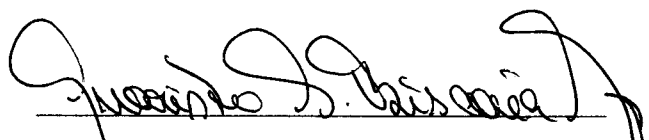


**Estudos do Processo de Obtenção de Proteínas Celulares
a partir de Gás Natural**

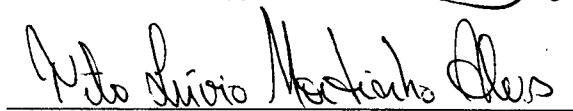
Agenor Fungo Junior

Tese submetida ao corpo docente da Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências em Engenharia Química.

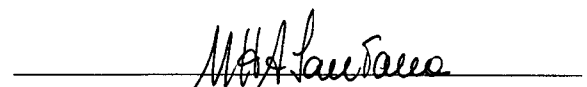
Aprovada por:


Prof. Evaristo Chalbaud Biscaia Jr., D. Sc.
(Presidente)


Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr., D. Ing.


Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D. Sc.


Profª. Elba P. S. Bon, Ph. D.


Profª. Maria Helena Andrade Santana, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Junho de 1995

FURIGO JR., AGENOR

Estudos do Processo de Obtenção de Proteínas Celulares a partir de Gás Natural [Rio de Janeiro], 1995

XI, 155p., 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 1995)

Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Processos bioquímicos
2. Modelagem cinética
3. *Methylococcus capsulatus*
4. Proteínas celulares
5. Gás natural

I. COPPE/UFRJ II. Título (série).

Às pessoas que amo:
Minha esposa Neusa,
meus filhos Neto e Karina,
minha mãe Alba , meu pai em memória e
meus irmãos Adilson, Augusto e Stella.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Evaristo pelo apoio, orientação e amizade.

Ao professor John Villadsen por tornar possível a realização do trabalho experimental e o intercâmbio entre a COPPE e a DTU, colocando à minha disposição todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Mogens H. Jørgensen pela amizade e pela colaboração na realização do trabalho experimental.

Aos professores Geraldo Lippel, Maria Helena, Elba e Tito Lívio por gentilmente aceitarem o convite para participar desta banca de tese.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química da UFSC que me apoiaram e contribuíram para que o trabalho fosse realizado.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao seu Departamento de Engenharia Química pelas autorizações de afastamento concedidas.

À CAPES pelo apoio financeiro durante 36 meses da realização do doutorado.

Aos professores do PEQ/COPPE/UFRJ por terem contribuído para a minha formação com dedicação e paciência.

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

**Estudos do Processo de Obtenção de Proteínas Celulares
a partir de Gás Natural**

Agenor Furigo Junior

Junho, 1995

Orientador: Professor Evaristo Chalbaud Biscaia Jr.
Programa de Engenharia Química, COPPE/UFRJ
Co-Orientador: Professor John Villadsen
Universidade Técnica da Dinamarca

RESUMO

O termo proteínas celulares ou *single cell protein* (SCP) é aplicada para se referir à biomassa microbiana rica em proteínas utilizada com propósitos alimentares. Além da excelente qualidade nutricional, vários produtos de interesse industrial como enzimas e polímeros podem ser obtidos da biomassa desses microorganismos.

No presente trabalho, uma cultura mista de bactérias, cujo principal constituinte é *Methylococcus capsulatus* (Bath), é cultivada continuamente em um fermentador agitado clássico com temperatura e pH constantes. Amônia é a fonte de nitrogênio e o nutriente limitante do crescimento. Gás natural é utilizado como a única fonte de carbono e energia e ar é empregado como a fonte de oxigênio. A fermentação é realizada sem assepsia.

São apresentados resultados experimentais e parâmetros, como velocidade específica de crescimento máxima e fatores de conversão de nitrogênio e carbono em células secas, que caracterizam a cultura em estado estacionário. Propõe-se um modelo para representar o crescimento celular com limitação de amônia, levando-se em consideração observações experimentais que sugerem o acúmulo de carbono pela célula.

O excesso de nitrogênio mostra-se uma preocupação tecnológica importante no processo de produção dos microorganismos metilotróficos estudados, uma vez que este excesso provoca a produção de nitrito que, em determinado nível, inibe o crescimento da cultura. Assim, estuda-se a assimilação e eliminação das formas de nitrogênio pela cultura, que é imperativo no auxílio do controle dos níveis de nitrito quando da aplicação do processo em estudo.

Testes dinâmicos experimentais de pulso de amônia são realizados e as concentrações de nitrito, nitrato e amônia são acompanhadas no tempo. A resposta experimental transiente aos pulsos de amônia apresenta picos característicos de concentração de nitrito e nitrato no meio fermentativo.

Com base nessas respostas experimentais típicas, propõe-se um modelo matemático para descrever a dinâmica da assimilação do nitrogênio pela cultura. O modelo proposto é simulado e simplificado para reduzir o número de parâmetros. Os parâmetros do modelo simplificado são estimados utilizando-se os resultados experimentais obtidos e o pacote de estimação de parâmetros desenvolvido para o trabalho.

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

**Studies of the Single Cell Protein Production Process
from Natural Gas**

Agenor Furigo Junior

June, 1995

Thesis Supervisor: Professor Evaristo Chalbaud Biscaia Jr.
Chemical Engineering Program, COPPE/UFRJ
Professor John Villadsen
Technical University of Denmark

ABSTRACT

The term single cell protein (SCP) is used to refer to the biomass rich in protein used as food purpose. Besides the nutritional quality, other attractive industrial products, such as enzymes and polymers, may be produced from microorganism biomass.

In this work, a mixed culture of bacteria, where *Methylococcus capsulatus* (Bath) is the main species, is grown in a continuous stirred tank fermentor with fixed temperature and pH. Ammonia is the nitrogen source and the limiting nutrient. Natural gas is the sole carbon and energy source, and air is used as the oxygen source. The process is carried out without sterilization.

Important observations from the steady state experimental data and typical parameters, e.g. maximum specific growth rate and cell yields on ammonia and methane are presented. A model is proposed to fit the cellular growth at the steady state, taking into account the build up of carbon in the cells.

Transient results show that the excess of nitrogen is an important technological factor for the process of production of the methylotrophic culture studied, since the excess of ammonia produces nitrite that, at certain amount, inhibits the culture growth. Therefore, the study of assimilation and elimination of nitrogen compounds by the culture becomes an important contribution to the control of nitrite level when the present process is applied.

Dynamic experimental tests of ammonia pulse are carried out and the concentrations of nitrite, nitrate and ammonia are followed during the transient. The experimental response to the ammonia pulse produces typical peaks of nitrite and nitrate in the broth.

Based on the experimental typical data, a mathematical model is developed to represent the dynamic assimilation of the nitrogen compounds by the culture. The proposed model is simulated and simplified in order to reduce the number of parameters. The parameters of the simplified model are estimated using the experimental data and the parameter estimation program developed for this study.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Introdução	1
CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica	4
2.1 - Aspectos Biológicos e Tecnológicos de Metilotróficos	4
2.1.1 - Single Cell Protein (SCP)	4
2.1.2 - Microorganismos que Metabolizam o Metano e Metanol	7
2.1.3 - Bioquímica de Utilização do Metano por Bactérias Metilotróficas	8
2.1.3.1 - Fator de Conversão para Metilotróficos	10
2.1.4 - Principais Problemas Envolvidos no Processo de Produção de SCP	11
2.1.5 - Fermentadores para a Produção de SCP	13
2.2 - Modelagem Cinética de Sistemas de Crescimento Microbianos	15
2.2.1 - Classificação de Modelos de Crescimento Microbiano	15
2.2.2 - Modelos Não Estruturados	17
2.2.3 - Modelos Estruturados	19
2.2.3.1 - Modelos Compartimentados	20
2.2.3.2 - Modelos Tipo Gargalo	25
2.2.3.3 - Modelos Estruturados Bioquimicamente	26
2.2.4 - Modelos Cibernéticos	27
CAPÍTULO 3 - Realização Experimental	29
3.1 - Cultura	29
3.2 - Substratos	29
3.3 - Equipamentos e Procedimentos	30
3.4 - Condições de Crescimento	31
3.5 - Métodos de Medida	33
3.5.1 - Concentração de Células	33

3.5.2 - Determinação de Carbono	33
3.5.3 - Determinação de nitrogênio nas células	34
3.5.4 - Determinação de Nitrogênio na Fase Líquida	35
3.5.5 - Concentração de Gases	35
3.6 - Resultados Preliminares	36
3.6.1 - Caracterização do Estado Estacionário	36
3.6.2 - Experimentos de Pulso	37
3.6.3 - Experimentos de Variação Degrau	39
 CAPÍTULO 4 - Caracterização do Estado Estacionário	 42
4.1 - Células	42
4.2 - Nitrogênio Extracelular	44
4.3 - Nitrogênio Intracelular	45
4.4 - Produção de Gás Carbônico	47
4.5 - Conteúdo de Carbono	48
4.6 - Consumo de Carbono	49
4.7 - Massa Molar das Células	50
4.8 - Conversão de Carbono em Células	51
4.9 - Conclusões	51
 CAPÍTULO 5 - Modelagem do Estado Estacionário	 52
5.1 - Descrição do Modelo	52
5.2 - Cinética das Etapas	54
5.3 - Equações de Balanço de Massa	56
5.4 - Estimativa de Parâmetros	58
5.5 - Previsões do Modelo	61
5.6 - Conclusões	65
 CAPÍTULO 6 - Crescimento com Excesso de Nitrogênio	 67
6.1 - Introdução	67
6.2 - Procedimento Experimental	67
6.3 - Resultados Experimentais e Discussão	68

6.4 - Conclusões	74
CAPÍTULO 7 - Modelagem da Assimilação do Nitrogênio	75
7.1 - Introdução	75
7.2 - Considerações Físicas do Modelo	76
7.3 - Modelo Matemático	78
7.4 - Resolução Numérica do Modelo	89
7.5 - Modelo Simplificado	95
7.6 - Obtenção dos Parâmetros para o Modelo Simplificado	100
7.6.1 - Definição de Constantes	100
7.6.2 - Estimativa do Parâmetro A_N	102
7.6.3 - Estimativa de Parâmetros	106
7.7 - Discussões sobre o Modelo Simplificado	113
7.7.1 - Comportamento da Concentração de Células	113
7.7.2 - Atraso na Produção de Nitrato	116
7.7.3 - Picos de Nitrito	116
7.7.4 - Caráter Inibitório na Assimilação de Amônia	117
7.8 - Conclusões	118
CAPÍTULO 8 - Conclusões e Sugestões	120
BIBLIOGRAFIA	123
NOMENCLATURA	133
Apêndice A - Desenvolvimento do Meio Mineral	140
Apêndice B - Resultados Experimentais do Estado Estacionário	144
Apêndice C - Resultados Experimentais dos Testes de Pulso	148
Apêndice D - Programa de Estimação de Parâmetros e Simulação	152

Capítulo 1

Introdução

O termo proteínas celulares ou *single cell protein* (SCP) é aplicado para se referir à biomassa microbiana rica em proteínas utilizada com propósitos alimentares. Além da excelente qualidade nutricional, vários produtos de interesse industrial como enzimas e polímeros podem, também, ser obtidos a partir da biomassa desses microorganismos.

A possibilidade de se obter proteínas a partir de hidrocarbonetos utilizando-se leveduras e bactérias é bastante conhecida. Em particular, bactérias metilotróficas podem ser cultivadas em condições aeróbicas utilizando compostos C_1 como única fonte de carbono e energia.

O uso de gás natural (cujo principal constituinte é o metano) como substrato para o crescimento celular é bastante atrativo devido ao seu baixo custo, abundância, alta pureza e a possibilidade de fácil remoção do metano não utilizado.

A produção de proteínas é uma alternativa para o melhor aproveitamento dos recursos brasileiros de gás natural. Uma parcela significativa do gás natural associado produzido no Brasil é queimada junto aos poços de petróleo e campos de gás ainda são mantidos sem exploração por falta de alternativa econômica de aproveitamento.

Contudo, alguns problemas tecnológicos devem ser sanados para que esse processo venha a acontecer competitivamente. Um dos problemas é a dificuldade de dissolução dos substratos gasosos no meio fermentativo que vem sendo estudado através da aplicação de novos tipos de fermentadores.

O conhecimento mais profundo do processo e, conseqüentemente, a modelagem do crescimento das bactérias é essencial para se otimizar e controlar as condições de cultivo das mesmas e contribuir para a aplicação prática do processo.

Dentre as motivações que nos levaram à escolha do tema "Estudos do Processo de Obtenção de Proteínas Celulares a partir de Gás Natural" destacam-se a importância, atratividade e praticidade do processo, a não convencionalidade da fermentação (onde a fonte

de carbono é gasosa) e o acompanhamento do desenvolvimento da área, extremamente atraente, de modelagem de crescimento microbiano, que passa de uma fase de modelagem não estruturada para a modelagem estruturada, combinando maiores detalhes matemáticos com maior compreensão biológica.

O presente trabalho tem como objetivo, além da apresentação de resultados experimentais, a modelagem e a simulação de aspectos estacionários e dinâmicos do processo de crescimento de uma cultura de bactérias metanotróficas.

Para se atingir esse objetivo, uma cultura mista de bactérias, cujo principal constituinte é *Methylococcus capsulatus* (Bath), é cultivada continuamente em um fermentador agitado clássico com temperatura e pH constantes. Amônia é a fonte de nitrogênio e o substrato que limita o crescimento. Gás natural é utilizado como a única fonte de carbono e energia. Ar é empregado como a fonte de oxigênio e a fermentação é realizada sem assepsia.

A fonte de carbono, nitrogênio e oxigênio foram escolhidas visando aplicações industriais, assim como o uso da cultura mista que, devido à sua resistência a contaminações, facilitam estas aplicações sem a necessidade de esterilização.

Resultados preliminares mostraram que a fonte de nitrogênio, amônia, é um nutriente chave no processo, pois o seu excesso no meio fermentativo provoca o aparecimento de nitrito que em determinado nível é acompanhado de uma inibição do crescimento da cultura.

Uma vez que o excesso de amônia é uma preocupação tecnológica importante no processo de produção desses microorganismos, estudou-se o crescimento da cultura tendo a fonte de nitrogênio como o nutriente limitante do processo de crescimento. Assim, justifica-se o esforço de se obter dados experimentais que caracterizem a cultura nestas condições.

Neste trabalho são apresentados resultados experimentais que pretendem caracterizar o estado estacionário do cultivo contínuo da cultura mista de bactérias metanotróficas utilizada.

O estudo da assimilação e eliminação das formas de nitrogênio pela cultura é imperativo para auxiliar no controle dos níveis de nitrito quando da aplicação do processo. Para tanto, testes dinâmicos experimentais de pulso de amônia são realizados e as concentrações de nitrito, nitrato e amônia são acompanhadas durante o período transiente.

Com base na resposta experimental obtida são propostos modelos matemáticos para representar o estado estacionário e, também, a fase transiente do processo de assimilação de

amônia. Os parâmetros dos modelos desenvolvidos são estimados e estes simulados.

Espera-se que o trabalho desenvolvido transmita experiência para a área de Processos Biotecnológicos, não só sobre um processo específico, mas no tratamento matemático de resultados experimentais, muitas vezes negligenciado em trabalhos da área, e em modelos de crescimento microbiano. Desta forma, espera-se contribuir para o desenvolvimento da área de Processos Biotecnológicos, considerada uma das prioritárias no contexto da Ciência e Tecnologia do país.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

A primeira parte do presente capítulo tem como objetivo apresentar a revisão bibliográfica do lado específico do trabalho, ou seja, o processo de produção de metilotróficos a partir de metano. Serão dadas características tecnológicas do processo, com atenção aos seus principais problemas. Serão ressaltados, também, o tipo de microorganismo utilizado e seus aspectos metabólicos que poderão ser importantes na montagem de um modelo de crescimento estruturado. Por fim, será apresentado o tipo de fermentador normalmente utilizado neste processo. A segunda parte do capítulo pretende mostrar a complexidade de um sistema microbiano e as abordagens mais comuns no desenvolvimento de modelos não segregados de crescimento celular. A intenção não é transcrever grande parte dos modelos propostos na literatura para representar sistemas específicos, e sim mostrar as linhas gerais da construção de modelos de crescimento e suas características. Alguns modelos simples, considerados importantes do ponto de vista histórico, serão comentados.

2.1 - Aspectos Biológicos e Tecnológicos de Metilotróficos

2.1.1 - *Single Cell Protein* (SCP)

O termo *single cell protein* (SCP) é utilizado atualmente para se referir à biomassa microbiana usada como alimento e como aditivo alimentar. SCP possui grande valor nutritivo devido ao seu alto conteúdo de proteínas e vitaminas e à presença de uma gama completa de aminoácidos essenciais. Assim, a produção de SCP é uma alternativa às fontes alimentares tradicionais. A Tabela (3.1) apresenta valores médios da composição de aminoácidos da "Bioprotein" (SCP produzido pela Dansk Bioprotein A/S) onde as proteínas representam 68,3 % da matéria seca.

Embora a proteína microbiana possa ser utilizada diretamente na alimentação humana,

atualmente ela é utilizada de forma indireta compondo ração alimentar de animais. O uso de SCP em larga escala na alimentação humana, muito estudado nas décadas de 50 e 60, foi abandonado devido principalmente à idéia errônea de que esta biomassa possa conter compostos tóxicos. O único constituinte conhecido de SCP que pode causar problemas em humanos é um grupo de ácidos nucléicos denominado purinas que podem causar gota se a injeção de líquidos for baixa. Outros alimentos normalmente consumidos também são ricos em purinas: como fígado, carne, ovos e legumes (Goldberg e Rokem (1991)). Contudo, tratamentos usualmente térmicos são utilizados para ativar as enzimas RNAases promovendo uma redução no conteúdo de nucleotídeos da SCP , adequando-se o produto às necessidades humanas. Os tratamentos térmicos, porém, devem ser realizados com cuidado, pois podem reduzir o nível de algumas vitaminas, bem como reduzir a digestibilidade de proteínas (Goldeberg e Rokem (1991)).

aminoácido	composição (%)	aminoácido	composição (%)
Alanina	4,3	Lisina	3,9
Arginina	4,2	Metionina	1,8
A.aspártico	5,5	Fenilalanina	2,9
Cisteína	0,5	Prolina	2,5
A.glutâmico	7,2	Serina	2,5
Glicina	3,2	Treonina	2,8
Histidina	2,0	Tirosina	2,4
Isoleucina	2,9	Triptofana	1,3
Leucina	4,8	Valina	4,0

Tabela 3.1 - Média da composição de aminoácidos na SCP produzida pela Dansk Bioprotein A/S.

Pode-se produzir SCP na forma de bactérias, leveduras e fungos, sendo hidrocarbonetos, metano, metanol, celulose e materiais residuais os principais substratos hoje

estudados.

Historicamente, as primeiras tentativas de se utilizar biossíntese de concentrados protéico-vitamínicos para alimentação datam da I Guerra Mundial, onde a Alemanha substituiu 60% da alimentação outrora importada por biomassa protéica na forma da levedura *Candida utilis* obtida a partir de carboidratos (Rimmington, 1985).

A crise do petróleo de 1973 mudou drasticamente a situação de preço que levou a um dramático colapso de linhas de produção de larga escala de SCP. A antiga União Soviética foi um dos poucos oásis em que a indústria não foi destruída, pois a situação de preço era favorável, além de considerações políticas (independência em relação à importação de soja dos Estados Unidos). Em 1989 a produção de SCP na então União Soviética atingiu 1,8 milhões de toneladas por ano (Biryukov (1990)).

A mais popular SCP da antiga União Soviética é um produto denominado "Paprin" obtido de n-alcanos (parafinas) utilizando leveduras como microorganismos produtores. Porém, SCP também é produzido via outros substratos: hidrolisados de madeira, etanol sintético, metanol e uma planta em escala industrial em Volgograd, utilizando gás natural e utilizando bactérias como microorganismos produtores.

Do lado ocidental, um exemplo muito citado de produção comercial de SCP é o da Imperial Chemical Industries (ICI) que tinha uma unidade em Billingham, Inglaterra, produzindo 50000 t/ano de SCP denominada "Pruteen", bactéria *Methylophilus methylotrophus*, utilizando metanol como substrato.

O uso de compostos C_1 , particularmente metanol e metano, é de grande interesse econômico uma vez que esses são produtos comuns em operações industriais. Metanol é o substrato C_1 mais utilizado para a produção de SCP. Metano é o maior constituinte do gás natural associado a campos petrolíferos e pode, também, ser sintetizado na gaseificação do carvão e a partir de biomassa. Porém, é muito rara a referência a processos em escala industrial que utilizam diretamente metano como matéria prima na produção de SCP. Isso se deve principalmente à baixa solubilidade do metano no meio fermentativo que exige alta tecnologia para o sistema de fermentação. Atualmente, a Dansk Bioprotein A.S. (Dinamarca) desenvolve um processo para a produção de SCP a partir de gás natural que garante ser competitivo economicamente. Há processos industriais, contudo, como o da ICI, que utilizam o metanol proveniente da oxidação do metano como substrato na produção de SCP.

A produção de SCP a partir de metano oferece vantagens por o substrato ser encontrado em forma relativamente pura e barata (gás natural ou biogás), além de não conter resíduos tóxicos e de a esterilização ser de pouca importância. Porém, há desvantagens, como a natureza gasosa do metano e sua baixa solubilidade no caldo fermentativo e, também, sua inflamabilidade que requer tecnologia na fabricação de reatores oferecendo restrições ao projeto dos mesmos.

2.1.2 - Microorganismos que Metabolizam o Metano e Metanol

Os microorganismos que utilizam metano e metanol como substratos estão classificados dentro do grupo dos microorganismos metilotróficos. Estes crescem apenas em substratos C_1 que não o gás carbônico (metano, metanol, formaldeído, etc.).

As opções biológicas para o uso de metano com substrato são bastante reduzidas pela própria característica de simplicidade química do metano (forma altamente reduzida). Poucas bactérias, altamente especializadas, podem utilizar o metano como substrato para seu crescimento. Algumas bactérias metilotróficas capazes de crescer em metano foram classificadas e podem ser citadas: *Methilophilus methylotrophus*, *Methylomonas clara*, *Methylococcus capsulatus*, *Methylococcus thermophilus*, *Methylocystis parvus*, *Methylosinus trichosporum*.

Denominam-se bactérias metanotróficas um pequeno subgrupo das bactérias metilotróficas que podem utilizar metano como a única fonte de carbono e energia. O caminho metabólico em metanotróficos é similar àquele de bactérias que utilizam metanol, e muitos metanotróficos podem também crescer em metanol, apesar de não haver uma ligação mais estreita entre esses dois tipos de bactérias. Os metanotróficos obrigatórios podem somente utilizar metano, metanol ou formaldeído como fonte de carbono e energia.

As bactérias metanotróficas são normalmente divididas na literatura em dois grupos, dependendo da morfologia de suas membranas internas e do tipo de fixação do formaldeído. As bactérias metanotróficas do tipo I fixam o formaldeído pela rota ribulose monofosfato, enquanto as do tipo II utilizam a rota da serina.

Muitos autores propõem uma cultura mista como melhor condição de desenvolvimento

de bactérias metilotróficas (Wilkinson *et al.* (1974), Wren *et al.* (1974), Harrison *et al.* (1975)). As vantagens da cultura mista sobre a cultura pura podem ser assim listadas: maior velocidade de crescimento, maior estabilidade, resistência à contaminação e redução dos problemas com espuma.

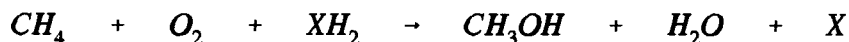
Tanto bactérias como leveduras podem metabolizar metano e metanol, embora leveduras que assimilem metano diretamente sejam muito raras. Bactérias possuem vantagens por conter de 60 a 70% de proteínas contra 45 a 55% para leveduras e por possuir, também, uma melhor distribuição de aminoácidos essenciais. Dijken e Harder (1975) apresentam o conversão teórica máxima de substrato (metano) em células para a levedura como sendo 54 % e para a bactéria 73%. A bactéria, também, requer meios fermentativos mais simples e cresce mais rapidamente que as leveduras, devido a um alto conteúdo de ácidos nucleicos (10 a 16%) comparados com leveduras (6 a 10%). Contudo, a alta concentração de ácidos nucleicos não é desejada por serem danosos à saúde humana. Os ácidos nucleicos, porém, podem ser reduzidos a posteriori como por exemplo em tratamento com choque térmico (Abu-Ruwaida *et al.*, 1988). O processo de produção de SCP com bactérias apresenta a desvantagem, em relação a leveduras, de ser mais difícil sua concentração, haja visto seu tamanho reduzido e sua densidade próxima à do meio fermentativo.

As bactérias que consomem metano são abundantes na natureza, onde essas, juntamente com as bactérias metanogênicas, colaboram para o ciclo do carbono. Metano é formado pelas metanogênicas como o produto final da degradação anaeróbica de matéria orgânica. Este metano é parcialmente oxidado a gás carbônico e parcialmente convertido em massa celular pelos metanotróficos.

Bactérias metilotróficas podem ser encontradas em solos de regiões produtoras de petróleo, em aterros sanitários, lagos, minas de carvão, etc. (onde há presença ou geração de metano). São encontradas junto à superfície ou em local onde haja condições aeróbicas. Estas, dependendo da espécie, podem se reproduzir bem a temperaturas que variam de 30 a 45 °C e em pH de 6,5 a 8,0 em meio mineral aquoso.

