

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICABILIDADE DE MODELOS CINÉTICOS PARA
MODELAGEM MATEMÁTICA DE CULTIVO EM
BATELADA DE *BACILLUS FIRMUS* (CEPA 37) NA
PRODUÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA
GLUCANOTRANSFERASE (CGTASE)**

Fernando Pereira Calderaro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisella Maria Zanin
Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Estadual de Maringá, como
parte dos requisitos necessários
à obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Química, área
de Desenvolvimento de
Processos.

Maringá - PR - Brasil
Fevereiro de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C146a Calderaro, Fernando Pereira
Aplicabilidade de modelos cinéticos para modelagem matemática de cultivo em batelada de *Bacillus firmus* (cepa 37) na produção de ciclomaltodextrina gluconotransferase (CGTase) / Fernando Pereira Calderaro. -- Maringá, 2012.
135 f. : il. color., figs., tabs., + anexo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2012.

1. *Bacillus firmus* - Produção CGTase. 2. Equações cinéticas - Modelagem. 3. Produção CGTase - Cultivo em batelada. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Olivo, José Eduardo, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 21.ed. 660.63

MN-002058

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

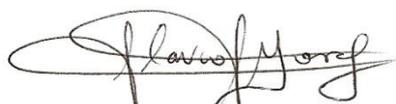
Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Fernando Pereira Calderaro perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 10 de fevereiro de 2012.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Orientadora / Presidente


Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Coorientador


Prof. Dr. Esdras Penêdo de Carvalho
Membro


Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Membro

“O Coração do homem considera o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.”

Provérbios, 16:9

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus pela vida, saúde e oportunidade de trilhar um caminho cheio de graça e bênçãos, por ter me concedido uma família maravilhosa e uma pessoa especial para estar ao meu lado nos dias de minha vida.
- ✓ Aos meus pais, Miriam e Gessiman, pelo apoio e confiança que sempre prestaram em todos os momentos, fáceis e difíceis, que mesmo estando longe me enchem de força pelas suas palavras.
- ✓ Aos meus irmãos, Rafael e Renato, que também estão trilhando seus caminhos acadêmicos, pelo companheirismo e amizade fraterna.
- ✓ À minha esposa Veridiane pelo amor, carinho e paciência, me ajudando a manter a calma nas horas de dificuldade.
- ✓ À professora Gisella pela orientação e confiança prestadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao professor Olivo pela co-orientação, pelos momentos de discussões na tentativa de elucidar os fenômenos, pelos puxões de orelha e pela amizade cultivada desde os tempos da graduação.
- ✓ Aos colegas pelos momentos de auxílio nas disciplinas e pela amizade desenvolvida neste período.
- ✓ Ao CNPq pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de modelos cinéticos clássicos na produção da enzima Ciclomaltodextrina-Glucanotransferase (CGTase) produzida em processo de batelada por *Bacillus firmus* da CEPA 37.

A finalidade de se estudar a aplicação dos modelos cinéticos na produção da enzima CGTase é poder utilizar a modelagem matemática como uma ferramenta para otimização do processo de produção da referida enzima e também permitir a simulação de novas situações de produção sem envolver gastos de reagentes e tempo despendido em laboratório.

Os dados utilizados neste trabalho foram extraídos da dissertação de mestrado de Marques (2004) e do trabalho de iniciação científica de Calderaro (2007), que avaliaram diversas condições experimentais de cultivo de *Bacillus firmus* (CEPA 37) na produção de CGTase.

O trabalho consistiu em avaliar a aplicação de modelos cinéticos através de um algoritmo de resolução de equações diferenciais escrito no software MATLAB[®] que foi elaborado para resolver um sistema de três equações diferenciais, sendo a que representa a taxa de crescimento celular, dX/dt , a que representa a taxa de formação de produto expressa em atividade enzimática, dP/dt (ou dA/dt) e a que representa a taxa de consumo de substrato, dS/dt . Dentro destas equações diferenciais foram substituídos os modelos cinéticos abordados, sendo utilizados os modelos de Monod (1949), Aiba *et al* (1968) e Andrews (1968).

Foram então desenvolvidos quatro sistemas de equações diferenciais, o primeiro que envolveu a representação do crescimento celular por Monod (1949), da atividade enzimática por Aiba *et al* (1968) e do consumo de substrato como a relação entre o crescimento celular e a atividade enzimática observada. O segundo sistema de equações diferenciais envolveu a representação do crescimento celular também por Monod (1949), a representação da atividade enzimática por Andrews (1968) e o consumo de substrato como a relação entre o crescimento celular e a atividade enzimática observada. No sistema três, tanto para o crescimento celular quanto para a atividade enzimática considerou-se que seus comportamentos respeitavam a equação cinética de Aiba *et al* (1968) e o consumo de substrato se manteve a relação entre o crescimento celular e da atividade enzimática. No sistema quatro, o crescimento celular e a atividade enzimática foram considerados como respeitando a equação cinética de Andrews (1968) a do

consumo de substrato se manteve como a relação entre o crescimento celular e a atividade enzimática.

Foram analisados também os comportamentos das curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de atividade enzimática (μ_A) em função do tempo, com o objetivo de verificar alguma relação entre as três curvas de velocidades específicas e tentar classificar a produção de CGTase por *Bacillus firmus* CEPA 37 como produção de enzima associada ou não ao crescimento celular. Observou-se para alguns meios de cultura uma relação entre as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e de atividade enzimática (μ_A), caracterizado pela atividade amilolítica da enzima CGTase, mas não se pôde afirmar que a produção da enzima está associada ao crescimento do *Bacillus firmus* CEPA 37 nas condições estudadas.

Outra observação realizada foi a relação de Luedeking e Piret (1959), entre a velocidade específica de formação de produto (μ_A) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_X), através da elaboração dos gráficos para cada meio de cultura, em que a velocidade específica de atividade enzimática (μ_A) compôs o eixo y e a velocidade específica de crescimento celular (μ_X) compôs o eixo x. Para as concentrações de amido utilizadas nos meios de cultura estudados (maior do que 10g/L), não se observou uma relação linear entre as velocidades específicas de atividade enzimática (μ_A) e de crescimento celular (μ_X), não sendo possível aplicar a relação de Luedeking e Piret (1959) no estudo dos modelos cinéticos.

Para a maior parte dos meios estudados, o modelo Aiba *et al* (1968) não apresentou nenhum resultado, sendo difícil a resolução do sistema de equações nas condições estudadas, já a combinação de modelos Monod-Aiba apresentou resultados semelhantes, graficamente, à combinação Monod-Andrews, e o modelo de Andrews (1968) apresentou bons resultados para praticamente todos os meios, porém, nenhuma das equações cinéticas estudadas foi suficiente para ajustar os três conjuntos de dados simultaneamente.

Por este motivo, para a produção de CGTase por *Bacillus firmus* CEPA 37, nas condições estudadas, é necessário se manipular as equações cinéticas existente ou se desenvolver novas equações cinéticas que permitam representar adequadamente este processo fermentativo.

Palavras-chave: CGTase, *Bacillus firmus*, equações cinéticas, modelagem, batelada.

ABSTRACT

This work had as objective evaluates the applicability of the classical kinetic models in the production of the enzyme Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase (CGTase) produced in a batch process by *Bacillus firmus* STRAIN 37.

The purpose of studying the application of the kinetic models in the production of the enzyme CGTase is to use the mathematical modeling as a tool for optimization of the process of production of the referred enzyme and also allow the simulation of new production situations without involving expenses of and time spent at laboratory.

The data used in this work were extracted of the dissertations of master's degree of Marques (2004) and of the work of scientific initiation of Calderaro (2007), that evaluate several experimental conditions of cultivation of *Bacillus firmus* (STRAIN 37) in the production of CGTase.

The work consisted in evaluating the application of kinetic models through an algorithm of resolution of differential equations written in the software MATLAB[®] that was elaborated to solve a system of three differential equations, being the one that represents the tax of cellular growth, dX/dt , the one that represents the tax of expressed product formation in enzymatic activity, dP/dt (or dA/dt) and the one that represents the tax of substrate consumption, dS/dt . Inside of this differential equations the approached kinetic models were substituted, being used models of Monod (1949), the Aiba *et al* (1968) and the Andrews (1968).

They were then developed four systems of differential equations, the first that it involved the representation of the cellular growth for Monod (1949), of the enzymatic activity for Aiba *et al* (1968) and of the substrate consumption as the relationship between the cellular growth and the observed enzymatic activity. The second system of differential equations involved the representation of the cellular growth also for Monod (1949), the representation of the enzymatic activity for Andrews (1968) and the substrate consumption as the relationship between the cellular growth and the observed enzymatic activity. In the system three, so much for the cellular growth as for the enzymatic activity it was considered that their behaviors respected the kinetic equation of Aiba *et al* (1968) and the substrate consumption stayed the relationship between the cellular growth and of the enzymatic activity. In the system four, the cellular growth and enzymatic activity they were considered as respecting the kinetic equation of Andrews

(1968) to the substrate consumption stayed the relationship between the cellular growth and the enzymatic activity.

Were they also analyzed the behaviors of the curves of specific rate of cellular growth (μ_X), substrate consumption (μ_S) and enzymatic activity (μ_A) in function of the time, with the objective of verify some relationship among the three curves of specific rate and try to classify the production of CGTase by *Bacillus firmus* STRAIN 37 how production of associated enzyme or not to the cellular growth. Was it observed for some culture means a relationship among the specific rates of substrate consumption (μ_S) and of enzymatic activity (μ_A), done characterize by the amylolytic activity of the enzyme CGTase, but could not one affirm that the production of the enzyme is associated to the growth of the *Bacillus firmus* STRAIN 37 in the studied conditions.

Was another accomplished observation the relationship of Luedeking and Piret (1959) among the specific rate of product formation (μ_A) and the specific rate of cellular growth (μ_X), through the elaboration of the graphs for each medium, in what the specific rate of enzymatic activity (μ_A) did it composes the axis “y” and the specific rate of cellular growth (μ_X) did it composes the axis “x”. For the concentrations of starch used in the culture mediums studied (larger of the than 10g/L), was not a lineal relationship observed between the specific rate of enzymatic activity (μ_A) and of cellular growth (μ_X), not being possible to apply the relationship of Luedeking and Piret (1959) in the study of the kinetic models.

For most studied mediums, the model Aiba *et al* (1949) didn't present any result, being difficult the resolution of the system of equations in the studied conditions, already the combination Monod-Aiba presented similar results, graphically, that the combination Monod-Andrews, and the model of Andrews (1968) presented good results for practically all of the mediums, none of the studied kinetic equations was enough to adjust the three groups of given simultaneously.

For this reason, for the production of CGTase for *Bacillus firmus* STRAIN 37, in the studied conditions, it's necessary to manipulates the existent kinetic equations or to develop new kinetic equations to allow to represent this fermentative process appropriately.

Key words: CGTase, *Bacillus firmus*, kinetic equations, modeling, batch.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	AMIDO E MALTODEXTRINAS.....	3
2.2	CICLODEXTRINAS.....	4
2.3	AS ENZIMAS.....	5
2.4	ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA GLUCANOTRANSFERASE (CGTase)....	6
2.4.1	Mecanismo de Ação da CGTase.....	8
2.4.2	Cinética da Enzima CGTase.....	10
2.5	CRESCIMENTO CELULAR.....	14
2.6	CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO.....	16
2.6.1	Parâmetros de Transformação.....	17
2.6.2	Classificação dos Processos Fermentativos.....	19
2.7	MODELAGEM E SIMULAÇÃO APLICADA A PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	22
2.7.1	Modelos Fenomenológicos.....	23
2.7.2	Modelos entrada-saída.....	24
2.7.3	Modelagem Aplicada à Produção de CGTase.....	24
3.	METODOLOGIA.....	26
3.1	EQUAÇÕES CINÉTICAS.....	27
3.2	VALORES EXPERIMENTAIS.....	30
3.2.1	Caracterização dos Meios de Cultura.....	30
3.2.2	Determinação dos Parâmetros Iniciais.....	31
3.2.3	Cálculo dos Parâmetros pelo MATLAB®.....	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	COMPORTAMENTO CINÉTICO DAS CURVAS DE μ_x , μ_A e μ_S	36
4.1.1	Meio de Cultura M7.....	36
4.1.2	Meio de Cultura M8.....	38
4.1.3	Meio de Cultura M9.....	40
4.1.4	Meio de Cultura M34.....	41
4.1.5	Meio de Cultura M56.....	43
4.1.6	Meio de Cultura E3A.....	45
4.1.7	Meio de Cultura E3B.....	46
4.1.8	Meio de Cultura E5A.....	48
4.1.9	Meio de Cultura E5F.....	50
4.1.10	Meio de Cultura E6A.....	51
4.1.11	Meio de Cultura E6F.....	53

4.1.12 Considerações Gerais	55
4.2 PARÂMETROS INICIAIS	56
4.3 MEIO DE CULTURA M7	58
4.3.1 Modelos Monod-Aiba.....	59
4.3.2 Modelos Monod-Andrews.....	60
4.3.3 Modelo Aiba.....	61
4.3.4 Modelo Andrews	61
4.4 MEIO DE CULTURA M8	62
4.4.1 Modelos Monod-Aiba.....	64
4.4.2 Modelos Monod-Andrews.....	64
4.4.3 Modelo Aiba.....	64
4.4.4 Modelo Andrews	64
4.5 MEIO DE CULTURA M9	64
4.5.1 Modelos Monod-Aiba.....	65
4.5.2 Modelos Monod-Andrews.....	66
4.5.3 Modelo Aiba.....	67
4.5.4 Modelo Andrews	67
4.6 MEIO DE CULTURA M34	69
4.6.1 Modelos Monod-Aiba.....	70
4.6.2 Modelos Monod-Andrews.....	70
4.6.3 Modelo Aiba.....	71
4.6.4 Modelo Andrews	72
4.7 MEIO DE CULTURA M56	73
4.7.1 Modelos Monod-Aiba.....	74
4.7.2 Modelos Monod-Andrews.....	75
4.7.3 Modelo Aiba.....	76
4.7.4 Modelo Andrews	77
4.8 MEIO DE CULTURA E3A	78
4.8.1 Modelo Monod-Aiba.....	79
4.8.2 Modelo Monod-Andrews	80
4.8.3 Modelo Aiba.....	81
4.8.4 Modelo Andrews	82
4.9 MEIO DE CULTURA E3B.....	83
4.9.1 Modelo Monod-Aiba.....	84
4.9.2 Modelo Monod-Andrews	85
4.9.3 Modelo Aiba.....	86
4.9.4 Modelo Andrews	87

4.10 MEIO DE CULTURA E5A	88
4.10.1 Modelo Monod-Aiba	89
4.10.2 Modelo Monod-Andrews	90
4.10.3 Modelo Aiba	91
4.10.4 Modelo Andrews	91
4.11 MEIO DE CULTURA E5F	93
4.11.1 Modelo Monod-Aiba	94
4.11.2 Modelo Monod-Andrews	94
4.11.3 Modelo Aiba	95
4.11.4 Modelo Andrews	95
4.12 MEIO DE CULTURA E6A	97
4.12.1 Modelo Monod-Aiba	98
4.12.2 Modelo Monod-Andrews	98
4.12.3 Modelo Aiba	99
4.12.4 Modelo Andrews	99
4.13 MEIO DE CULTURA E6F	101
4.13.1 Modelo Monod-Aiba	102
4.13.2 Modelo Monod-Andrews	102
4.13.3 Modelo Aiba	103
4.13.4 Modelo Andrews	103
4.14 CONSIDERAÇÕES GERAIS	105
4.15 REPRESENTAÇÃO POR LUEDEKING E PIRET	109
4.16 OUTRAS CONSIDERAÇÕES	114
4.16.1 Testes com outras funções objetivo	114
4.16.2 Ajuste de dados por Spline	115
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	117
6. REFERÊNCIAS	120
7. ANEXO I	127
8. ANEXO II	133

Índice de Figuras

Figura 2.1-Formação de dextrinas de cadeia aberta e cíclicas a partir da molécula de amido. Fonte: SZEJTLI (1988).	7
Figura 2.2-Estruturas de α , β e γ – Ciclodextrinas. Fonte: SZEJTLI (1988).....	7
Figura 2.3-Esquema da estrutura funcional das Ciclodextrinas. Fonte: baseado em SZEJTLI (1988), modificado por Calderaro.	7
Figura 2.4 - Representação da cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas. Fonte: baseado em MANAKKER <i>et al</i> (2009), modificado por Calderaro.	8
Figura 2.5-Dimensões das moléculas de Ciclodextrinas. Fonte: SZEJTLI (1988).	8
Figura 2.6 - Curva de crescimento de micro-organismo em sistema de cultivo descontínuo. Fonte: SCHMIDELL <i>et al</i> (2001).	14
Figura 2.7 - Curvas de ajuste dos valores de S, X e P hipotéticas para uma fermentação. Fonte: SCHMIDELL <i>et al</i> (2001).	16
Figura 2.8 - Variação das velocidades específicas em uma fermentação alcoólica. Fonte: SCHMIDELL <i>et al</i> (2001).....	19
Figura 2.9 - Variação das velocidades específicas na produção de ácido cítrico. Fonte: SCHMIDELL <i>et al</i> (2001).....	20
Figura 2.10 - Variação das velocidades específicas da produção de penicilina. Curva 1 - Produção de antibiótico; Curva 2 - Consumo de açúcar; Curva 3 - Consumo de oxigênio; Curva 4 - Crescimento do micro-organismo. Fonte: SCHMIDELL <i>et al</i> (2001).	21
Figura 3.1 - Algoritmo de resolução das equações diferenciais. Referência Pessoal.....	26
Figura 3.2 - Determinação de μ_{xmax} para o meio M56 de Marques (2004).	32
Figura 3.3 - Determinação de $Y_{X/S}$ para o meio M56 de Marques (2004).....	33
Figura 3.4 - Determinação de $Y_{A/S}$ para o meio M56 de Marques (2004).....	33
Figura 4.1 - Meio M7. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h.	37
Figura 4.2 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M7.....	37
Figura 4.3 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M7.....	37
Figura 4.4 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M7.....	38
Figura 4.5 - Meio M8. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h.	38
Figura 4.6 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M8.....	39

Figura 4.7 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M8.	39
Figura 4.8 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M8.....	39
Figura 4.9 - Meio M9. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h.	40
Figura 4.10 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M9.....	40
Figura 4.11 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M9.	41
Figura 4.12 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M9.....	41
Figura 4.13 - Meio M34. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h.	42
Figura 4.14 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M34.....	42
Figura 4.15 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M34.	42
Figura 4.16 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M34.....	43
Figura 4.17 - Meio M56. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h.	43
Figura 4.18 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M56.....	44
Figura 4.19 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M56.	44
Figura 4.20 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M56.....	44
Figura 4.21 - Meio E3A. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.	45
Figura 4.22 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3A.....	45
Figura 4.23 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E3A.	46
Figura 4.24 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3A.....	46
Figura 4.25 - Meio E3B. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.	47
Figura 4.26 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3B.	47
Figura 4.27 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E3B.....	47
Figura 4.28 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3B.	48
Figura 4.29 - Meio E5A. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.	48
Figura 4.30 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5A.....	49
Figura 4.31 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E5A.	49
Figura 4.32 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5A.....	49
Figura 4.33 - Meio E5F. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.	50

Figura 4.34 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5F.	50
Figura 4.35 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E5F.	51
Figura 4.36 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5F.	51
Figura 4.37 - Meio E6A. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.	52
Figura 4.38 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6A.	52
Figura 4.39 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E6A.	53
Figura 4.40 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6A.	53
Figura 4.41 - Meio E6F. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.	54
Figura 4.42 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6F.	54
Figura 4.43 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E6F.	54
Figura 4.44 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6F.	55
Figura 4.45 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M7 truncados em 36h de cultivo.	59
Figura 4.46 – Meio M7. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação de modelos Monod-Aiba.	60
Figura 4.47 - Meio M7. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação de modelos Monod-Andrews.	61
Figura 4.48 - Meio M7. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	62
Figura 4.49 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M8 truncados em 36h de cultivo.	63
Figura 4.50 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M9 truncados em 36h de cultivo.	65
Figura 4.51 - Meio M9. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	66
Figura 4.52 - Meio M9. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.	67

Figura 4.53 - Meio M9. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	68
Figura 4.54 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M34 truncados em 36h de cultivo.	69
Figura 4.55 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	70
Figura 4.56 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.	71
Figura 4.57 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.	72
Figura 4.58 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	73
Figura 4.59 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M56 truncados em 36h de cultivo.	74
Figura 4.60 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	75
Figura 4.61 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.	76
Figura 4.62 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.	77
Figura 4.63 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	78
Figura 4.64 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E3A truncados em 36h de cultivo.	79
Figura 4.65 - Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	80
Figura 4.66 - Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.	81

Figura 4.67- Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.....	82
Figura 4.68 - Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	83
Figura 4.69 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E3B truncados em 24h de cultivo.	84
Figura 4.70 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	85
Figura 4.71 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.....	86
Figura 4.72 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.....	87
Figura 4.73 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	88
Figura 4.74 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E5A truncados em 24h de cultivo.	89
Figura 4.75 - Meio E5A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	90
Figura 4.76 - Meio E5A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.....	91
Figura 4.77 - Meio E5A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. ...	92
Figura 4.78 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E5F truncados em 24h de cultivo.....	93
Figura 4.79 - Meio E5F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	94
Figura 4.80 - Meio E5F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.....	95

Figura 4.81 - Meio E5F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.	96
Figura 4.82 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E6A truncados em 24h de cultivo.	97
Figura 4.83 - Meio E6A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	98
Figura 4.84 - Meio E6A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.	99
Figura 4.85 - Meio E6A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. .	100
Figura 4.86 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E6F truncados em 24h de cultivo.	101
Figura 4.87 - Meio E6F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.	102
Figura 4.88 - Meio E6F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.	103
Figura 4.89 - Meio E6F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews. .	104
Figura 4.90 - Meio M7. Relação entre μ_A e μ_X	110
Figura 4.91 - Meio M8. Relação entre μ_A e μ_X	110
Figura 4.92 - Meio M9. Relação entre μ_A e μ_X	110
Figura 4.93 - Meio M34. Relação entre μ_A e μ_X	111
Figura 4.94 - Meio M56. Relação entre μ_A e μ_X	111
Figura 4.95 - Meio E3A. Relação entre μ_A e μ_X	111
Figura 4.96 - Meio E3B. Relação entre μ_A e μ_X	112
Figura 4.97 - Meio E5A. Relação entre μ_A e μ_X	112
Figura 4.98 - Meio E5F. Relação entre μ_A e μ_X	112
Figura 4.99 - Meio E6A. Relação entre μ_A e μ_X	113
Figura 4.100 - Meio E6F. Relação entre μ_A e μ_X	113

Figura 4.101 - Curvas de ajuste por <i>spline</i> para o meio de cultura M34. a) Crescimento Celular (X), b) Atividade Enzimática (A), c) Consumo de Substrato (S).	115
Figura 4.102 - Curvas de ajuste por <i>spline</i> para o meio de cultura M56. a) Crescimento Celular (X), b) Atividade Enzimática (A), c) Consumo de Substrato (S).	116
Figura 7.1 - Meio M7. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h. (MARQUES, 2004).	127
Figura 7.2 - Meio M8. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h. (MARQUES, 2004).	128
Figura 7.3 - Meio M9. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h. (MARQUES, 2004).	128
Figura 7.4 - Meio M34. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h. (MARQUES, 2004).	129
Figura 7.5 - Meio M56. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h. (MARQUES, 2004).	129
Figura 7.6 - Meio E3A. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).	130
Figura 7.7 - Meio E3B. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).	130
Figura 7.8 - Meio E5A. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).	131
Figura 7.9 - Meio E5F. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).	131
Figura 7.10 - Meio E6A. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).	132

Figura 7.11 - Meio E6F. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007). 132

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a produção de α , β e γ -CD para diferentes CGTases	10
Tabela 2.2 - Caracterísitcas das CGTases produzidas por diversos microrganismos	12
Tabela 2.3 - Características das CGTases produzidas por diversos microrganismos	13
Tabela 3.1 - Caracterização dos meios de cultura de Marques (2004).....	30
Tabela 3.2 - Caracterização dos meios de cultura de Calderaro (2007).....	31
Tabela 4.1 - Determinação de μ_{xmax} experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).....	56
Tabela 4.2 - Determinação de μ_{Amax} experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).....	56
Tabela 4.3 - Determinação de $Y_{X/S}$ experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).....	56
Tabela 4.4 - Determinação de $Y_{A/S}$ experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).....	57
Tabela 4.5 - Determinação de μ_{xmax} experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).....	57
Tabela 4.6 - Determinação de μ_{Amax} experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).....	57
Tabela 4.7 - Determinação de $Y_{X/S}$ experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).....	57
Tabela 4.8 - Determinação de $Y_{A/S}$ experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).....	58
Tabela 4.9 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M7	62
Tabela 4.10 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M9	68
Tabela 4.11 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M34	73
Tabela 4.12 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M56	78
Tabela 4.13- Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E3A	83
Tabela 4.14 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E3B.....	88
Tabela 4.15 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E5A	92
Tabela 4.16 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E5F.....	96
Tabela 4.17 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E6A.....	100
Tabela 4.18 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E6F.....	104

Nomenclatura:

A : atividade enzimática (U/mL)

$C1$: constante de integração

$C2$: constante de integração

$\frac{dp}{dt}$: taxa de formação do produto;

$\frac{ds}{dt}$: taxa de consumo de substrato;

$\frac{dx}{dt}$: taxa de crescimento celular;

kD: kilo-Dalton, 1000 Dalton. 1 Dalton (D) equivale a uma unidade de massa molecular.

K_{SX} : constante de saturação (g/L)

K_{SA} : constante de saturação quando o produto é dado em atividade enzimática (g/L)

K_{SP} : constante de saturação (g/L)

K_{IS} : constante de inibição pelo substrato na velocidade de crescimento celular (g/L)

K_{IP} : constante de inibição pelo substrato na velocidade de formação do produto (g/L)

K_{IA} : constante de inibição pelo substrato na velocidade de formação do produto quando o produto é dado em atividade enzimática (g/L)

K_m : constante de Michaelis-Menten

P_X : produtividade em biomassa (g/L·h)

P_P : produtividade em produto (g/L·h)

P : concentração de produto (g/L)

P_M : concentração de produto máxima ou final (g/L)

P_0 : concentração de produto inicial (g/L)

(p/v): % massa/volume, utilizado para caracterizar os meios de cultura

r_X : velocidade instantânea de crescimento celular (g/L·h)

r_S : velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L·h)

r_p : velocidade instantânea de formação de produto (g/L·h)

S : concentração de substrato (g/L)

S_0 : concentração de substrato inicial (g/L)

$t_f = t_{fp}$: tempo final de um cultivo ou fermentação (h)

U : unidade de atividade enzimática (μmol de β -CD formado /min)

X : concentração celular (g/L)

X_M : concentração celular máxima ou final (g/L)

X_0 : concentração celular inicial (g/L)

$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células (g célula/g substrato)

$Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto (g produto/g substrato)

$Y_{X/P}$: quantidade de células geradas por produto formado (g célula/g produto)

$Y_{A/S}$: fator de conversão de substrato em produto expresso em atividade enzimática

($U_{enzima} \cdot L/g \text{ substrato} \cdot mL$)

Letras gregas:

μ : velocidade específica (h^{-1})

μ_X : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

μ_S : velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g substrato} / \text{g célula} \cdot \text{h}$)

μ_P : velocidade específica de formação de produto ($\text{g produto} / \text{g célula} \cdot \text{h}$)

μ_A : velocidade específica de formação de produto expressa em atividade enzimática
($\text{U}_{\text{enzima}} \cdot \text{L} / \text{g célula} \cdot \text{mL} \cdot \text{h}$)

$\mu_{X_{\text{max}}}$: veloc. específica de crescimento celular máxima (h^{-1})

$\mu_{A_{\text{max}}}$: veloc. específica de atividade enzimática máxima ($\text{U}_{\text{enzima}} \cdot \text{L} / \text{g célula} \cdot \text{mL} \cdot \text{h}$)

1. INTRODUÇÃO

A importância das Ciclodextrinas aumenta com o passar dos anos, principalmente nos setores farmacêuticos e alimentícios. Sua capacidade de encapsulamento de substâncias, alterando suas propriedades físico-químicas tem atraído diversos estudos para a estabilização de fármacos e de produtos alimentícios.

A enzima responsável pela formação das ciclodextrinas é a ciclomaltodextrinoglucanotransferase (CGTase), que atua sobre o amido formando as moléculas cíclicas, das quais as mais comuns são a α -ciclodextrina (6 moléculas de glicose), β -ciclodextrina (7 moléculas de glicose) e a γ -ciclodextrina (8 moléculas de glicose).

Além das pesquisas que envolvem as propriedades das ciclodextrinas, também existem as pesquisas que tratam da produção da enzima CGTase por micro-organismos, principalmente bacilos. Por se tratar de um produto biotecnológico e caro, a otimização do processo de produção de CGTase e o barateamento do custo desta produção podem refletir diretamente no custo de produção de ciclodextrinas.

A modelagem de processos fermentativos é uma grande ferramenta na otimização de processos de obtenção de produtos biotecnológicos, podendo auxiliar na redução de custo de produção destas substâncias, envolvendo menor gasto em pesquisas laboratoriais. Existem modelos cinéticos clássicos que possuem grande aplicabilidade de acordo com o tipo de processo em estudo, como o modelo de Monod (1949) aplicável a processos em que há apenas um substrato limitante e não há inibição por este substrato e os modelos de Aiba *et al* (1968) e Andrews (1968) que também consideram a existência de apenas um substrato limitante mas com atividade inibitória sobre o crescimento do micro-organismo.

Tendo em mãos um conjunto de dados experimentais, é possível iniciar um estudo de modelagem deste processo, tentando representar o comportamento do micro-organismo em estudo por meio de curvas experimentais de crescimento celular (X), de formação de produto (P) e de consumo de substrato (S), seja utilizando equações cinéticas consagradas, seja propondo uma nova equação cinética.

Neste trabalho foram utilizados os modelos cinéticos de Monod (1949), Aiba *et al* (1986) e Andrews (1986), que foram substituídos em um sistema de equações diferenciais resolvido pelo método Runge-Kutta de quarta ordem (CHAPRA E CANALE, 2008), utilizando a função *ode45* do MATLAB[®], sendo os parâmetros

otimizados pelo método Simplex e os erros comparados pelo método dos Mínimos Quadrados. Todo o cálculo foi realizado em uma rotina desenvolvida no software MATLAB[®].

Também foram feitas análises do comportamento das curvas de velocidade específica de crescimento celular (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de atividade enzimática (μ_A) para verificar alguma associação entre as mesmas, principalmente, se a atividade da enzima CGTase é associada ao crescimento do *Bacillus firmus* CEPA 37.

Ao final do trabalho foi feita a verificação da relação de Luedeking e Piret (1959) para a velocidade específica de crescimento celular (μ_X) e para a velocidade específica de atividade enzimática (μ_A), a fim de verificar a aplicabilidade da relação descrita por estes autores, apresentada na equação 2.14.

O objetivo principal do trabalho foi analisar os modelos acima citados e sua aplicabilidade na produção de CGTase, avaliando o comportamento matemático dos modelos em relação aos dados obtidos experimentalmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMIDO E MALTODEXTRINAS

O amido pode ser encontrado em todas as partes da maioria das plantas superiores, sendo, depois da celulose, a principal substância glicosídica sintetizada pelos vegetais, por ação da energia solar. Quimicamente é um carboidrato formado por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio na razão 6:10:5 ($C_6H_{10}O_5$), podendo ser considerado como um polímero de condensação de glicose, constituído de unidades de anidroglicose ligadas entre si pelo oxigênio de carbono C_1 de uma, ao carbono C_4 da outra, chamadas de ligações glicosídicas, que são estáveis em condições alcalinas e hidrolisáveis em meios ácidos.

As principais fontes comerciais de amido são os grãos de cereais (milho, trigo, sorgo e arroz), tubérculos (batata), raízes (mandioca, batata doce e araruta) e o sagu. As propriedades físicas e químicas do amido dependem de onde é originário.

O grânulo de amido natural é um produto heterogêneo de alto peso molecular, sendo que esta característica é atribuída à existência de dois polissacarídeos de estrutura e peso molecular diferentes, a amilose e a amilopectina, as quais são formadas por mecanismo de biossíntese ainda não inteiramente conhecido, e cujas proporções variam de acordo com a origem do amido. A hidrólise do amido e seus componentes, a amilose e a amilopectina resultam na produção de D-glicose, maltose e uma série de oligossacarídeos e polissacarídeos que possuem uma estrutura similar à do polissacarídeo original. Os menores membros desta série, que possuem um grau de polimerização (GP) na faixa de 20 a 30, são conhecidos como maltodextrinas (TESTER *et al.*, 2004). Normalmente, as maltodextrinas contêm um baixo teor de glicose e maltose. As maltodextrinas, portanto, são polímeros da D-glicose, onde os resíduos individuais α -D-glucopiranosil são unidos por meio de ligações α (1 \rightarrow 4) nas partes lineares de sua cadeia e ligações α (1 \rightarrow 6), quando há ramificações. Dessa forma apresentam a fórmula geral: $H(C_6H_{10}O_5)_nOH$.

Segundo Szejtli (1988), A hidrólise enzimática do amido, de um modo geral, resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose e uma série de malto-oligossacarídeos lineares ou ramificados conhecidos como maltodextrinas ou simplesmente dextrinas. Esse tipo de degradação do amido é um processo hidrolítico,

onde os produtos resultantes da quebra das ligações glicosídicas reagem com uma molécula de água. As dextrinas são substâncias heterogêneas amorfas e higroscópicas, produzidas para uso nas indústrias alimentícias, têxteis e de papel, entre outras.

2.2 CICLODEXTRINAS

A degradação da molécula de amido pela enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase), conduz à formação de produtos cíclicos que contêm ligações α (1 \rightarrow 4), conhecidas como ciclodextrinas (CDs). As CDs são obtidas a partir de uma reação intramolecular onde não há participação de moléculas de água (TONKOVA, 1998). As ciclodextrinas, industrialmente produzidas, constituem uma família de três oligossacarídeos cíclicos, derivados de glicose, não redutores, não higroscópicos, hidrossolúveis e cristalizáveis que podem ser obtidos na forma pura (SZEJTLI, 1988; TONKOVA, 1998). São denominadas α , β e γ -CD de acordo com o número de unidades de glicose.

A α -ciclodextrina, também conhecida como α -dextrina de Schardinger, ciclomaltohexaose, ciclohexaglacana, ciclohexamilose, α -CD, ACD e C6A é constituída por 6 unidades de glicose. A β -ciclodextrina, ou β -dextrina de Schardinger, cicloheptaose, cicloheptaglacana, cicloheptamilose, β -CD, BCD e C7A é formada por 7 unidades de glicose. A γ -ciclodextrina, também conhecida como γ -dextrina de Schardinger, ciclomalto-octaose, ciclo-octaglacana, ciclo-octamilase, γ -CD, GCD e C8A é formada por 8 unidades de glicose (SZEJTLI, 1988, TONKOVA, 1998).

Sundara & Rao (1970), citados por Szejtli (1988), demonstraram por meio de um mapa de conformação energética que ciclodextrinas com menos de 6 unidades de glicose em seu anel podem não ser formadas por razões estéricas. No entanto, esta conclusão já foi provada errada, e a ocorrência da ciclodextrina com 5 unidades de glicose foi demonstrada na prática. Ciclodextrinas maiores (contendo nove ou mais unidades de glicose), ou seja, δ -, ϵ -, ξ - e η -ciclodextrinas também são encontradas, mas são difíceis de serem purificadas e apresentam pouca habilidade de complexação (SZEJTLI, 1988; ENDO E UEDA, 2004). Estas CDs, teoricamente, apresentam elevada solubilidade em água o que tornaria difícil sua separação do meio. Somente a δ -CD, com nove unidades de glicose, foi razoavelmente caracterizada, mas ainda não é produzida industrialmente e pouco se sabe sobre suas propriedades (ENDO E UEDA, 2004).

Uma das propriedades mais importantes das CDs é sua resistência à hidrólise por parte das enzimas do grupo amilolítico (α -amilase, EC 3.2.1.1 e β -amilase, EC 3.2.1.2, amiloglicosidase, EC 3.2.1.3 e pululanase, EC 3.2.1.41). As CDs naturais são resistentes à ação da enzima β -amilase desde que não apresentem grupos terminais susceptíveis ao ataque dessa enzima. Embora em baixas velocidades, a enzima β -amilase é capaz de hidrolisar as CDs, uma vez que estas enzimas não requerem grupos terminais livres para sua atuação. A enzima amiloglicosidase também não é capaz de hidrolisar as CDs (SZEJTLI, 1988).

2.3 AS ENZIMAS

A principal característica da maioria das reações bioquímicas é a de transcorrerem com grande rapidez devido à ação de catalisadores naturais chamados enzimas. Pode-se descrever as enzimas como catalisadores complexos de origem biológica, formadas basicamente por proteínas com uma grande especificidade e enorme eficiência. Muitas das reações não ocorreriam em extensão apreciável, ou simplesmente não aconteceriam, sem a participação das enzimas. Assim como os catalisadores inorgânicos, as enzimas livres em solução não podem ser economicamente recuperadas ao final da reação (NARVÁEZ E DOMÍNGUEZ, 2005).

Segundo Dixon & Webb (1979), a catálise enzimática tem basicamente o mesmo mecanismo de uma catálise inorgânica. A enzima faz com que a reação ocorra por um caminho energético diferente, por uma via que envolve uma energia de ativação menor.

Uma grande vantagem das enzimas sobre os catalisadores químicos é que elas possuem uma alta especificidade ao substrato, o que leva a um rendimento maior na reação e uma baixa formação de subprodutos. Além disso, as reações enzimáticas têm um baixo consumo de energia e ocorrem em condições de reação suaves (temperatura, pressão, pH). No entanto, as reações enzimáticas têm alta sensibilidade às variações de temperatura e pH e a separação catalisador / produto é difícil e dispendiosa (ZANIN, 1989).

Existem diversos fatores que influenciam a atividade enzimática:

1 - pH: pelo fato das enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e carboxílico das proteínas são afetados pelas mudanças de pH. Valores altos ou baixos de pH podem causar desnaturação, e às vezes até completa inativação da enzima;

2 - temperatura: a reação enzimática é sensível à mudança de temperatura. Devido à natureza protéica de uma enzima, aumentando-se a temperatura ocorrerá uma desnaturação térmica, com conseqüente redução da concentração efetiva, implicando no decréscimo da velocidade de reação;

3 - concentração de substrato / produto: a velocidade de reação catalisada por uma enzima depende diretamente da concentração desta. Se a concentração do substrato / produto é aumentada, mantendo-se fixa a concentração da enzima e as demais condições, a atividade enzimática atinge um máximo. Além do qual não se tem efeito adicional mesmo quando se aumenta a concentração do substrato;

4 - concentração de qualquer ativador presente: certas substâncias são capazes de ativar as reações enzimáticas. Esta ativação pode ser resultado da ação de um íon inorgânico com K^+ ou Na^+ , sobre a velocidade da reação. Muitas coenzimas ou grupos prostéticos são agentes ativadores;

5 - Concentração de qualquer inibidor presente: ao contrário dos ativadores, o efeito dos inibidores é diminuir a velocidade de reação.

2.4 ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA GLUCANOTRANSFERASE (CGTase)

A enzima Ciclomaltodextrina Glucano Transferase (CGTase) EC 2.4.1.19 (α -1,4-glucano-4-glicosiltransferase) é uma enzima monomérica de massa molar em torno de 74,5kD. Sua estrutura é semelhante à da enzima α -amilase, sendo, portanto, considerada como sendo da família das amilases (MATIOLI et al, 2000). A sequência de aminoácidos presentes na α -amilase e na CGTase é semelhante, resultando em uma estrutura secundária parecida, os sítios ativos presentes nos chamados domínios A, B e C são semelhantes nas duas enzimas, porém, a CGTase apresenta dois domínios a mais do que a α -amilase, os domínios D e E (WIND 1995). A CGTase apresenta cerca de 684 aminoácidos em sua cadeia enquanto que a α -amilase apresenta uma sequência de 403 aminoácidos (YAN & SUN 1997).

A CGTase catalisa a conversão de moléculas de amido em moléculas cíclicas, não redutoras, de malto-oligossacarídeos, denominadas ciclodextrinas (CDs), através de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização), como mostra a figura 2.1. As CDs mais comuns são formadas por 6, 7 ou 8 moléculas de glicose, sendo denominadas de α -CD, β -CD e γ -CD respectivamente (BONILHA *et al* 2006), figura 2.2.

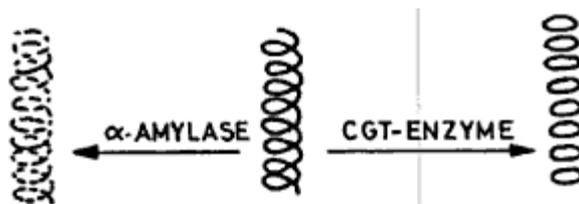


Figura 2.1-Formação de dextrinas de cadeia aberta e cíclicas a partir da molécula de amido. Fonte: SZEJTLI (1988).

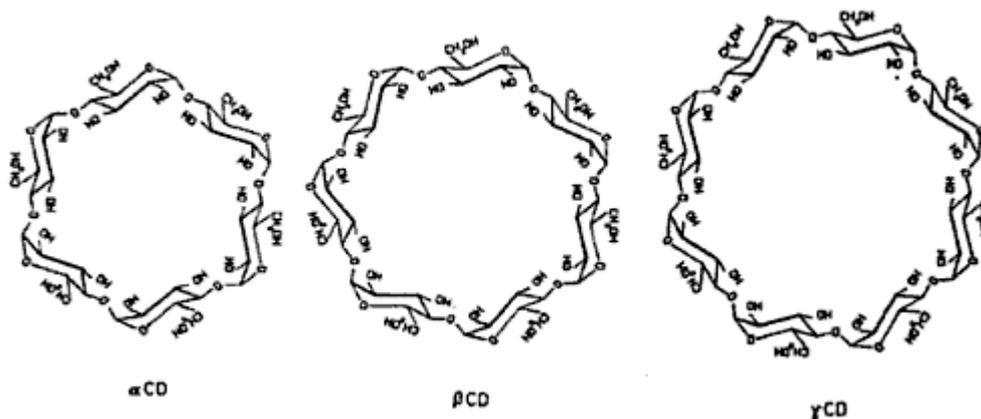


Figura 2.2-Estruturas de α , β e γ – Ciclodextrinas. Fonte: SZEJTLI (1988).

As ciclodextrinas formam estruturas cristalinas não higroscópicas que em solução aquosa se apresentam em formato cilíndrico, sendo a superfície externa hidrofílica e a superfície da cavidade interna hidrofóbica (figuras 2.3 e 2.4). Algumas moléculas orgânicas e inorgânicas podem se ligar ao interior das CDs e formar complexos de inclusão, sofrendo alterações em suas propriedades físicas e químicas, podendo ser aplicadas em alimentos, fármacos e cosméticos, por exemplo. Quanto mais moléculas de glicose houver, maior será a cavidade interna da CD, permitindo encapsular um número maior de moléculas (figura 2.5).

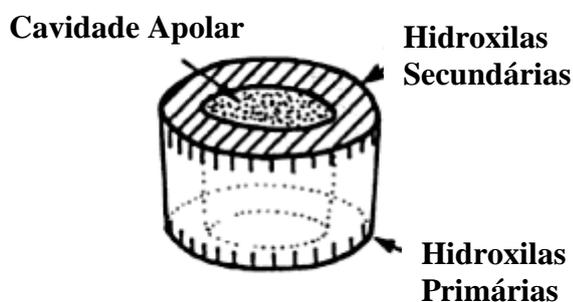


Figura 2.3-Esquema da estrutura funcional das Ciclodextrinas. Fonte: baseado em SZEJTLI (1988), modificado por Calderaro.

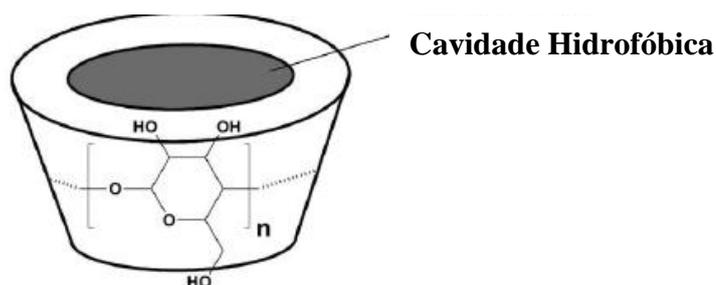


Figura 2.4 - Representação da cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas. Fonte: baseado em MANAKKER *et al* (2009), modificado por Calderaro.

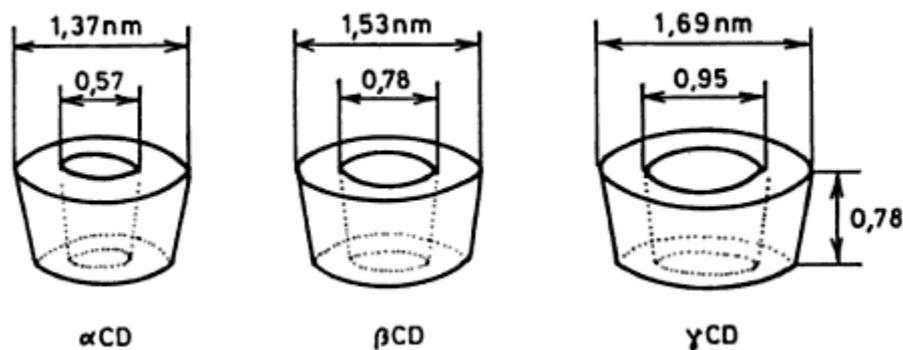


Figura 2.5-Dimensões das moléculas de Ciclodextrinas. Fonte: SZEJTLI (1988).

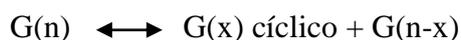
2.4.1 Mecanismo de Ação da CGTase

Além das reações de transglicosilação intramolecular (ciclização), a enzima CGTase também pode atuar em reações de transglicosilação intermolecular como o acoplamento e o desproporcionamento e reações de hidrólise, menos comuns. Segundo Menocci *et al* (2008) estas reações podem ser representadas por:

Reações de hidrólise em ligações α (1-4):



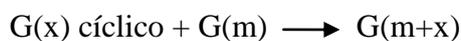
Reações de ciclização para formar anéis de CDs (reação específica da CGTase):



Reações de desproporcionamento (reação de glicosiltransferase), onde um malto-oligossacarídeo é removido e transferido para outro oligossacarídeo linear:



Reação de acoplamento que representa o inverso da ciclização, neste caso, o anel de CD é quebrado e transferido para um oligossacarídeo linear:



As reações de ciclização ocorrem diretamente quando o substrato disponível para a enzima CGTase apresentar mais de 6 moléculas de glicose e estiver na forma helicoidal. Nesta reação, a extremidade não redutora atua como receptora da extremidade redutora. Se o substrato apresentar massa molar inferior a 6 unidades de glicose e superior à maltose, a CGTase atua, inicialmente, na síntese de oligômeros de peso molecular superior a seis unidades de glicose, através das reações de desproporcionamento, só então depois, produzindo CDs. A quantidade de α , β e γ -CD produzida depende do microrganismo produtor da enzima (MATIOLI et al, 2000).

As reações de acoplamento, que consistem na abertura do anel da CD com transferência dos malto-oligossacarídeos gerados para moléculas receptoras, ocorrem na presença de CDs e de certos substratos, havendo uma competição entre as reações de ciclização e de acoplamento. Em 1978, Kitahata et al, utilizando 22 tipos de monossacarídeos e seus derivados, concluíram que para ocorrer a reação de acoplamento, os aceptores devem apresentar estrutura piranosídica e a mesma configuração do grupamento hidroxila livre nos carbonos C2, C3 e C4 que a glicose. Caso contrário, o acceptor será fraco e predominarão as reações de ciclização.

As reações de desproporcionamento consistem na redistribuição dos resíduos de glicose entre os malto-oligossacarídeos, estas reações ocorrem, principalmente, no início de uma reação enzimática, quando o substrato fornecido à enzima for uma cadeia muito longa de amido. Estas reações ficam evidentes através do rápido decréscimo da viscosidade da solução do substrato. Se as reações de desproporcionamento derem origem a cadeias de ótimo comprimento, a reação de ciclização predomina. Altas concentrações de malto-oligossacarídeos ou de glicose, favorecerão as reações reversas do acoplamento, resultando em produtos lineares com pequenas quantidades de CDs (MATIOLI *et al*, 2000).

