações de células em alguns experimentos foram acompanhadas de forma *online* como descrito no Capítulo 3. Tal aquisição motivou o desenvolvimento do modelo de séries temporais lineares, uma vez que com os valores de concentrações de células disponíveis *online*, pode-se tentar inferir outras variáveis importantes. O programa para armazenamento de dados salva os valores da concentração de células (X) de minuto em minuto e nos gráficos mostrados a seguir nos resultados utilizou-se a média de 10 leituras.

Os dados experimentais obtidos encontram-se nos Apêndices C-I a C-VI, e são mostrados a seguir o comportamento das concentrações de células das fermentações FC01, FC03, FC04, FC06, FC08 (Figura 4.41 - 4.44). Os comportamentos dinâmicos observados nas fermentações foram coerentes com os dados obtidos de forma *offline* e de forma equivalente foram determinadas as taxas de crescimento.

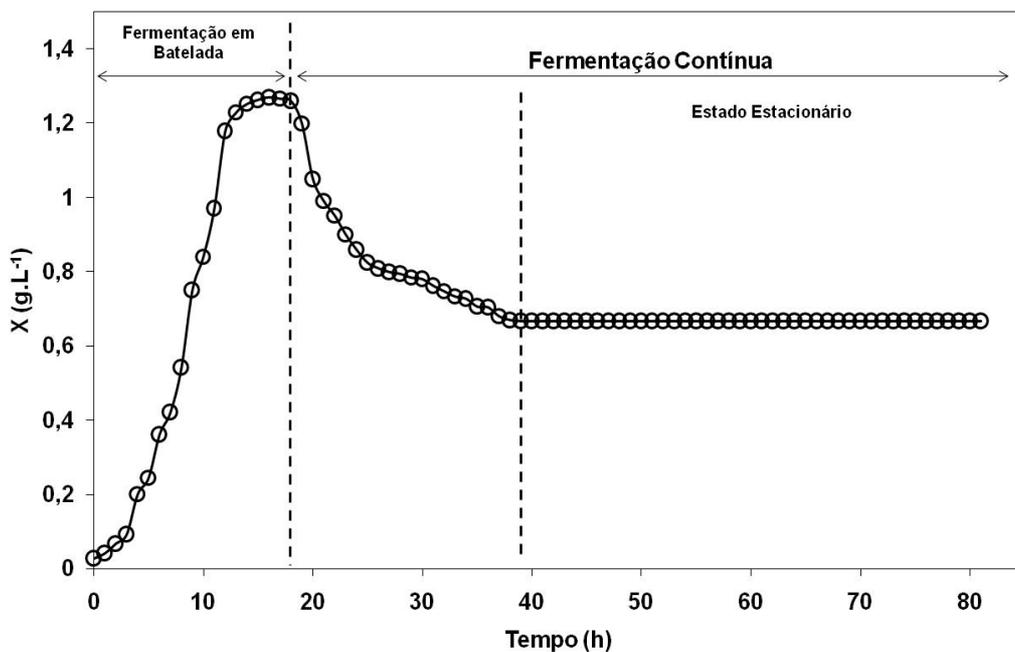


FIGURA 4.41 – Fermentação Contínua (FC01) – Dados *online*: (●) Células (X), $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, Agitação – 150 rpm, $\text{pH} = 5,0$, $S_0 = 100\text{ g.L}^{-1}$, $S_F = 100\text{ g.L}^{-1}$, $D = 0,06\text{ h}^{-1}$, $\bar{X}_{EE} = 0,668\text{ g.L}^{-1}$, $\mu = 0,301\text{ h}^{-1}$.

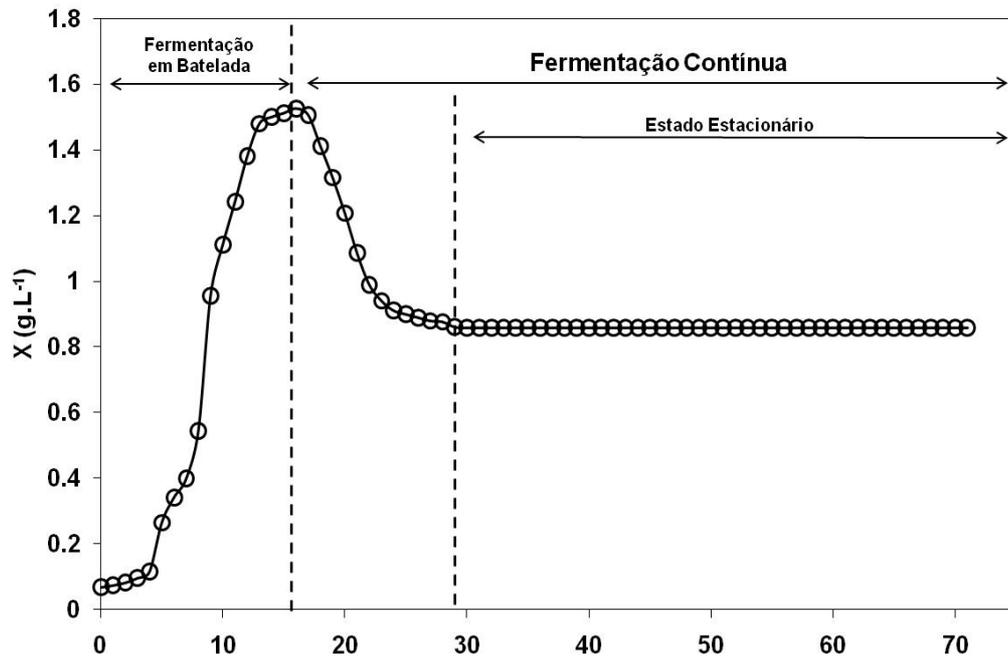


FIGURA 4.42 – Fermentação Contínua (FC03) – Dados *online*: (●) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 150 g.L⁻¹, S_F – 150 g.L⁻¹, $D = 0,06$ h⁻¹, $\bar{X}_{EE} = 0,859$ g.L⁻¹, $\mu = 0,262$ h⁻¹.

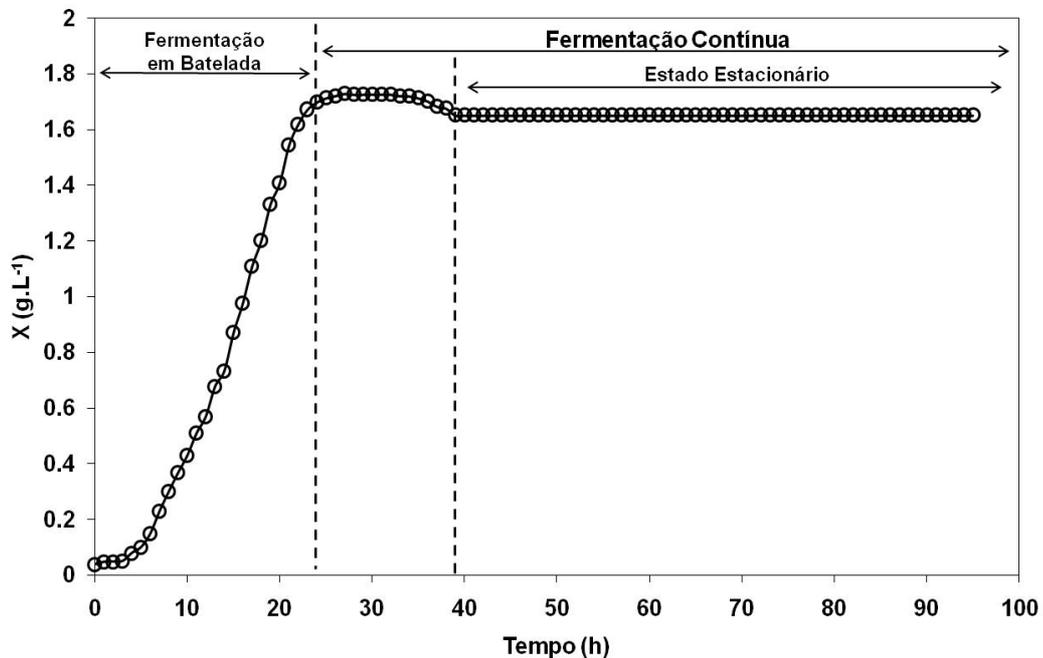


FIGURA 4.43 – Fermentação Contínua (FC04) – Dados *online*: (●) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 150 g.L⁻¹, S_F – 200 g.L⁻¹, $D = 0,06$ h⁻¹, $\bar{X}_{EE} = 1,651$ g.L⁻¹, $\mu = 0,220$ h⁻¹.

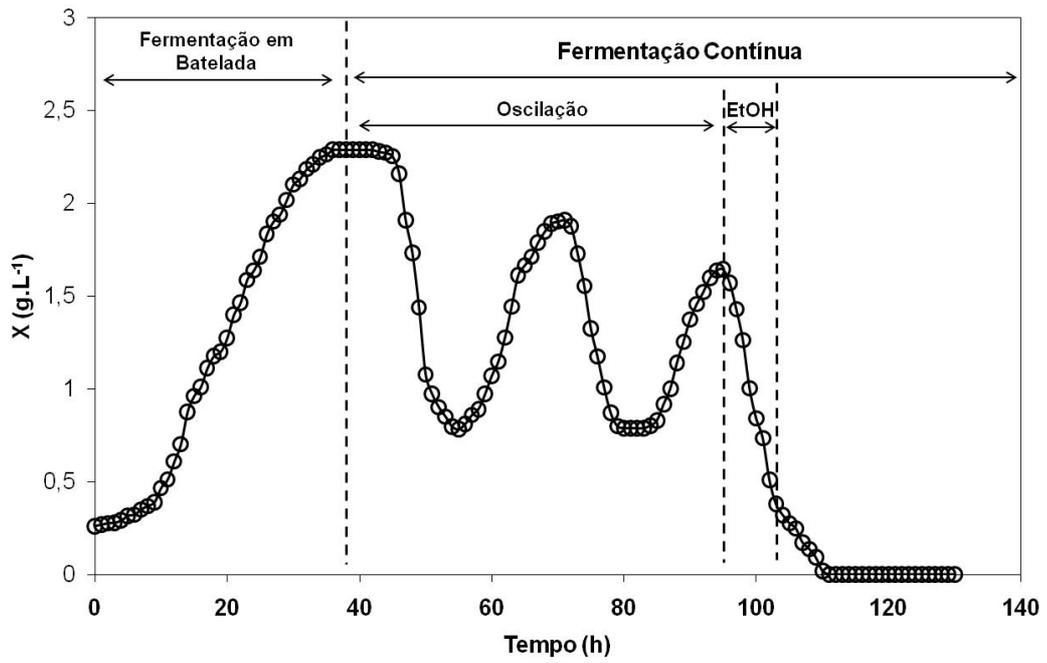


FIGURA 4.44 – Fermentação Contínua (FC06/FC08) – Dados *online*: (●) Células (X), T – 30 °C, Agitação – 150 rpm, pH – 5,0, S_0 – 200 g.L⁻¹, S_F – 200 g.L⁻¹, $D = 0,06$ h⁻¹, $\mu = 0,076$ h⁻¹.

Capítulo 5 - Modelagem Matemática

5.1 Modelo Fenomenológico

O modelo fenomenológico de LI *et al.* (1997) foi utilizado nesta tese, inicialmente, por se mostrar satisfatório em condições diversas de comportamentos dinâmicos. Tal modelo, consiste em um conjunto de cinco equações diferenciais (Equações 5.1 – 5.5), sendo as três primeiras equações resultantes do balanço de massa, considerando a operação do biorreator em modo contínuo. As duas outras equações são resultantes da diferenciação das médias ponderadas de primeira e segunda ordem da variação da concentração de etanol $Z(t)$ e $W(t)$ em relação ao tempo.

$$\frac{dX}{dt} = [\mu(S, P, Z) - D] \cdot X \quad 5.1$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot [S_F - S] - \frac{Q_P \cdot X}{Y_{P/S}} \quad 5.2$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_P \cdot X - D \cdot P \quad 5.3$$

$$\frac{dZ}{dt} = \beta \cdot [W - Z] \quad 5.4$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta \cdot [Q_P \cdot X - D \cdot P - W] \quad 5.5$$

O efeito de inibição para o tempo de atraso foi estabelecido como o efeito da média ponderada de segunda ordem da taxa de variação da concentração de etanol, Z , foi posposto conforme a equação 5.6 (LI *et al.*, 1997):

$$Z(t) = \int_{-\infty}^t \left. \frac{dP}{dt} \right|_r \cdot \psi_z(\tau) d\tau \quad 5.6$$

O peso para a taxa de variação da concentração na história $\psi_z(\tau)$ é dado por:

$$\psi_z(\tau) = \beta^2(t - \tau).e^{-\beta.(t-\tau)} \quad 5.7$$

onde τ é o tempo na história e t é o tempo atual. O máximo de $\psi_z(\tau)$ acontece a $\tau = t - 1/\beta$, ou seja, $1/\beta$ horas antes do tempo atual t . Em outras palavras, a taxa de mudança da concentração de etanol à qual ocorre em $1/\beta$ horas antes tem a influência mais significativa no desempenho atual. O parâmetro β indica a magnitude do tempo de atraso pelo efeito de inibição da história.

Sendo $Z(t)$ a média ponderada da velocidade de mudança da concentração de etanol, definido na eq. 5.6, é suposto que quando ela é positiva, há inibição do crescimento das células em um tempo t , quando negativa não tem nenhum efeito no crescimento da célula em um tempo t . Normalmente, uma função parcial não é desejada em procedimentos de estimação de parâmetro, desde que, embora elas sejam contínuas (neste caso), elas não são continuamente diferenciáveis. A descontinuidade na derivada pode causar problema para um algoritmo de estimação. Além disso, a falta de continuidade na derivada pode dificultar a análise da dinâmica do processo. Para facilitar o procedimento de estimação de parâmetros, uma função hiperbólica continuamente diferenciável, $f_\mu(Z(t))$, é introduzido para representar o efeito aproximado de $Z(t)$ no crescimento celular (LI *et al.*, 1997).

$$f_\mu(Z(t)) = \frac{1}{2} \cdot \left(1 - \frac{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} - e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} + e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}} \right) \quad 5.8$$

A taxa específica de crescimento dinâmica $\mu(S, P, Z)$ é obtida pelo produto da taxa específica de crescimento instantânea $\mu(S, P)$ e pela função $f_\mu(Z(t))$:

$$\mu(S, P, Z) = \mu(S, P) \cdot f_\mu(Z(t)) \quad 5.9$$

A taxa de crescimento instantânea é dada por:

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} S \left[1 - \frac{P}{P_{ma}} \right] f(P)}{k_s + \frac{S}{g(S)}} \quad 5.10$$

onde as funções $g(S)$ e $f(P)$ são:

$$\begin{aligned} g(S) &= 0 & \text{se} & \quad S \leq S_i, \\ g(S) &= \left(\frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i) + (S - S_i)} \right) & \text{se} & \quad S \geq S_i \end{aligned} \quad 5.11$$

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 & \text{se} & \quad P \leq P_{ob} \\ f(P) &= 1 - \left(\frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}} \right)^b & \text{se} & \quad P_{ob} \leq P < P_{mb} \\ f(P) &= 0 & \text{se} & \quad P > P_{mb} \end{aligned} \quad 5.12$$

A taxa específica de produção de etanol é expressa por:

$$Q_P = \frac{Q_{P\max} \cdot S}{k_{mP} + S} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{me}} \right)^\alpha \right) \quad 5.13$$

De forma similar ao que foi mostrado na equação 5.6, efeito de inibição com retardo modelado como o efeito da média ponderada de primeira ordem da taxa de variação da concentração de etanol foi posposto como o termo W:

$$W(t) = \int_{-\infty}^t \frac{dP}{dt} \Big|_{\tau} \psi_w(\tau) d\tau \quad 5.14$$

O peso para a taxa de variação da concentração na história $\psi_w(\tau)$ é dado por:

$$\psi_w(\tau) = \beta \cdot e^{-\beta \cdot (t-\tau)} \quad 5.15$$

O modelo proposto por LI *et al.* (1997) considera um efeito de retardo na inibição do crescimento causada pelas variações da concentração de etanol. O modelo cinético também considera efeitos de limitação e inibição pelo substrato. As taxas de crescimento e de produção estão desacopladas, enquanto a taxa de consumo de glicose depende da taxa de produção de etanol.

Os parâmetros do modelo - α , β , λ , δ , a , b , Q_{Pmax} e $Y_{P/S}$ - foram estimados na presente tese por tentativa e erro comparando-se por simulação os dados experimentais obtidos e as curvas do modelo. Houve a tentativa da estimação dos parâmetros utilizando-se o programa Estima (KENNEDY & EBERHART, 1995), com a utilização da abordagem Particle Swarm ou enxame de partículas, porém a tentativa não foi bem sucedida. A concentração de glicose na alimentação (S_F) foi definida pelo processo. Já os valores de P_{ob} , P_{ma} , P_{mb} , P_{me} , K_s , K_i , S_i , K_{mp} , e μ_{max} foram os mesmos utilizados da literatura (MCLELLAN *et al.*, 1999, VEERAMALLU e AGRAWAL, 1990 e LEE e ROGERS, 1983) (Tabela 5.1).

Inicialmente tentou-se estimar os parâmetros do modelo na condição das fermentações onde oscilações foram obtidas (FC05 e FC06). A etapa em batelada foi levada em consideração, mas a estimação não foi bem sucedida, não sendo possível obter um único conjunto de parâmetros para representar as condições de batelada e contínuo com oscilação. Desta forma, foi necessária a separação dos dados experimentais em dois estágios: 1. Estágio inicial - dados em batelada e 2. Estágio final – dados do processo contínuo com oscilação (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Valores dos parâmetros utilizados no modelo para as fermentações FC05 e FC06 com *Zymomonas mobilis*.