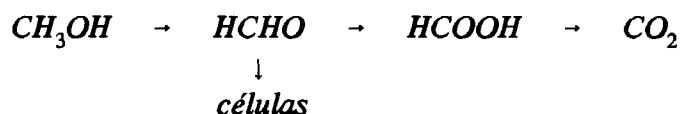
2.1.3 - Bioquímica de Utilização do Metano por Bactérias Metilotróficas

Embora o primeiro passo da assimilação do metano não esteja totalmente claro, é aceito que o metano é oxidado pelos microorganismos metilotróficos a metanol, incorporando também o oxigênio molecular, através da enzima metano-monooxigenase. Este processo é dependente de uma coenzima redutora.



Por causa de sua baixa especificidade para com o substrato, a enzima metano-monooxigenase é biologicamente interessante em relação às biotransformações oxidativas. Duas formas diferentes de metano-monooxigenase existem nos metanotróficos termofílicos *Methylococcus capsulatus* dependendo do nível de cobre no meio de crescimento (Carlsen *et al.*, 1991). Se o nível de cobre for baixo a enzima é citoplasmática (solúvel), enquanto a níveis elevados de cobre a enzima é ligada à membrada (particulada).

Há evidências e é consensualmente aceito que o metanol produzido pela oxidação do metano ou obtido diretamente do meio é oxidado pelas bactérias metilotróficas para formar biomassa e gás carbônico via os seguintes intermediários:



Uma fração do formaldeído produzido pela desidrogenação do metanol é convertida em massa celular (mecanismo assimilatório). O formaldeído restante é, então, oxidado a gás carbônico para gerar energia para o crescimento e metabolismo (mecanismo dissimilatório).

A assimilação do formaldeído para produção de células de bactérias metilotróficas pode se realizar pelos dois mecanismos claramente elucidados e apresentados na literatura: da serina e do ciclo ribulose monofosfato (RMP). Os trabalhos de Papoutsankis *et al.* (1978) e de Van Dijken e Harder (1975) fazem a comparação entre a via da serina e a do ciclo RMP, concluindo que microorganismos utilizando o ciclo RMP apresentam rendimento energético superior àqueles que utilizam o caminho da serina. Assim, microorganismos que utilizam a rota RMP para a fixação do formaldeído são os mais atrativos industrialmente.

2.1.3.1 - Fator de Conversão para Metilotróficos

Na utilização de microorganismos metilotróficos com a finalidade de produzir proteínas, produto de baixo valor agregado, o fator de conversão da fonte de carbono em células assume particular importância, devido ser a fonte de carbono bastante representativa nos custos de produção.

Dessa forma, visando a maximização do fator de conversão de carbono em células, há vários trabalhos na literatura (Leak e Dalton (1986), Anthony (1982), Van Dijken e Harder (1975), Papoutsakis *et al.* (1978)) tentando prever teoricamente o fator de conversão de carbono em células em organismos metilotróficos.

Esses trabalhos são baseados na observação de que a energia derivada de processos catabólicos é usada com aproximadamente a mesma eficiência máxima para a biossíntese de material celular em diferentes microorganismos. O valor experimental médio da necessidade de energia para a síntese de constituintes celulares é 10,5 gramas de células secas por mol de ATP gerado no processo catabólico, para microorganismos crescendo em substrato glicose. Este valor é aproximadamente igual para a síntese de material celular a partir de 3-fosfoglicerato (intermediário chave da assimilação de compostos C_1). Para se prever o fator de conversão de carbono em células é necessário, ainda, conhecer-se a composição celular (para a previsão da quantidade de força redutora requerida), o processo dissimilatório, bem como a energia requerida para a produção de 3-PGA a partir de C_1 (que depende da rota envolvida).

O desconhecimento de como é realizado o transporte de elétrons na rota de oxidação de compostos C_1 dificulta a previsão da conversão de carbono em células, pois não se sabe com certeza quantos moles de ATP são formados por mol de substrato oxidado. Desta forma, a literatura apresenta possibilidades de resultados que dependem do sistema de transporte de elétrons. Especificamente para o substrato metano, os resultados experimentais não ajudam muito a análise teórica devido aos resultados encontrados na literatura serem extremamente variados (de 0,6 a 1,1 g de células secas/g de metano). Van Dijken e Harder (1975) atribuem parte dessa variação nos resultados experimentais à dificuldade experimental de se fazer balanço material durante o crescimento para substratos gasosos.

Outra dificuldade é que a oxidação de compostos C_1 difere da oxidação de açúcares,

uma vez que oxigênio e força redutora podem ser consumidos em reações de oxidação, não produzindo, portanto, energia. A maioria dos metilotróficos crescendo em metano via monooxigenase, caso do microorganismo estudado, *Methylococcus capsulatus*, é limitada no seu rendimento de crescimento pela disponibilidade de força redutora (NAD(P)H) e não pelo ATP ou suprimento de carbono.

Segundo a literatura citada, a captura de metano se dá pela reação de oxidação de metano a metanol utilizando a enzima metano-monooxigenase. Essa reação de oxidação, embora exotérmica, consome oxigênio e força redutora não rendendo energia para a célula, muito pelo contrário, consumindo energia. Dessa forma, os fatores de conversão de metano em células previstos são menores que os fatores de conversão de metanol em células (utilizando base molar). Porém, medidas realizadas mostram conversões em metano tão altas ou por vezes maiores que o mesmo microorganismo crescendo em metanol. Uma explicação para o fenômeno dada por Anthony (1982) é que metano-monooxigenase continua presente quando do crescimento em metanol, catalisando a reação de oxidação do metanol. Dessa forma, força redutora não seria produzida e sim consumida, diminuindo, portanto, o fator de conversão de substrato em células.

2.1.4 - Principais Problemas Envolvidos no Processo de Produção de SCP via Metano

A primeira preocupação no processo de produção de SCP a partir do metano é com o meio fermentativo e a cultura de microorganismos. Este deve conter diversos íons sendo os mais importantes os sulfatos, fosfatos, ferro e cobre. A fonte de nitrogênio normalmente é amônia para a produção em larga escala, embora bactérias metilotróficas possam utilizar o nitrogênio molecular. Porém, a concentração de íons amônio (NH_4^+) deve ser mantida baixa uma vez que este pode ser oxidado para nitrito e nitrato pelas próprias bactérias. O crescimento é inibido pelo nitrito e energia é requerida para reduzir o nitrito e nitrato de volta à amônia (usada na síntese de proteínas).

O ideal em um biorreator SCP é que todo carbono proveniente da fonte de carbono termine como massa celular e gás carbônico. O gás natural, por sua vez, contém outros gases que não o metano (etano, propano, butano e pentano). As bactérias metilotróficas oxidam os

hidrocarbonetos a seus correspondentes álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos, porém estas não podem utilizá-los para a produção de biomassa ou degradá-los a CO_2 e H_2O . Estes metabólitos de hidrocarbonetos superiores podem inibir o processo de crescimento das bactérias. Por outro lado, mesmo quando metano puro é utilizado como substrato, bactérias morrem e desintegram-se na cultura. O acúmulo de proteínas e outros compostos no meio causam excesso de espuma, sendo necessário adicionar substâncias anti-espumantes ao meio que, via de regra, são prejudiciais ao crescimento dos microorganismos, principalmente por reduzirem a transferência de massa gás-líquido e, também, aparecerem como componente indesejável no produto final.

Por esses motivos, é de extrema importância a presença de diversas bactérias metilotróficas e outras bactérias que utilizem os diferentes metabólitos do meio fermentativo. Dentre as vantagens da utilização da cultura mista em relação à cultura pura estão: alta velocidade de crescimento, boa estabilidade, pouca tendência à formação de espuma, boa conversão de substrato em célula e resistência à contaminação (alguns processos são realizados sem assepsia).

Como qualquer processo fermentativo contínuo, a produtividade da fermentação é um dos parâmetros mais importantes a ser analisado. Porém, para efeito de otimização, deve-se analisar também a concentração de células à saída do fermentador. Isto se deve a dificuldades processuais em se concentrar células bacterianas. Assim, para se garantir concentrações mais altas no fermentador, pode-se optar por trabalhar com produtividades mais baixas que a produtividade ótima.

A concentração máxima de células atingida em trabalhos experimentais preliminares na Technical University of Denmark (DTU) foi da ordem de 30 g de matéria seca por litro de cultura. Contudo, concentrações de até 50 g/l são listadas na literatura (Barnes *et al.*, 1976) como possíveis de serem atingidas por uma cultura bacteriana sem aumentar grandemente a viscosidade do meio, o que prejudicaria a transferência de massa e a sua homogeneização.

A sequência de etapas de recuperação das bactérias é um tanto quanto complexa devido ao seu tamanho reduzido, à massa específica próxima à do meio e às baixas concentrações em que são produzidas. Faust e Präve (1983) apresentam diversos processos de recuperação da biomassa, sendo o mais eficiente a decantação por centrifugação seguida de processo de secagem.

Outro detalhe tecnológico que merece ser mencionado é a necessidade de refrigeração para o controle de temperatura no fermentador. O crescimento das bactérias metilotróficas é fortemente exotérmico e as bactérias, evidentemente, sensíveis a um descontrole da temperatura. Outro cuidado a ser tomado para se evitar riscos de explosão é trabalhar em faixas de mistura metano-ar dentro de limites seguros.

Uma das principais preocupações no projeto de fermentadores para a produção de SCP a partir de gás natural é a capacidade destes em promover a transferência de massa de oxigênio e metano para o meio fermentativo. Metano e oxigênio são muito pouco solúveis no meio fermentativo, assim o fermentador deve promover um ótimo contato gás-líquido para que a demanda de nutrientes requerida pelas bactérias seja satisfeita.

2.1.5 - Fermentadores para a Produção de SCP

Uma das principais características de um fermentador aerado é que este promove a homogeneização necessária do meio fermentativo e, também, a transferência de massa entre as bolhas de gás e o meio de cultura líquido. Porém, os processos de produção de SCP são normalmente realizados em fermentadores de tamanho considerável (20-2000 m³), sendo portanto os custos de agitação importantes para a viabilidade do processo.

Os fermentadores agitados clássicos utilizados em estudos de processos de produção de SCP em escala de laboratório são inaceitáveis em escala industrial de produção. Os agitadores mecânicos quando utilizados para fermentadores de grande porte perdem sua eficiência e não conseguem promover uma homogeneização satisfatória. A energia requerida para a promoção dessa agitação e para transferência de massa é elevada.

Os trabalhos realizados nessa área vêm confirmando, com absoluto consenso, que os fermentadores tipo *air-lift* (coluna de bolhas com recirculação) e suas variações (*loop reactors*) são os mais adequados para o processo de produção de SCP, onde há a necessidade de uma alta eficiência na transferência de massa.

O fermentador *air-lift* é uma torre com elevada relação altura/diâmetro e com ligação entre o líquido do topo e da base do equipamento. Gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor formando uma dispersão gás-fluido. As bolhas de gás sobem

através do líquido contido no tanque contatando-o e deslocando-o, provocando, assim, turbulência e uma auto-circulação dirigida. O gás é retirado no topo do equipamento. A turbulência gerada e a grande distância que as bolhas de gás devem atravessar em contato com o líquido promovem altos níveis de transferência de oxigênio que podem operar processos de produção de SCP em grande escala sem limitação de oxigênio local. A circulação em larga escala, então, é promovida por força hidrostática causada por diferença de densidade, enquanto as bolhas de gás promovem a mistura pontual.

O fermentador *air-lift* é de construção e manutenção fácil e barata, especialmente pela ausência de partes móveis. Este pode ter circulação interna (inserindo-se, por exemplo, um tubo central separando as seções de subida e descida das correntes) ou externa (que pode facilitar a transferência de energia).

Um dos mais notáveis exemplos desse tipo de equipamento é um fermentador do tipo *air-lift* com circulação e troca de calor externa, conhecido como *ICI pressure cycle fermentor*, que foi montado pela ICI para produzir SCP de metanol em Billingham, Inglaterra. O fermentador possui cerca de 60 metros de altura e o metanol era colocado em pequenas quantidades ao longo do fermentador, pois uma alta concentração de metanol diminui o fator de conversão em células. Hoje a unidade ainda produz SCP ("Mycoprotein"), porém utilizando como substrato hidrolisado de amido e como microorganismo um fungo filamentosso *Fusarium graminearum*.

As características hidrodinâmicas (*gas hold-up*, circulação da fase líquida, etc.) e de transferência de massa de fermentadores *air-lift* têm sido estudadas pela literatura (Bello *et al.* (1984)), Chisti *et al.* (1988), Sun *et al.* (1988), Siegel *et al.* (1986), etc.).

A respeito da produção de SCP a partir de substrato gasoso, no caso gás natural, não existe experiência prática na construção desses fermentadores em escala industrial. Contudo, parece inevitável o uso de fermentadores *air-lift* com uma alta relação altura/diâmetro e altas taxas de mistura para assegurar o completo consumo de substrato. O reciclo do gás é impraticável (metano não consumido contém outros gases que não são desejáveis: CO₂ e N₂) e inseguro.

Abordagens de novos tipos de fermentadores, sempre com o intuito de minimizar o consumo de energia por unidade de gás transferido bem como aumentar a facilidade de construção e operação de grandes unidades, vêm sendo consideradas recentemente,

especialmente o fermentador *ejector-loop* (Moresi *et al.* e Prokopet *et al.*, 1983) e o fermentador *jet-loop* (Blenke, 1979). Este último é utilizado no processo SCP da Dansk Bioprotein Production A/S que utiliza gás natural como substrato (unidade de 50 m³).

Nos dois tipos de fermentadores citados, a recirculação orientada é externa e obtida pelo uso de uma bomba centrífuga na seção de retorno, que injeta líquido ou dispersão gás-líquido no fermentador. Enquanto no fermentador *jet-loop* o gás é dispersado no líquido diretamente no fermentador de maneira semelhante à do *air-lift*, nos biorreatores *ejector-loop* o gás é dispersado no líquido na seção de retorno através de um ejetor gás-líquido. No ejetor o jato de líquido succiona o gás que é dispersado em pequenas bolhas, não necessitando, portanto, de compressor.

Há ainda a possibilidade de nos fermentadores *jet-loop* o gás ser dispersado no topo do equipamento. Assim, o tempo de contato gás-líquido é maior, pois as bolhas de gás terão de percorrer todo o caminho do tubo de ciclo antes de passar pelo fermentador propriamente dito. No entanto, cuidados devem ser tomados no projeto do mesmo para se evitar a coalescência das bolhas que diminui a área interfacial gás-líquido.

2.2 - Modelagem Cinética de Sistemas de Crescimento Microbianos

2.2.1 - Classificação de Modelos de Crescimento Microbiano

Os modelos matemáticos, embora úteis no entendimento de diversos tipos de processos, são uma descrição simplificada dos sistemas reais, uma vez que idealizações e simplificações são consideradas. Nos processos fermentativos, em particular, ressaltam-se um grande número de variáveis e processos envolvidos. As propriedades da célula e do meio fermentativo e as suas interações influenciam o crescimento celular e a formação de produtos com tal complexidade que torna a tarefa de descrição matemática das mesmas praticamente impossível.

A fase não biológica do sistema (meio) é multicomponente e, normalmente, multifásica. Contém os nutrientes necessários ao crescimento celular e recebe os produtos

finais do metabolismo celular. Propriedades do meio fermentativo, tais como concentrações, pH, temperatura e viscosidade, influenciam o crescimento celular e variam de modo geral no transcorrer da fermentação.

As características da população celular aumentam ainda mais a complexidade do sistema. Cada célula individualmente é um sistema multicomponente, heterogêneo e com um grande número de reações ocorrendo simultaneamente que estão sujeitas a um conjunto complexo de controles internos. Pesa-se, ainda, o fato da heterogenidade entre as células (idade, tamanho, atividade metabólica), sua adaptabilidade e suas mutações espontâneas.

Assim, nota-se a impraticabilidade de se formular um modelo levando em consideração todas as características e detalhes inerentes a um processo fermentativo e, conseqüentemente, há necessidade de idealizações e simplificações.

Uma das hipóteses comumente considerada é a de que apenas os substratos (fontes de carbono) são nutrientes limitantes e apenas suas concentrações no meio influenciam o crescimento celular e a formação de produtos. Na maioria dos casos existe apenas uma fonte de carbono. É considerado que os demais nutrientes e micronutrientes, embora essenciais para o processo fermentativo, estejam em excesso no meio ou controlados de forma que as possíveis variações das concentrações desses não sejam suficientes para alterar as velocidades globais envolvidas. É óbvio, que os produtos e nutrientes que possam inibir o desenvolvimento dos microorganismos devam ser considerados pelo modelo. Outras variáveis importantes do meio fermentativo como pH e temperatura comumente são consideradas constantes pois também são controladas externamente.

Os modelos de crescimento microbiano podem ser classificados de acordo com o grau de descrição da fase biológica como estruturados e não estruturados.

Os modelos não estruturados são aqueles em que uma única variável é usada para representar o material celular, normalmente massa ou quantidade de células. As células são representadas como se não tivessem estrutura interna e as composições intracelulares, chamadas de variáveis intrínsecas, não são consideradas.

O uso desse tipo de modelo, embora possua vantagens aplicativas pela sua simplicidade, é limitado a representar crescimentos balanceados, ou seja, em estado estacionário ou em pseudo estado estacionário, onde a composição interna da célula se mantém constante com o tempo. Já que os modelos não estruturados não podem descrever

mudanças nos componentes intracelulares, esses modelos, normalmente, não descrevem bem o comportamento dinâmico de um crescimento celular.

Os modelos estruturados consideram uma estrutura interna para a célula, através de variáveis intrínsecas e mecanismos intracelulares. As composições dos componentes intracelulares determinam um estado para a célula que é capaz de representar a adaptação da célula ao meio fermentativo, permitindo descrever mais adequadamente o crescimento celular em sua forma dinâmica.

Além desse tipo de abordagem estrutural, os modelos podem também ser classificados como segregados e não segregados.

Os modelos segregados tratam as células individualmente com suas diferenças de tamanho, idade, velocidade de crescimento, etc., enquanto os modelos não segregados, também chamados de contínuos, consideram a população celular homogênea.

Embora os modelos segregados representem melhor a realidade física da distribuição heterogênea das células, esses são matematicamente muito mais complexos que os modelos não segregados. Esses modelos estão ainda em estágio incipiente de desenvolvimento.

2.2.2 - Modelos Não Estruturados

Os modelos não estruturados são aqueles que consideram, além das variáveis abióticas, apenas a quantidade de biomassa na cultura (em número ou massa de células) suficiente para especificar a atividade do microorganismo. Com essa simplificação, mudanças na composição da biomassa são totalmente ignoradas.

Apesar da consideração altamente simplificada adotada, os modelos não estruturados podem descrever os crescimentos em regime permanente (onde as variáveis intrínsecas não mudam com o tempo) ou os crescimentos balanceados (onde os componentes intra-celulares estão em pseudo-estado estacionário, ou melhor, as constantes de tempo de mecanismos de adaptação da fase biótica são muito menores ou maiores que as constantes de tempo relacionados com o processo global).

Os modelos não estruturados são largamente utilizados, haja visto serem de fácil descrição matemática e verificação experimental. São em geral baseados na observação

experimental da cinética global de sistemas microbianos, sendo muitas vezes nada mais que uma interpolação de dados experimentais em condições de operação específicas. Possuem, portanto, uma força preditiva limitada.

Os modelos de crescimento microbiano não estruturados são determinados apenas pela massa ou número de células e por variáveis abióticas (pH, temperatura, concentrações extra-celulares, etc.).

A equação apresentada por Monod (1942) para representar o crescimento de microorganismos com um único substrato limite é um exemplo do sucesso dos modelos não estruturados. Este modelo e suas modificações levando em consideração manutenção, inibição, etc. são capazes de correlacionar dados experimentais de crescimento de maneira satisfatória em muitas situações e, portanto, são modelos largamente aceitos.

O modelo de Monod é originariamente empírico e a equação da velocidade de crescimento (semelhante à equação de Michaelis e Menten (1913) para reações enzimáticas com um único substrato) é escrita tendo a velocidade de crescimento específica como função apenas da concentração do substrato.

Uma vez que em muitos sistemas microbianos uma alta concentração de substrato ou a concentração de um determinado produto metabólico podem inibir o crescimento das células, há na literatura diferentes propostas de modificação da equação de Monod a fim de considerar tais efeitos. Edwards (1970) leva em conta a inibição por substrato, Aiba *et al.* (1968) considera a inibição por produto e Lee *et al.* (1983) inclui a inibição por substrato e produto.

Devido a freqüentes diferenças entre resultados experimentais a baixas velocidades de crescimento e os previstos pelos modelos não estruturados, foram propostas na literatura modificações da lei de Monod que consideram a energia necessária à manutenção celular.

O modelo de Herbert (1958) incorpora o fenômeno de metabolização endógena e propõe uma correção na velocidade de crescimento específica. Esta correção representa a velocidade específica do processo de decaimento endógeno, podendo ser também interpretado como uma velocidade específica de "morte" celular.

No modelo de Pirt (1965), a manutenção é representada por um aumento do consumo de substrato externo e, portanto, a velocidade de consumo de substrato é alterada.

Embora os modelos não estruturados descrevam satisfatoriamente o comportamento

de muitos sistemas microbianos, não são capazes de descrever situações nas quais as células são sujeitas a mudanças no seu ambiente (quando a composição da biomassa muda drasticamente). Tais modelos tem dificuldades em prever, por exemplo, a fase de adaptação de microorganismos em um processo batelada (*lag phase*) ou o consumo seqüencial de substrato. Isso decorre do fato de que estes modelos não fazem referência ao estado fisiológico das células que pode sofrer variações com as mudanças nas condições do meio, ou seja, apesar da referência à quantidade de células, esses modelos não possuem variáveis que meçam a qualidade dessas células.

Embora o modelo de Monod e suas modificações sejam os modelos não estruturados de maior aplicação na atualidade, outros modelos alternativos (na maioria com 2 parâmetros também) existem e são utilizados e muitas vezes são superiores a Monod dependendo da aplicação. Como exemplo tem-se o de Constantinides *et al.* (1970) utilizado para fermentação em batelada.

Conclui-se que os modelos não estruturados, embora de grande utilidade, são na realidade uma tentativa de se correlacionar os dados experimentais. Dependendo do tipo de fermentação um ou outro modelo representa melhor esses dados. Seu poder de predição é bastante limitado e, portanto, os parâmetros estimados valem, via de regra, para determinadas cepas, em um determinado substrato e dentro de determinada faixa e condições experimentais.

2.2.3 - Modelos Estruturados

Como citado anteriormente, a modelagem não estruturada não consegue representar de maneira satisfatória muitas características de crescimento celular. Além disso, muitas vezes a modelagem tem como interesse principal a descrição de determinados metabólitos que seriam o produto de interesse da fermentação (por exemplo proteína na produção de SCP). Isso posto, surge a alternativa dos modelos estruturados, que consideram o estado fisiológico das células e expressam essa propriedade através da composição celular. Esses modelos, que dão informação não apenas da quantidade de células, mas também de sua qualidade, podem ser definidos de maneira simples como aqueles que descrevem a atividade de microorganismos através de mais de uma variável.

Obviamente não se pode, na montagem de um modelo estruturado, descrever completamente a atividade e a qualidade das células. Existem limitações pelo desconhecimento de processos e composições intracelulares e, também, pelo grande número de parâmetros que uma tentativa desse tipo acarretaria.

Assim, no desenvolvimento de um modelo estruturado, faz-se uma seleção de determinados componentes ou conjunto de componentes da célula cujas composições representem de forma adequada o estado fisiológico da célula (normalmente DNA, RNA, carboidratos e proteínas). Informações de natureza microbiológica, bioquímica, química molecular e dados experimentais orientam na escolha dessas variáveis, que devem ser passíveis de serem obtidas experimentalmente.

Desta forma, um modelo estruturado fornece informações apenas sobre os processos e variáveis de maior relevância para determinados propósitos. Para uma compreensão mais detalhada, muitos parâmetros seriam incorporados ao modelo. Os modelos, então, complicados seriam de manipulação matemática bastante complexa e muitos parâmetros perderiam sua significação biológica. Além disso, um número muito grande de experimentos em condições específicas deveriam ser realizados para a obtenção desses parâmetros.

Atualmente, a classe de modelos estruturados potencialmente úteis à Engenharia Bioquímica é formada por uma simples extensão da abordagem de modelos não estruturados, onde a quantidade e as propriedades da biomassa são especificadas por duas ou três variáveis. Este tipo de modelo que aparece freqüentemente na literatura é chamado de modelo estruturado simples. Ele descreve o comportamento do sistema melhor que os modelos não estruturados com uma moderada complexidade matemática e possui um número de parâmetros suficientemente baixo o que permite a verificação experimental.

Pode-se notar na literatura uma tendência de três linhas distintas para a abordagem de um modelo de crescimento estruturado: os modelos compartimentados, os estruturados bioquimicamente ou metabólicos e os cibernéticos ou de otimização.

2.2.3.1 - Modelos Compartimentados

O mais simples modelo de crescimento estruturado é o modelo compartimentado onde

a biomassa é dividida em um pequeno número de compartimentos que interagem entre si. Estas interações provocam alterações na composição de cada compartimento em relação à célula e são responsáveis pelo crescimento celular.