2.4.2 Cinética da Enzima CGTase

Diversos pesquisadores fizeram o levantamento dos parâmetros cinéticos K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima). MATIOLI *et al* (2000) apresenta em seu trabalho uma tabela com os valores dos parâmetros cinéticos levantados por alguns pesquisadores (tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a produção de α , β e γ -CD para diferentes CGTases

Origem da Enzima	K_m (mM)			$V_{m\acute{a}x}$			Referências
	α -CD	β -CD	γ -CD	α -CD	β -CD	γ -CD	
<i>Bacillus macerans</i>	2,62	2,65					DePinto & Campbell, 1968
<i>Bacillus sphaericus</i>	0,71	0,38	1,43	0,074 μmol CD/ml	0,110 μmol CD/ml	0,039 μmol CD/ml	Oguma <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus coagulans</i>		2,8					Kitahata <i>et al.</i> , 1983 (citado por Oguma <i>et al.</i> , 1990)
<i>Bacillus circulans</i>		5,02		0,214 μmol CD/min			Villette <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus sp.</i>		0,26	1,32		1,26*	0,21*	Hamon <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus ohbensis</i>	1,94	0,2		2,74*	4,26*		Sato <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus megaterium</i>	0,9	0,16		106*	0,19*		Kitahata, 1988 (citado por Sato <i>et al.</i> , 1994)
<i>Bacillus sp.</i>	5,9	0,39		133*	23*		Nakamura e Horikoshi, 1976 (citado por Sato <i>et al.</i> , 1990)
<i>Bacillus macerans</i>	0,85	0,07		79*	0,03*		Kitahata, 1988 (citado por Sato <i>et al.</i> , 1994)

* $[\mu\text{mol CD}/(\text{min} \times \text{mL de enzima})] \times 10^{-2} \text{mL}$

Fonte: MATIOLI *et al* (2000)

É interessante notar que para a mesma enzima CGTase que produza as diferentes CDs, resultados diferentes de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos. Nenhum autor apresentou uma explicação para esses resultados.

Influência do Tempo de Reação

A enzima CGTase produz principalmente as três formas de ciclodextrinas, a α , β e γ -CD (SZEJTLI, 1988). Alguns pesquisadores observaram que a proporção de formação destas CDs é dependente do tempo de incubação da enzima no meio contendo amido, pois muitas CGTases formam inicialmente α -CD enquanto que a formação de CDs maiores é mais lenta. A termodinâmica reacional tende a favorecer a produção de

β -CD, quando a reação se prolonga por muito tempo, tendendo ao equilíbrio (FRENCH, 1957 citado por MATIOLI *et al*, 2000).

Influência da Concentração da Enzima

Geralmente, a escolha da concentração ideal de CGTase para a produção industrial de CDs é uma questão de preço da enzima e tempo de duração do processo. Porém parece existir uma correlação entre o grau de conversão em CDs alcançável e a concentração de CGTase. Melhores resultados foram obtidos com uma razão enzima-substrato (p/p) de 1:1000 e 1:50000 (MATIOLI *et al*, 2000).

Influência de Íons

Vários autores têm verificado a influência de íons cálcio na estabilização da enzima CGTase. Horikoshi (1971), observou que emprego de CaCl_2 aumentou a estabilidade térmica da enzima, constatando que a atividade da CGTase de *Bacillus* n°221 a 60 – 65°C, na presença de 5mM de Ca^{2+} , era de 700%, e a 60 °C, na ausência de Ca^{2+} , era de 400%.

Outros autores analisaram a influência de outros íons na atividade da CGTase. Em presença de HgCl_2 , CdCl_2 , CuCl_2 , AgNO_3 e ZnCl_2 , a CGTase de *Brecibacterium* sp. teve sua atividade fortemente inibida (MATIOLI *et al*, 2000). A CGTase de *Bacillus firmus* apresentou queda da atividade na presença de uma concentração superior a 1mM de HgCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 e ZnSO_4 , e também a uma concentração superior a 5mM de FeSO_4 (Yim *et al*, 1997).

Influência da Temperatura e do pH

De acordo com os experimentos realizados até o momento, a temperatura ótima da CGTase está entre 45 e 60°C (MATIOLI *et al*, 2000), como mostrado nas tabelas 2.2 e 2.3. Os valores de pH ótimo variam conforma a espécie do microrganismo produtor da enzima. As tabelas 2.2 e 2.3 também apresentam o pH para várias CGTases produzidas por diferentes microrganismos. A maior parte das enzimas apresenta pH ótimo entre 5 e 8.

As CGTases caracterizadas por Starnes e colaboradores (1990) e Norman & Jorgensen (1992), produzida por *Thermoanaerobacter* sp. apresentaram temperatura ótima entre 90-95°C. Wind *et al* (1995), encontraram uma temperatura ótima na faixa de 80-85°C para a CGTase produzida por *Thermoanaerobacterium*.

Tabela 2.2 - Características das CGTases produzidas por diversos microrganismos

Origem	pH ótimo	Temper. Ótima (°C)	pH estável	Estabilid. Térmica (°C)	Massa Molar (Daltons)	Principal CD	Referência
<i>Bacillus</i> sp	9,0	45			72.000	β-CD	Prema <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> A11.	4-8	40-50				β-CD	Techaiyakul <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus firmus</i> n° 324	7,5-8,5	65	6,0 – 9,5	55	75.000	β-CD	Yim, 1996
<i>Brevibacterium</i> sp. n° 9605	7	50	6-8	55	75.000	γ-CD	Mori <i>et al.</i> , 1994 e 1995
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	5	95		80		β-CD	Starnes <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus circulans</i>	6	55			79.000		Villette <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus autolyticus</i>	5-6	60			70.000	β-CD	Tomita <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus macerans</i>	5-6	55	8-10	<60		α-CD	Kitahata <i>et al.</i> , 1974
<i>Bacillus megaterium</i>	5-6	55	7-10	<55	66.000	β-CD	Kitahata e Okada., 1974
<i>Bacillus macerans</i>	6,2-6,4	30-40					De Pinto & Campbell, 1968
<i>Bacillus sphaericus</i> E-244	8		5,5-9,0	<45	72.000		Oguma <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> 290-3	6-8	60	6-8	50	75.000	γ-CD	Englbrecht <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> 1-1	6-8	50			75.000	β-CD	Englbrecht <i>et al.</i> , 1990
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6,0-7,2	45			69.000	α-CD	Englbrecht <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus lentus</i>	6,5-7,5	45-55	6,5-8,5	55	33.000	β-CD	Sabioni e Park, 1992b
<i>Bacillus</i> n° 221	11-12	60-65	7-8	60	30.000		Horikoshi, 1971a
<i>Bacillus</i> n° A-40-2	10,5	55	8,5		70.000		Horikoshi, 1971b
<i>Bacillus circulans</i> C31	5,5	60	5,5-9,0	>50	103.000	β-CD	Pongsawasdi & Yagisawa, 1968

Fonte: MATIOLI (2000).

As CGTases estudadas por Prema *et al* (1990) e por Horikoshi (1971a e 1971b), citados por Matioli (2000), apresentam pH ótimo essencialmente alcalino, apresentando valores de 9, 11-12 e 10,5 respectivamente.

Pode-se observar também que algumas CGTases apresentam faixa de estabilidade de pH elevada, como é o caso da CGTase estudada por Yim (1996) com faixa de pH entre 6 e 9,5, da CGTase estudada por Oguma *et al* (1990) com faixa de pH

estável entre 5,5 e 9,0 e da CGTase estudada por Nomoto *et al* (1984 e 1986) apresentando faixa de pH estável de 6 a 11.

Tabela 2.3 - Características das CGTases produzidas por diversos microrganismos

Origem	pH ótimo	Temper. Ótima (°C)	pH estável	Estabilid. Térmica (°C)	Massa Molar (Daltons)	Principal CD	Referência
<i>Bacillus coagulans</i>	6,5	60				β-CD	Kaneko <i>et al.</i> , 1990a
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	6	90-95		75		β-CD	Norman & Jorgensen, 1992
<i>Bacillus sp. HÁ 3-3-2</i>	6,5 - 8,0	60	6 - 11	70	68.000		Nomoto <i>et al.</i> , 1984 e 1986
<i>Bacillus sp. IT25</i>	5,5	65-70	6,0-9,5	>65	72.000	β-CD	Aoki <i>et al.</i> , 1987
<i>Bacillus sp.</i>	5,5	50-55			80.000	β-CD	Kometani <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus ohbensis</i>	5,5	60	6,5-9,5	55	35.000	β-CD	Sato e Yagi, 1991
<i>Bacillus macerans</i>	5,5	50	6,5-8,5	50	150.000	α-CD	Sato e Yagi, 1991
<i>Bacillus circulans</i>	8,0	55	6,0-9,5	55	200.000	β-CD	Sato e Yagi, 1991
<i>Klebsiella oxytoca 19-1</i>	5,5-7,5	30-45				α-CD	Lee <i>et al.</i> , 1992
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	4,5-7,0	80-85		80	68.000	β-CD	Wind <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus subtilis n° 313</i>	6-8	65		50	64.000	γ-CD	Kato e Horikoshi, 1986
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	6	65	5,5	60			Saha <i>et al.</i> , 1991
<i>Thermoanaerobacter B6A</i>	6	60	6	60			Saha <i>et al.</i> , 1991

Fonte: MATIOLI (2000).

Energia de Ativação

A energia de ativação da CGTase também depende da espécie de micro-organismo produtor a do tipo de CD produzido. Hamom & Moraes (1990) determinaram que a energia de ativação da CGTase de *Bacillus sp.* alcalofílico para produção de β-CD foi de 8,1 kcal/mol e para a produção de γ-CD foi de 4,0 kcal/mol, em pH 8,0. Depinto & Campbell (1968), trabalhando com CGTase de *Bacillus macerans*, obtiveram uma energia de ativação de 27,4 kcal/mol, em pH 6,2.

Energia de Inativação Térmica

Segundo Starnes *et al* (1991), citado por Matioli (2000), uma das desvantagens da CGTase é sua baixa estabilidade térmica, levando a um longo tempo de reação para uma produção de CDs razoável. Para contornar este problema, estudos envolvendo a produção de CGTase por microrganismos termófilos têm apresentado bons resultados. A CGTase de *Thermoanaerobacter* sp. apresentou pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 95°C. A mesma enzima na ausência de substrato e de íons cálcio, a 80°C e pH 5,0, reteve entre 95 e 100% de sua atividade durante 40 min.

Estudos realizados por Matioli (1997) mostraram que a energia de inativação térmica da enzima CGTase produzida por *Bacillus firmus* da cepa 37, em presença de 5mM de CaCl₂ e em solução de maltodextrina 10% (p/v) foi de 38,988 kcal/mol.

2.5 CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular se caracteriza pelo aumento da biomassa presente em um meio de cultura, sendo que durante este crescimento o microrganismo consome o substrato presente e gera o produto de interesse do processo fermentativo. Na figura 2.6 é apresentado o comportamento da curva de crescimento celular.

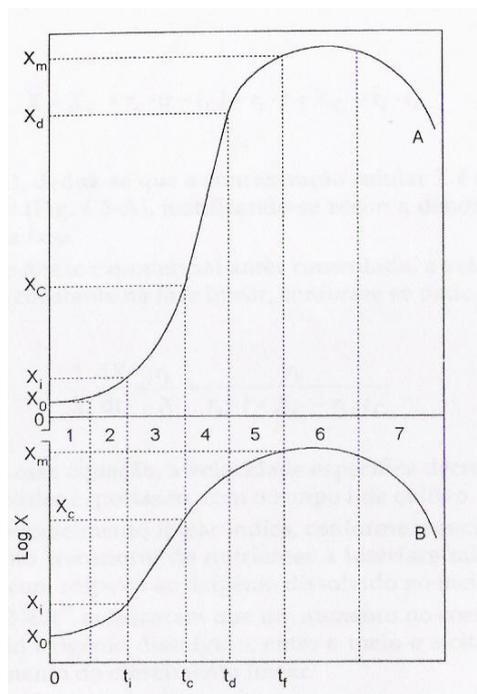


Figura 2.6 - Curva de crescimento de micro-organismo em sistema de cultivo descontínuo. Fonte: SCHMIDELL *et al* (2001).

Segundo Alterthumm (2005), o crescimento de micro-organismos pode ser dividido em 4 fases, a fase “lag”, de crescimento exponencial, estacionária e a fase de declínio ou morte celular.

Fase 1: Fase “lag” – Durante a fase “lag” as células microbianas presentes no meio de cultura, principalmente se forem células obtidas de uma cultura velha, passam por uma reorganização de suas estruturas celulares, recuperando os sistemas enzimáticos e outros componentes necessários para a fermentação em meio de cultura novo. Nesta etapa as células aumentam de tamanho devido à síntese destes componentes celulares, mas ainda não se reproduzem ativamente. Se houver semeadura de microrganismos mais novos em meio de cultura mais rico do que o original, a fase lag ocorrerá em menos tempo ou até mesmo será suprimida, fato importante quando se deseja uma rápida produção de um metabólito de interesse.

Fase 2: Fase de crescimento exponencial – Durante o tempo em que a quantidade de nutrientes é superior às necessidades dos microrganismos presentes no meio em fermentação e não há acúmulo significativo de substâncias tóxicas, verifica-se um crescimento exponencial. Nesta fase, a velocidade de crescimento dX/dt é uma função da massa celular X , que pode ser representada como na equação 2.1 com uma constante de proporcionalidade μ .

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

A constante de proporcionalidade pode ser isolada e representada então pela equação 2.2, representando a velocidade específica de crescimento.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.2)$$

Na fase lag, a velocidade específica é uma constante, o que torna esta fase a mais importante do crescimento microbiano, fornecendo dados fundamentais para os estudos da fisiologia e da cinética, pois a velocidade específica é um parâmetro de grande importância, sendo possível estudar a influência de uma série de fatores como consumo de substrato e aparecimento de produtos do metabolismo.

Fase 3: Fase estacionária – Nesta fase, o número de indivíduos gerados é igual ao número de indivíduos que morrem, provocando uma redução na velocidade de

crescimento. Esta diminuição do crescimento microbiano pode ocorrer pelo acúmulo de metabólitos tóxicos, esgotamento de nutrientes e queda no nível de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Em alguns casos, se houver alimentação de nutrientes e injeção de oxigênio no meio, o crescimento microbiano pode ser parcialmente restabelecido, aumentando a massa celular e a quantidade de produto gerado.

Fase 4: Fase de declínio – É caracterizada pelo aumento do número de células mortas e pelo baixo crescimento microbiano, até que este cesse, findando o processo de fermentação.

2.6 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

O estudo cinético de uma fermentação consiste na análise da evolução dos valores de concentração de substrato, microrganismo (células) e produtos em função do tempo de fermentação. Os valores experimentais destas concentrações (S para substrato, X para células e P para produtos), podem ser representados graficamente em função do tempo de fermentação t , e então suas curvas de ajuste podem ser obtidas, como apresentado na figura 2.7.

Como um meio de cultivo é rico em diversos nutrientes e substratos e os microrganismos geram uma gama muito grande de metabólitos, no estudo cinético se escolhe o substrato limitante e o produto de interesse econômico.

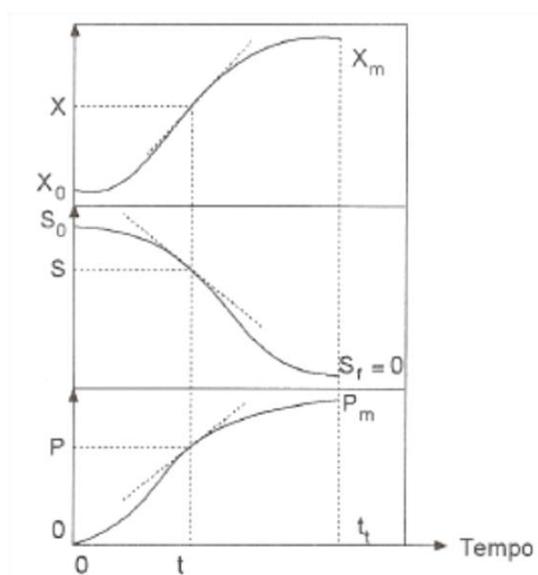


Figura 2.7 - Curvas de ajuste dos valores de S, X e P hipotéticas para uma fermentação. Fonte: SCHMIDELL *et al* (2001).

2.6.1 Parâmetros de Transformação

Os parâmetros de transformação são úteis para determinar a quantidade de substrato que foi convertida em células ou em produtos para um dado processo fermentativo. Utilizando os dados de concentração celular, substrato e produto obtido pode-se determinar alguns parâmetros de transformação tais como as velocidades instantâneas de transformação, as produtividades, as velocidades específicas de transformação e os fatores de conversão.

As velocidades instantâneas de transformação são representadas graficamente como a tangente à curva de X, S ou P em função do tempo em um dado instante “t”. Pode-se representar matematicamente as velocidades instantâneas como derivadas das curvas estudadas, sendo as velocidades de crescimento do microrganismo, consumo de substrato e formação de produto dadas pelas expressões:

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (2.3)$$

$$r_S = -\frac{dS}{dt} \quad (2.4)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (2.5)$$

As velocidades instantâneas também são conhecidas como velocidades volumétricas de transformação e suas unidades são em massa/volume x tempo.

Outros parâmetros úteis para a análise do desempenho de um processo fermentativo são a produtividade em biomassa e a produtividade em produto, e são definidas pela diferença entre os valores de biomassa e produto máximos ou finais em relação aos iniciais, divididos pelo tempo em que se obteve a medida final.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (2.6)$$

$$P_P = \frac{P_m - P_0}{t_{fP}} \quad (2.7)$$

As velocidades específicas de transformação são obtidas através da razão entre as velocidades instantâneas de transformação e a concentração celular no instante “t”, são representadas pela letra grega μ . As equações 2.8, 2.9 e 2.10 apresentam as velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto, respectivamente.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2.8)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (2.9)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (2.10)$$

Os fatores de conversão são parâmetros que correlacionam a quantidade de substrato convertido em células e produtos e a quantidade de células geradas em função da quantidade de produto obtido na fermentação. As expressões para os fatores de conversão de substrato em células, conversão de substrato em produto e da quantidade de células geradas em função do produto são apresentadas nas equações de 2.11 a 2.13, respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X-X_0}{S_0-S} \quad (2.11)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad (2.12)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X-X_0}{P-P_0} \quad (2.13)$$

2.6.2 Classificação dos Processos Fermentativos

Gaden (1959) propôs uma classificação para os processos fermentativos, baseado na análise das curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de formação de produto (μ_P) plotadas em função do tempo.

No primeiro caso, existe uma associação entre as curvas de velocidades específicas de formação de produto, consumo de substrato e muitas vezes de crescimento celular. Esta situação é característica quando o produto é um metabólito primário, cuja formação está ligada às reações do catabolismo ou à decomposição direta do substrato (açúcares), diz-se então que se trata de uma fermentação com formação de produto associada ao crescimento celular. Um exemplo característico deste tipo de fermentação é a produção de etanol, como se pode observar na figura 2.8.

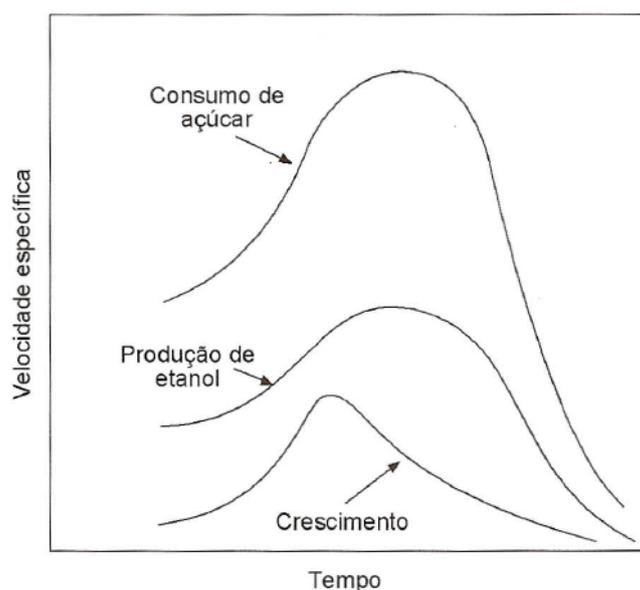


Figura 2.8 - Variação das velocidades específicas em uma fermentação alcoólica. Fonte: SCHMIDELL *et al* (2001).

A produção de algumas vitaminas e aminoácidos também se encaixa neste tipo de fermentação.

No segundo caso, se observam duas fases distintas, a primeira em que as velocidades específicas de consumo de substrato (açúcar), μ_S , está diretamente relacionada à curva de velocidades específicas de crescimento, μ_X , não havendo praticamente formação de produto. A segunda fase do processo fermentativo se caracteriza pela semelhança entre as três curvas de velocidades específicas, neste caso,

diz-se que a formação de produto está parcialmente associada ao crescimento celular e sua formação não está diretamente ligada ao caminho metabólico produtor de energia. É característica deste tipo de fermentação a produção de ácido cítrico, como é apresentado na figura 2.9.

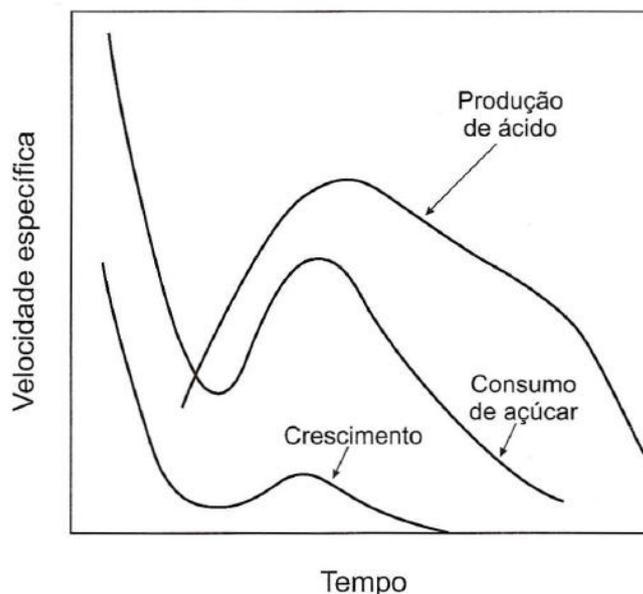


Figura 2.9 - Variação das velocidades específicas na produção de ácido cítrico. Fonte: SCHMIDELL *et al* (2001).

Outro processo que se enquadra neste tipo de fermentação é a produção de ácido láctico. Em 1959, Luedeking e Piret estudaram a cinética de produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii*, e verificaram uma relação linear entre a velocidade específica de crescimento bacteriano (μ_X) e a velocidade específica de formação de ácido láctico (μ_P) expressa pela equação 2.14.

$$\mu_P = \alpha \cdot \mu_X + \beta \quad (2.14)$$

Sendo α e β constantes empíricas dependentes do pH, indicando a existência de dois mecanismos de produção de ácido láctico, um relacionado à reprodução das bactérias (representado pela parcela da equação, $\alpha \cdot \mu_X$) e outro independente do crescimento do micro-organismo, representado pelo termo β .

As fermentações mais complexas se enquadram no terceiro caso da classificação proposta por Gaden (1959). As curvas de velocidades específicas destas fermentações não apresentam semelhança ao longo do processo fermentativo, sendo difícil estabelecer uma relação cinética definida entre elas, como no caso da equação 2.14. Este tipo de comportamento se verifica geralmente na produção de metabólitos secundários, como

antibióticos e toxinas. A figura 2.10 apresenta as curvas de velocidades específicas para a produção de penicilina, ilustrando o comportamento deste tipo de fermentação.

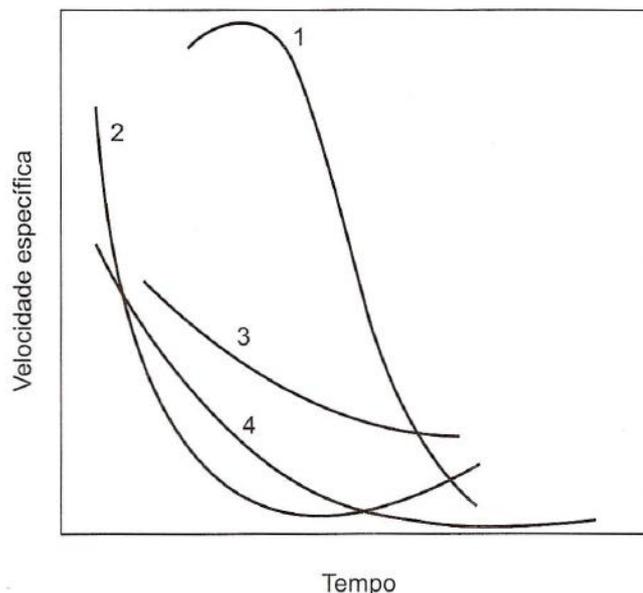


Figura 2.10 - Variação das velocidades específicas da produção de penicilina. Curva 1 - Produção de antibiótico; Curva 2 - Consumo de açúcar; Curva 3 - Consumo de oxigênio; Curva 4 - Crescimento do micro-organismo. Fonte: SCHMIDELL *et al* (2001).

As enzimas, como proteínas, são produzidas através da codificação de genes específicos, sendo que sua síntese envolve as etapas de transcrição, tradução e processos pós-traducionais. Pode-se dividir as enzimas em duas classes, as que estão sempre disponíveis para a célula, conhecidas como constitutivas e as que são sintetizadas em resposta às condições ambientais, chamadas de indutivas. A produção das enzimas indutivas ocorre quando os mecanismos de regulação de expressão gênica celular são acionados, geralmente por substâncias presentes no meio de cultura, que podem exercer a função de indutoras, ativadores, inibidores ou repressores (Bon *et al*, 2008).

A produção de enzimas pode ser associada ao crescimento celular, não-associada ao crescimento ou parcialmente associada (Bon *et al*, 2008). Segundo Aiba *et al* (1971), a produção de algumas enzimas, como a glicoamilase (EC 3.2.1.3), se enquadra no tipo de fermentação não-associada ao crescimento celular, havendo portanto, uma relação complexa entre as velocidades específicas de formação de produto e de crescimento celular.

2.7 MODELAGEM E SIMULAÇÃO APLICADA A PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os modelos matemáticos de processos fermentativos têm por finalidade representar os balanços de massa para cada componente dentro de um biorreator, associados às transformações bioquímicas que ocorrem dentro das células em estudo e às velocidades com que essas transformações ocorrem. Como os processos fermentativos reais são muito complexos, os modelos matemáticos são baseados na idealidade, fornecendo uma representação mais fiel de apenas algumas propriedades do processo fermentativo.

Segundo Bonomi e Schmidell (2001), o desenvolvimento da modelagem matemática permite organizar informações desconexas dos fenômenos biológicos, analisar e observar quais componentes e interações são mais importantes num sistema complexo, descobrir novas estratégias para explicar o comportamento das células em estudo, corrigir possíveis falhas existentes no entendimento de alguns fenômenos e entender qualitativamente as características de determinados processos.

No desenvolvimento dos modelos matemáticos, os parâmetros das equações devem representar da melhor maneira possível os fenômenos que caracterizam a interação entre população microbiana, meio ambiente e tipo de processo fermentativo. O tipo de célula ou tecido, sua “idade”, os nutrientes presentes no meio, temperatura, pH, condições de alimentação de nutrientes e agitação do meio de cultura são alguns dos fatores que caracterizam estas interações dentro de um biorreator.

Depois de elaborados os modelos, pode-se trabalhar com a simulação dos processos para prever comportamentos dinâmicos e estacionários em sistemas operando a condições não testadas empiricamente, permitindo a determinação de condições ótimas de operação, viáveis economicamente, além de auxiliar no projeto e ajuste de algoritmos de controle que possam ser incorporados ao processo fermentativo.

Os modelos matemáticos dos processos fermentativos podem ser classificados em dois grandes grupos, os *modelos fenomenológicos* e os *modelos de entrada-saída*.

2.7.1 Modelos Fenomenológicos

São constituídos por equações matemáticas que relacionam as variáveis de interesse do sistema a ser estudado. Tais equações devem ser, sempre que possível, baseadas nas relações fundamentais de conservação de massa, energia e quantidade de movimento e em princípios físico-químicos, aumentando a confiabilidade destes modelos quanto a interpolações e/ou extrapolações.

A construção dos modelos fenomenológicos deve incorporar além das equações de conservação, as equações de velocidade de transporte de massa, energia e espécies químicas, equações termodinâmicas e equações de velocidade de transformação. As equações de conservação, velocidade de transporte e termodinâmicas são passíveis de padronização através de estudos teóricos que são desenvolvidos há anos na Engenharia Química. Porém, as equações de velocidade de transformação são características de cada processo fermentativo e conferem o caráter empírico do modelo, pois são obtidas através dos ensaios realizados em laboratório. Estas equações são conhecidas como modelos cinéticos e podem conter também a informação de substâncias inibidoras tanto do crescimento celular quanto da geração do produto desejado.

Os modelos cinéticos podem ser classificados também quanto ao número de componentes utilizados na representação celular, sendo os *modelos não-estruturados* os que representam o material celular com uma variável e os *modelos estruturados* os que representam o material celular com mais detalhes, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças ocorridas no meio ambiente em que está inserida.

Outra classificação dos modelos cinéticos é quanto à heterogeneidade da população microbiana no meio de cultura. Os *modelos não segregados* consideram a população como sendo homogênea, de forma que as células apresentem o mesmo comportamento ao longo da fermentação, e os *modelos segregados* promovem a individualização das células microbianas, diferindo-as quanto à idade, tamanho e propriedades celulares.

Fica claro que os modelos cinéticos *estruturados* e *segregados* representam com mais fidelidade o comportamento real dos microrganismos dentro de um processo fermentativo, porém, por serem de difícil generalização e por apresentarem um esforço computacional muito grande, na maioria das vezes são substituídos pelos modelos *não estruturados* e *não segregados* que fornecem uma boa representatividade do processo, com um esforço computacional bem menor.

2.7.2 Modelos entrada-saída

Estes modelos são obtidos através de dados empíricos e se caracterizam por fornecer através de cálculos as respostas ou saídas de um sistema a partir de um número definido de variáveis de entrada, que são medidas e controladas, podendo sofrer variações ao longo do processo de cálculo.

O grande exemplo de modelo entrada-saída muito estudado e utilizado para representar processos complexos, como é o caso dos processos fermentativos, são as redes neurais. Seu funcionamento se baseia no cérebro humano, havendo a recepção de informações, avaliação da força destas informações no processo estudado, ajuste de coeficientes e transformação das informações como saída, geralmente utilizando sigmóides.

2.7.3 Modelagem Aplicada à Produção de CGTase

A maior parte das pesquisas que envolvem a produção da enzima CGTase é de cunho experimental, em que se busca otimizar a produção da enzima pela manipulação *in loco* de parâmetros empíricos como concentrações de nutrientes, fontes de carbono, nitrogênio, macro e micronutrientes, agitação e aeração do meio de cultura (MATIOLI, 1997; ALVES, 2002; MARQUES, 2004; CALDERARO, 2007 e CARMELLO, 2007).

Um número menor de trabalhos se refere à utilização de modelos matemáticos para representar a produção da enzima CGTase, sendo que a grande maioria destes utiliza métodos estatísticos como *Central Composite Design* (CCD) aplicável à Metodologia de Superfície de Resposta (ZAIN *et al*, 2007), que permite determinar qual parâmetro experimental exerce maior influência na produção de CGTase e seu valor ótimo.

Segundo Beschkov *et al* (2010), os experimentos cinéticos tradicionais são conduzidos em batelada, em recipientes perfeitamente agitados e à temperatura constante, de acordo com o micro-organismo em estudo. Segundo o mesmo autor, os modelos matemáticos são constituídos por um conjunto de equações diferenciais ordinárias que levam em consideração a presença ou a ausência de efeitos inibitórios causados pelo substrato ou pelo produto, possuindo parâmetros conhecidos e desconhecidos que devem ser determinados durante a resolução dos modelos matemáticos.

Poucos são os trabalhos que utilizam Modelos Cinéticos Fenomenológicos na modelagem matemática da produção de CGTase, dentre esses pode-se citar Burhan *et al* (2005 e 2007) que trabalharam com a produção da enzima por *Bacillus circulans* ATCC 21783, resolvendo um conjunto de equações diferenciais e utilizando equações cinéticas de Andrews (1968) e Aiba *et al* (1968) para representar a inibição da produção de CGTase pelo substrato. Ainda assim, as concentrações de amido iniciais são diferentes das utilizadas neste trabalho, pois Burhan *et al* (2005 e 2007) trabalharam com dados com concentrações iniciais de amido inferiores a 10g/L, além de utilizarem na resolução dos modelos a atividade enzimática com a unidade definida como uma Unidade da Enzima igual à quantidade de enzima que proporciona a formação de um micrograma de β -CD por minuto.

Os Modelos Fenomenológicos permitem uma melhor visualização do comportamento do micro-organismo na produção da enzima, assim como do crescimento celular e do consumo do substrato utilizado, de maneira que possa auxiliar no maior entendimento da razão de produção da enzima CGTase pelo micro-organismo em estudo.

3. METODOLOGIA

A dissertação foi desenvolvida através da obtenção de dados experimentais da produção da enzima CGTase de Marques (2004) e Calderaro (2007). Como os valores experimentais foram obtidos em intervalos de tempo grandes (a cada 8h ou 12h), foi feito o alisamento dos dados para aumentar a quantidade de pontos a serem inseridos na resolução das equações diferenciais. Depois foram obtidos os valores experimentais dos parâmetros das equações diferenciais, sendo estes utilizados como valores iniciais na etapa de otimização dos parâmetros. A rotina no MATLAB[®] foi desenvolvida como é apresentado na figura 3.1 e no Anexo II ao final deste trabalho.

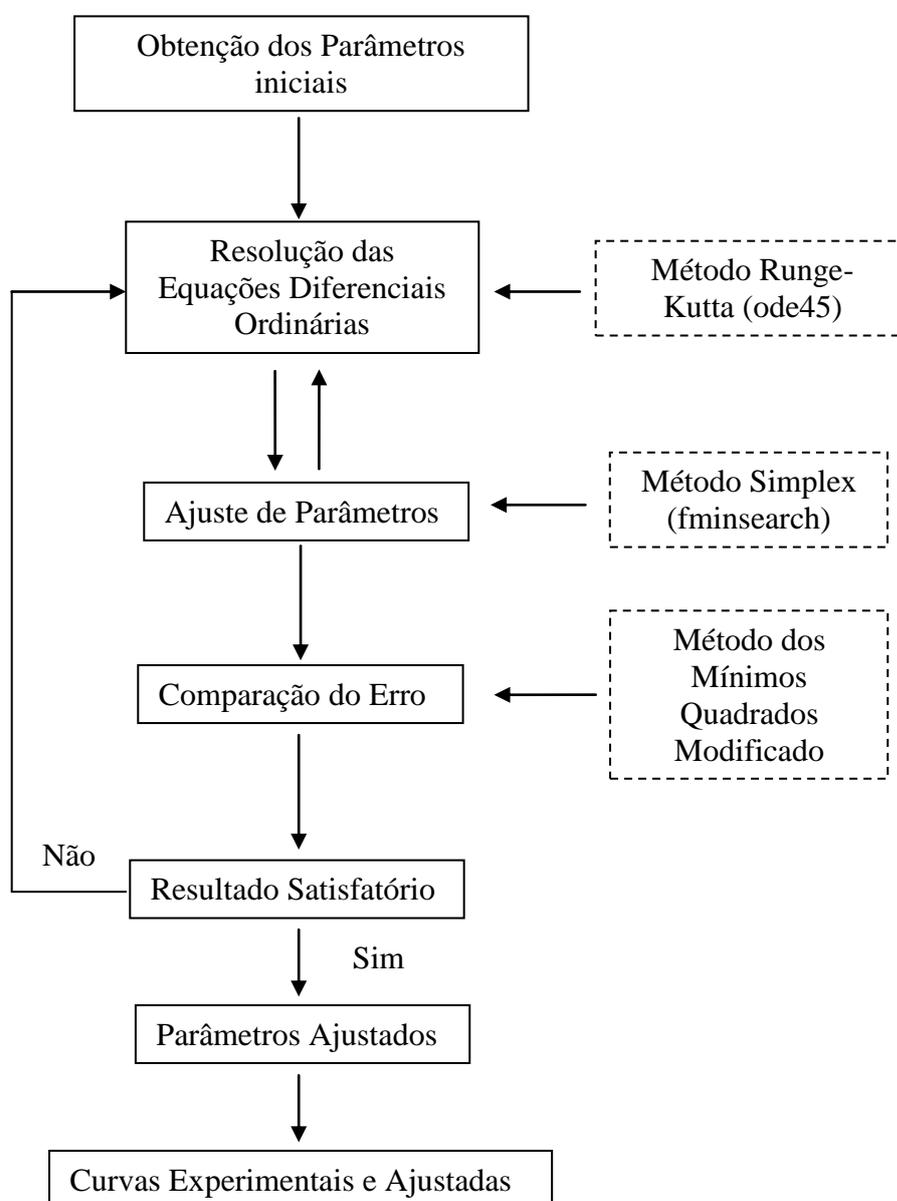


Figura 3.1 - Algoritmo de resolução das equações diferenciais. Referência Pessoal.

O alisamento dos dados experimentais foi realizado no software Excel[®] 2007 pela inserção dos valores de concentração celular, consumo de substrato, atividade enzimática e tempo de retirada de amostras obtidos por Marques (2004) e Calderaro (2007) no software. Em seguida os conjuntos de valores experimentais foram avaliados separadamente, ou seja, foi analisado o comportamento da concentração celular em relação ao tempo, do consumo de substrato em relação ao tempo e da atividade enzimática em relação ao tempo.

Cada curva foi analisada e seccionada, se necessário, e os dados experimentais foram ajustados à melhor curva, geralmente um polinômio. Depois de ajustada a curva, novos valores foram gerados com a curva obtida e o conjunto de dados tratados foi utilizado no software MATLAB[®] para a resolução do sistema de equações diferenciais estudado.

3.1 EQUAÇÕES CINÉTICAS

Neste trabalho foram utilizados modelos fenomenológicos não-segregados e não-estruturados. Dentre os diversos modelos existentes na literatura foram escolhidos os modelos de Monod (1949), que considera o crescimento de micro-organismos em um único substrato limitante sem inibição, Aiba *et al* (1968) e Andrews (1968), que consideram a existência de um substrato limitante e com inibição pelo substrato. Estes modelos são apresentados nas equações 3.1, 3.2 e 3.3, respectivamente.

$$\text{(Monod)} \quad \mu_X = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \quad (3.1)$$

$$\text{(Aiba et al)} \quad \mu_X = \frac{\mu_{Xmax} \cdot S}{K_{SX} + S} \cdot e^{\frac{-S}{K_{IS}}} \quad \mu_P = \frac{\mu_{Pmax} \cdot S}{K_{SP} + S} \cdot e^{\frac{-S}{K_{IP}}} \quad (3.2)$$

(a) (b)

$$\text{(Andrews)} \quad \mu_X = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (3.3)$$

As equações 2.8 a 2.10 apresentam a definição de μ como uma derivada. Desta forma pode-se escrever os modelos cinéticos apresentados como equações diferenciais, na forma:

$$\text{(Monod)} \quad \frac{dX}{dt} = \left(\frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \right) \cdot X \quad (3.4)$$

$$\text{(Aiba et al)} \quad \frac{dX}{dt} = \left(\frac{\mu_{Xmax} \cdot S}{K_{SX} + S} \cdot e^{\frac{-S}{K_{IS}}} \right) \cdot X \quad \frac{dP}{dt} = \left(\frac{\mu_{Pmax} \cdot S}{K_{SP} + S} \cdot e^{\frac{-S}{K_{IP}}} \right) \cdot X \quad (3.5)$$

(a) (b)

$$\text{(Andrews)} \quad \frac{dX}{dt} = \left(\frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \cdot X \quad (3.6)$$

Estas equações diferenciais foram inseridas no MATLAB[®] compondo um sistema de três equações diferenciais ordinárias para ser resolvido, sendo uma equação para a geração de células (dX/dt), outra para a formação de produto (dP/dt) e a terceira para o consumo de substrato (dS/dt). É importante salientar que a formação de produto em um processo fermentativo geralmente é dada em g/L, ou seja, concentração de produto formado, neste trabalho, a formação de produto é dada em U/mL, pois o produto estudado é uma enzima e as medidas experimentais estão na forma de atividade enzimática. Portanto, a formação de produto será representada pela relação dA/dt. A Unidade Enzimática é definida como a quantidade de enzima que forma um μmol de β-CD/min nas condições experimentais especificadas.

O sistema de equações diferenciais é apresentado nas equações 3.7 a 3.9.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \mu_X \cdot X \quad (3.7) \\ \frac{dA}{dt} = \mu_A \cdot X \quad (3.8) \\ \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{A/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (3.9) \end{array} \right.$$

Na análise da aplicabilidade das equações cinéticas, foram realizadas combinações dos modelos de Monod (1949), Aiba *et al* (1968) e Andrews (1968). Inicialmente em dX/dt, μ_X foi tomado como a equação de Monod, em dA/dt, μ_A foi tomado como a equação de Aiba e dS/dt permaneceu como a relação entre dX/dt e dA/dt, formando o Sistema I. Na segunda combinação, μ_X também foi representada pela equação de Monod e μ_A foi representada pela equação de Andrews, formando o Sistema

II. Na terceira combinação, μ_X e μ_A foram representadas por Aiba, formando o Sistema III e na quarta combinação μ_X e μ_A foram representadas pela equação de Andrews, formando o Sistema IV conforme é apresentado nos sistemas de equações de 3.10 a 3.21.

Sistema I

(Monod) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \left(\mu_{Xmax} \cdot \frac{S}{K_{SX}+S} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.10)$

(Aiba *et al*) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{dt} = \left(\mu_{Amax} \cdot \frac{S}{K_{SA}+S} \cdot e^{\left(\frac{-S}{K_{IA}}\right)} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.11)$

$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{A/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \end{array} \right. \quad (3.12)$

Sistema II

(Monod) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \left(\mu_{Xmax} \cdot \frac{S}{K_{SX}+S} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.13)$

(Andrews) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{dt} = \left(\mu_{Amax} \cdot \frac{S}{(K_{SA}+S)+\left(\frac{S^2}{K_{IA}}\right)} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.14)$

$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{A/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \end{array} \right. \quad (3.15)$

Sistema III

(Aiba *et al*) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \left(\mu_{Xmax} \cdot \frac{S}{K_{SX}+S} \cdot e^{\left(\frac{-S}{K_{IS}}\right)} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.16)$

(Aiba *et al*) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{dt} = \left(\mu_{Amax} \cdot \frac{S}{K_{SA}+S} \cdot e^{\left(\frac{-S}{K_{IA}}\right)} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.17)$

$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{A/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \end{array} \right. \quad (3.18)$

Sistema IV

(Andrews) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \left(\mu_{Xmax} \cdot \frac{S}{(K_{SX}+S)+\left(\frac{S^2}{K_{IS}}\right)} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.19)$

(Andrews) $\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{dt} = \left(\mu_{Amax} \cdot \frac{S}{(K_{SA}+S)+\left(\frac{S^2}{K_{IA}}\right)} \right) \cdot X \end{array} \right. \quad (3.20)$

$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{A/S}} \cdot \frac{dP}{dt} \end{array} \right. \quad (3.21)$

3.2 VALORES EXPERIMENTAIS

3.2.1 Caracterização dos Meios de Cultura

Os dados experimentais foram retirados da Dissertação de Mestrado de Marques (2004) e do relatório de Iniciação Científica de Calderaro (2007). Os meios de cultura utilizados foram M7, M8, M9, M34 e M56 de Marques (2004) e Ensaio 3 Meios A (E3A) e B (E3B), Ensaio 5 Meios A (E5A) e F (E5F) e Ensaio 6 Meios A (E6A) e F (E6F) de Calderaro (2007). A caracterização destes meios de cultura é apresentada nas tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 - Caracterização dos meios de cultura de Marques (2004).

Componentes	Composição dos Meios (% p/v)				
	M7	M8	M9	M34	M56
Amido Solúvel Hidrolisado	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Polipeptona	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extrato de Levedura	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K₂HPO₄	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
MgSO₄.7H₂O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Na₂CO₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pH do Tampão	8,0	9,0	10,0	-	-
Volume do Meio de Cultivo	1L	1L	1L	125mL	125mL
Capacidade do Erlenmeyer	2L	2L	2L	250mL	250mL
Tempo de Cultivo (h)	126	126	126	84	84

Os meios E5F e E6F foram cultivados em biorreator de bancada, os demais meios foram cultivados em erlenmeyers de capacidade conforme indicado nas tabelas. Todos os meios tiveram uma agitação de 150 rpm, sendo que os meios cultivados no fermentador tiveram adição de ar, e os meios cultivados em erlenmeyer tiveram oxigenação disponível pela área superficial do meio de cultura e pela agitação orbital desenvolvida pelo shaker.

Tabela 3.2 - Caracterização dos meios de cultura de Calderaro (2007).

Componentes	Composição dos Meios (% p/v)					
	E3A	E3B	E5A	E5F	E6A	E6F
Amido Solúvel Hidrolisado	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Polipeptona	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extrato de Levedura	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Na ₂ CO ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pH Inicial	10,5	10,5	10,5	10,5	10,8	10,7
pH Final	9,1	8,9	9,4	10,4	9,5	9,7
Volume do Meio de Cultivo	0,5L	1L	0,5L	1L	0,5L	1L
Capacidade do Erlenmeyer	2L	2L	2L	-	2L	-
Capacidade do Fermentador	-	-	-	1,5L	-	1,5L
Tempo de Cultivo (h)	72h	72h	72h	72h	72h	72h

3.2.2 Determinação dos Parâmetros Iniciais

Para dar início ao programa de resolução das equações diferenciais, foram determinados os parâmetros $\mu_{X_{max}}$, $\mu_{A_{max}}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{A/S}$. As variáveis K_{SX} , K_{IX} , K_{SA} e K_{IA} foram estimadas livremente a fim de se obter seus valores ótimos.

A determinação de $\mu_{X_{max}}$ se deu pela integração da equação 2.8, resultando na equação 3.22. A determinação de $\mu_{A_{max}}$ se deu pela metodologia proposta por LeDuy Zajic (1973) apresentada por Hiss (2001), em planilha desenvolvida no Excel.

$$\ln X = \mu_{X_{max}} \cdot t + C1 \quad (3.22)$$

Como se observa, esta equação apresenta o aspecto de uma equação de reta, sendo $\mu_{X_{max}}$ o coeficiente angular da reta resultante do gráfico de $\ln X$ versus t . Desta

forma, foi possível determinar os valores experimentais das velocidades específicas de crescimento celular.

Os fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{A/S}$) foram determinados pela análise das equações 2.11 e 2.12, que podem ser reescritas conforme é apresentado nas equações 3.23 e 3.24.

$$(X - X_0) = Y_{X/S} \cdot (S_0 - S) \quad (3.23)$$

$$(A - A_0) = Y_{A/S} \cdot (S_0 - S) \quad (3.24)$$

Pode-se observar que as equações 3.23 e 3.24 também apresentam o aspecto de uma reta, sendo $Y_{X/S}$ o coeficiente angular resultante do gráfico de $(X-X_0)$ versus (S_0-S) e $Y_{A/S}$ o coeficiente angular resultante do gráfico de $(A-A_0)$ versus (S_0-S) .

As figuras 3.2 a 3.4 apresentam o exemplo da determinação de $\mu_{x_{\max}}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{A/S}$ para o meio M56.

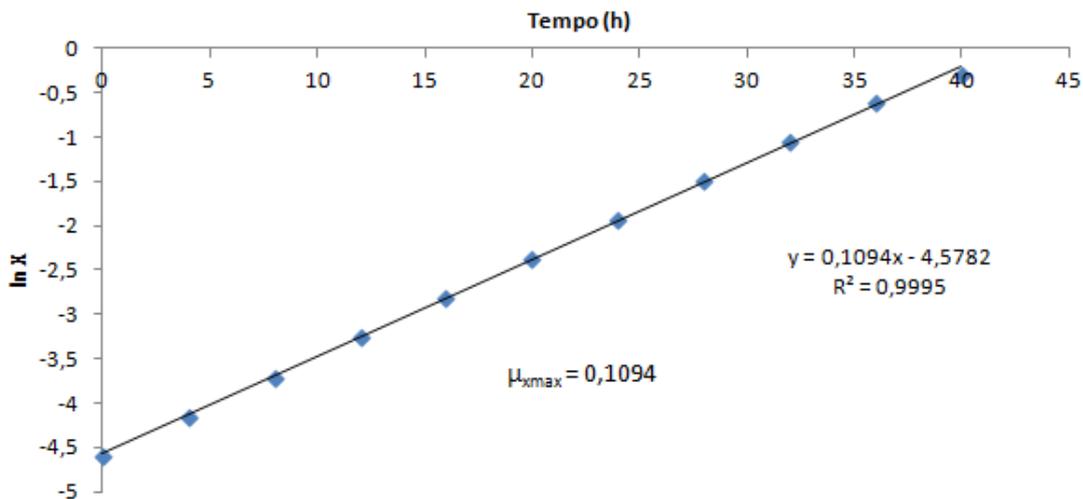


Figura 3.2 - Determinação de $\mu_{x_{\max}}$ para o meio M56 de Marques (2004).