Parâmetros obtidos na Literatura		Parâmetros obtidos por Estimação		
Parâmetros	Valores	Parâmetros	Etapa Inicial	Etapa Final
μ_{max}	0,41	a	0,410	0,310
P_{ob}	59	b	1,70	2,10
P_{ma}	217	α	1,3	10,8
P_{mb}	108	β	0,06	0,100
P_{me}	120	λ	3,8	21,05
S_i	80	δ	7,53	0,53
K_i	200	$Q_{P,max}$	7,6	2,5
K_s	0,5	$Y_{p/s}$	0,486	0,495
K_{mp}	0,2			
S_f	200			

Os dados experimentais das fermentações FC05 e FC06 (etapa inicial e final) foram confrontados com os valores de simulação, conforme as Figuras 5.1–5.4 respectivamente. Observa-se que o modelo não correspondeu bem aos dados experimentais das concentrações de células(X), glicose(S) e etanol (P) na etapa inicial das fermentações FC05 e FC06. A's amplitudes da concentração de substrato do modelo na oscilação (etapa final) das fermentações FC05 e FC06 não correspondem à amplitude dos dados experimentais. Isso pode ter ocorrido por um procedimento ineficiente de estimação de parâmetros ou pelo fato de a estrutura ou as suposições do modelo não representarem efetivamente o comportamento experimental do processo.

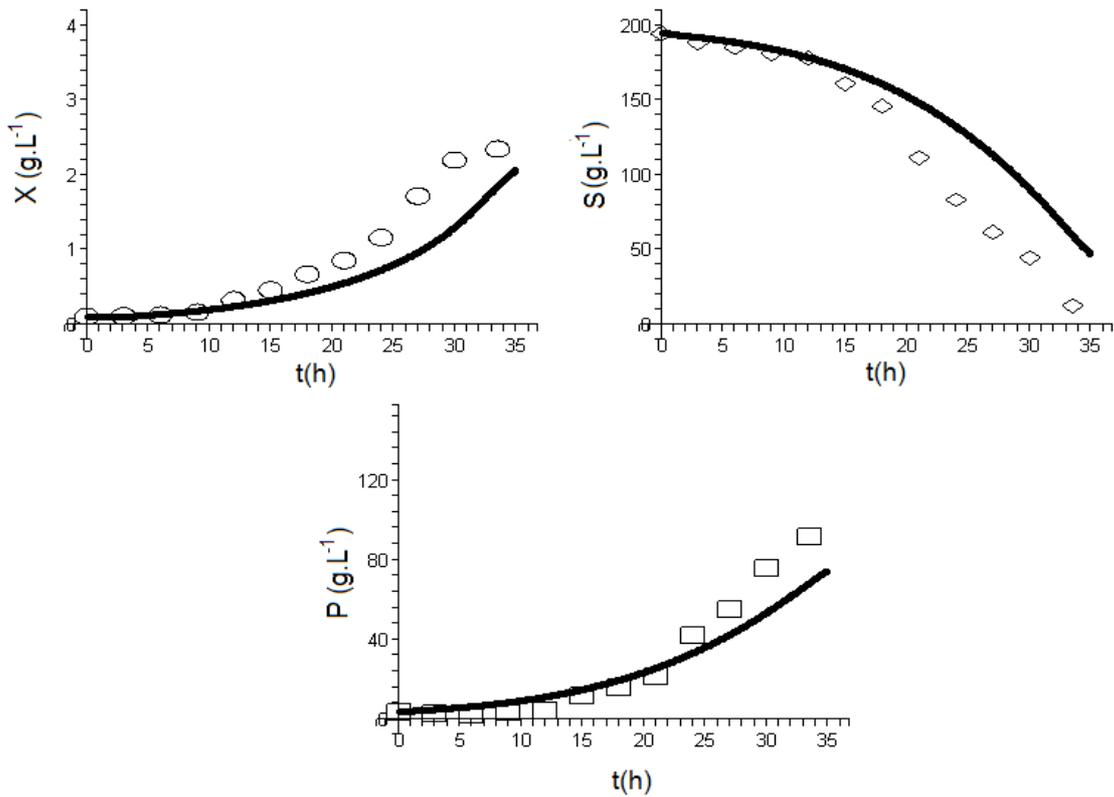


Figura 5.1: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC05 (Etapa Inicial) e o Modelo Fenomenológico.

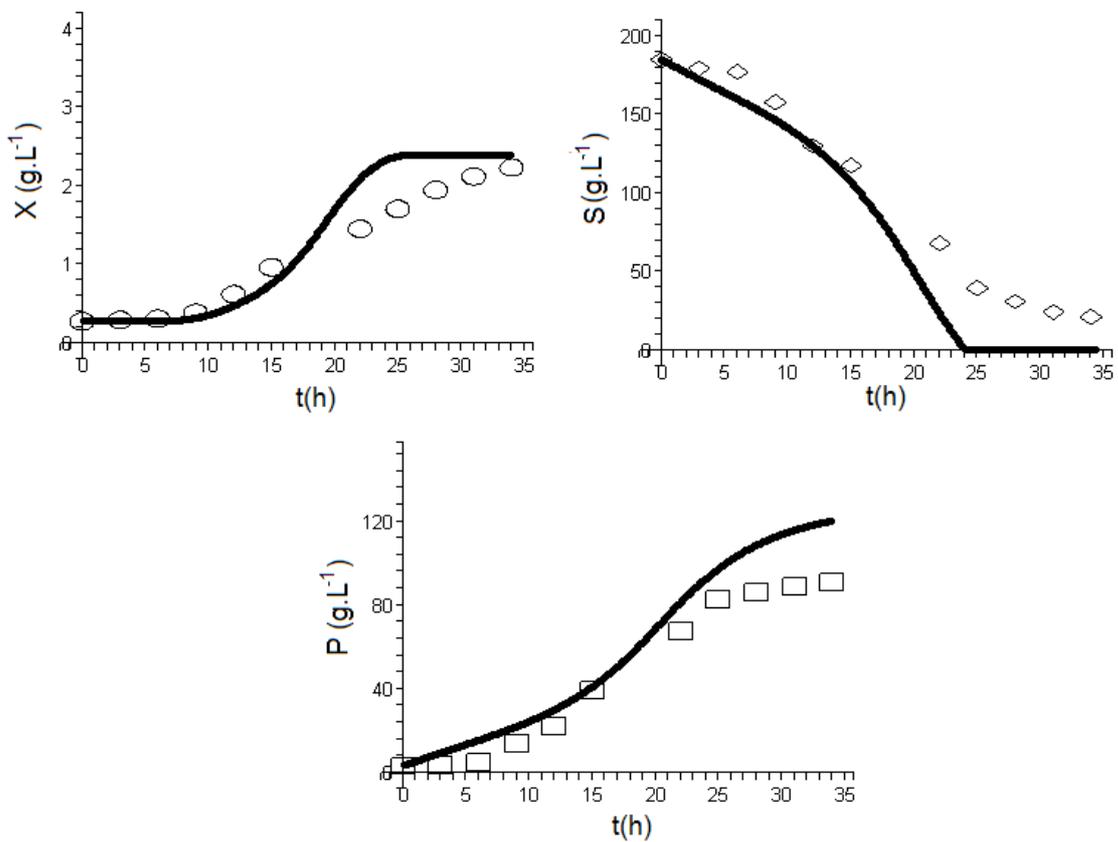


Figura 5.2: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC06 (Etapa Inicial) e o Modelo Fenomenológico

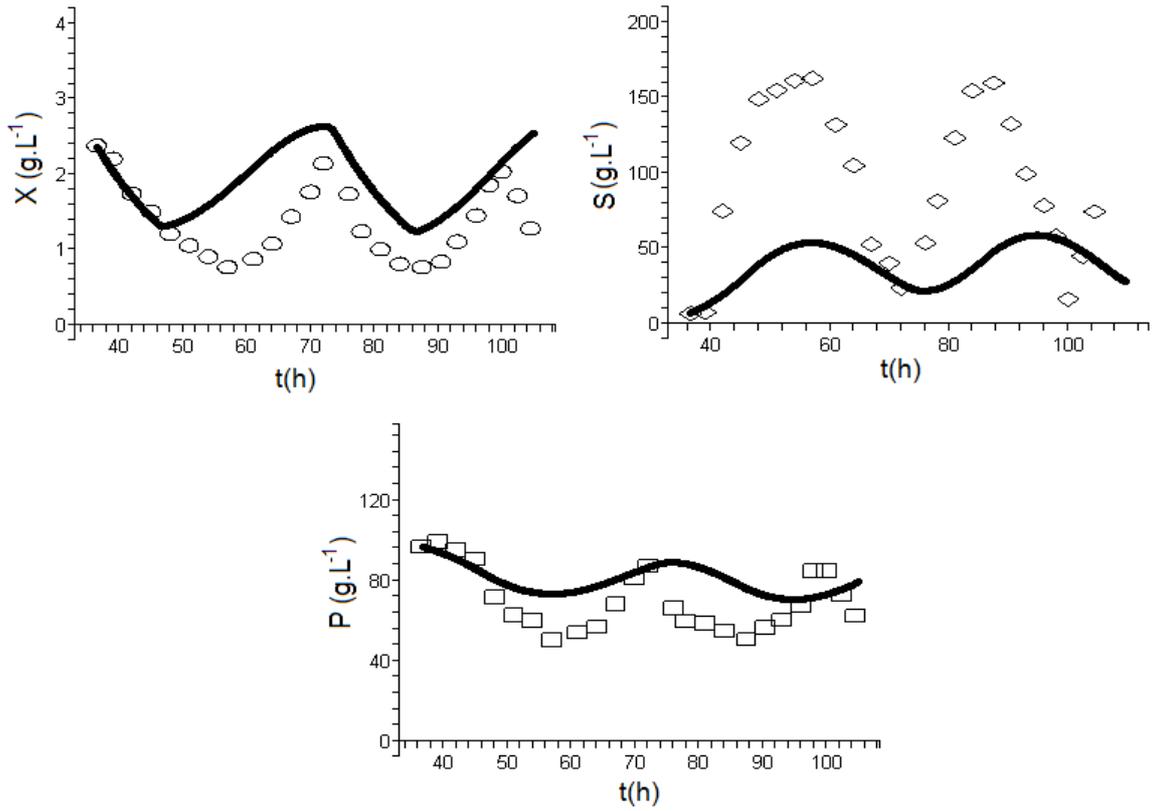


Figura 5.3: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC05 (Etapa Final) e o Modelo Fenomenológico.

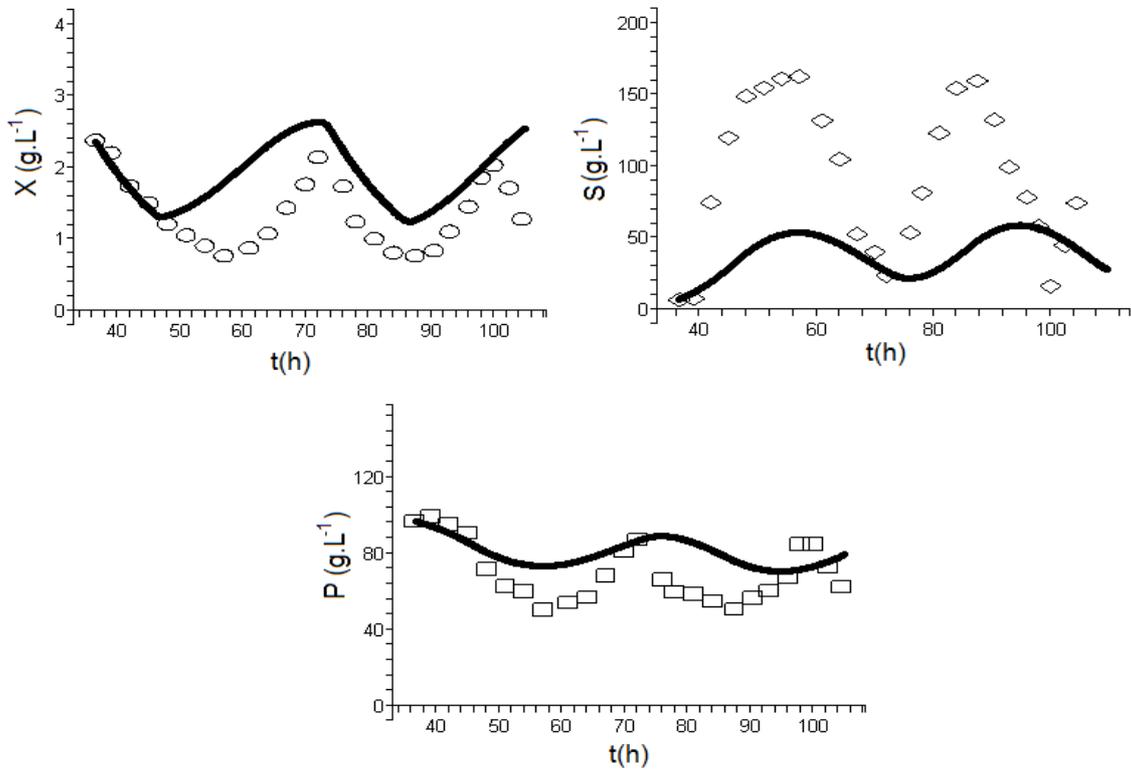


Figura 5.4: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC06 (Etapa Final) e o Modelo Fenomenológico.

Para as fermentações FC01 – FC04 a etapa de batelada foi levada em consideração juntamente com a etapa contínua. O modelo conseguiu prever condições de estados estacionário, contudo apresentou desvios dos dados experimentais. Os parâmetros estimados, também por tentativa e erro encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores dos parâmetros utilizados no modelo para fermentações FC01, FC02, FC03 e FC04 com *Zymomonas mobilis*

Parâmetros obtidos na Literatura		Parâmetros obtidos por Estimação	
Parâmetros	Valores	Parâmetros	Valores
μ_{max}	0,41	a	2.687
P_{ob}	59	b	0.051
P_{ma}	217	α	3.32
P_{mb}	108	β	1.0
P_{me}	120	λ	1.0
S_i	80	δ	0.568
K_i	200	$Q_{P,max}$	4.9
K_s	0,5	$Y_{p/s}$	0.232
K_{mp}	0,2		
S_f	200		

Os dados experimentais das fermentações FC01 - FC04 foram confrontados com o modelo, conforme as Figuras 5.5–5.8.

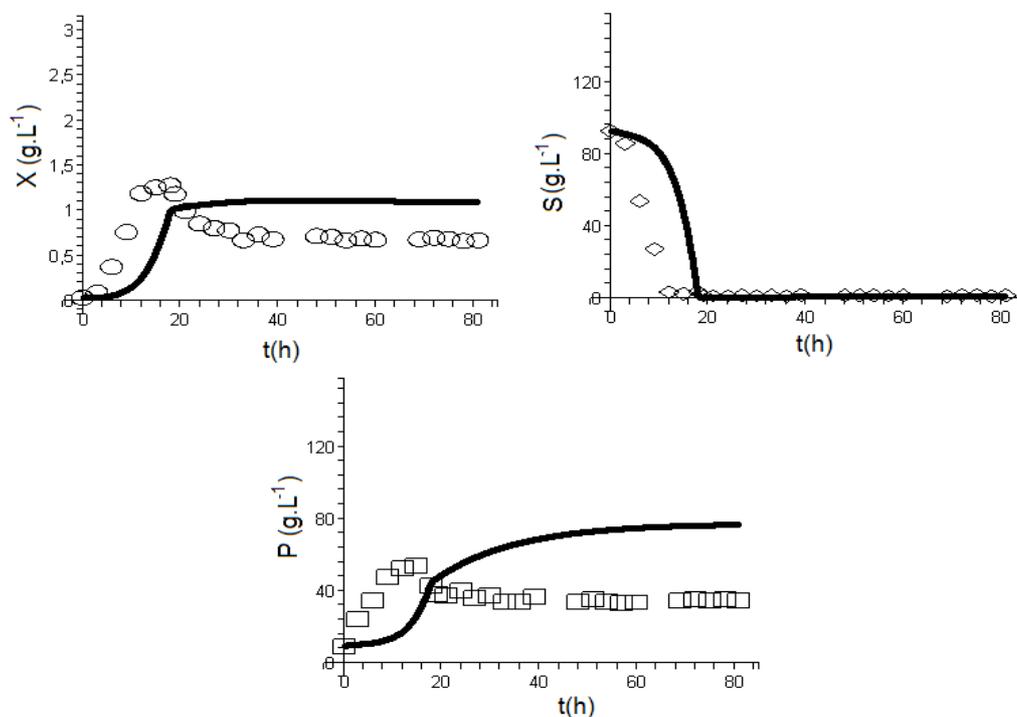


Figura 5.5: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC01 e o Modelo Fenomenológico.