No desenvolvimento de um modelo compartimentado uma série de componentes podem ser utilizados para compor os compartimentos. Normalmente os compartimentos abrigam componentes celulares com funções semelhantes, como componentes de síntese (RNA e carboidratos) e componentes de assimilação (DNA, proteínas e material estrutural). É de interesse reconhecer os componentes celulares mais importantes ou aqueles que realizam papéis de "gargalo" em determinados processos. Para tanto, além de uma análise teórica, muitas vezes é interessante conseguir resultados experimentais de sensibilidade das concentrações de determinados componentes em resposta a mudanças externas (por exemplo velocidade de diluição em regime permanente).

A observação das dimensões de constantes de tempo (através do tempo de relaxação) de reações e transportes intracelulares também é relevante no desenvolvimento de um modelo compartimentado. Os processos mais importantes do ponto de vista da modelagem dinâmica são aqueles cujas ordens de grandeza de seus tempos característicos podem ser comparados à ordem de grandeza dos tempos de fermentação.

O tempo de relaxação está relacionado com o tempo necessário para que um determinado processo atinja o estado estacionário depois de uma perturbação externa. Se o tempo de relaxação de um processo intracelular (difusão, síntese de proteínas, etc.) for muito menor que o tempo característico das alterações no meio fermentativo, então, o processo celular responde muito rápido a essas alterações extra-celulares. Portanto, este processo pode ser considerado como estando em pseudo estado estacionário e, conseqüentemente, ser desconsiderado na modelagem dinâmica. Por outro lado, se o tempo de relaxação de determinados processos for muito maior que o tempo característico das mudanças no ambiente das células este processo é dito estar congelado no estado inicial não interferindo no processo de crescimento como um todo.

Os primeiros trabalhos propondo modelos estruturados para representar o crescimento celular datam de 1966/67 com as publicações dos modelos compartimentados de Williams (1967) e de Ramkrishna *et al.* (1967).

Sendo o modelo de Williams (1967) indiscutivelmente o mais simples e por transmitir

bem a filosofia da modelagem compartimentada, além de conseguir descrever qualitativamente diversos aspectos do crescimento microbiano - tal como a fase de adaptação e a mudança do tamanho médio da célula durante uma fermentação batelada - , ele será apresentado com maiores detalhes, bem como suas modificações.

Williams divide o material celular em duas categorias: uma pertencente a um compartimento sintético, K - que contém ribossomos e pequenas macromoléculas - e outra pertencente a um compartimento estrutural e genético, G - que contém os componentes restantes da célula (proteínas, DNA e outras macromoléculas). Considera-se que a célula cresça em um único substrato.

O esquema de reação é o seguinte: O compartimento K é considerado ser sintetizado diretamente do substrato com um fator de conversão de substrato em componentes de K de 100%. A velocidade específica de reação é considerada de primeira ordem em relação à concentração do substrato

O compartimento G é considerado ser sintetizado a partir do compartimento K também com fator de conversão unitário. A velocidade específica de transformação de K em G é definida como sendo proporcional e de primeira ordem em relação às concentrações intrínsecas dos compartimentos K e G da biomassa.

O modelo original de Williams não está formulado corretamente em termos de concentrações intrínsecas. Os termos que representam a diluição dos componentes intracelulares, devido ao crescimento do biomaterial, foram incorretamente omitidos por Williams e em muitas publicações de modelos de crescimento estruturado, conforme alertou Fredrickson (1976).

O modelo de Williams considera que a duplicação dos componentes estruturais e genéticos do compartimento G é necessária e suficiente para a divisão celular. Desta forma, a concentração de células (dada em número de células pelo volume da cultura) seria proporcional à concentração dos componentes do compartimento G na cultura.

O modelo de Williams, devidamente corrigido em termos de variáveis intrínsecas foi simulado por Nielsen e Nikolajsen (1988) num fermentador batelada com inóculo de baixa quantidade de nutrientes (concentração de K baixa). O resultado da simulação ressalta as potencialidades qualitativas do modelo de Williams. Existe, no início da fermentação, uma fase de adaptação (*lag phase*) quando o tamanho das células aumenta, porém, há pouca

divisão celular. Observa-se uma fase de crescimento exponencial, onde o tamanho das células é máximo, com rápido aumento do número de células e da massa celular. O enriquecimento do compartimento K é o responsável pelo aumento do tamanho das células. A composição celular varia durante todo o ciclo de crescimento, inclusive na fase exponencial. As células na fase estacionária, onde há carência de nutrientes, voltam a ter tamanho reduzido e a composição do compartimento K também volta a níveis iniciais. Observa-se, ainda, que a concentração mássica de células não está necessariamente ligada à sua concentração numérica de forma direta.

Roels (1983) apresenta o modelo de Williams em sua forma original e em termos de concentrações não intrínsecas. Roels aplica o modelo em um fermentador CSTR em regime permanente e constata que a composição celular depende da concentração de células. Essa dependência é inconsistente com resultados experimentais onde apenas a concentração de células está relacionada com concentração de substrato da alimentação.

A apresentação do modelo de Williams escrito consistentemente na forma intrínseca elimina essa incoerência e comprova características qualitativas interessantes, como o fato de a concentração de K aumentar linearmente com a velocidade de diluição em um fermentador CSTR em regime permanente.

Procurando melhorar o modelo intrínseco de Williams, Roels e Kossen (1978) propuseram modificações pertinentes que aumentam a representatividade do modelo embora à custa do aumento do número de parâmetros.

A velocidade de aquisição de substrato que originariamente era linear em relação à concentração de substrato foi modificada para uma equação do tipo Monod. Esta equação leva em consideração a limitação da velocidade de processamento de substrato na célula (fenômeno de saturação), que o modelo original não previa.

O modelo original considera que a conversão do substrato em compartimento K e a conversão de G em K se efetua com conversão unitária. O modelo de Williams não leva em consideração as perdas de massa em transformações no interior das células e que são expelidas (produtos metabólicos). Para considerar a estequiometria do processo de síntese dos compartimentos K e G, Roels e Kossen introduziram mais dois parâmetros ao modelo original que são os fatores de conversão de substrato em compartimento K e de compartimento K em compartimento G.

Por fim, Roels e Kossen consideram uma característica típica de transformação de energia em microorganismos que é o requerimento para manutenção. O metabolismo de manutenção é introduzido através de uma despolimerização do compartimento G, com rendimento unitário.

Dessa forma, a síntese de G (manutenção) seria requerida para manter a célula com capacidade de crescimento.

A velocidade específica de degradação de G em K é considerada ser de primeira ordem.

Ressalta-se que a literatura apresenta versões diferentes do modelo de Williams. Bailey e Ollis (1986) apresentam esse modelo com variáveis intrínsecas e com apenas um coeficiente de conversão de substrato em componentes do compartimento K. Villadsen (1989) apresenta o modelo de Williams como modificado por Roels e Kossen, porém, com a velocidade específica de aquisição de substrato não definida e função da concentração de substrato.

Esener *et al.* (1982) testaram a capacidade preditiva do modelo de Williams modificado através de verificação experimental de crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em processo batelada alimentada e contínuo.

RNA, carboidratos e outras moléculas celulares menores foram concentrados no compartimento K e proteínas, DNA, material estrutural, etc. no compartimento G. A razão de se colocar o RNA como constituinte principal do compartimento K foi experimental, pois foi notado que a composição desse componente variava muito em um cultivo contínuo para vários estados estacionários.

Os seis parâmetros do modelo foram estimados através de dados de batelada alimentada de Esener *et al.* (1981).

O modelo adaptou-se satisfatoriamente a uma corrida experimental batelada alimentada, embora o artigo não deixe claro o procedimento usado para se obter todos esses parâmetros, nem quais pontos experimentais foram utilizados para a estimativa desses parâmetros.

A capacidade preditiva do modelo é testada através de dados experimentais de cultivo contínuo em estado estacionário para diversas velocidades de diluição. A concordância entre os dados experimentais e a previsão do modelo é excelente inclusive para a previsão do *washout*.

O modelo foi testado dinamicamente através de uma variação degrau na velocidade de diluição (acima do washout). Embora o modelo tenha uma resposta dinâmica correta do ponto de vista qualitativo, o tempo de resposta mostrou ser muito menor que o encontrado experimentalmente.

A dependência da fração de RNA na célula com a velocidade de crescimento também não foi descrita pelo modelo.

Concluindo, o modelo possui uma idéia lógica e representa o metabolismo celular com relativa simplicidade. Possui apenas 2 compartimentos e 3 reações, porém, um número relativamente grande de 6 parâmetros. O modelo tem a capacidade de prever o comportamento estacionário da concentração de células e o estado de washout, contudo, não consegue prever quantitativamente o comportamento dinâmico de adaptação e crescimento celular e nem o comportamento estacionário de variáveis intracelulares.

É fácil imaginar que modelos mais representativos deverão ter número de compartimentos, reações e, conseqüentemente, parâmetros maiores. Isso irá se refletir em um aumento da complexidade matemática e da verificação experimental do modelo.

2.2.3.2 - Modelos Tipo Gargalo

Os modelos tipo gargalo podem ser considerados compartimentados, pois a célula também é dividida em compartimentos. A diferença, porém, é que nos modelos tipo gargalo considera-se que um determinado componente intracelular limita o crescimento da célula. Este componente, que normalmente é o RNA, limitaria a atividade metabólica da célula, ou seja, faria parte da etapa mais lenta das reações envolvidas no processo de crescimento.

Como exemplo, no modelo tipo gargalo de Ierusalimsky (1967) a célula é dividida em 3 compartimentos: RNA, proteínas e o material celular restante.

A velocidade de crescimento específica, obtida das equações de balanço do modelo, depende apenas de uma variável que é intrínseca e ligada à concentração de RNA. Essa relação caracteriza o modelo gargalo e o difere do compartimentado.

Outros modelos tipo gargalo são citados na literatura: Powell (1967 e 1968) e Chi e Howell (1976).

2.2.3.3 - Modelos Estruturados Bioquimicamente

Nos modelos estruturados bioquimicamente, também chamados metabólicos, o modelo de crescimento microbiano é construído através do conhecimento de reações metabólicas chaves desses microorganismos.

Uma das características desse modelo é que quanto maior for os detalhes biológicos a ele incorporados, este se torna cada vez mais específico para um determinado microorganismo e processo. A estrutura nesse tipo de modelo é, normalmente, de dimensão apreciável com grande número de parâmetros. É de se esperar, portanto, que haverá a necessidade de um conhecimento profundo do microorganismo e conseqüentemente um trabalho de difícil comprovação experimental.

É interessante observar que os modelos estruturados bioquimicamente são muito semelhantes e podem ser confundidos com os modelos estruturados multicompartimentados. Porém, note-se, que a especificidade é a característica principal dos modelos com estrutura bioquímica.

Os modelos estruturados bioquimicamente podem incorporar aspectos do metabolismo de síntese de uma determinada enzima (Harder e Roels, 1982), incorporar determinadas rotas importantes do metabolismo celular (Tsai e Lee, 1987) ou tentar modelar todas as reações e rotas mais importantes da célula. Os modelos desta última abordagem são chamados modelos celulares (*single cell models*). Estes são altamente específicos e é necessário um profundo conhecimento bioquímico da célula. O número de parâmetros é bastante grande e devem ser determinados experimentalmente de maneira individual (um grande número de parâmetros obtidos via estimação de parâmetros pode comprometer a preditividade do modelo). Como exemplo de modelos celulares estruturados bioquimicamente tem-se os modelos desenvolvidos na Universidade de Cornell para *E.coli* (Shuler, 1985) e para *S.cerevisiae* (Steinmeyer e Shuler, 1989). Neste último, Steinmeyer e Shuler dividem a célula de *S.cerevisiae* em 12 agrupamentos de componentes celulares. A grande maioria das 116 constantes cinéticas e estequiométricas apresentadas foram obtidas da literatura de bioquímica.

2.2.4 - Modelos Cibernéticos

A modelagem cibernética vem sendo desenvolvida recentemente e os primeiros trabalhos publicados, Kompala *et al.* (1984), Dhurjati *et al.* (1985), Kompala *et al.* (1986), Ramkrishna *et al.* (1987) e Turner *et al.* (1988), contam com a participação de Doraiswami Ramkrishna. Este modelo se baseia na hipótese de que os microorganismos têm um processo regulatório interno com o objetivo de otimizar o crescimento celular.

Esse tipo de modelo é bastante interessante, pois introduz uma idéia diferente dos modelos vistos anteriormente que se baseiam apenas em considerações cinéticas. Consegue, através de um mecanismo cinético relativamente simples e de dados experimentais obtidos em substratos único, representar formas complexas de crescimento com precisão quantitativa como os crescimentos de microorganismos em substratos múltiplos.

A estratégia de otimização é definida através da maximização do crescimento frente aos recursos alocados que é representada no modelo através de variáveis cibernéticas que induzem ou reprimem a fabricação de determinadas enzimas.

No modelo cinético a assimilação do *i*-ésimo substrato pela biomassa é considerada ser catalisada por uma enzima chave que representa o conjunto de enzimas catalisando o caminho metabólico do crescimento a partir do *i*-ésimo substrato.

A cinética de crescimento no modelo cibernético é a cinética de Monod, porém com o nível de enzimas influenciando na velocidade específica de crescimento máxima. A formação de enzimas também é apresentada numa equação tipo Monod.

O modelo considera que tanto a produção de biomassa, como a produção de enzimas não acontecem sem que a elas sejam alocados determinados recursos celulares críticos. Estes recursos, que a célula distribui para os diversos processos nela existentes, não são apenas materiais, mas podem ser, por exemplo, o tempo necessário para a transcrição de uma determinada enzima.

Na descrição matemática do modelo cinético estes recursos são apresentados por duas variáveis cibernéticas. Uma variável cibernética representa a ação de controle do mecanismo regulatório celular da repressão e indução catabólica e altera a velocidade de síntese de enzimas. A outra variável cibernética está ligada à ação regulatória de inibição e ativação de

enzimas já existentes e altera a velocidade de crescimento celular pela rota do *i*-ésimo substrato.

Encerrando a modelagem cinética, é considerada uma velocidade de decaimento no nível de enzimas, linear à concentração de enzimas.

Os parâmetros cinéticos do modelo cibernético são obtidos através de resultados experimentais com os respectivos substratos isolados. Já as variáveis cibernéticas são encontradas por otimização de uma determinada estratégia que deve ser fixada.

Na estratégia cibernética mais comum, para os recursos investidos pelas células ligados à síntese de enzimas para os diferentes substratos presentes no meio, o retorno, obtido da alocação desses recursos, é a velocidade de crescimento celular. Já para os recursos destinados à ação regulatória celular de inibição e ativação de enzimas já existentes, o retorno é a velocidade de produção de energia pela célula (Kompala *et al.* (1984)). ATP é produzido em mecanismos catabólicos e requerido em sínteses de macromoléculas durante o crescimento celular. O objetivo desse controle seria, então, a otimização da velocidade de produção de ATP.

A modelagem não segregada cibernética (principalmente para a representação de crescimento *diauxie* em múltiplos substratos) e a modelagem compartimentada (com um número pequeno de compartimentos) parecem ser a tendência atual da modelagem de crescimento microbiano para a substituição da modelagem não estruturada.

Capítulo 3

Realização Experimental

Neste capítulo pretende-se apresentar o equipamento usado na obtenção dos resultados experimentais do trabalho, bem como descrever o meio de cultura, o microorganismo, os métodos de medida e apresentar as condições de crescimento da cultura. Resultados experimentais preliminares são também apresentados e discutidos.

3.1 - Cultura

Foi utilizada uma cultura mista de microorganismos sendo *Methylococcus capsulatus* (Bath) a principal espécie constituinte da cultura e, também, a espécie metanotrófica. Essa cultura foi obtida junto a DANSK BIOPROTEIN A/S que vem produzindo com sucesso proteínas na forma de "Single Cell Protein" a partir de gás natural.

A cultura mista assegura que pequenas quantidades de hidrocarbonetos com mais de um átomo de carbono no gás natural, os quais são metabolizados para inibidores (ácidos e aldeídos correspondentes), sejam eliminados e transformados em células. Além disso, a cultura mista é estável evitando assim infecções e permitindo que a fermentação seja realizada sem assepsia.

A cultura foi armazenada no próprio meio fermentativo sob refrigeração, à temperatura de 1 °C, durante até 2 meses com aerações regulares.

3.2 - Substratos

Ar foi utilizado como fonte de oxigênio e gás natural como a única fonte de carbono e energia. A composição do gás natural utilizado foi em % volumétrica: metano 91,4; etano 4,8; nitrogênio 0,3; dióxido de carbono 0,8; propano, butano e hidrocarbonetos superiores 2,7.

O substrato líquido continha a fonte de nitrogênio (amônia) e os demais nutrientes e micronutrientes necessários ao crescimento da cultura. A composição desse substrato é apresentada na Tabela (3.1) em mmol/l.

NH ₄ ⁺	25,00	PO ₄ ⁻³	7,81	SO ₄ ⁻²	12,56
Cl ⁻	1,91	Mg ⁺²	1,27	K ⁺	1,86
Ca ⁺²	0,94	Na ⁺	1,86.10 ⁻³	Fe ⁺³	1,81.10 ⁻³
Cu ⁺²	8,50.10 ⁻³	Ni ⁺²	5,25.10 ⁻⁵	Mn ⁺²	1,26.10 ⁻⁴
Co ⁺²	5,25.10 ⁻⁴	Zn ⁺²	1,74.10 ⁻³	B ⁺³	2,63.10 ⁻⁴
Mo ⁺⁷	1,86.10 ⁻³				

Tabela (3.1) - Composição do substrato líquido em mmol/l.

A composição do substrato líquido foi ajustada de acordo com experiências anteriores bem sucedidas no cultivo dessa cultura que usava como fonte de nitrogênio uma mistura de nitrato e amônia. O apêndice A descreve o desenvolvimento da composição do meio de cultura a partir do já existente. A composição de sódio no meio fermentativo foi ajustada durante a fermentação uma vez que o controle de pH foi realizado pela adição de hidróxido de sódio.

Durante a fase de testes preliminares e de desenvolvimento do substrato líquido foram realizados alguns ensaios com a presença de citrato no meio de cultura para garantir a solubilidade dos sais envolvidos. Este procedimento foi abandonado, por ser o citrato uma fonte de carbono indesejável, e as precipitações evitadas através da diminuição do pH do meio de cultura.

3.3 - Equipamentos e Procedimentos

Os experimentos foram conduzidos em um fermentador agitado clássico com 5 litros de capacidade equipado com controles de pH e de temperatura.

Este fermentador foi alimentado por duas correntes gasosas injetadas no fundo do

fermentador: uma de ar suprindo oxigênio para a cultura e outra de gás natural suprindo a cultura com a fonte de carbono e energia. Os gases foram supridos separadamente no fermentador e misturados através de uma vigorosa agitação, evitando assim a possível inflamabilidade da mistura.

Rotâmetro foi utilizado para medir a vazão de ar. Medidores de gás de alta precisão foram utilizados para medir a vazão de entrada de gás natural e da mistura gasosa à saída do fermentador, possibilitando assim, maior precisão no balanço de carbono. A pressão do gás à entrada do fermentador, utilizada para a obtenção das vazões mássicas de gás, foi medida por manômetro em forma de U.

As concentrações dos diversos componentes do gás de saída do fermentador (metano, etano, gás carbônico, nitrogênio e oxigênio) foram medidas via cromatografia gasosa depois de passarem por um sistema de limpeza e desumidificação do gás. Metano e gás carbônico podiam também ser medidos em linha através de medidores infravermelhos.

A corrente líquida, armazenada em recipiente com marcação de nível, entrava no fermentador com o auxílio de uma bomba peristáltica levando a fonte de nitrogênio e os sais necessários ao crescimento. O meio de fermentação também foi retirado do fermentador usando bomba peristáltica.

Eletrodos de pH e de oxigênio dissolvido foram utilizados no acompanhamento dos ensaios.

Uma visão esquemática de todo o sistema é apresentada na Figura (3.1).

Dois tipos de procedimentos experimentais foram realizados. Um com o objetivo de levar o sistema ao estado estacionário e outro de acompanhamento dinâmico da assimilação de nitrogênio pela cultura. Esses procedimentos são detalhados nos capítulos 3 e 5 destinados à apresentação dos resultados experimentais respectivamente em estado estacionário e em regime dinâmico.

3.4 - Condições de Crescimento

Baseado em resultados experimentais anteriores e em sugestões da própria literatura, a temperatura de trabalho foi fixada em 45 °C e o pH em 6,6. O controle de pH foi efetuado

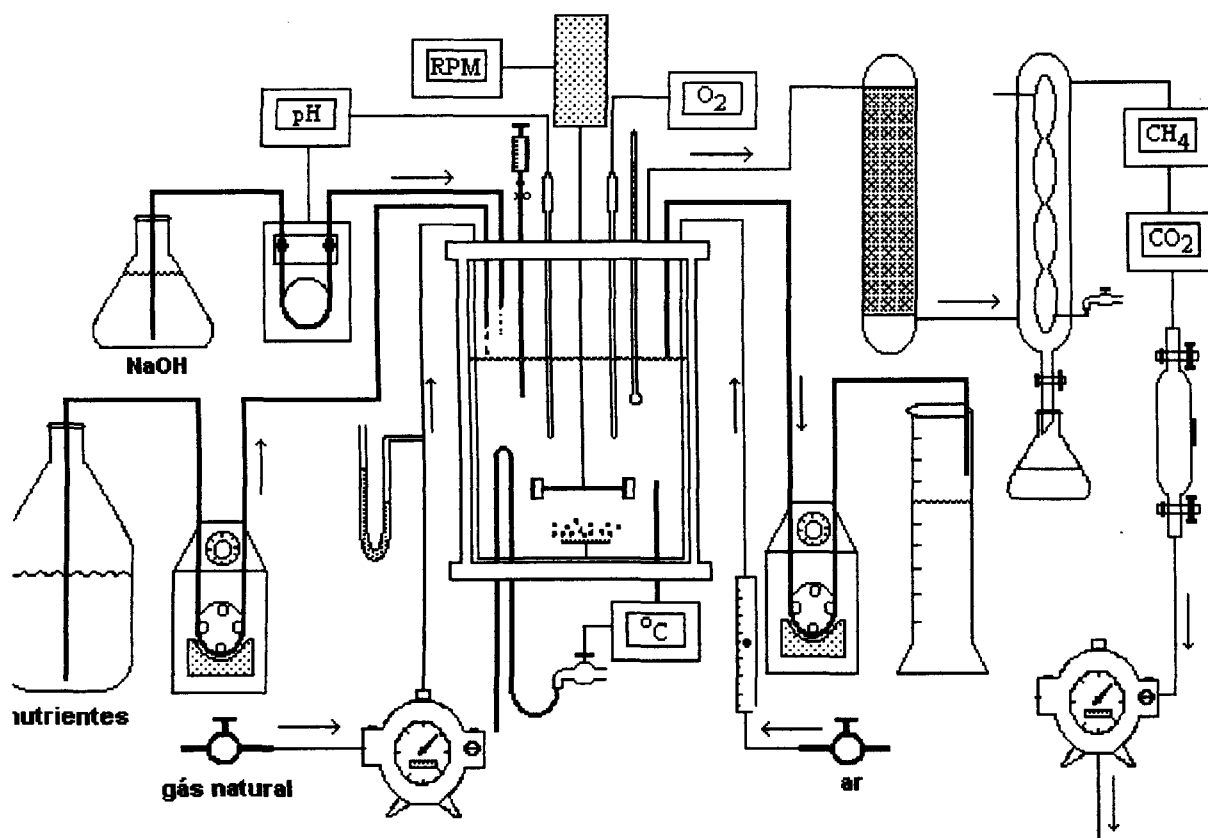


Figura 3.1 - Esquema do Processo e Equipamentos Utilizados.

pela adição de hidróxido de sódio 2 N ao fermentador. A adição de ácido foi realizada via alimentação do meio de cultura uma vez que este tinha o pH ácido. O volume do fermentador foi mantido em torno de 2 litros através de um controle de nível adaptado ao fermentador.

A agitação foi vigorosa e mantida na faixa de 800 a 1000 rpm rendendo um coeficiente de transferência de massa (K_La) em torno de 700 h^{-1} . Um eletrodo para oxigênio confirmou o excesso de oxigênio dissolvido no meio.

Assim, considera-se o nitrogênio o substrato limitante, uma vez que todos os outros nutrientes foram supridos em excesso. A vazão de gás natural foi mantida em aproximadamente 250 l/d e a vazão de ar ajustada em aproximadamente 1500 l/d. Dessa forma mantém-se a relação metano/oxigênio em torno de 0,7. Esses valores mostraram-se adequados para atender a demanda de oxigênio e metano, e suficiente para garantir excesso desses gases nos experimentos realizados.

3.5 - Métodos de Medida

3.5.1 - Concentração de Células

Para a medida quantitativa da concentração de células no fermentador foram utilizados dois diferentes métodos gravimétricos, utilizando centrifugação e filtragem de células, como seguem:

Uma amostra de 10 ml do caldo de fermentação foi centrifugada por 25 minutos a 5000 rpm. As células precipitadas foram secadas a 80 °C por 24 horas e resfriadas num dessecador antes de serem pesadas.

Uma amostra de 2 ml foi filtrada (filtro Gelman (0,22)) e secada em estufa à temperatura de 50 °C por 24 horas.

A separação por centrifugação foi adotada no início dos trabalhos experimentais e foi abandonada em favor da separação via filtração que mostrou ser mais rápida e eficiente.