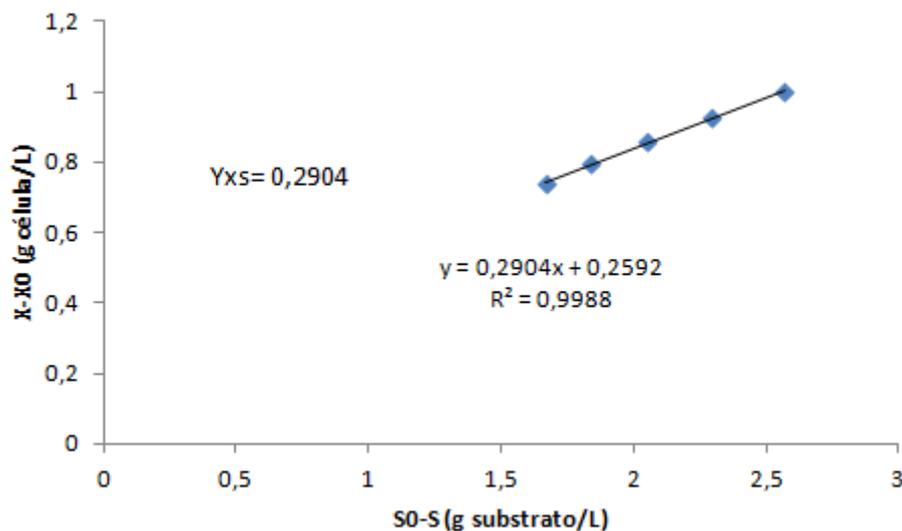


Figura 3.3 - Determinação de $Y_{X/S}$ para o meio M56 de Marques (2004).

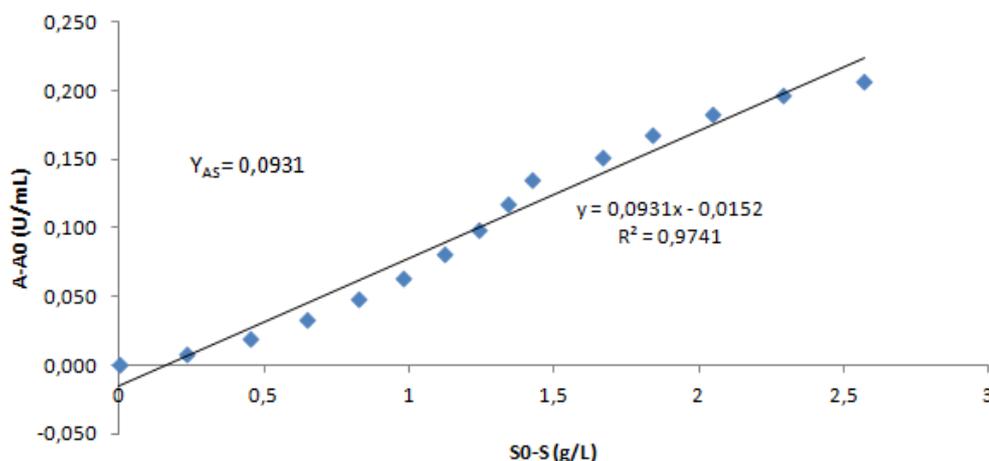


Figura 3.4 - Determinação de $Y_{A/S}$ para o meio M56 de Marques (2004).

Através dos dados experimentais dos onze meios de cultura estudados e das equações 3.22 a 3.24, foi obtido o conjunto de valores experimentais para os parâmetros acima citados, sendo apresentados na seção 4.1.

Para a análise do comportamento da produção de CGTase por *Bacillus firmus* e para a verificação da aplicação da equação de Luedeking e Piret (1959), as velocidades específicas de crescimento celular (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de atividade enzimática (μ_A) também foram calculadas através da metodologia proposta por LeDuy e Zajic (1973).

3.2.3 Cálculo dos Parâmetros pelo MATLAB®

Após a determinação dos parâmetros cinéticos iniciais, o sistema de equações diferenciais ordinárias constituído pelas equações cinéticas apresentadas foi resolvido por integração numérica do método Runge-Kutta de quarta ordem (CHAPRA E CANALE, 2008) através da função *ode45* do MATLAB®.

A otimização dos parâmetros estudados foi feita pelo método Simplex Geométrico ou Método dos Poliedros Flexíveis que minimiza uma função de n variáveis independentes utilizando-se de $(n+1)$ vértices de um poliedro no espaço E^n (BONOMI E SCHIMIDELL, 2001). Ao se utilizar o método Simplex para otimização de experimentos, cada vértice do poliedro representa um conjunto de condições experimentais, o método promove a reflexão destes pontos até chegar a uma região de ótimo. Ao se utilizar uma função com duas variáveis, o método Simplex representa os conjuntos de dados utilizados como um triângulo, o primeiro passo do método é determinar o valor da função objetivo em cada vértice do poliedro, o vértice que retornar o maior valor da função objetivo, em um problema de minimização de função, é refletido. Se o ponto refletido não retornar um menor valor para a função objetivo, o método faz uma contração deste ponto, a fim de tentar minimizar os resultados da função objetivo, e o método se repete. Se após a reflexão, houver uma minimização da função objetivo no ponto refletido, o método simplex realiza uma expansão deste ponto e reavalia a função objetivo nos vértices do poliedro novamente, outras contrações podem ocorrer nas vizinhanças do ponto ótimo a fim de determinar uma posição mais precisa para este (NELDER E MEAD, 1965). Uma vez determinados os parâmetros iniciais, o algoritmo estabelece novos parâmetros experimentais que são levados automaticamente para um ótimo. O método Simplex determina ótimos locais e não ótimos globais, retornando várias soluções válidas.

Dentro do algoritmo de otimização, a comparação do erro foi realizada pelo método dos mínimos quadrados modificado, sendo que cada variável experimental utilizada (concentração celular, X , consumo de substrato, S , e atividade enzimática, A) contribui para a determinação do erro. Portanto, a função objetivo determina o erro pela equação 3.25, sendo aplicada para concentração celular, consumo de substrato e atividade enzimática, e o critério de otimização como a soma dos erros para cada um dos conjuntos de valores experimentais, representado pelas equações de 3.26 a 3.29.

$$\mathbf{Erro} = \sqrt{\left(\frac{\mathbf{Ajustado-Experimental}}{\mathbf{Maior Valor Experimental}}\right)^2} \quad (3.25)$$

$$\mathbf{Erro 1} = \sqrt{\left(\frac{\mathbf{X Ajustado-X Experimental}}{\mathbf{Maior Valor Experimental de X}}\right)^2} \quad (3.26)$$

$$\mathbf{Erro 2} = \sqrt{\left(\frac{\mathbf{S Ajustado-S Experimental}}{\mathbf{Maior Valor Experimental de S}}\right)^2} \quad (3.27)$$

$$\mathbf{Erro 3} = \sqrt{\left(\frac{\mathbf{A Ajustado-A Experimental}}{\mathbf{Maior Valor Experimental de A}}\right)^2} \quad (3.28)$$

$$\mathbf{Critério de otimização} = \mathbf{Erro 1} + \mathbf{Erro 2} + \mathbf{Erro 3} \quad (3.29)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos e as discussões resultantes das análises dos modelos utilizados de acordo com os meios de cultura aplicados e suas condições de cultivo. Na seção 4.1 será apresentado o comportamento cinético das curvas de velocidade específica de crescimento celular (μ_X), da velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) e da velocidade específica de atividade enzimática (μ_A). Na seção 4.2 serão apresentados os valores iniciais obtidos dos parâmetros μ_{Xmax} , μ_{Amax} , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ e nas seções 4.3 a 4.13 serão apresentados os valores experimentais, já tratados, e os resultados obtidos para cada meio de cultura separadamente, em relação aos modelos cinéticos utilizados na modelagem desenvolvida, além da verificação da aplicação da relação obtida por Luedeking e Piret (1959) entre as velocidades específicas μ_X e μ_A na seção 4.14.

4.1 COMPORTAMENTO CINÉTICO DAS CURVAS DE μ_X , μ_A e μ_S .

Para buscar um melhor entendimento do comportamento das curvas de crescimento celular, consumo de substrato e de atividade enzimática, foram feitos os gráficos das variações das velocidades específicas com o tempo para cada meio de cultura de maneira a tentar estabelecer, também, uma relação entre a atividade da enzima CGTase durante o processo fermentativo e o crescimento das células de *Bacillus firmus* ou do consumo de amido.

Nesta seção serão apresentados os gráficos agrupados contendo as três velocidades específicas variando com o tempo de fermentação e um comparativo entre as velocidades específicas μ_X e μ_A , em relação ao tempo, e μ_S e μ_A em relação ao tempo junto a uma discussão sobre o comportamento observado.

4.1.1 Meio de Cultura M7

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.1 e a partir da figura 4.1, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.2 a 4.4.

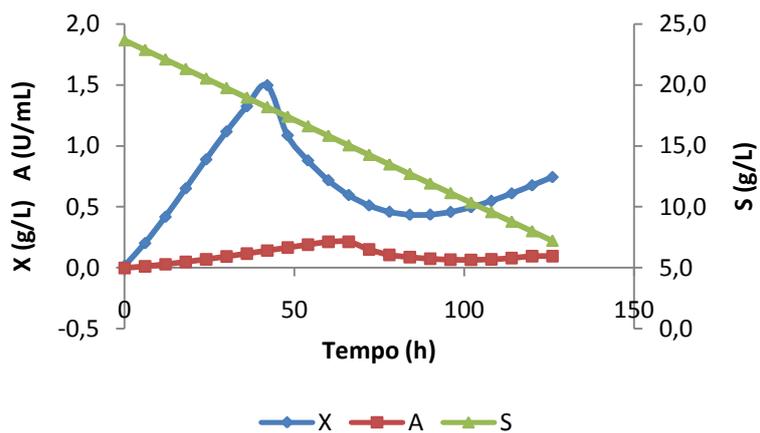


Figura 4.1 - Meio M7. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h.

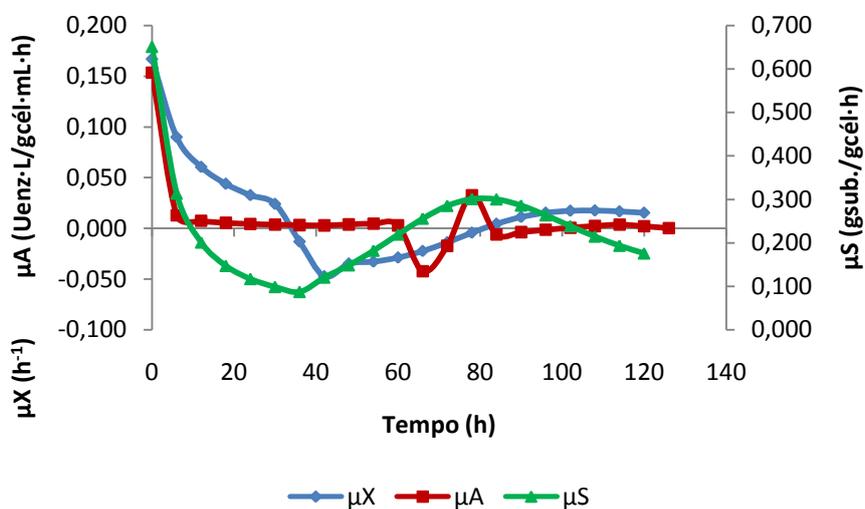


Figura 4.2 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M7.

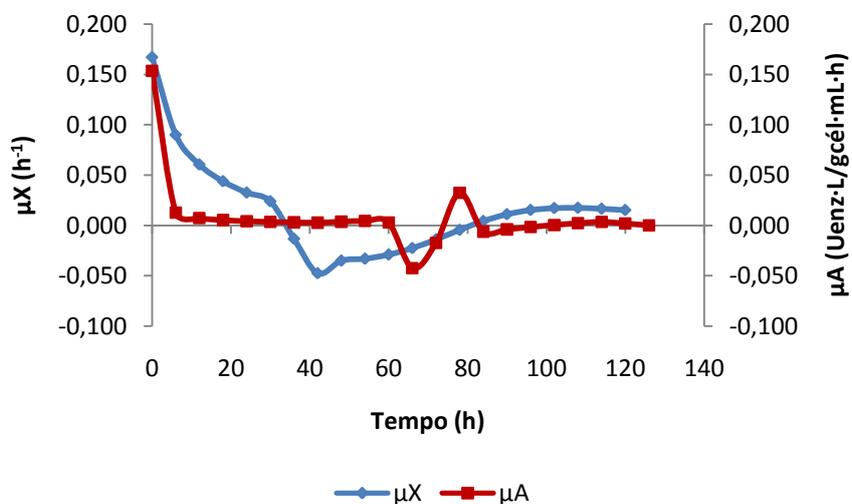


Figura 4.3 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M7.

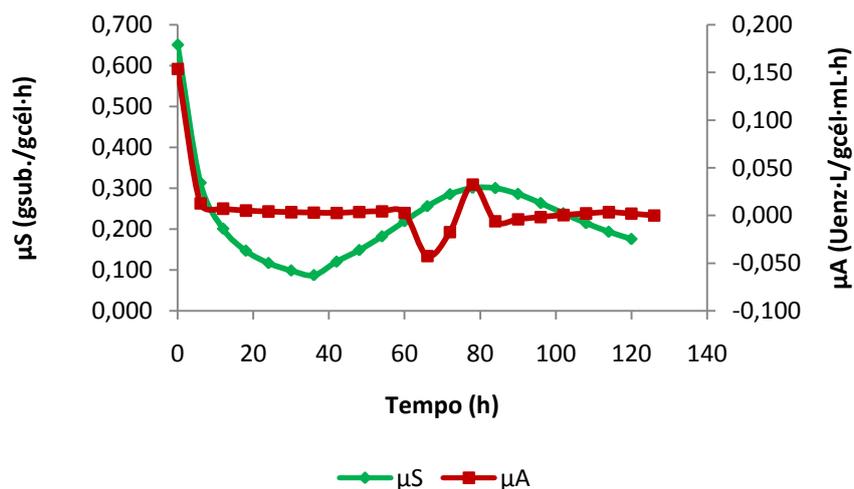


Figura 4.4 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M7.

Pode-se observar que as três curvas apresentam comportamento semelhante nas primeiras 8h de cultivo, com um perfil de decréscimo de velocidade específica, no restante do cultivo não se observa uma relação direta entre a velocidade específica de crescimento celular (μ_X) e a velocidade específica de atividade enzimática (μ_A), bem como da velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) e da velocidade específica de atividade enzimática (μ_A).

4.1.2 Meio de Cultura M8

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.1 e a partir da figura 4.5, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.6 a 4.8.

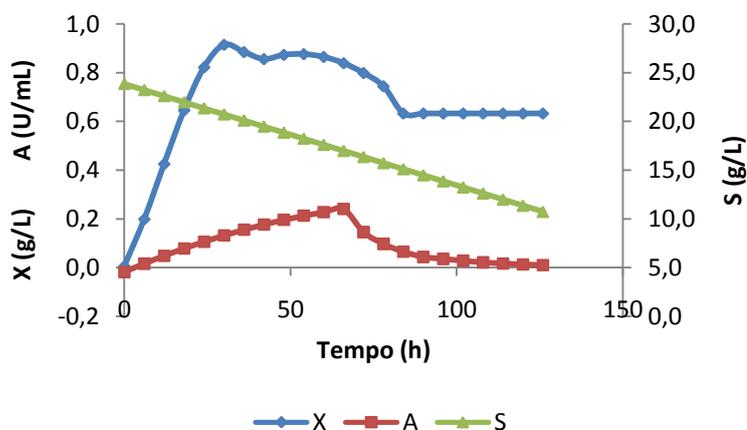


Figura 4.5 - Meio M8. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h.

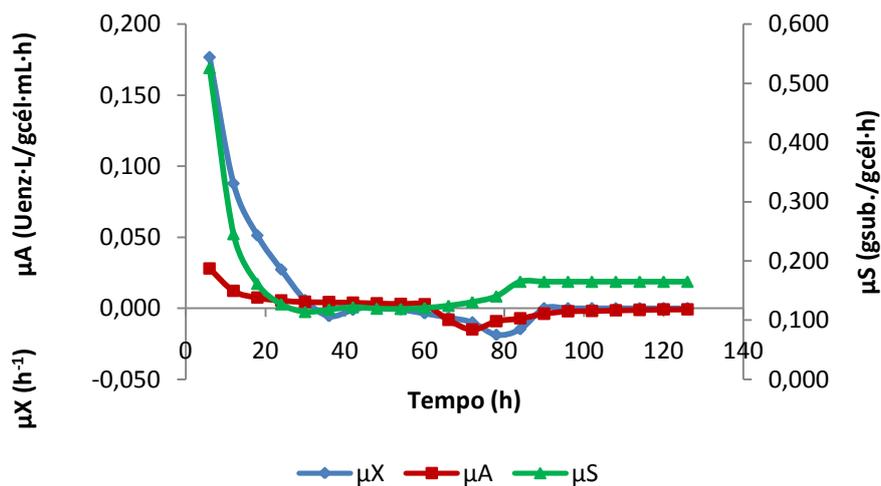


Figura 4.6 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M8.

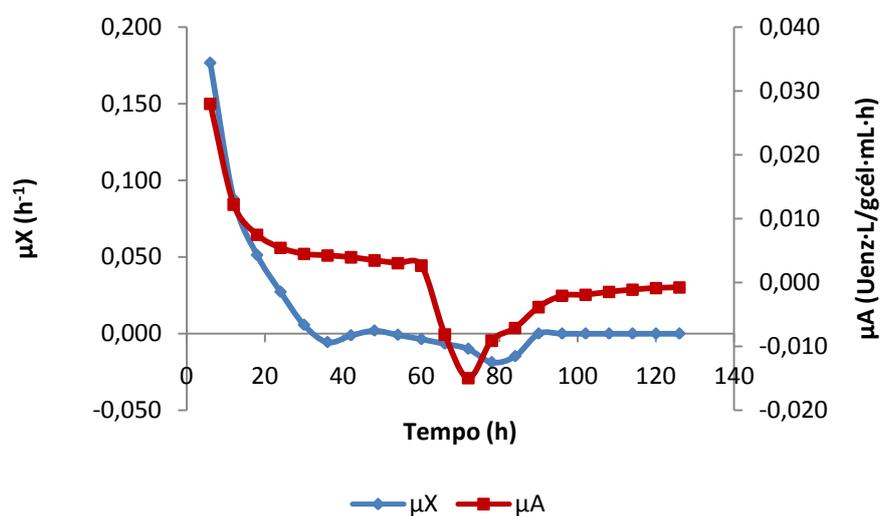


Figura 4.7 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M8.

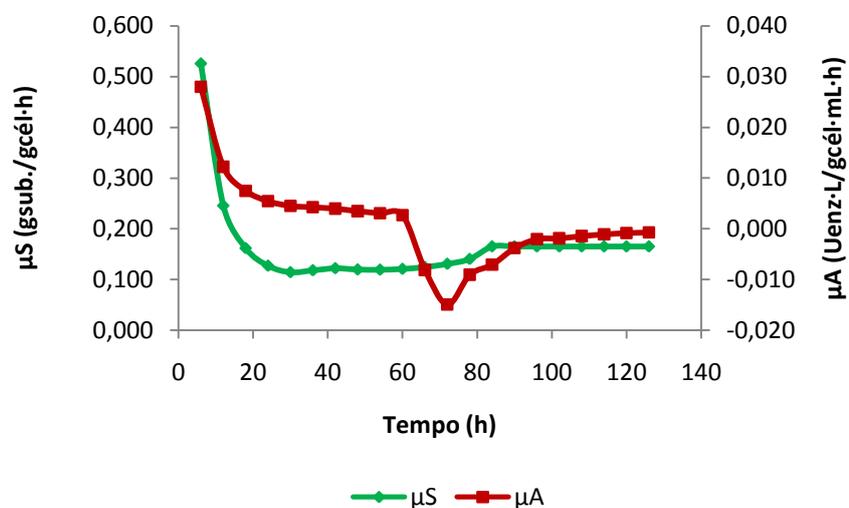


Figura 4.8 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M8.

Neste meio de cultura, também se observa um perfil de velocidades específicas semelhante apenas no início do cultivo, de maneira que as velocidades específicas apresentam comportamento diferente no restante da fermentação.

4.1.3 Meio de Cultura M9

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.1 e a partir da figura 4.9, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.10 a 4.12.

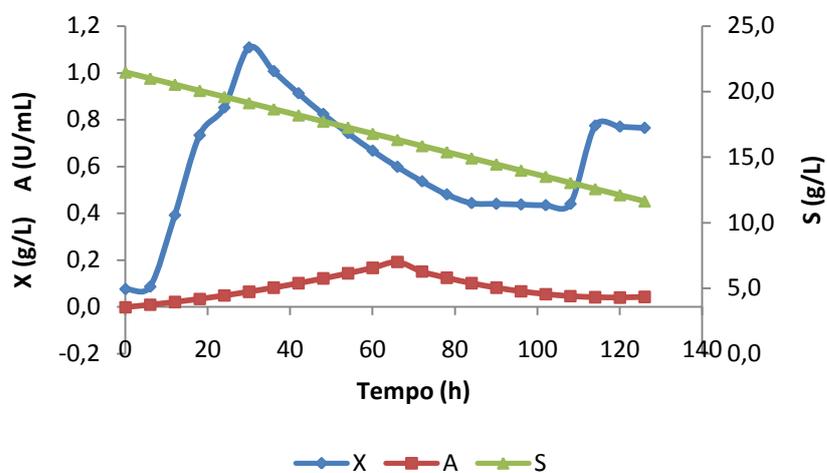


Figura 4.9 - Meio M9. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h.

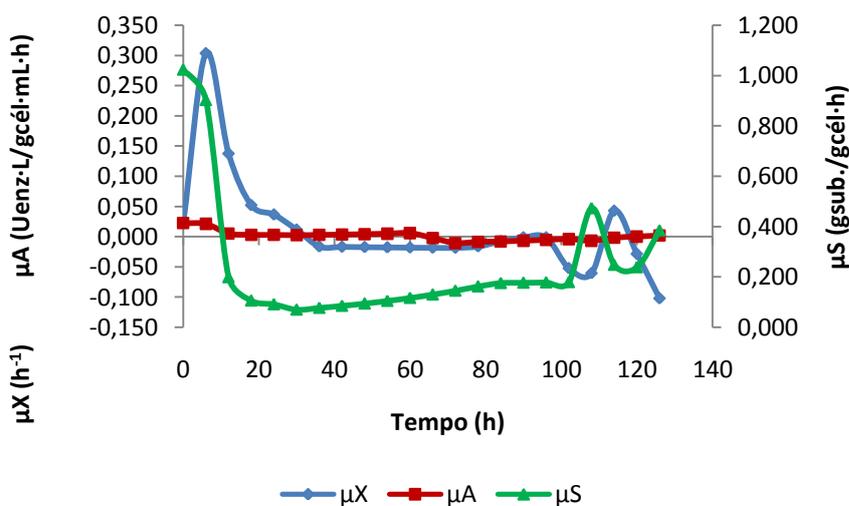


Figura 4.10 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M9.

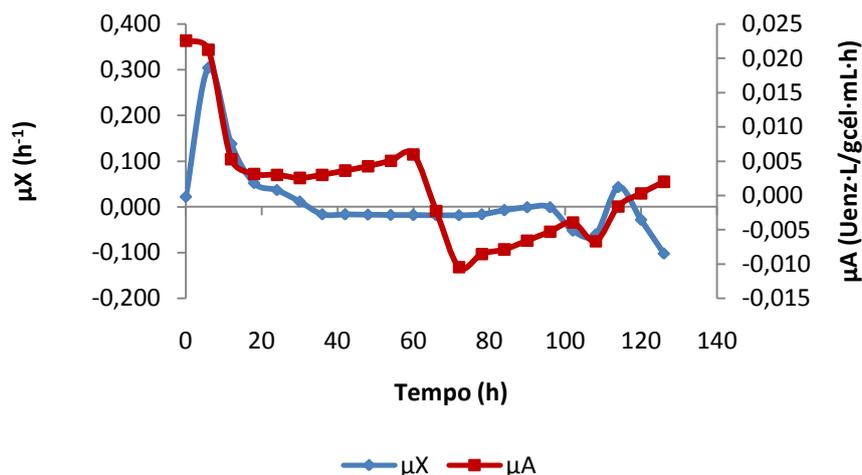


Figura 4.11 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M9.

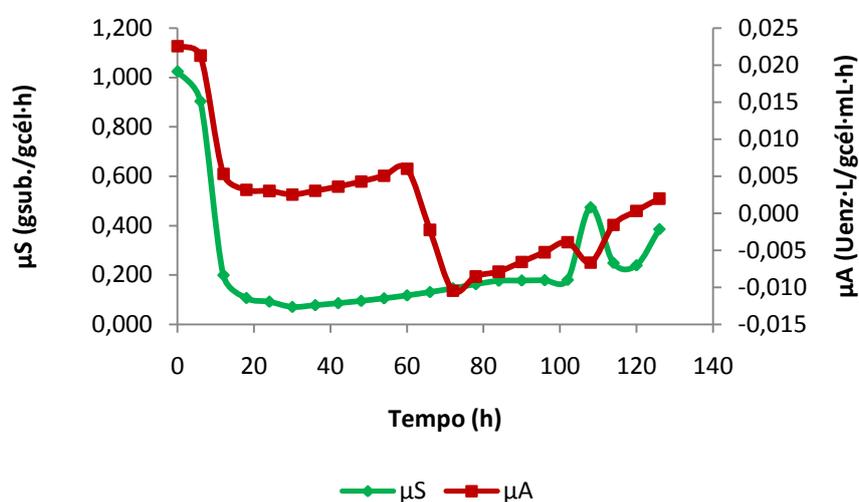


Figura 4.12 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M9.

Para o meio M9 se observou um comportamento das curvas de velocidade específicas semelhante também para as primeiras horas de cultivo, ainda que a curva de μ_X tenha iniciado com um valor baixo, no decorrer da fermentação, as velocidades específicas assumiram comportamentos distintos, não permitindo relacioná-las diretamente.

4.1.4 Meio de Cultura M34

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.1 e a partir da figura 4.13 em anexo, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.14 a 4.16.

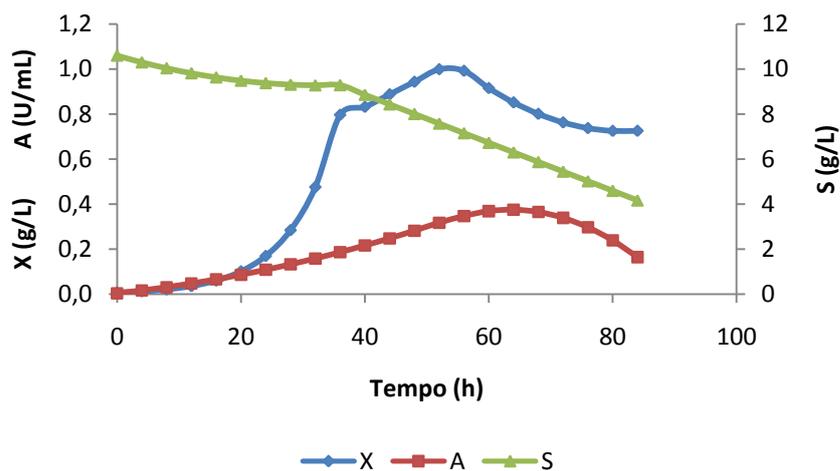


Figura 4.13 - Meio M34. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h.

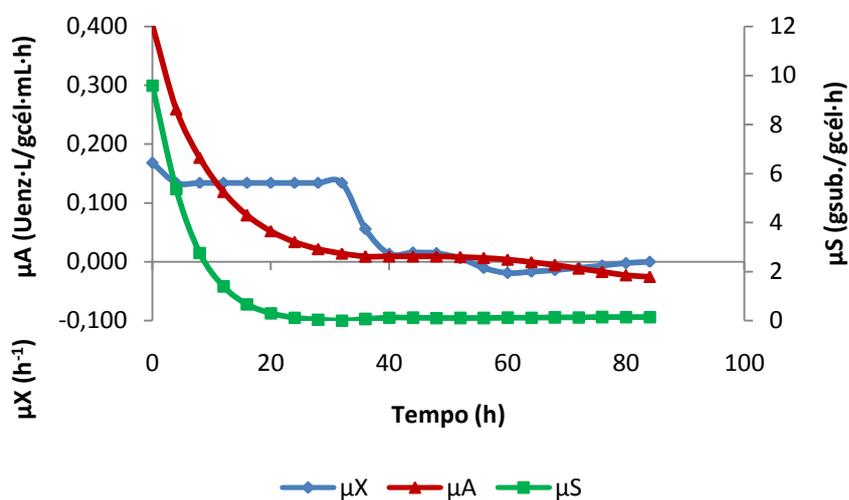


Figura 4.14 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M34.

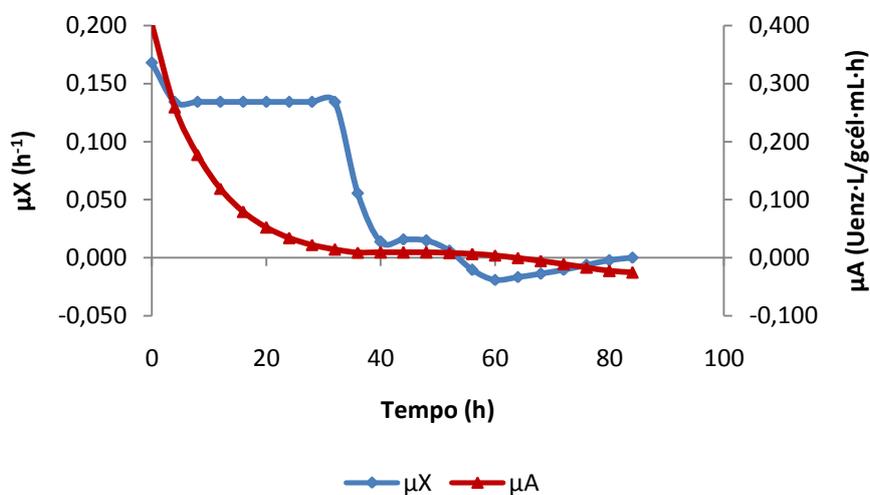


Figura 4.15 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M34.

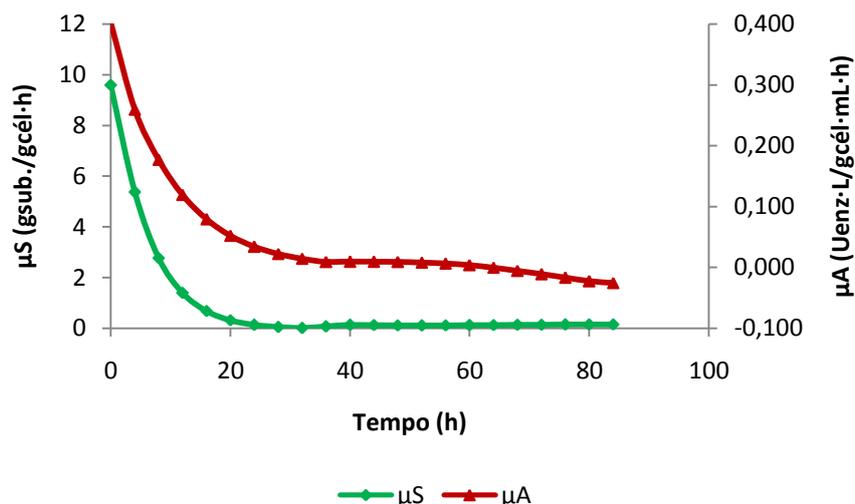


Figura 4.16 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M34.

Para o meio M34 pode-se observar um comportamento semelhante entre as curvas de velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) e de velocidade específica de atividade enzimática (μ_A) ao longo de todo o cultivo (figura 4.16), porém não se observa o mesmo comportamento em relação à velocidade específica de crescimento celular (μ_X).

4.1.5 Meio de Cultura M56

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.1 e a partir da figura 4.17, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.18 a 4.20.

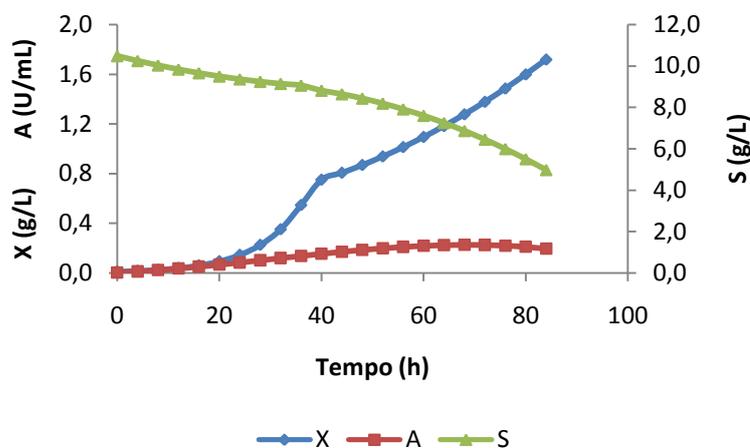


Figura 4.17 - Meio M56. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h.

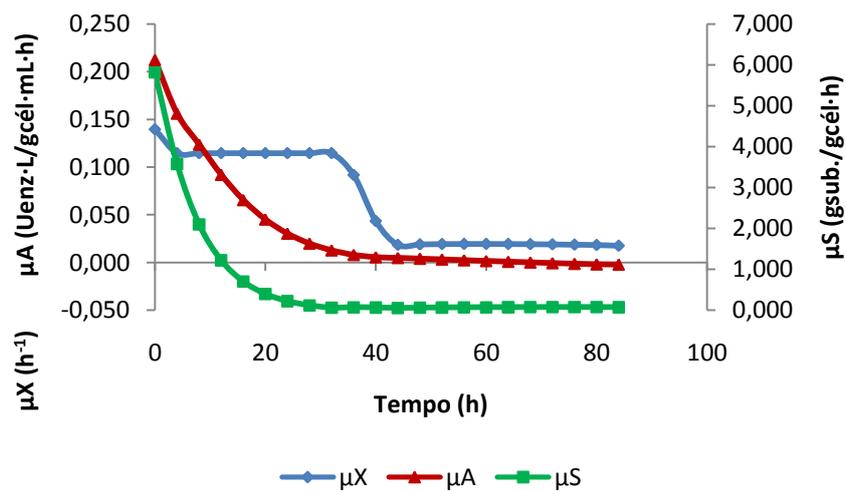


Figura 4.18 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M56.

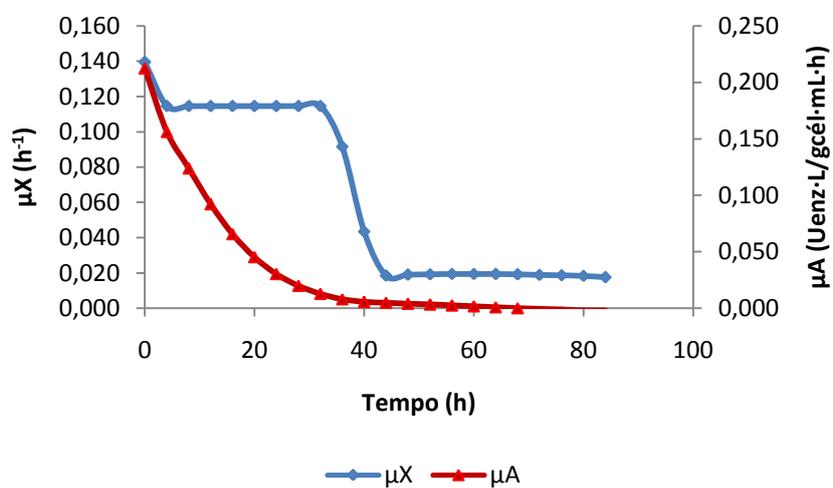


Figura 4.19 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio M56.

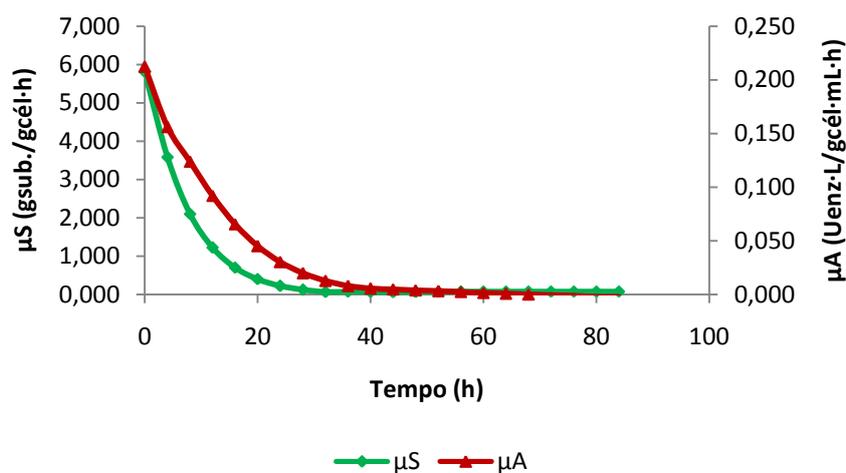


Figura 4.20 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio M56.

Assim como o meio M34, as curvas de μ_S e μ_A apresentam comportamento semelhante para o meio M56 (figura 4.20) o que não se observa ao se comparar as curvas de μ_X e μ_A .

4.1.6 Meio de Cultura E3A

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.2 e a partir da figura 4.21, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.22 a 4.24.

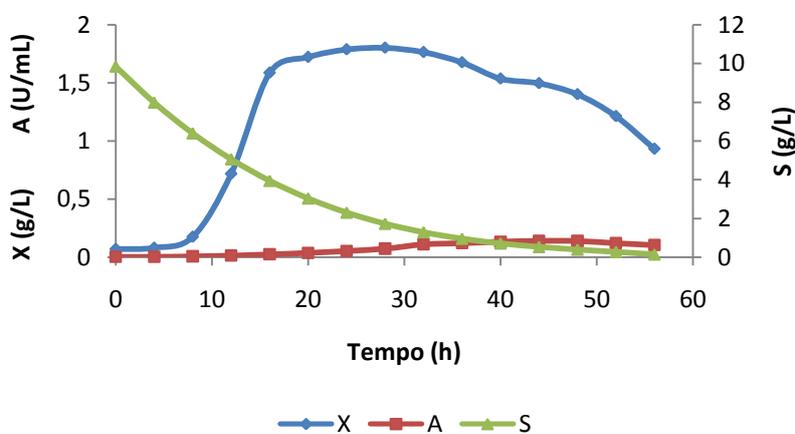


Figura 4.21 - Meio E3A. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.

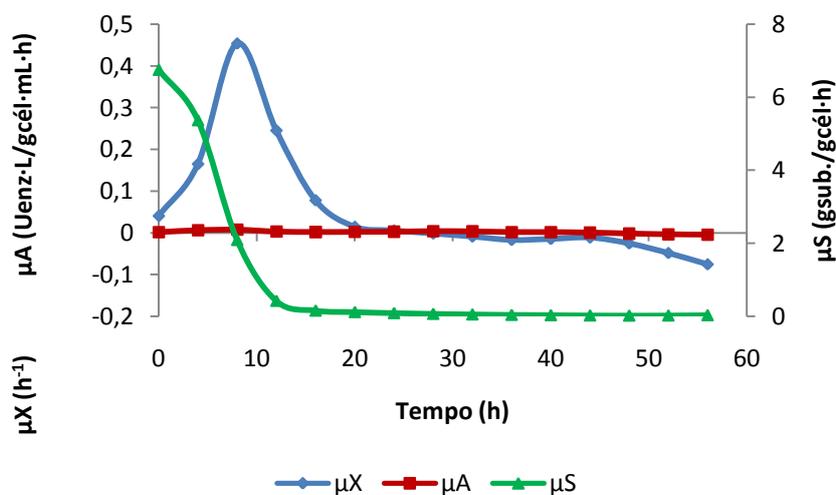


Figura 4.22 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3A.

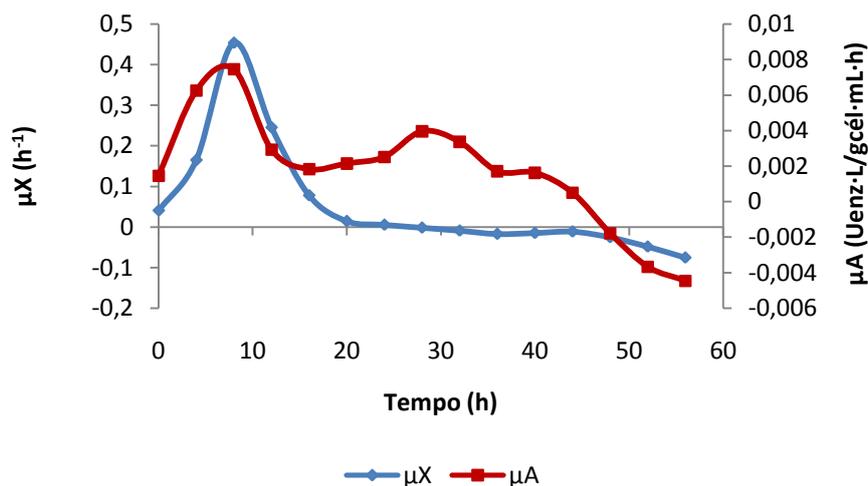


Figura 4.23 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E3A.

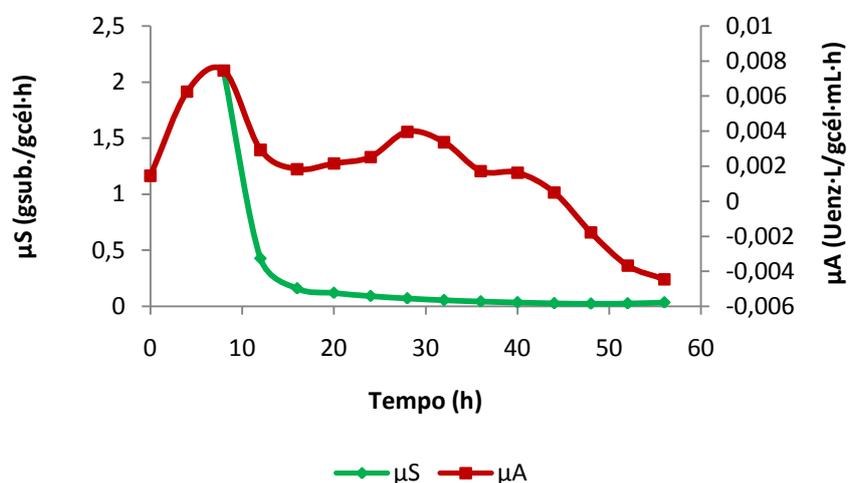


Figura 4.24 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3A.

Na figura 4.23 observa-se um comportamento semelhante entre as curvas de velocidades específicas μ_X e μ_A até próximo às 16h de cultivo, após este período, o comportamento das duas curvas divergem, pela figura 4.24 não se observa uma relação semelhante entre as curvas de μ_S e μ_A .

4.1.7 Meio de Cultura E3B

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.2 e a partir da figura 4.25 em anexo, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.26 a 4.28.

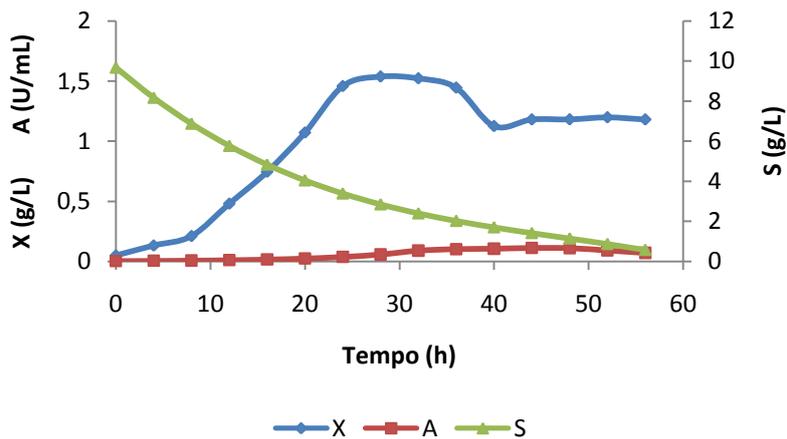


Figura 4.25 - Meio E3B. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.

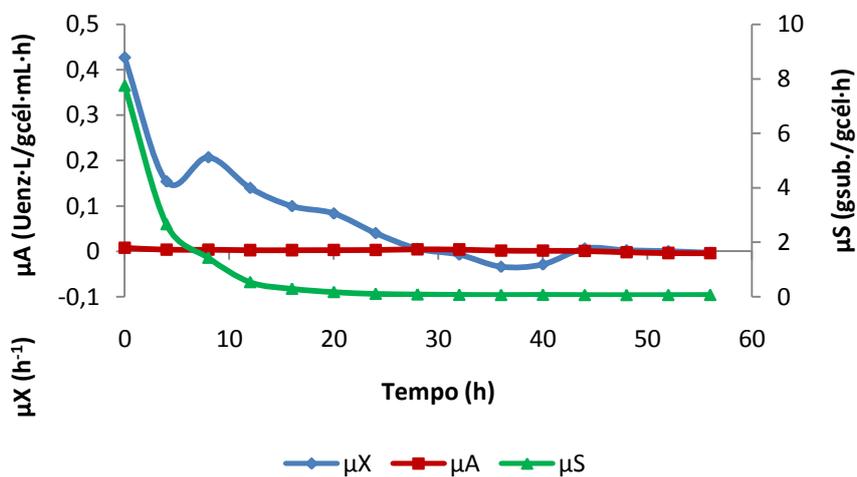


Figura 4.26 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3B.

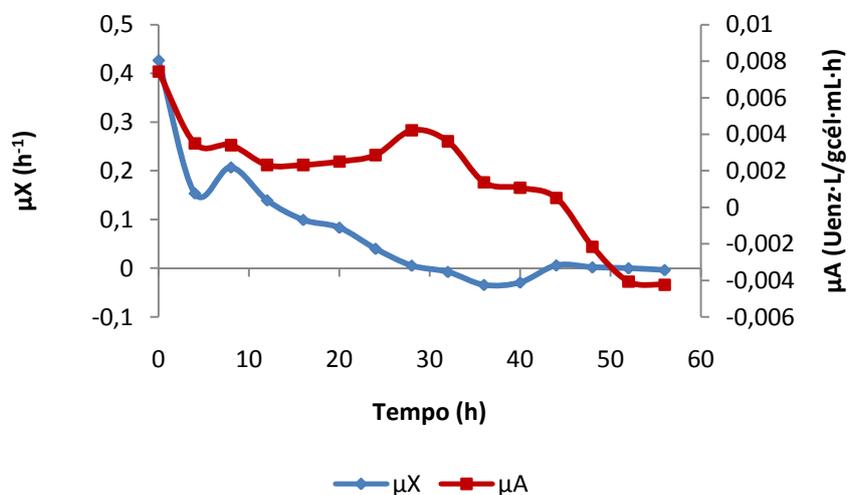


Figura 4.27 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E3B.

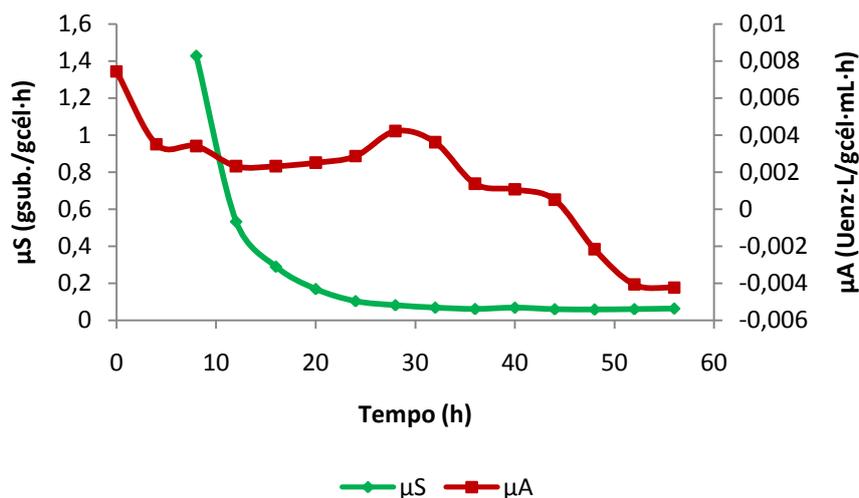


Figura 4.28 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E3B.