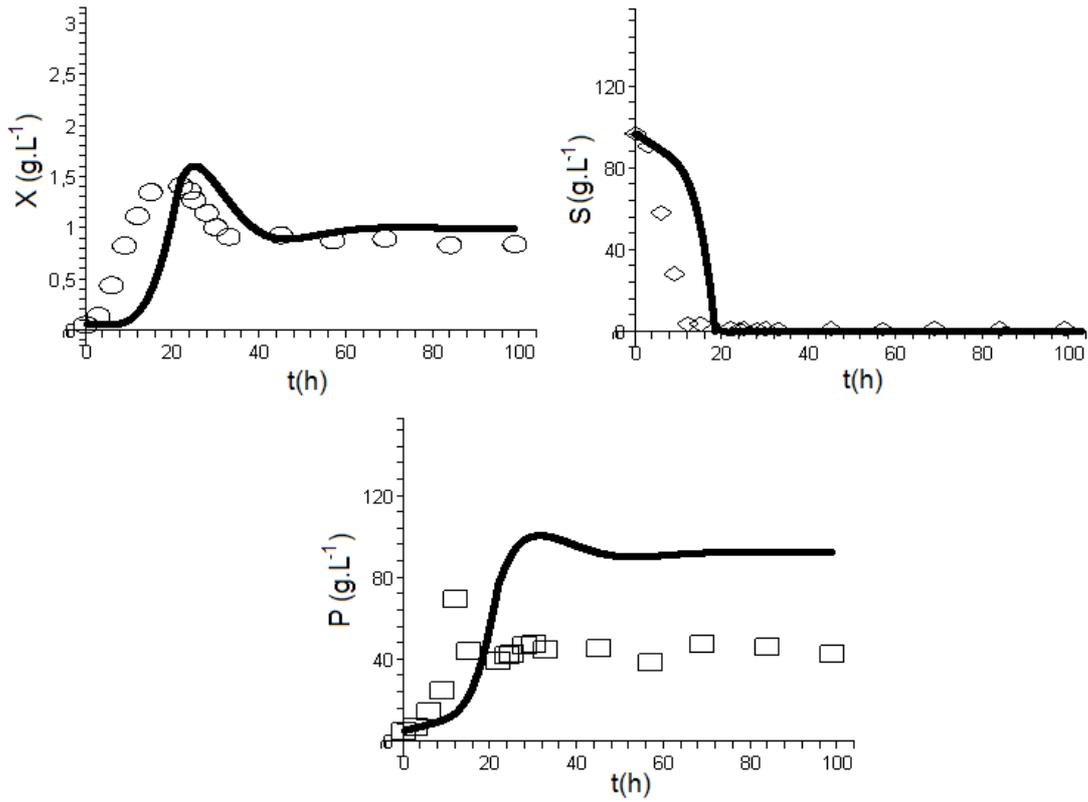


Figura 5.6: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC02 e o Modelo Fenomenológico.

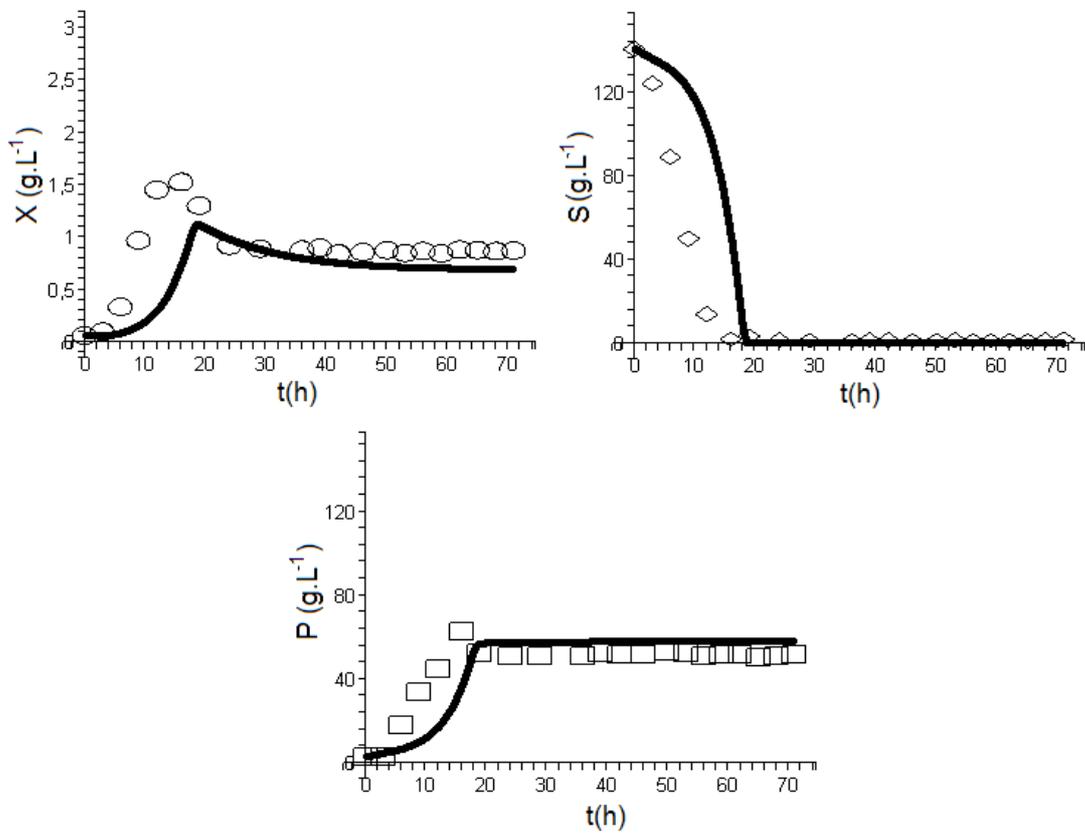


Figura 5.7: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC03 e o Modelo Fenomenológico.

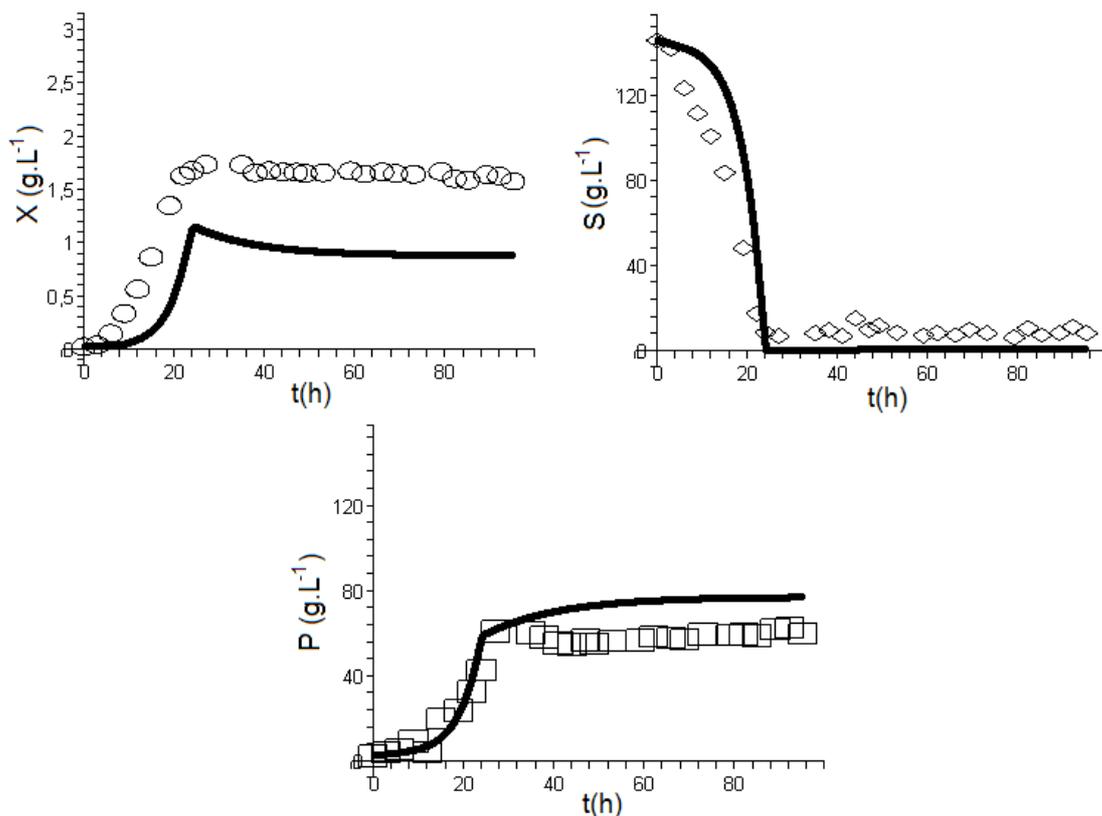


Figura 5.8: Confronto dos dados experimentais de células (X), glicose (S) e etanol (P) da fermentação FC04 e o Modelo Fenomenológico.

Analisando os resultados da modelagem para cada fermentação em que estado estacionário foi obtido, verifica-se que o modelo matemático não foi capaz de se ajustar aos dados experimentais para todas as variáveis ao mesmo tempo, ou seja, às vezes um melhor ajuste de concentração de glicose era conseguido às expensas de uma piora na representação da concentração de etanol. Como os experimentos tiveram valores de concentrações de glicose, no meio reacional e de alimentação, diferentes, observou-se uma diferenciação no patamar das concentrações de células e etanol da etapa contínuas das fermentações FC05 –FC07. O acoplamento entre os parâmetros dificulta bastante a estimação de parâmetros. As condições experimentais no contínuo são diferentes da batelada, desta forma os microorganismos apresentam comportamentos não observados na batelada, o que requer, como já mencionado na discussão para as fermentações oscilatórias, uma mudança no modelo e não somente

uma re-estimação de parâmetros. Observa-se que pelo modelo utilizado não foi possível obter um único conjunto de parâmetros para comportamentos dinâmicos variados; desta forma, visando ao monitoramento do processo, foram desenvolvidos modelos simples, lineares de séries temporais (MLST), como descrito a seguir.

5.2 Modelo de Séries Temporais Lineares

A disponibilidade de leituras *online*, a cada minuto, de concentrações de células – como apresentado nos Capítulos 3 e 4 – estimulou o desenvolvimento de modelos para inferência de outras variáveis importantes. Modelos de inferência lineares de séries temporais (abreviados aqui por MLST) foram então investigados para a inferência da concentração futura de glicose a partir de concentrações de células (X) e da taxa de diluição (D) e também de valores passados de concentração de glicose.

Considerando-se inicialmente fermentações em batelada, foram estudados modelos na forma:

$$A(q) \cdot S(k) = B(q) \cdot X(k - \theta) + e(k) \quad 5.16$$

sendo

$$A(q) = 1 + a_1 \cdot q^{-1} + a_2 \cdot q^{-2} + a_3 \cdot q^{-3} + \dots + a_{ny} \cdot q^{-ny} \quad 5.17$$

$$B(q) = 1 + b_1 \cdot q^{-1} + b_2 \cdot q^{-2} + b_3 \cdot q^{-3} + \dots + b_{nu} \cdot q^{-nu} \quad 5.18$$

onde a variável S no tempo discreto k é dada por uma combinação linear de valores de S e X passados; θ é o tempo morto; o termo ' e ' se refere a uma fonte de ruído branco; os coeficientes dos polinômios A e B são parâmetros (constantes) a determinar e q é um

operador de deslocamento. Um modelo de inferência (MLST) na forma da Eq. 5.16 será designado aqui pela seqüência $ny nu \theta$.

Empregando-se o System Identification Toolbox Versão 6.0.1 (R14), MATLAB, o modelo MLST 441 foi obtido (Eq. 5.19), adotando-se os dados da fermentação em batelada FD01, dados estes, cujo número foi aumentado usando-se interpolação *spline* com um período de amostragem de 0,3 h, para a estimação dos parâmetros do modelo.

$$\hat{S}(k) = 3,824 \cdot S(k-1) - 5,537 \cdot S(k-2) + 3,6 \cdot S(k-3) - 0,887 \cdot S(k-4) + 0,2849 \cdot X(k-1) - 1,546 \cdot X(k-2) + 2,312 \cdot X(k-3) - 1,052 \cdot X(k-4) \quad 5.19$$

tal que o “^” indica valor estimado.

Os dados experimentais da fermentação FD02 foram usados à guisa de validação e houve praticamente uma sobreposição entre os valores preditos pelo modelo MLST 441 e os valores de substrato reais (FD02), conforme mostrado na Figura 5.9.

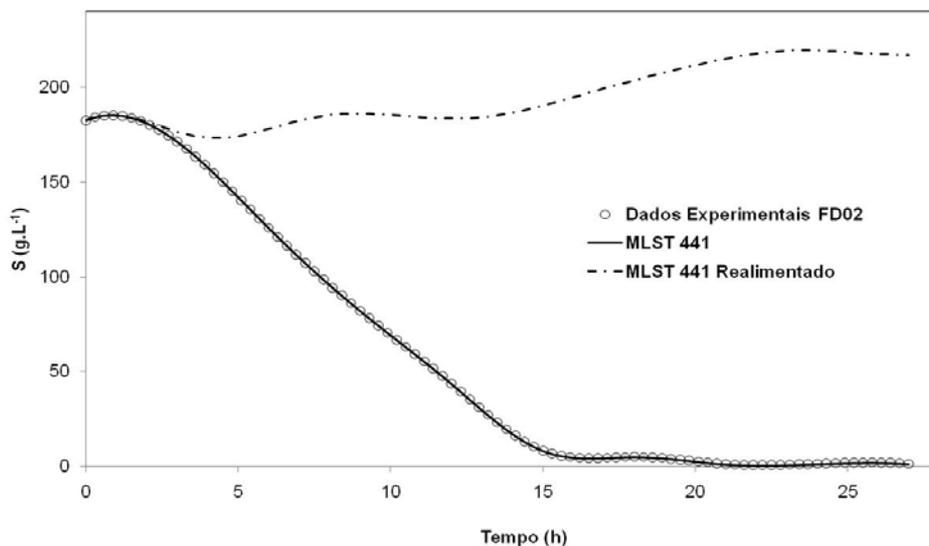


Figura 5.9: Obtenção do modelo MLST 441 confrontado com os dados experimentais da fermentação em batelada (FD02).

A Figura 5.9 exibe também a curva para o modelo MLST 441 Realimentado, cujo desenvolvimento será explanado na sequência

O sucesso inicial do modelo MLST estimulou a investigação do uso do modelo para situações mais realistas, em que não houvesse medidas de substrato disponíveis (Figura 5.9), de modo que a própria saída do modelo fosse realimentada ao longo do tempo. A estrutura do modelo para uso sem e com realimentação é ilustrada na Figura 5.10, ressaltando-se que esta figura considera um modelo mais genérico para o qual a variável D (nula para as fermentações em batelada) está incluída.

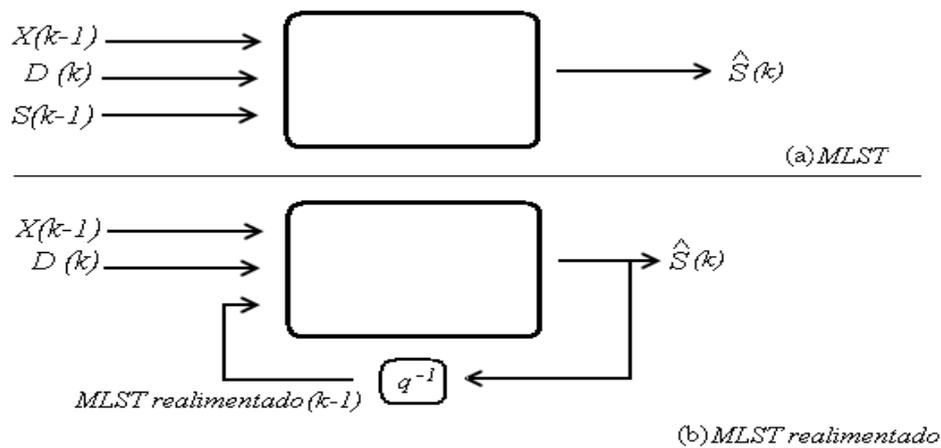


Figura 5.10: Configuração adotada para o modelo sem realimentação (a) e com realimentação (b).

Como pode ser apreciado na Figura 5.9 o modelo MLST 441 Realimentado apresentou um grande desvio dos dados reais após algumas horas de monitoramento, tornando o seu uso inadequado para o caso com realimentação. Optou-se, então, por gerar um modelo MLST com polinômio A de grau 1 (MLST 141), por depender de menos valores atrasados da saída (substrato), de modo a tentar diminuir o efeito da realimentação na predição. Obteve-se então o modelo:

$$\hat{S}(k) = 0,9915 S(k-1) - 1229 X(k-1) + 3577 X(k-2) - 3518 X(k-3) + 1170 X(k-4) \quad 5.20$$

Na Figura 5.11, observou-se que quando a saída do modelo era realimentada (MLST 141 Realimentado) pelo próprio modelo (MLST 141), novamente ocorria um desvio dos dados reais depois de alguns tempos de amostragem.

A Figura 5.11 exibe também a curva para o modelo MLST 141 Corrigido, cujo desenvolvimento será elucidado na sequência

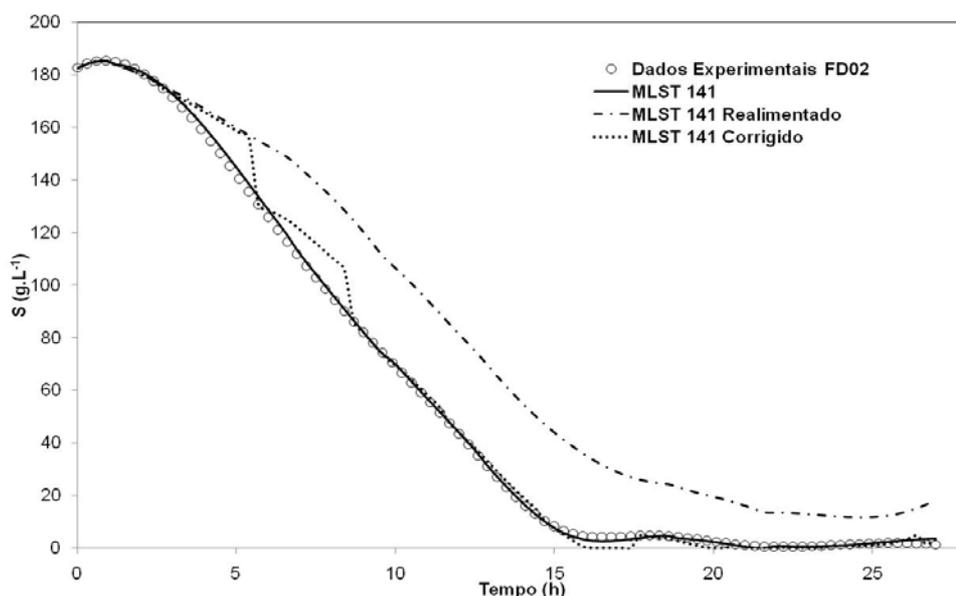


Figura 5.11: MLST 141, MLST 141 Realimentado, MLST 141 Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FD02.