Para se observar a tendência das mudanças na concentração de células, espectrofotometria foi usada lendo-se a absorbância da amostra de células a 620 nm, obviamente após diluição adequada. A espectrofotometria foi usada como um método rápido de se observar as mudanças de concentração de células. A precisão desse método, porém, é questionável uma vez que notavam-se alterações na curva de calibração com a variação da velocidade de diluição ou no estado transiente. Esse fato é atribuído às alterações do volume das células ou às alterações no equilíbrio entre os microorganismos participantes da cultura mista.

3.5.2 - Determinação de Carbono

Para a determinação do conteúdo de carbono das células foi utilizado um método de obtenção da demanda química de oxigênio de acordo com os métodos padrões da Associação de Saúde Pública Americana com algumas modificações como segue:

Utilizando-se uma corrente de ar livre de impurezas, uma amostra de 1 ml do caldo de fermentação foi oxidada em uma mistura em ebulição de 10 ml de dicromato de potássio

($K_2Cr_2O_7$) saturado e 25 ml de ácido sulfúrico concentrado com sulfato de prata (0,6 %) como catalisador. As células são destruídas pela violenta oxidação e CO_2 e outros gases são liberados. SO_2 foi absorvido em uma solução de ácido sulfúrico e sulfato de cromo e os compostos clorados foram reduzidos a Cl_2 em uma torre aquecida, tendo cobre como catalisador. Uma corrente de ar transportava o CO_2 envolvido para ser absorvido em uma coluna de solução alcalina (hidróxido de sódio 0,1 M). Utilizando-se cloreto de bário, precipitou-se o gás carbônico absorvido na forma de carbonato de bário ($BaCO_3$). O excesso de base foi neutralizado com ácido clorídrico 0,1 M na presença de fenolftaleína. Continuou-se a titulação com ácido provocando a solubilização do precipitado e a liberação do gás carbônico. Pela quantidade de ácido clorídrico (0,1 M) adicionada do ponto de viragem da fenolftaleína ao ponto de viragem do verde de bromocresol obteve-se a medida direta do conteúdo de carbono das células, uma vez que apenas traços de CO_2 e outros compostos de carbono foram encontrados no meio de fermentação durante o processo fermentativo.

Devido a possíveis impurezas nas soluções utilizadas, especialmente hidróxido de sódio, o conteúdo de carbono de uma amostra em branco foi obtido pelo mesmo método e o resultado foi levado em consideração nos cálculos do conteúdo de carbono das células.

O método foi testado várias vezes com células de leveduras de composição conhecida e mostrou uma recuperação de carbono ao redor de 95 %.

3.5.3 - Determinação de Nitrogênio nas Células

O método de Kjeldahl de digestão ácida foi utilizado para determinação da composição de nitrogênio das células.

Uma amostra de 3 ml foi levada à ebulição com 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, 5 ml de H_2O_2 e um tablete de selênio como catalisador. Quando a coloração do líquido tornou-se transparente (aproximadamente 30 min), cessou-se a ebulição. O conteúdo do tubo foi tratado com 20 ml de NaOH 40 % e destilado com vapor de água. O nitrogênio na forma de amônia foi absorvido em 10 ml de ácido bórico 4 % e titulado com uma solução 0,005 M de ácido clorídrico na presença do indicador verde de bromocresol até a mudança da cor verde para cinza. A recuperação de nitrogênio por esse método é excelente, aproximando-se

de 100 %.

3.5.4 - Determinação de Nitrogênio na Fase Líquida

Nitrato foi determinado por espectrofotometria como segue: para uma amostra de filtrado do meio fermentativo (limpo de células) de 0,1 ml foram adicionados 0,05 ml de solução de brucina 1% seguido de 2 ml de ácido sulfúrico (96 %). Depois de esfriar, o volume foi levado a 5 ml com ácido sulfúrico concentrado (96 %). A transmitância de uma coloração amarela foi lida no espectrofotômetro a 430 nm e comparado ao padrão conhecido. Nitrito interferia com a mesma absorção molar e foi deduzido de acordo.

Nitrito foi determinado pela formação de um intenso corante vermelho pela adição sucessiva de 1 ml de sulfanilamida (1 %) e 1 ml de N-(nafitil-1)etilenodiamina (0,02 %) em 3 ml de HCl para 0,1 ml de amostra. A absorbância foi lida a 530 nm depois de diluição para 5 ml. A curva de calibração é preparada com quantidades conhecidas.

O teste colorimétrico para a determinação de amônia foi baseado na formação de uma coloração azul. Os reagentes para a reação e a prescrição para o uso foram supridos pela Merk Darnstadv (Spectroquant).

Outros testes colorimétricos Merk de rápida determinação para NO_3^- , NO_2^- e NH_4^+ foram utilizados para o rápido assessoramento qualitativo das variações dessas concentrações nesses compostos.

Tentou-se, também, medir a concentração de amônia utilizando um eletrodo Ingold. O método não apresentou bons resultados, o que foi atribuído à interferência de outros íons.

3.5.5 - Concentração de Gases

As concentrações dos diversos constituintes das correntes gasosas foram determinadas basicamente por cromatografia gasosa.

O gás à saída do fermentador foi limpo e desumidificado por um sistema de filtro e condensador e depois coletado em recipiente próprio para amostragem. Utilizando-se argônio

como gás de arraste e uma coluna Peneira Molecular, oxigênio, nitrogênio e metano foram separados. Ar (oxigênio, nitrogênio e argônio), gás carbônico, metano e etano foram separados por uma coluna Porapak Q. As análises foram realizadas através de um detector de condutividade térmica.

3.6 - Resultados Preliminares

Alguns experimentos foram realizados em caráter preliminar e se mostraram importantes para a definição dos objetivos do trabalho. Foram realizados experimentos preliminares de caracterização do estado estacionário, testes de pulso de amônia e de variação de grau da concentração de amônia na corrente de alimentação.

Esses experimentos foram realizados sem um rigor quantitativo nas medidas experimentais. Desta forma, as concentrações de amônia, nitrato e nitrito foram determinadas usando métodos colorimétricos de rápida determinação fornecidos pela Merk. A concentração de células foi obtida pela medida da absorbância de amostra convenientemente diluída a 620 nm, e uma curva de calibração foi obtida pelo método gravimétrico convencional depois de centrifugação. Todos os métodos já foram apresentados neste capítulo.

3.6.1 - Caracterização do Estado Estacionário

Os experimentos de estado estacionário são de grande importância, pois podem oferecer informações sobre a estequiometria da reação. Além disso, informações sobre o fator de conversão de nitrogênio em células e, conseqüentemente, sobre a composição de nitrogênio na célula podem ser obtidas desse tipo de experimento. Como será observado, a quantidade de nitrogênio intracelular é um bom parâmetro para se quantificar a "gordura" da célula.

Os resultados experimentais são apresentados na Tabela 3.1. Esses resultados não são ainda suficientes para analisar a dependência do fator de conversão com a velocidade de diluição. Porém, esses números parecem ter valores maiores que aqueles parcos apresentados na literatura. Da estequiometria escrita por Jørgensen, L. (1987) esse valor seria 102 g

células/mol NH₃ e segundo Hamer et al. (1981) seria 103 g células/mol NH₃.

experimento	meio de cultura	conc. de amônia na alimentação (mol/l)	velocidade de diluição (h ⁻¹)	concentração de células (g/l)	Y _{NX} (g/mol)
1	amônia/ citrato	0,0800	0,0550	11,7	146
2	amônia	0,0250	0,0520	4,6	184
3	amônia	0.0267	0,0315	4,7	176

Tabela 3.2 - Resultados experimentais de estado estacionário.

Esta discrepância poderia ser explicada devido ao fato de os valores da literatura terem sido obtidos em experimentos com limitação da fonte de carbono, enquanto que os presentes foram executados com excesso de carbono e sendo nitrogênio o substrato em falta. Assim, os resultados sugerem que as células estejam acumulando carbono e essa "gordura" celular seja a responsável pelo aumento no fator de conversão de nitrogênio em células. Ansejo e Suk (1986) estudaram a acumulação de carbono em microorganismos metilotróficos do tipo II na forma de poly-β-hidroxibutirato (PHB) e apresentaram resultados onde a composição de PHB chega a 70% da massa seca.

3.6.2 - Experimentos de Pulso

O objetivo destes experimentos é a obtenção de informações qualitativas do comportamento dinâmico do metabolismo do nitrogênio da célula.

Os experimentos foram realizados com o fermentador perto do estado estacionário. A alimentação foi desligada e um pulso de amônia e outros nutrientes foi realizado. A fermentação continuava em operação batelada. O consumo de amônia, bem como o produção e consumo de nitrito e nitrato foram observados no meio fermentativo. Os três experimentos apresentados foram realizados usando o meio de amônia/citrato, velocidade de diluição de 0,06 h⁻¹ .

A Figura (3.2) mostra um experimento com um pequeno pulso de amônia (4,5 mmol/l). Neste caso, não há a formação de nitrito nem nitrato e o consumo de amônia tem característica linear.

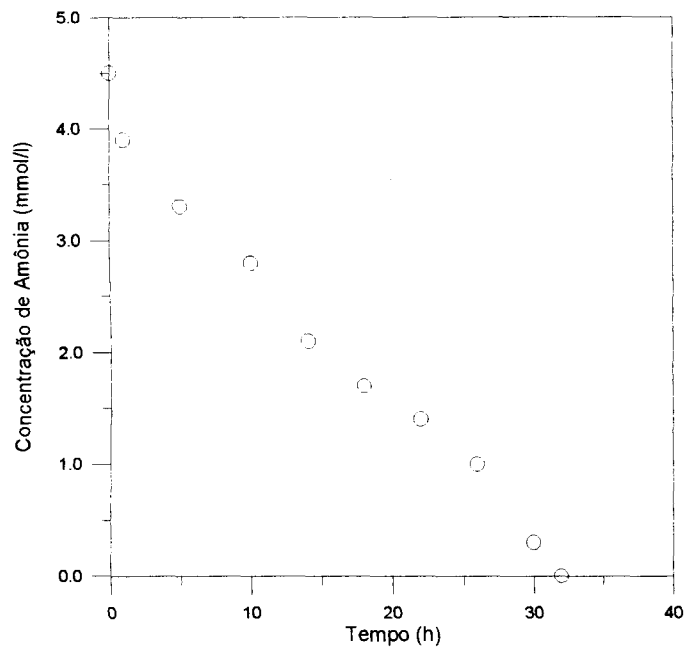


Figura (3.2) - Comportamento da concentração de amônia durante testes preliminares de pulso de amônia.

A Figura (3.3) apresenta o comportamento de um pulso com concentração inicial de amônia de 8,55 mmol/l. O comportamento do consumo de amônia é o mesmo; no entanto, nitrato aparece em quantidades muito baixas. Uma observação importante desse experimento é que as células admitem amônia numa velocidade constante, embora a quantidade admitida seja excessiva para essas. As células expõem o excesso de nitrogênio admitido na forma de nitrato e nitrito, com preponderância do nitrato. Os microorganismos utilizam o nitrato como fonte de nitrogênio apenas quando a fonte de amônia se esgota.

Um incremento adicional foi dado ao pulso de amônia (18,2 mmol/l) e a Figura (3.4) mostra que o comportamento de consumo de amônia e geração e consumo de nitrato praticamente se repetem, agora com maior liberação de nitrato. Depois da amônia ter sido totalmente consumida e durante o consumo de nitrato é observado que um pico de nitrito, em quantidades relativamente grandes, surge no meio fermentativo. Isso mostra claramente que o consumo de nitrato está relacionado com a produção de nitrito. Quando praticamente todo

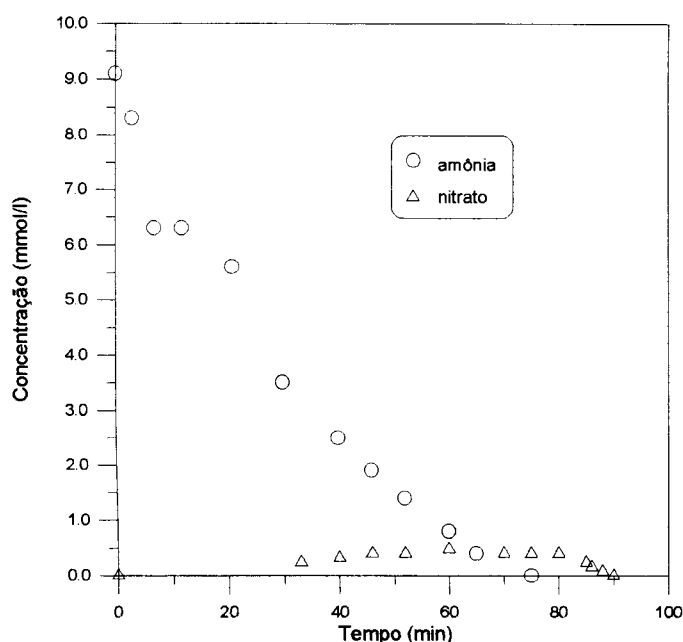


Figura (3.3) - Comportamento das concentrações de amônia e nitrato durante testes preliminares de pulso de amônia.

o nitrato foi consumido inicia-se o consumo de nitrito. Pode-se também observar que a velocidade de admissão de amônia diminui com o aumento do nível de nitrato e nitrito.

3.6.3 - Experimentos de Variação Degrau

A Figura (3.5) apresenta um experimento em que fez-se uma variação do tipo degrau na concentração de amônia na corrente de alimentação do fermentador.

Esse experimento foi realizado à velocidade de diluição bastante baixa ($0,032 \text{ h}^{-1}$) e a concentração de amônia da alimentação foi de $0,0267 \text{ M}$. A fermentação foi realizada de forma contínua até o estado estacionário ser alcançado, quando a concentração de amônia da alimentação foi alterada para $0,05 \text{ M}$.

Era esperado que o sistema convergiria para um novo estado estacionário no qual a concentração de células estaria em torno de 9 g/l , porém o sistema mostrou um comportamento oscilatório. Ao final da segunda oscilação (tempo=480 h) houve um acúmulo de amônia, nitrato e nitrito no meio fermentativo causando inibição. No entanto, o sistema recuperou-se da inibição sofrida com o conseqüente aumento da concentração celular. O

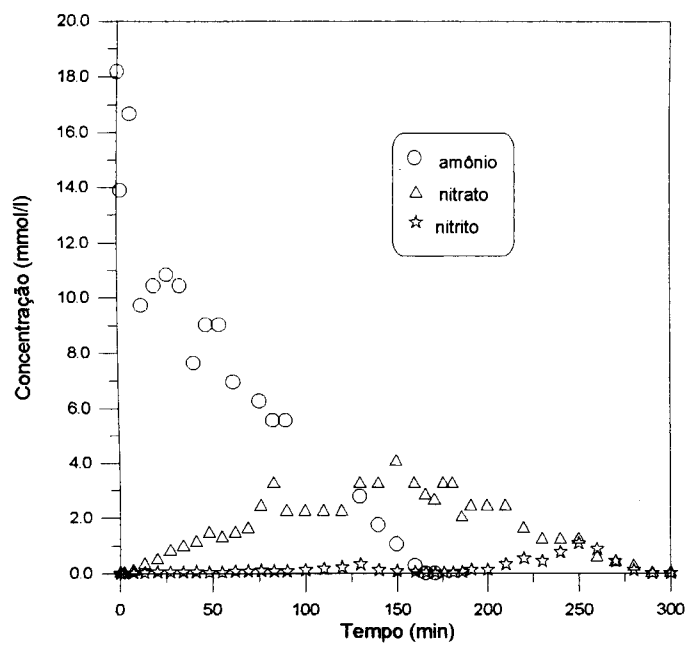


Figura (3.4) - Comportamento das concentrações de amônia, nitrato e nitrito durante testes preliminares de pulso.

experimento teve que ser interrompido devido a problemas de quebra de equipamento.

Esta oscilação pode ser explicada considerando uma acumulação de amônia dentro das células juntamente com uma fase de adaptação dos microorganismos. No início as células crescem com uma determinada velocidade específica de crescimento. Repentinamente um excesso de amônia aparece; as células recebem a amônia, mas não são capazes de alterar sua velocidade de crescimento de forma imediata. Assim, durante a fase de adaptação, há o acúmulo de amônia dentro dos microorganismos. As células adaptam seu sistema enzimático às condições de excesso de substrato e a velocidade de crescimento específica atinge valores altos, acima da velocidade específica de crescimento do estado estacionário. A consequência é a falta de amônia e a queda brusca na velocidade específica de crescimento. A uma baixa velocidade específica de crescimento, amônia começa novamente a ser acumulada dentro das células e o ciclo se repete.

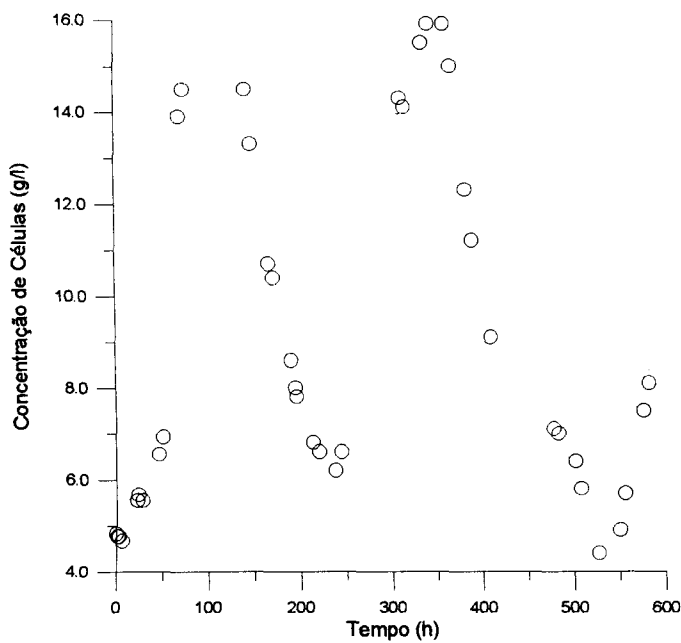


Figura (3.5) - Comportamento das concentração de células durante testes preliminares de variação de grau de amônia.

Capítulo 4

Caracterização do Estado Estacionário

Nesse capítulo apresentam-se os resultados experimentais que pretendem caracterizar o estado estacionário do crescimento da cultura em um fermentador agitado clássico operando em regime contínuo e tendo nitrogênio como substrato limitante. Dados importantes para as aplicações do processo em estudo são apresentados, como por exemplo velocidade específica de crescimento máxima e fator de conversão de substrato em célula. Os resultados obtidos serão utilizados na proposta de um modelo de crescimento do sistema e na obtenção de parâmetros desse modelo.

4.1 - Células

A concentração de células no caldo de fermentação foi obtida diretamente por método gravimétrico após separação por filtração e secagem, conforme descrição no capítulo 3.

A variação da concentração de células ao longo de toda a faixa de velocidades de diluição possíveis é apresentada na Figura (4.1). Com o aumento da velocidade de diluição a concentração de células varia de forma decrescente, tendendo a um patamar para velocidades de diluição altas e menores que $0,23 \text{ h}^{-1}$.

A Figura (4.1) sugere, com razoável definição, a velocidade de diluição (D) do "wash out" em torno de $0,257 \text{ h}^{-1}$, sendo portanto esse o valor da velocidade específica de crescimento máxima obtido experimentalmente. Cabe ressaltar que para velocidades específicas perto da máxima ($D > 0,23 \text{ h}^{-1}$) os erros dos resultados experimentais da concentração de células são elevados, uma vez que pequenas flutuações que porventura ocorram na vazão de alimentação ou no volume do fermentador têm uma grande influência na concentração de células.

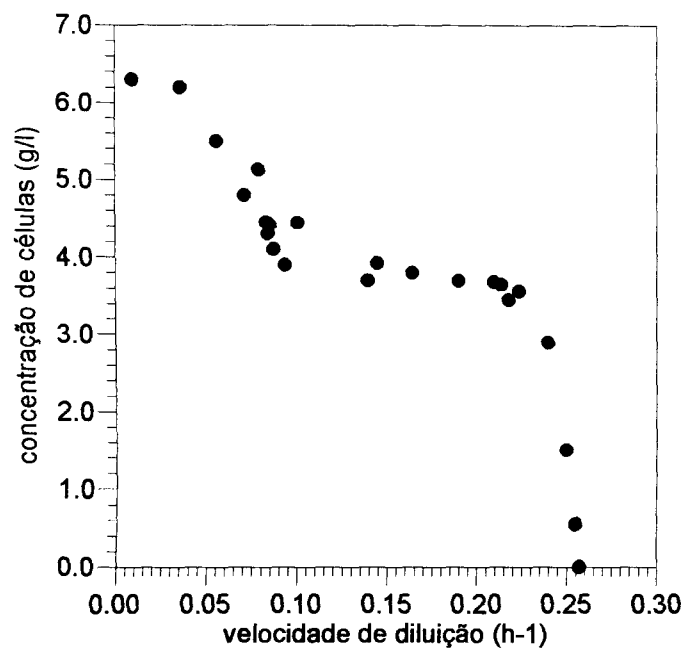


Figura (4.1) - Concentração de células secas em estado estacionário.

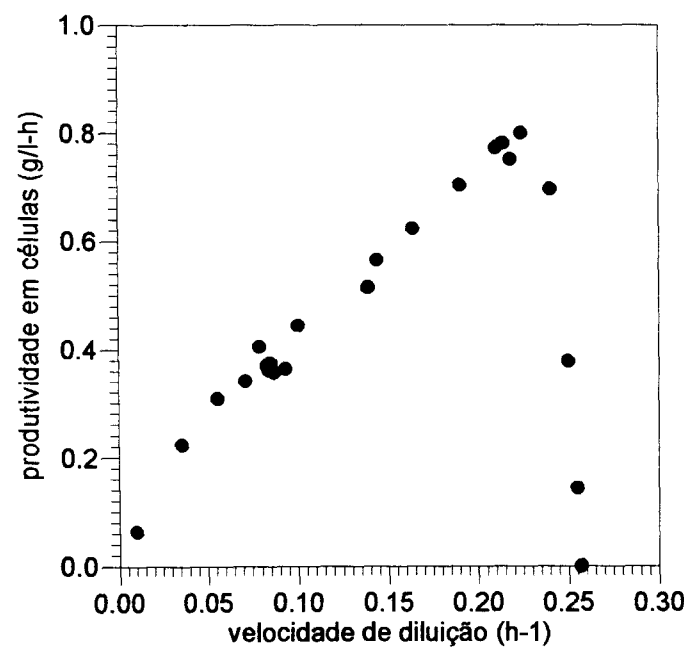


Figura (4.2) - Produtividade em células em estado estacionário.

Embora os erros experimentais tendam a aumentar também para velocidades de diluição próximas a zero, pela dificuldade experimental em se constatar a obtenção do estado estacionário, pode-se prever que a concentração de células tem um valor máximo quando a velocidade de diluição aproxima-se de zero. Isso se deve ao fato da velocidade de diluição estar relacionada à vazão da corrente líquida (fonte de nitrogênio e sais) que não é fonte de energia. Assim, a célula pode se manter a velocidades de diluição próximas a zero, pois a fonte de energia continua sendo suprida. Isso foi confirmado por um experimento qualitativo realizado onde apesar da velocidade de diluição ser igual a zero, a cultura continuava produzindo CO_2 .

A produtividade em células é mostrada na Figura (4.2). Uma constatação experimental interessante e importante para o desenvolvimento de modelos não estruturados é que a produtividade em células é proporcional à velocidade de diluição, para velocidades de diluição entre $0,03$ e $0,23 \text{ h}^{-1}$, que é a faixa com menor erro experimental e mais importante para possíveis aplicações.

4.2 - Nitrogênio Extracelular

As concentrações de nitrogênio foram medidas no meio de fermentação por métodos colorimétricos e são retratadas na Figura (4.3).

Nota-se que, exceto para a faixa próxima a de diluição máxima, a concentração de nitrogênio nas suas prováveis formas (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) foi imperceptível aos métodos de medida utilizados. Este fato reforça a consideração de que o nitrogênio é o substrato limite para o crescimento das células.

Pode-se, também, concluir que se um modelo tipo Monod fosse usado para representar o crescimento das células, a constante de Monod seria muito pequena para o sistema estudado. Pode-se afirmar, ainda, que para altas velocidades de crescimento específica a cultura pode conviver com concentrações de nitrogênio até 25 mmol/l sem que ocorra inibição ao crescimento da cultura.

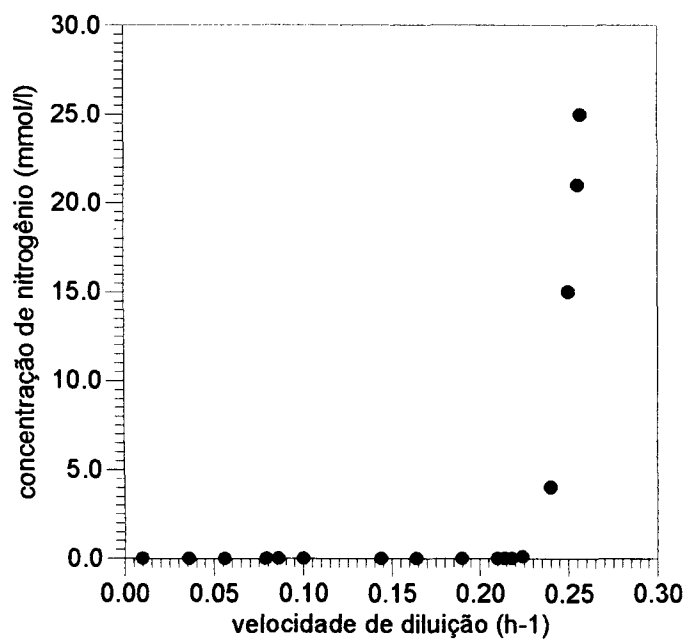


Figura (4.3) - Concentração de nitrogênio no meio de fermentação em estado estacionário.