Pela figura 4.27 se observa que o comportamento das curvas de μ_X e μ_A é semelhante até 12h de cultivo, ainda que as inflexões apresentadas pela curva de μ_X são maiores do que as inflexões da curva de μ_A . Não se pôde observar comportamento análogo entre as curvas de μ_S e μ_A .

4.1.8 Meio de Cultura E5A

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.2 e a partir da figura 4.9, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.30 a 4.32.

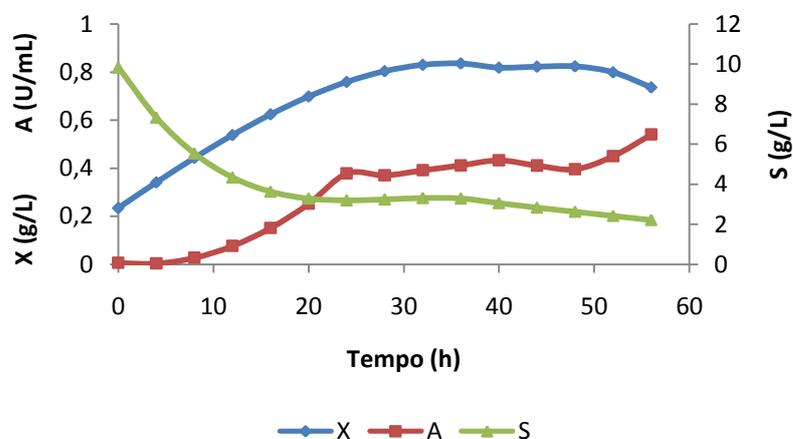


Figura 4.29 - Meio E5A. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.

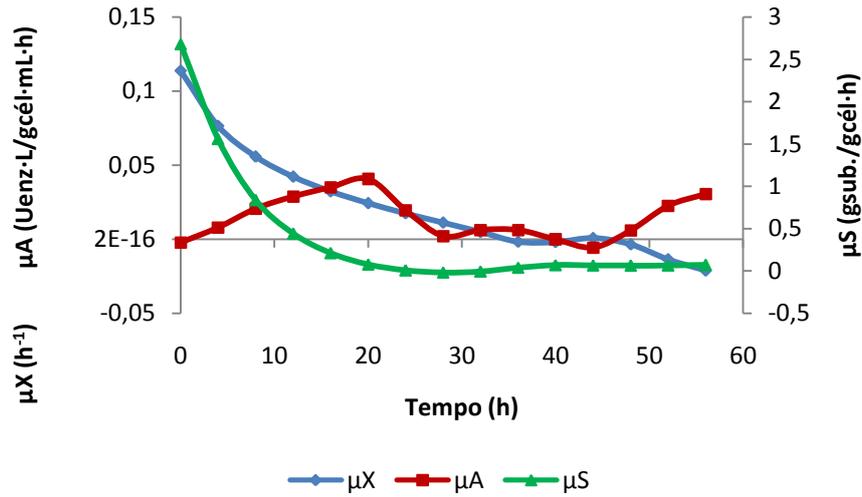


Figura 4.30 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5A.

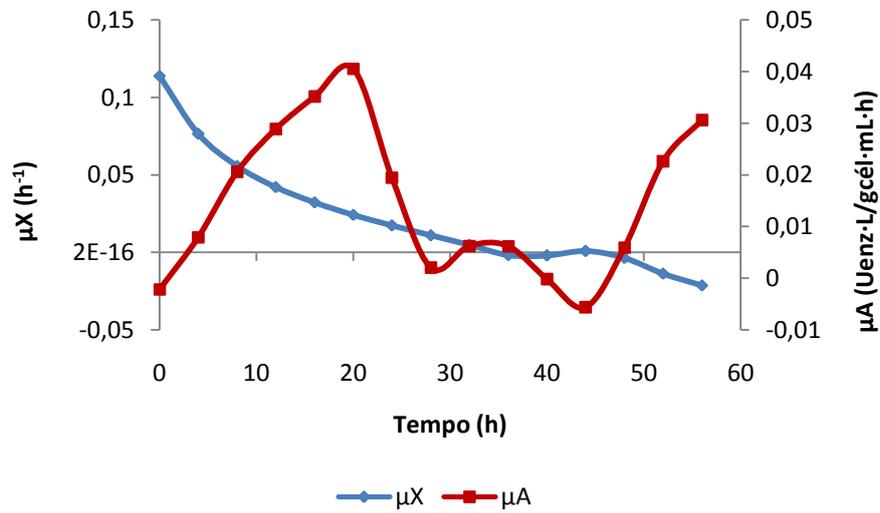


Figura 4.31 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E5A.

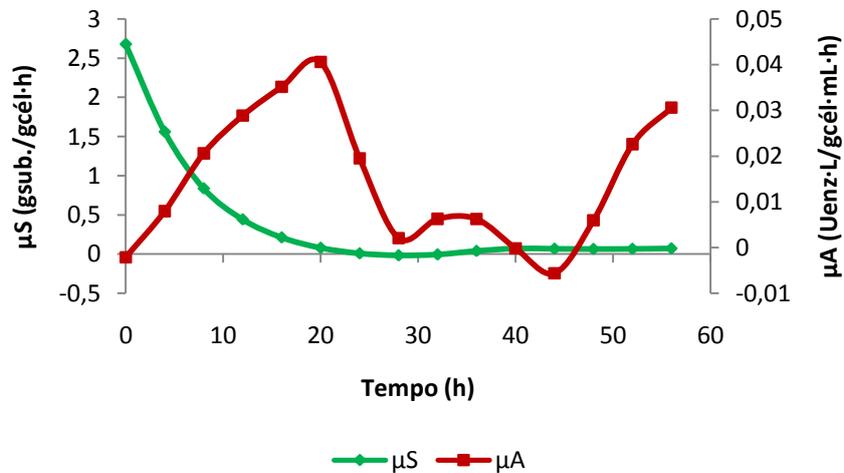


Figura 4.32 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5A.

Para o meio de cultura E5A não se observou uma relação entre as curvas de velocidades específicas μ_X , μ_A e μ_S e μ_A em nenhum período de fermentação. O que se observa é certa semelhança entre as curvas de μ_X e μ_S .

4.1.9 Meio de Cultura E5F

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.2 e a partir da figura 4.33, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.34 a 4.36.

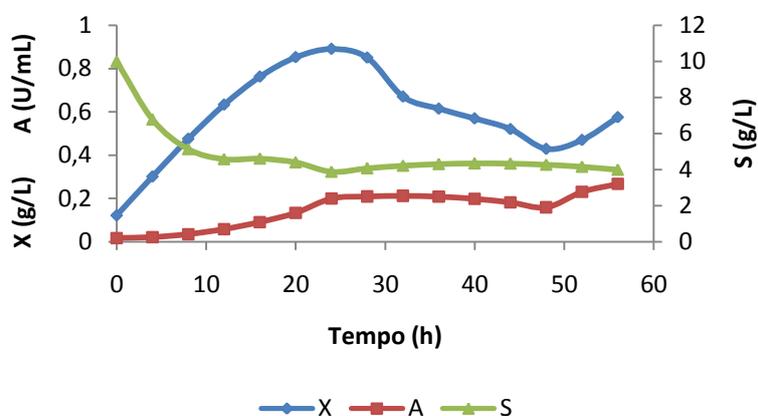


Figura 4.33 - Meio E5F. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.

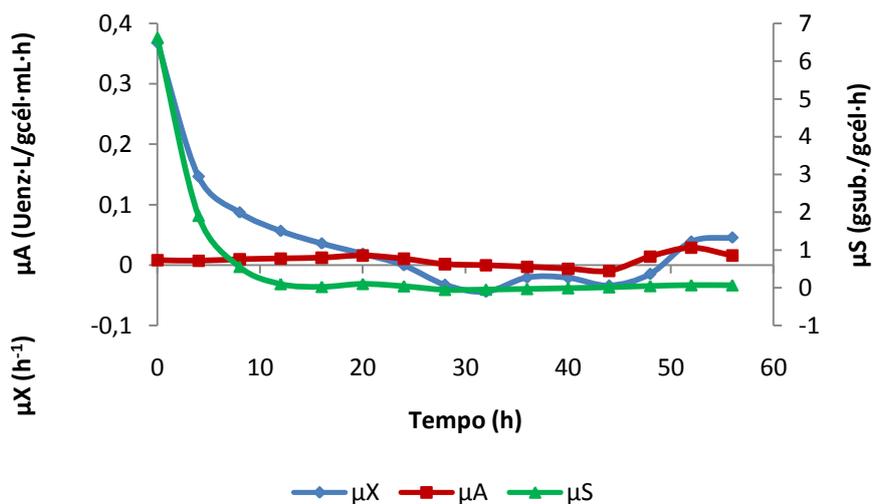


Figura 4.34 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5F.

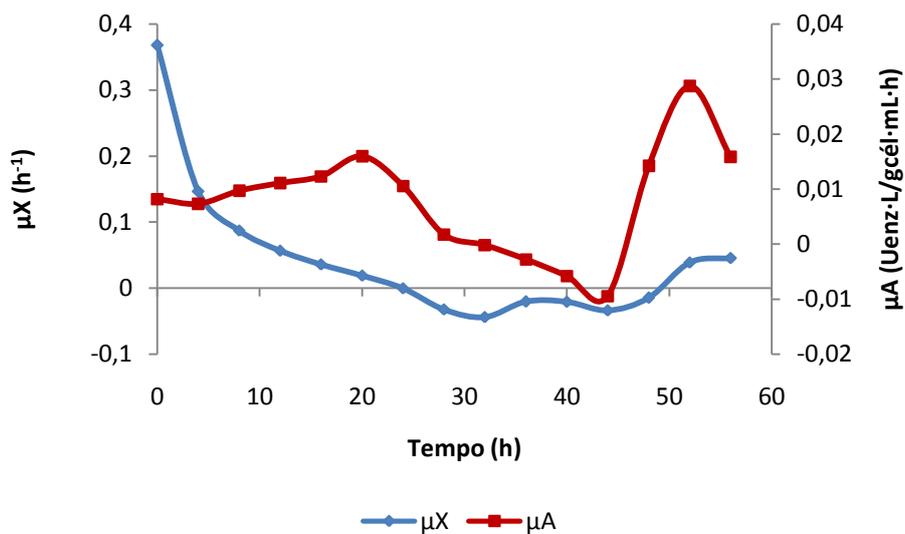


Figura 4.35 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E5F.

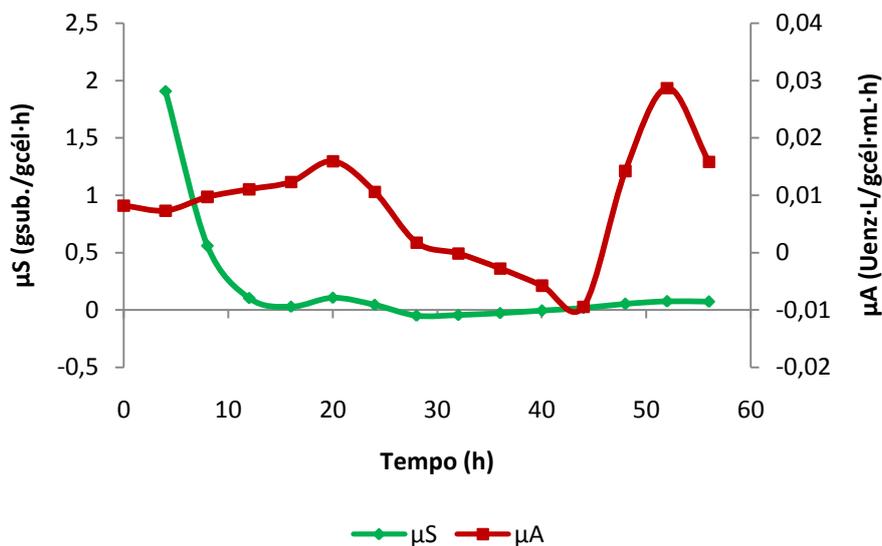


Figura 4.36 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E5F.

Assim como o meio E5A, não se observou um comportamento semelhante entre as curvas de velocidades específicas μ_X , μ_A e μ_S e μ_A em nenhum período de fermentação.

4.1.10 Meio de Cultura E6A

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.2 e a partir da figura 4.37 em anexo, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são

apresentadas nas figuras 4.38 a 4.40 são apresentados os comportamentos das velocidades específicas em função do tempo.

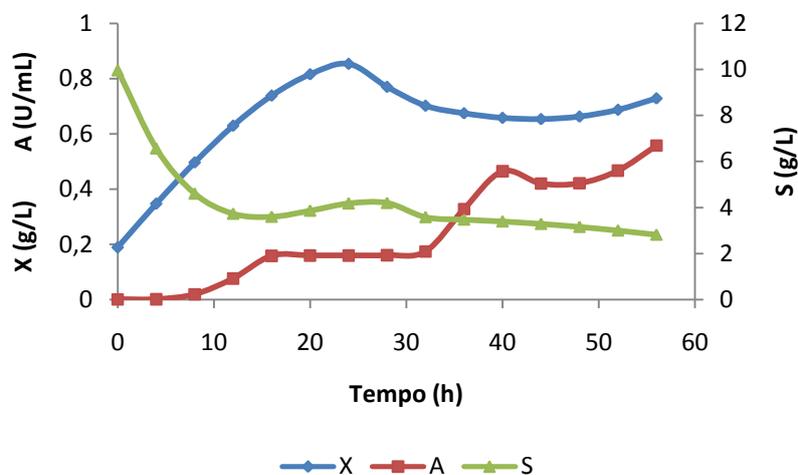


Figura 4.37 - Meio E6A. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.

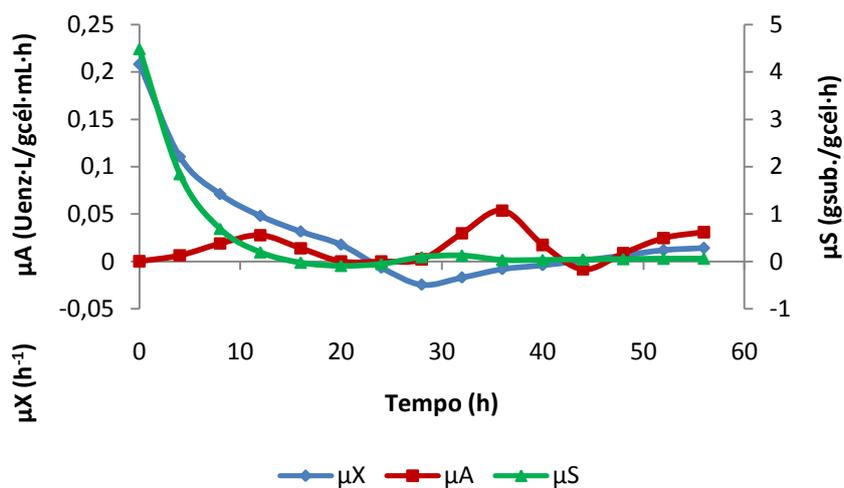


Figura 4.38 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6A.

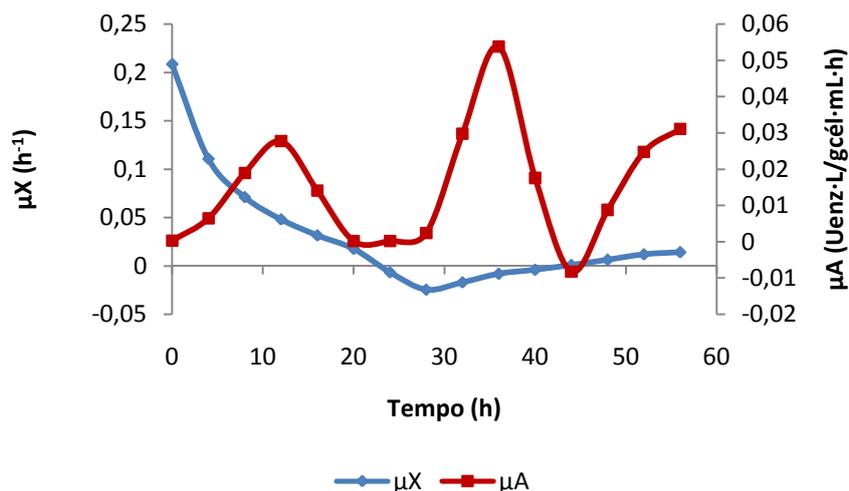


Figura 4.39 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E6A.

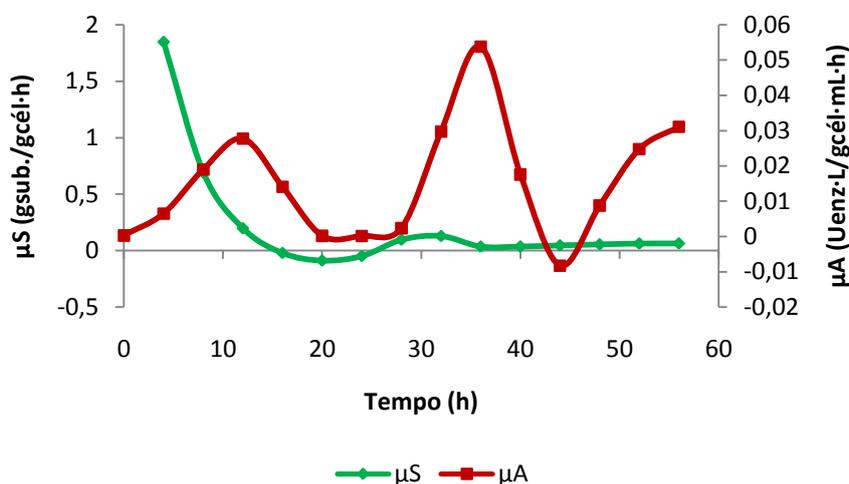


Figura 4.40 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6A.

A curva de velocidade específica de atividade enzimática (μ_A) apresentou comportamento bem distinto em relação às curvas de velocidade específica de crescimento celular (μ_X) e de consumo de substrato (μ_S). As curvas de μ_X e μ_S apresentam comportamento semelhante no início da fermentação, até próximo a 12h de cultivo.

4.1.11 Meio de Cultura E6F

Conforme caracterização apresentada na tabela 3.2 e a partir da figura 4.41 em anexo, foram determinadas as velocidades específicas em função do tempo como são apresentadas nas figuras 4.42 a 4.44.

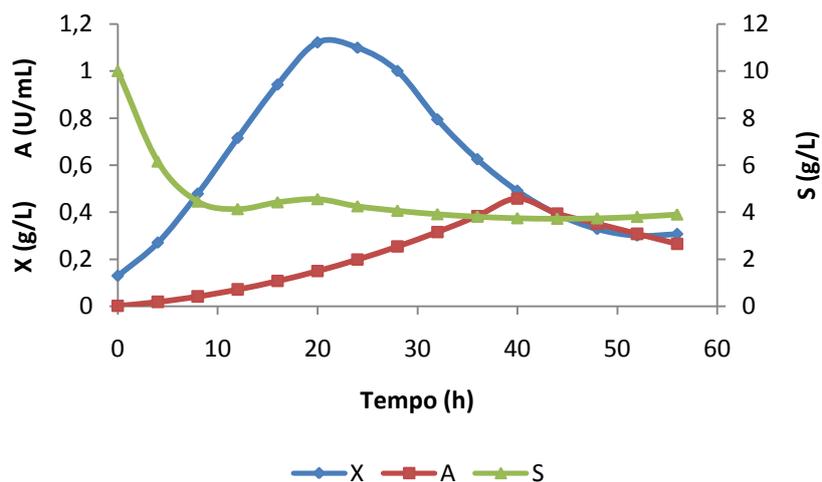


Figura 4.41 - Meio E6F. Dados alisados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h.

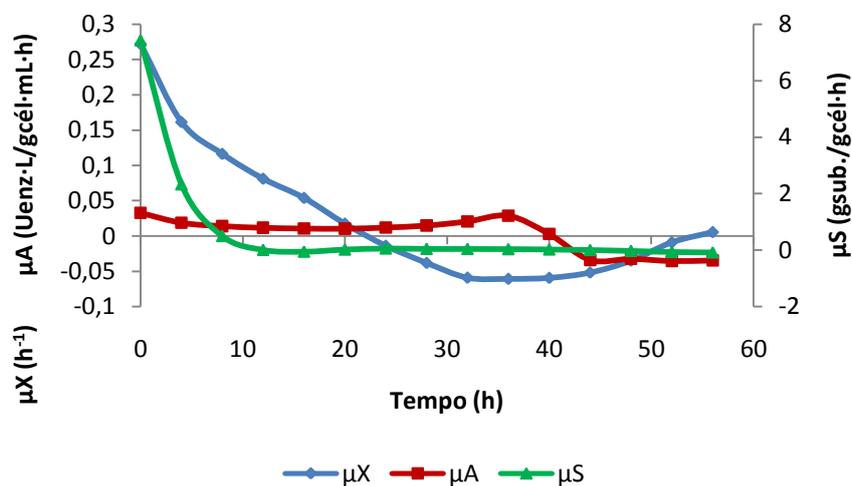


Figura 4.42 - Curvas de μ_X , μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6F.

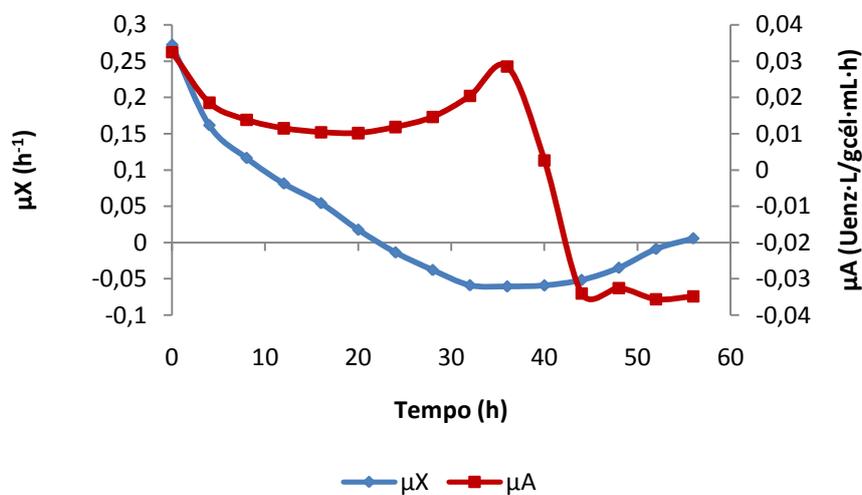


Figura 4.43 - Curvas de μ_X e μ_A em função do tempo para o meio E6F.

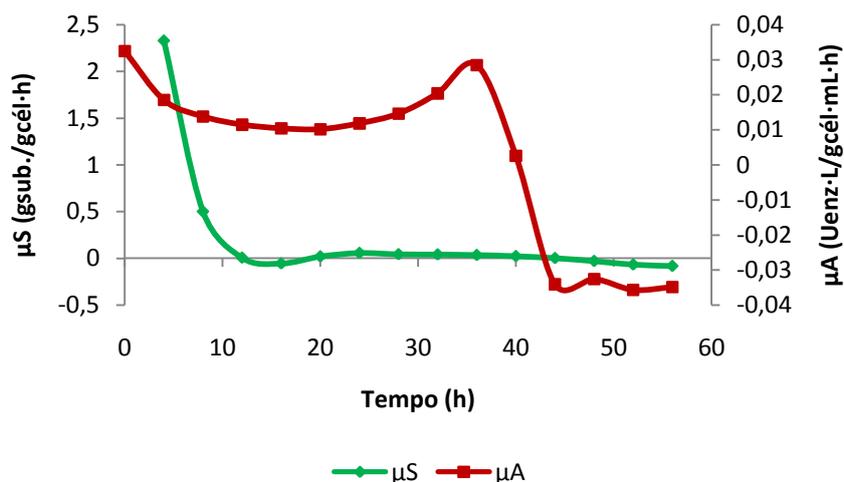


Figura 4.44 - Curvas de μ_S e μ_A em função do tempo para o meio E6F.

A curva de velocidade específica de atividade enzimática (μ_A) apresentou comportamento bem distinto em relação às curvas de velocidade específica de crescimento celular (μ_X) e de consumo de substrato (μ_S) também para o meio E6F.

4.1.12 Considerações Gerais

A partir da análise das figuras expostas nas seções anteriores, percebe-se que a atividade da enzima CGTase não está diretamente associada ao crescimento celular, em outras palavras, a produção da enzima não está diretamente associada com o crescimento do *Bacillus firmus*, fica mais evidente em alguns momentos (figuras 4.16 e 4.20) a associação entre a velocidade específica de atividade enzimática e a velocidade específica de consumo de substrato, o que, de certa forma, era esperado, uma vez que a enzima é amilolítica, atuando sobre o substrato e convertendo-o em ciclodextrinas, mas é certo que grande parte do amido presente fica disponível para o crescimento celular e para a geração de outros metabólitos.

O comportamento das curvas de μ_X , μ_S e μ_A , faz acreditar que a produção de CGTase por *Bacillus firmus* CEPA 37, nas condições dos meios de cultura apresentados, é característica de um processo fermentativo complexo, pois o produto de interesse é uma enzima que é uma das proteínas indutivas sintetizadas pelo micro-organismo, dentre as demais proteínas indutivas e constitutivas sintetizadas e outros metabólitos.

4.2 PARÂMETROS INICIAIS

Os valores dos parâmetros $\mu_{X_{\max}}$, $\mu_{A_{\max}}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ determinados a partir dos dados experimentais ajustado (anexo I) de concentração celular, consumo de substrato e atividade enzimática, conforme metodologia descrita no item 3.2.2, são apresentados nas tabelas de 4.1 a 4.8.

Tabela 4.1 - Determinação de $\mu_{X_{\max}}$ experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).

Meio	$\mu_{X_{\max}}$	Equação	R^2	Intervalo
M7	0,0979	$y = 0,0979x - 2,1467$	0,9806	6 a 18h
M8	0,0984	$y = 0,0984x - 2,152$	0,9725	6 a 18h
M9	0,1781	$y = 0,1781x - 3,3689$	0,9460	6 a 18h
M34	0,1232	$y = 0,1232x - 4,7895$	0,9944	0 a 40h
M56	0,1094	$y = 0,1094x - 4,5782$	0,9995	0 a 40h

$$[\mu_{X_{\max}}] = h^{-1}$$

Tabela 4.2 - Determinação de $\mu_{A_{\max}}$ experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).

Meio	$\mu_{A_{\max}}$
M7	0,153
M8	0,028
M9	0,023
M34	0,403
M56	0,212

$$[\mu_{A_{\max}}] = U \text{ enzima} \cdot L / g \text{ célula} \cdot mL \cdot h$$

Tabela 4.3 - Determinação de $Y_{X/S}$ experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).

Meio	$Y_{X/S}$	Equação	R^2	Intervalo
M7	0,2785	$y = 0,2785x - 0,0151$	0,9985	0 a 42h
M8	0,3035	$y = 0,3035x + 0,0226$	0,9864	0 a 30h
M9	0,4440	$y = 0,444x - 0,0266$	0,9832	0 a 30h
M34	0,1208	$y = 0,1208x + 0,6221$	0,9938	36 a 52h
M56	0,2904	$y = 0,2904x + 0,2592$	0,9988	40 a 56h

$$[Y_{X/S}] = g \text{ célula} / g \text{ substrato}$$

Tabela 4.4 - Determinação de $Y_{A/S}$ experimentais dos meios de cultura de Marques (2004).

Meio	$Y_{A/S}$	Equação	R^2	Intervalo
M7	0,0277	$y = 0,0277x - 0,0098$	0,994	0 a 54h
M8	0,0411	$y = 0,0411x + 0,013$	0,9888	0 a 54h
M9	0,0343	$y = 0,0343x - 0,0086$	0,9873	0 a 54h
M34	0,0767	$y = 0,0767x + 0,0797$	0,9988	36 a 52h
M56	0,0931	$y = 0,0931x - 0,0152$	0,9741	0 a 56h

$$[Y_{A/S}] = U \text{ enzima} \cdot L / g \text{ substrato} \cdot mL$$

Tabela 4.5 - Determinação de μ_{xmax} experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).

Meio	μ_{xmax}	Equação	R^2	Intervalo
E3A	0,2593	$y = 0,2583x - 3,6294$	0,9856	4 a 16h
E3B	0,1240	$y = 0,124x - 2,4322$	0,9732	4 a 24h
E5A	0,0534	$y = 0,0534x - 1,3335$	0,9542	0 a 20h
E5F	0,1349	$y = 0,1349x - 1,9361$	0,9361	0 a 12h
E6A	0,0829	$y = 0,0829x - 1,5008$	0,935	0 a 16h
E6F	0,1425	$y = 0,1425x - 1,9615$	0,9831	0 a 12h

$$[\mu_{xmax}] = h^{-1}$$

Tabela 4.6 - Determinação de μ_{Amax} experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).

Meio	μ_{Amax}
E3A	0,007454
E3B	0,007424
E5A	0,0405
E5F	0,0159
E6A	0,0277
E6F	0,0325

$$[\mu_{Amax}] = U \text{ enzima} \cdot L / g \text{ célula} \cdot mL \cdot h$$

Tabela 4.7 - Determinação de $Y_{X/S}$ experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).

Meio	$Y_{X/S}$	Equação	R^2	Intervalo
E3A	0,4955	$y = 0,4955x - 1,6103$	0,9586	8 a 20h
E3B	0,3487	$y = 0,3487x - 0,891$	0,9666	8 a 24h
E5A	0,0608	$y = 0,0608x - 0,0233$	0,9660	0 a 16h
E5F	0,0865	$y = 0,0865x - 0,0314$	0,9155	0 a 12h
E6A	0,0668	$y = 0,0668x - 0,0242$	0,9483	0 a 12h
E6F	0,0584	$y = 0,0584x - 0,0197$	0,8946	0 a 8h

$$[Y_{X/S}] = g \text{ célula} / g \text{ substrato}$$

Tabela 4.8 - Determinação de $Y_{A/S}$ experimentais dos meios de cultura de Calderaro (2007).

Meio	$Y_{A/S}$	Equação	R^2	Intervalo
E3A	0,0173	$y = 0,0173x - 0,0772$	0,9367	12 a 28h
E3B	0,011	$y = 0,011x - 0,0381$	0,929	12 a 24h
E5A	0,0235	$y = 0,0235x - 0,0661$	0,9038	4 a 12h
E5F	0,0148	$y = 0,0148x - 0,046$	0,8284	4 a 12h
E6A	0,0236	$y = 0,0236x - 0,0865$	0,7577	4 a 12h
E6F	0,022	$y = 0,022x - 0,0697$	0,8146	4 a 12h

$$[Y_{A/S}] = U \text{ enzima} \cdot L / g \text{ substrato} \cdot mL$$

Os valores obtidos de μ_{Xmax} , μ_{Amax} , $Y_{X/S}$ e $Y_{A/S}$ foram utilizados como parâmetros iniciais a serem substituídos nos modelos cinéticos estudados no processo inicial de resolução dos sistemas de equações diferenciais, sendo gerados novos valores ao fim da resolução dos sistemas, que serão apresentados nos itens 4.3 a 4.13.

4.3 MEIO DE CULTURA M7

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio M7, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, cada conjunto de gráficos apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.3.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme a tabela 3.1, o meio de cultura M7 foi caracterizado por utilizar uma concentração de amido (substrato) inicial em torno de 23g/L, tendo seu pH tamponado em 8,0, num volume de meio de cultura de 1L em erlenmeyer de 2L, atingindo atividade máxima de 0,2153 U/mL em 66h de cultivo, concentração celular máxima de 1,3588g/L em 42h de cultivo e concentração de substrato final de 8,05g/L ao final do cultivo, em 126h.

Os dados experimentais foram retirados a cada 12h, para aumentar o número de pontos a serem inseridos no programa de resolução das equações diferenciais, foi feito o ajuste dos dados como descrito no capítulo 3, sendo o intervalo de tempo de 6 em 6h, conforme foi apresentado na figura 4.1.

Como as curvas de concentração celular e de atividade enzimática não apresentam comportamento constante, com inflexões, a aplicação dos modelos cinéticos em todo tempo de cultivo se torna mais difícil, além de se tratar de um sistema em batelada, com acúmulo de metabólitos secundários no meio de cultura que não serão representados pelos modelos cinéticos estudados, os dados ajustados inseridos no algoritmo de resolução no MATLAB[®] foram os obtidos no tempo de 0 a 36h de cultivo (figura 4.45).

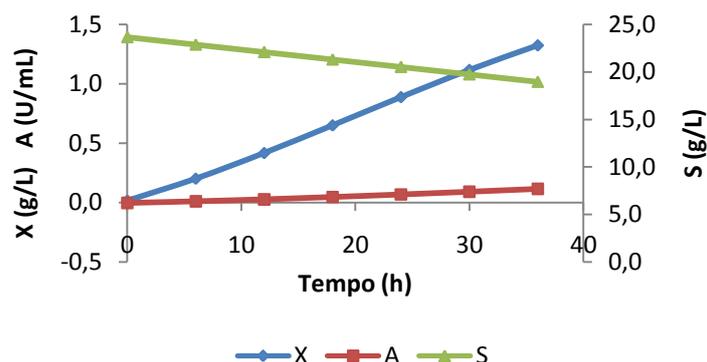
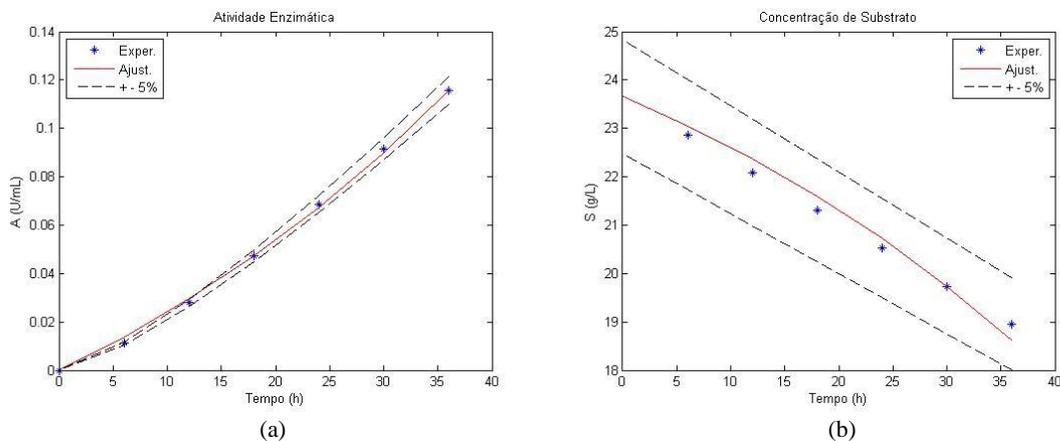


Figura 4.45 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M7 truncados em 36h de cultivo.

4.3.1 Modelos Monod-Aiba

Na figura 4.46 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para os dados obtidos por Marques (2004) para o meio M7, com concentração inicial de substrato de 23 g/L aplicando o modelo de Monod para o crescimento celular e o modelo de Aiba para a atividade enzimática.



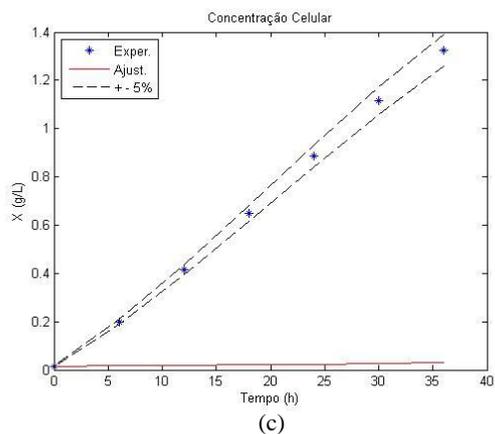
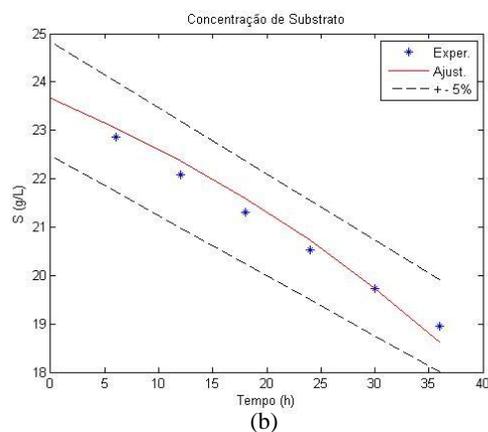
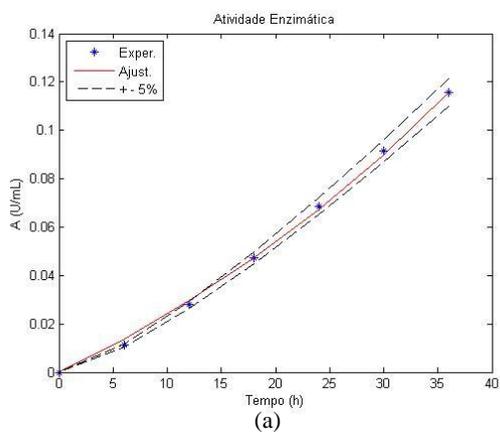


Figura 4.46 – Meio M7. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação de modelos Monod-Aiba.

4.3.2 Modelos Monod-Andrews

Na figura 4.47 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para os dados obtidos por Marques (2004) para o meio M7, com concentração inicial de substrato de 23 g/L, aplicando o modelo de Monod para a concentração celular e o modelo de Andrews para a atividade enzimática.



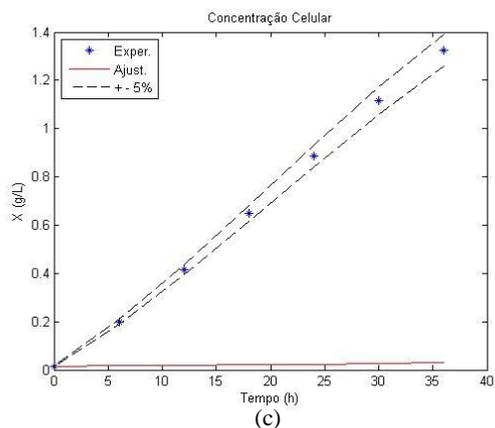


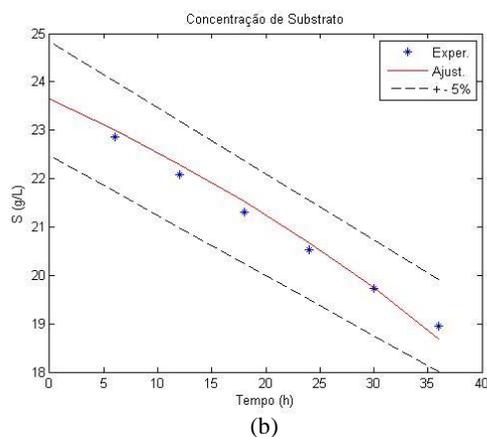
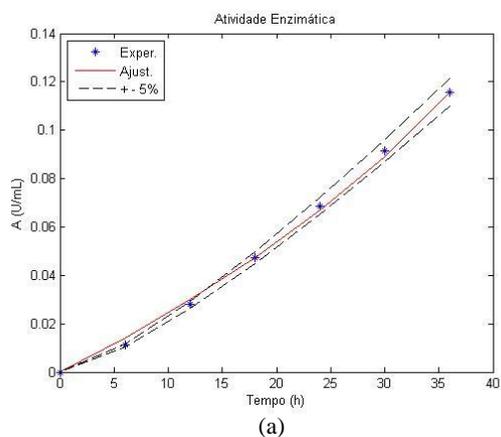
Figura 4.47 - Meio M7. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação de modelos Monod-Andrews.

4.3.3 Modelo Aiba

Para a representação da concentração celular e da atividade enzimática pelo modelo Aiba, não houve resolução das equações diferenciais, de forma que o programa não conseguiu ajustar nenhum conjunto de valores experimentais.

4.3.4 Modelo Andrews

Na figura 4.48 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para os dados obtidos por Marques (2004) para o meio M7, com concentração inicial de substrato de 23 g/L, aplicando o modelo de Andrews para a concentração celular e para a atividade enzimática.



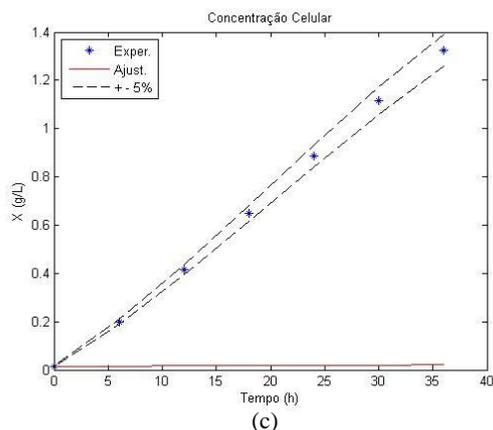


Figura 4.48 - Meio M7. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.9 são apresentados os valores dos parâmetros obtidos pelos modelos estudados para o meio M7.

Tabela 4.9 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M7

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{max}}$ (h^{-1})	0,0189	0,0190	-	0,1873
$\mu_{A_{max}}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,1898	0,1984	-	0,1249
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,2715	0,3239	-	0,0015
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,0232	0,0232	-	0,1067
K_{sx} (g/L)	0,0987	0,1095	-	0,5531
K_{is} (g/L)	-	-	-	1,0723
K_{sa} (g/L)	0,0431	0,0443	-	-16,1103
K_{ia} (g/L)	91,9719	66,7982	-	47,2051

4.4 MEIO DE CULTURA M8

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio M8, foi feita a tentativa de gerar quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas

de equações diferenciais estudados, porém os dados aplicados ao algoritmo de resolução das equações diferenciais não possibilitou a geração de curvas de ajuste ou as curvas geradas não satisfizeram nenhum dos conjuntos de dados experimentais, ou seja, concentração celular, consumo de substrato e atividade enzimática.

Conforme a tabela 3.1, o meio de cultura M8 foi caracterizado por possuir concentração inicial de substrato (amido) em torno de 23,6g/L e ser tamponado em pH 9,0, tendo 1L de meio de cultura em erlenmeyer de 2L. Este meio apresentou atividade máxima de 0,2258U/mL em 66h de cultivo, concentração celular máxima de 0,8856g/L em 30h de cultivo e concentração final de substrato de 10,824g/L em 126h de cultivo.

Da mesma forma que o meio M7, o meio M8 teve suas amostras retiradas de 12 em 12h e para aumentar o número de pontos experimentais inseridos na resolução das equações diferenciais, foi feito o alisamento dos dados e a ampliação do número de pontos experimentais para intervalos de tempo de 6 em 6h, conforme foi apresentado na figura 4.5.

Neste meio de cultura também se observa que o comportamento das curvas de concentração celular e de atividade enzimática sofre variações ao longo das 126 horas de cultivo, para minimizar estas variações e a influência do acúmulo de metabólitos secundários no meio de cultura, foram utilizados dados ajustados de 0 a 36h de cultivo, conforme é apresentado na figura 4.49.

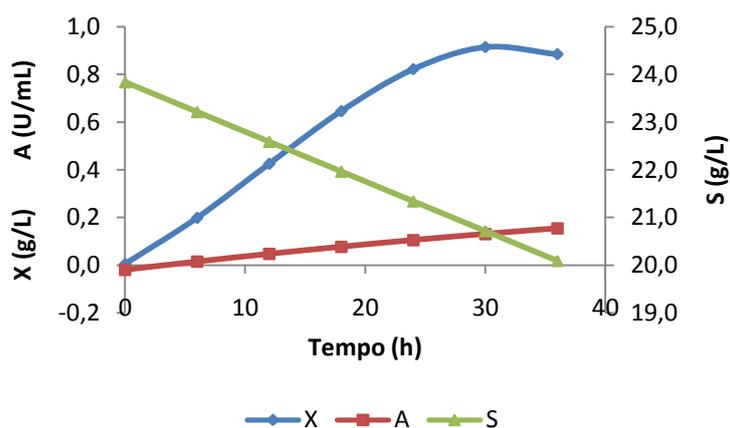


Figura 4.49 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M8 truncados em 36h de cultivo.

4.4.1 Modelos Monod-Aiba

A combinação de modelos Monod-Aiba não resultou em bons resultados para o ajuste do meio M8, de maneira que as curvas de ajuste resultantes se afastaram muito dos pontos experimentais obtidos.

4.4.2 Modelos Monod-Andrews

A combinação de modelos Monod-Andrews também não se mostrou favorável para o ajuste do meio M8, apresentando curvas de ajuste distantes dos pontos experimentais obtidos.

4.4.3 Modelo Aiba

O modelo de Aiba não ajustou adequadamente os dados experimentais do meio M8, apresentando pouca concordância entre os dados experimentais e o modelo ajustado.

4.4.4 Modelo Andrews

O modelo de Andrews não permitiu um bom ajuste entre os valores experimentais do meio M8 e o modelo.

4.5 MEIO DE CULTURA M9

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio M9, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.5.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme a tabela 3.1, o meio de cultura M9 se caracterizou por apresentar concentração inicial de substrato (amido) de 22g/L em tampão de pH 10,0, sendo 1L de meio de cultura cultivado em erlenmeyer de 2L. A atividade máxima atingida neste meio foi de 0,1654U/mL em 66h de cultivo, a concentração celular máxima obtida foi de 1,1268g/L em 30h de cultivo e a concentração final de substrato foi de 11,406g/L em 126h de fermentação.

Assim como os meios M7 e M8, as amostras foram retiradas de 12 em 12h e o alisamento dos dados foi feito para tempos de 6 em 6h, como foi apresentado na figura 4.9.

Da mesma forma, para diminuir a influência das mudanças de comportamento das curvas de concentração celular e de atividade enzimática, além de minimizar os efeitos dos metabólitos secundários acumulados no final da fermentação, foram utilizados os dados ajustados no intervalo de tempo de 0 a 36h de cultivo, apresentados na figura 4.50.

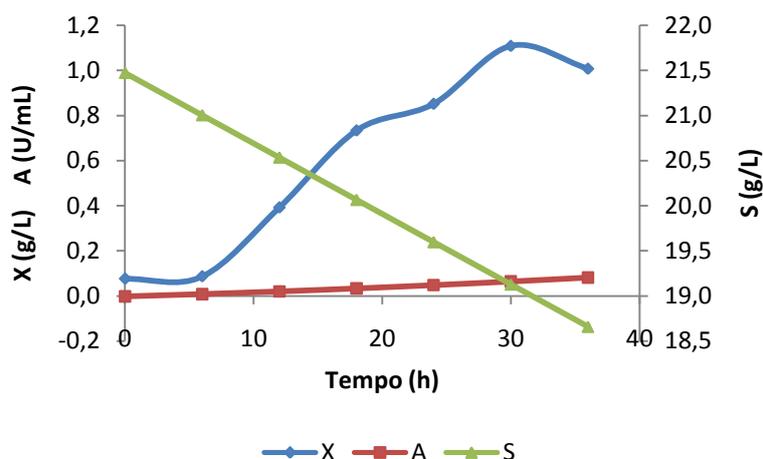


Figura 4.50 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M9 truncados em 36h de cultivo.