Desta forma, uma nova configuração de realimentação foi proposta, porém chamada de MLST Corrigido, onde foram feitas atualizações a cada 3 h dos valores reais obtendo-se uma melhoria considerável no acompanhamento da concentração de substrato pelo modelo corrigido (MLST 141 Corrigido), conforme pode ser verificado na Figura 5.11. Com a correção proposta, a saída do modelo realimenta a sua entrada, mas a cada 10 tempos de amostragem o valor real de concentração de substrato é empregado na entrada, como ilustrado através de uma chave lógica na Figura 5.12.

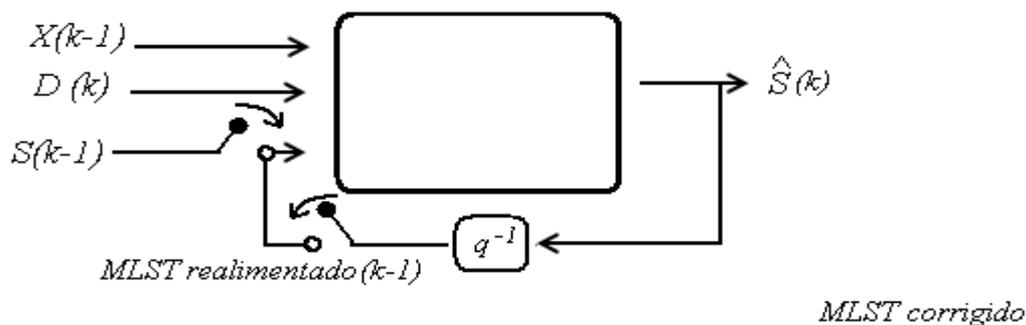


Figura 5.12: Configuração adotada para o sistema, com atualizações de 3h modelo MLST corrigido.

Os procedimentos apresentados até aqui foram realizados para as fermentações em batelada. Quando dados de fermentações contínuas FC02 (interpolados com amostragem de 0,5 h) foram introduzidas no modelo MLST 141, os resultados foram insatisfatórios como pode ser percebido na Figura 5.13. Tal resultado pode ser justificado devido à fato da operação haver mudado de batelada para contínuo, ao tempo de amostragem ser diferente (0,5 h para as FCs e não mais 0,3 h, como nas FDs) e a concentração inicial de substrato ter sido bem superior àquelas das bateladas simples (Figura 5.13).

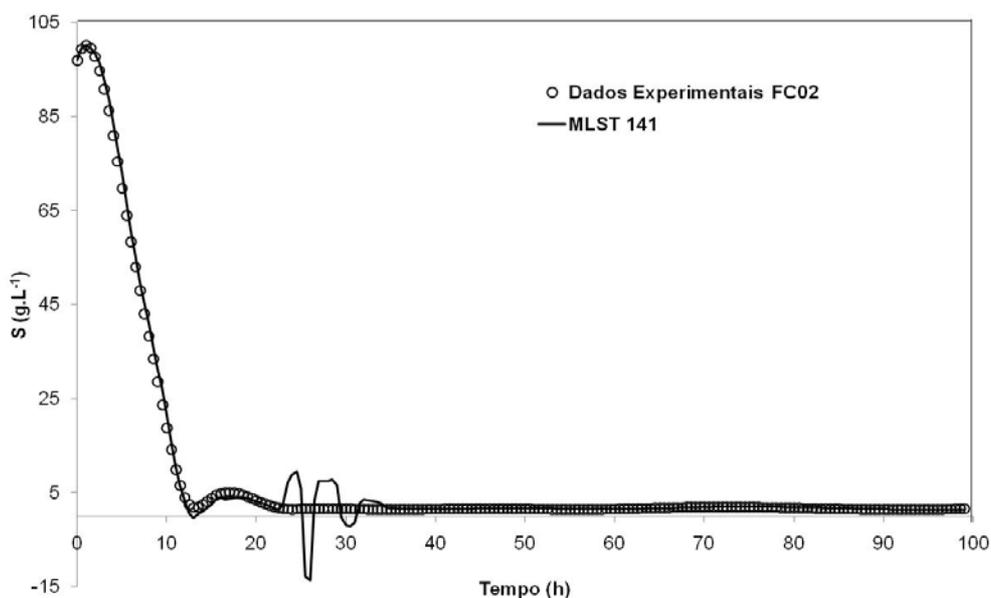


Figura 5.13: MLST 141 versus Dados Experimentais da Fermentação FC02.

Desta forma, um novo modelo foi desenvolvido, havendo a inclusão da variável $D(k)$, que corresponde à taxa de diluição (no caso de batelada este valor era zero; nas fermentações contínuas, $0,06 \text{ h}^{-1}$) e modificou-se também o polinômio B para grau 0, resultando assim no modelo doravante chamado MLST 1111:

$$A(q)S(k) = B1(q) \cdot X(k-1) + B2(q) \cdot D(k) + e(k) \quad 5.21$$

Os parâmetros foram estimados no STATISTICA 6.0 e os dados de entrada/saída foram normalizados. Utilizou-se ainda para treinamento, 2/3 dos dados experimentais e 1/3 para validação. O modelo MLST 1111 obtido foi:

$$\hat{S}(k) = 1,003 \cdot S(k-1) + 0,012 \cdot D(k) - 0,007 \cdot X(k-1) \quad 5.22$$

Os valores de substrato preditos um passo adiante pelo modelo MLST 1111 praticamente se sobrepuseram aos dados experimentais das fermentações FC01 – FC7 (O número de dados experimentais foi aumentado através da interpolação *spline* em todo o estudo). No entanto, quando a saída do modelo foi realimentada, o modelo apresentou desvios dos dados reais. Novamente, a atualização a cada 4 tempos de amostragem (2 h) da entrada de substrato garantiu ao modelo um acompanhamento da concentração de substrato (Figura 5.14-5.20).

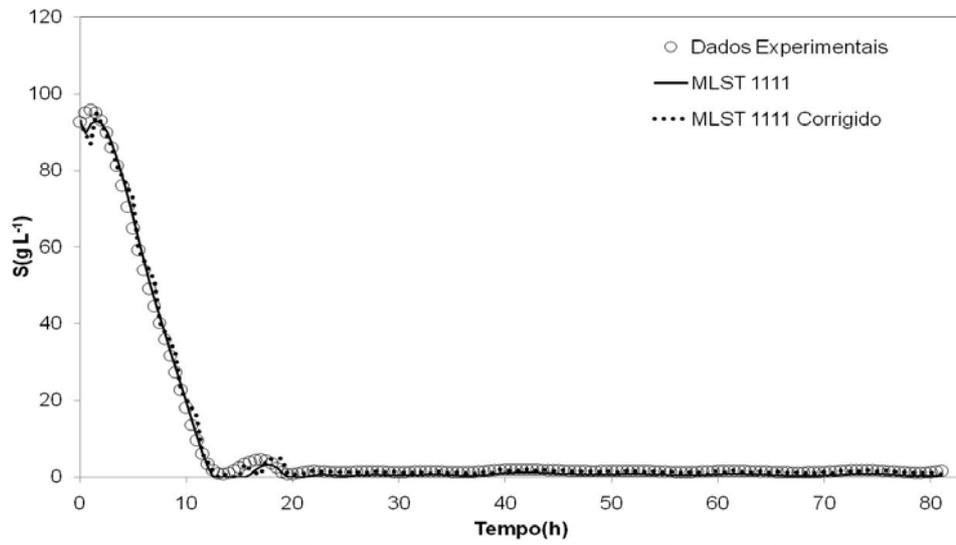


Figura 5.14: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC01.

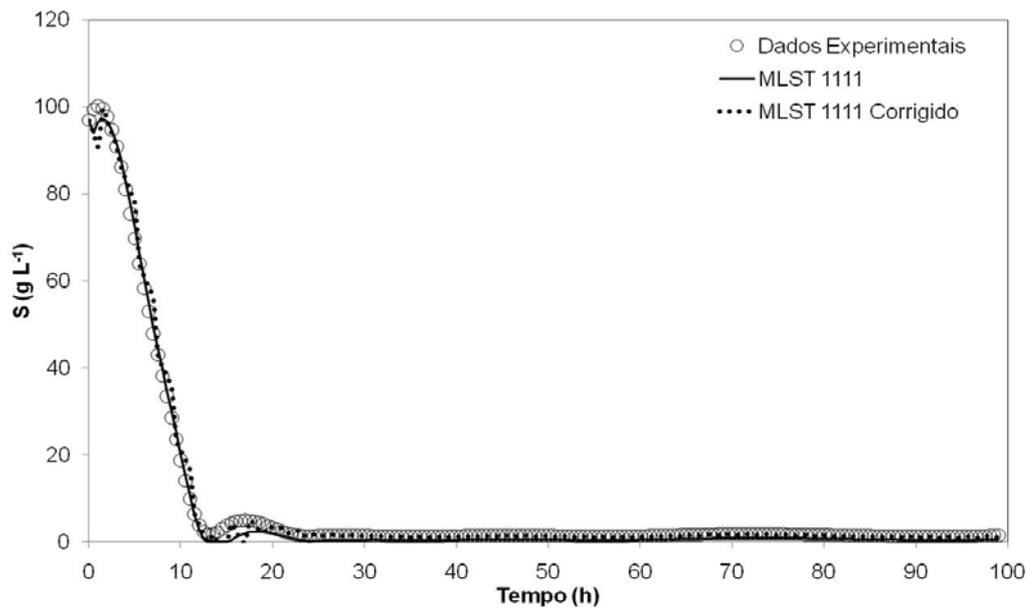


Figura 5.15: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC02.

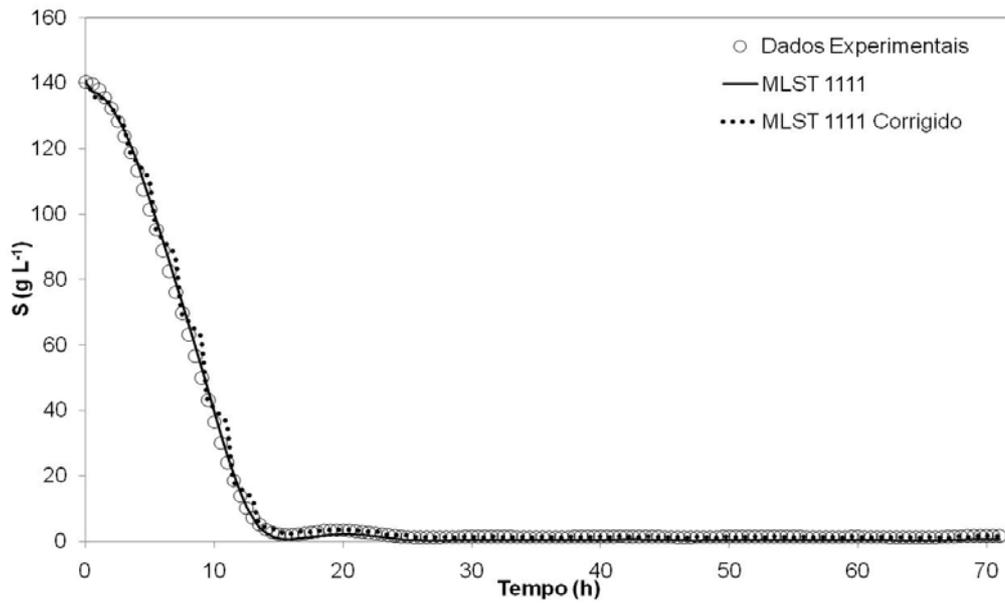


Figura 5.16: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC03.

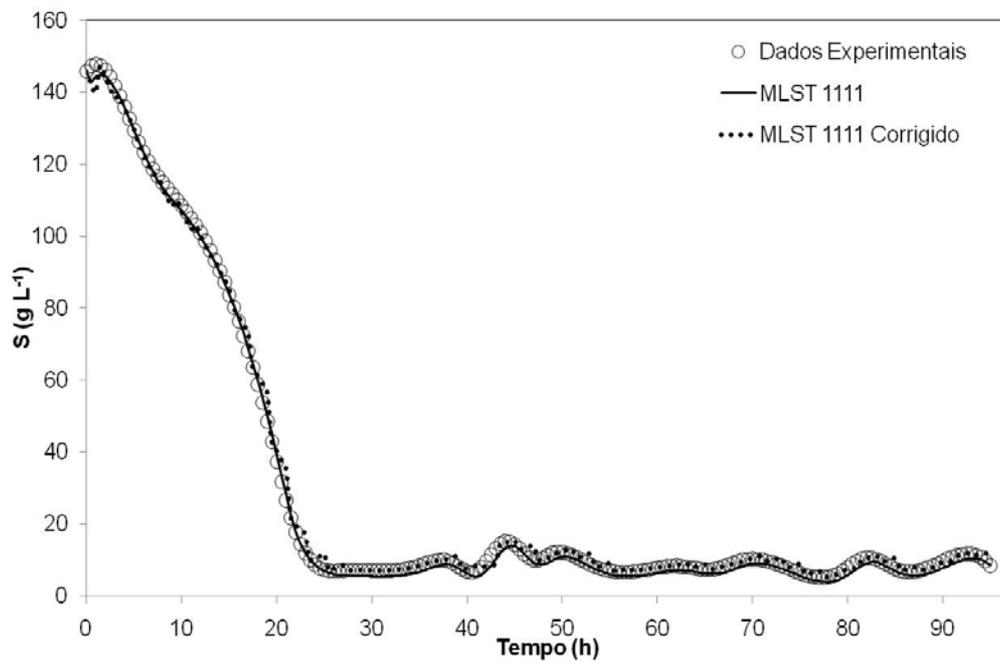


Figura 5.17: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC04.

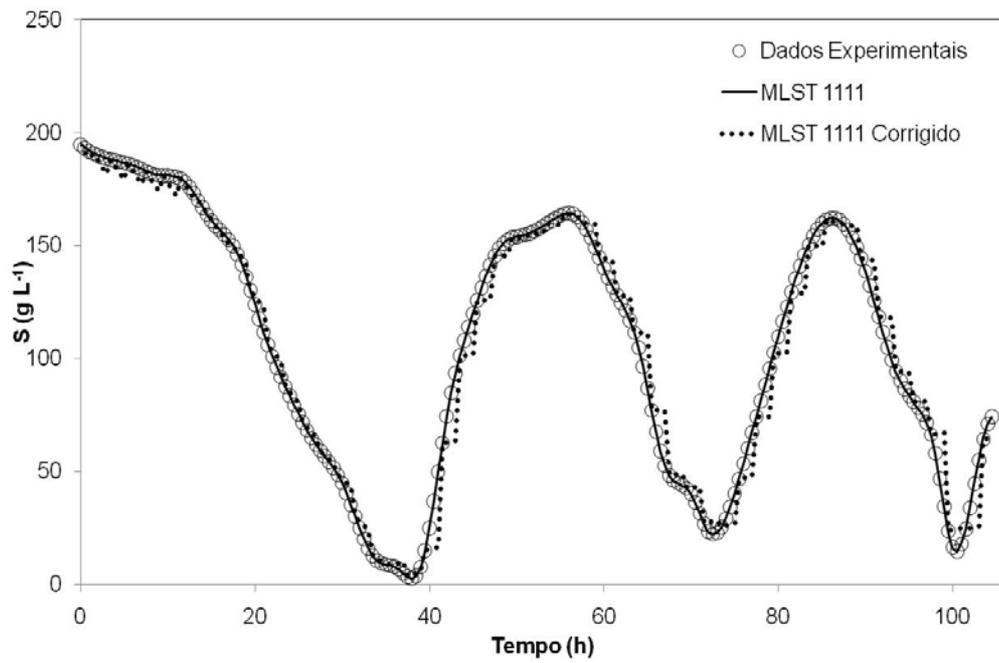


Figura 5.18: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC05.

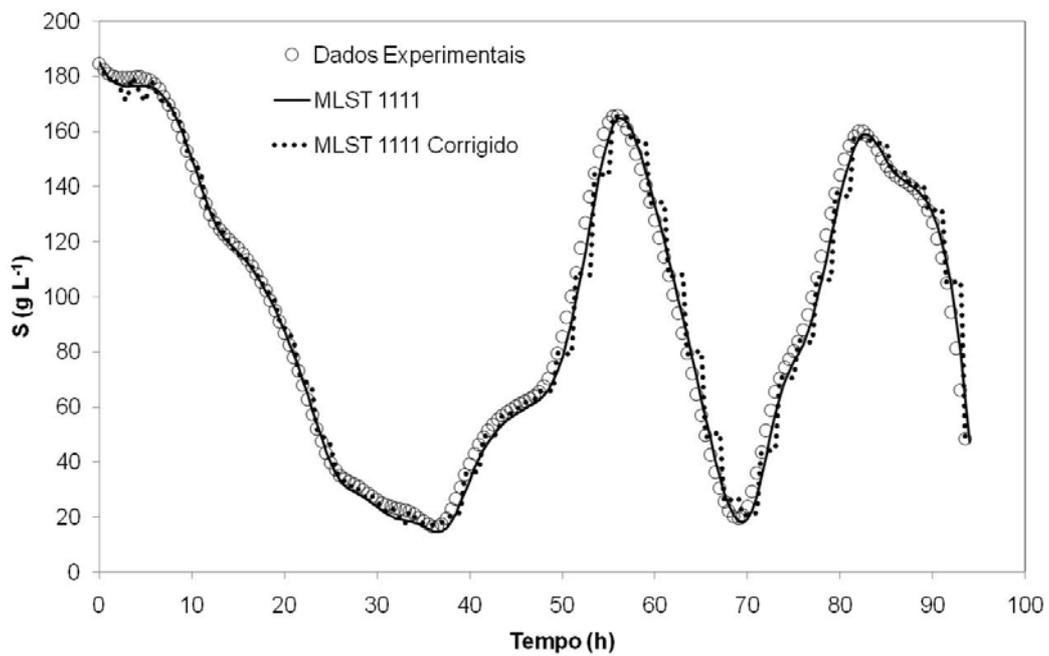


Figura 5.19: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC06.