4.3 - Nitrogênio Intracelular

A partir dos resultados experimentais apresentados nas Figuras (4.1) e (4.3) pode-se obter, via um balanço de massa para o nitrogênio e admitindo-se que a cultura não utiliza nitrogênio elementar, as composições de nitrogênio das células (Figura (4.4)).

Os resultados mostram que o conteúdo de nitrogênio da célula varia muito com a velocidade de diluição. Sendo nitrogênio o substrato limite e portanto em falta, essa grande variação na composição de nitrogênio pode ser atribuída a um armazenamento de carbono pelas células. O fato do carbono estar em excesso e de a composição de nitrogênio ser menor a baixas velocidades de diluição reforça a idéia do estoque de carbono. Essa constatação é de extrema importância e pode ser usada na montagem de um modelo de crescimento compartimentado.

Os valores da literatura de fator de conversão de nitrogênio em células são extremamente baixos, talvez devido ao fato de o nitrogênio não ser limitante nos respectivos experimentos e, então, a célula não apresentar compartimento de estoque de carbono.

O conteúdo de nitrogênio das células pode também ser obtido via medida direta da concentração de nitrogênio no meio fermentativo (Kjeldahl). O resultado, apresentado na Figu-

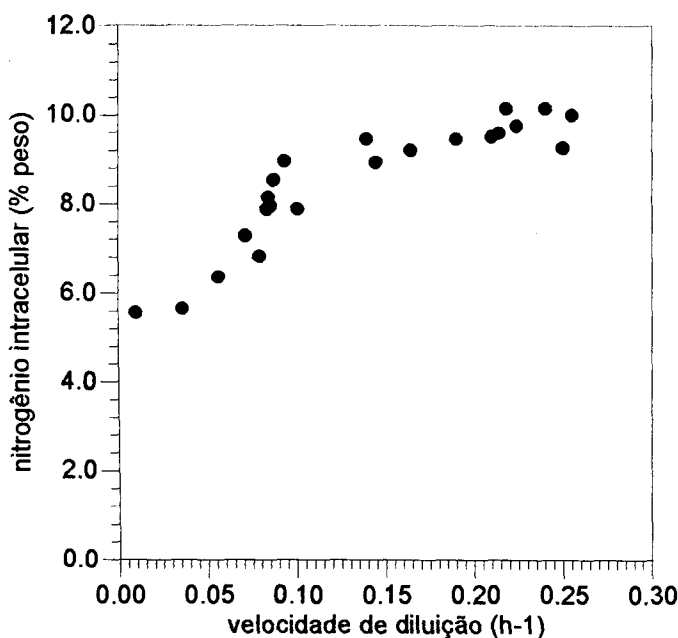


Figura (4.4) - Conteúdo de nitrogênio das células em estado estacionário obtido via balanço de massa.

ra (4.5), é praticamente o mesmo do calculado via balanço de massa (Figura (4.4)). Essa excelente concordância entre os dois métodos de obtenção do nitrogênio intracelular confirma que o estado estacionário foi alcançado e reforça a credibilidade dos resultados experimentais.

O fator de conversão de nitrogênio em células secas (Y_{NX}), definido como a relação entre a produção de células e o consumo de nitrogênio pelas células, é facilmente obtido dos resultados experimentais das Figuras (4.1) e (4.3) e é apresentado na Figura (4.6).

4.4 - Produção de Gás Carbônico

A produção de gás carbônico (Figura (4.7)) foi obtida experimentalmente medindo-se a vazão de gás seco à saída do fermentador e a concentração de gás carbônico, via cromatografia gasosa, nessa corrente. A produção de gás carbônico reflete a atividade das células na produção de energia e é de importância no balanço de massa para o carbono.

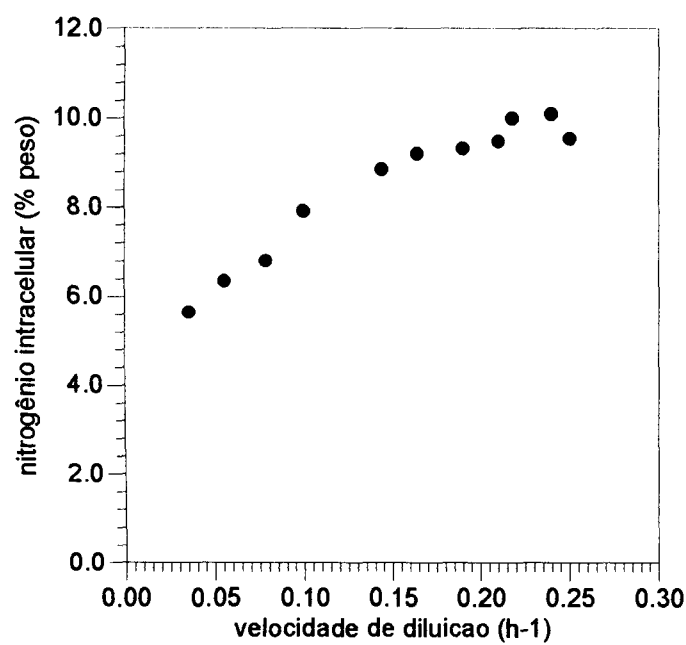


Figura (4.5) - Conteúdo de nitrogênio das células (medida direta) em estado estacionário.

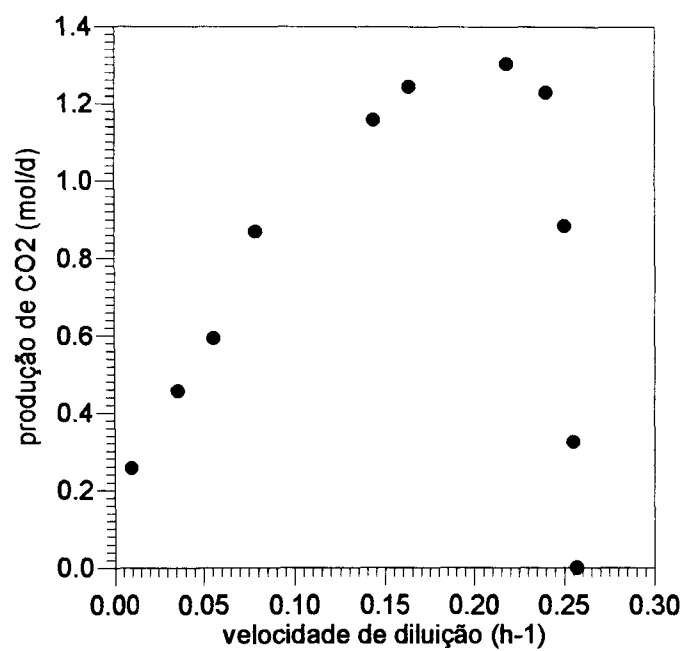


Figura (4.7) - Produção de gás carbônico em estado estacionário.

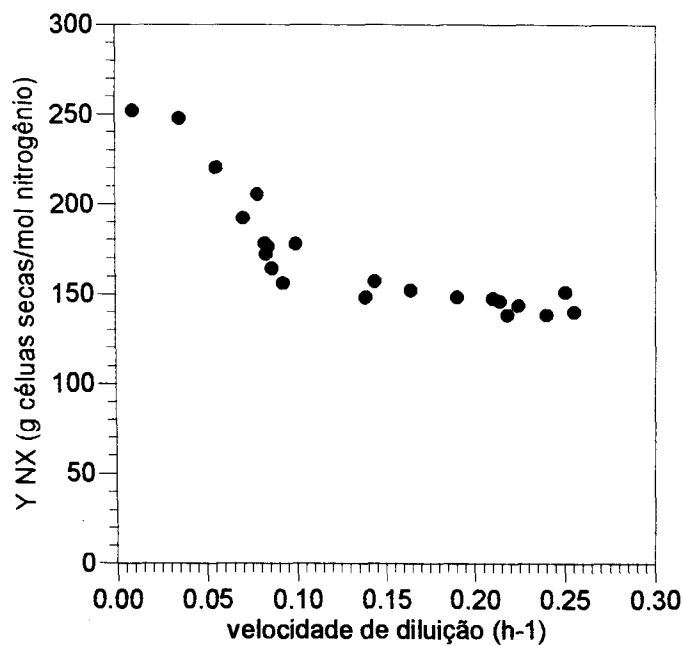


Figura (4.6) - Fator de conversão de nitrogênio em células secas calculado via balanço de massa.

4.5 - Conteúdo de Carbono

Tentou-se obter o número de moles de carbono consumido por um balanço de massa na corrente gasosa, supondo que nenhum outro composto de carbono fosse produzido em solução (alguns foram testados: ácido fórmico, ácido acético, metanol e etanol) e, portanto, todo carbono consumido terminasse em células ou gás carbônico. O número de moles de carbono consumido foi obtido da diferença entre o número de moles de carbono que entrava e que saía do fermentador, portanto, obtinha-se um número muito pequeno da diferença de dois números grandes (carbono estava em grande excesso). Embora medidores de gás (*wet gas meter*) de precisão estivessem sendo usados para a medida das vazões de gás e cromatografia gasosa para a análise dos gases, os resultados foram imprecisos.

Optou-se, então, pela obtenção do conteúdo do carbono medindo-se diretamente a quantidade de carbono através da análise do gás carbônico liberado da oxidação das células, conforme procedimento descrito no capítulo 3. Os resultados experimentais do conteúdo de carbono nas células são apresentados na Figura (4.8) e apresentam valores coerentes para a composição de carbono em microorganismos.

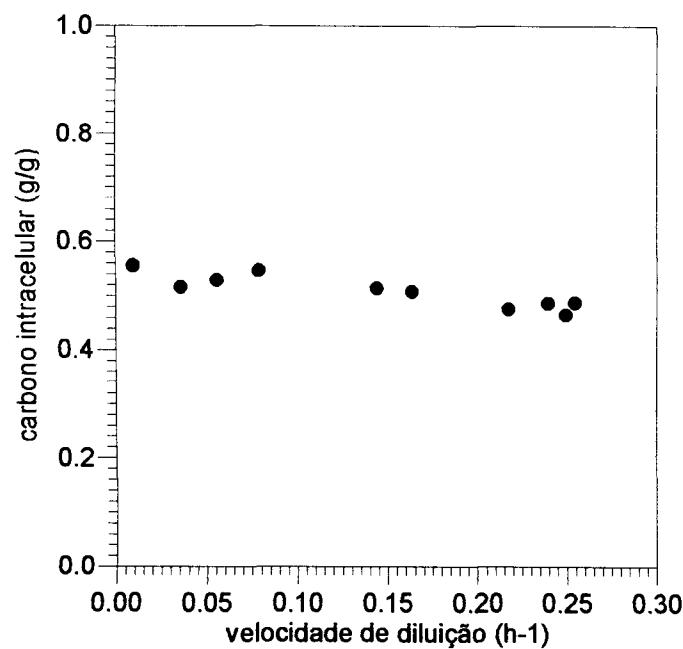


Figura (4.8) - Conteúdo de carbono das células em estado estacionário.

4.6 - Consumo de Carbono

O consumo de carbono em estado estacionário foi calculado por um balanço de massa para o carbono. Foram utilizados o conteúdo de carbono das células, a produção de células, a produção de CO₂ e considerado que todo carbono terminasse em células ou CO₂, que é razoável para uma cultura mista. O consumo de carbono é apresentado na Figura (4.9).

4.7 - Massa Molar das Células

A massa molar das células foi definida como o mol de uma molécula de fórmula C₁H_nO_oN_n e que representasse a composição do microorganismo. A massa molar das células foi calculada em estado estacionário pela relação entre a produção de biomassa e o consumo de carbono e é apresentada no gráfico (4.10).

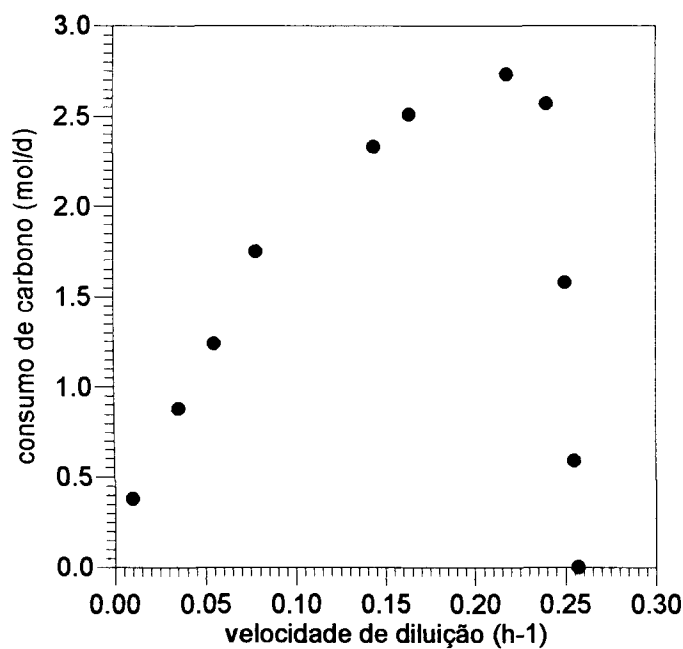


Figura (4.9) - Consumo de carbono em estado estacionário.

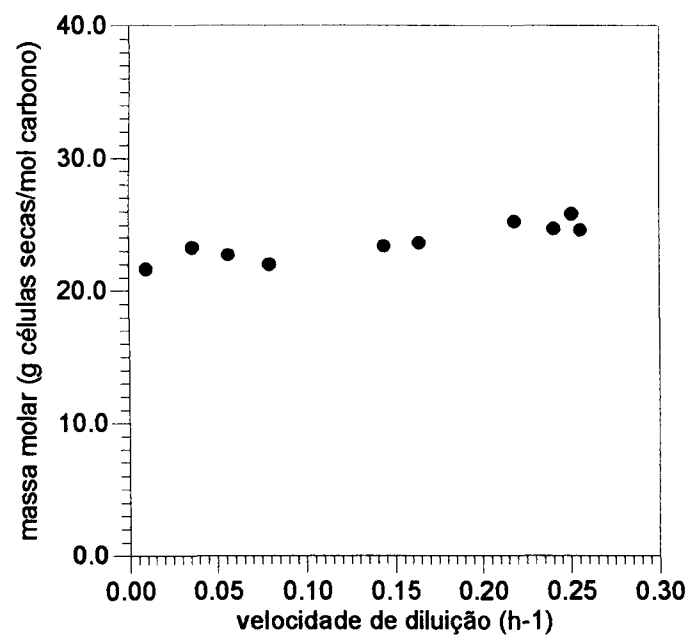


Figura (4.10) - Massa das células por mol de carbono intracelular.

4.8 - Conversão de Carbono em Células

O fator de conversão de carbono em células secas (Y_{CX}) pode ser calculado em estado estacionário pela relação entre a produção de células e o consumo de carbono. O resultado é apresentado na Figura (4.11).

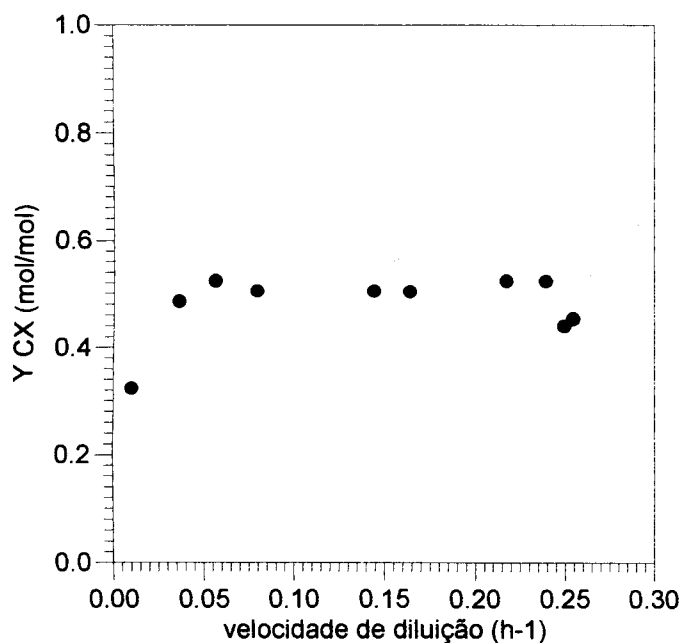


Figura (4.11) - Fator de conversão carbono em células secas.

4.9 - Conclusões

Dados experimentais como velocidade específica de crescimento máxima e dos fatores de conversão de nitrogênio e carbono em células secas em estado estacionário foram obtidos no presente trabalho, contribuindo para o enriquecimento da literatura e a aplicação prática de produção de proteínas a partir de gás natural, utilizando-se *Methylococcus capsulatus*.

A análise dos resultados experimentais permitiu observações que certamente auxiliarão na montagem de modelos de crescimento dos microorganismos. Destacam-se o fato de a cultura mista armazenar carbono e da produtividade ser proporcional à velocidade de diluição para velocidades de diluição passíveis de aplicação prática.

Capítulo 5

Modelagem do Estado Estacionário

Nesse capítulo será proposto, com base nos resultados experimentais em estado estacionário, um modelo para representar o crescimento das células com limitação do substrato nitrogênio. Pretende-se, também, estimar os parâmetros do modelo utilizando esses resultados experimentais.

5.1 - Descrição do Modelo

Analizando os resultados experimentais para o estado estacionário nota-se, como foi ressaltado no capítulo anterior, uma grande variação na composição de nitrogênio da célula. Como se está trabalhando com nitrogênio como substrato limite, é de se esperar que a variação da concentração de nitrogênio seja devido a um estoque de carbono na célula. O fato de a concentração de nitrogênio intracelular ser baixa para baixas velocidades de diluição reforça essa idéia do estoque de carbono, uma vez que é natural que para velocidades de crescimento específicas baixas (baixo consumo de carbono) o acúmulo de carbono seja favorecido.

O modelo que se pretende, então, deve levar em conta o acúmulo de carbono. O modelo é desenvolvido considerando a célula composta de dois compartimentos. O primeiro, um compartimento de reserva de carbono e energia e outro definido como a parte ativa da célula. A Figura (5.1) mostra o esquema do modelo de crescimento compartimentado proposto e as reações envolvidas.

É importante ressaltar que a célula apresentada na Figura (5.1) é uma célula representativa de todas as células, pois o modelo é não segregado, não existindo, portanto, diferença entre as células.

C representa o compartimento de estoque de carbono e energia e A a parte ativa da célula. A admissão da fonte de carbono metano (M) para estocagem é feita diretamente pelo

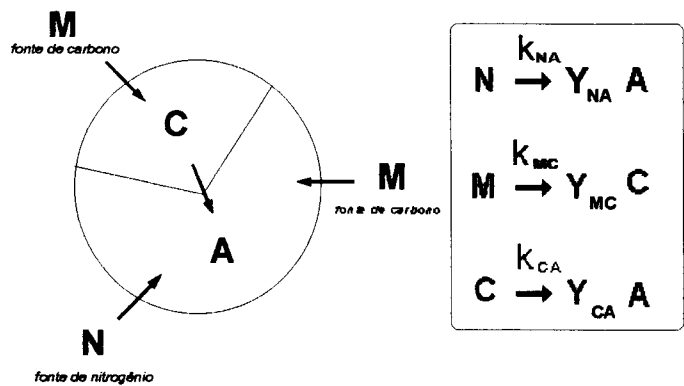


Figura (5.1) - Esquema do modelo proposto e reações envolvidas.

compartimento C por simplicidade. Se o metano entrasse no compartimento ativo A para depois ser estocado, o número de parâmetros do modelo seria maior e por conseguinte a sua complexidade aumentaria.

O modelo consiste de dois compartimentos e três reações. As reações consideradas não são elementares, mas são representações de etapas (reação, regulação e difusão são incorporados em cada etapa). Como várias substâncias são envolvidas em cada etapa de reação, surge a necessidade da definição dos fatores de conversão. Assim, dois parâmetros que representam os fatores de conversão de componentes em outros compartimentos são definidos (Y_{MC} e Y_{NA}). Os fatores de conversão serão considerados constantes e serão tratados como parâmetros.

A próxima tarefa na elaboração do modelo é definir as velocidades de reação de cada etapa e de como essa etapa deve depender dos compartimentos e de outras variáveis do sistema.

Como a concentração de nitrogênio no exterior das células foi imperceptível para os instrumentos de medidas utilizados, fica muito difícil construir um modelo não estruturado baseado na concentração do substrato limite no exterior das células. Além disso, sabe-se que a incorporação de nitrogênio ou carbono na célula não depende apenas da concentração desses constituintes. Depende sim de um sistema enzimático celular para a sua captura e incorporação. Assim, no modelo será definido um termo hipotético de nível de atividade enzimática (X_E), que terá unidades e comportamento de concentração intracelular, com o objetivo de descrever o grau de atividade da célula.

Na verdade o nível de atividade enzimática da célula em estado estacionário é função da velocidade de crescimento específica em estado estacionário e pode ser usada, dinamicamente, para saber como a velocidade de crescimento específica varia no tempo e seguindo quais estímulos. Como a variável é hipotética, pode-se definir, um estado de referência máximo e mínimo para o nível enzimático.

A idéia é que a atividade enzimática influencie a etapa de incorporação de carbono à célula. Dentro da filosofia de criar o modelo mais simples possível, considerar-se-à a velocidade dessa etapa apenas proporcional ao nível de atividade enzimática da célula.

A etapa de transformação de carbono estocado em parte ativa da célula seria proporcional à velocidade de aquisição de nitrogênio. Ou seja, a composição de nitrogênio e de carbono da parte ativa da célula é suposto ser constante e a velocidade de incorporação de nitrogênio é proporcional à incorporação de carbono nesse compartimento.

A etapa de aquisição de nitrogênio não será definida, pois no estado estacionário, ela é quantificada no balanço de massa para o nitrogênio.

5.2 - Cinética das Etapas

Com base na proposta verbal de modelo do item anterior, propõe-se um modelo cinético cujas principais características são:

1. A velocidade da reação $M \rightarrow C$ é somente dependente e proporcional ao nível de atividade da célula para a admissão de carbono no compartimento de estoque X_E .
2. A velocidade da etapa $C \rightarrow A$ é proporcional à velocidade de aquisição de nitrogênio.
3. A velocidade da reação de nitrogênio em compartimento A não é definida.

Pode-se propor, então, as equações de cinética das reações das etapas como segue:

$$r_{MC} = k_{MC} \cdot X_E \cdot C_X (1 - X_C) \quad (5.1)$$

$$r_{CA} = k_{CA} \cdot r_{NA} \quad (5.2)$$

Onde,

r_{MC} = velocidade de consumo da fonte de carbono para estoque no compartimento C [g/l-h].

r_{NA} = velocidade de consumo da fonte de nitrogênio para incorporação no compartimento A [mmol/l-h].

r_{CA} = velocidade de consumo do compartimento C para produção de compartimento A [g/l-h].

k_{MC} = constante de velocidade da reação $M \rightarrow C$ [h^{-1}].

k_{CA} = constante de velocidade da reação $C \rightarrow A$ [g compartimento C/mmol N].

C_X = concentração de células secas [g/l].

X_C = fração mássica do compartimento C na células [adimensional].

X_E = nível de atividade enzimática da célula para estocagem da fonte de carbono [adimensional].

Considerando-se que nas condições de velocidade específica de crescimento igual a zero não haja consumo de carbono pela célula, pode-se definir que o nível de atividade enzimática da célula é nulo. Sendo o nível de atividade enzimática uma variável hipotética será definido um estado de referência em que o nível de atividade enzimática máxima seja unitário e é claro deve ocorrer para a velocidade específica de crescimento máxima. Considerando-se ainda que a atividade da célula seja uma função crescente da velocidade específica de crescimento e deve tender para o máximo (valor unitário por definição) à medida que a velocidade de crescimento específica tende ao seu valor máximo, propõe-se que:

$$X_E = \frac{\mu}{\mu + k_\mu} \quad (5.3)$$

Onde,

μ = velocidade específica de crescimento [h^{-1}].

k_μ = constante [h^{-1}].

5.3 - Equações de Balanço de Massa

Tendo em conta que o processo fermentativo se dá em um fermentador de mistura convencional de forma contínua, as equações de balanço de massa para os compartimentos e principais elementos envolvidos no modelo, considerando o volume do fermentador constante, pode ser apresentado como segue:

$$\frac{d C_X}{dt} = (\mu - D) \cdot C_X \quad (5.4)$$

$$\frac{d C_N}{dt} = D \cdot (C_{N_f} - C_N) - r_{NA} \quad (5.5)$$

$$\frac{d X_A}{dt} = \frac{1}{C_X} \cdot (Y_{NA} \cdot r_{NA}) - \mu \cdot X_A \quad (5.6)$$

$$\frac{d X_C}{dt} = \frac{1}{C_X} \cdot (Y_{MC} \cdot r_{MC} - r_{CA}) - \mu \cdot X_C \quad (5.7)$$

Onde,

X_A = fração mássica do compartimento A na célula [adimensional].

Y_{NA} = fator de conversão da fonte de nitrogênio em compartimento A [g A/mmol N].

Y_{MC} = fator de conversão da fonte de carbono em compartimento C [g C/g M].

C_N = concentração da fonte de nitrogênio no meio fermentativo [mmol N/l].

C_{Nf} = concentração da fonte de nitrogênio na alimentação do fermentador [mmol N/l].