4.5.1 Modelos Monod-Aiba

Na figura 4.51 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M9, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

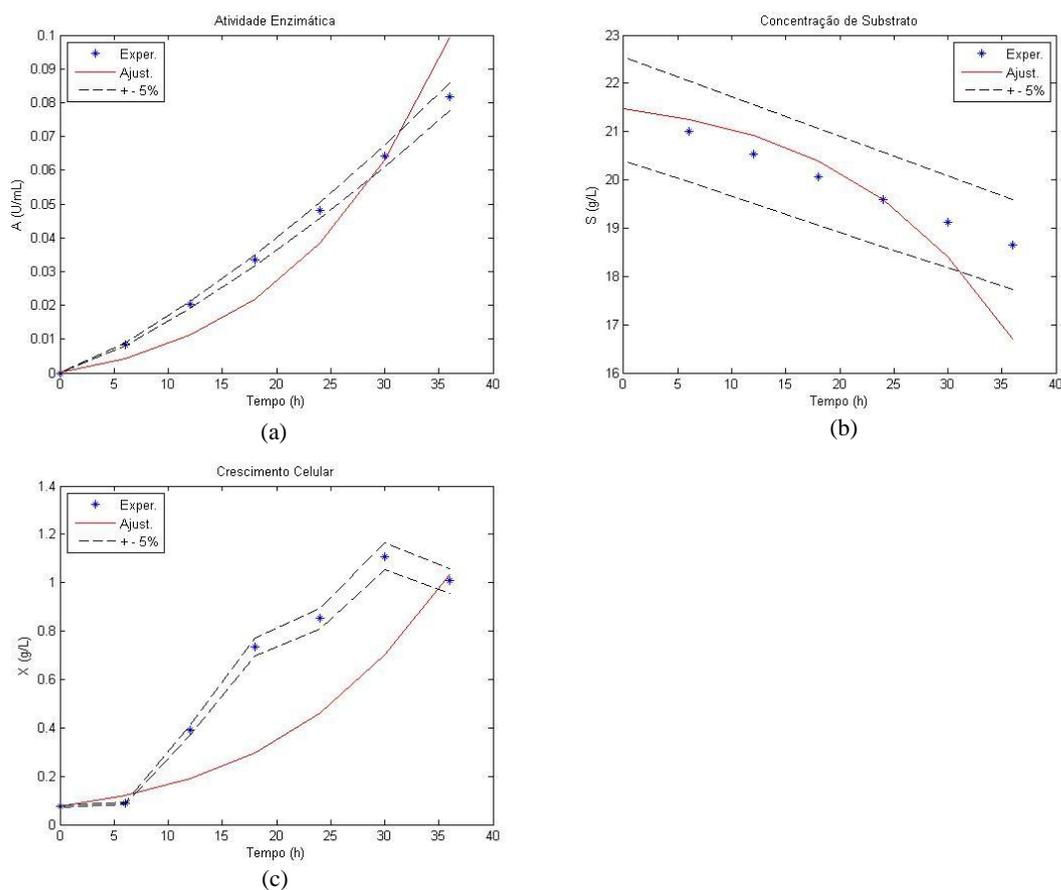


Figura 4.51 - Meio M9. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.5.2 Modelos Monod-Andrews

Na figura 4.52 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M9, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

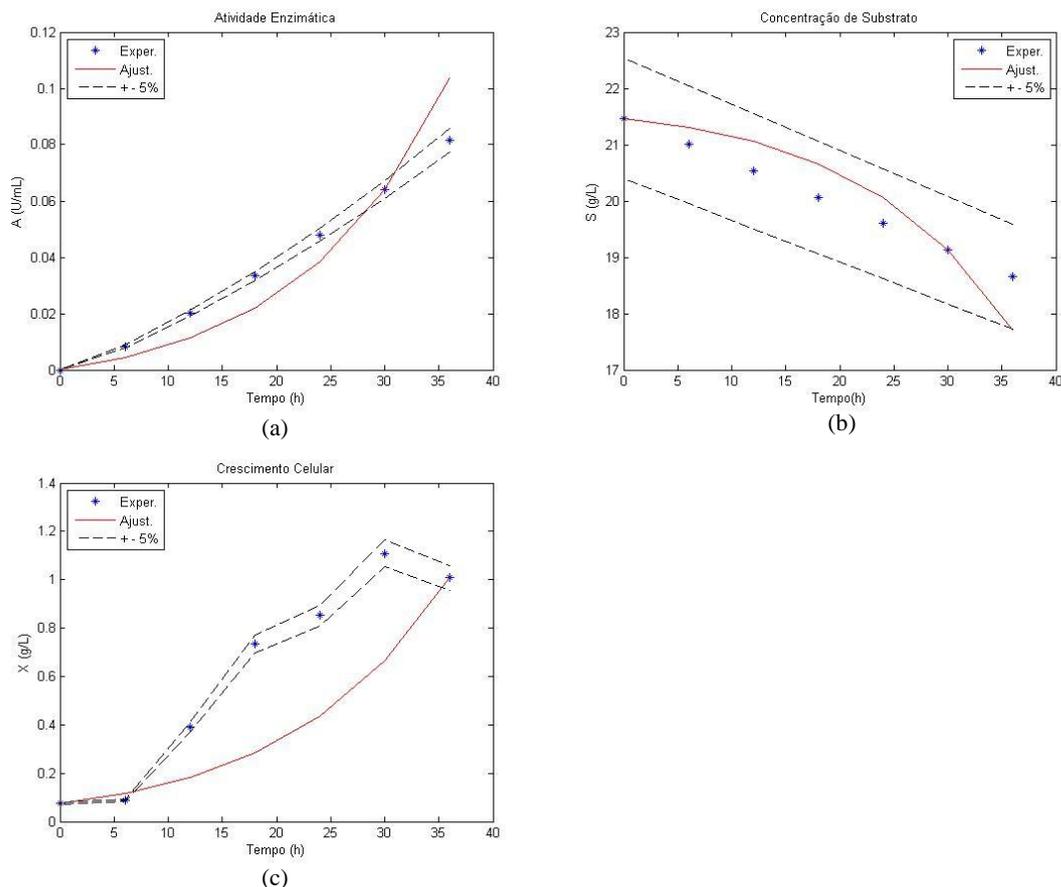


Figura 4.52 - Meio M9. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.5.3 Modelo Aiba

O modelo de Aiba não apresentou resultados satisfatórios para o meio M9, sendo as curvas ajustadas com comportamento distante dos dados experimentais e com o aparecimento de parâmetros negativos ou com valor zero.

4.5.4 Modelo Andrews

Na figura 4.53 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para os dados obtidos por Marques (2004) para o meio M9, com concentração inicial de substrato de 22 g/L, aplicando o modelo de Andrews para a concentração celular e para a atividade enzimática.

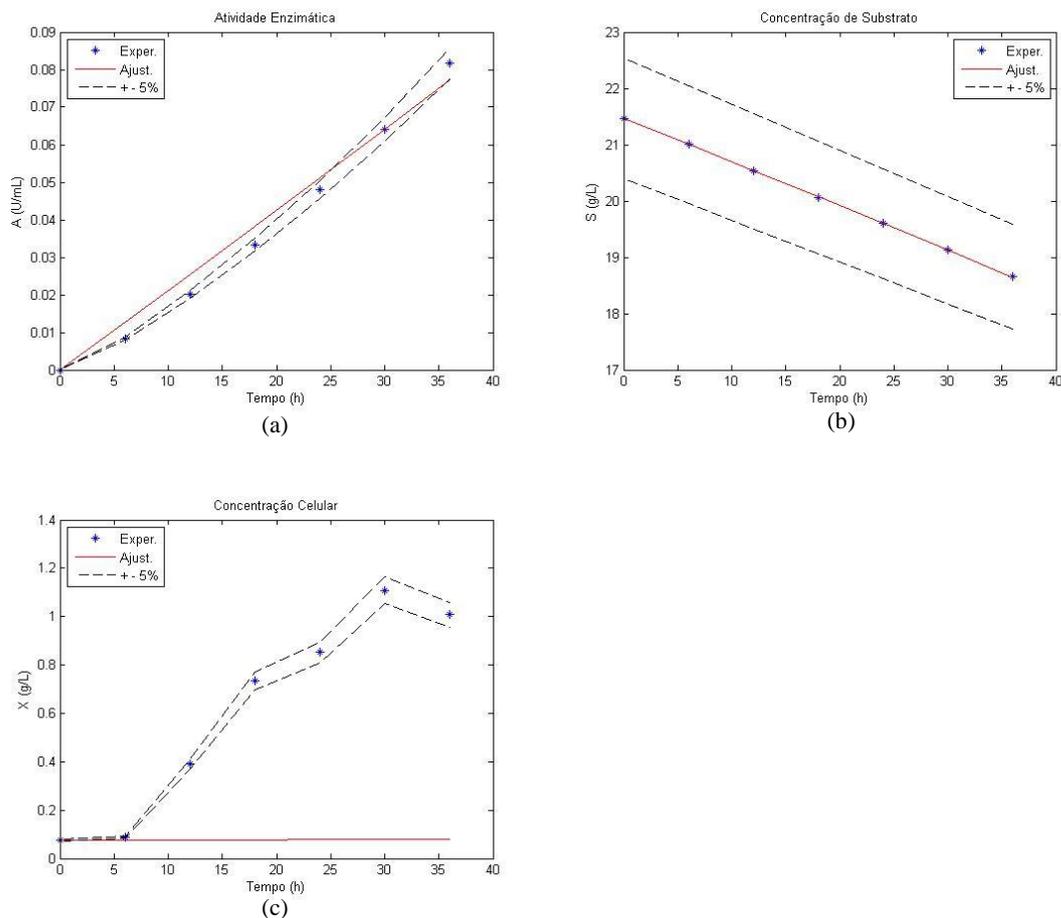


Figura 4.53 - Meio M9. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.10 são apresentados os parâmetros ajustados para o meio M9 segundo os modelos utilizados.

Tabela 4.10 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M9

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{\max}}$ (h^{-1})	0,1781	0,1128	-	0,1949
$\mu_{A_{\max}}$ ($U_{\text{enzima}} \cdot L / g_{\text{célula}} \cdot mL \cdot h$)	0,0166	0,0274	-	0,0373
$Y_{X/S}$ ($g_{\text{célula}} / g_{\text{substrato}}$)	0,4318	0,7111	-	0,0183
$Y_{A/S}$ ($U_{\text{enzima}} \cdot L / g_{\text{substrato}} \cdot mL$)	0,0391	0,0423	-	0,0287
K_{sx} (g/L)	98,9748	11,6563	-	0,0673
K_{is} (g/L)	-	-	-	0,0870
K_{sa} (g/L)	19,0086	14,3632	-	2,8084
K_{ia} (g/L)	135,0708	11,2619	-	97,2826

4.6 MEIO DE CULTURA M34

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio M34, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.6.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme a tabela 3.1, o meio M34 caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10,6g/L e com a utilização de 0,1% de K_2HPO_4 , com meio de cultivo de 125mL em erlenmeyer de 250mL, a atividade máxima obtida foi de 0,3613U/mL em 72h de cultivo, com concentração celular máxima de 1,0276g/L em 36h e concentração final de substrato em 4,191g/L em 84h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.13.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 36h (figura 4.54).

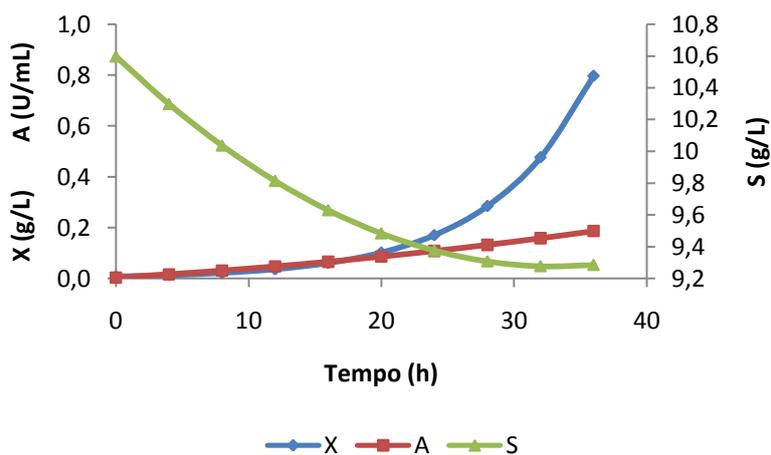


Figura 4.54 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M34 truncados em 36h de cultivo.

4.6.1 Modelos Monod-Aiba

Na figura 4.55 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M34, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

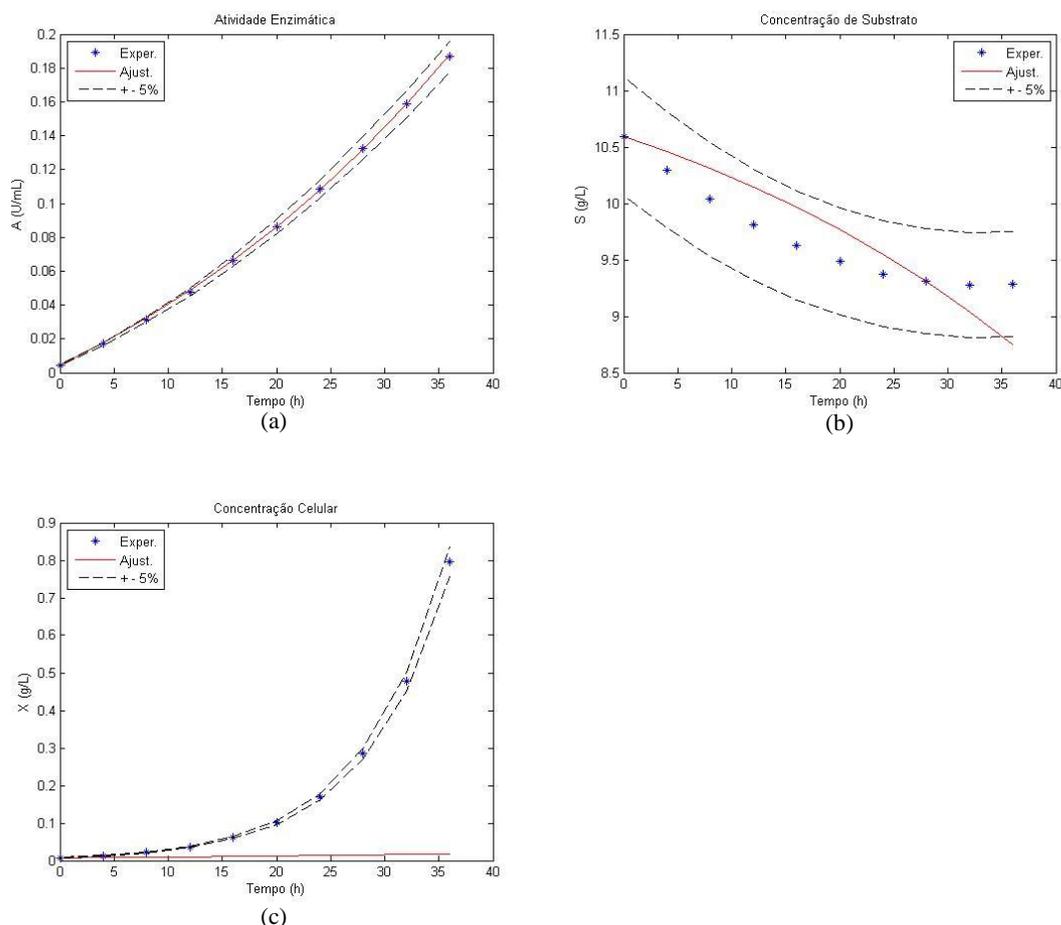


Figura 4.55 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.6.2 Modelos Monod-Andrews

Na figura 4.56 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M34, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

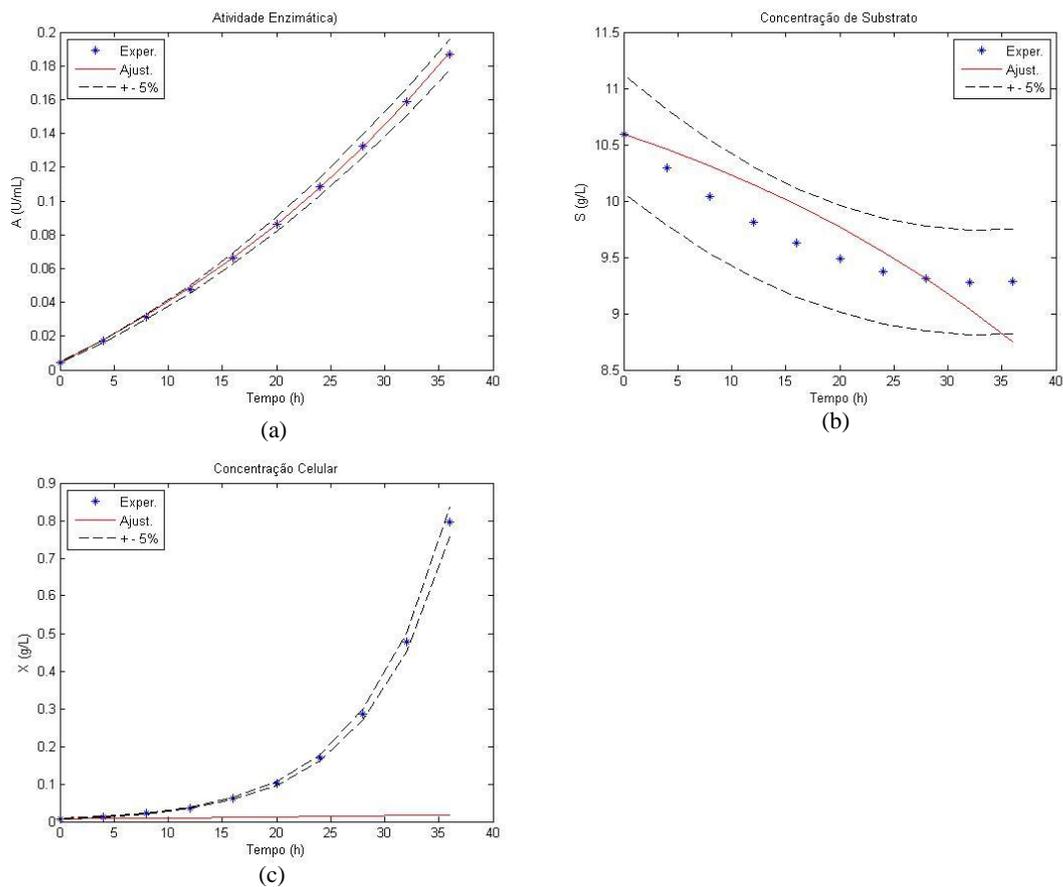


Figura 4.56 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.6.3 Modelo Aiba

Na figura 4.57 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M34, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Aiba.

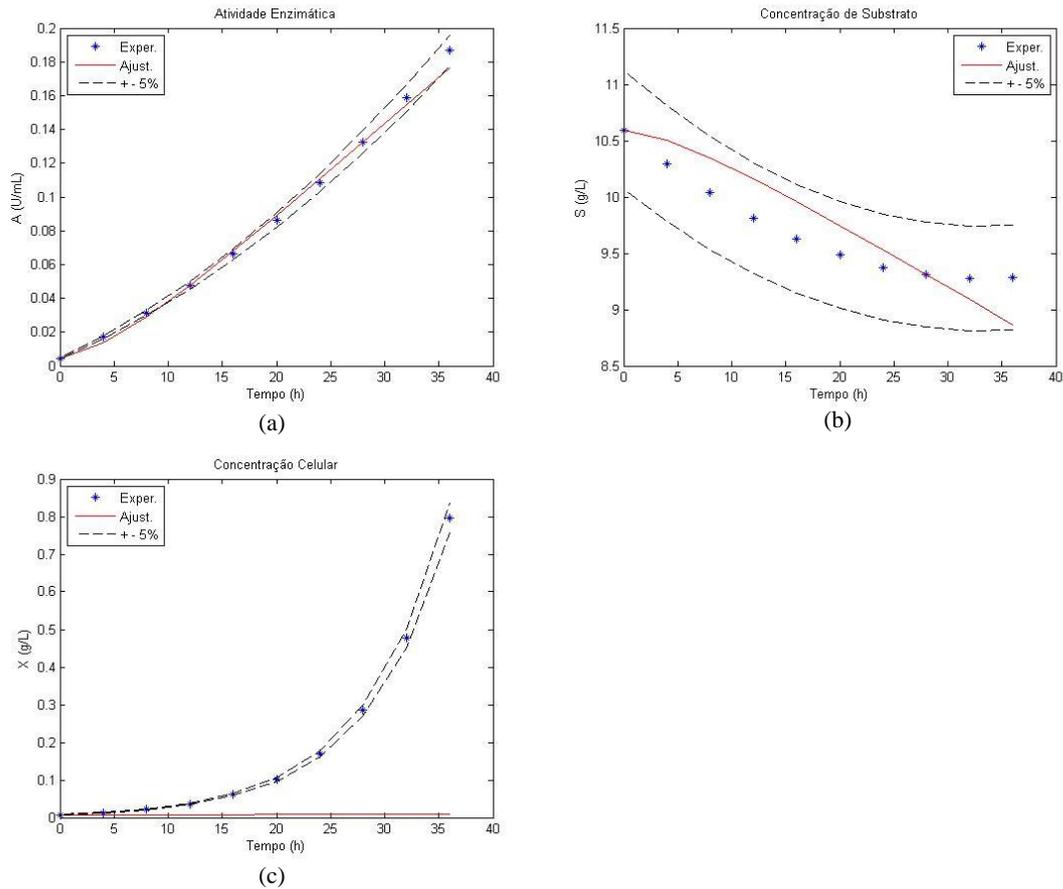
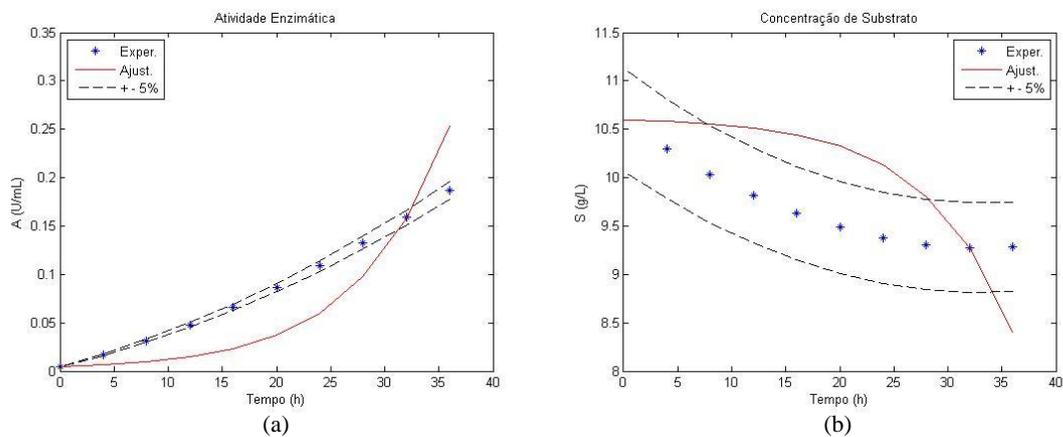


Figura 4.57 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.

4.6.4 Modelo Andrews

Na figura 4.58 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M34, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.



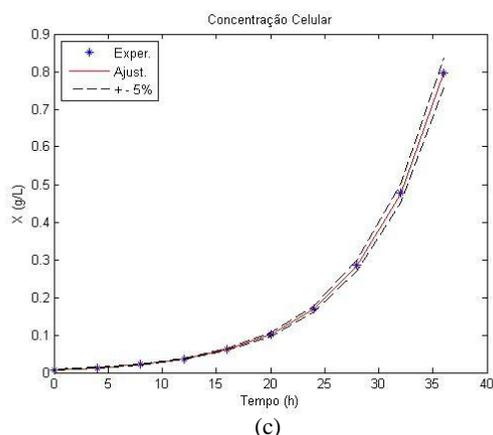


Figura 4.58 - Meio M34. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.11 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio M34, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.11 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M34

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
μ_{Xmax} (h^{-1})	0,0240	0,0236	0,1621	0,1409
μ_{Amax} ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,4750	0,5269	0,3887	0,4975
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,1130	0,1753	0,1248	0,5617
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,1045	0,1025	0,0997	0,3168
K_{sx} (g/L)	0,9040	0,0938	1,0244	0,1068
K_{is} (g/L)	-	-	6,7369	117,7892
K_{sa} (g/L)	0,0523	0,1100	0,0149	102,1947
K_{ia} (g/L)	72,3878	37,9889	0,4519	55,3718

4.7 MEIO DE CULTURA M56

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio M56, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações

diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.7.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme a tabela 3.1, o meio M56 caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10,4g/L e com a utilização de 0,5% de K_2HPO_4 , com meio de cultivo de 125mL em erlenmeyer de 250mL, a atividade máxima obtida foi de 0,1913U/mL em 72h de cultivo, com concentração celular máxima de 1,496g/L em 84h e concentração final de substrato em 4,846g/L em 84h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.17.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 36h (figura 4.59).

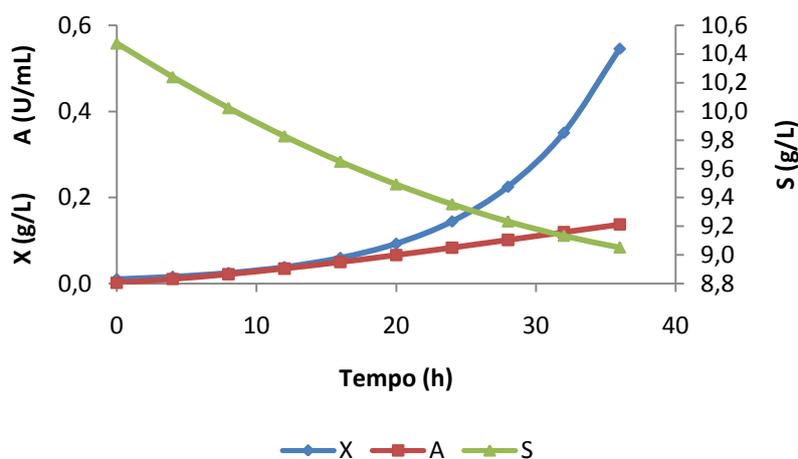


Figura 4.59 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio M56 truncados em 36h de cultivo.

4.7.1 Modelos Monod-Aiba

Na figura 4.60 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M56, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

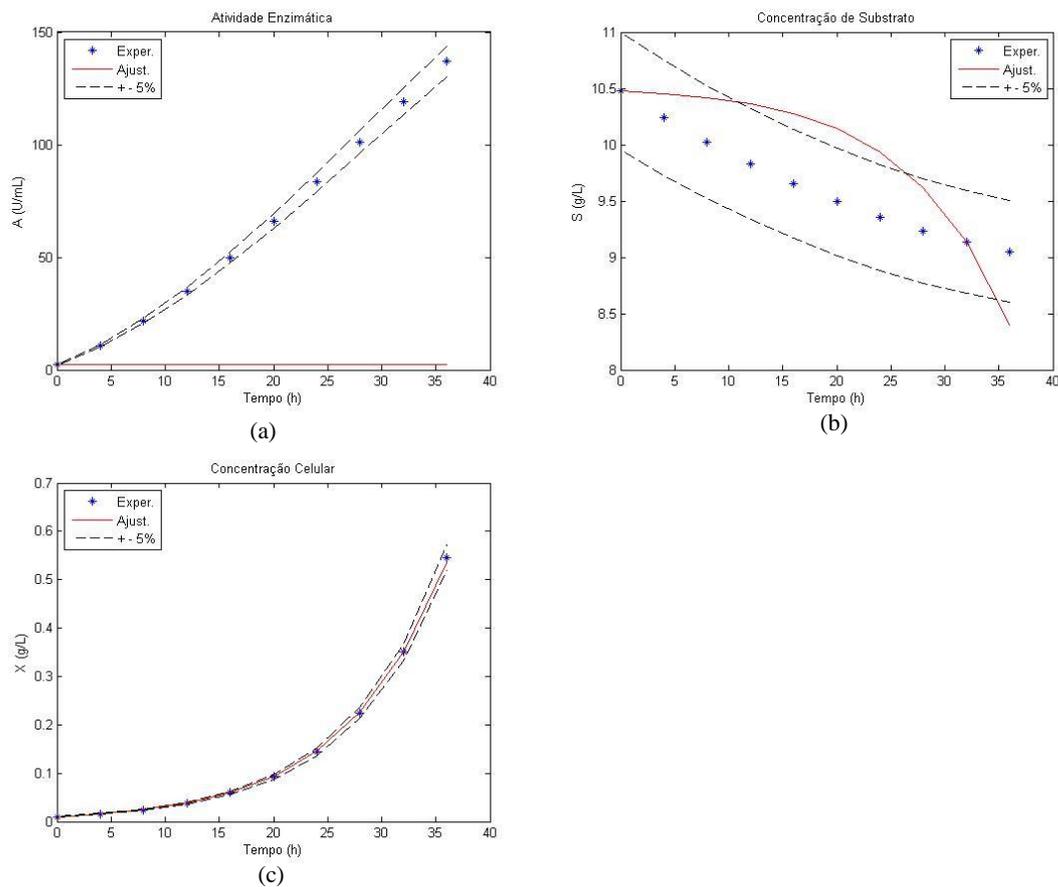


Figura 4.60 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.7.2 Modelos Monod-Andrews

Na figura 4.61 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M56, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

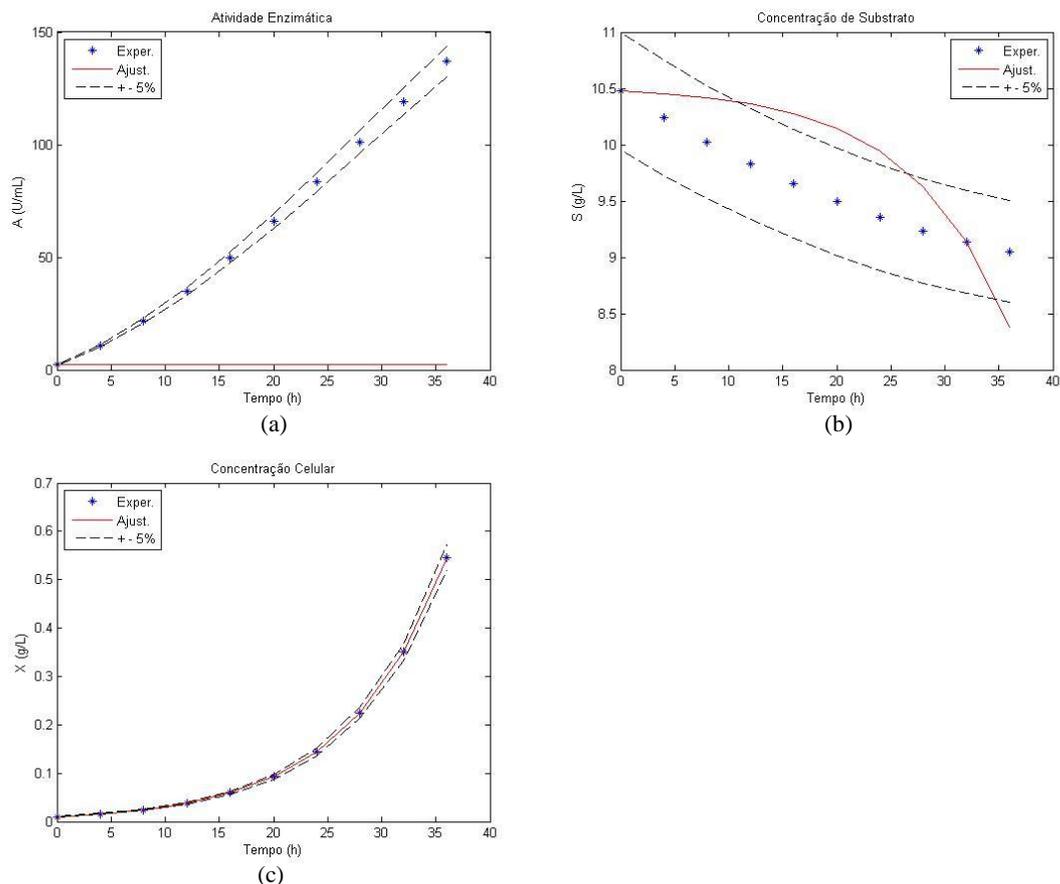
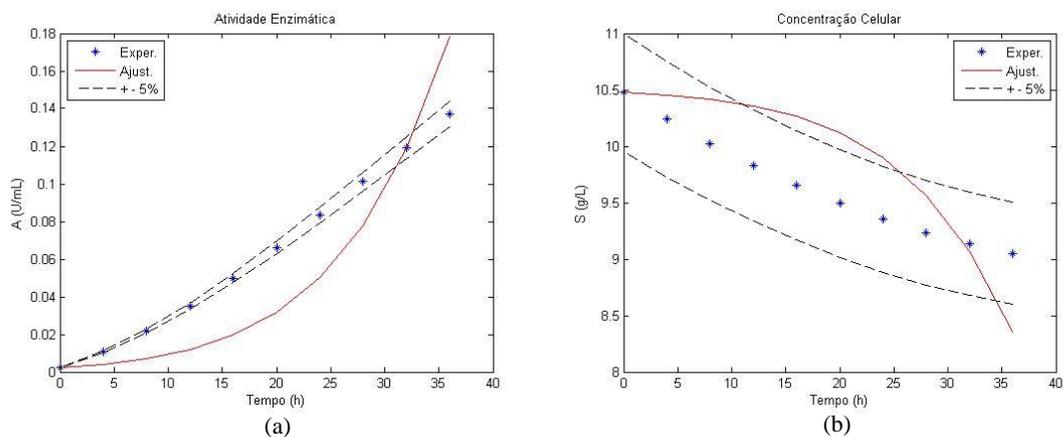


Figura 4.61 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.7.3 Modelo Aiba

Na figura 4.62 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M56, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Aiba.



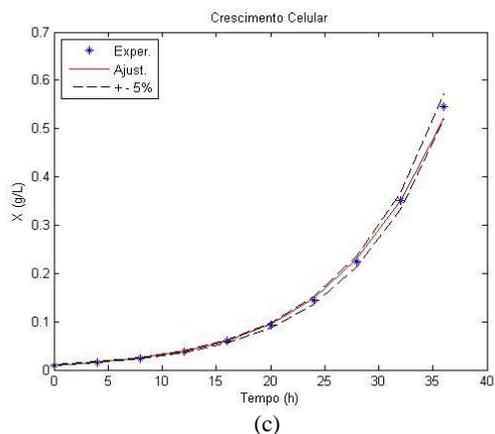
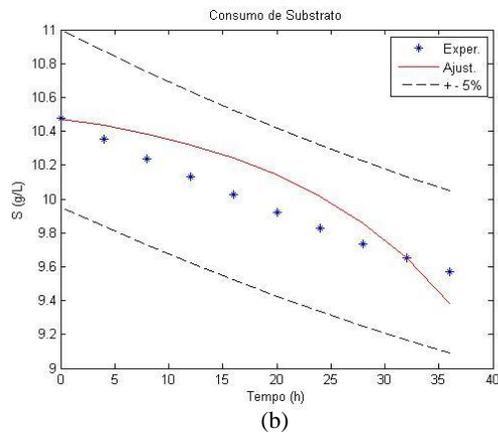
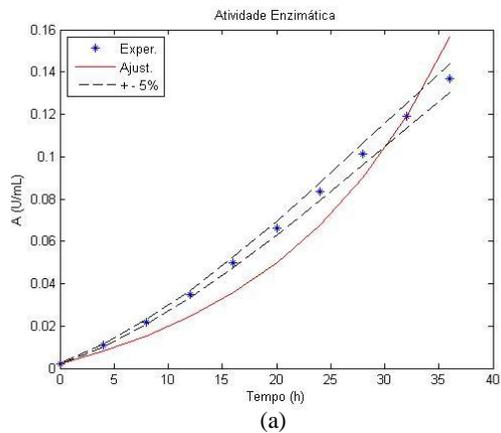


Figura 4.62 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.

4.7.4 Modelo Andrews

Na figura 4.63 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio M56, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.



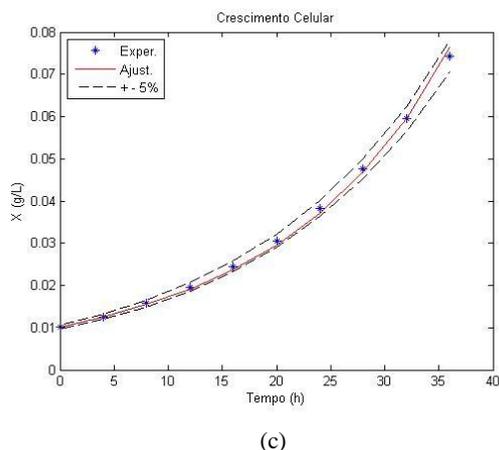


Figura 4.63 - Meio M56. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.12 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio M56, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.12 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura M56

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{max}}$ (h^{-1})	0,1478	0,1121	0,2002	0,2453
$\mu_{A_{max}}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,0391	0,0694	0,0416	0,3787
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,2737	0,4115	0,2541	0,2009
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,1346	0,1811	1,7115	0,2023
K_{sx} (g/L)	3,3827	0,1243	0,0001	-21,4751
K_{is} (g/L)	-	-	1,7281	1,8362
K_{sa} (g/L)	33,8165	12,2976	2,3950	0,0443
K_{ia} (g/L)	13,6905	316,9630	1,0444	5,5203

4.8 MEIO DE CULTURA E3A

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio E3A, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de

ajuste, sendo apresentados também, no item 4.8.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme apresentado na tabela 3.2, o meio E3A caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10g/L e com pH inicial de 10,5 e pH final de 9,1, com meio de cultivo de 500mL em erlenmeyer de 2L, a atividade máxima obtida foi de 0,1392U/mL em 48h de cultivo, com concentração celular máxima de 1,782g/L em 24h e concentração final de substrato em 0,276g/L em 56h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.21.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 36h (figura 4.64).

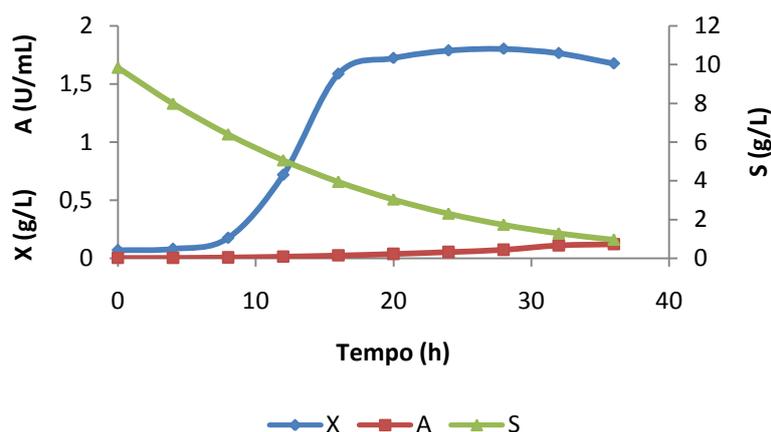


Figura 4.64 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E3A truncados em 36h de cultivo.

4.8.1 Modelo Monod-Aiba

Na figura 4.65 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3A, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

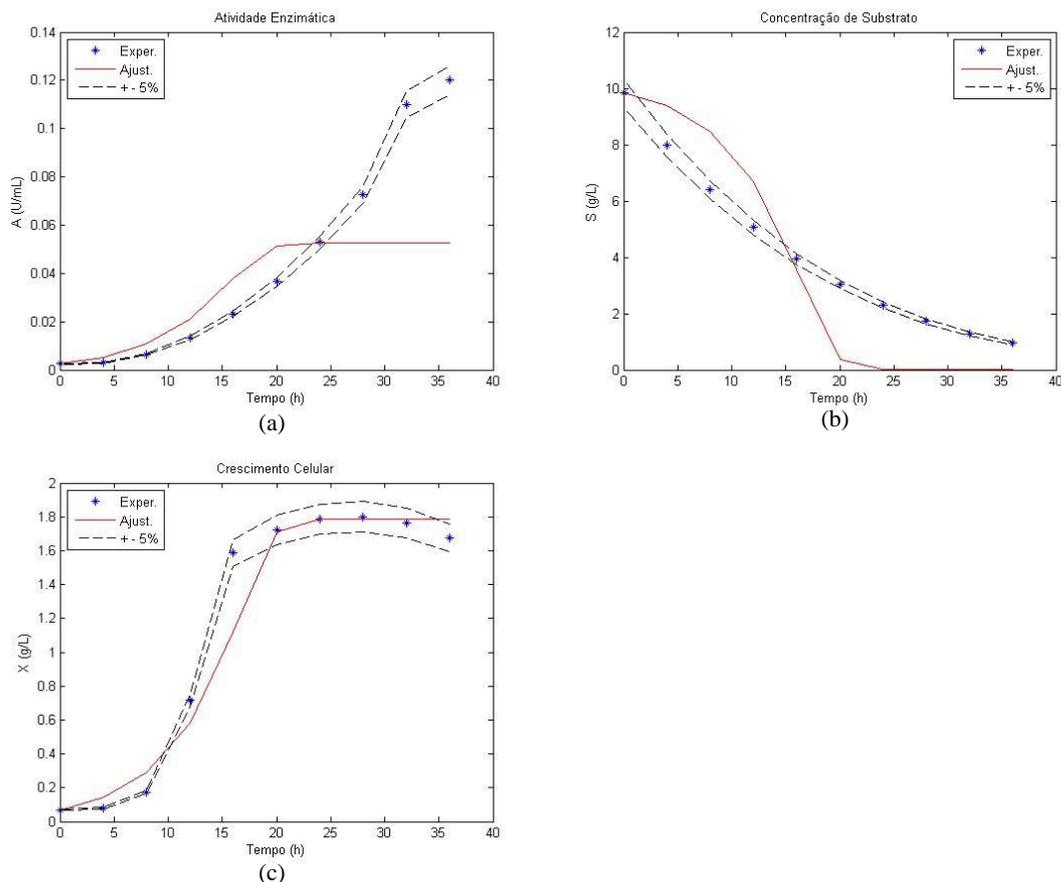


Figura 4.65 - Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.8.2 Modelo Monod-Andrews

Na figura 4.66 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3A, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

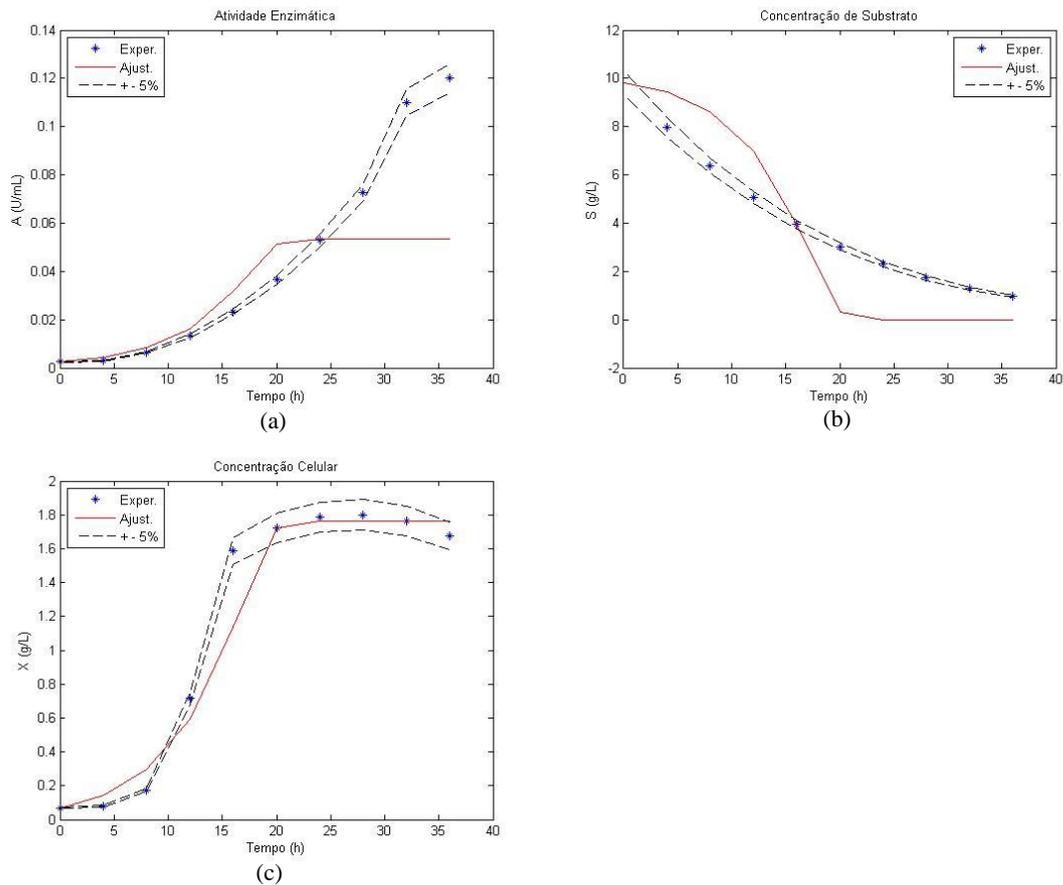
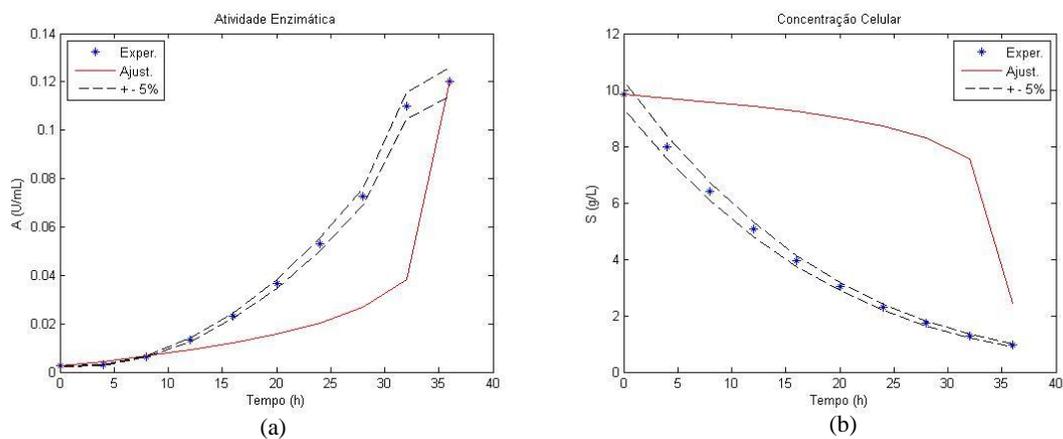


Figura 4.66 - Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.8.3 Modelo Aiba

Na figura 4.67 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3A, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Aiba.



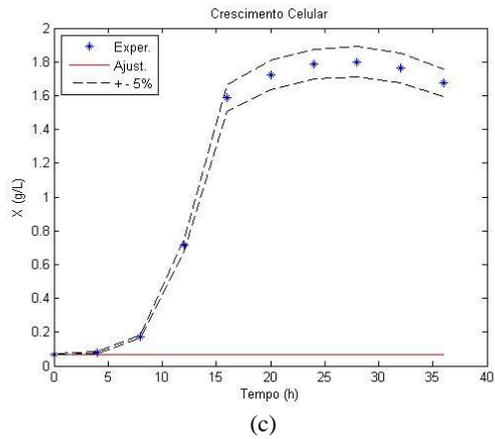
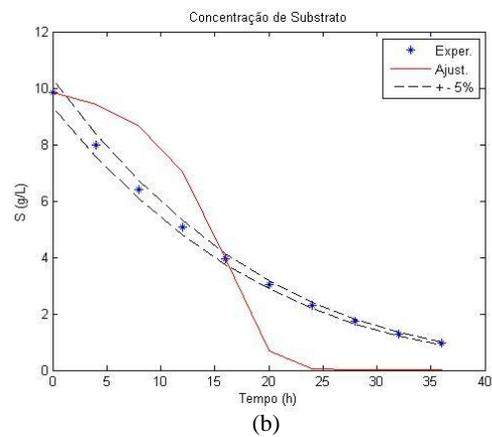
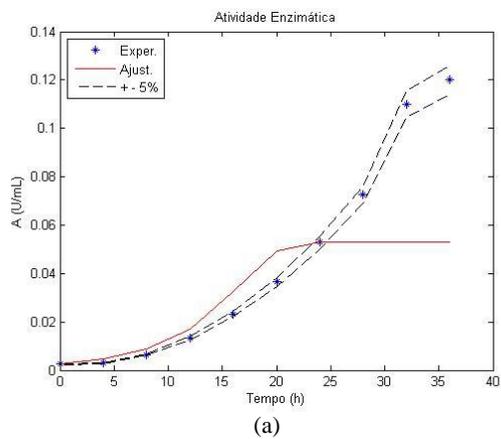
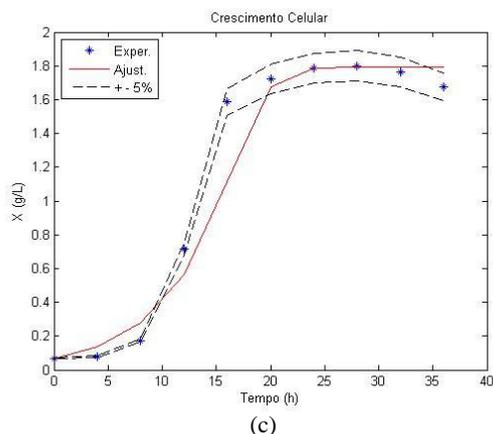


Figura 4.67- Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.