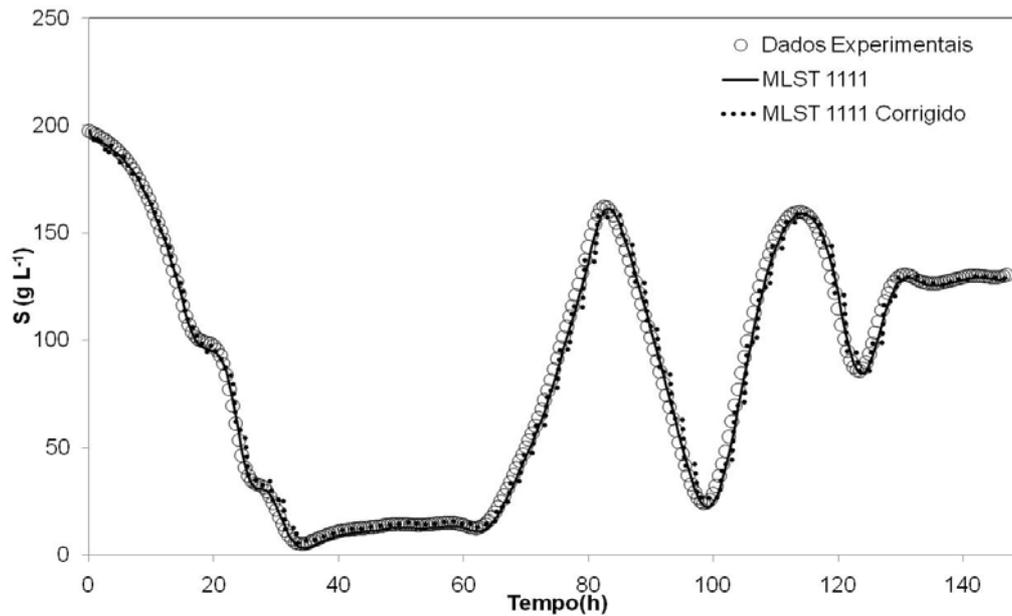


Figura 5.20: MLST 1111, MLST Corrigido versus Dados Experimentais da Fermentação FC07.

Com os resultados obtidos foi possível visualizar que os modelos MLST são adequados para monitoramento e controle por apresentarem poucos parâmetros e serem capazes de prever a variável um passo adiante a partir de dados passados, uma vez que o tempo para a correção (2 h) é grande o bastante para possibilitar a disponibilidade de leituras reais de glicose. A predição do comportamento oscilatório permite considerar tais ferramentas como úteis na exploração do comportamento dinâmico do processo.

Capítulo 6 – Conclusões e Sugestões

6.1 – Conclusões

Neste trabalho foram realizadas fermentações descontínuas e contínuas com *Zymomonas mobilis*, para o estudo dos comportamentos dinâmicos complexos, como oscilações e múltiplos estados estacionários.

Nas fermentações descontínuas, as bactérias *Zymomonas mobilis*, apresentaram crescimento tipicamente exponencial em meio de crescimento contendo glicose como substrato limitante e boa adaptação ao meio.

As fermentações contínuas foram realizadas com sucesso, obtendo-se os comportamentos dinâmicos esperados pelos diagramas de bifurcação gerados pelo modelo de LI (1997), como estados estacionários e oscilações. Oscilações foram obtidas na condição de meio de crescimento no reator e de alimentação de 200 g.L⁻¹ de glicose, taxa de diluição (D) de 0,06 h⁻¹, temperatura (T) de 30 °C, agitação de 150 rpm e pH 5,0.

O estudo da influência do etanol no sistema – com adição de etanol – foi de grande importância, uma vez que se observou uma maior inibição da concentração de células, do que com diferentes concentrações de glicose. Possivelmente esta ocorrência se dá pelo fato do etanol causar uma maior “fragilidade” na membrana celular do que a glicose.

Através da ferramenta de eletroforese, foi possível observar uma intensificação da banda referente à enzima 2 Ceto 3 Desoxi - 6 Fosfogliconato aldolase quando oscilações foram observadas, assim faz-se necessário um estudo mais detalhado para melhor visualização e entendimento de tal intensificação, uma vez que não houve a quantificação das bandas.

A implementação do modelo fenomenológico de LI *et al.* (1997) foi realizada e o conjunto de parâmetros (a , b , α , β , λ , δ , $Q_{P,max}$ e $Y_{p/s}$) foi estimado por tentativa e erro, e obteve-se um ajuste dos dados experimentais da concentração de células (X), de glicose (S) e de etanol (P). No caso das fermentações, onde oscilações foram obtidas (FC05, FC06 e FC07), o modelo apresentou uma diferença na amplitude das curvas de glicose. Houve uma dificuldade em estimar os parâmetros do modelo de LI *et al.* (1997), tanto com a utilização do ESTIMA com a abordagem Particle Swarm, devido a função de descontinuidade das funções, como por tentativa e erro, indicando assim que a estrutura do modelo e/ou as suposições feitas na tese não correspondem a realidade experimental.

Após análise do modelo de LI *et al.* (1997), percebeu-se que o termo Q_P , vincula totalmente o consumo de glicose a produção de etanol (através do fator de conversão), o que não está de acordo com a rota de Entner–Doudoroff. Desta forma, pelo fato do modelo não leva em consideração também o consumo de glicose para crescimento e assim justifica-se o não ajuste do modelo.

Os modelos lineares desenvolvidos se mostraram adequados para aplicações posteriores de monitoramento e controle, por serem capazes de prever a concentração de substrato um passo adiante a partir de dados passados e por apresentarem poucos

parâmetros. O modelo se mostrou razoável inclusive quando apenas entradas experimentais de concentrações de células estavam disponíveis “on-line”, desde que atualizações da concentração de substrato fossem procedidas, após alguns tempos de amostragem. A predição do comportamento oscilatório permite considerar tais ferramentas como úteis na exploração da dinâmica do processo.

As principais contribuições deste trabalho foram:

- o fornecimento de evidências experimentais de comportamentos dinâmicos complexos em fermentações contínuas com a bactéria *Zymomonas mobilis*;
- a verificação experimental do efeito do aumento das concentrações de glicose e de etanol no aparecimento de oscilações;
- o emprego de diagramas de bifurcação baseados em modelo fenomenológico para determinação de janelas operacionais nas quais o comportamento complexo ocorre;
- o emprego de simulação do modelo fenomenológico para verificação qualitativa dos comportamentos dinâmicos complexos;
- a verificação da correlação entre a intensidade das bandas em um estudo de comparação por gel SDS-PAGE das enzimas participantes da rota bioquímica de Entner-Doudoroff e os comportamentos dinâmicos observados;
- o desenvolvimento de modelos simples para a estimação da concentração de substrato um passo adiante.

Acredita-se que tais contribuições e ferramentas desenvolvidas propiciem uma melhor operação e controle do processo fermentativo na busca por um processo mais produtivo. Contudo, percebe-se também como resultado do presente estudo que,

para uma determinação mais precisa dos fatores que desencadeiam as oscilações, uma investigação mais aprofundada – literalmente usando informações do interior da célula *Zymomonas mobilis*, como das suas enzimas, e não apenas de variáveis macroscópicas do meio com o qual ela interage – se faz necessária.

6.2 – Sugestões para Trabalhos Posteriores

Sugere-se para trabalhos futuros os seguintes pontos:

- Estudo mais detalhado, com ferramentas mais específicas, das enzimas envolvidas na rota bioquímica da bactéria *Zymomonas mobilis*, nas condições de fermentações onde comportamentos dinâmicos diversos possam ser observados.
- O monitoramento das concentrações de glicerol ou sorbitol, durante o curso do processo contínuo, para um possível entendimento dos comportamentos dinâmicos complexos.
- Estudo de controle e monitoramento usando os modelos desenvolvidos nesta tese.
- Desenvolver um modelo matemático fenomenológico, que leve em consideração a rota bioquímica da bactéria *Zymomonas mobilis*, redefinindo os parâmetros de maiores importância e assim, tentando obter um único conjunto de parâmetros.
- Investigar os diferentes comportamentos observados nas células bacterianas durante o comportamento dinâmico oscilatório.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

- AIBA, S. AND SHODA, M., 1969, “Reassessment of the product Inhibition in Alcohol Fermentation”, *J. Ferment. Technol.*, 12: 790-794.
- AGUIRRE, L. A., *Introdução à Identificação de Sistemas – Técnicas Lineares e Não-Lineares Aplicadas a Sistemas Reais*, Editora UFMG, 2000.
- AGRAWAL, P., LEE, C., LIM, H. C. and RAMKRISHNA, D., “Theoretical Investigation of Dynamic Behavior of Isothermal Continuous Stirred tank Biological Reactors”, *Chemical Engineering Science*, v. 3, 37, pp. 453-462, 1982.
- AMUNDSON, N. R. AND BILOUS, B., “Chemical Reactor Stability and Sensitivity”, *A.I.Ch.E.* 1: 513-521, 1955.
- AMUNDSON, N. R. AND ARIS, R. – “An Analysis of Chemical Reactos Stability and Control I: The Possibility of local control, with perfect or imperfect control mechanisms”, *Chemical Engineering Science*, 7, 121-131, 1958a.
- AMUNDSON, N. R. AND ARIS, R. – “An Analysis of Chemical Reactos Stability and Control II: The Evolution of the Proportion Control”, *Chemical Engineering Science*, 7, 132-147, 1958b.
- AMUNDSON, N. R. AND ARIS, R. – “An Analysis of Chemical Reactos Stability and Control III: “The Principles of programming reactor calculations – some Extensions”, *Chemical Engineering Science*, 7, 148-155, 1958c.
- ANDREWS, J. F., “A Mathematical model of the Continuous Culture of Microorganism Utilizing Inhibition Substrates”, *Biotechnology and Bioengineering*, 10, PP. 707-723, 1968.

- AN, H. J., SCOPES R. K., RODRIGUEZ M., *et al.*, “Gel-electrophoretic Analysis of *Zymomonas-mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes - Identification of Alcohol Dehydrogenase-II as a Stress Protein”, *Journal of Bacteriology*, v.19, 173, pp 5975-5982, 1991.
- BAI, F.W., ANDERSON, W. A., Moo-Young, M., “Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks”, *Biotechnology Advances*, v. 26, pp. 89-105, 2008.
- BAILEY, J. E., OLLIS, F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill International Edition, Second Edition, 1986.
- BALOO, S. e RAMKRISHMA, D., “Metabolic regulation in bacterial continuous culture: II”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38:11, pp. 1353–1363, 1991.
- BELAICH, J. P., SENEZ, J. C., “Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*”, *Journal of Bacteriology*, v. 89, n. 5, pp. 1195-1200, 1965
- BRADFORD, M. M., “A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, *Anal Biochem* v. 72, pp. 248-254, 1976.
- BRUCE, L. J.; AXFORD, D. B.; CISZEK, B. and DAUGULIS, A.J. – “extractive Fermentation by *Zymomonas mobilis* and the Control of Oscillatory Behaviour”, *Biotechnol. Lett.*, v 13, pp 291-296, 1991.
- BURRILL, H.; DOELLE, H. W. AND GREENFIELD, P. F., “The Inhibitory Effect of Ethanol on Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology Letters*, v. 5, pp 423-426, 1983.
- CAMÊLO, A. C. R., *Estudo Computacional-Experimental do Comportamento Oscilatório em fermentação Contínuas com Zymomonas mobilis*, Dissertação de M.Sc, DEQ, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2004.

- CARTWRIGHT, C. P., VEAZEY, F. J., ROSE, A. H., “Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae*”. *J Gen Microbiol.*, v. 133, pp. 857–865, 1987.
- CASEY, G. P. and INGLEDEW, W. M., “Ethanol tolerance in yeasts”. *Rev Microbiol.*, v. 13, pp. 219-280, 1986.
- CHEN, CHING-I; McDONALD, K. A AND BISSON, L., a, “Oscillatory Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture: I. Effects of pH and Nitrogen Levels”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, pp. 19-27, 1990.
- CHEN, CHING-I; McDONALD, K. A AND BISSON, L., b, “Oscillatory Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture: II. Analysis of Cell Synchronization and Metabolism”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, pp. 28-38, 1990.
- CHI, C. T.; HOWELL, J. A. AND PAWLOWSK, U., “Regions of Multiple Stable Steady States of a Biological Reactor With Wall Growth”, *Chemical Engineering Science*, v. 29, pp. 207-211, 1974.
- CHI, C. T. AND HOWELL, J. A., “Transient-Behavior of a Continuous Stirred Tank Biological Reactor Utilizing Phenol as an Inhibitory Substrate”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 18, pp. 63-80, 1976.
- COSTA, F. H. N, BUZATO J. B., CELLIGOI M. A. P. C. e TANO, M. S. “Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose”, *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 3, n. 2, PP. 201-207, 2001.
- D'AMORE, T. and STEWART, G. G., “Ethanol tolerance of yeast”. *Enzyme Microb Technol.*, v. 9, pp. 322–330, 1987.

- DASARI, G.; WORTH, M. A.; CONNOR, M. A. AND PAMMENT, N. B. "Reasons for the Apparent Difference in the Effect of Produced and Added Ethanol on Culture Viability during Rapid Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, v. 35, pp. 109-122, 1990.
- DOEDEL, E.; CHAMPNEYS, A. R.; FAIRGRIEVE, T. F.; KUZNETSOV, Y. A.; SANDSTEDE, B. AND WANG, X., 1997, "AUTO97: Continuation and Bifurcation Software for Ordinary Differential Equations", User's Guide, Montreal, Concordia University.
- DOELLE, H. W., "Kinetic Characteristics and Regulatory Mechanisms of Glucokinase and Fructokinase from *Zymomonas mobilis*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 14, pp 241-246, 1982.
- EDWARDS, V. H., "The Influence of High Substrate Concentrations on Microbiol Kinetics", *Biotechnology and Bioengineering*, v 12, pp 679-712, 1970.
- EVELEIGH, D. E., STROKES, H. W. and DOLLY, E. L. "Recombinant DNA Approaches for Enhancing the Ethanol Productivity of *Zymomonas mobilis*", In: Wise DL (ed) *Organichemicals from Biomass*, Benjamin/Cumming, Menlo Park, California, pp. 69-91, 1983.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O., "*Zymomonas mobilis* e o seu emprego como agente de fermentação alcoólica", *Revista do Instituto de Antibióticos*, 1, pp 169-182, 1982.
- FEYO DE AZEVEDO, S.; DAHM, B.; OLIVEIRA, F.R., "Hybrid Modelling of Biochemical Processes: A Compararion with the conventional Approach", *Computers Chem. Engng.*, v. 21, pp. S751-S756, 1997.
- FERRARA, N. F. AND PRADO, C. P. C. – CAOS: Uma Introdução, Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 1995.
- FRANÇA, F. P. and RODRIGUES, M. C. S., "The alcoholic fermentation by *Zymomonas mobilis* CP3", *Rev. Lat. Amer. Microbiol*, v. 27, n. 1, pp 55-60, 1985.

- GALANI, I.; DRAINAS, C. AND TYPAS, M. A., “Growth Requirements and the Establishment of a Chemically defined Minimal, Medium in *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnol. Lett.*, v. 7, n. 9, pp 673-678, 1985.
- GARHYAN, P., ELNASHAIE, S. S. E. H., AL-HADDAD, S. M., IBRAHIM, G., “Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol” *Chemical Engineering Science*, v. 58, pp. 1479 – 1496, 2003.
- GARHYAN, P. and ELNASHAIE, S. S. E. H., “Utilization of Mathematical Models to Investigate the Bifurcation and Chaotic Behavior of Ethanol Fermentors”, *Mathematical and Computer Modelling*, 39, pp. 381-427, 2004.
- GARHYAN, P. and ELNASHAIE, S. S. E. H., “Experimental Investigation and Confirmation of Static/Dynamic Bifurcation Behavior in a Continuous Ethanol Fermentor. Practical Relevance of Bifurcation and the Contribution of Harmon Ray”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44, pp. 2525-2531, 2005.
- GHOMMIDH, C; VAIJA, J.; BOLARINWA, S. AND NAVARRO, J. M., “Oscillatory Behaviour of *Zymomonas* in Continuous Cultures: A simple Stochastic Model”, *Biotechnol. Lett.*, v. 11, pp. 659-664, 1989.
- GHOSE, T. K and TYAPI, R. D., “Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate, II. Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermenter Design”, *Biotechnology and Bioengineering*, v 21, pp 1401-1420, 1979.
- GILLEY, J. W. and BUNGAY, H. R., “Oscillatory Growth Rate Responses of *S. cerevisiae* in Continuous Culture”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 9, pp. 617, 1967.
- GUCKENHEIMER, J. and HOLMES, P., *Nonlinear Oscillation, Dynamical Systems and bifurcations of Vector fields*, Springer-Verlag, 1983.