D = velocidade de diluição [h^{-1}]

As equações (5.6) e (5.7) levam à definição da velocidade específica de crescimento como escrita na equação (5.8), tendo-se em consideração que a soma das frações mássicas dos dois compartimentos é unitária (equação 5.9).

$$\mu = \frac{1}{C_X} \cdot (Y_{NA} \cdot r_{NA} + Y_{MC} \cdot r_{MC} - r_{CA}) \quad (5.8)$$

$$X_A + X_C = 1 \quad (5.9)$$

Utilizando as equações de balanço de massa (5.4), (5.5) e (5.6) para o estado estacionário e tendo-se em conta a definição do fator de conversão de nitrogênio em células para o estado estacionário (equação (5.10)), pode-se obter a equação (5.11) que relaciona o fator de conversão de nitrogênio em células (obtido experimentalmente) com o fator de conversão de nitrogênio em compartimento A.

$$Y_{NX} = \frac{C_X}{C_{Nf} - C_N} \quad (5.10)$$

$$Y_{NX} = \frac{Y_{NA}}{X_A} \quad (5.11)$$

Onde,

Y_{NX} = fator de conversão de nitrogênio em células secas [g X / mmol N].

A partir da equação de balanço de massa para o compartimento C (equação (5.7)) aplicada para o estado estacionário e com as informações de estado estacionário das equações (5.5) e (5.11), e levando-se também em conta a equação de definição da cinética de incorporação do carbono (equação (5.1)), obtém-se a relação (5.12).

Utilizando em estado estacionário a equação proposta para representar o nível de atividade enzimática na incorporação do carbono (equação (5.3)) obtém-se a equação (5.13).

$$Y_{MC} \cdot k_{MC} \cdot Y_{NA} \cdot X_E + D \cdot (Y_{NA} - k_{CA} - Y_{NX}) = 0 \quad (5.12)$$

$$Y_{MC} \cdot K_{MC} \cdot Y_{NA} \cdot \frac{1}{D + k_{\mu}} + Y_{NA} - k_{CA} = Y_{NX} \quad (5.13)$$

Observando o formato da curva dos valores experimentais do fator de conversão de nitrogênio em células contra a velocidade de diluição (Figura 4.6) é possível perceber que a equação (5.13) pode representar e bem o comportamento dessa curva uma vez que os parâmetros Y_{MC} , k_{MC} , Y_{NA} , k_{μ} e k_{CA} são considerados constantes pelo modelo, respaldando a proposta da equação para representar o nível de atividade enzimática (equação 5.3).

5.4 - Estimativa de Parâmetros

A equação (5.12) é válida para toda a faixa de velocidades de diluição possíveis e portanto deve satisfazer a condição de definição para o nível de atividade máxima, ou seja,

o nível de atividade tem valor unitário quando a velocidade específica de crescimento tende à máxima. Assim, pode-se obter dessa equação a seguinte relação entre os parâmetros.

$$Y_{MC} \cdot k_{MC} = D^{\max} \cdot \left(\frac{k_{CA} + Y_{NX}^{\max} - Y_{NA}}{Y_{NA}} \right) \quad (5.14)$$

Onde,

$D^{\max}$ = velocidade de diluição máxima [h^{-1}].

$Y_{NX}^{\max}$ = fator de conversão de nitrogênio em células secas nas condições máximas de crescimento [g/gmol].

Substituindo a equação (5.14) na equação (5.13) obtém-se:

$$[Y_{NX}^{\max} - (Y_{NA} - k_{CA})] \cdot \frac{D^{\max}}{D + k_{\mu}} + (Y_{NA} - k_{CA}) = Y_{NX} \quad (5.15)$$

O parâmetro que representa a velocidade de diluição do *wash-out* ($D^{\max}$) foi obtido diretamente dos resultados experimentais do estado estacionário e apresenta o valor $0,257 \text{ h}^{-1}$.

Utilizando os resultados experimentais do fator de conversão de nitrogênio em células (Figura (4.6) do capítulo anterior) obteve-se uma estimativa dos parâmetros ($Y_{NA} - K_{CA}$), K_{μ} e $Y_{NX}^{\max}$. A função objetivo minimizada foi o somatório do quadrado das diferenças entre os resultados experimentais e os valores previstos pelo modelo do fator de conversão de nitrogênio em células. O método utilizado para encontrar os parâmetros que minimizassem a função objetivo foi o método SIMPLEX que é descrito com detalhe no apêndice D. Os parâmetros encontrados foram:

$$\begin{aligned}
 Y_{NA} - k_{CA} &= 108,2 \text{ g A/mol N} \\
 k_{\mu} &= 0,059 \text{ h}^{-1} \\
 Y_{NX}^{\max} &= 146,7 \text{ g X/mol N}
 \end{aligned}$$

A função objetivo apresentou no seu mínimo o valor 172 o que representa um erro médio do modelo em relação aos pontos experimentais de 4,5 %.

Os parâmetros Y_{NA} e k_{CA} podem ser estimados separadamente considerando-se que quando a velocidade de crescimento específica tende ao seu valor máximo o compartimento de carbono tende a um valor próximo de zero. Essa consideração é baseada na forma assintótica da curva do fator de conversão de nitrogênio em células (Figura 4.6).

Assim, para as condições de atividade máxima da célula, obtém-se das equações do estado estacionário que:

$$X_C = 0 \Rightarrow Y_{NX} = Y_{NA} \quad (5.16)$$

Utilizando a equação (5.16), a equação (5.15) pode ser reescrita na forma:

$$k_{CA} \cdot \left(\frac{D^{\max}}{D + k_{\mu}} - 1 \right) + Y_{NA} = Y_{NX} \quad (5.17)$$

Uma nova otimização de parâmetros utilizando agora a equação (5.17) como equação do modelo para prever os resultados experimentais e sendo Y_{NA} também um parâmetro a ser otimizado, chega-se que:

$$\begin{aligned}
 k_{CA} &= 29,7 \text{ g compartimento C/mol N} \\
 Y_{NA} &= Y_{NX}^{\max} = 145,4 \text{ g compartimento A/mol N} \\
 k_{\mu} &= 0,046 \text{ h}^{-1}
 \end{aligned}$$

A função objetivo apresentou valor 184 o que representa um erro médio de 4,5 % em relação aos dados experimentais.

É importante ressaltar que os parâmetros obtidos são coerentes fisicamente, ou seja, o sinal e a ordem de grandeza dos parâmetros são possíveis fisicamente e satisfazem algumas restrições.

O parâmetro k_{μ} além de ser positivo apresentou um valor muito menor que a velocidade específica de crescimento máxima. Essa restrição era esperada para satisfazer a definição de nível de atividade da célula que tem valor unitário nas condições de crescimento máxima.

O parâmetro que representa o fator de conversão de nitrogênio em compartimento A (Y_{NA}) era esperado ser maior que o parâmetro que representa o fator de conversão do compartimento C em compartimento A e ambos, obviamente, maiores que zero. Essa restrição é devido ao fato de a admissão de carbono no compartimento A ser apenas parcialmente suprida pelo compartimento de estoque C, o restante entra diretamente do exterior no compartimento A. A restrição também foi satisfeita.

Os parâmetros estimados com a consideração de que o compartimento de carbono é próximo a zero em condições de atividade máxima em estado estacionário foram bastante próximos dos estimados sem essa hipótese. Os erro médio dos resultados experimentais com relação aos estimados também foram próximos. Assim, conclui-se que a hipótese de que nas condições de crescimento máxima a célula não possui estoque de carbono é razoável e será adotada.

O desvio médio dos pontos experimentais em relação ao previsto pelo modelo foi de 4,7 %. Nota-se porém uma maior discordância dos dados experimentais em relação ao modelo a baixos valores de velocidades de diluição, embora nessa faixa o número de resultados experimentais sejam escassos.

5.5 - Previsões do Modelo

Dentro de praticamente toda a faixa de velocidades de diluição possíveis a concentração de nitrogênio fora da célula mostrou-se ser insignificante quando comparada à concentração de nitrogênio da alimentação. Isso só não aconteceu para velocidades de diluição muito próximas à máxima. Assim, para a ampla faixa de velocidades de diluição de real

interesse prático - entre zero e $0,23 \text{ h}^{-1}$ - essa informação faz com que a equação (5.10) possa ser escrita na forma da equação (5.18):

$$Y_{NX} = \frac{C_X}{C_{N_f}} \tag{5.18}$$

Como a equação (5.17) prevê o comportamento de Y_{NX} e sendo C_{N_f} uma constante para os dados experimentais coletados, pode-se prever a concentração de células (C_X) e a produtividade em células ($D.C_X$). As Figuras (5.2) e (5.3) apresentam o comportamento do modelo na representação do estado estacionário da concentração de células e da produtividade em células para a faixa de velocidades de diluição de 0 a $0,23 \text{ h}^{-1}$. Esses gráficos apresentam também os resultados experimentais.

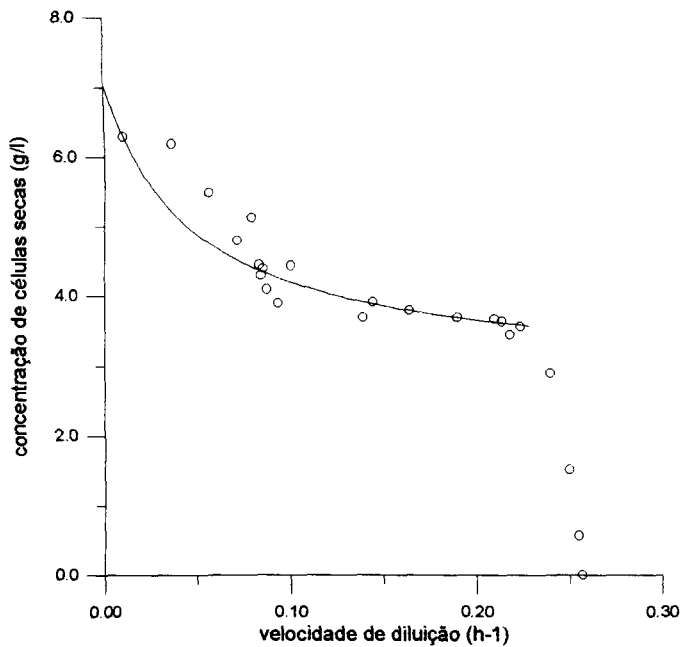


Figura (5.2) - Concentração de células em estado estacionário prevista pelo modelo (-) e obtida experimentalmente (o).

A Figura (5.4) é uma previsão do modelo de como o compartimento de estoque de carbono varia com a velocidade de diluição. Essa informação foi obtida através das equações (5.11) e (5.9).

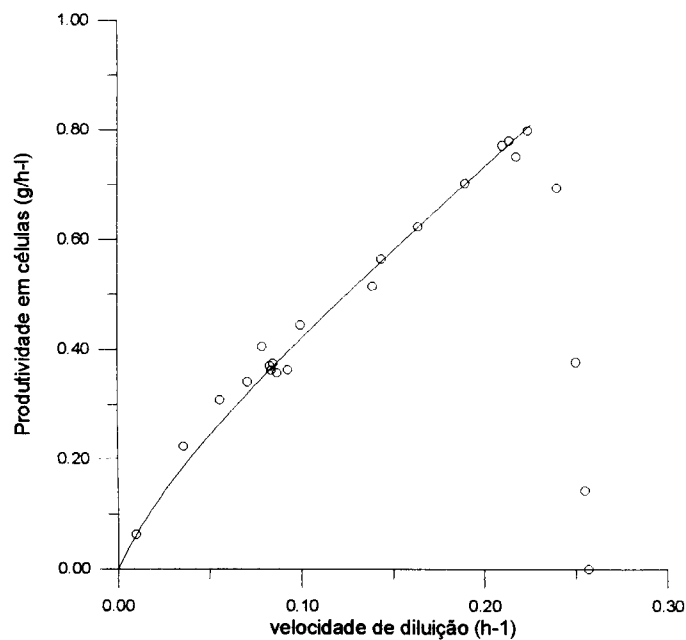


Figura (5.3) - Produtividade em células em estado estacionário prevista pelo modelo (-) e obtida experimentalmente (o).

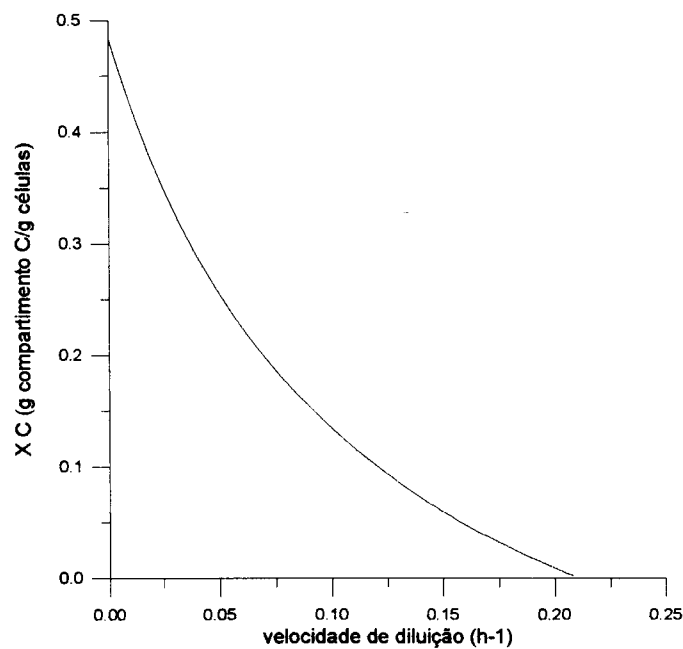


Figura (5.4) - Previsão do modelo para a fração mássica do compartimento de estoque de carbono em estado estacionário.

A fração de carbono da célula (medida experimentalmente) poderia ser obtida se

tivéssemos a composição de carbono do compartimento de estoque e da parte ativa da célula através da equação:

$$f_C \cdot X_C + f_A \cdot (1 - X_C) = f_X \quad (5.19)$$

Onde,

f_X = fração de carbono da célula [g carbono/g células secas].

f_C = fração de carbono no compartimento C [g carbono/g compartimento C].

f_A = fração de carbono no compartimento A [g carbono/g compartimento A].

Como tem-se resultados experimentais da fração de carbono na célula para o estado estacionário de diversas velocidades de diluição (Figura (4.8) do capítulo 4) e como a fração do compartimento de estoque (X_C) pode ser prevista pelo modelo também em função da velocidade de diluição (Figura (5.4)), pode-se estimar as frações de carbono do compartimento ativo da célula e do compartimento utilizado para estoque de carbono.

As frações f_C e f_A podem ser obtidas através de uma estimação de parâmetros a partir dos resultados experimentais disponíveis do conteúdo de carbono das células em estado estacionário. Assim, utilizando o programa de minimização SIMPLEX desenvolvido (apêndice D) e utilizando como função objetivo o módulo da diferença entre o valor de f_X experimental e o previsto pelo modelo obtém-se:

$$\begin{aligned} f_C &= 0,64 \text{ g carbono/g compartimento C} \\ f_A &= 0,49 \text{ g carbono/g compartimento A} \end{aligned}$$

O erro médio do ajuste dos pontos experimentais com relação aos simulados pelo modelo foi de 2,2 % e esse ajuste pode ser melhor visualizado na Figura (5.5).

Observa-se uma coerência nos parâmetros obtidos uma vez que a fração em carbono da parte ativa da célula tem um valor próximo à composição normal de uma célula bacteriana. Como exemplo, Hammer (1981) apresenta uma composição típica dos principais constituintes celulares para células bacterianas secas como sendo $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,4}\text{N}_{0,23}$, o que leva a uma fração de carbono de 0,50 g/g ou um pouco menor se considerarmos outros componentes celulares.

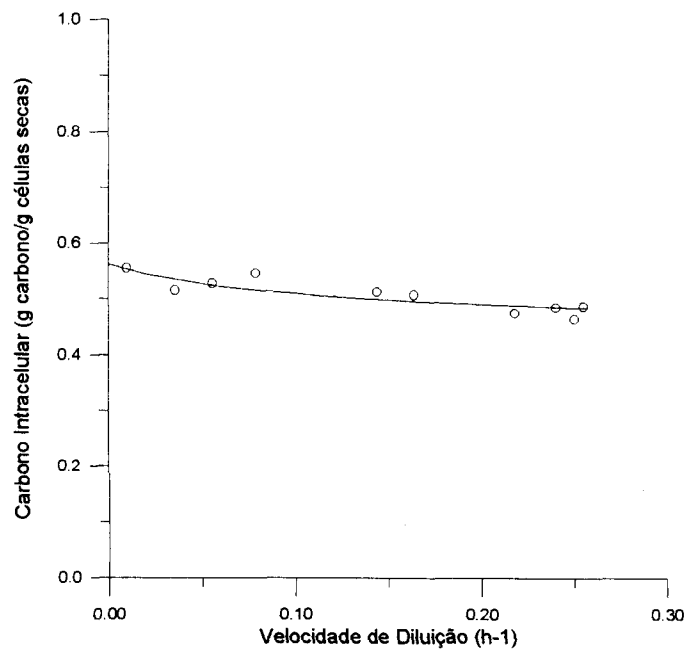


Figura (5.5) - Ajuste dos pontos experimentais de concentração intracelular de carbono (o) pelo modelo (-).

A fração de carbono no compartimento de estoque de carbono na célula apresentou um valor bastante alto (0,64 g de carbono/g compartimento C). Este valor sugere que a célula armazena carbono em um polímero cuja concentração em carbono é bastante alta. Uma hipótese é o armazenamento de carbono na forma de Poly-β-Hidroxibutirato (PHB) que apresenta em sua unidade monomérica a composição $C_4H_6O_2$ que leva a uma fração de carbono de 0,56 g de carbono/g de PHB.

5.6 - Conclusões

Os bons ajustes da produtividade em células e concentração intracelular de carbono promovidos pelo modelo, os resultados interessantes de previsões da fração de carbono dos compartimentos C e A, e a estimativa adequada da fração mássica do compartimento de estoque de carbono na célula sugerem que as bases em que o modelo é proposto tem coerência, incentivando esforços para o seu desenvolvimento.

Porém, para que o modelo desenvolvido possa ser efetivamente testado, novos

experimentos devem ser realizados a fim de confirmar a sua capacidade preditiva na representação de resultados experimentais de estado estacionário com variadas concentrações de nitrogênio na corrente de alimentação.

Uma das falhas do modelo cinético é que este não apresenta a velocidade de reação do nitrogênio em compartimento A. Esta representação não foi necessária, pois pretendeu-se que o modelo representasse a grande faixa de velocidade de diluição passível de aplicação prática, em que se sabe, baseado nos experimentos realizados, que a concentração de nitrogênio no meio fermentativo é desprezível em relação à concentração de nitrogênio na alimentação. Porém, para futuros desenvolvimentos do modelo, deve-se considerar essa reação, que o dotará de capacidade para representar o *wash out*, bem como de extrapolar sua aplicação para o estado não estacionário.

Capítulo 6

Crescimento com Excesso de Nitrogênio

A finalidade do presente capítulo é apresentar os procedimentos e resultados experimentais do comportamento dinâmico do sistema estudado quando submetido a pulsos na concentração da fonte de nitrogênio.

6.1 - Introdução

Como apresentado nos testes preliminares, o excesso de nitrogênio é uma preocupação tecnológica importante no processo de produção desses microorganismos, uma vez que há a produção de nitrito que em determinado nível inibe o crescimento da cultura. Assim, o estudo da assimilação e eliminação das formas de nitrogênio pela cultura é imperativo para auxiliar no controle dos níveis de nitrito quando da aplicação do processo em estudo.

Para tanto, testes dinâmicos experimentais de pulso de amônia foram realizados e as concentrações de nitrito, nitrato e amônia foram acompanhadas dinamicamente. Pretende-se que esses resultados sejam de utilidade para uma proposta de modelo que represente a assimilação e eliminação de compostos nitrogenados pelas células.

6.2 - Procedimento Experimental

O fermentador agitado clássico foi operado continuamente com excesso de nutrientes exceto a fonte de nitrogênio (amônia) que atuava como substrato limite. O sistema foi levado até um suposto estado estacionário onde as concentrações de células e a composição do gases de saída não variavam significativamente com o tempo. Nestas condições as concentrações de amônia, nitrato e nitrito permaneciam a níveis praticamente nulos de concentração.

As mudanças no tempo zero foram realizadas adicionando-se ao fermentador um pequeno volume de líquido contendo a quantidade de amônia necessária para se atingir a concentração inicial de amônia pretendida para o teste de pulso. A quantidade de amônia colocada no fermentador foi acompanhada de outros nutrientes e micronutrientes líquidos na mesma proporção do substrato líquido de alimentação.

O pulso era efetuado em um intervalo de tempo de aproximadamente 10 minutos para que o controle de pH tivesse tempo de conter a tendência de abaixamento no pH, pois o substrato era fortemente ácido. As concentrações de amônia, nitrato e nitrito no meio fermentativo, bem como a concentração de células foram medidas dinamicamente.

Os valores iniciais da concentração de amônia foram escolhidos de forma a favorecer o aparecimento de nitrato e nitrito no meio fermentativo, evitando-se uma possível inibição no crescimento da cultura o que acarretaria sua possível extinção.

6.3 - Resultados Experimentais e Discussão

Foram efetuados três ensaios quantitativos que refletem bem o comportamento do sistema quando submetido a um pulso de nitrogênio. Procurou-se realizar os testes de pulso a partir de estados estacionários próximos.

A Figura (6.1) apresenta os resultados experimentais das concentrações de amônia, nitrato, nitrito e células (absorbância) para um pulso de amônia de 21,7 mmol/l. Da mesma forma a Figura (6.2) mostra os resultados experimentais para um pulso de amônia de 19,1 mmol/l e a Figura (6.3) para um pulso de amônia de 14,3 mmol/l. O apêndice C apresenta os resultados experimentais em forma de tabelas.

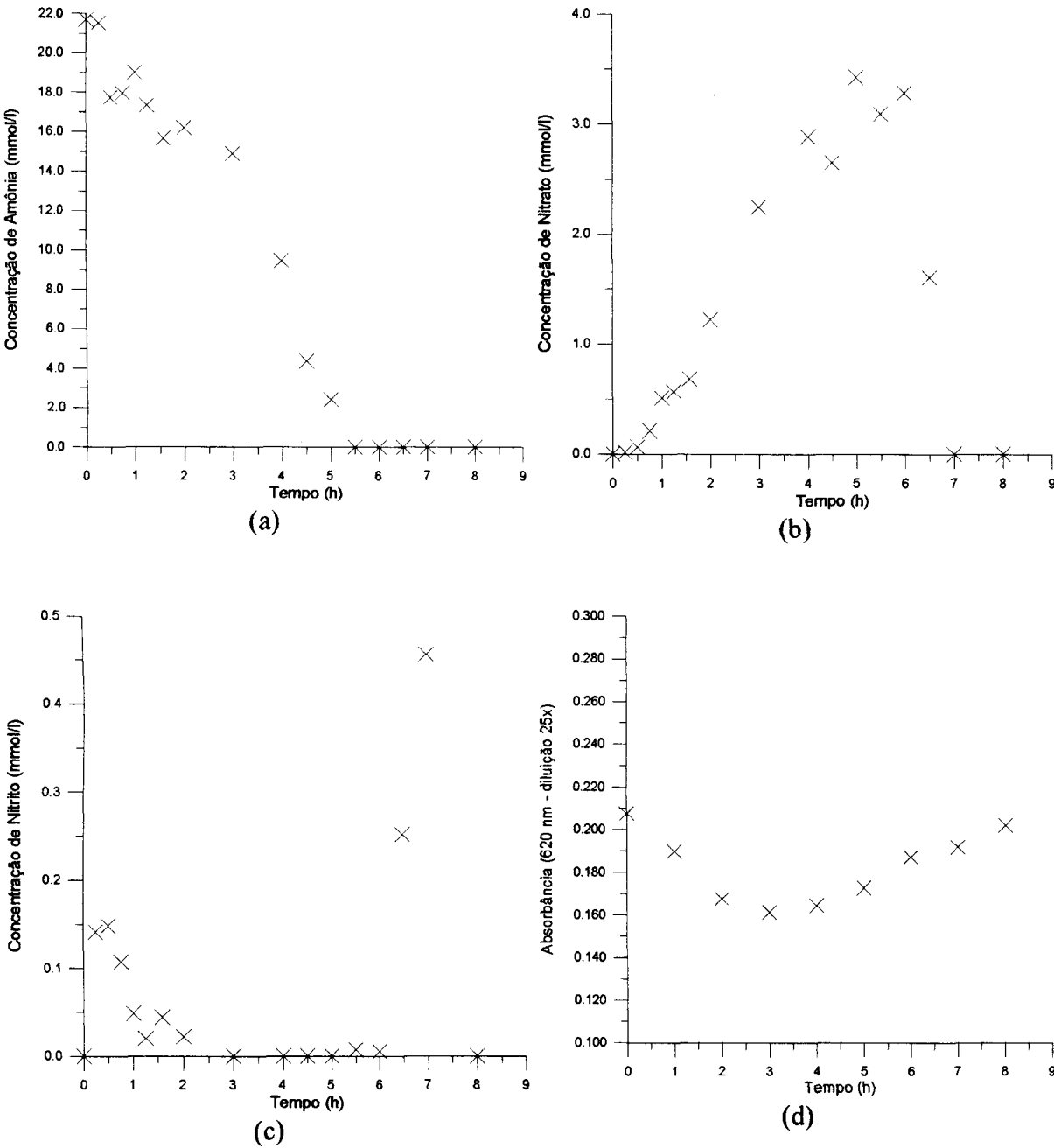


Figura 6.1 - Comportamento dinâmico da concentração de amônia (a), concentração de nitrato (b), concentração de nitrito (c), e concentração de células (absorbância) (d), durante teste de pulso com 50,0 mmol de amônia. [$D(t=0^-)=0,083\text{ h}^{-1}$, $C_{\text{NH}_3}(t=0^+)=21,7\text{ mmol/l}$].