4.8.4 Modelo Andrews

Na figura 4.68 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3A, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.





(c)
 Figura 4.68 - Meio E3A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.13 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio E3A, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.13- Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E3A

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
μ_{Xmax} (h^{-1})	0,2060	0,2158	0,2865	0,4874
μ_{Amax} ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,0106	0,0057	0,0107	0,0110
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,2502	0,3902	0,5358	0,4746
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,0169	0,0093	0,0159	0,0082
K_{sx} (g/L)	1,3602	1,7802	0,6721	6,9296
K_{is} (g/L)	-	-	5,9086	8,9850
K_{sa} (g/L)	4,1998	0,9192	1,9099	4,7830
K_{ia} (g/L)	25,0268	84,3935	0,0001	14,5434

4.9 MEIO DE CULTURA E3B

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio E3B, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de

ajuste, sendo apresentados também, no item 4.9.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme apresentado na tabela 3.2, o meio E3B caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10g/L e com pH inicial de 10,5 e pH final de 8,9, com meio de cultivo de 1L em erlenmeyer de 2L, a atividade máxima obtida foi de 0,1096U/mL em 48h de cultivo, com concentração celular máxima de 1,614g/L em 32h e concentração final de substrato em 0,504g/L em 56h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.25.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 24h (figura 4.69).

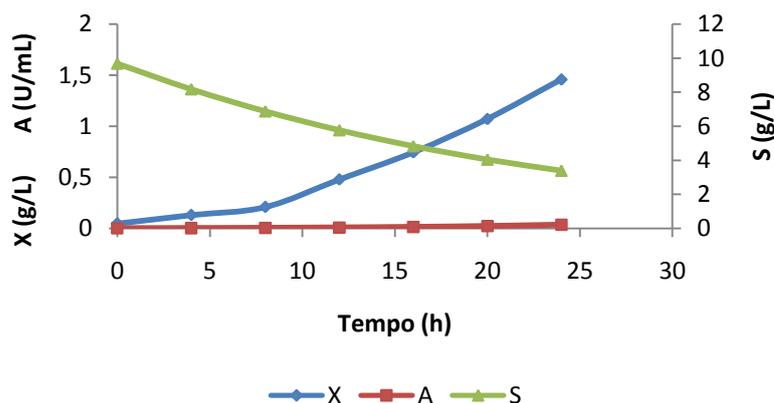


Figura 4.69 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E3B truncados em 24h de cultivo.

4.9.1 Modelo Monod-Aiba

Na figura 4.70 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3B, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

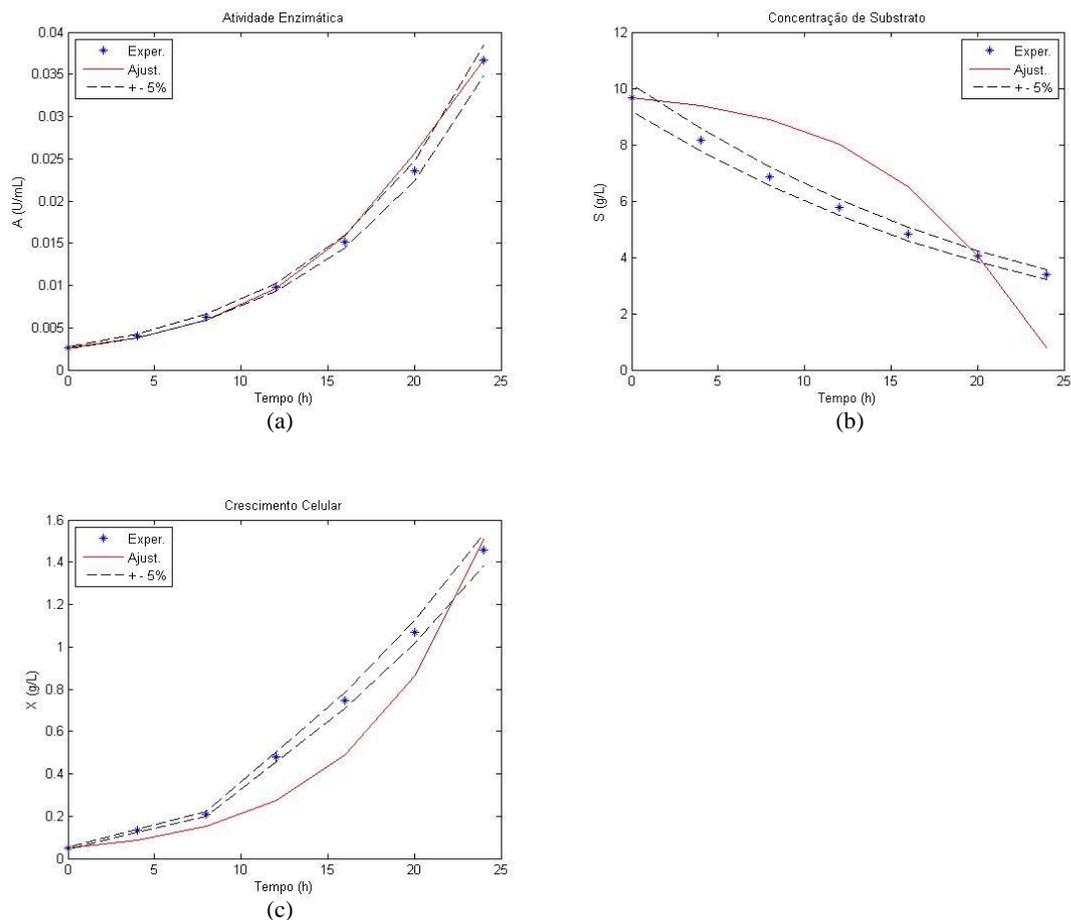


Figura 4.70 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.9.2 Modelo Monod-Andrews

Na figura 4.71 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3B, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

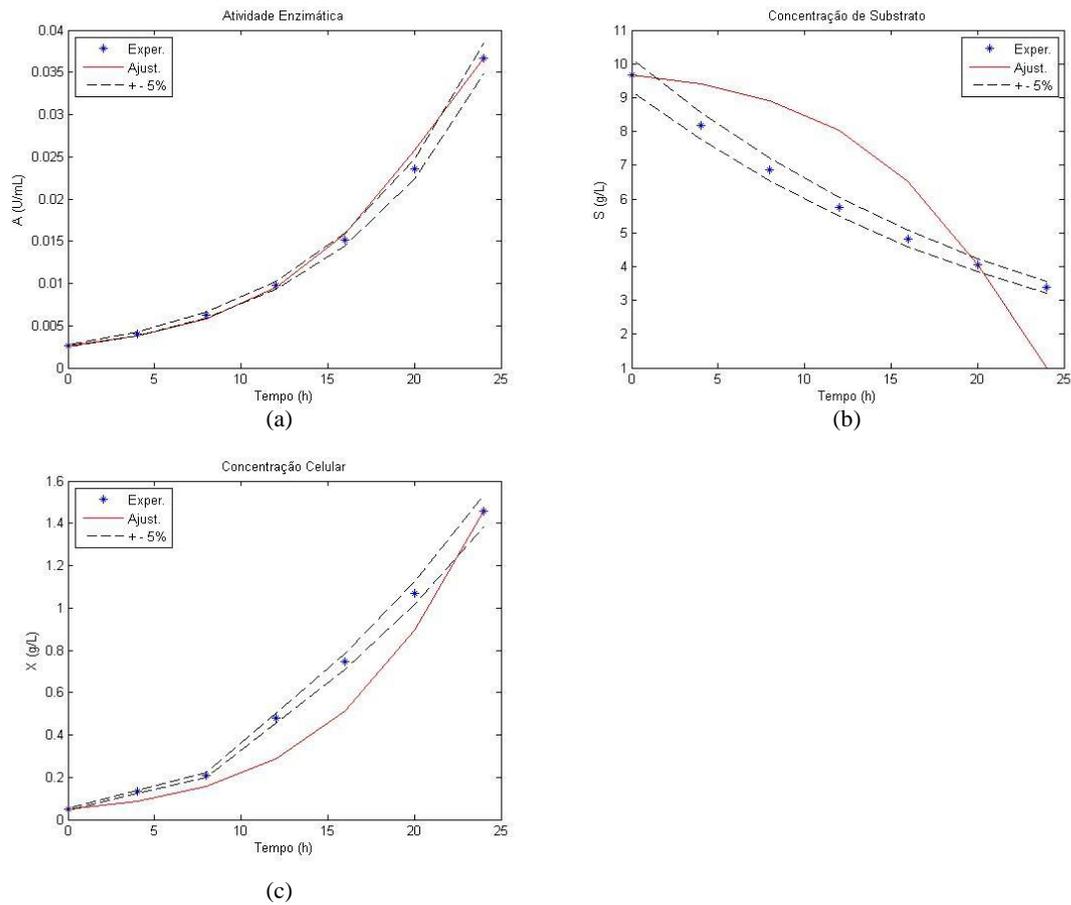
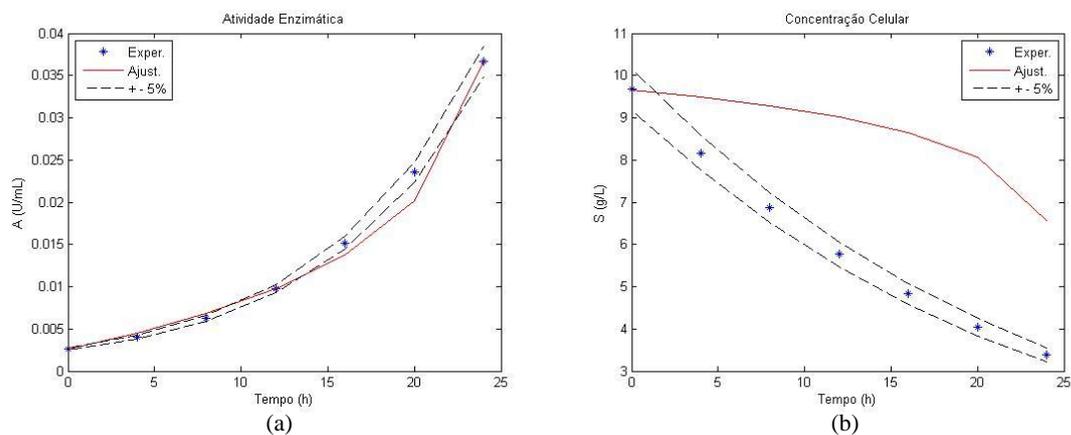


Figura 4.71 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.9.3 Modelo Aiba

Na figura 4.72 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3B, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Aiba.



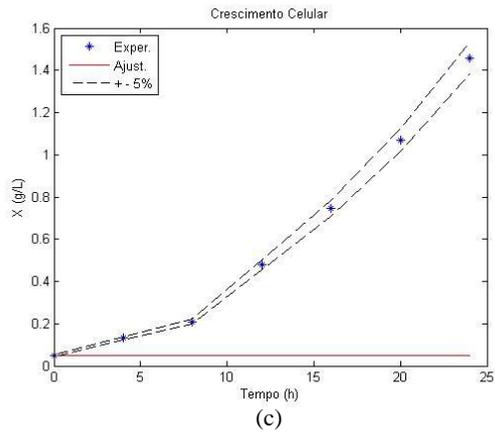
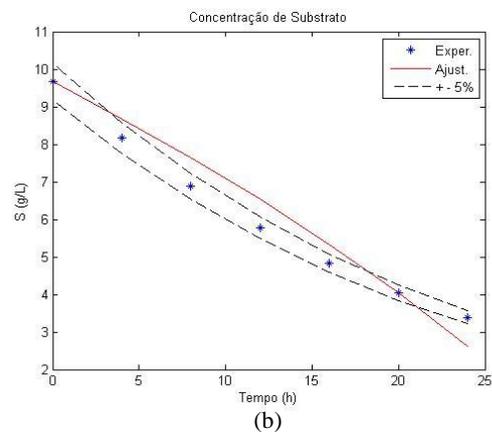
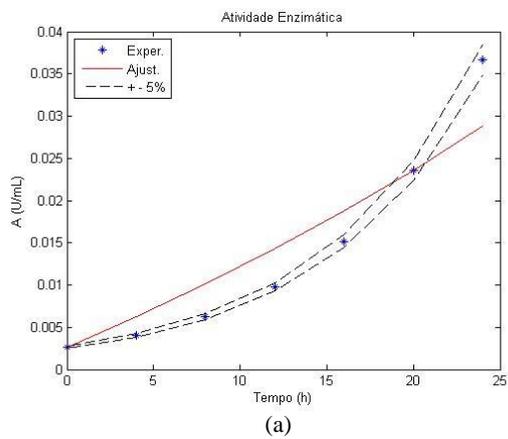


Figura 4.72 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Aiba.

4.9.4 Modelo Andrews

Na figura 4.73 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E3B, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.



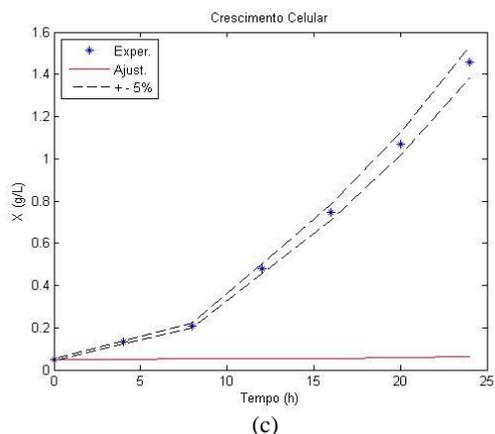


Figura 4.73 - Meio E3B. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.14 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio E3B, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.14 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E3B

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
μ_{Xmax} (h^{-1})	0,1455	0,1592	0,1636	0,1353
μ_{Amax} ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,0065	0,0069	0,0102	0,0251
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,4328	0,4125	0,3521	0,4156
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,0062	0,0065	0,0110	0,0037
K_{sx} (g/L)	0,0806	0,6981	0,8690	1,4954
K_{is} (g/L)	-	-	0,5761	0,5058
K_{sa} (g/L)	2,6243	4,4299	0,2324	0,0691
K_{ia} (g/L)	27,6209	82,6400	0,0001	27,1099

4.10 MEIO DE CULTURA E5A

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB®, com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio E5A, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de

ajuste, sendo apresentados também, no item 4.10.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme apresentado na tabela 3.2, o meio E5A caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10g/L e com pH inicial de 10,5 e pH final de 9,4, com meio de cultivo de 500mL em erlenmeyer de 2L, a atividade máxima obtida foi de 0,54U/mL em 56h de cultivo, com concentração celular máxima de 0,8604g/L em 48h e concentração final de substrato em 2,2469g/L em 56h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como é apresentado na figura 4.29.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 24h (figura 4.74).

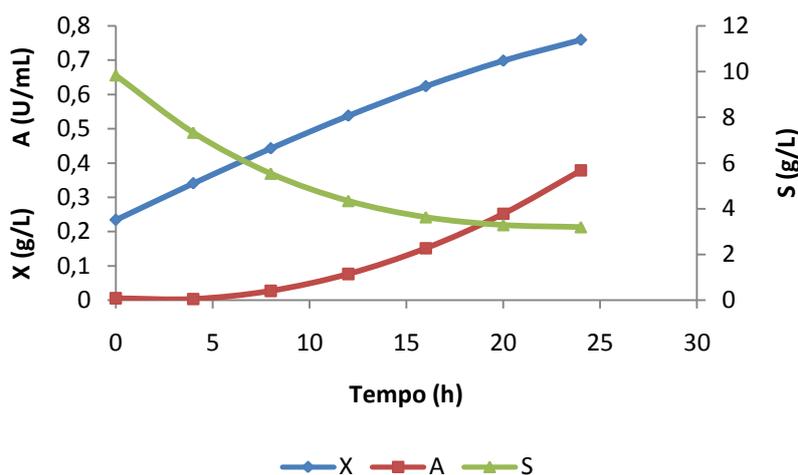


Figura 4.74 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E5A truncados em 24h de cultivo.

4.10.1 Modelo Monod-Aiba

Na figura 4.75 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E5A, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

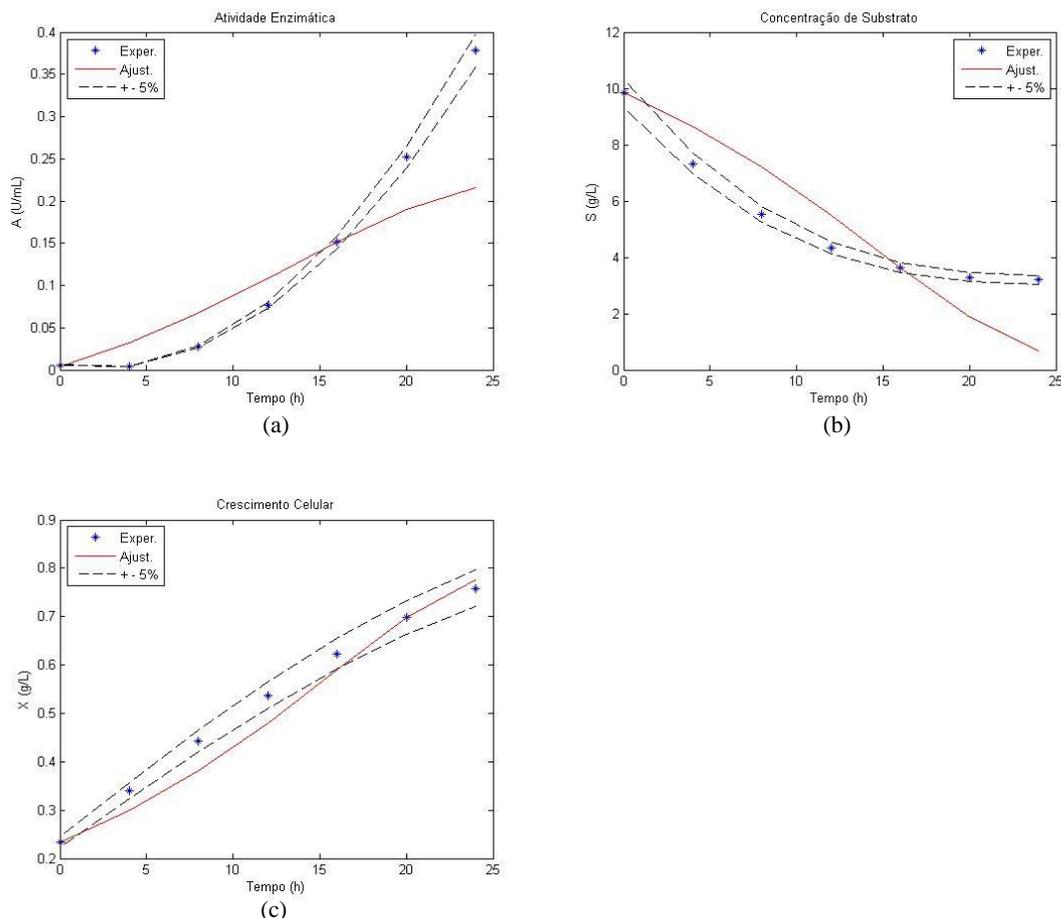


Figura 4.75 - Meio E5A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.10.2 Modelo Monod-Andrews

Na figura 4.76 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E5A, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

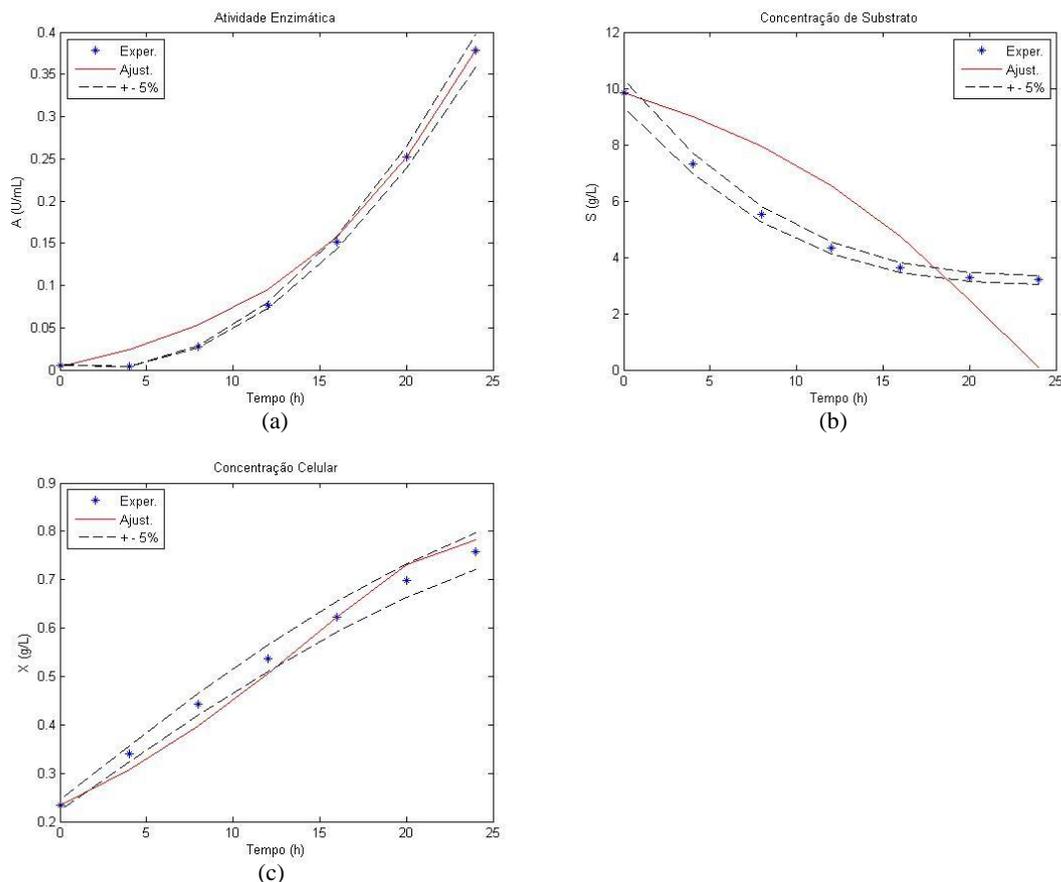


Figura 4.76 - Meio E5A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.10.3 Modelo Aiba

O modelo de Aiba não apresentou resultados satisfatórios para o meio E5A, sendo as curvas ajustadas com comportamento distante dos dados experimentais e com o aparecimento de parâmetros negativos ou com valor zero.

4.10.4 Modelo Andrews

Na figura 4.77 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E5A, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.

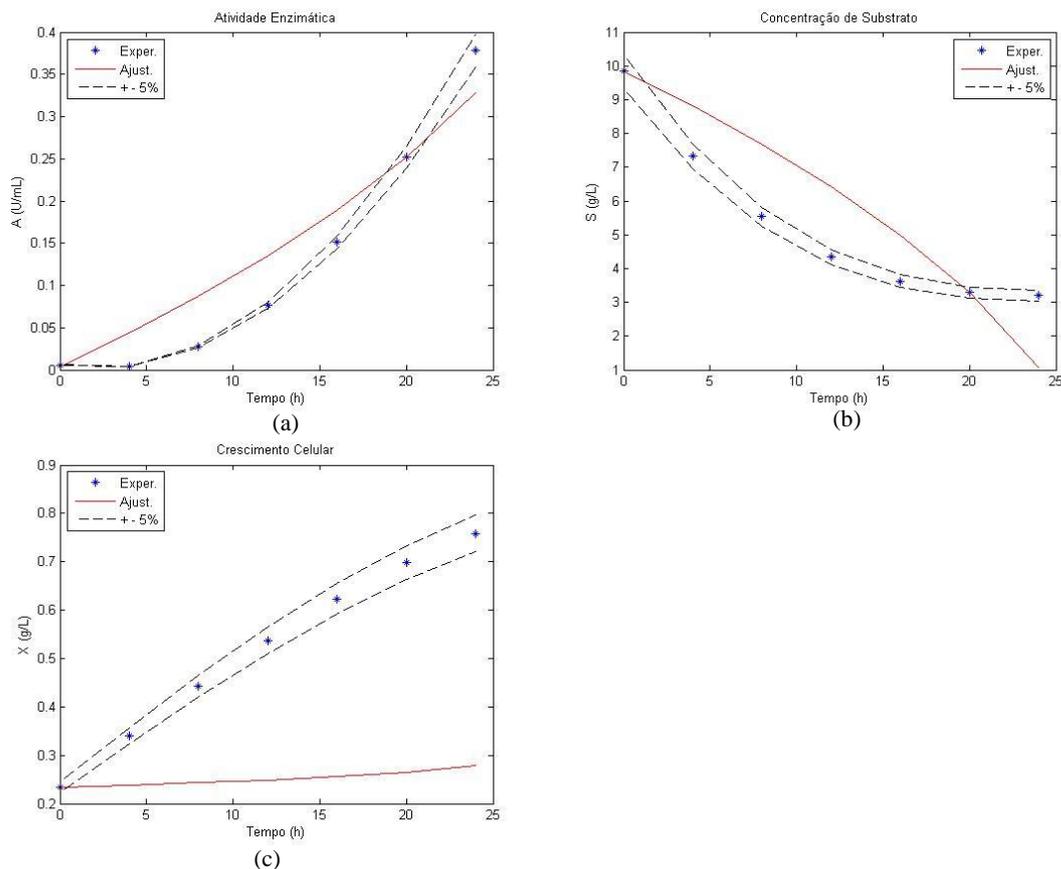


Figura 4.77 - Meio E5A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.15 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio E5A, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.15 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E5A

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{\max}}$ (h^{-1})	0,0776	0,1174	-	0,0367
$\mu_{A_{\max}}$ ($U_{\text{enzima}} \cdot L / g_{\text{célula}} \cdot mL \cdot h$)	0,0433	0,0770	-	0,0967
$Y_{X/S}$ ($g_{\text{célula}} / g_{\text{substrato}}$)	0,1326	0,1492	-	0,0255
$Y_{A/S}$ ($U_{\text{enzima}} \cdot L / g_{\text{substrato}} \cdot mL$)	0,0420	0,0617	-	0,0464
K_{sx} (g/L)	2,2792	6,9355	-	0,1158
K_{is} (g/L)	-	-	-	1,3014
K_{sa} (g/L)	3,6880	0,3322	-	0,1561
K_{ia} (g/L)	10,5873	3,1807	-	7,3436

4.11 MEIO DE CULTURA E5F

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio E5F, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.11.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme apresentado na tabela 3.2, o meio E5F caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10g/L e com pH inicial de 10,5 e pH final de 10,4, com meio de cultivo de 1L em fermentador de bancada de 1,5L, a atividade máxima obtida foi de 0,2664U/mL em 56h de cultivo, com concentração celular máxima de 0,8761g/L em 24h e concentração final de substrato em 4,1041g/L em 56h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.33.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 24h (figura 4.78).

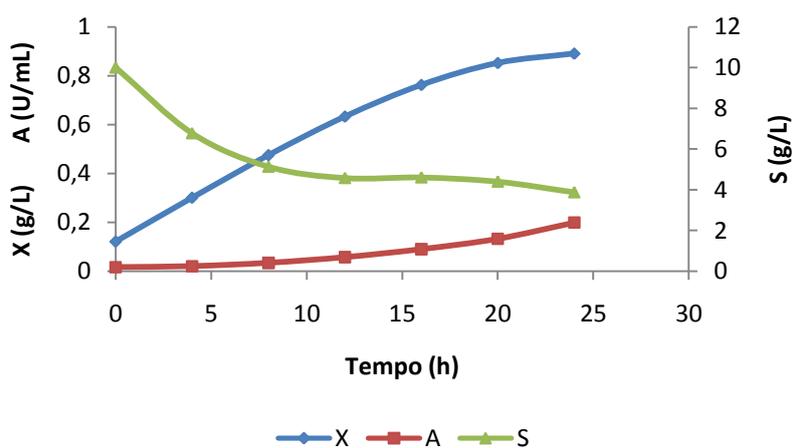


Figura 4.78 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E5F truncados em 24h de cultivo.

4.11.1 Modelo Monod-Aiba

Na figura 4.79 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E5F, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

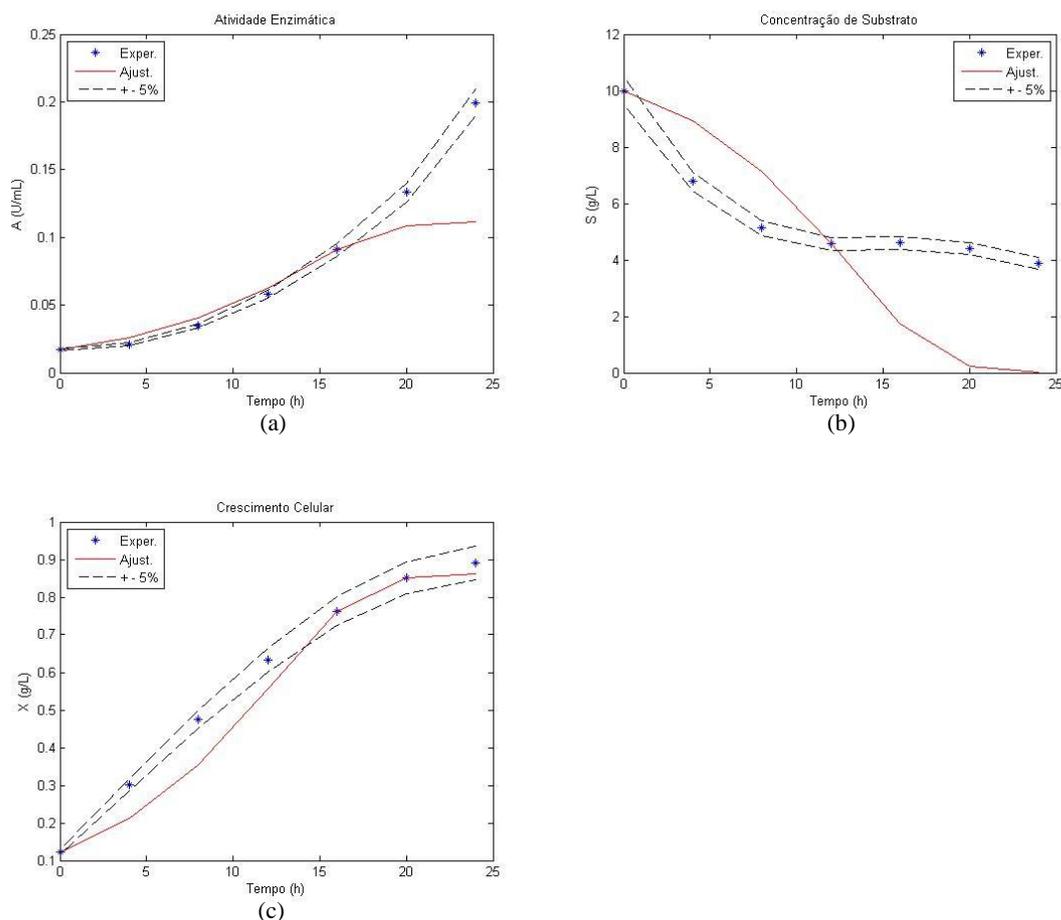


Figura 4.79 - Meio E5F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.11.2 Modelo Monod-Andrews

Na figura 4.80 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E5F, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

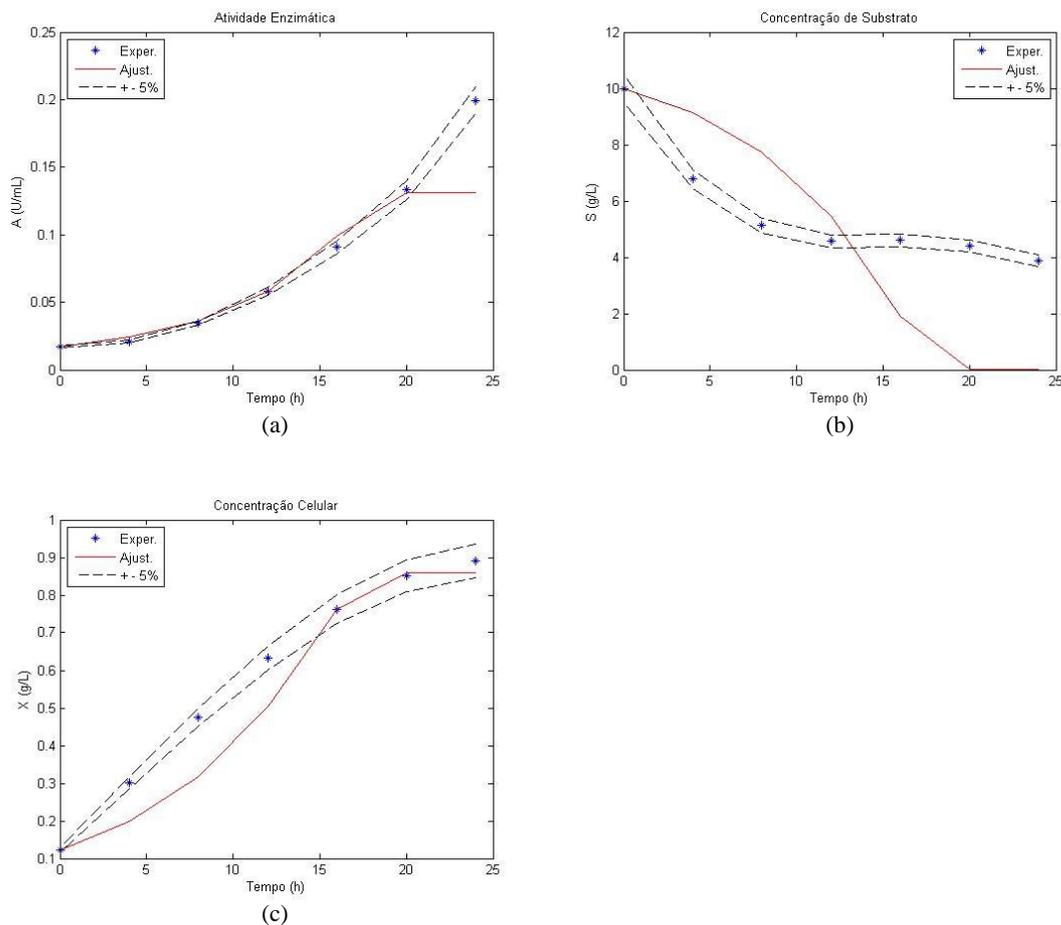


Figura 4.80 - Meio E5F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.11.3 Modelo Aiba

O modelo de Aiba não apresentou resultados satisfatórios para o meio E5F, sendo as curvas ajustadas com comportamento distante dos dados experimentais e com o aparecimento de parâmetros negativos ou com valor zero.

4.11.4 Modelo Andrews

Na figura 4.81 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E5F, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.

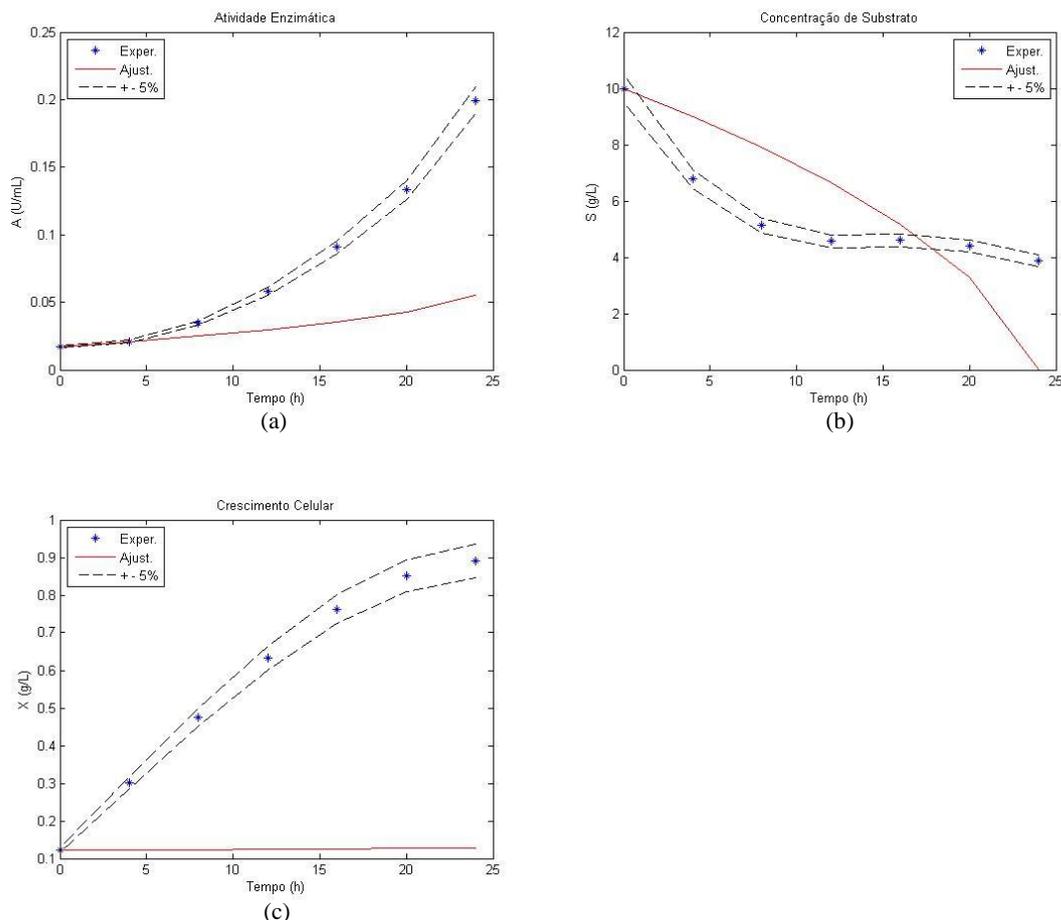


Figura 4.81 - Meio E5F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.16 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio E5F, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.16 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E5F.

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{max}}$ (h^{-1})	0,2104	0,1332	-	0,1454
$\mu_{A_{max}}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,0228	0,0237	-	0,0479
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,1312	0,1219	-	0,0342
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,0216	0,0288	-	0,0039
K_{sx} (g/L)	5,0626	1,0145	-	42,9292
K_{is} (g/L)	-	-	-	0,0961
K_{sa} (g/L)	0,8951	0,1257	-	0,0029
K_{ia} (g/L)	1,9908	8,6779	-	1,8216

4.12 MEIO DE CULTURA E6A

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio E6A, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.12.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme apresentado na tabela 3.2, o meio E6A caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10g/L e com pH inicial de 10,8 e pH final de 9,5, com meio de cultivo de 500mL em erlenmeyer de 2L, a atividade máxima obtida foi de 0,5334U/mL em 56h de cultivo, com concentração celular máxima de 0,8249g/L em 24h e concentração final de substrato em 2,9118g/L em 56h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.33.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 24h (figura 4.82).

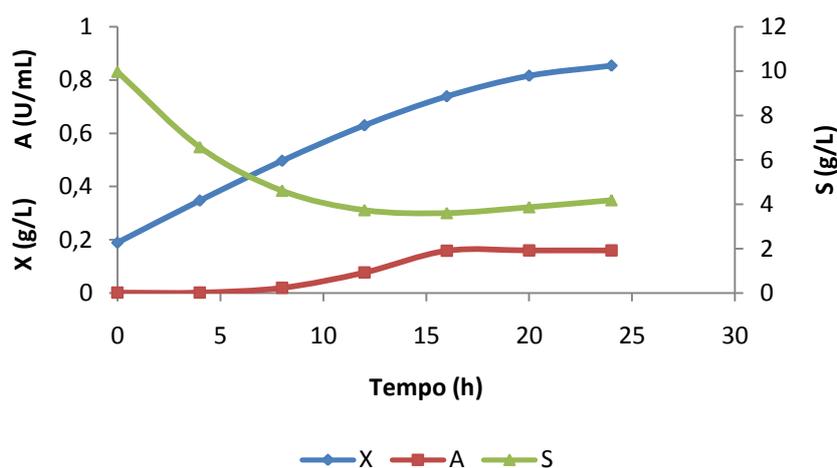


Figura 4.82 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E6A truncados em 24h de cultivo.

4.12.1 Modelo Monod-Aiba

Na figura 4.83 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E6A, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

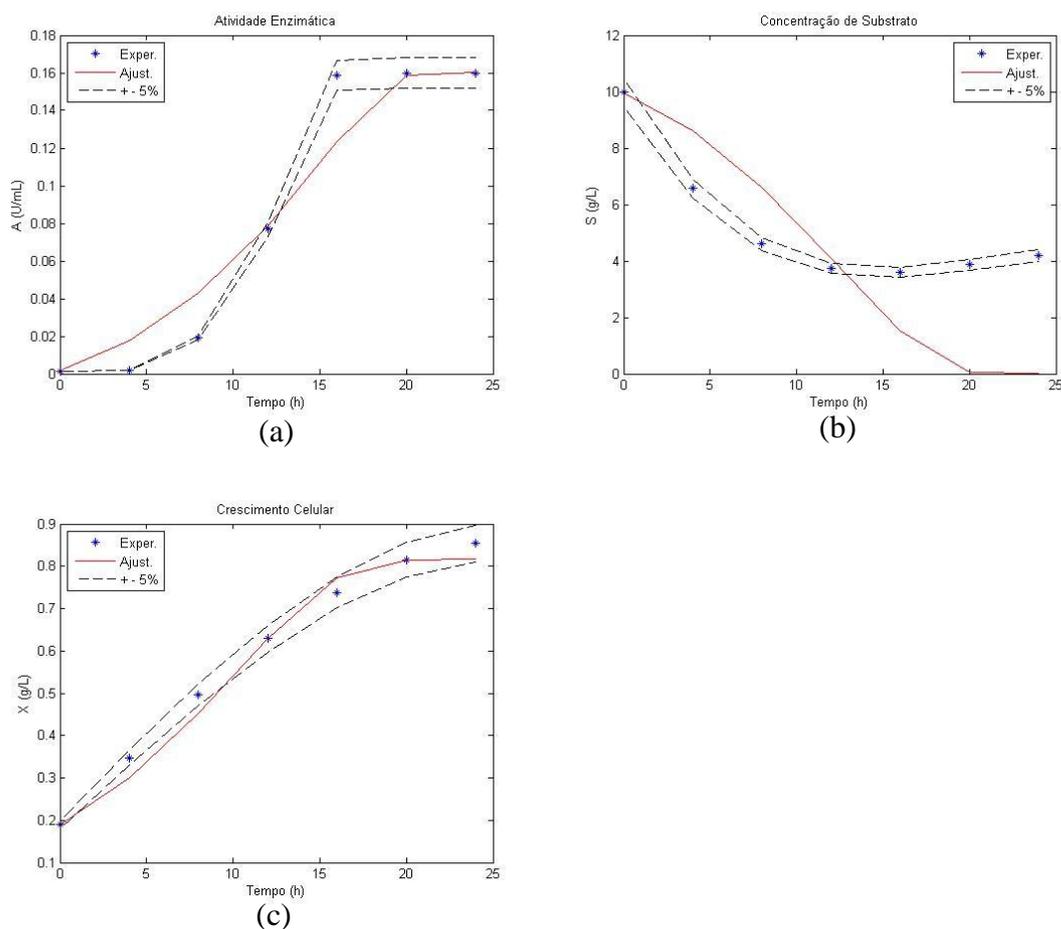


Figura 4.83 - Meio E6A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.12.2 Modelo Monod-Andrews

Na figura 4.84 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E6A, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

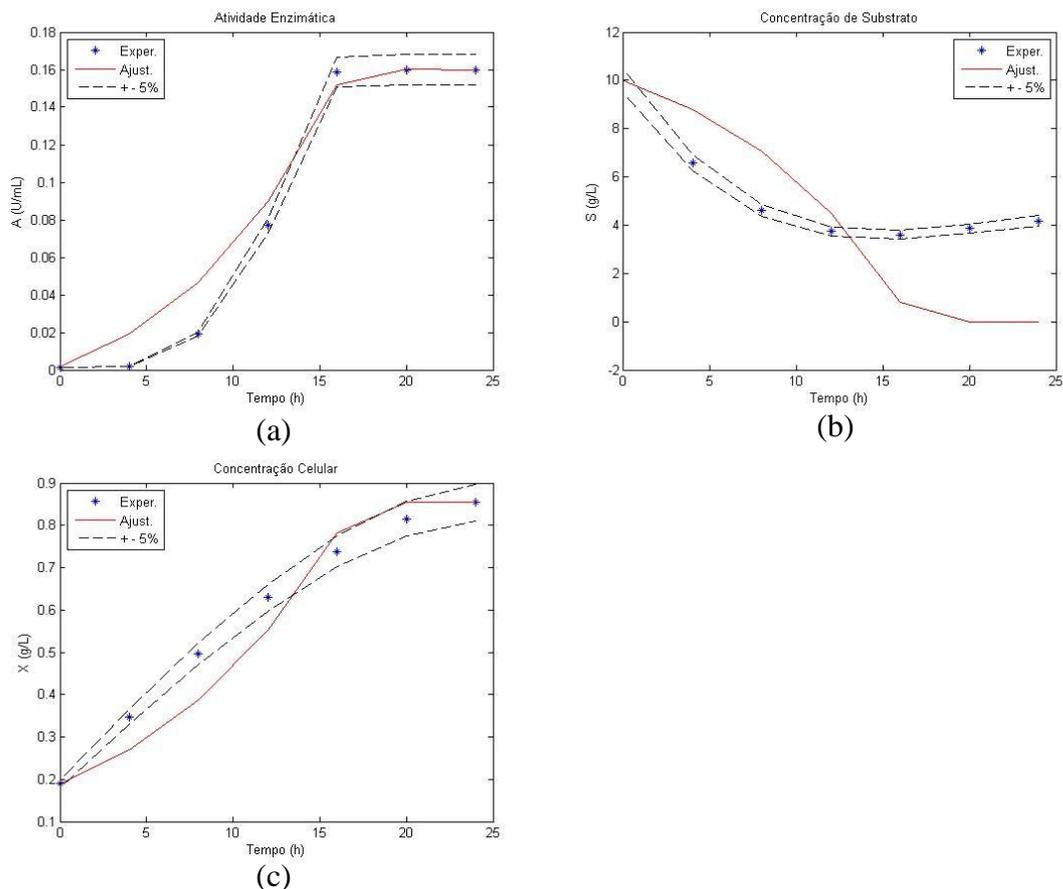


Figura 4.84 - Meio E6A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.12.3 Modelo Aiba

O modelo de Aiba não apresentou resultados satisfatórios para o meio E6A, sendo as curvas ajustadas com comportamento distante dos dados experimentais e com o aparecimento de parâmetros negativos ou com valor zero.

4.12.4 Modelo Andrews

Na figura 4.85 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E6A, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.

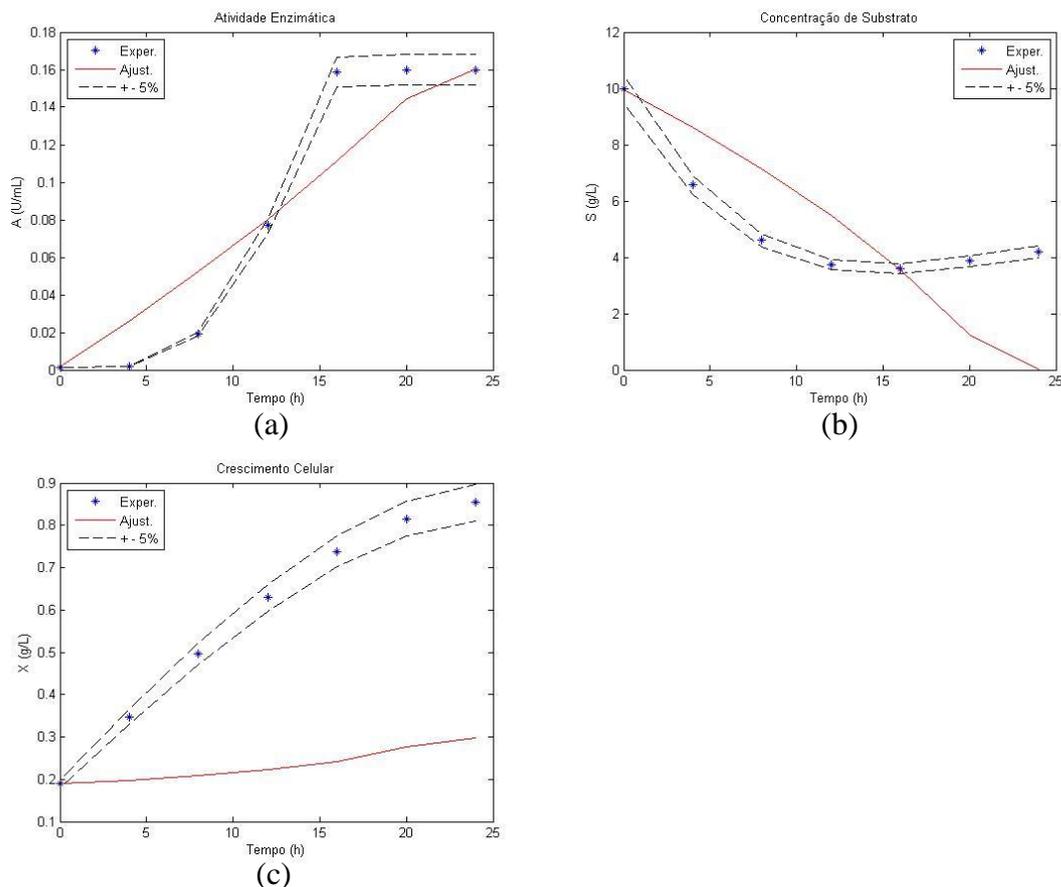


Figura 4.85 - Meio E6A. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.17 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio E6A, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.17 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E6A.