- HOBLEY, T. J. and PAMMENT, N. B., “Differences in response of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* to Change in Extracellular Ethanol Concentration”, *Biotechnology Bioengineering*, 43, pp 155-158, 1994.
- JARZEBSKI, A. B., “Modelling of Oscillatory Behaviour in Continuous Ethanol Fermentation”. *Biotechnol. Lett.* v. 14, pp 137-142, 1992.
- JÖBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; VAN BAALEN, A. and ROELS, J. A., “Mathematical Modelling of growth and Substrate Conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35°C”, *Biotechnol. Lett.*, 27, pp 984-995, 1985.
- JÖBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; LUYBEN, K. C. A. M and ROELS, J. A., “Fermentation Kinetics of *Zymomonas mobilis* at High Ethanol Concentration: Oscillations in Continuous Cultures”, *Biotechnol. Bioeng.*v. 28, pp. 868-877, 1986.
- JONES, R. P., “Intracellular Etanol – Accumulation and Exit from Yeast and Other Cells”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1988
- JONES , R. P. and GREENFIELD, “Replicative inactivation and metabolic inhibition in yeast ethanol fermentations”, *Biotechnology Letters*, v. 7 n. 4, pp. 223-228, 1985.
- KALMAN, R. E., FALB, P. L. and ARBIB, M. A., *Topic in Mathematical Sysytem Theory*, MacGraw-Hill, 1969.
- KENNEDY, J. e EBERHART , R., *Particle swarm optimization*, Proceeding IEEE, International Condeference on Neural Networks, Perth, Austrália, pp. 1942-1948, 1995.
- KOMPALA, D. S., JANSEN, N. B., TSAO, G. T., AMKRISHNA, G.T., “Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, pp. 1044–1055, 1986.
- KUMAR *et al.*, “Nonlinear analysis of the effect of maintenance in continuous cell cultures”, *Math. Comput. Simul.* (2008), doi:10.1016/j.matcom.2008.05.004

- LARUE, F., LAFON-LAFOURCADE, S., RIBEREAU-GAYON, P., “Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and the activities of hexokinase and alcohol dehydrogenase”. *Biotechnol Lett*, v. 6, pp. 687–692, 1984.
- LEE, B. and LIM, H., “New Device for Continuously Monitoring the Optical-Density of Concentrated Microbial Culture”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, pp. 639-642, 1980.
- LEE, K. L. e ROGERS, P. L., “The Fermentation Kinetics of Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*”, *Chem. Eng. J.*, v 27, pp 31-38, 1983.
- LEE, W. C. and HUANG, C. T., “Modeling of Ethanol fermentation Using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 Grown on the Media Containing Glucose and Fructose, *Biochemical Engineering Journal*, 4, pp 217-227, 2000.
- LI, J., 1995, *Experimental Investigation and Mathematic Modelling of oscillatory Behaviour in the Ethanol Fermentation by Zymomonas mobilis*, Ph.D dissertation, Queen’s University, Kingston, Ontário, Canadá.
- LI, J. H., DAUGULIS, A. J.; AND MCLELLAN, P. J., “Experimental Investigation and Modeling of Oscillatory Behavior in the Continuous Culture of *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56, n. 1, pp. 99-105, 1997.
- LILJENROTH, F. G., “Starting and Stability Phenomena of Ammonia-Oxidation and Similar reactions”, *Chemical Metalurgical Engineering*, v. 19, pp 287, 1918.
- LIMA, E. L., Nota de aula – Análise de Sistemas de Engenharia Química, Capítulo 2, 2008.
- LIN, Y., TANAKA, S., “Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects”. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 69, pp. 627-642, 2006.
- LOPES, C. E., Notas de aula - Métodos Matemáticos, mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2002

- LOUNG, J. H., "Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation", *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 280-285, 1985.
- MARTINI, N. D., KATERERE, D. R., ELOF, J. N.; "Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae)". *J Ethnopharmacol*, v. 93, pp. 207-212, 2004.
- MCLELLAN, P. K. L., LI, J., AND DAUGULIS, A. J., "Inhibition Effects Ethanol Concentration History and Ethanol Concentration Change Rate on *Zymomonas mobilis*", *Biotechnology Letters*, 17, v. 3, pp. 321-326, 1995.
- MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A.J. AND LI, J., "The Incidence of Oscillatory Behaviour in the Continuous Fermentation of *Zymomonas mobilis*", *Biotechnology Progress*, 15, pp. 667-680, 1999.
- MONOD, J. "The growth of bacterial cultures". *Annual Review of Microbiology*, New York, v. 3, pp 371-394, 1949.
- NAMBA, A., NISHIZAWA, Y. TSUCHIYA, Y. *et al.*, "Kinetic Analysis for Batch Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Fermentation Technology*, v. 65, pp 277-283, 1987.
- NANJOSHI, A. A. and RAMKRISHNA, D., " A cybernetic modeling framework for analysis of metabolic systems", *Journal & Chemical Engineering*, 29, pp. 487-498, 2005.
- NORGAARD, M., RAVN, O., POULSEN, N. K. and HANSEN, L. K., *Neural Networks for Modelling and Control of Dynamic Systems*, Springer-Verlag, 2000.
- OAKLEY, B. R., KIRSCH, D. R., MORRI, N. R., "A simplified ultrasensitive stain for detecting for proteins in polyacrylamide gels", *Analytical Biochemistry*, 105, pp 361-368, 1980.

- OSMAN, Y. A. and INGRAM, L. O., "Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4", *Journal Bacteriology*, 164, pp 173-180, 1985.
- PALHA, M. A. P. F., 1987, *Emprego do Método Simplex no Estudo Cinético da fermentação Alcoólica Contínua por Zymomonas mobilis*; Dissertação de M.Sc., CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
- PALHA, M. A. P. F., LOPES, C. E., LIMA, M. A. G. A., PEREIRA JR., N., "The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation", *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 3, pp 272-278, 2002.
- PAWLOWSKY, U. e HOWELL, J. A., "Mixed Culture Biooxidation of Phenol. I. Determination of Kinect Parameters", *Biotechnology and Bioengineering*, 15, pp 889-896, 1973.
- PINHEIRO, I. O., *Fermentação de Zymomonas mobilis em Meio Mínimo com Asparagina como Fonte de Nitrogênio*; Tese de D.Sc, PEQ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2001.
- PORRO, D.; MARTEGANI, E.; RANZI, B. M. AND AKLBERGHINA, L., "Oscillations in Continuous Cultures of Budding Yeast: A Segregatet Parameter Analysis", *Biotechnology and Bioengineering*, 32, pp. 411-417, 1988.
- RATLEADGE, C. and KRISTIENSEN, B., *Basic Biotechnology*, Cambridge, Cambridge University Press, 2001.
- RAMKRISHNA, D.; FREDRICKSON, A. G. AND TSUCHIYA, H. M., "Dynamics of Microbial Propagation: Models Considering Inhibitors and Variable Cell Composition", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 9, pp. 129-170, 1967.
- READ, S. M.; NORTHCOTE, D.H., "Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein". *Anal Biochem*, 116, pp. 53-64, 1981.

- ROGERS, P. L., LEE, K. J. and TRIBE, D. E., “High Productivity Ethanol Fermentation with *Zymomonas mobilis*”, *Process Biochemistry*, august/September, pp.7-10, 1980.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J., SKOTNICKI, M. L. AND TRIBE, D. E. – “Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*”, *Advances in Biochemical Engineering*, 23: 37-84, 1982.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SMITH, G. M. and BARROW, K. D. “Ethanol Tolerance of *Zymomonas mobilis*”, *Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*, van Uden Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL.), 239-256, 1988
- SILVA JÚNIOR, J. G., *Eletroforese de Proteínas – Guia Teórico-Prático*, Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2001.
- SPRENGER, G. A., “Carbohydrate Metabolism in *Zymomonas mobilis*: A Catabolic Highway With Some Scenic Routes”, *FEMS Microbiology Letters*, v. 145, pp 301-307, 1996.
- SWINGS, J. and DE LEY, J., “The biology of e biology of *Zymomonas mobilis*”, *Bacteriology Reviews*, v.41, 1, pp 1-46, 1977.
- TRINDER, P., “Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor”. *Ann. Clin. Biochem.*, v. 6, pp. 24-27, 1969.
- VAN HEERDEN, C., “Autothermic Process”, *Ind. Engng. Chem.*, v. 44, pp 1242, 1953.
- VEERAMALLU, U. and AGRAWAL, P., “A Structured Kinetic Model for *Zymomonas mobilis* ATCC10988”, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 36, pp 649-704, 1990.
- VOET, D. and VOET, J. G., *Biochemistry*, Wiley, 2^a Edition, 1995.

WILBERG, K. Q., *Estudo da Produção de Sorbitol e Acido Glicônico Utilizando Células Permeabilizadas de Zymomonas mobilis*, Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996.

XIU, Z.; ZENG, A. AND DECKWER, W., “Multiplicity and Stability Analysis of Microorganisms in Continuous Culture: Effects of Metabolic Overflow and Growth Inhibition”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 3, 57, pp. 251-261, 1998.

ZHANG, Y. and HENSON, M. A. “Bifurcation analysis of continuous biochemical reactor models”. *Biotechnology Progress* v. 17:4, pp. 647–660, 2001.

ZHANG, Y., ZAMAMIRI, A. M., HENSON, M. A., *et al.*, “Cell population models for bifurcation analysis and nonlinear control of continuous yeast bioreactors”, *Journal of Process Control*, 12, pp. 721-734, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – I - Curva Padrão de Determinação de Peso Seco para a *Zymomonas mobilis* Ag11

A curva de calibração foi obtida, através das leituras das diluições sucessivas de um concentrado bacteriano, obtido após o término de uma fermentação, em espectrofotômetros distintos, como descrito no capítulo 03. Deste concentrado bacteriano, foram retiradas três alíquotas de 10 mL para três tubos Falcon previamente pesados e que foram centrifugados.

O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi ressuspensão com água destilada para nova centrifugação. Este processo foi repetido por três vezes. A adição de água destilada foi realizada para que todo e qualquer tipo de resíduo do meio fosse retirado e assim o peso seco correspondesse somente às células de *Zymomonas mobilis*. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e os três tubos foram levados à estufa, a 60°C, até o peso constante. As massas obtidas nos três tubos foram:

TUBOS	MASSA(g)
01	0,0397
02	0,038
03	0,0409
Valor médio	0,0395
CONCENTRAÇÃO	3,9533

Desta forma, as curvas de calibração de concentrações versus absorvância para *Zymomonas mobilis* Ag11 nos processos descontínuos e contínuos foram obtidas (Figura AA – I e AA – II):

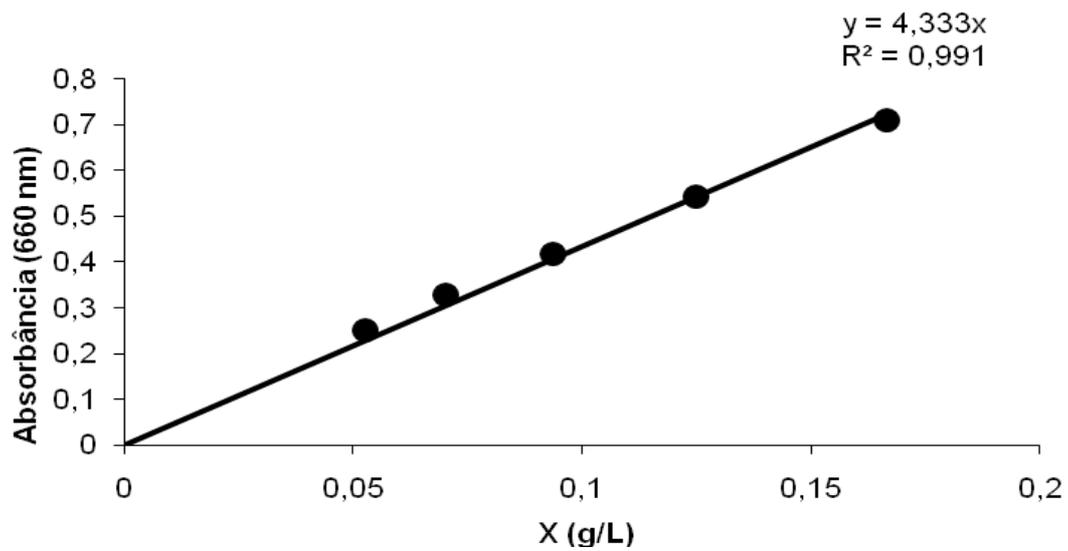


Figura AA - I: Curva de calibração em espectrofotômetro descontínuo, para a bactéria *Zymomonas mobilis* Ag11.

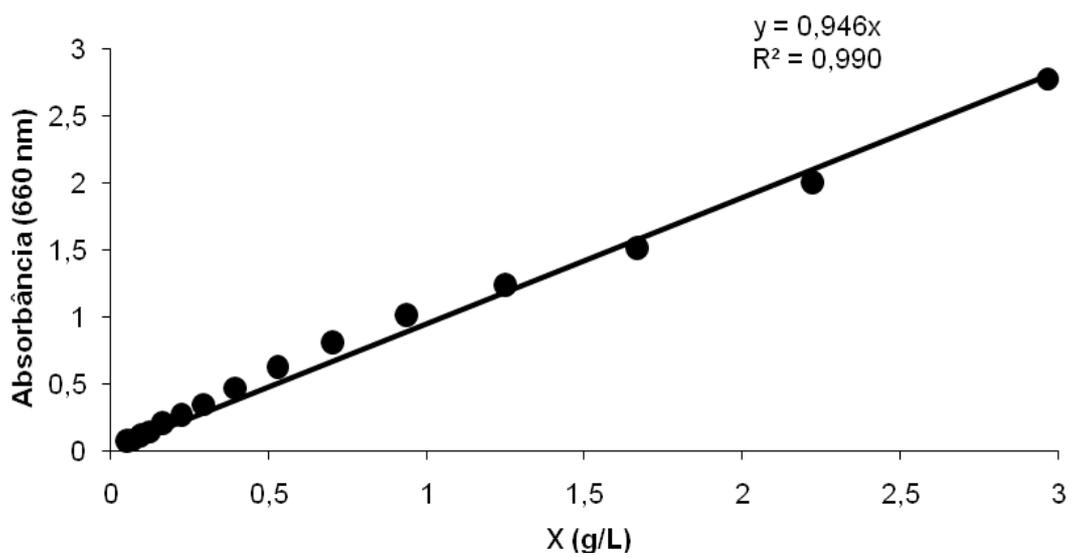


Figura AA - II: Curva de calibração em espectrofotômetro contínuo, para a bactéria *Zymomonas mobilis* Ag11.

APÊNDICE A – II - Curva de Calibração da Concentração de Glicose

Como mostrado no capítulo 3, para a determinação da concentração de glicose, utilizou-se Kit (Glicose SD), cuja metodologia baseia-se no método enzimático-colorimétrico (GOD-POD). Desta forma, inicialmente preparou-se o Reativo de Trabalho (RT), que consiste na solução composta por 2,0mL do reativo 2 adicionado a cada 100 mL do reativo 1. O RT deve ser mantido em frasco âmbar e desde que a temperatura se mantenha entre 2 a 8°C, sua durabilidade é de até 30 dias, caso contrário, sendo mantido a temperatura ambiente só terá durabilidade de 7 dias.

O procedimento de uso consistiu num sistema de três tubos marcados com as letras B (Branco), P (Padrão) e D (Desconhecido) e em cada tudo deste adicionou as seguintes quantidades de reativos (Tabela A -I).

TABELA A - I: Quantidade de reativo utilizada

	B	P	D
Padrão	-	10 μ L	-
Amostra	-	-	10 μ L
Reativo de Trabalho	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Incubou-se por 10 minutos em banho a 37°C. Retirou-se do banho e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 505nm e zera-se o aparelho com o branco. A cor é estável por 60 minutos. As soluções de glicose cujas concentrações são conhecidas foram 4,5g.L⁻¹, 4,0 g.L⁻¹, 3,0 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 1 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹, 0,1 g.L⁻¹ e 0,05 g.L⁻¹.

Desta forma, a curva de calibração de concentração versus absorvância para glicose foi obtida (Figura AA – III).

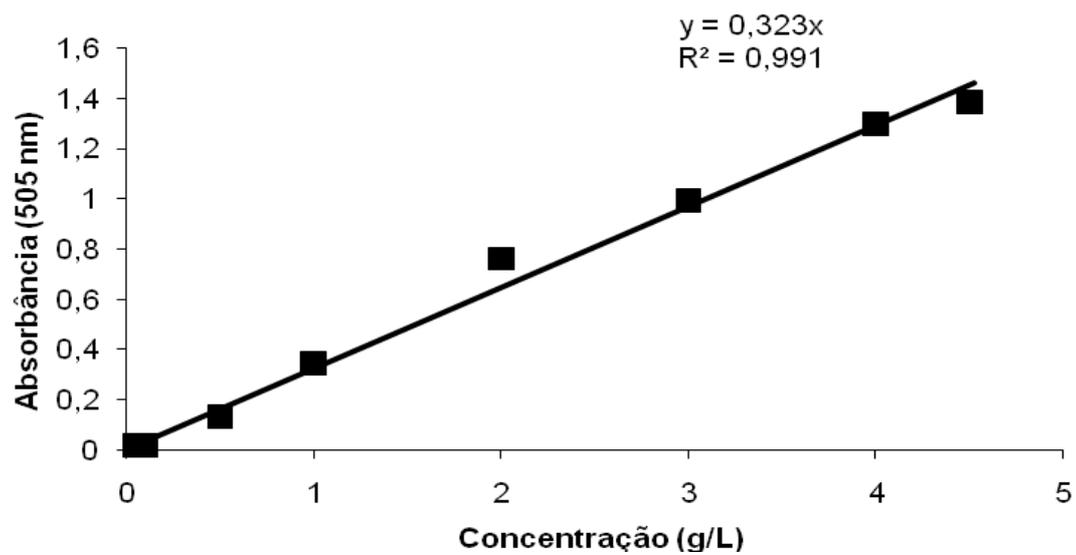


Figura AA - II: Curva de calibração de glicose com Kit enzimático.