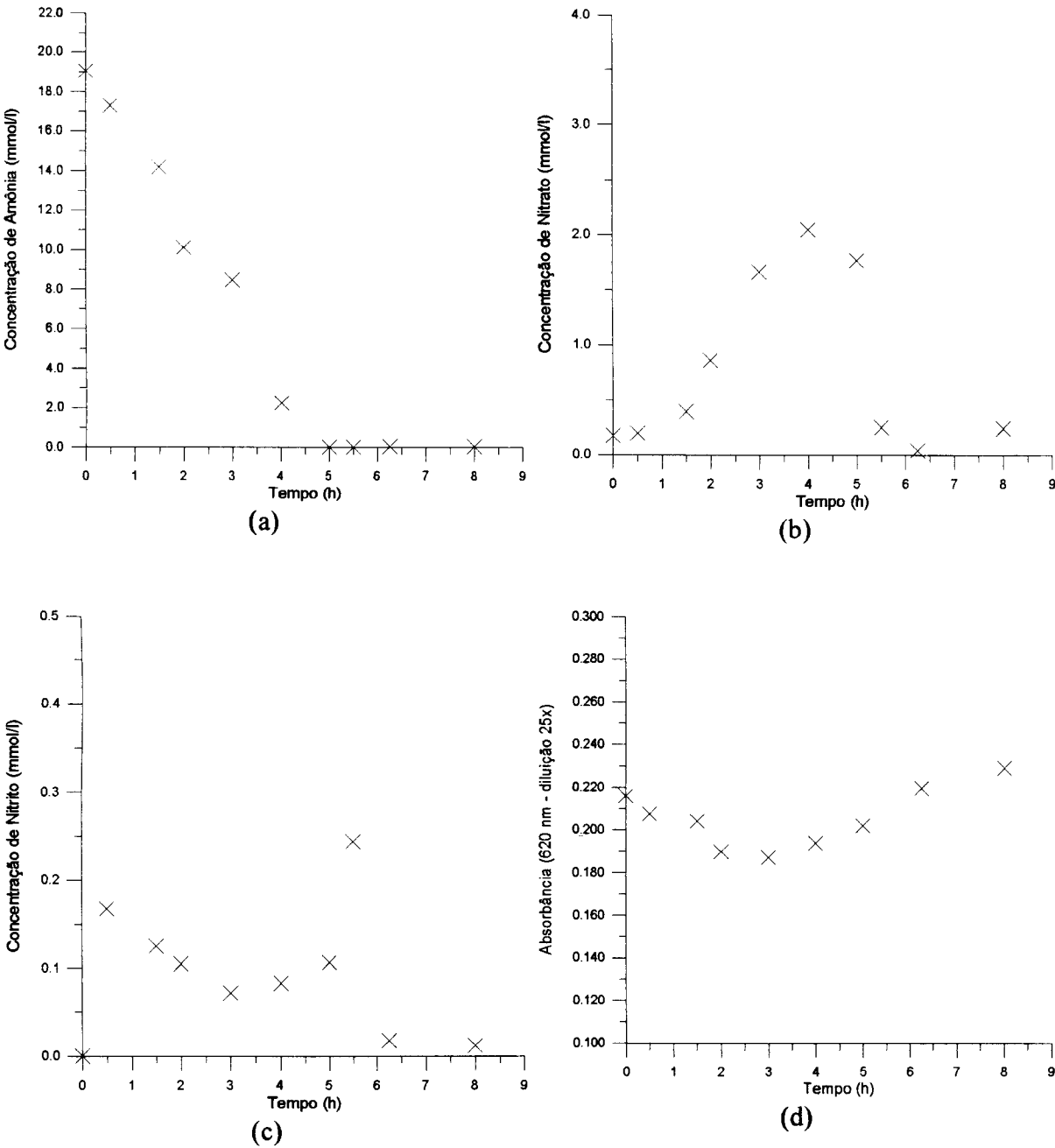


Figura 6.2 - Comportamento dinâmico da concentração de amônia (a), concentração de nitrato (b), concentração de nitrito (c), e concentração de células (absorbância) (d), durante teste de pulso com 40,0 mmol de amônia. [$D(t=0-)=0,085 \text{ h}^{-1}$, $C_{\text{NH}_3}(t=0+)=19,1 \text{ mmol/l}$].

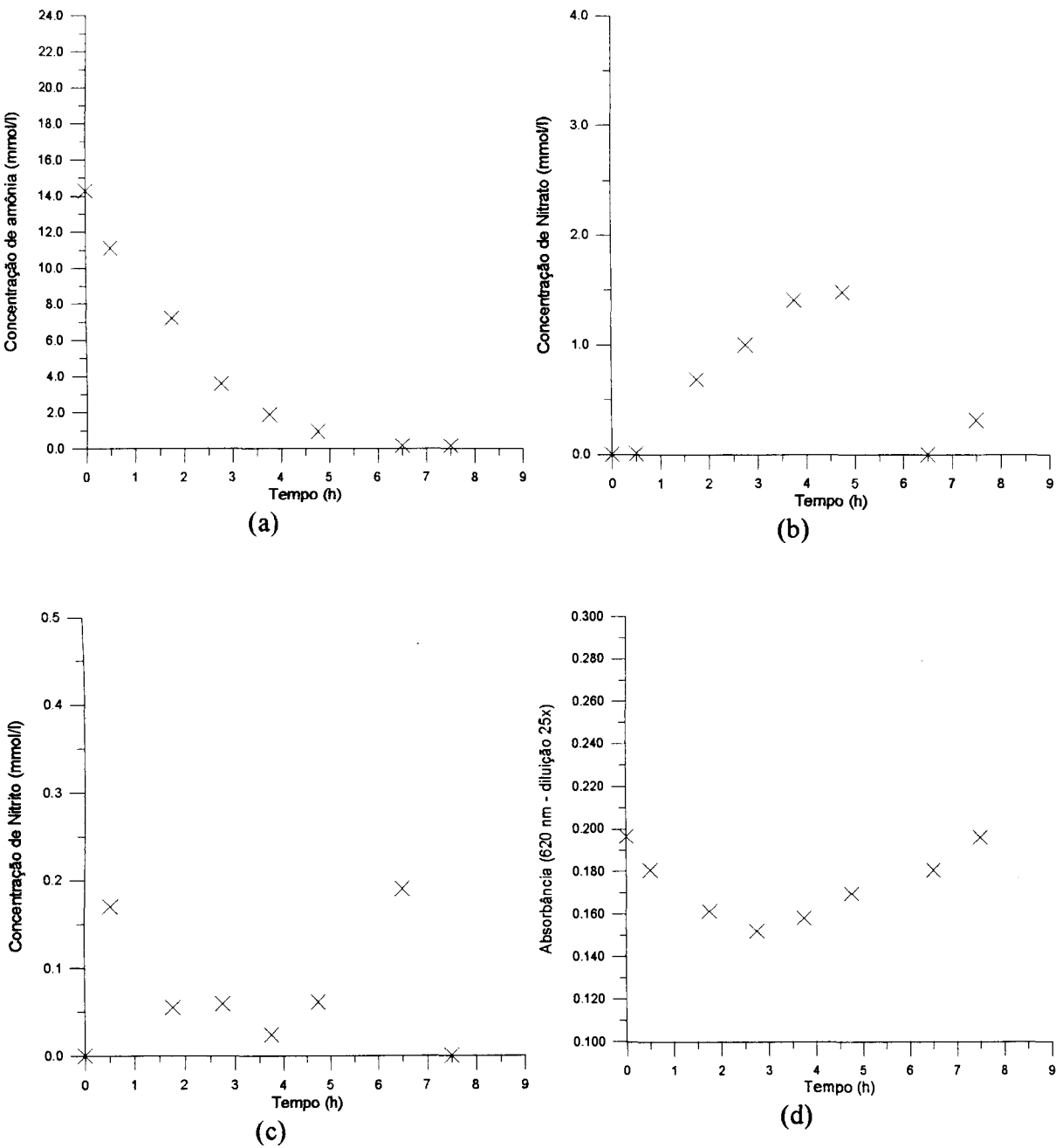


Figura 6.3 - Comportamento dinâmico da concentração de amônia (a), concentração de nitrato (b), concentração de nitrito (c), e concentração de células (absorbância) (d), durante teste de pulso com 30,0 mmol de amônia. [$D(t=0^-)=0,086\text{ h}^{-1}$, $C_{NH_3}(t=0^+)=14,3\text{ mmol/l}$].

Observando o comportamento transiente dos resultados experimentais de pulso de amônia fica evidente que há um sistema complexo para a metabolização do nitrogênio. Um pulso de amônia é seguido por uma sequência de excreções e assimilações provocando o aparecimento de picos de primeiro nitrito, seguido por nitrato e, sobreposto à calda deste, nitrito novamente. Em todos os casos o comportamento qualitativo do sistema é o mesmo, ou seja, esses três picos são típicos e podem ser observados durante todos transientes de pulsos de amônia.

Os microorganismos assimilam a amônia do meio fermentativo e uma parte desta é transformada inicialmente em nitrito e nitrato. O nitrito rapidamente desaparece e o nitrato é acumulado no meio fermentativo. A partir do momento que o nível de amônia do meio tende a zero, o nitrato que é excretado pelos microorganismos começa a ser consumido como fonte de nitrogênio e um novo pico de nitrito aparece em solução.

Uma teoria para explicar essas observações é que nitrito seria formado independentemente da "vontade" celular e esta, para a sua proteção, oxidaria o nitrito a nitrato que por sua vez é expelido da célula uma vez que há amônia em excesso. Quando da ausência de amônia, os microorganismos consumiriam o nitrato outrora expelido. Para tanto, as células teriam que reduzir o nitrato a amônia o que é feito passando pelo nitrito.

É bem aceito na literatura que a incorporação do carbono à célula dá-se através da oxidação de metano a metanol utilizando a enzima metano-monooxigenase. A enzima metano-monooxigenase também poderia oxidar amônia para nitrito. Assim, os substratos competiriam pela mesma enzima e ter-se-ia um sistema na célula reagindo exclusivamente com compostos de nitrogênio não participando do anabolismo e, conseqüentemente, independente do crescimento e "vontade" celular.

Uma pequena queda na concentração de células representada pela variação da absorbância era esperada depois da realização do pulso de amônia, uma vez que houve uma variação instantânea do volume do fermentador que o controle de volume compensava aumentando a vazão de saída do fermentador. Porém, esse fato não explica totalmente essa queda na concentração de células devido à variação de volume ser pequena (menor que 5% do volume do fermentador).

Outra explicação seria que o fenômeno estaria associado à diminuição da velocidade específica de crescimento dos microorganismos e seria atribuído à tentativa dos

microorganismos se adaptarem às novas condições de crescimento. Desta forma, as células "esqueceriam" o crescimento e concentrariam esforços no aumento ou ativação de seu sistema enzimático, visando o crescimento com velocidade específica maior que a do estado estacionário (que é regulada pela quantidade limitada da fonte de nitrogênio). Porém, constatou-se experimentalmente que a produção de gás carbônico não diminui, ou seja, a atividade da célula para a produção de energia é incrementada a partir da realização do pulso.

A Figura (6.4) apresenta a produção de gás carbônico pela cultura durante o ensaio de pulso com 40 mmoles de amônia.

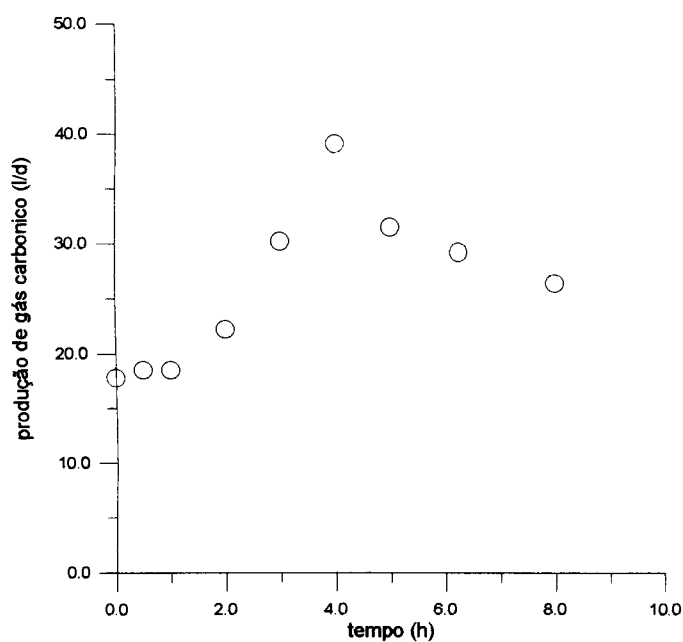


Figura 6.4 - Comportamento dinâmico da produção de gás carbônico durante teste de pulso com 40 mmol de amônia. $[D(t=0-)=0,085\text{ h}^{-1}$, $C_{NH_3}(t=0+)=19,1\text{ mmol/l}$].

A explicação que se evidencia, então, é que o tamanho das células diminuiria a partir do início dos testes de pulso, refletindo-se em uma diminuição da absorbância e mesmo da massa de células. Esse fato poderia ser atribuído ao consumo de carbono estocado nas células, estoque esse adquirido quando do crescimento com limitação de nitrogênio e excesso de carbono. Com o aumento da atividade celular, devido à abundância de substratos, a célula utilizaria também o carbono armazenado em seu estoque e a captura do carbono na forma de metano sofreria, agora, a competição da fonte de nitrogênio (amônia) pela mesma enzima.

6.4 - Conclusões

As observações experimentais dos testes de pulso levam a conclusões interessantes que ajudarão na modelagem do processo de assimilação das fontes de nitrogênio.

A primeira delas é que os microorganismos estão aptos a consumir todas as formas em que o nitrogênio aparece: amônia, nitrito e nitrato. Assim, as células estão aptas a consumir também nitrito em pequenas quantidades (até 0,5 mmol/l), mesmo tendo sido constatado que nitrito pode ser um forte inibidor. Concentrações de amônia superiores a 25 mmol/l inibem o crescimento da cultura.

Constatou-se, também, que os microorganismos preferem consumir amônia a outras fontes de nitrogênio presentes. Assim, presume-se que a incorporação de nitrogênio à célula seja na forma de amônia. Isso já era esperado pois o estado de oxidação de nitrogênio na forma de amônia é mais parecido com o estado de oxidação do nitrogênio na forma de células.

Outra observação interessante é que a formação e o consumo de nitrato passa pelo composto nitrito. Isso explicaria o primeiro e segundo picos de nitrito, respectivamente quando nitrato é formado e quando nitrato é consumido.

Conclui-se ainda que, devido ao aumento da atividade celular, as células devem utilizar a fonte de carbono de suas reservas quando da aplicação do pulso, contribuindo assim para a diminuição da massa celular observada.

Capítulo 7

Modelagem da Assimilação do Nitrogênio

O objetivo do capítulo é desenvolver um modelo de crescimento celular que descreva a dinâmica da assimilação do nitrogênio pela cultura metanotrófica em um fermentador tipo tanque agitado clássico operando com excesso de nitrogênio. O modelo desenvolvido é capaz de reproduzir qualitativamente a excreção e admissão de nitrato e nitrito pela célula quando do excesso de amônia no caldo de fermentação. Um modelo simplificado é obtido do modelo completo e os parâmetros do modelo simplificado são estimados.

7.1 - Introdução

Como dito anteriormente, *Methylococcus capsulatus* exibe um caminho metabólico interessante para o carbono e nitrogênio. Com relação à assimilação do carbono, existe na literatura um excelente trabalho objetivando a elucidação das várias enzimas que transformam o carbono em moléculas necessárias à construção e atividade das células [Anthony (1982)]. Os trabalhos existentes na literatura com relação à assimilação de nitrogênio por organismos metanotróficos são escassos, contendo poucas informações relativas à inibição do crescimento celular por excesso de nitrogênio.

A assimilação de amônia pela célula assume particular importância para a condução do processo visto que a célula pode produzir nitrito (constatado experimentalmente neste trabalho) quando há excesso relativamente pequeno de amônia no caldo fermentativo. Constatou-se que o surgimento de nitrito em determinado nível é acompanhado por inibição do crescimento celular. Esse fato também foi observado por outros autores [Dalton (1977), O'Neill (1977)].

Em vista da importância que assume assimilação e dissimilação do nitrogênio para o crescimento das células, pretende-se desenvolver um modelo matemático representativo deste

fenômeno fundamentado no comportamento qualitativo dos resultados experimentais de pulso de amônia obtidos nesse trabalho e em algumas observações importantes retiradas da literatura.

7.2 - Considerações Físicas do Modelo

Parece um consenso na literatura que a enzima metano-monooxigenase (MMO) existente em organismos metilotróficos é a responsável pela captação e oxidação do metano a metanol. Essa enzima carece de especificidade e pode oxidar também amônia, sendo esta, portanto, um inibidor competitivo [Carlsen *et al.* (1991)]. O resultado desta oxidação não é bem definida na literatura, podendo ser metilamina, nitrito ou nitrato.

Para explicar os resultados experimentais obtidos será considerado que o excesso de amônia é oxidado via um sistema enzimático que utiliza a enzima metano-monooxigenase (MMO) para nitrito e este nitrito é posteriormente oxidado a nitrato. Os resultados experimentais sugerem, ainda, que amônia é a fonte de nitrogênio preferida dos microorganismos, o que concorda com as observações realizadas por Leak (1984). Para que os organismos distingam entre essas duas fontes de nitrogênio é razoável considerar que amônia exerce um efeito inibitório na redução do nitrato e nitrito, respectivamente para nitrito e amônia, criando assim compartimentos dos dois compostos.

Baseado nas considerações acima, propõe-se um modelo físico para representar principalmente a assimilação do nitrogênio pela célula que pode ser visualizado na Figura (7.1). As várias etapas de transformação do nitrogênio são representados na figura por setas e as etapas de metabolização do carbono foram incluídas no modelo devido à competição entre carbono e nitrogênio pela enzima MMO que é sugerida na literatura. Como pode ser visto na Figura (7.1), definiram-se 5 sistemas enzimáticos envolvidos no transporte do nitrogênio: E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_N .

Na etapa de crescimento da célula com uma quantidade limitada de amônia, grande parte da amônia intracelular entra no sistema enzimático metabólico normal (E_N) e termina na forma de novas células. A partir do momento em que a quantidade de amônia é considerável, uma parte desta é transformado pelo sistema enzimático E_1 (que inclui a enzima

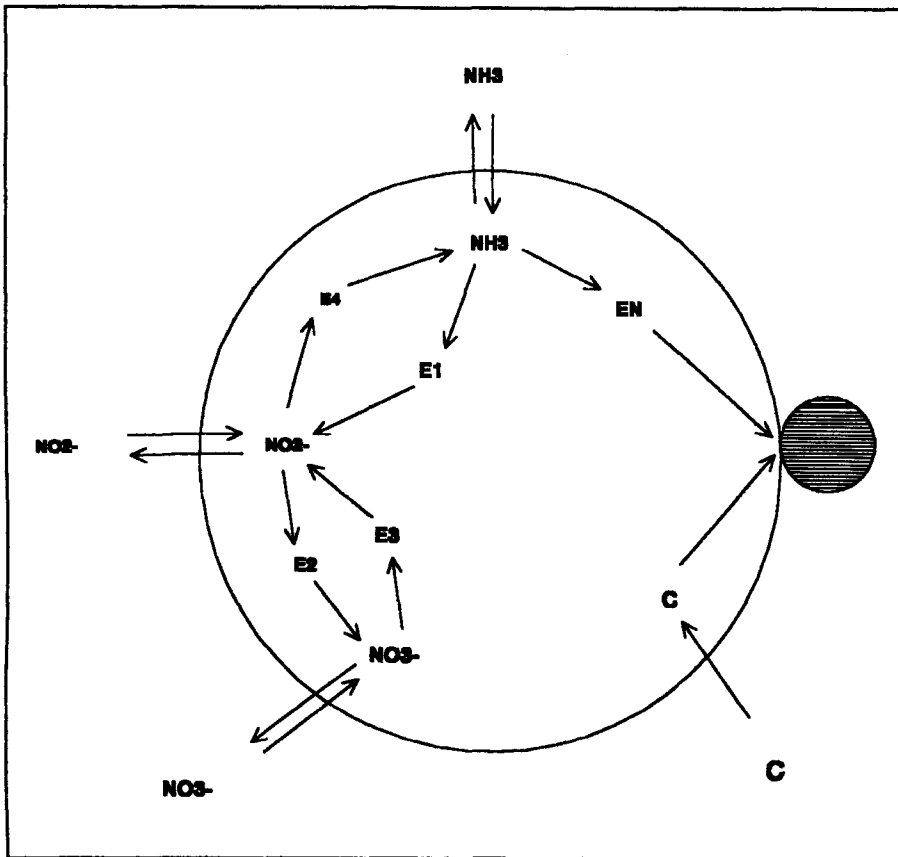


Figura (7.1) - Esquema das reações e sistemas enzimáticos propostos para o modelo.

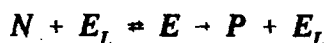
metano-monooxigenase) em nitrito intracelular. Este composto, não desejado pela célula, é transformado via três caminhos distintos: Eliminação via membrana celular para o exterior da célula rendendo nitrito fora da célula, re-redução para amônia via o sistema enzimático E_4 , e oxidação para nitrato intracelular, que é neutro para a célula uma vez que nitrato é inclusive uma fonte de nitrogênio alternativa, via o sistema enzimático E_2 . O nitrato acumulado na célula pode ser reduzido para nitrito via o sistema enzimático E_3 ou ser eliminado rendendo nitrato fora da célula. Se amônia estiver em excesso a reação de redução do nitrato é bloqueada porque a célula prefere amônia como fonte de nitrogênio. Assim nitrato é acumulado e excretado da célula rendendo nitrato extracelular. Quando a concentração de amônia intracelular eventualmente se torna pequena, o bloqueio para a redução de nitrato desaparece e o nitrato acumulado é reduzido a nitrito que por sua vez é reduzido a amônia a qual é utilizada pelo sistema normal E_N produzindo células como o produto final.

Não será considerado nenhum sistema enzimático para a transformação de carbono

intracelular (C) em células. O consumo de carbono é considerado como proporcional ao consumo de amônia para o crescimento. A estocagem de carbono ou o consumo do carbono do estoque não é considerada no modelo proposto.

7.3 - Modelo Matemático

Todas as etapas de reações intracelulares serão consideradas como simples reações enzimáticas onde todo sistema enzimático é representado por uma única enzima hipotética que toma parte da reação. O mecanismo da reação enzimática segue o esquema convencional. Nitrogênio em uma determinada forma (N) reage com a enzima livre (E_L) dando um complexo enzima-reagente (E) que por sua vez é transformado em produto (P) - outro estado de oxidação do nitrogênio - e enzima livre. O esquema da reação enzimática é assim representado:



A quantidade total de enzimas é considerada constante, e a velocidade de formação do complexo enzima-reagente (E) é proporcional à diferença entre a concentração de enzima complexada e a concentração de equilíbrio desta enzima, resultando na Equação (7.1).

$$r_{E_i} = k_{E_i} \cdot (X_{E_i}^* - X_{E_i}) \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.1)$$

Sendo,

r_{E_i} = velocidade de formação do complexo enzima i-nitrogênio (E_i) [mmol N/l células-h].

k_{E_i} = constante [h^{-1}].

X_{E_i} = concentração intracelular do complexo E_i [mmol N/l células].

$X_{E_i}^*$ = concentração intracelular de equilíbrio do complexo E_i [mmol N/l células].

A concentração enzimática de equilíbrio é dependente da concentração de nitrogênio reagente (indutor na formação do complexo enzima-reagente) e, para os sistemas enzimáticos definidos por E_2 e E_N , representada por Equações do tipo Michaelis-Menten, de acordo com as Equações (7.2) e (7.3).

$$X_{E_2}^* = X_{E_2}^{MAX} \cdot \frac{X_{NO_2}}{X_{NO_2} + K_{M_2}} \quad (7.2)$$

$$X_{E_N}^* = X_{E_N}^{MAX} \cdot \frac{X_{NH_3}}{X_{NH_3} + K_{M_N}} \quad (7.3)$$

Onde,

$X_{E_2}^*$ e $X_{E_N}^*$ = concentrações intracelulares de equilíbrio respectivamente dos complexos E_2 e E_N [mmol N/l células].

$X_{E_2}^{MAX}$, $X_{E_N}^{MAX}$, K_{M_2} e K_{M_N} = constantes [mmol N/l células úmidas].

X_{NO_2} e X_{NH_3} = concentrações intracelulares respectivamente de nitrito e amônia [mmol N/l células].