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{max}}$ (h^{-1})	0,2371	0,0898	-	0,1599
$\mu_{A_{max}}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h$)	0,0862	0,0528	-	0,0394
$Y_{X/S}$ ($g_{célula} / g_{substrato}$)	0,1325	0,1205	-	0,0426
$Y_{A/S}$ ($U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL$)	0,0303	0,0356	-	0,0213
K_{sx} (g/L)	9,9838	0,0584	-	1,4458
K_{is} (g/L)	-	-	-	0,7174
K_{sa} (g/L)	0,0815	1,7589	-	0,3661
K_{ia} (g/L)	0,2499	6,0940	-	44,4282

4.13 MEIO DE CULTURA E6F

Utilizando os sistemas de equações diferenciais I a IV (equações 3.10 a 3.21), aplicadas ao algoritmo apresentado na figura 3.1 no software MATLAB[®], com a substituição dos parâmetros iniciais determinados no item 4.2 para o meio E6F, foram gerados quatro conjuntos de gráficos, correspondentes aos quatro sistemas de equações diferenciais estudados, apresentando os dados experimentais alisados e as curvas de ajuste, sendo apresentados também, no item 4.13.4, os parâmetros determinados pelo algoritmo de resolução das equações diferenciais.

Conforme apresentado na tabela 3.2, o meio E6F caracterizou-se pela concentração inicial de amido de 10g/L e com pH inicial de 10,7 e pH final de 9,7, com meio de cultivo de 1L em fermentador de bancada de 1,5L, a atividade máxima obtida foi de 0,4566U/mL em 40h de cultivo, com concentração celular máxima de 1,0988g/L em 24h e concentração final de substrato em 3,6914/L em 56h de fermentação.

Neste meio, as amostras foram retiradas de 8 em 8h e no alisamento dos dados foram obtidos valores em intervalos de tempo de 4 em 4h, como foi apresentado na figura 4.37.

Para minimizar os efeitos dos metabólitos que se acumulam ao longo de um cultivo em batelada, os dados ajustados utilizados foram no intervalo de tempo de 0 a 24h (figura 4.86).

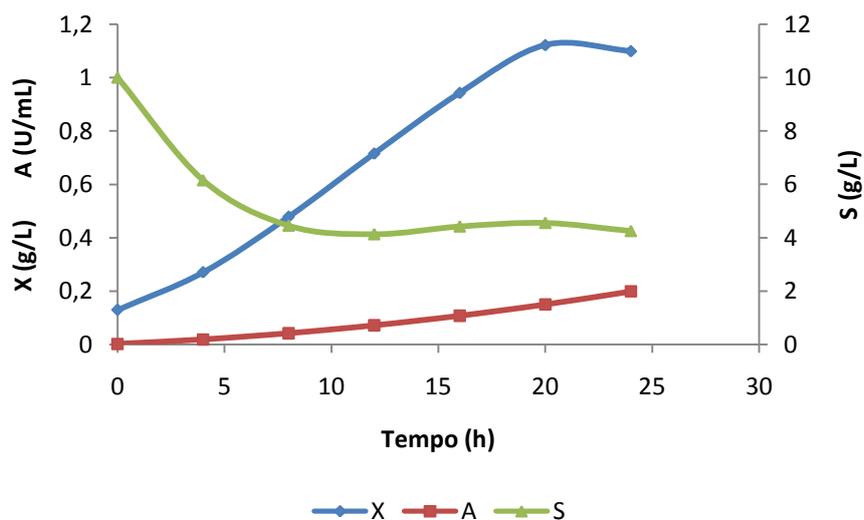


Figura 4.86 - Dados Alisados de concentração celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) do meio E6F truncados em 24h de cultivo.

4.13.1 Modelo Monod-Aiba

Na figura 4.87 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E6F, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Aiba.

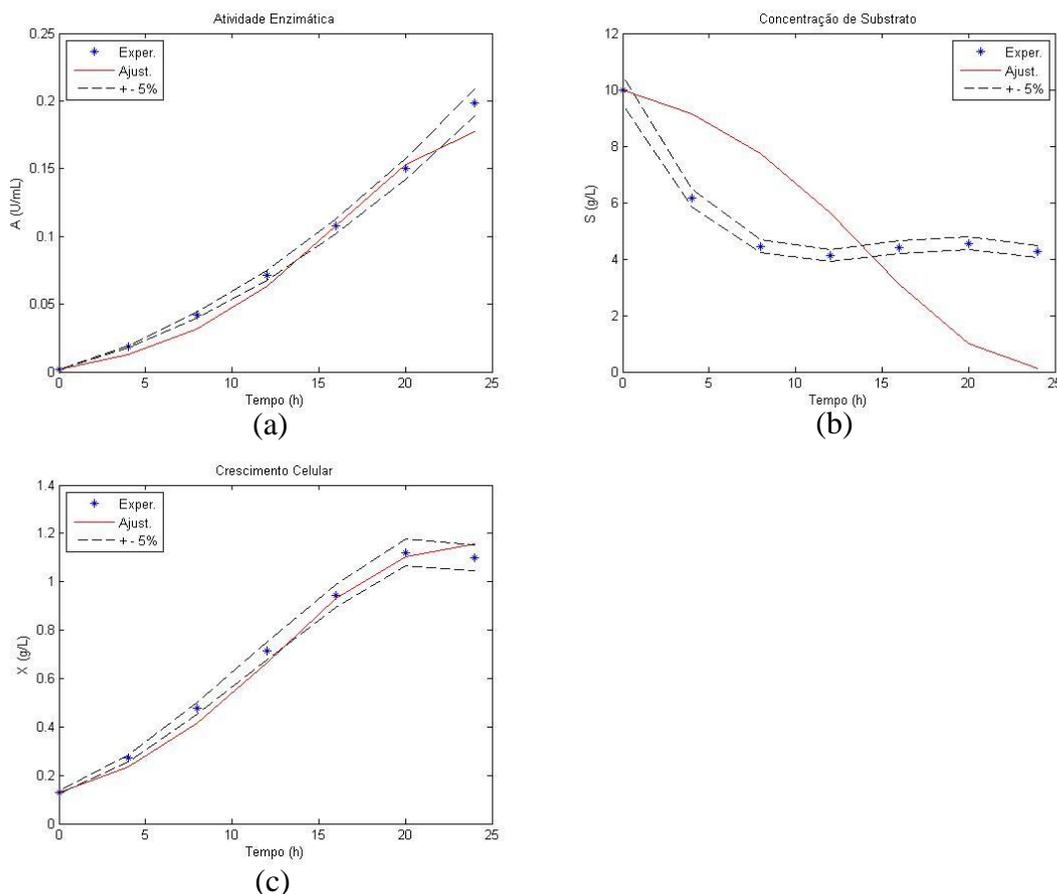


Figura 4.87 - Meio E6F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Aiba.

4.13.2 Modelo Monod-Andrews

Na figura 4.88 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E6F, considerando o crescimento celular com comportamento descrito pela equação cinética de Monod e o comportamento da atividade enzimática descrita pela equação cinética de Andrews.

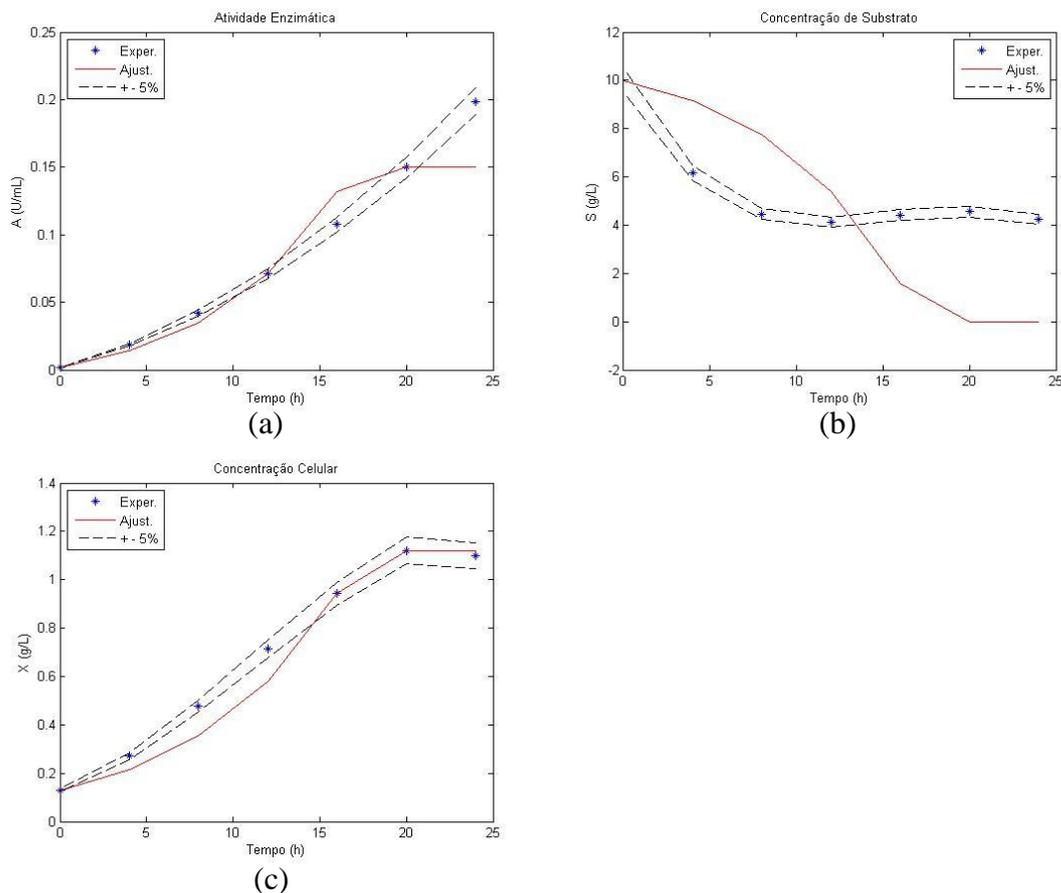


Figura 4.88 - Meio E6F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para a combinação dos modelos de Monod e Andrews.

4.13.3 Modelo Aiba

O modelo de Aiba não apresentou resultados satisfatórios para o meio E6F, sendo as curvas ajustadas com comportamento distante dos dados experimentais e com o aparecimento de parâmetros negativos ou com valor zero.

4.13.4 Modelo Andrews

Na figura 4.89 são apresentados os valores experimentais e as curvas ajustadas para o meio E6F, considerando o crescimento celular e a atividade enzimática com comportamento descrito pela equação cinética de Andrews.

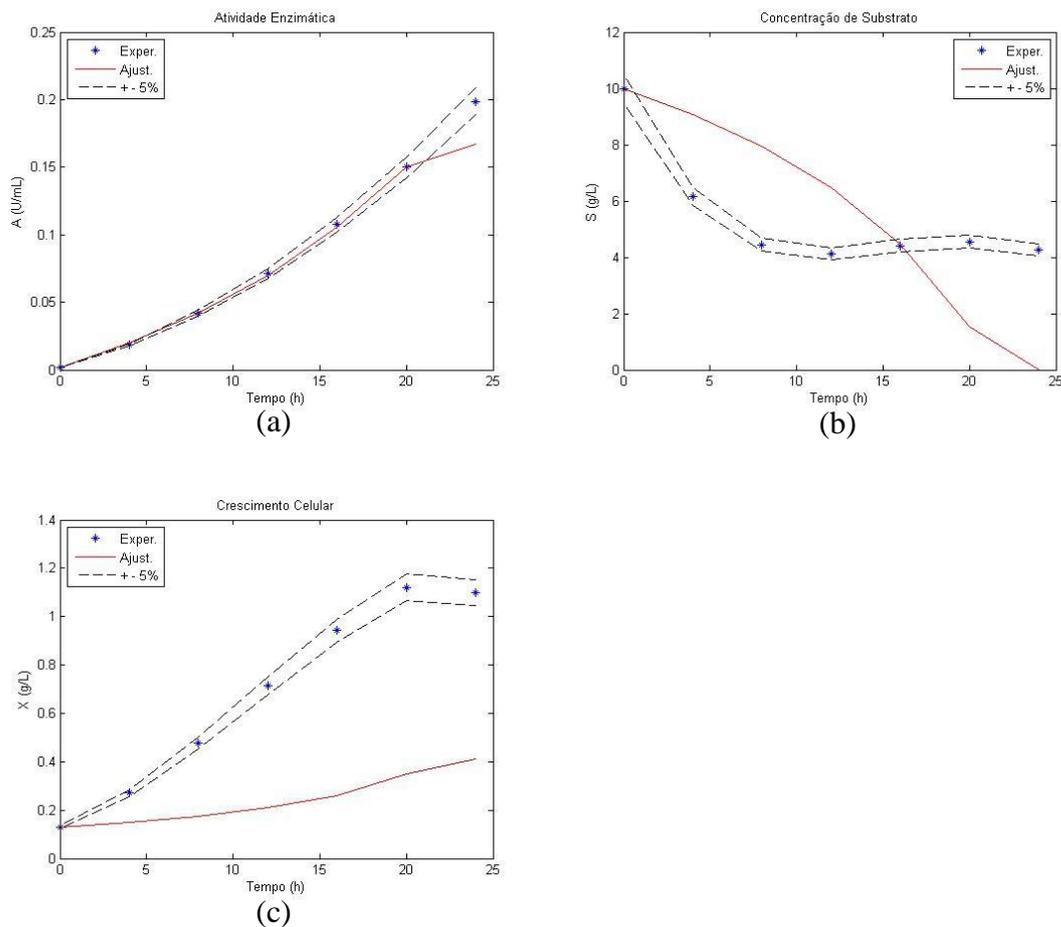


Figura 4.89 - Meio E6F. a) Atividade Enzimática (A), b) Concentração de Substrato (S) e c) Concentração Celular (X) em função do Tempo (t) para o modelo de Andrews.

Na tabela 4.18 são apresentados os parâmetros cinéticos ajustados para o meio E6F, de acordo com os modelos cinéticos utilizados.

Tabela 4.18 - Parâmetros cinéticos ajustados para o Meio de cultura E6F.

Parâmetros	Modelos			
	Monod-Aiba	Monod-Andrews	Aiba	Andrews
$\mu_{X_{max}} (h^{-1})$	0,4264	0,1271	-	0,3017
$\mu_{A_{max}} (U_{enzima} \cdot L / g_{célula} \cdot mL \cdot h)$	0,0250	0,0389	-	0,0890
$Y_{X/S} (g_{célula} / g_{substrato})$	0,1896	0,1509	-	0,0623
$Y_{A/S} (U_{enzima} \cdot L / g_{substrato} \cdot mL)$	0,0394	0,0432	-	0,0302
$K_{sx} (g/L)$	17,4931	0,1376	-	2,1173
$K_{is} (g/L)$	-	-	-	1,3295
$K_{sa} (g/L)$	0,4036	1,7296	-	2,6252
$K_{ia} (g/L)$	2,0672	9,7553	-	6,5438

4.14 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tendo por base os resultados apresentados nas seções 4.3 a 4.13, serão traçados comentários sobre as curvas obtidas e o comparativo dos valores obtidos para os parâmetros estimados.

Conforme apresentado na seção 4.3 para o meio M7 de Marques (2004), graficamente, os resultados se mostraram semelhantes para os sistemas de equações diferenciais I (combinação Monod-Aiba), II (combinação Monod-Andrews) e IV (somente Andrews), apresentados nas figuras 4.46, 4.47 e 4.48, o sistema de equações diferenciais número III, contendo apenas o modelo cinético de Aiba não mostrou resultados apreciáveis durante a tentativa de resolução, por meio da manipulação dos parâmetros K_{sx} , K_{is} , K_{sa} e K_{ia} . Para o meio M7, os sistemas que apresentaram uma resposta permitiram um ajuste das curvas de atividade enzimática (A) e de consumo de substrato (S), não ajustando a curva de crescimento celular (X). Numericamente, os parâmetros estimados pelas combinações Monod-Aiba e Monod-Andrews apresentam valores muito próximos (tabela 4.9), já o modelos de Andrews, mesmo apresentado comportamento gráfico semelhante aos demais, apresentou valores bem distintos dos estimados pelas combinações dos modelos cinéticos, além de apresentar um valor negativo, de K_{sa} .

Na seção 4.4, para o meio de cultura M8 de Marques (2004), mesmo restringindo o tempo de cultivo analisado em 36h (figura 4.49), nenhum dos sistemas de equações diferenciais estudados apresentou resultados satisfatórios, sendo que o algoritmo de resolução não conseguiu resolver o sistema ou demandaria um tempo de resolução maior, o que não foi testado. É possível que algum dos parâmetros iniciais esteja em desacordo com o necessário para que o sistema de equações diferenciais possa ser resolvido, tendo por base os dados experimentais disponíveis.

Para o meio M9 de Marques (2004), apresentado na seção 4.5, mesmo com a restrição do tempo de fermentação estudado (36h, figura 4.50), a curva de crescimento celular (X) apresentou algumas inflexões ao longo deste período, diferente das curvas de atividade enzimática (A) e de consumo de substrato (S). Os sistemas I e II, com a combinação dos modelos cinéticos de Monod-Aiba e Monod-Andrews, respectivamente, apresentaram uma curva de ajuste próxima aos valores experimentais de atividade enzimática (A) sem, no entanto, ajustá-los adequadamente, a curva de ajuste de consumo de substrato (S) ficou dentro do limite de 5%, mas apresentou um

perfil diferente do apresentado pelos valores experimentais, e não houve ajuste para as curvas de crescimento celular (X), conforme é apresentado nas figuras 4.51 e 4.52. O sistema III, com o modelo de Aiba não apresentou resultados satisfatórios novamente, e o sistema IV, com o modelo de Andrews, apresentou um bom ajuste gráfico para a atividade enzimática (A) e para o consumo de substrato (S), porém não esboçou o mesmo comportamento para o crescimento celular (X), e diferente dos sistemas I e II, resultou em uma linha horizontal. Numericamente, os parâmetros estimados (tabela 4.10) para os sistemas I, II e IV apresentaram valores distintos e geralmente distantes, com algumas exceções como $Y_{A/S}$ que foi de $0,0391 U_{enzima} \cdot L / g_{subs} \cdot mL$ para a combinação Monod-Aiba e de $0,0423 U_{enzima} \cdot L / g_{subs} \cdot mL$ para a combinação Monod-Andrews.

Na seção 4.6 para o meio M34 de Marques (2004), observa-se que os quatro sistemas de equações diferenciais apresentaram resultados gráficos interessantes, sendo que os sistemas I, II e III ajustaram bem os dados de crescimento celular (X) não ajustaram os dados de atividade enzimática (A) e de consumo de substrato (S) como é mostrado nas figuras 4.55, 4.56 e 4.57. Para este meio de cultura, o modelo de Andrews (Sistema IV) apresentou bom ajuste para os dados de crescimento celular (X), não apresentando ajuste para o crescimento celular (X) e para o consumo de substrato (S), figura 4.58. Numericamente os parâmetros estimados apresentaram valores diferentes (tabela 4.11), sendo o parâmetro K_{ia} , o que apresentou maior distância entre os valores encontrados.

Para o meio M56 de Marques (2004), apresentado na seção 4.7, os sistemas de equações diferenciais I (Monod-Aiba), II (Monod-Andrews) e III (Aiba) apresentaram bom ajuste gráfico para o crescimento celular (X), não ajustando o consumo de substrato (S) e a atividade enzimática (A), conforme as figuras 4.60, 4.61 e 4.62. O sistema IV, com o modelo de Andrews, permitiu um bom ajuste para a concentração celular (X), a curva de consumo de substrato (S) ficou dentro do limite de 5% e a curva de atividade enzimática (A) apresentou um comportamento melhor do que os sistemas anteriores, mostrado na figura 4.63, apresentando um valor de K_{sx} negativo de -21,4751.

Na seção 4.8, para o meio E3A de Calderaro (2007), mesmo com a restrição do tempo de fermentação analisado em 36h (figura 4.64), a curva de crescimento celular apresentou um patamar após 16h de cultivo, neste caso, os sistemas de equações I, II e IV apresentaram bom ajuste para o crescimento celular (X), gerando uma curva ajustada

também com patamar para a atividade enzimática (A) e apresentando comportamento semelhante para as curvas ajustada de concentração de substrato (S), como foi apresentado nas figuras 4.65, 4.66 e 4.68. O sistema III com o modelo de Aiba não apresentou ajuste para os dados de atividade enzimática (A), para a concentração celular (X) e para o consumo de substrato (S). Numericamente os parâmetros estimados apresentaram valores distintos ao se comparar entre os sistemas de equações utilizados.

Para o meio E3B de Calderaro (2007), apresentado na seção 4.9, os sistemas de equações diferenciais I e II, com as combinações das equações cinéticas de Monod-Aiba e Monod-Andrews, respectivamente, apresentaram um bom ajuste para as curvas de atividade enzimática (A), não ajustando adequadamente os dados de consumo de substrato (S) e de crescimento celular (X), como é apresentado nas figuras 4.70 e 4.71. O sistema III com o modelo de Aiba apresentou bom ajuste para a atividade enzimática (A), mas não apresentou bom resultado para as curvas de consumo de substrato (S) e de crescimento celular (X), figura 4.72. O sistema IV, com o modelo de Andrews, não apresentou um bom ajuste para a atividade enzimática (A), para o consumo de substrato (S) e para o crescimento celular (X), figura 4.73. Numericamente, os parâmetros estimados apresentam valores semelhantes entre as velocidades específicas e os fatores de conversão para os sistemas II e IV, os demais parâmetros apresentaram valores bem distintos como é apresentado na tabela 4.14.

Na seção 4.10, para o meio de cultura E5A de Calderaro (2007), o sistema I com a combinação Monod-Aiba apresentou bom ajuste para a concentração celular (X) após 20h de cultivo, porém para a atividade enzimática (A) e para o consumo de substrato (S), não houve bom ajuste (figura 4.75). Já para o sistema II, com a combinação de modelos Monod-Andrews houve bom ajuste da atividade enzimática (A) e um ajuste bom para a concentração celular (X) após 15h de cultivo, não havendo bom ajuste para a concentração de substrato (S), como apresentado na figura 4.76. O sistema III com o modelo de Aiba não apresentou bom ajuste para nenhum dos três conjuntos de dados analisados. O sistema IV com a equação de Andrews não apresentou ajuste para o crescimento celular (X), para a atividade enzimática (A) e para a concentração de substrato (S), conforme figura 4.77. Numericamente, na tabela 4.15, verifica-se que os valores dos parâmetros estimados entre os sistemas de equações estudados, apresentando valores com ordens de grandeza diferentes como, por exemplo, K_{sx} , que assumiu o valor de 2,2792g/L para a combinação de modelos Monod-Aiba, 6,9355 g/L

para a combinação de modelos Monod-Andrews e de 0,1158 para o modelo de Andrews.

Observa-se para o meio de cultura E5F de Calderaro (2007), na seção 4.11, que os sistemas I e II apresentam um bom ajuste para a atividade enzimática (A), um ajuste razoável para o crescimento celular (X) após 15h de cultivo, mas não apresentou um bom ajuste para a concentração de substrato (S), como é apresentado nas figuras 4.79 e 4.80. O modelo de Aiba não forneceu bons resultados para os dados experimentais analisados. O sistema IV apresentou bom ajuste para a atividade enzimática (A) nas primeiras 5h de cultivo, mas não apresentou bons resultados para o crescimento celular (X) e para o consumo de substrato (S), figura 4.81. Numericamente, pela tabela 4.16, verifica-se que os parâmetros estimados apresentam ordens de grandeza semelhantes para os sistemas I e II.

De maneira análoga, para o meio E6A, apresentado na seção 4.12, o sistema de equações diferenciais I (Monod-Aiba) apresentou bom ajuste para os dados de crescimento celular (X) e de atividade enzimática (A) após 20h de cultivo, não apresentando bom resultado para o consumo de substrato (S). O sistema II (Monod-Andrews) apresentou melhor ajuste para a atividade enzimática (A) a partir de 13h de cultivo, não ajustando bem o consumo de substrato (S) e o crescimento celular (X). O sistema IV (Andrews) não apresentou bom ajuste para dados de crescimento celular (X), de atividade enzimática (A) e de consumo de substrato (S), como se verifica nas figuras 4.83, 4.84 e 4.85. Novamente, o sistema de equações diferenciais com o modelo de Aiba não forneceu bons resultados para os dados do meio E6A. Numericamente observa-se que as ordens de grandeza dos parâmetros estimados são semelhantes para os três sistemas analisados, havendo diferença nos valores dos parâmetros K_{sa} , K_{sx} e K_{ia} .

Na seção 4.13, para o meio de cultura E6F de Calderaro (2007), o sistema de equações I com a combinação de modelos Monod-Aiba, apresentou bom ajuste para os dados de crescimento celular (X) e para a atividade enzimática (A), não apresentando bom ajuste para os dados de concentração de substrato (S), como se observa na figura 4.87. O sistema de equações II com os modelos Monod-Andrews apresentou um ajuste bom para o crescimento celular (X) após 15h de cultivo, um bom ajuste para a atividade enzimática (A) até 13h de cultivo, mas não apresentaram bom ajuste para os dados de consumo de substrato (S), como se pode observar na figura 4.88. O sistema de equações III com o modelo de Aiba, novamente não apresentou resultados satisfatórios para o meio E6F. O sistema IV (Andrews) apresentou bom ajuste para a atividade enzimática

(A) até 20h de cultivo, não apresentando bom ajuste para os dados de crescimento celular (X) e de consumo de substrato (S). Numericamente, os parâmetros estimados apresentaram valores distintos, sendo que as velocidades específicas e os fatores de conversão mantiveram-se na mesma ordem de grandeza para as combinações de modelos Monod-Aiba e Monod-Andrews.

4.15 REPRESENTAÇÃO POR LUEDEKING E PIRET

Na tentativa de representar matematicamente a produção da enzima CGTase por *Bacillus circulans*, Burhan *et al* (2005) utilizaram a relação entre a velocidade específica de formação de produto (μ_P) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_X) apresentada por Luedeking e Piret em 1959 (equação 2.14) como uma das equações diferenciais do sistema de equações a ser resolvido na modelagem deste processo.

Luedeking e Piret (1959) obtiveram uma relação linear entre a velocidade específica de produção de ácido láctico (μ_P) e a velocidade específica de crescimento celular de *Lactobacillus delbrueckii*, de maneira que, para que esta relação seja válida, é necessário que um gráfico de μ_P versus μ_X resulte em uma reta, sendo que o coeficiente angular da reta representa a constante α e o coeficiente linear da reta representa a constante β , como foi apresentado na equação 2.14.

Por este motivo, foram feitos os gráficos de velocidade específica de atividade enzimática de CGTase (μ_A) versus a velocidade específica de crescimento celular de *Bacillus firmus* (μ_X), uma vez que permitem verificar a relação existente entre estas velocidades específicas e também se esta relação pode ser representada facilmente por uma equação matemática, em especial por uma reta, no formato da equação 2.14.

A verificação desta relação para os meios de cultura estudados é apresentada nas figuras 4.90 a 4.100, na confecção dos gráficos de μ_A versus μ_X .

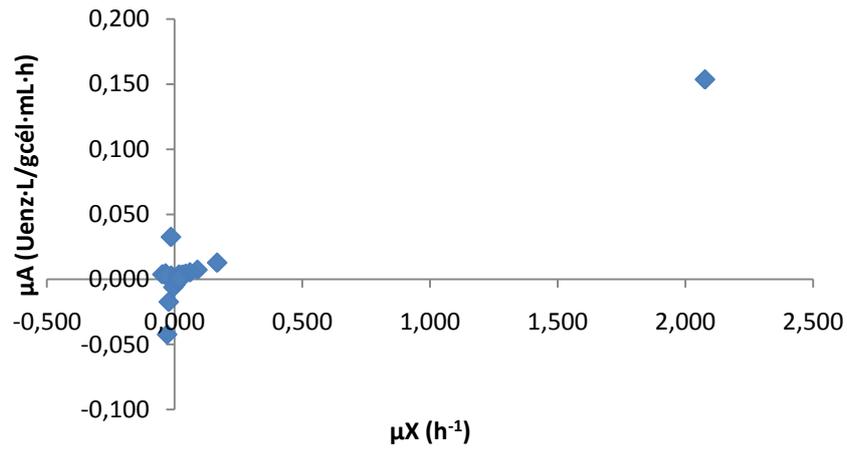


Figura 4.90 - Meio M7. Relação entre μ_A e μ_X .

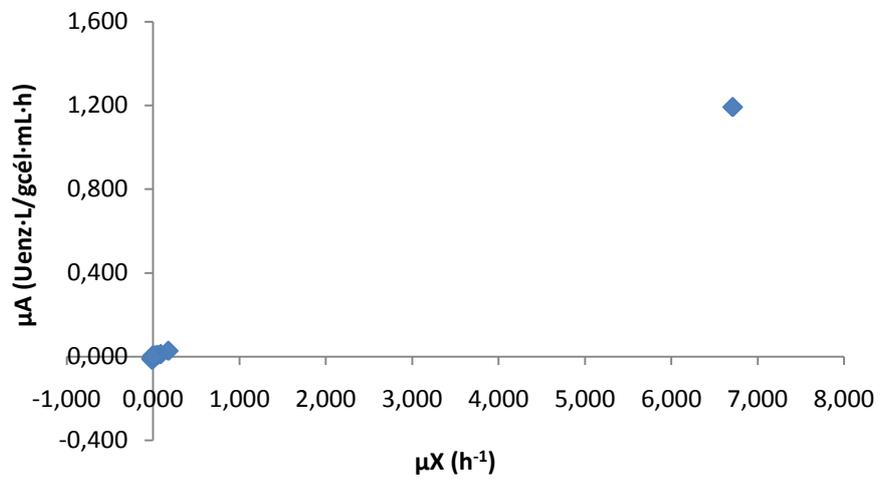


Figura 4.91 - Meio M8. Relação entre μ_A e μ_X .

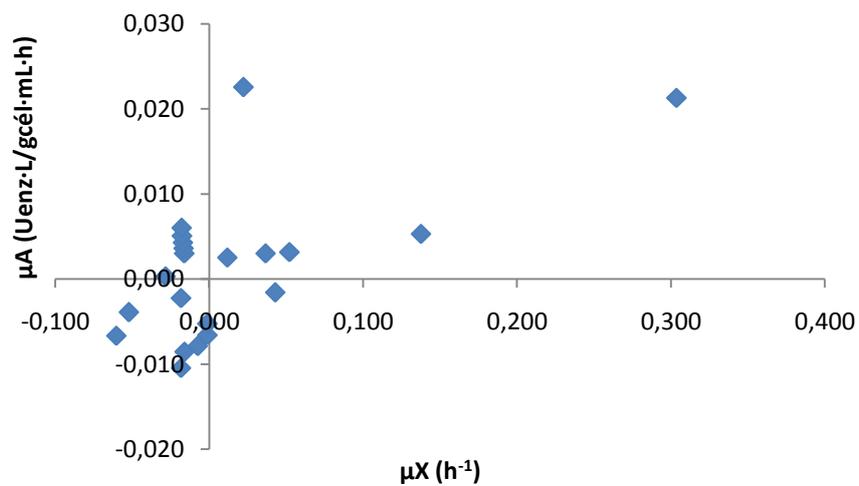


Figura 4.92 - Meio M9. Relação entre μ_A e μ_X .

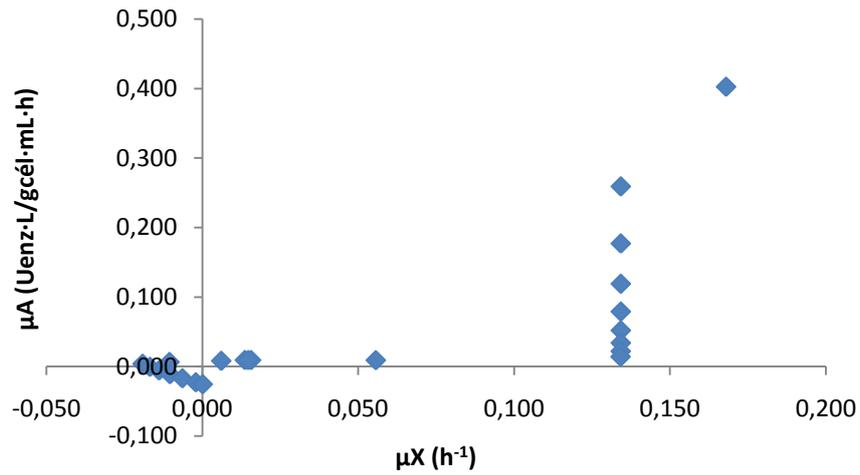


Figura 4.93 - Meio M34. Relação entre μ_A e μ_X .

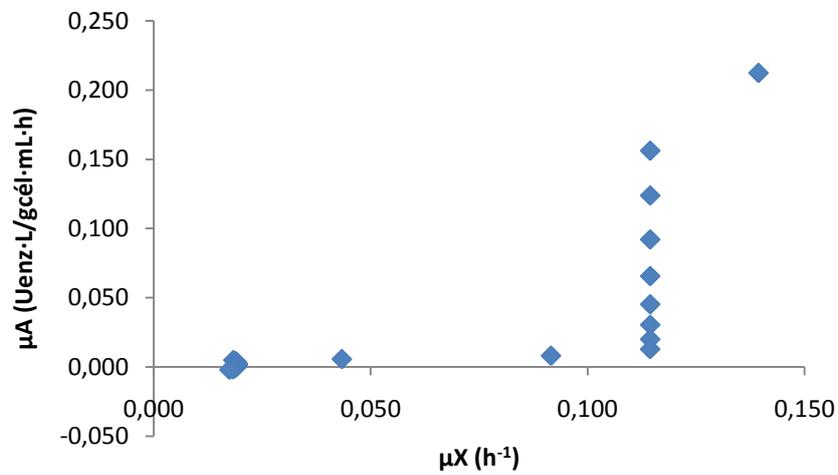


Figura 4.94 - Meio M56. Relação entre μ_A e μ_X .

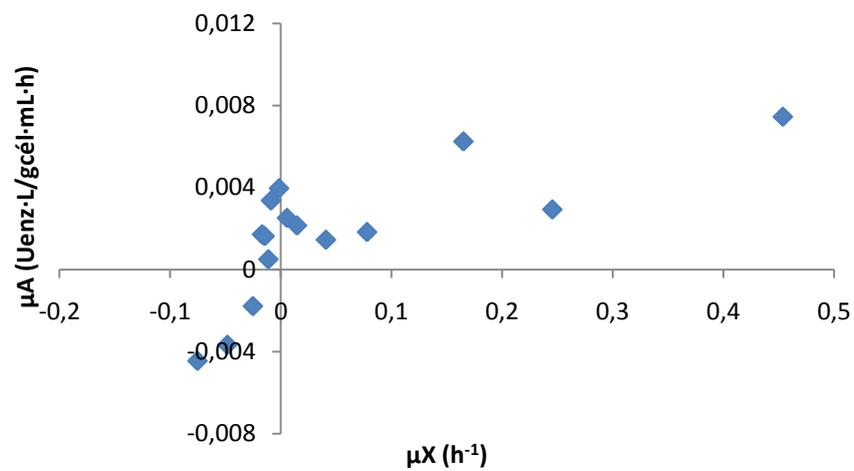


Figura 4.95 - Meio E3A. Relação entre μ_A e μ_X .

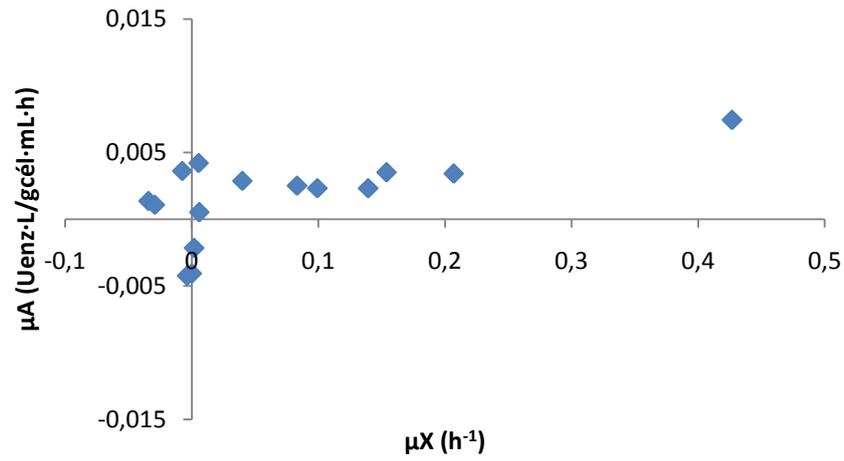


Figura 4.96 - Meio E3B. Relação entre μ_A e μ_X .

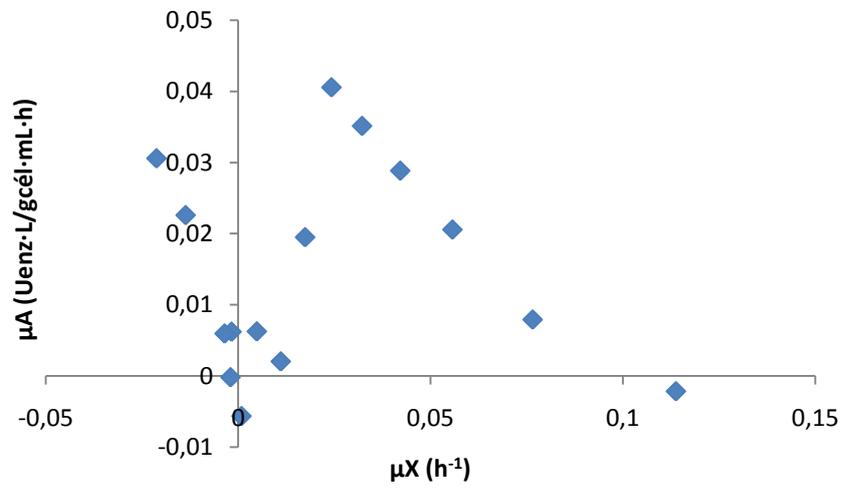


Figura 4.97 - Meio E5A. Relação entre μ_A e μ_X .

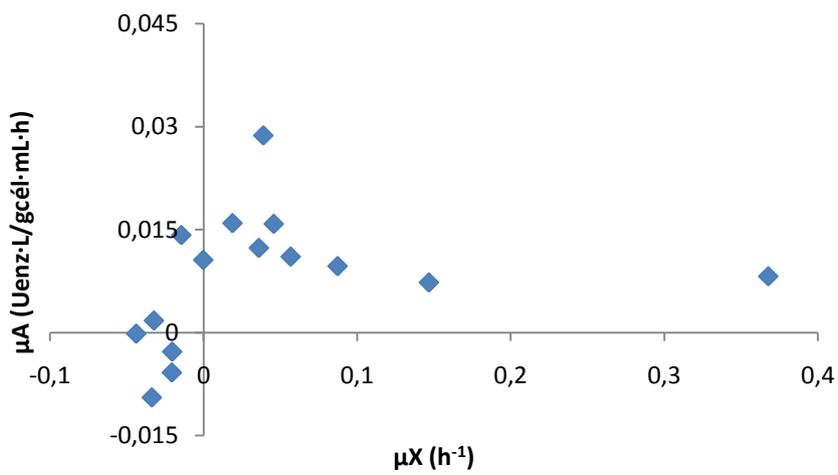


Figura 4.98 - Meio E5F. Relação entre μ_A e μ_X .

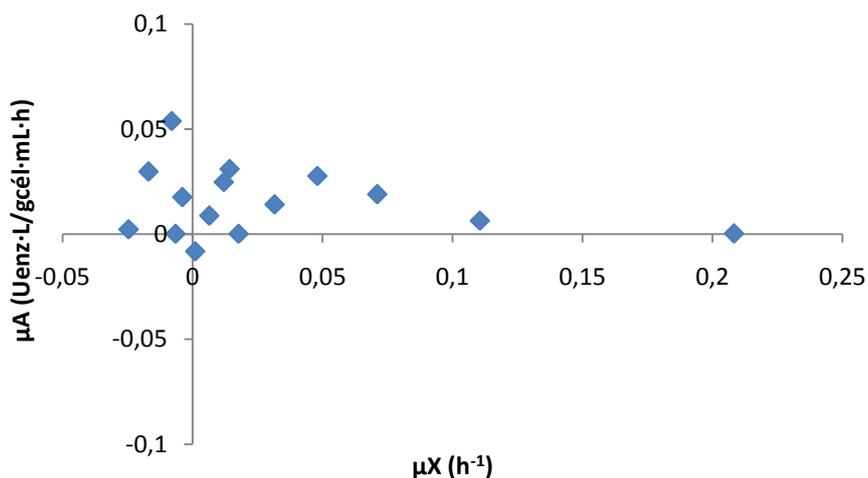


Figura 4.99 - Meio E6A. Relação entre μ_A e μ_X .

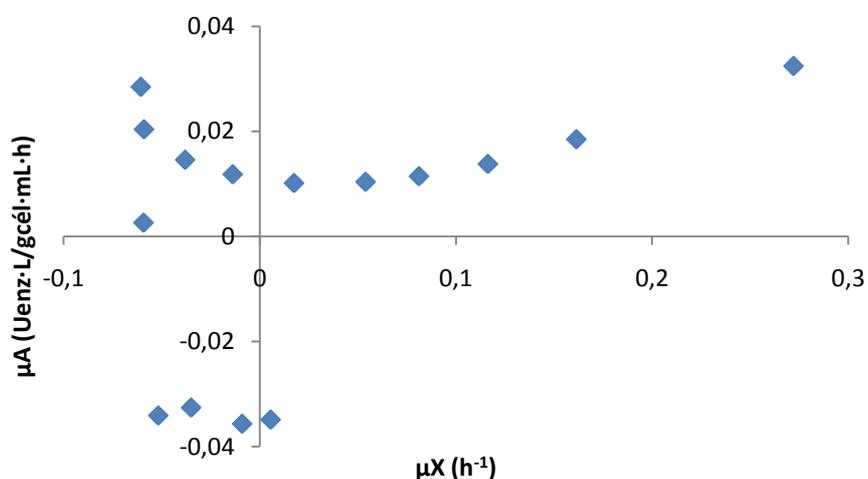


Figura 4.100 - Meio E6F. Relação entre μ_A e μ_X .

Pode-se observar que não existe uma relação linear entre a velocidade específica de atividade enzimática (μ_A) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_X) nas condições trabalhadas de fermentação para a produção da enzima CGTase por *Bacillus firmus* CEPA 37. Ainda que nas figuras 4.90 e 4.91, para os meios M7 e M8 respectivamente, esta relação pareça surgir, há uma concentração de pontos na origem dos eixos e um ponto que se destaca nos dois gráficos, de maneira que o Excel apresente a curva cheia como uma reta, mas não se pode afirmar que a relação seja linear.

É possível que Burhan *et al* (2005) tenham encontrado uma relação linear por trabalharem com baixa concentração de substrato (amido), minimizando a influência dos efeitos inibitórios decorrentes de altas concentrações de amido.

4.16 OUTRAS CONSIDERAÇÕES

4.16.1 Testes com outras funções objetivo

A fim de tentar melhorar as respostas dos modelos cinéticos em relação ao dados experimentais utilizados, foi proposto alterar as equações de erro utilizadas pela função objetivo no MATLAB[®]. A primeira opção foi utilizar a equação de erro clássica, como apresentado na equação 4.1.

$$Erro = (ajustado - experimental)^2 \quad (4.1)$$

A segunda opção foi utilizar a diferença entre os valores ajustados e experimentais em módulo, como apresentado na equação 4.2.

$$Erro = |ajustado - experimental| \quad (4.2)$$

Para ambas as equações, como apresentado na seção 3.2.3, o critério de otimização permaneceria como a soma entre as três equações de erro, ou seja, as equações 4.1 e 4.2 seriam aplicadas aos valores de crescimento celular (X), de atividade enzimática (A) e de consumo de substrato (S). Nestes dois casos, não seria possível fazer a soma entre estes critérios, pois as equações de erro para concentração celular (X) e de consumo de substrato (S) resultam em valores com unidade em g/L e a equação do erro para a atividade enzimática (A) resulta em valores com unidade em U/mL, tendo portanto, dimensões diferentes.

Outra opção foi utilizar então uma equação semelhante à 3.25, fazendo o quadrado da diferença entre os valores ajustados e experimentais divididos pelo valor experimental, como apresentado na equação 4.3.

$$Erro = \left(\frac{ajustado - experimental}{experimental} \right)^2 \quad (4.3)$$

A implementação desta equação de erro no MATLAB[®] permitiu manter o critério de otimização como a soma dos erros de X, S e A, mas não os resultados dos modelos não foram melhores dos obtidos com o erro expresso pela equação 3.25.

4.16.2 Ajuste de dados por Spline

O ajuste dos dados experimentais foi feito no software Excel, através de interpolações disponíveis neste software buscando a melhor curva de ajuste. Outra proposta foi utilizar a função *interp1* do MATLAB[®], promovendo uma interpolação por *spline*. Porém, a interpolação por este método, resultou em valores negativos para concentração celular (X) nas primeiras horas de cultivo, o que não ocorreu com a interpolação realizada através do Excel. As figuras 4.101 e 4.102 apresentam as curvas interpoladas por *spline* para os meios M34 e M56.

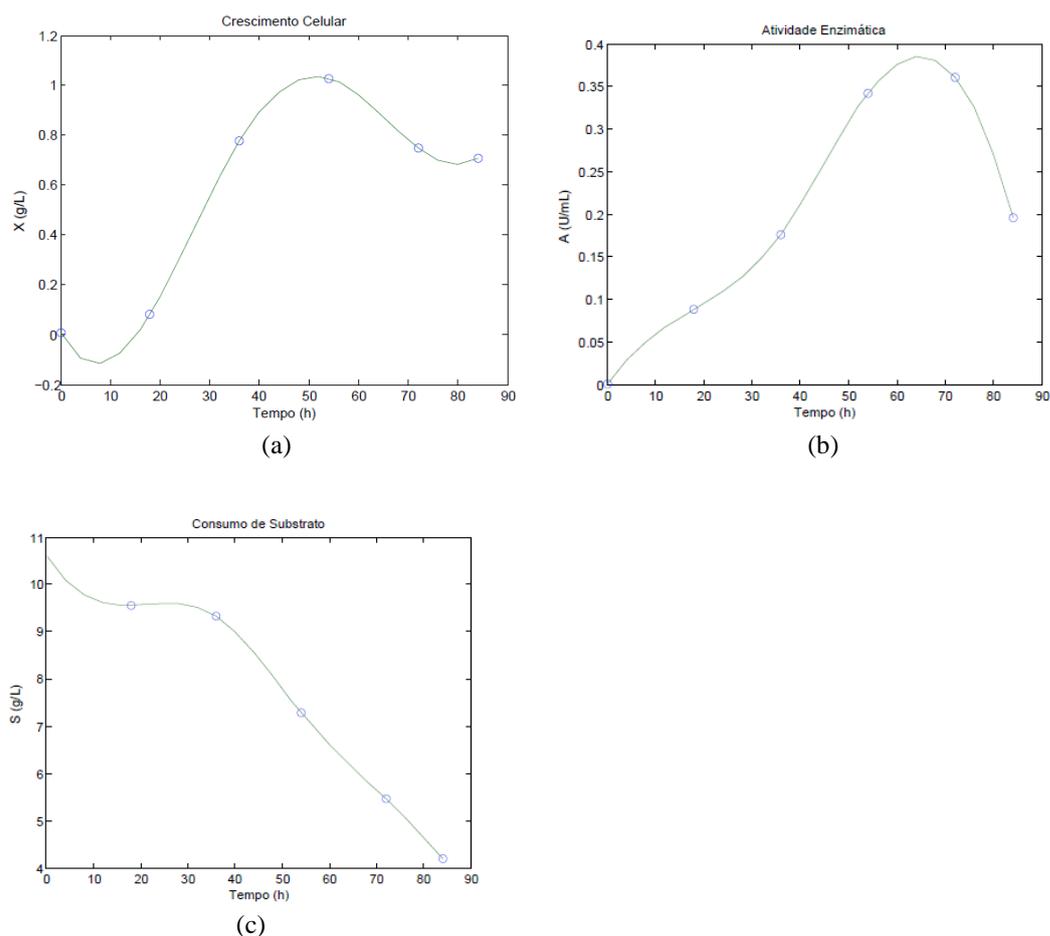


Figura 4.101 - Curvas de ajuste por *spline* para o meio de cultura M34. a) Crescimento Celular (X), b) Atividade Enzimática (A), c) Consumo de Substrato (S).