APÊNDICE A – III - Curva de Calibração da Concentração de Etanol

As soluções de etanol foram preparadas nas concentrações de 10, 8, 6, 4, 2, 1 e 0 g.L⁻¹. Para cada concentração, 3 injeções foram feitas. Os valores das médias das áreas encontram-se na Tabela A – II, a curva de calibração foi obtida e pode ser observada na Figura AA – IV.

Tabela A – II: Dados experimentais para curva de calibração de etanol

Concentração (g.L ⁻¹)	Média - Área
10	1028677,2
8	845721,5
6	626852,0
4	398910,8
2	210277,8
1	91812,5
0	0,0

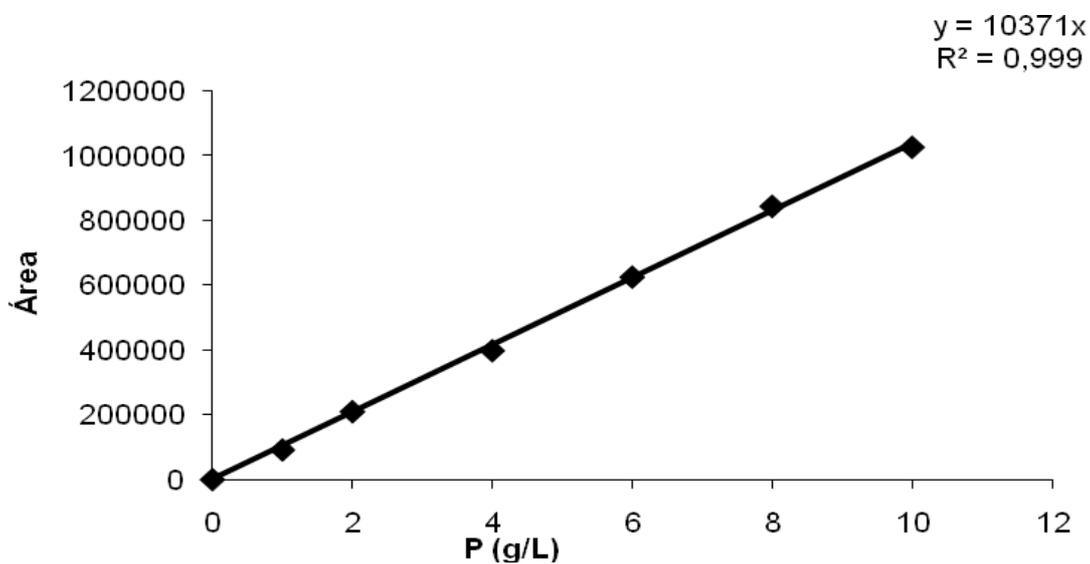


Figura AA - IV: Curva de calibração de etanol.

APÊNDICE A – IV - Protocolo de eletroforese (Gel de Poliacrilamida)

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. O entendimento da interação entre a partícula carregada com o meio onde ela está suspensa ou dissolvida e o comportamento deste sistema em face das condições elétricas empregadas permite uma avaliação mais precisa do fenômeno migratório verificado.

Preparação do Gel de Poliacrilamida - Informações Gerais

Muitos dos reagentes usados comumente na eletroforese em gel de poliacrilamida são tóxicos e seu manuseio deve ser cuidadoso. Desta forma, recomenda-se primeiramente a observação das normas de segurança preconizadas internacionalmente destes reagentes, como também o conhecimento prévio da toxicidade do reagente a ser usado para que procedimentos de manutenção e eliminação sejam realizados de forma correta.

As informações descritas abaixo sobre alguns dos reagentes devem ser levadas em consideração:

❖ Acrilamida e bis-acrilamida (N,N'-metileno bis-acrilamida)

A acrilamida e a bis-acrilamida consistem em agentes de polimerização e co-polimerização, respectivamente, são altamente neurotóxicos e, provavelmente, mutagênicos. Apesar destes reagentes não serem tóxicos, as luvas NÃO devem ser retiradas ao longo de todo o experimento, pois o exsudato (do latim 'exsudare', o mesmo que transpirar, suar, exsuar, trasudar), que é comum ocorrer após a polimerização, ainda é tóxico.

Os devidos cuidados a serem tomados são além do uso de jaleco ou guarda-pó, o manuseio destes reagentes deve ser feito com luvas de plástico e uso de máscara. Caso a substância, no ato da pesagem, caia no prato da balança, ou nos seus arredores, deve ser de imediato retirada.

❖ Persulfato de Amônio de TEMED

Consistem em reagentes tóxicos. O TEMED que é uma amina no estado líquido, altamente volátil e tóxico, deve ser manuseado em capela com exaustão ligada durante todo o seu uso.

❖ Demais reagentes

Os demais reagentes usados na formação do referido gel de poliacrilamida são tóxicos e o uso deve ser feito também com o devido rigor.

IMPORTANTE: É comum ao se formular uma preparação de gel de poliacrilamida para a eletroforese referir-se a % de T e % de C. T significa a soma das massas de acrilamida + bis-acrilamida encontrada em 100 mL da solução, onde o bis-acrilamida é o agente de ligação cruzada entre os homopolímeros que se formarão às expensas de acrilamida. C representa a relação entre a massa de bis-acrilamida e a massa total (acrilamida + bis-acrilamida) em porcentagem por peso. Assim, se fizermos um gel a T=10% e C=3%, teremos 0,3g de bis-acrilamida e 9,7g de acrilamida em 100 mL de solução gelificante ou ainda 0,3g de bis-acrilamida em 10 de acrilamida + bis-acrilamida.

A ÁGUA A SER UTILIZADA NA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E DOS GÉIS É AGUÁ ULTRA-PURA (Milli-Q)

1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

❖ Solução SDS 10% (100 mL)

SDS	10 g
Água	q.s.p. 100 mL

* Estocar a temperatura ambiente

❖ Tampão de Corrida – pH 8.3 (V = 1L)

Tris - base (25 mM) – PM = 121,14	3,02g
Glicina (250 mM) – PM =75,07	14,5 g
SDS 10%	10 mL
Água	q.s.p. 1000 mL

* Estocar em temperatura ambiente.

❖ Tris-base 1,5M - pH 8,8 (V = 50 mL)

Tris base (PM=121,14)	9,0855g
Água	q.s.p 50 mL

* Ajustar o pH para 8,8 com HCl 2M e guardar a solução em geladeira.

❖ Monômero 30% T → 29,2% acrilamida e 0,8% bis-acrilamida

Acrilamina	14,6 g
Bis-acrilamida	0,4 g
Água	q.s.p 50 mL

$T = (\% \text{ bis-acrilamida} + \% \text{ acrilamida})$
 $C = (\% \text{ bis-acrilamida} / T)$

* Trabalhar na Capela e estocar no escuro, a 4°C, por 3 semanas.

❖ Tris-base 1,0 M - pH 6,8 (V = 50 mL)

Tris base (PM=121,1)	6,057g
Água	q.s.p 50 mL

* Ajustar o pH para 6,8 com HCl e guardar a solução em geladeira

❖ Persulfato de amônio 10%

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,2g
Água	q.s.p 2 mL

* Preparar no dia e estocar no congelador para o gel de nivelamento

❖ Solução p/ aplicação de amostra

Tris-Base 1,0M – pH 6,8	1,25 mL
SDS 10%	2,0 mL
Mercaptoetanol	0,5 mL

Azul de bromofenol	4,0 mL
Glicerol	1,0 mL
Água	1,25 mL

* Ajustar o pH para 6,8 com NaOH 1M e estocar a – 20°C durante 4 semanas, em alíquota de 1 mL.

❖ **Solução Azul de bromofenol 0,05%**

Azul de bromofenol	0,005 g
Água	10 mL

❖ **Solução corante (0,025% azul de coomassic R-250, 40% metanol, 7% ácido acético)**

Solução corante (A)	12,5 mL
Metanol	25 mL
Ácido Acético	1 mL
Água	q.s.p 100mL

❖ **Solução corante (A)**

Azul de coomassic R-250	1,0g	q.s.p 100 mL
Água		

* Filtrar em papel de filtro

❖ **Solução descorante (volume para 1 gel)**

Metanol	30 mL
Ácido acético	7 mL
Água	q.s.p. 100 mL

2. PREPARAÇÃO DOS GÉIS

✓ Gel de Corrida (V = 10 mL) – 2 Géis

Tabela A -III: Reagentes e soluções utilizados no gel de corrida em diversas porcentagens

Reagentes e Soluções	10%	12%	15%	18%
Volume	mL	mL	mL	mL
Água Milli-Q	4,0	3,3	2,3	1,3
Tris.HCl 1,0 M pH 6.8	2,5	2,5	2,5	2,5
Monômero 30%	3,3	4,0	5,0	6,0
SDS 10%	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,004	0,004	0,004
Persulfato 10%	0,1	0,1	0,1	0,1

Os reagentes e soluções devem ser misturados num béquer previamente limpo, seguindo a seqüência da Tabela 1. O TEMED (catalisador) e o persulfato de

amônio (gerador de radicais livres) devem ser adicionados por último uma vez que para a formação do gel, além do monômero têm que estar presentes os sistemas catalisador e gerador de radicais livres para dar início a polimerização. Aguardar por 30 minutos para posterior preparação do gel de nivelamento.

✓ **Gel de Nivelamento (V = 5 mL) – 2 Géis**

Tabela IV: Reagentes e soluções utilizados no gel de nivelamento.

Reagentes e Soluções	4%
Volume	mL
Água Milli-Q	3,4
Tris.HCl 1,0 M pH 6.8	0,63
Monômero 30%	0,83
SDS 10%	0,05
TEMED	0,005
Persulfato 10%	0,05

APÊNDICE A – V - Curva de calibração de Bradford

Soluções de BSA (Albumina bovina) foram preparadas com concentrações variando de 0,01 g.L⁻¹ a 0,1 g.L⁻¹. Aliquotas de 0,1 mL das soluções eram adicionadas à 1 mL da solução corante, mediante agitação. Após 10 minutos, procedia-se a leitura da absorbância a 595 nm. As curvas de calibração foram construídas representando-se a absorbância em relação à concentração de proteína nas amostras, como mostra a Figura AA – V.

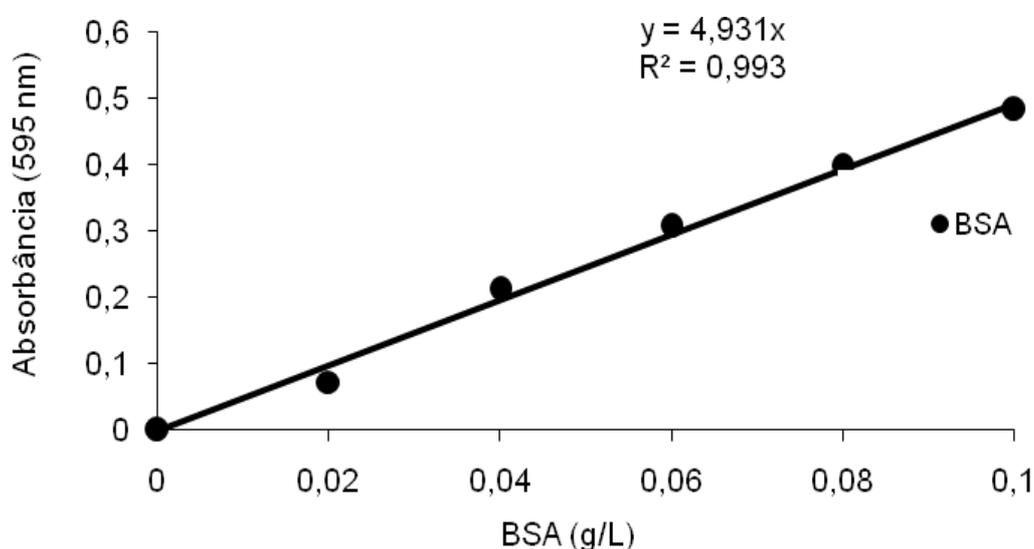


Figura AA - V: Curva de calibração de Bradford.

Cabe observar que a solução corante empregada nas análises adsorve fortemente em materiais de vidro, recomendando-se assim, o uso de cubetas descartáveis. Caso cubetas de vidro sejam utilizadas, estas devem ser lavadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) para remover resíduos do corante.

APÊNDICE A – VI - Determinação dos Coeficientes $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e Produtividade Volumétrica

Para a determinação dos coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, foi considerado o esquema abaixo de um fermentador CSTR no regime estacionário (Figura 3.6).

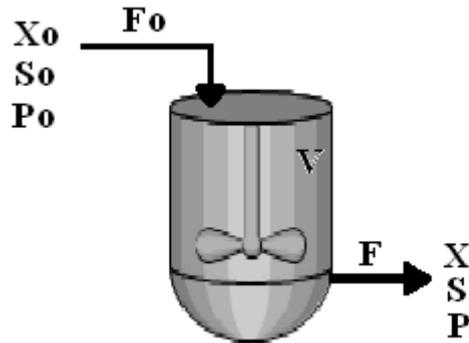


Figura AA - VI: Representação do Biorreator.

Onde temos :

X_o , S_o e P_o = a concentração de células (X), glicose (S) e etanol (P) na alimentação.

X , S e P = a concentração células (X), glicose (S) e etanol (P) na saída do fermentador.

F = vazão volumétrica.

V = volume do fermentador.

Partindo do balanço volumétrico temos:

$$\frac{dV}{dt} = F_o - F \quad \text{AVI.1}$$

Uma vez que no estado estacionário a vazão de entrada do meio estéril é igual à vazão de saída do meio fermentado ($F_o = F$):

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{AVI.2}$$

O balanço de massa dentro do biorreator pode ser escrito da seguinte forma:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \quad \text{AVI.3}$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_F - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad \text{AVI.4}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} \cdot X \cdot \mu - D \cdot P \quad \text{AVI.5}$$

Como no estado estacionário $\frac{dX}{dt}, \frac{dS}{dt}, \frac{dP}{dt} = 0$, da equação 3.3, temos que

$\mu = D$. Desta forma as equações 3.4 e 3.5, podem ser escritas:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_F - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \longrightarrow D(S_F - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad \text{AVI.6}$$

$$Y_{X/S} = \frac{x}{(S_F - S)} \quad \text{AVI.7}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} \cdot X \cdot \mu - D \cdot P \longrightarrow D \cdot P = Y_{P/S} \cdot X \cdot \mu \quad \text{AVI.8}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P}{X} \quad \text{AVI.9}$$

A produtividade volumétrica no caso do processo contínuo, consiste:

$$Q^*_{VP} = \frac{P}{D} \quad \text{AVI.10}$$

APÊNDICE B – I - Dados Experimentais da Fermentação FD01 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)
0,000	0,036	182,214	1,313
3,000	0,081	179,321	2,247
6,000	0,281	171,756	2,694
9,000	0,571	156,362	6,067
12,000	1,317	78,051	11,754
15,000	1,801	31,916	30,854
18,000	2,646	4,854	63,472
21,000	2,380	0,781	60,921
24,000	2,425	1,175	61,079
27,000	2,380	1,291	63,936

APÊNDICE B – II - Dados Experimentais da Fermentação FD02 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)
0,000	0,035	182,214	2,981
3,000	0,083	180,885	2,920
6,000	0,280	165,380	3,071
9,000	0,569	121,674	5,650
12,000	1,320	83,125	11,745
15,000	2,012	8,192	21,493
18,000	2,315	4,854	43,628
21,000	2,282	1,063	58,921
24,000	2,426	1,203	55,551
27,000	2,382	1,207	54,617

APÊNDICE B – III - Dados Experimentais da Fermentação FC01 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,029	92,638	9,099	
3,000	0,086	85,890	23,869	
6,000	0,370	53,988	34,305	
9,000	0,757	27,301	47,574	
12,000	1,186	3,485	42,304	
15,000	1,251	2,607	53,815	
18,000	1,274	3,669	42,542	← Início da Fermentação Contínua
19,000	1,177	1,313	37,923	
21,000	0,988	1,356	37,147	
24,000	0,849	1,325	39,734	
27,000	0,798	1,540	36,002	
30,000	0,775	1,356	37,282	
33,000	0,665	1,552	33,363	
36,000	0,729	1,258	33,630	
39,000	0,678	1,828	36,696	
48,000	0,711	1,601	33,923	
51,000	0,701	1,681	35,108	
54,000	0,664	1,583	33,365	
57,000	0,683	1,331	33,002	
60,000	0,669	1,644	33,357	
69,000	0,675	1,294	34,164	
72,000	0,694	1,736	35,048	
75,000	0,680	1,761	34,641	
78,000	0,657	1,221	34,975	
81,000	0,665	1,712	34,652	

APÊNDICE B – IV - Dados Experimentais da Fermentação FC02 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)
0,000	0,051	92,466	4,832
3,000	0,140	85,528	6,805
6,000	0,438	55,571	14,314
9,000	0,826	24,448	24,701
12,000	1,117	3,485	69,203
15,000	1,348	1,994	44,192
22,000	1,408	3,656	38,935
24,000	1,361	1,313	41,928
25,000	1,269	1,356	42,676
28,000	1,145	1,325	46,432
30,000	1,006	1,540	47,656
33,000	0,914	1,356	44,509
45,000	0,928	1,552	45,685
57,000	0,877	1,258	38,360
69,000	0,895	1,828	47,372
84,000	0,831	1,485	45,948
99,000	0,840	1,515	42,388

← Início da Fermentação Contínua

APÊNDICE B – V - Dados Experimentais da Fermentação FC03 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,058	140,491	2,420	
3,000	0,095	123,926	2,648	
6,000	0,332	88,957	18,218	
9,000	0,965	50,000	33,394	
12,000	1,449	13,988	44,988	
16,000	1,523	2,080	62,629	← Início da Fermentação Contínua
19,000	1,297	3,442	52,348	
24,000	0,914	1,681	51,008	
29,000	0,886	1,405	50,865	
36,000	0,877	1,356	50,744	
39,000	0,895	1,460	52,074	
42,000	0,840	1,558	51,773	
46,000	0,854	1,325	51,552	
50,000	0,872	1,436	52,828	
53,000	0,845	1,466	52,206	
56,000	0,863	1,399	51,037	
59,000	0,840	1,405	51,889	
62,000	0,877	1,356	51,821	
65,000	0,872	1,215	50,181	
68,000	0,863	1,583	50,671	
71,000	0,868	1,724	51,356	

APÊNDICE B – VI - Dados Experimentais da Fermentação FC04 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,023	145,767	2,424	
3,000	0,039	141,718	4,148	
6,000	0,148	123,313	5,393	
9,000	0,336	111,656	9,276	
12,000	0,565	100,920	13,972	
15,000	0,864	83,742	19,962	
19,000	1,348	48,466	23,722	
22,000	1,629	17,730	32,570	
24,000	1,678	8,712	42,793	← Início da Fermentação Contínua
27,000	1,736	7,117	60,867	
35,000	1,732	8,466	60,122	
38,000	1,656	9,755	58,183	
41,000	1,673	7,025	55,407	
44,000	1,663	15,276	54,554	
47,000	1,660	10,031	56,698	
49,000	1,649	11,933	54,928	
53,000	1,656	8,681	56,419	
59,000	1,672	7,393	56,812	
62,000	1,644	8,405	58,318	
66,000	1,663	7,546	57,698	
69,000	1,648	10,061	57,130	
73,000	1,641	8,497	59,472	
79,000	1,668	6,288	59,136	
82,000	1,602	10,706	59,406	
85,000	1,587	7,577	58,722	
89,000	1,638	8,466	61,994	
92,000	1,624	11,595	62,564	
95,000	1,575	8,479	59,759	

APÊNDICE B – VII - Dados Experimentais da Fermentação FC05 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,102	194,745	3,104	
3,000	0,106	188,563	2,610	
6,000	0,120	185,471	2,114	
9,000	0,158	181,144	3,761	
12,000	0,323	178,053	3,789	
15,000	0,457	161,051	11,729	
18,000	0,665	146,213	15,942	
21,000	0,849	111,592	21,417	
24,000	1,158	83,462	41,995	
27,000	1,712	61,824	55,041	
30,000	2,192	44,822	75,760	
33,500	2,340	12,674	91,580	
36,500	2,372	6,801	96,550	← Início da Fermentação Contínua
39,000	2,197	7,728	98,913	
42,000	1,735	74,498	94,928	
45,000	1,495	119,938	90,463	
48,000	1,205	148,686	71,350	
51,000	1,048	154,869	62,458	
54,000	0,900	161,051	59,711	
57,000	0,761	162,597	50,177	
61,000	0,868	131,685	53,853	
64,000	1,071	104,791	56,839	
67,000	1,431	52,550	68,120	
70,000	1,758	40,185	80,719	
72,000	2,137	23,493	87,136	
76,000	1,731	53,478	65,957	
78,000	1,237	81,298	59,434	
81,000	0,997	123,029	58,281	
84,000	0,803	154,250	54,743	
87,500	0,761	159,505	50,524	
90,500	0,831	132,303	56,574	
93,000	1,098	99,227	60,279	
96,000	1,445	78,207	67,370	
98,000	1,851	58,114	84,445	
100,000	2,026	16,383	84,686	
102,500	1,708	44,513	72,477	
104,500	1,274	74,189	62,151	

APÊNDICE B – VIII - Dados Experimentais da Fermentação FC06/FC08 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,271	184,791	3,099	
3,000	0,290	179,598	3,140	
6,000	0,305	177,434	4,582	
9,000	0,380	157,960	13,559	
12,000	0,618	130,139	21,764	
15,000	0,959	117,774	38,966	
22,000	1,452	68,006	67,400	
25,000	1,703	39,876	82,337	
28,000	1,945	31,221	86,107	
31,000	2,117	24,420	88,773	
34,000	2,230	21,329	90,776	
37,000	2,297	17,620	85,904	← Início da Fermentação Contínua
40,000	2,349	39,567	82,209	
46,000	2,150	62,133	64,869	
49,000	1,439	74,498	59,117	
52,000	0,917	117,774	56,757	
55,000	0,759	163,524	51,176	
58,000	0,882	152,087	61,574	
61,000	1,131	114,683	65,053	
64,000	1,595	72,334	67,216	
70,000	1,916	24,111	86,478	
73,000	1,712	65,533	69,449	
76,000	1,186	88,099	61,593	
79,000	0,796	130,294	53,239	
82,000	0,761	160,124	50,973	
85,000	0,826	147,759	50,882	
88,000	1,107	139,413	58,910	
94,000	1,617	28,130	85,767	← Início da Adição de Etanol (FC08).
97,000	1,432	26,275	89,137	
100,000	0,832	31,530	103,081	
103,000	0,374	40,495	123,569	
106,000	0,252	74,498	104,412	
109,000	0,097	113,756	85,863	
112,000	0,000	143,926	66,995	
115,000	0,000	162,906	15,754	
118,000	0,000	175,270	13,859	
124,000	0,000	178,671	6,767	
127,000	0,000	178,980	6,768	
130,000	0,000	179,209	6,769	

APÊNDICE B – IX - Dados Experimentais da Fermentação FC07 (Off-line)

Tempo	X (g.L ⁻¹)	S (g.L ⁻¹)	P (g.L ⁻¹)	
0,000	0,098	197,527	3,987	
3,500	0,175	191,314	4,085	
7,500	0,261	177,434	5,177	
11,000	0,475	154,869	18,803	
14,000	0,689	127,357	30,937	
16,000	1,108	106,955	46,113	
22,000	1,574	83,771	64,529	
25,000	1,966	40,495	72,281	
28,000	2,354	31,221	83,379	
32,000	2,404	8,810	88,115	
36,000	2,216	6,646	93,950	
40,000	1,930	10,819	81,890	
46,000	1,807	12,983	64,037	
49,000	1,820	14,219	60,935	
52,000	1,835	13,910	60,734	
55,000	1,824	14,219	59,369	
59,000	1,805	14,529	60,206	
63,000	1,783	13,292	62,138	← Início da Fermentação Contínua (S _F = 200 g.L ⁻¹)
69,000	1,183	43,586	50,819	
73,000	0,915	72,025	47,011	
76,000	0,700	101,391	44,796	
79,000	0,670	131,561	40,321	
82,000	0,624	161,051	42,581	
85,000	0,746	150,850	44,364	
88,000	1,210	122,102	54,834	
94,000	1,733	57,805	66,174	
97,000	1,994	29,057	72,281	
99,000	2,056	24,111	86,996	
102,000	1,595	48,223	84,630	
105,000	1,041	92,117	69,780	
108,000	0,692	130,448	48,202	
114,000	0,570	159,815	45,301	
119,000	0,733	129,212	48,106	
121,000	0,916	100,464	61,890	
124,000	1,147	86,862	70,244	← Início da Fermentação Contínua (S _F = 300 g.L ⁻¹)
127,000	1,298	113,756	55,871	
130,000	1,253	130,139	61,297	
133,000	0,942	127,666	60,458	
142,000	0,929	130,139	58,050	
145,000	0,932	129,212	59,173	
147,000	0,927	130,448	59,689	

APÊNDICE B – X - Dados Experimentais da Fermentação FC09 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,046	95,706	7,353	
8,000	0,711	25,153	29,399	
11,000	0,969	3,374	35,871	
14,000	1,288	2,577	44,650	
17,000	1,431	1,816	52,951	
20,000	1,412	2,485	50,522	
22,000	1,389	2,509	49,468	← Início da Fermentação Contínua
25,000	1,381	1,313	46,923	
28,000	1,413	1,356	46,996	
32,000	1,380	1,325	47,652	
34,000	1,390	1,540	46,826	
36,000	1,371	1,356	46,956	
40,000	1,392	1,552	48,903	← Início da Adição de Etanol
42,000	1,401	1,258	84,327	
44,000	1,398	1,828	96,821	← Fim da Adição de Etanol
48,000	1,373	1,601	88,124	
52,000	1,368	1,681	56,010	
56,000	1,337	1,470	45,521	
58,000	1,340	1,482	46,031	
62,000	1,377	1,476	44,292	
67,000	1,371	1,476	44,790	
72,000	1,370	1,482	44,167	
78,000	1,339	1,482	45,787	
83,000	1,375	1,470	46,461	
88,000	1,389	1,475	44,903	
93,000	1,360	1,481	45,972	
98,000	1,376	1,482	46,487	
103,000	1,381	1,468	44,731	
108,000	1,392	1,469	45,233	
113,000	1,381	1,461	44,604	
118,000	1,371	1,483	46,240	
123,000	1,379	1,462	45,493	
125,000	1,405	1,454	44,969	

APÊNDICE B – XI - Dados Experimentais da Fermentação FC10 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,068	90,798	8,091	
3,000	0,090	88,344	13,423	
8,000	0,436	74,847	25,052	
12,000	1,131	30,368	35,074	
15,000	1,195	3,172	40,574	
23,000	1,237	2,528	45,150	← Início da Fermentação Contínua
27,000	1,163	1,969	43,100	
31,000	0,974	1,577	42,807	
35,000	0,877	1,528	43,025	
39,000	0,886	1,521	43,250	
48,000	0,900	1,491	42,750	← Início da Adição de Etanol
51,000	1,015	1,055	55,706	
56,000	1,061	0,448	80,250	
61,000	0,923	0,313	87,750	
65,000	0,877	0,000	92,750	← Fim da Adição de Etanol
69,000	0,839	0,055	85,750	
73,000	0,886	0,123	52,750	
78,000	0,886	0,061	42,250	
82,000	0,900	1,546	43,000	
85,000	0,918	1,472	43,500	
87,000	0,909	1,479	42,775	
97,000	0,900	1,491	43,392	
102,000	0,905	1,485	42,911	
107,000	0,895	1,497	43,125	
120,000	0,905	1,479	42,911	
125,000	0,909	1,485	42,619	
129,000	0,900	1,485	43,352	
133,000	0,905	1,491	43,686	

APÊNDICE B – XII - Dados Experimentais da Fermentação FC11 (Off-line)

Tempo	X (g.L⁻¹)	S (g.L⁻¹)	P (g.L⁻¹)	
0,000	0,068	96,319	7,054	
3,000	0,111	92,638	10,064	
8,000	0,457	55,215	28,792	
12,000	0,881	21,472	48,574	
15,000	1,440	3,043	50,574	
23,000	1,394	1,540	52,150	← Início da Fermentação Contínua
27,000	1,409	1,485	45,030	
31,000	1,395	1,509	47,307	
35,000	1,427	1,503	45,725	
39,000	1,394	1,515	46,913	
48,000	1,403	1,509	45,005	← Início da Adição de Etanol
51,000	1,523	1,147	58,206	
56,000	1,532	0,509	83,500	
61,000	1,481	0,442	90,500	
65,000	1,458	0,067	96,250	← Fim da Adição de Etanol
69,000	1,343	0,074	88,750	
73,000	1,291	0,117	56,750	
78,000	1,352	0,074	44,750	
82,000	1,389	1,607	45,270	
85,000	1,403	1,583	48,413	
87,000	1,439	1,331	47,525	
97,000	1,390	1,485	45,892	
102,000	1,395	1,497	45,411	
107,000	1,406	1,491	45,625	
120,000	1,395	1,491	46,161	
125,000	1,385	1,497	45,119	
129,000	1,392	1,497	45,852	
133,000	1,419	1,485	44,675	

APÊNDICE C – I - Dados Experimentais da Fermentação FC01 (Online)

Tempo	X (g.L⁻¹)	Tempo	X (g.L⁻¹)
0	0,028	44	0,668
1	0,042	45	0,668
2	0,068	46	0,668
3	0,093	47	0,668
4	0,201	48	0,668
5	0,245	49	0,668
6	0,362	50	0,668
7	0,422	51	0,668
8	0,543	52	0,668
9	0,752	53	0,668
10	0,841	54	0,668
11	0,971	55	0,668
12	1,180	56	0,668
13	1,230	57	0,668
14	1,253	58	0,668
15	1,264	59	0,668
16	1,271	60	0,668
17	1,267	61	0,668
18	1,261	62	0,668
19	1,200	63	0,668
20	1,051	64	0,668
21	0,991	65	0,668
22	0,952	66	0,668
23	0,901	67	0,668
24	0,860	68	0,668
25	0,825	69	0,668
26	0,810	70	0,668
27	0,800	71	0,668
28	0,795	72	0,668
29	0,785	73	0,668
30	0,781	74	0,668
31	0,763	75	0,668
32	0,748	76	0,668
33	0,734	77	0,668
34	0,728	78	0,668
35	0,707	79	0,668
36	0,705	80	0,668
37	0,697	81	0,668
38	0,688		
39	0,681		
40	0,668		
41	0,668		
42	0,668		
43	0,668		

APÊNDICE C – II - Dados Experimentais da Fermentação FC03 (Online)

Tempo	X (g.L⁻¹)	Tempo	X (g.L⁻¹)
0	0,068	44	0,859
1	0,074	45	0,859
2	0,082	46	0,859
3	0,096	47	0,859
4	0,116	48	0,859
5	0,265	49	0,859
6	0,342	50	0,859
7	0,399	51	0,859
8	0,545	52	0,859
9	0,957	53	0,859
10	1,112	54	0,859
11	1,243	55	0,859
12	1,381	56	0,859
13	1,481	57	0,859
14	1,501	58	0,859
15	1,513	59	0,859
16	1,527	60	0,859
17	1,507	61	0,859
18	1,412	62	0,859
19	1,316	63	0,859
20	1,208	64	0,859
21	1,086	65	0,859
22	0,990	66	0,859
23	0,941	67	0,859
24	0,911	68	0,859
25	0,900	69	0,859
26	0,890	70	0,859
27	0,880	71	0,859
28	0,877		
29	0,861		
30	0,859		
31	0,859		
32	0,859		
33	0,859		
34	0,859		
35	0,859		
36	0,859		
37	0,859		
38	0,859		
39	0,859		
40	0,859		
41	0,859		
42	0,859		
43	0,859		

APÊNDICE C – III - Dados Experimentais da Fermentação FC04 (Online)

Tempo	X (g.L⁻¹)	Tempo	X (g.L⁻¹)
0	0,040	49	1,651
1	0,049	50	1,651
2	0,050	51	1,651
3	0,052	52	1,651
4	0,081	53	1,651
5	0,102	54	1,651
6	0,151	55	1,651
7	0,232	56	1,651
8	0,302	57	1,651
9	0,369	58	1,651
10	0,431	59	1,651
11	0,511	60	1,651
12	0,571	61	1,651
13	0,679	62	1,651
14	0,734	63	1,651
15	0,871	64	1,651
16	0,976	65	1,651
17	1,108	66	1,651
18	1,201	67	1,651
19	1,332	68	1,651
20	1,408	69	1,651
21	1,543	70	1,651
22	1,619	71	1,651
23	1,672	72	1,651
24	1,698	73	1,651
25	1,713	74	1,651
26	1,721	75	1,651
27	1,729	76	1,651
28	1,726	77	1,651
29	1,726	78	1,651
30	1,726	79	1,651
31	1,726	80	1,651
32	1,726	81	1,651
33	1,721	82	1,651
34	1,720	83	1,651
35	1,713	84	1,651
36	1,702	85	1,651
37	1,683	86	1,651
38	1,676	87	1,651
39	1,651	88	1,651
40	1,651	89	1,651
41	1,651	90	1,651
42	1,651	91	1,651
43	1,651	92	1,651
44	1,651	93	1,651
45	1,651	94	1,651
46	1,651	95	1,651
47	1,651		
48	1,651		

APÊNDICE C – IV - Dados Experimentais da Fermentação FC06/FC08 (Online)

Tempo	X (g.L⁻¹)	Tempo	X (g.L⁻¹)	Tempo	X (g.L⁻¹)
0	0,261	47	1,907	94	1,638
1	0,268	48	1,732	95	1,644
2	0,276	49	1,439	96	1,572
3	0,278	50	1,078	97	1,429
4	0,291	51	0,972	98	1,263
5	0,316	52	0,902	99	1,003
6	0,322	53	0,851	100	0,841
7	0,351	54	0,797	101	0,734
8	0,369	55	0,782	102	0,511
9	0,389	56	0,811	103	0,379
10	0,466	57	0,859	104	0,321
11	0,512	58	0,891	105	0,277
12	0,609	59	0,973	106	0,248
13	0,703	60	1,070	107	0,173
14	0,877	61	1,147	108	0,138
15	0,961	62	1,277	109	0,093
16	1,009	63	1,443	110	0,020
17	1,111	64	1,612	111	0,000
18	1,178	65	1,666	112	0,000
19	1,199	66	1,712	113	0,000
20	1,274	67	1,788	114	0,000
21	1,399	68	1,847	115	0,000
22	1,463	69	1,891	116	0,000
23	1,587	70	1,902	117	0,000
24	1,637	71	1,909	118	0,000
25	1,711	72	1,877	119	0,000
26	1,833	73	1,729	120	0,000
27	1,902	74	1,554	121	0,000
28	1,939	75	1,326	122	0,000
29	2,017	76	1,174	123	0,000
30	2,101	77	1,008	124	0,000
31	2,132	78	0,870	125	0,000
32	2,184	79	0,800	126	0,000
33	2,211	80	0,789	127	0,000
34	2,247	81	0,789	128	0,000
35	2,263	82	0,788	129	0,000
36	2,289	83	0,789	130	0,000
37	2,289	84	0,802		
38	2,289	85	0,831		
39	2,289	86	0,918		
40	2,289	87	1,001		
41	2,289	88	1,139		
42	2,289	89	1,254		
43	2,278	90	1,373		
44	2,272	91	1,457		
45	2,254	92	1,522		
46	2,160	93	1,598		