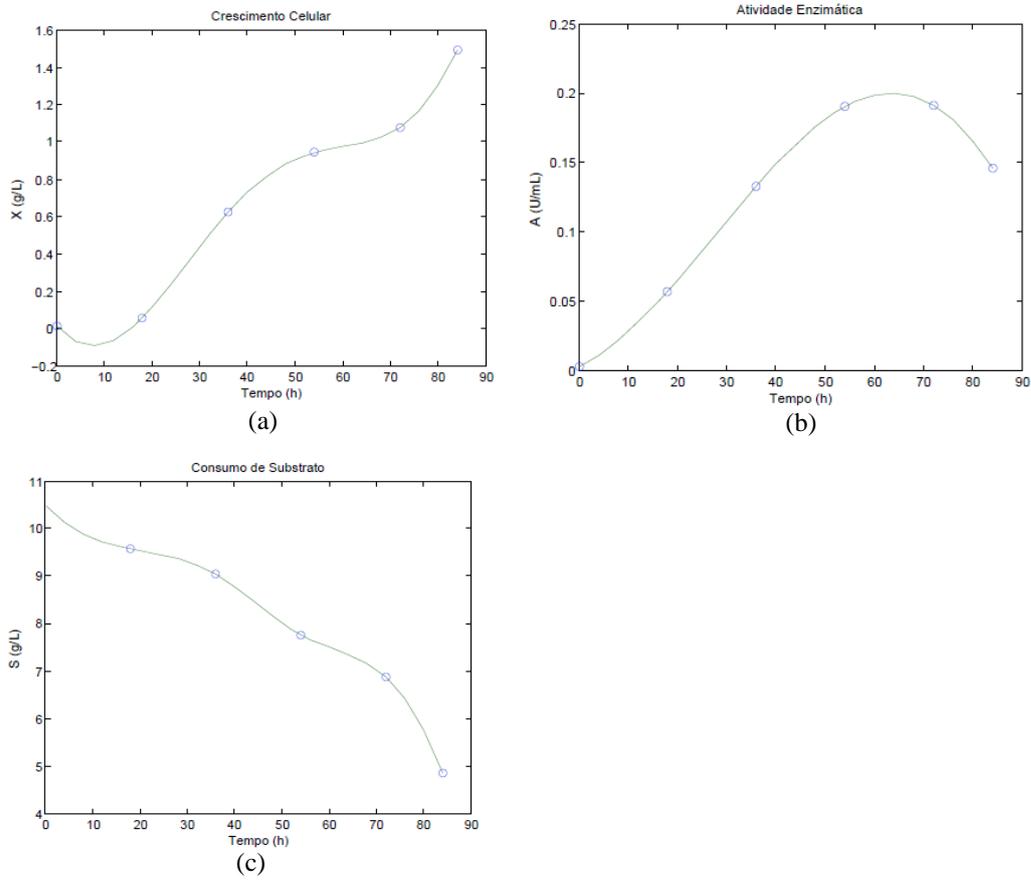


Figura 4.102 - Curvas de ajuste por *spline* para o meio de cultura M56. a) Crescimento Celular (X), b) Atividade Enzimática (A), c) Consumo de Substrato (S).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A otimização da produção da enzima Ciclomaltodextrina-Glucanotransferase (CGTase) é de grande importância para baratear o custo de produção de ciclodextrinas, favorecendo sua aplicação nas indústrias farmacêuticas e alimentícias por exemplo. Para tanto, é necessário conhecer o processo fermentativo e uma das ferramentas disponíveis para a otimização de processos fermentativos é a utilização de modelos cinéticos para representar matematicamente um fenômeno biológico. Neste trabalho, foram galgados mais alguns degraus para melhor entender o processo de produção de CGTase por *Bacillus firmus* da CEPA 37, é importante ressaltar que o processo de resolução das equações diferenciais teve por base uma parte do tempo de cultivo do bacilo, ou seja, foram utilizados os dados experimentais e ajustados para intervalos de tempo de 0 a 36h ou 0 a 24h, excluindo parte do processo, devido aos acúmulos de metabólitos secundários e à grande complexidade envolvida ao se considerar todo o processo fermentativo, seguem as conclusões encontradas.

Na seção 4.1, foi observado o comportamento das curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de atividade enzimática (μ_A) em função do tempo para verificar possíveis associações entre a atividade da enzima CGTase e o crescimento do bacilo. Observou-se que nas condições trabalhadas, com altas concentrações de amido como substrato (acima de 10g/L) não se pode afirmar que exista uma associação entre a atividade enzimática (A) e o crescimento celular (X), porém, se observou em alguns momentos, uma clara associação entre a atividade da enzima CGTase e a concentração de amido presente no meio de cultura (figuras 4.8, 4.12, 4.16 e 4.20), o que era esperado, uma vez que a enzima CGTase é amilolítica, sendo uma proteína indutiva, produzida pelo *Bacillus firmus*, tendo como uma das funções, atuar sobre o amido. Esta observação é condizente com a apresentada por Aiba *et al* (1971), segundo o qual, a produção de glicoamilase (da família das amilases) pertence ao tipo de fermentação não-associada ao crescimento celular, havendo uma relação complexa entre as velocidades específicas de formação de produto e de crescimento celular.

A modelagem de processos fermentativos é um tanto complexa, pois envolve a tentativa de representar por meio de equações matemáticas, o comportamento de micro-organismos, quanto ao seu crescimento, geração do produto de interesse e consumo de

substrato. O conhecimento da cinética de fermentação é fundamental para a aplicação de modelos matemáticos ou para o desenvolvimento de novos modelos.

O ajuste das curvas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e de atividade enzimática (A) na produção da enzima CGTase muitas vezes é possível matematicamente, porém, ao se analisar os parâmetros obtidos, muitos perdem o significado dentro do contexto de um processo biotecnológico, quando se encontra, por exemplo, fatores de conversão negativos ou velocidades específicas iguais a zero.

Como as unidades de concentração celular e de consumo de substrato são g/L e a de atividade enzimática é U/mL, os valores numéricos muitas vezes apresentam grande variação, tendo por exemplo em um dado tempo, uma concentração celular de 0,0116g/L, concentração de substrato de 10,474g/L e atividade enzimática de 0,0024U/mL, o que pode dificultar a convergência dos três conjuntos de dados experimentais durante a resolução dos sistemas de equações diferenciais.

A maior parte das equações cinéticas foi desenvolvida para trabalhar com quantidades ou concentrações de produtos mensuráveis, neste trabalho, não se dispunha da quantidade (concentração) de enzima, mas sim de sua atividade, expressando sua função dentro do meio de cultura, sendo este outro fator limitante na resolução dos sistemas de equações obtidos a partir de modelos cinéticos clássicos.

As equações utilizadas neste trabalho apresentam baixa capacidade de ajuste quando as curvas dos dados experimentais apresentam muitas inflexões, tendo maior representatividade no intervalo de tempo em que as curvas apresentam comportamento uniforme, crescente ou decrescente. Porém, mesmo não ajustando adequadamente os dados experimentais utilizados, os modelos cinéticos mostraram alguma capacidade de ajuste para a produção de CGTase, no período em estudo, de forma que em algumas situações, as curvas ajustadas se mostraram coerentes quanto ao crescimento celular (X), ao consumo de substrato (S) e à atividade enzimática (A), como se observa nas figuras 4.55, 4.56, 4.59, 4.62, 4.68 e 4.77, por exemplo. Desta forma, pode-se dizer que dependendo dos dados experimentais utilizados e dos valores dos parâmetros iniciais, existe a possibilidade de conseguir bons ajustes com os modelos cinéticos.

Na seção 4.15, foram feitos gráficos de velocidade específica de atividade enzimática (μ_A) versus a velocidade específica de crescimento celular (μ_X), a fim de verificar a existência da relação linear encontrada por Luedeking e Piret (1959), apresentada na equação 2.14, na produção de ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* e utilizada por Burhan *et al* (2005) na modelagem da produção de CGTase por *Bacillus*

circulans. Ao analisar as figuras obtidas (4.90 a 4.100) não se verificou esta relação, valendo lembrar que Burhan *et al* (2005) utilizaram concentrações de amido baixas, menores do que 10g/L, o que pode ter permitido o aparecimento do comportamento descrito.

Certamente, novos dados experimentais são necessários para melhorar o entendimento da cinética de fermentação da produção de CGTase por *Bacillus firmus* CEPA 37, de maneira a possibilitar a incorporação de novos parâmetros nas equações cinéticas para representar com maior fidelidade o comportamento da produção de CGTase.

Necessita-se determinar os valores de alguns parâmetros cinéticos como K_{sx} , K_{sa} , K_{is} e K_{ia} , uma vez que os mesmos sofreram variações de valores ao longo das tentativas de ajuste dos modelos e ao serem estimados, apresentaram valores muito distintos entre os sistemas de equações diferenciais estudados. É possível também, que a determinação destes parâmetros e sua inserção nos modelos cinéticos como constantes, favoreça a resolução das equações diferenciais, diminuindo a quantidade de parâmetros a serem ajustados e também diminuindo o tempo de resolução dos sistemas de equações.

6. REFERÊNCIAS

- AIBA, S., HUMPHREY, A.E., MILLIS, N.F., 1971, **Engenharia Bioquímica**, Campinas-SP, Fundação Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos.
- AIBA, S., SHODA, M., NAGATANI, M., 1968, “Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation”, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, pp. 845-864.
- ALVES, L. B.; MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. and OLIVO, J. E.. *Production of Cyclodextringlycosyltransferase from Bacillus firmus*. **Journal of Inclusion phenomena and Macrocyclic Chemistry**, **44**, 399-402, 2002.
- ALTERTHUMM F., 2005 “Elementos de Microbiologia”. In: Borzani, W., et al (coord), **Biotecnologia Industrial – volume 1: Fundamentos**, 1ª ed., capítulo 1, São Paulo, Edgard Blücher LTDA.
- ANDREWS, J.F., 1968, “A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates”, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, pp. 707-723.
- BESCHKOV, V., SAPUNDZHIEV, T., PETROV, K, et al, 2010, “Mathematical Modeling for Studying Microbial Processes – Some Examples”, **Serdica Journal of Computing**, v. 4, pp. 19-28.
- BON, E.P.S., PEREIRA Jr., N., GOTTSCHALK, L.M.F., et al, 2008, “Bioprocessos para Produção de Enzimas”. In: BON, E.P.S., FERRARA, M.A., CORVO, M.L., (coords), **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**, capítulo 5, Rio de Janeiro, Brasil, Interciência.
- BONILHA, P.R.M., MENOCCI, V., GOULART, A.J., et al, 2006, “Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: Optimization of Production and its Properties”, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, pp. 317-323

BONOMI, A., SCHMIDELL, W., 2001, “Modelagem Matemática e Simulação de Processos Fermentativos”. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., (coords), **Biotecnologia Industrial vol. 2 – Engenharia Bioquímica**, 1ªed., capítulo 7, São Paulo, Brasil, Edgard Blucher.

BROCKMAN, J.B., 2010, **Introdução à Engenharia – Modelagem e Solução de Problemas**, Rio de Janeiro, LTC

BURHAN, N., SAPUNDZHIEV, Ts., BESCHKOV, V., 2005, “Mathematical modelling of cyclodextrin-gluconotransferase production by batch cultivation”, **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, pp. 73-77.

BURHAN, N., SAPUNDZHIEV, Ts., BESCHKOV, V., 2007, “Mathematical modelling of cyclodextrin-glucono-transferase production by immobilised cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 at batch cultivation”, **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, pp. 114-119.

CALDERARO, F.P. et al, 2007, **Produção de Ciclodextrina-Glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus firmus* CEPA 37 sob Diferentes Condições de Aeração e Agitação**. Relatório de Iniciação Científica PIBIC realizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá.

CARMELLO, J.B. et al, 2007, **Avaliação da Concentração Celular na Produção de Ciclodextrina-Glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus firmus* CEPA 37 sob Diferentes Condições de Agitação e Aeração**. Trabalho de Iniciação Científica realizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá.

CHAPMAN, S.J., 2011, **Programação em MATLAB para Engenheiros**. 2ªed. São Paulo, CENGAGE Learning.

CHAPRA, S.C., CANALE, R.P., 2008, “Métodos de Runge-Kutta”. In: CHAPRA, S.C., CANALE, R.P. **Métodos Numéricos para Engenharia**. 5ªed, capítulo 25, São Paulo, McGraw-Hill.

DEPINTO, J.A., CAMPBELL, L.L., 1968, "Purification and Properties of The Cyclodextrinase of *Bacillus macerans*." **Biochemistry**, v. 7, p. 121-125.

DIXON, M., WEBB, E., 1979, **Enzymes**, Academic Press, New York.

ENDO, T., UEDA, H., 2004, "Large Ring Cyclodextrins – Recent Progress", **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 29, pp. 27-38.

GADEN, E. L. Jr., 1959, "Fermentation Process Kinetics", **Journal of Biochemical and Microbiology Technology and Engineering**, v. 1, n.4, pp. 413-429.

HAMOM, V., MORAES, F.F. de, 1990, "Étude Préliminaires a L'immobilisation de la CGTase WACKER". **Laboratoire de Technologie Enzymatique. Université de Technologie de Compiègne**. (Relatório de Pesquisa)

HISS, H., GOMBERT, A.K., 2001, "Cinética de Processos Fermentativos". In: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. (coords), **Biotecnologia Industrial vol. 2 – Engenharia Bioquímica**, 1 ed., capítulo 6, São Paulo, Brasil, Edgard Blucher.

HORIKOSHI, K., 1971a, "Production of Alkaline Enzymes by Alkalophilic Microorganisms. Part I. Alkaline Protease Produced by *Bacillus n.221*." **Agricultural and Biotechnology Chemistry**, v. 35, p. 1407-1414.

HORIKOSHI, K., 1971b, "Production of Alkaline Enzymes by Alkalophilic Microorganisms. Part II. Alkaline Amylases Produced by alkalophilic *Bacillus A-40-2*." **Agricultural and Biotechnology Chemistry**, v. 35, p. 1783-1791

KITAHATA, S., OKADA, S., FUKUI, T., 1978, "Acceptor Specificity of the Transglycosylation Catalyzed by Cyclodextrin Glycosyltransferase", **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, pp. 2369-2374.

KROUMOV, A. D. 2000, "Fermentation - production of the enzyme CGTase using L arabinose as second substrate-inducer. Internal report", Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil.

LEDUY, A., ZAJIC, J.E., 1973, "A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, pp. 805-810.

LUEDEKING, R., PIRET, E.L., 1959, "A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH", **Journal of Biochemical and Microbiology Technology and Engineering**, v. 1, n.4, pp. 393-412.

MANAKKER, F.V., VERMONDEN, T., NOSTRUM, C.F.V., 2009, *et al*, "Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications", **BioMacromolecules**, v. 10, n.12, pp. 3157-3175.

MARQUES, M. B. DE A., 2004, "Síntese da enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase em Diferentes Meios de Cultivo Utilizando *Bacillus firmus* alcalofílico", Paraná, XXXIX, 274 (PEQ/UEM, Engenharia Química).

MATIOLI, G. 1997, "Seleção de microrganismo e caracterização de sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase", Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MATIOLI, G., MORAES, F.F., ZANIN, G.M., 2000, **Ciclodextrinas e Suas Aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**, Maringá, EDUEM.

MENOCCI, V., GOULART, A.J., ADALBERTO, P.R., *et al*, 2008, "Cyclodextrin Glycosiltransferase Production by New *Bacillus SP.* Strains Isolated from Brazilian Soil", **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, pp. 682-688.

MONOD, J., 1949, "The Growth of Bacterial Cultures", **Annual Review of Microbiology**, v.3, pp. 371-394.

MURATI, G. ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; DE MORAES, F. F., 1998, "Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil". **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, pp. 267-275.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K., 1976, "Characterization and Some Cultural Conditions of a Cyclodextrin Glycosyltransferase-producing Alkalophilic *Bacillus* sp.", **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 40, pp.753-757.

NARVÁEZ, A., DOMINGUEZ, E., 2005, "Enzymes - Overview", Elsevier Ltd, pp.508-523

NELDER, J.A., MEAD, R., 1965, "A Simplex Method for Function Minimization", **The Computer Journal**, v. 7, n° 4, pp. 308-313

NOMOTO, M., CHEN, S.J., SHEW, D.C., 1986, "Purification and Characterization of Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkalophilic Bacterium of Taiwan." **Agricultural and Biological Chemistry**, v.50, pp. 2701-2707.

NOMOTO, M., SHEW, D.C., CHEN, S.J., *et al*, 1984, "Cyclodextrin Glucanotransferase from Alkalophilic Bacteria of Taiwan." **Agricultural and Biological Chemistry**, v.58, pp. 1337-1338.

NORMAN, B.E., JORGENSEN, S.T., 1992, "*Thermoanaerobacter* sp CGTase: its properties and applications", *Denpun Kagaku*, v.39, pp101-108.

OGUMA, T., KIKUCHI, M., MIZUSAWA, K., 1990, "Purification and some properties of cyclodextrin-hydrolyzing enzyme from *Bacillus sphaericus*." **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1036, pp. 1-5.

PREMA, P., SREEDHARAN, P.V., RAJA, K.C.M. *et al.* “Studies on Cyclodextrin glycosyltransferase production and characterization.” In: DUCHÊNE, D. (Ed.) Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins. Paris: Editions Santé, pp 46-49.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. (coords), 2001, **Biotechnologia Industrial vol. 2 – Engenharia Bioquímica**, 1 ed., São Paulo, Brasil, Edgard Blucher.

STARNE, R.L., FLINT, V.M., KATKOCIN, D.M., 1990, “Cyclodextrin production with a highly thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoaerobacter sp.*” In: DUCHÊNE, D. (Ed.) Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins. Paris: Editions Santé, pp.55-61.

SZEJTLI, J., 1988, “Cyclodextrin Technology”, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 450 p.

TESTER, R.F., KARKALAS, J., QI, X., 2004, “Starch – composition, fine structure and architecture”, **Journal of Cereal Science**, v. 39, pp. 151-165

TONKOVA, A., 1998, “Bacterial cyclodextrin glucanotransferase”, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, pp. 678-686.

WIND, R.D., LIEBL, W., BUITELAAR, R.M, *et al.*, 1995, “Cyclodextrin Formation by the Thermostable α -Amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenis* EM1 and Reclassification of the Enzyme as a Cyclodextrin Glycosyltransferase.”, **Applied and Environmental Microbiology**, pp. 1257 – 1265.

YAN, B.X., SUN, Y.Q., 1997 “Glycine Residues Provide Flexibility for Enzyme Active Sites”, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, N^o 6, pp. 3190-3194.

YIM, D.G., SATO, H.H., PARK, Y.H., *et al.*, 1997, “Production of Cyclodextrin from Starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme”, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, pp. 402-405.

ZAIN, W.S.W.Md., ILLIAS, R.Md., MADIHAH, S.Md., et al., 2007, "Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: Optimization of Carbon and Nitrogen concentration in the feed medium using central composite design", **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, pp. 26-33.

ZANIN, G.M., 1989, "Sacarificação do Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

7. ANEXO I

Neste anexo são apresentados os pontos dos dados experimentais medidos e as curvas com os dados experimentais ajustados para o crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo dos meios de cultura analisados de Marques (2004) e Calderaro (2007), a linha tracejada representa o intervalo de tempo em que houve o truncamento dos dados para aplicação nos modelos cinéticos, na tentativa de modelar o processo de produção de CGTase por *Bacillus firmus* CEPA 37.

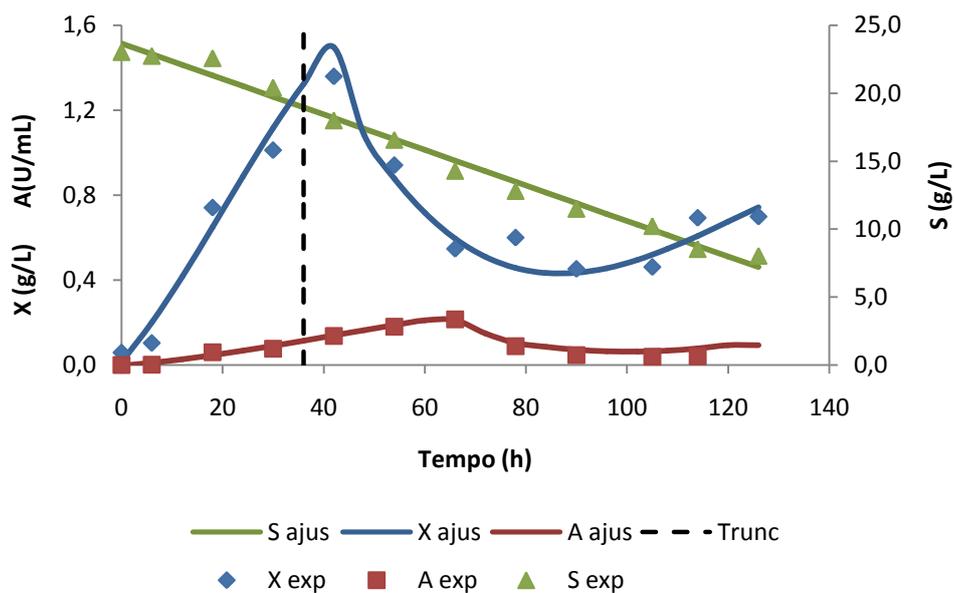


Figura 7.1 - Meio M7. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h. (MARQUES, 2004).

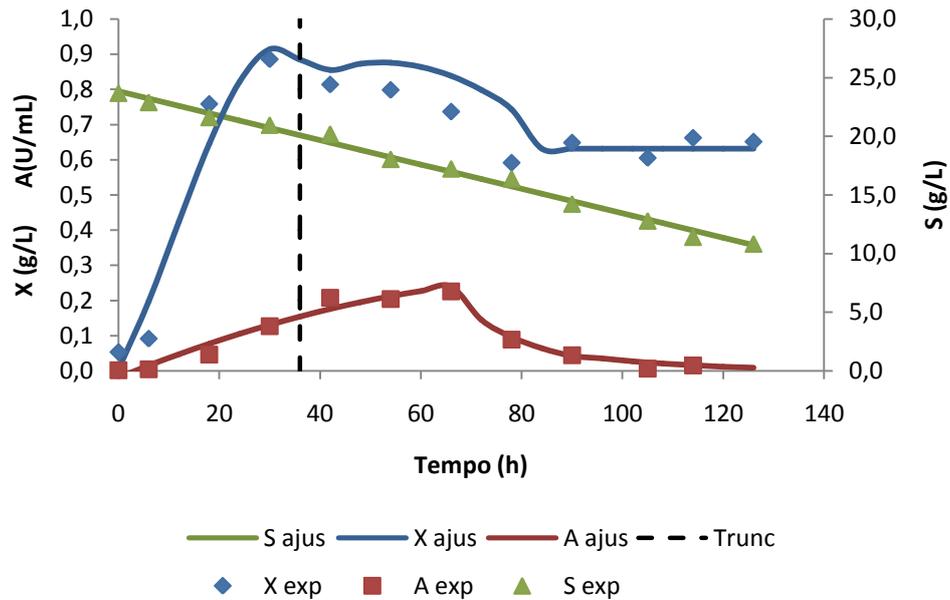


Figura 7.2 - Meio M8. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h. (MARQUES, 2004).

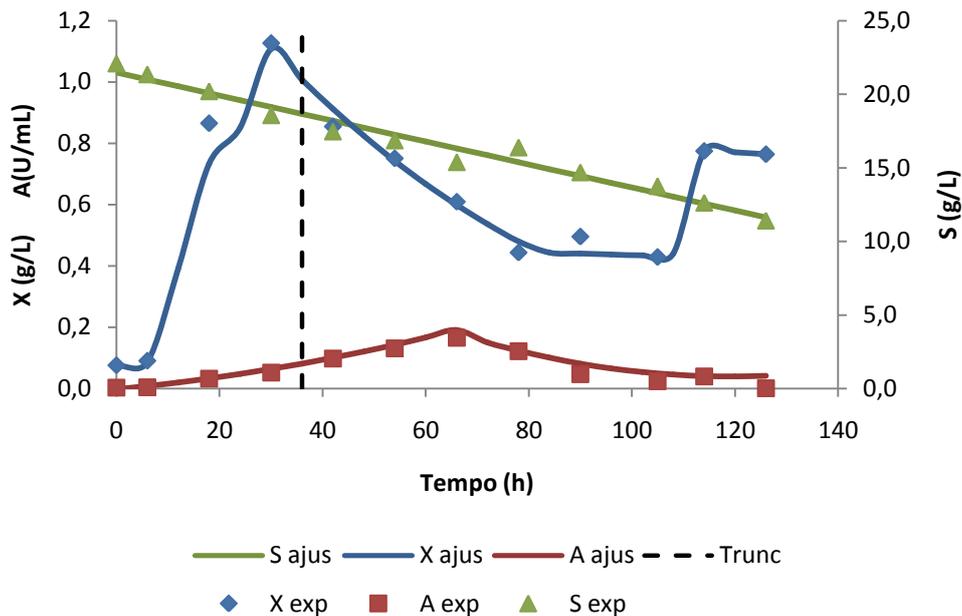


Figura 7.3 - Meio M9. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 126h. (MARQUES, 2004).

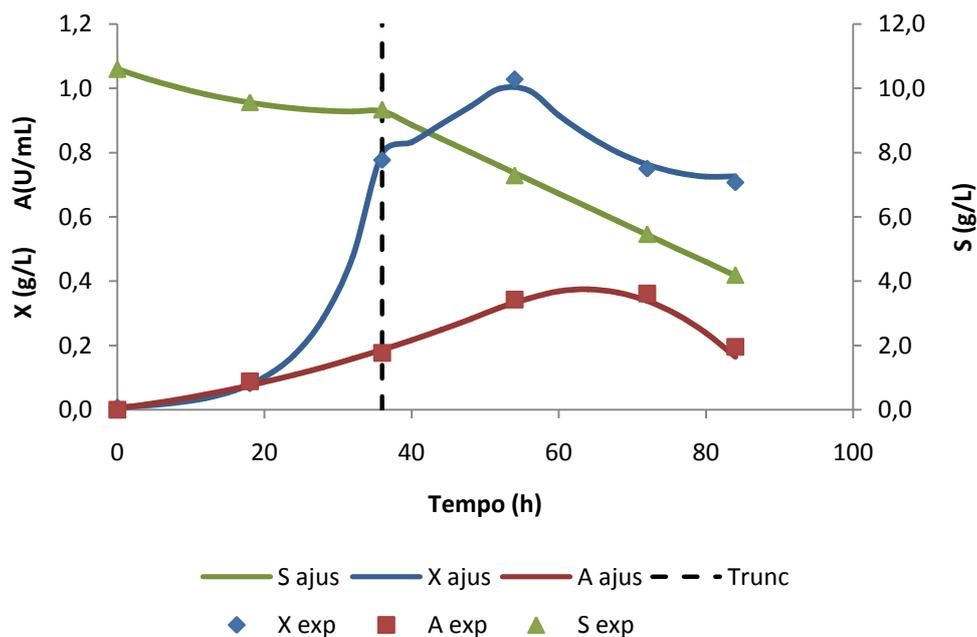


Figura 7.4 - Meio M34. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h. (MARQUES, 2004).

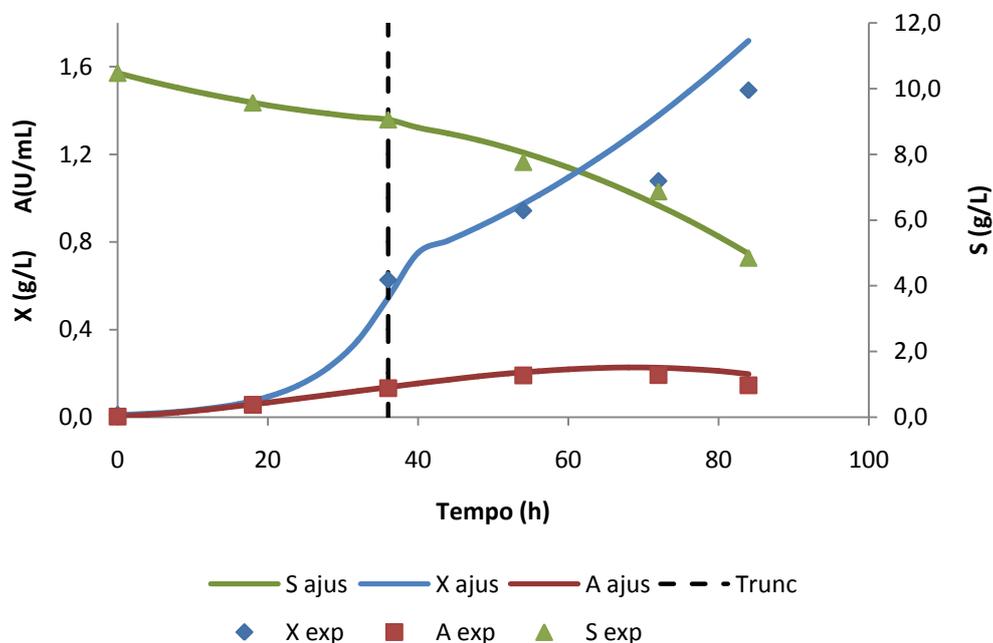


Figura 7.5 - Meio M56. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 84h. (MARQUES, 2004).

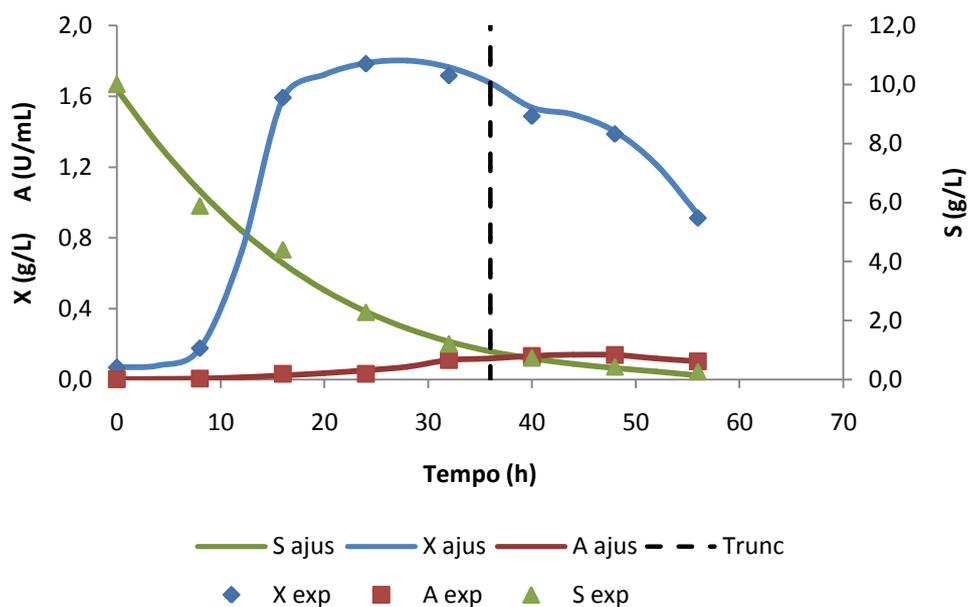


Figura 7.6 - Meio E3A. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).

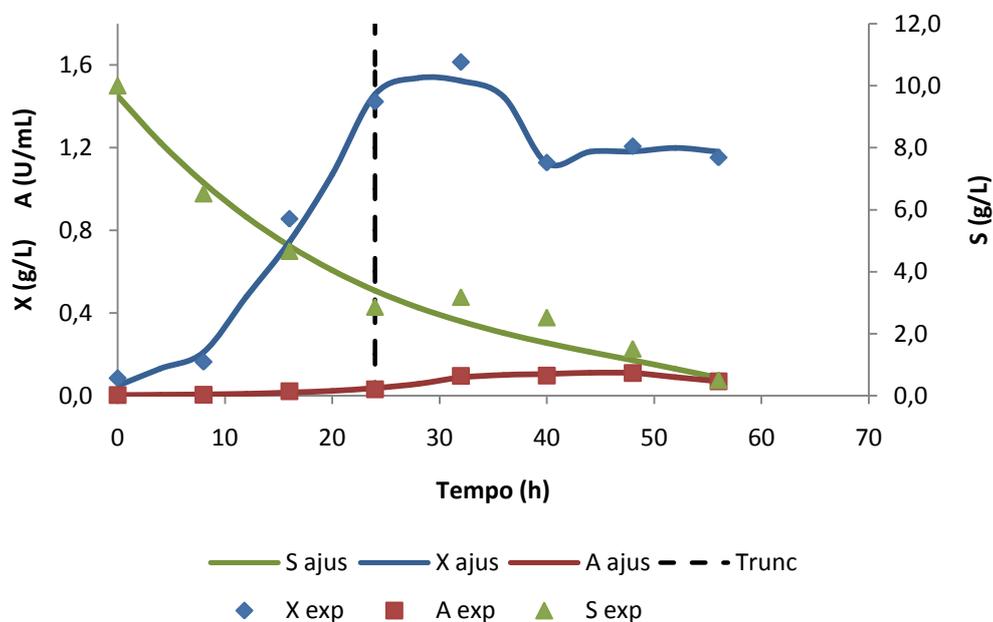


Figura 7.7 - Meio E3B. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).

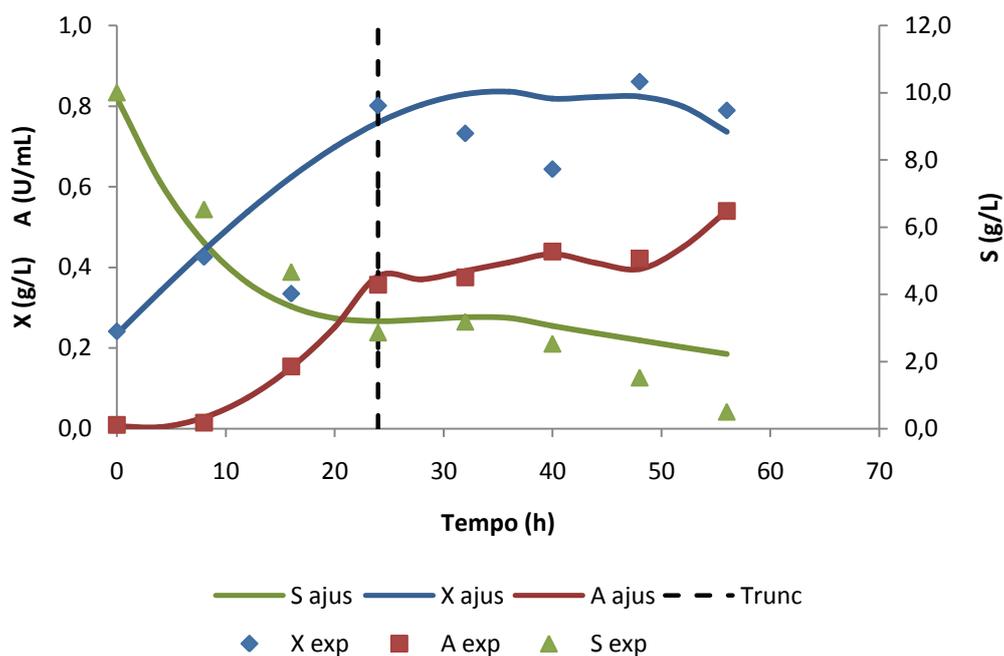


Figura 7.8 - Meio E5A. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).

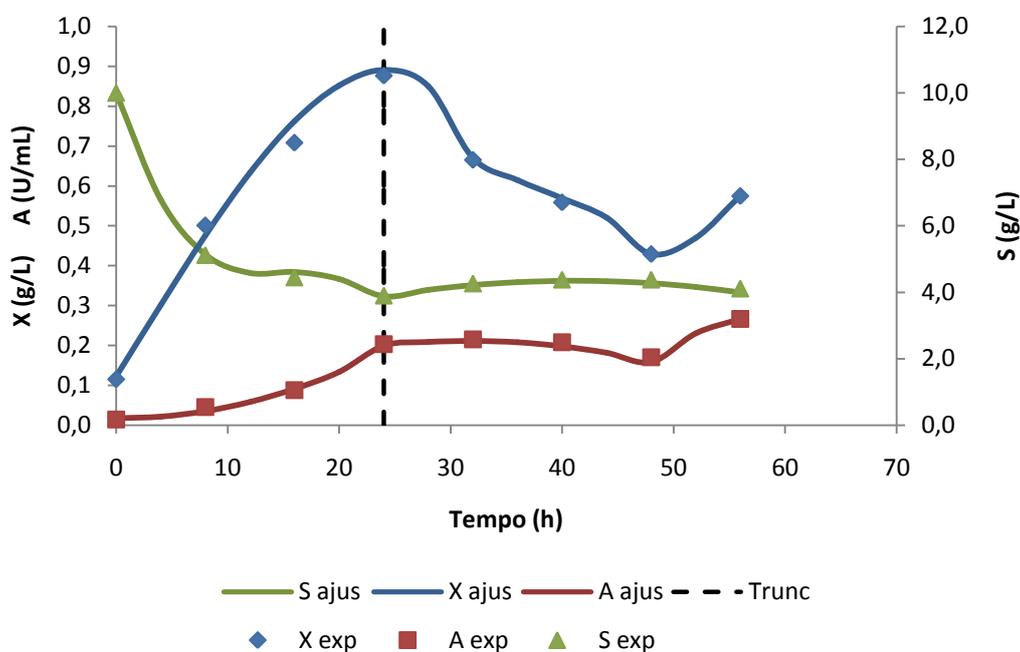


Figura 7.9 - Meio E5F. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).

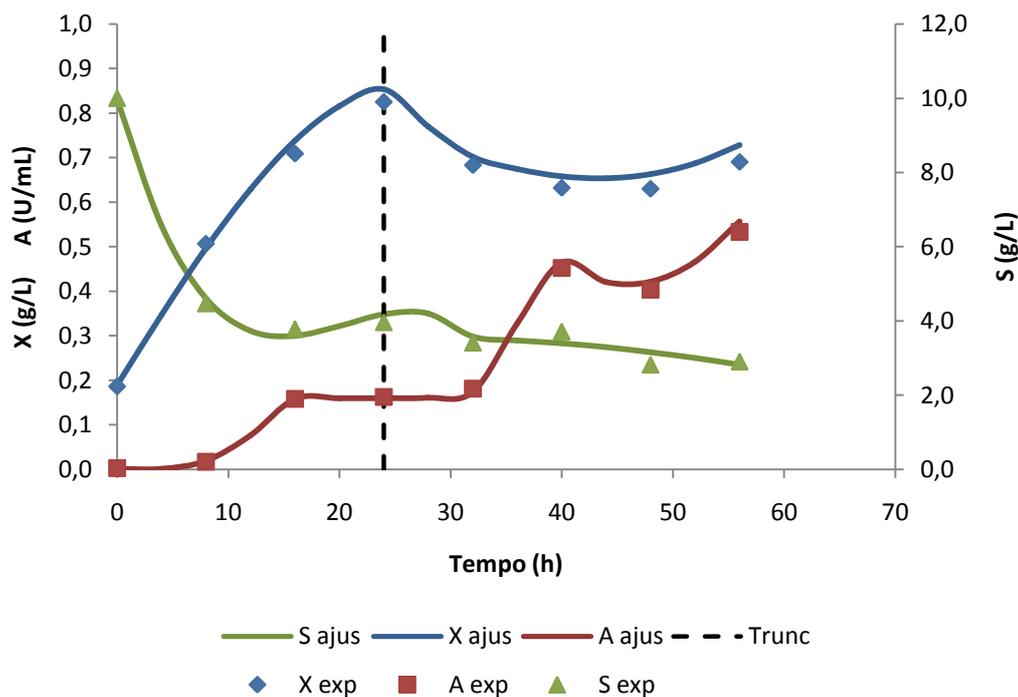


Figura 7.10 - Meio E6A. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).

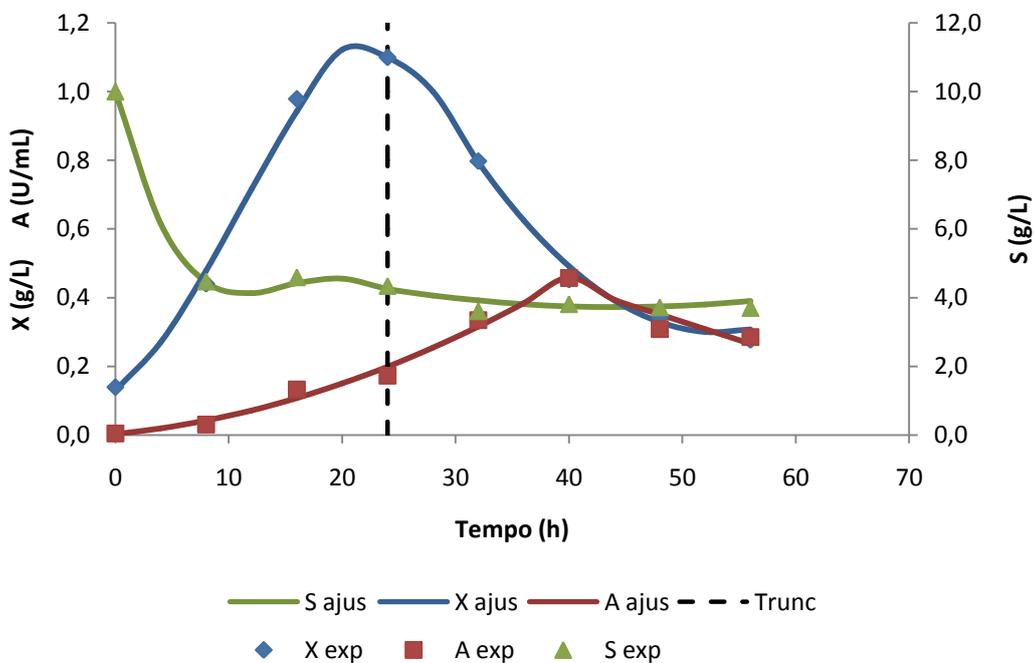


Figura 7.11 - Meio E6F. Dados experimentais medidos e ajustados de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e atividade enzimática (A) em função do tempo de cultivo – 56h. (CALDERARO, 2007).

8. ANEXO II

Neste anexo será apresentado um breve descritivo do algoritmo de resolução das equações diferenciais, utilizado neste trabalho e implementado no MATLAB[®]. Foram utilizados 3 arquivos *m-file*, um com o nome de “Equacoes_diferenciais”, outro com o nome “Func_Obj” e outro com o nome “Funcao”.

- ✓ Abrindo o programa MATLAB[®], cria-se um arquivo *m-file* para a representação das equações diferenciais a serem resolvidas, neste trabalho foi o arquivo “Equacoes_diferenciais”.
 - Através da função *function* define-se o nome da função que conterà as equações diferenciais assim como as variáveis que comporão esta equação;
 - Escreve-se os parâmetros das equações diferenciais atribuindo-os à variável local *par()*;
 - Escreve-se as equações diferenciais que serão resolvidas pelo algoritmo e salva-se o arquivo *m-file* que será “chamado” no arquivo da função objetivo.
- ✓ Cria-se um arquivo do Excel na extensão ‘.xls’ apenas contendo os valores dos dados experimentais escritos na forma de coluna, por exemplo, os dados de tempo na coluna ‘A’, os dados de concentração celular (X) na coluna ‘B’, os dados de atividade enzimática (A) na coluna ‘C’ e os dados de concentração de substrato (S) na coluna ‘D’, salva-se o arquivo com o nome que será escrito no *m-file* principal de resolução das EDO’s.
- ✓ Depois cria-se um novo arquivo *m-file* para definir a função objetivo, que servirá de critério de parada para a estimação de parâmetros, neste trabalho foi o arquivo com o nome de “Func_Obj”.
 - Dentro de um novo arquivo *m-file* insere-se nova função através do comando *function*, definindo a função objetivo, contendo as variáveis dependente e independente, assim como as condições de contorno a serem utilizadas na resolução das equações diferenciais;
 - Insere-se as variáveis que receberão o resultado da resolução do sistema de equações diferenciais, as variáveis experimentais que serão lidas em arquivo do Excel e a variável indicativa do tempo final da integração,

utiliza-se a função *global* para que as variáveis estejam disponíveis para serem lidas e modificadas durante o processo de resolução do sistema de EDO's.

- Define-se onde o Matlab buscará o valor do tempo final para a resolução do sistema de EDO's e escreve-se a função na forma de resolução do sistema de equações diferenciais escrito no primeiro *m-file*, utilizando a função *ode45* que implementa um esquema de resolução de sistemas de equações diferenciais com valores iniciais utilizando o método Runge-Kutta.
 - Escreve-se os critérios de avaliação do erro, apresentados na seção 3.2.3, nas equações 3.27 a 3.30, representando os valores experimentais de X, A e S atribuindo a estas variáveis uma referência aos dados experimentais que serão buscados no arquivo do Excel, por exemplo, chamando X de *exper(:,2)*, A de *exper(:,3)* e S de *exper(:,4)* sendo que os valores experimentais atribuídos devem estar respectivamente na 2ª coluna do arquivo do Excel para X, na 3ª coluna do mesmo arquivo para A e na 4ª coluna para S. Define-se também os valores ajustados de X, A e S a serem inseridos na fórmula do erro. Neste trabalho, estas variáveis foram tomadas como a interpolação linear pela função *interp* do Matlab dos dados de tempo e dos respectivos valores de X, A e S após a resolução do sistema de EDO's.
 - Salva-se o *m-file* com um nome conhecido que será escrito no arquivo principal de resolução das EDO's.
- ✓ Abrindo um novo arquivo *m-file*, implementa-se o algoritmo que resolverá o sistema de equações diferenciais escrito, utilizando os critérios adotados pela função objetivo também descrita. Neste trabalho foi utilizado o arquivo com o nome de "Funcao".
- Declaram-se as variáveis globais novamente e "chama-se" os dados experimentais do arquivo do Excel escrito através da função *xlsread* (*'nome do arquivo contendo os dados experimentais'*), atribuindo-os às variáveis experimentais escritas, neste caso, *exper=xlsread('nome')*.
 - Escreve-se o *set* de otimização dos parâmetros através da função *optimset*, contendo a função *TolFun* para definir a precisão desejada da resolução dos parâmetros, seguida pela função *eps* que representa a

precisão numérica da ordem de 10^{-16} , determinando a tolerância da convergência dos processos iterativos, em seguida utiliza-se a função *LevenbergMarquardt*, seguida do termo “on”, para ativar a resolução por este método, acrescenta-se o número máximo de funções a serem avaliadas pela função *MaxFunEval*, neste trabalho, foi utilizado o valor de 6500, e o número máximo de iterações a ser realizado *MaxIter*, sendo utilizado o valor de 3000.

- Deve-se declarar as variáveis presentes nas equações diferenciais descritas no respectivo *m-file* junto com seus valores iniciais.
- Define-se as condições iniciais do problema, neste trabalho foram as condições iniciais X_0 , A_0 e S_0 , deve-se atribuir o valor para as condições iniciais, “chamando-as” do arquivo do Excel.
- Depois realiza-se a minimização da função objetivo, através da função *fminsearch*, que implementa o algoritmo de busca simplex, de Nelder-Mead, através da alteração dos componentes de “x” para atingir o mínimo da função. Neste momento, dentro da função *fminsearch*, “busca-se” o arquivo *m-file* que contém a função objetivo, junto com os parâmetros presentes nas equações diferenciais, os dados experimentais e as condições de contorno do problema.
- Escreve-se então as funções para plotar os gráficos dos valores experimentais e das curvas obtidas pelos modelos, utilizando a função *plot* e as função que completam o gráfico como, *title*, *xlabel*, *ylabel* e *legend*.
- Salva-se o arquivo e ele está apto a ser executado.