Para as enzimas responsáveis pela redução do nitrato para nitrito (E_3) e do nitrito para amônia (E_4) a representação da concentração enzimática de equilíbrio leva em consideração, além da constante tipo Michaelis-Menten, uma influência inibitória da concentração de amônia intracelular (X_{NH_3}) no valor da concentração de equilíbrio de enzimas. Este termo inibitório é colocado para restringir o consumo de nitrato e nitrito pelas células quando amônia estiver presente em concentrações elevadas. Isso assegura o fato experimental de os microorganismos preferirem amônia a outros substratos nitrogenados. Assim, as Equações (7.4) e (7.5) representam as concentrações enzimáticas de equilíbrio para as enzimas E_3 e E_4 .

$$X_{E_3}^* = X_{E_3}^{MAX} \cdot \frac{X_{NO_3}}{X_{NO_3} + K_{M_3} + K_{I_3} \cdot X_{NH_3}} \quad (7.4)$$

$$X_{E_4}^* = X_{E_4}^{MAX} \cdot \frac{X_{NO_2}}{X_{NO_2} + K_{M_4} + K_{I_4} \cdot X_{NH_3}} \quad (7.5)$$

Onde,

$X_{E_3}^*$ e $X_{E_4}^*$ = concentrações intracelulares de equilíbrio respectivamente dos complexos E_3 e

E_4 [mmol N/l células].

X_{NO_3} = concentração intracelular de nitrato [mmol N/l células].

$X_{E_3}^{MAX}$, $X_{E_4}^{MAX}$, K_{M_3} e K_{M_4} = constantes [mmol N/l células].

K_{I_3} e K_{I_4} = constantes adimensionais.

O presente modelo considera que a amônia é oxidada pela mesma enzima que é utilizada na fixação do carbono na célula. Assim o modelo deve representar uma competição entre carbono e amônia pela mesma enzima MMO quando há excesso de amônia. Para que essa competição fosse representada pelo modelo definiu-se primeiramente a fração da enzima MMO em uso pelo sistema enzimático responsável pela admissão do carbono como dependente da concentração de carbono e amônia intracelular conforme Equação (7.6). A fração de MMO comprometida com a incorporação de carbono (fr_C) é considerada pelo modelo ter influência negativa na concentração enzimática de equilíbrio da enzima responsável pela oxidação da amônia (E_1) de acordo com a Equação (7.7).

$$fr_C = \frac{X_C}{X_C + K_C + K_{C_I} \cdot X_{NH_3}} \quad (7.6)$$

$$X_{E_1}^* = X_{E_1}^{MAX} \cdot \frac{X_{NH_3}}{X_{NH_3} + K_{M_1}} \cdot (1 - fr_C) \quad (7.7)$$

Onde,

fr_C = fração de MMO comprometida com a incorporação do carbono.

X_C = concentração intracelular de carbono [mmol C/l células].

$X_{E_1}^{MAX}$ e K_{M_1} = constantes [mmol N/l células].

K_C = constante [mmol C/l células].

K_{C_i} = constante [mmol C/mmol N].

A velocidade de formação do produto (P) que é uma outra forma do composto nitrogênio é de primeira ordem em relação a concentração de enzima ativada.

$$r_i = k_i X_{E_i} \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.8)$$

Onde,

r_i = velocidade de formação do produto via o sistema enzimático i [mmol N/h-l células].

k_i = constante [h^{-1}].

O transporte das diversas formas de nitrogênio via membrana celular será considerado um fenômeno de transporte passivo sendo a velocidade do transporte proporcional à diferença de concentração entre o exterior e interior da célula.

$$r_{N_i}^T = k_T (C_{N_i} - X_{N_i}) \quad i=1,2,3 \quad (7.9)$$

Onde,

$r_{N_i}^T$ = velocidade de transporte do componente N_i para o interior da célula [mmol N/h-l de células].

k_T = constante de transferência de massa [h^{-1}].

C_{N_i} = concentração extracelular do componente N_i [mmol N/l].

X_{N_i} = concentração intracelular do componente N_i [mmol N/l de células].

N_1 , N_2 e N_3 = representam os componentes amônia, nitrito e nitrato, respectivamente.

Da mesma forma para o carbono:

$$r_C^T = k_T(C_C - X_C) \quad (7.10)$$

Onde,

r_C^T = velocidade de transporte de carbono para o interior da célula [mmol C/h-l células].

C_C = concentração de carbono na fase líquida [mmol C/l].

X_C = concentração intracelular de carbono [mmol C/l células].

Com a definição das reações cinéticas intracelulares para os compostos e as pseudo-enzimas envolvidas e tendo a definição das Equações de transporte, um balanço de massa num volume de controle definido pelas próprias células pode ser realizado para todos os componentes intracelulares envolvidos. O balanço de massa para as 5 enzimas envolvidas é representado pela Equação (7.11).

$$\frac{dX_{E_i}}{dt} = r_{E_i} - r_i - \frac{X_{E_i}}{V_X} \cdot \frac{dV_X}{dt} \Big|_X \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.11)$$

Sendo,

$$\left. \frac{dV_x}{dt} \right|_x = \text{variação do volume de células para crescimento [l/h]}.$$

O termo de variação do volume de células com o tempo da Equação (7.11) representa a diluição da enzima E_i devido ao crescimento celular. Esse termo foi obtido de um balanço de massa usando as células como volume de controle. Assim, o termo de variação de volume das células está relacionado ao crescimento celular e nada tem a ver com a variação de volume das células no fermentador, que teria a influência de variáveis hidrodinâmicas. Dessa forma, tendo-se em conta que a definição de velocidade específica de crescimento é dada pela Equação (7.12) e considerando a massa específica das células constante e a velocidade de crescimento das células úmidas igual a de células secas, pode-se escrever a Equação (7.13)

$$\mu = \frac{1}{M_x} \cdot \left. \frac{dM_x}{dt} \right|_x \quad (7.12)$$

$$\mu = \frac{1}{V_x} \cdot \left. \frac{dV_x}{dt} \right|_x \quad (7.13)$$

Onde,

μ = velocidade específica de crescimento [h^{-1}].

$$\left. \frac{dM_x}{dt} \right|_x = \text{variação da massa de células secas para crescimento [g/h]}.$$

V_x = volume das células úmidas[l].

Assim, é conveniente reescrever a Equação (7.11) na forma da Equação (7.14):

$$\frac{dX_{E_i}}{dt} = r_{E_i} - r_i - \mu \cdot X_{E_i} \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.14)$$

Da mesma forma escreve-se as Equações de balanço de massa para os diversos estados de nitrogênio intracelular conforme Equações (7.15), (7.16) e (7.17).

$$\frac{dX_{NH_3}}{dt} = r_{NH_3}^T - \mu \cdot X_{NH_3} + r_4 - r_{E_1} - r_{E_N} \quad (7.15)$$

$$\frac{dX_{NO_2}}{dt} = r_{NO_2}^T - \mu \cdot X_{NO_2} + r_1 + r_3 - r_{E_2} - r_{E_4} \quad (7.16)$$

$$\frac{dX_{NO_3}}{dt} = r_{NO_3}^T - \mu \cdot X_{NO_3} + r_2 - r_{E_3} \quad (7.17)$$

Onde,

r_1 , r_2 , r_3 e r_4 = velocidades de formação de produto via os sistemas enzimáticos respectivos (1, 2, 3 e 4) [mmol N/h-l células].

$r_{NH_3}^T$, $r_{NO_2}^T$, $r_{NO_3}^T$ = velocidades de transporte de respectivamente amônia, nitrito e nitrato para o interior das células [mmol N/h-l células].

r_{E_1} , r_{E_2} , r_{E_3} , r_{E_4} e r_{E_N} = velocidades de formação dos respectivos complexos enzima - nitrogênio (E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_N) [mmol N/l células - h].

Um balanço de massa para o carbono intracelular faz-se necessário uma vez que este exerce papel de importância na determinação da fração de MMO envolvida na oxidação da

amônia (Equação (7.18)). A velocidade de consumo de carbono celular foi considerada proporcional ao consumo de amônia para o crescimento celular e o coeficiente de proporcionalidade (Y_{CN}), que define a estequiometria entre o consumo de carbono e nitrogênio, pode ser obtido de resultados experimentais.

$$\frac{dX_C}{dt} = r_C^T - r_N Y_{NC} - \mu \cdot X_C \quad (7.18)$$

Onde,

r_N = velocidade de consumo de nitrogênio para o crescimento celular [mmol N/h-l células].

Y_{NC} = relação estequiométrica entre o consumo de carbono e nitrogênio usados para o crescimento celular [mmol C/mmol N].

Para o carbono extracelular o balanço de massa dá origem à Equação (7.19).

$$\frac{dC_C}{dt} = K_L a \left(\frac{C_G}{H} - C_C \right) - \frac{r_C^T \cdot C_{X_w}}{\rho_X} - \frac{F}{V} \cdot C_C - C_C \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (7.19)$$

Onde,

C_G = concentração de carbono na fase gasosa [mmol C/l].

H = constante de Henry $\left[\frac{\text{mmol C/l fase gas.}}{\text{mmol C/l fase liq.}} \right]$.

C_{X_w} = concentração de células úmidas [g/l].

$K_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de massa [h^{-1}].

V = volume do fermentador [l].

F = vazão volumétrica à saída do fermentador [l/h].

ρ_X = massa específica das células [g células úmidas/l células].

As equações de balanço de massa dos componentes intracelulares independem do modo de operação do fermentador. Porém, para os compostos extracelulares o balanço de massa é efetuado considerando como volume de controle o fermentador e o fato de estar-se trabalhando em um fermentador agitado clássico continuamente alimentado é considerado. As Equações (7.20) e (7.21) são obtidas para representar as concentrações de nitrito e nitrato fora da célula e a Equação (7.22) para representar a concentração de amônia, que está presente na corrente de alimentação por ser a fonte de nitrogênio.

$$\frac{dC_{NO_2}}{dt} = -r_{NO_2}^T \cdot \frac{V_X}{V} - \frac{F}{V} \cdot C_{NO_2} - \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \cdot C_{NO_2} \quad (7.20)$$

$$\frac{dC_{NO_3}}{dt} = -r_{NO_3}^T \cdot \frac{V_X}{V} - \frac{F}{V} \cdot C_{NO_3} - \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \cdot C_{NO_3} \quad (7.21)$$

$$\frac{dC_{NH_3}}{dt} = -r_{NH_3}^T \cdot \frac{V_X}{V} + \frac{F^o}{V} \cdot C_{NH_3}^o - \frac{F}{V} \cdot C_{NH_3} - \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \cdot C_{NH_3} \quad (7.22)$$

Onde,

C_{NH_3} , C_{NO_2} , C_{NO_3} = concentrações extracelulares de respectivamente amônia, nitrito e nitrato [mmol N/l células].

$C_{NH_3}^o$ = concentração de amônia na alimentação [mmol N/l].

F^o = vazão volumétrica da alimentação [l/h].

Por fim escreve-se o balanço de massa para as células secas no fermentador (Equação (7.23)).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X - \frac{F}{V} \cdot C_X - \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \cdot C_X \quad (7.23)$$

Onde,

C_X = concentração de células secas [g/l].

A velocidade de crescimento das células (r_X) é definida como sendo proporcional à velocidade de consumo de nitrogênio usado para o crescimento celular (r_N). O coeficiente de proporcionalidade é naturalmente o fator de conversão de nitrogênio em células secas (Y_{NX}). A velocidade de crescimento das células pode então ser escrita de acordo com a Equação (7.24). O termo de correção de volume dessa Equação aparece devido à velocidade de consumo de nitrogênio estar definida relativamente ao volume das células, enquanto a velocidade de crescimento das células deve ser definida em relação ao volume do fermentador.

$$r_X = Y_{NX} \cdot r_N \left(\frac{V_X}{V} \right) \quad (7.24)$$

Onde,

r_X = velocidade de crescimento celular [g células secas/h-l].

Y_{NX} = fator de conversão de nitrogênio em células secas [g células secas/mmol N].

Desta forma, a velocidade específica de crescimento pode ser escrita de acordo com a Equação (7.25).

$$\mu = \frac{r_X}{C_X} = \frac{Y_{NX} \cdot r_N}{\rho_X} \quad (7.25)$$

Onde,

Y_{NW} = fator de conversão de nitrogênio em células úmidas [g células úmidas/mmol N].

Os resultados experimentais foram obtidos partindo de condições de estado estacionário e mantendo-se o sistema em estado estacionário hidrodinâmico mesmo durante o regime transiente de crescimento dos microorganismos e assimilação das fontes de nitrogênio. Dessa forma, empregou-se um controle de nível com a finalidade de manter o volume do fermentador constante e, conseqüentemente, a vazão de saída (produção de SCP) igual à vazão de alimentação líquida. No início dos experimentos havia uma variação de volume no fermentador devido ao pulso aplicado que no caso extremo não ultrapassou a 5 % do volume do estado estacionário. O controle de volume do fermentador manipulou a vazão de saída do fermentador para manter o nível constante. Assim, durante período inicial dos experimentos o sistema não estava em estado estacionário hidrodinâmico e esse fato é considerado no desenvolvimento do modelo. As características do controle adotado sugerem uma ação de controle puramente proporcional, resultando na Equação (7.26).

$$F = \alpha \cdot (V - V^o) + F^o \quad (7.26)$$

Onde,

V^o = volume do fermentador em estado estacionário [l].

α = constante de proporcionalidade [h^{-1}].

Considerando a massa específica da mistura no fermentador constante, o balanço de massa global no fermentador define a variação de volume deste no início do processo (Equação (7.27), (7.28)).

$$\frac{dV}{dt} = F^o - F \quad (7.27)$$

$$C.I. \quad V(t=0) = V^o + \Delta V^o \quad (7.28)$$

Onde,

ΔV^o = volume do pulso de substrato [l].

A Equação (7.27), (7.28) pode ser resolvida analiticamente utilizando a Equação (7.26) para a condição inicial considerada obtendo a Equação (7.29) para a representação do volume do fermentador.

$$V = V^o + \Delta V^o \cdot e^{-\alpha t} \quad (7.29)$$

Onde,

t = tempo [h].

As equações desenvolvidas definem o modelo matemático para a representação dinâmica do crescimento celular e da oxidação do nitrogênio pelos microorganismos para um fermentador agitado clássico continuamente alimentado. Para maior clareza de apresentação estas equações, com a devida incorporação da Equação (7.27), (7.28), estão resumidas na Figura (6.2). Para que o modelo possa ser simulado é necessário conhecer-se ainda as condições iniciais para todas as variáveis dinâmicas envolvidas.

7.4 - Resolução Numérica do Modelo

O modelo obtido é bastante complexo pois possui um número muito grande de parâmetros, além de diversas variáveis intracelulares hipotéticas ou que não foram medidas experimentalmente. Assim, fica praticamente impossível estimar todos os parâmetros do modelo com base nos resultados experimentais obtidos.

O objetivo dessa seção é apresentar a resolução numérica do modelo adotando um

conjunto de parâmetros hipotéticos (não otimizados), visando avaliar a capacidade de descrição das características experimentais obtidas, sobretudo as relativas à incorporação e à produção dos compostos de nitrogênio.

Foi possível encontrar um conjunto de parâmetros, apresentados na Figura (6.3), que conduz a uma razoável solução do sistema de equações, e que representa qualitativamente os resultados experimentais. Os resultados da simulação para amônia, nitrato e nitrito são apresentados nas figuras (6.5), (6.6) e (6.7) para dois valores de pulso de amônia inicial.

Equações algébricas:

$$r_{E_i} = k_{E_i} (X_{E_i}^* - X_{E_i}) \quad i=1,2,3,4,N$$

$$r_i = k_i X_{E_i} \quad i=1,2,3,4,N$$

$$r_{N_i}^T = k_T (C_{N_i} - X_{N_i}) \quad i=1,2,3$$

$$r_C^T = k_T (C_C - X_C)$$

$$X_{E_1}^* = X_{E_1}^{MAX} \cdot \frac{X_{NH_3}}{X_{NH_3} + K_{M_1}} \cdot (1 - fr_C)$$

$$X_{E_2}^* = X_{E_2}^{MAX} \cdot \frac{X_{NO_2}}{X_{NO_2} + K_{M_2}}$$

$$X_{E_3}^* = X_{E_3}^{MAX} \cdot \frac{X_{NO_3}}{X_{NO_3} + K_{M_3} + K_{I_3} \cdot X_{NH_3}}$$

$$X_{E_4}^* = X_{E_4}^{MAX} \cdot \frac{X_{NO_2}}{X_{NO_2} + K_{M_4} + K_{I_4} \cdot X_{NH_3}}$$

$$X_{E_N}^* = X_{E_N}^{MAX} \cdot \frac{X_{NH_3}}{X_{NH_3} + K_{M_N}}$$

$$\mu = \frac{r_N Y_{NW}}{\rho_X}$$

$$fr_C = \frac{X_C}{X_C + K_C + K_{C_1} X_{NH_3}}$$

$$F = \alpha \cdot (V - V^0) + F^0$$

$$V = V^0 + \Delta V^0 \cdot e^{-\alpha t}$$

Equações diferenciais:

$$\frac{dX_{E_i}}{dt} = r_{E_i} - r_i - \mu \cdot X_{E_i} \quad i=1,2,3,4,N$$

$$\frac{dX_{NH_3}}{dt} = r_{NH_3}^T - \mu \cdot X_{NH_3} + r_4 - r_{E_1} - r_{E_N}$$

$$\frac{dX_{NO_2}}{dt} = r_{NO_2}^T - \mu \cdot X_{NO_2} + r_1 + r_3 - r_{E_2} - r_{E_4}$$

$$\frac{dX_{NO_3}}{dt} = r_{NO_3}^T - \mu \cdot X_{NO_3} + r_2 - r_{E_3}$$

$$\frac{dX_C}{dt} = r_C^T - r_N \cdot Y_{NC} - \mu \cdot X_C$$

$$\frac{dC_C}{dt} = K_L \alpha \left(\frac{C_G}{H} - C_C \right) - \frac{r_C^T \cdot V_X}{V} - \frac{F^0}{V} \cdot C_C$$

$$\frac{dC_{NH_3}}{dt} = -r_{NH_3}^T \cdot \frac{V_X}{V} + \frac{F^0}{V} \cdot (C_{NH_3}^0 - C_{NH_3})$$

$$\frac{dC_{NO_2}}{dt} = -r_{NO_2}^T \cdot \frac{V_X}{V} - \frac{F^0}{V} \cdot C_{NO_2}$$

$$\frac{dC_{NO_3}}{dt} = -r_{NO_3}^T \cdot \frac{V_X}{V} - \frac{F^0}{V} \cdot C_{NO_3}$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - \frac{F^0}{V} \right) \cdot C_X$$

Figura (6.2) - Equações envolvidas no modelo de incorporação e transformação de nitrogênio pela célula.

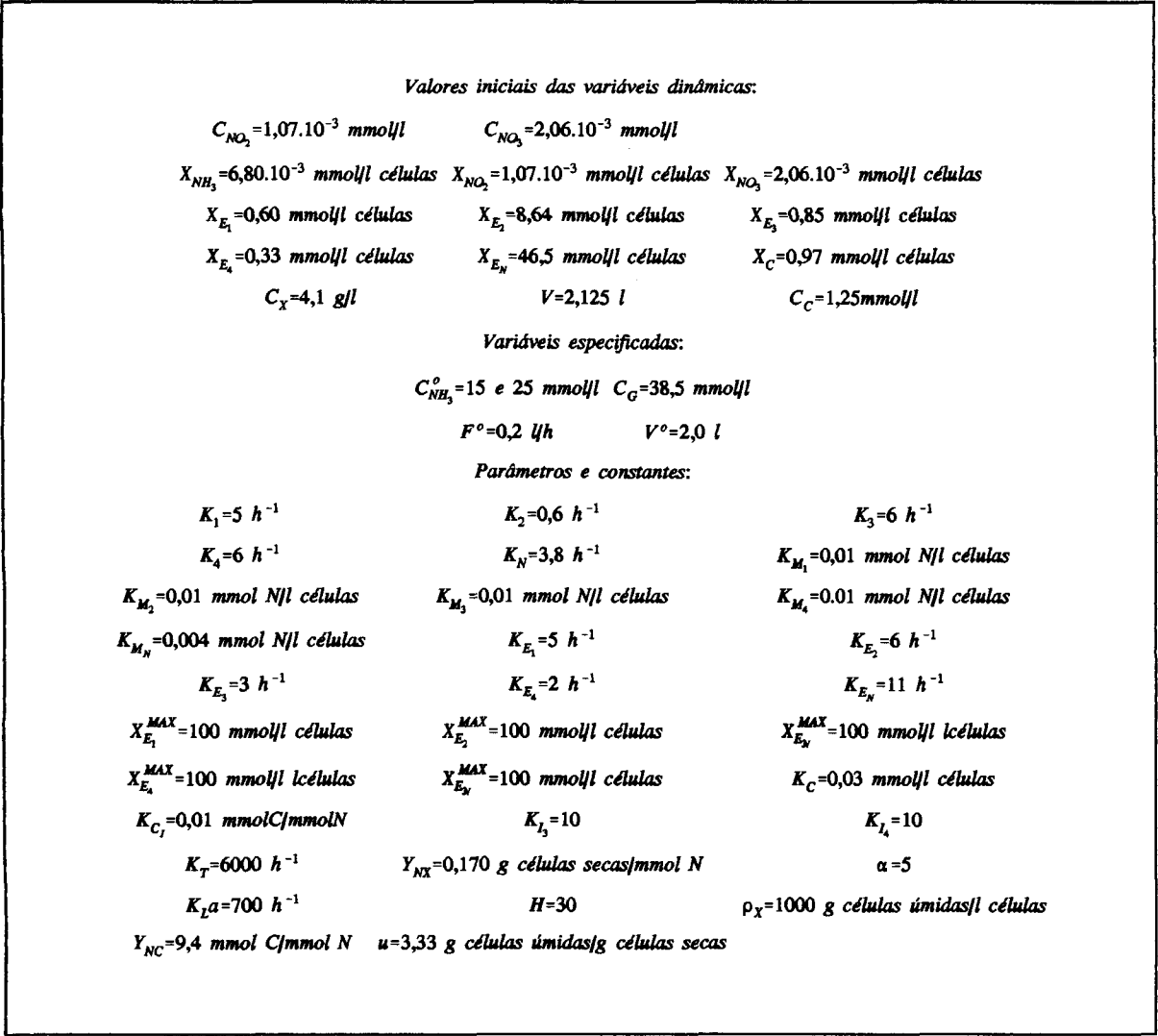


Figura (6.3) - Especificações das variáveis e parâmetros utilizados na simulação do modelo completo.

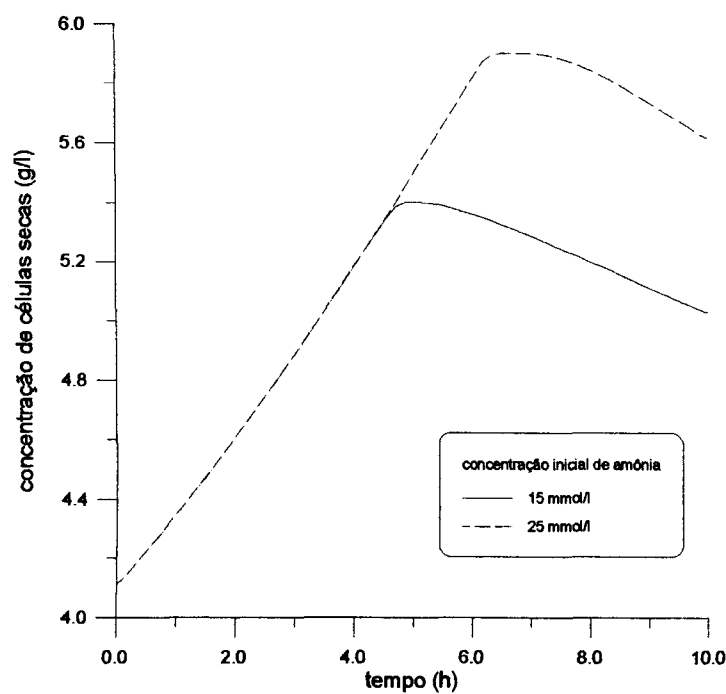


Figura (7.4) - Simulação do comportamento dinâmico da concentração de células secas durante experimento de pulso de amônia, utilizando o modelo completo desenvolvido.

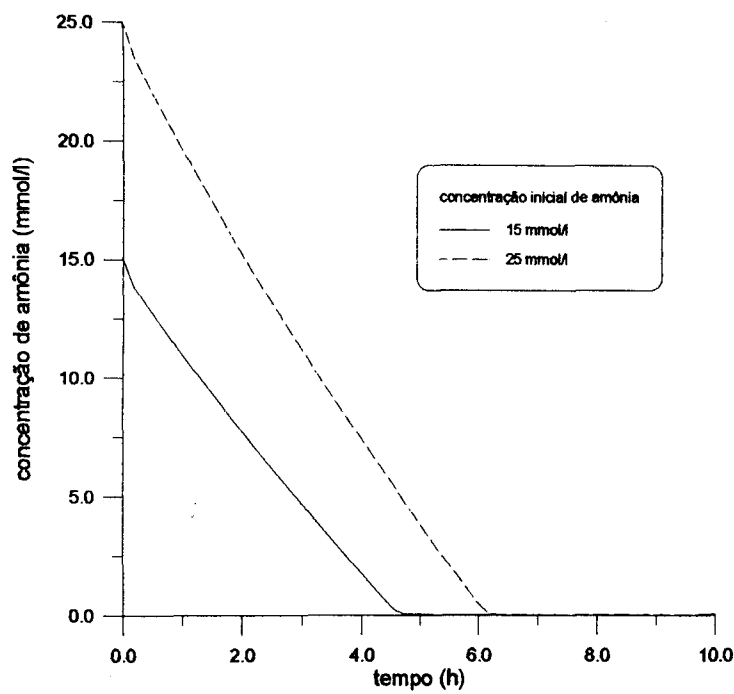


Figura (7.5) - Simulação do comportamento dinâmico da concentração de amônia durante o experimento de pulso de amônia, utilizando o modelo completo desenvolvido.

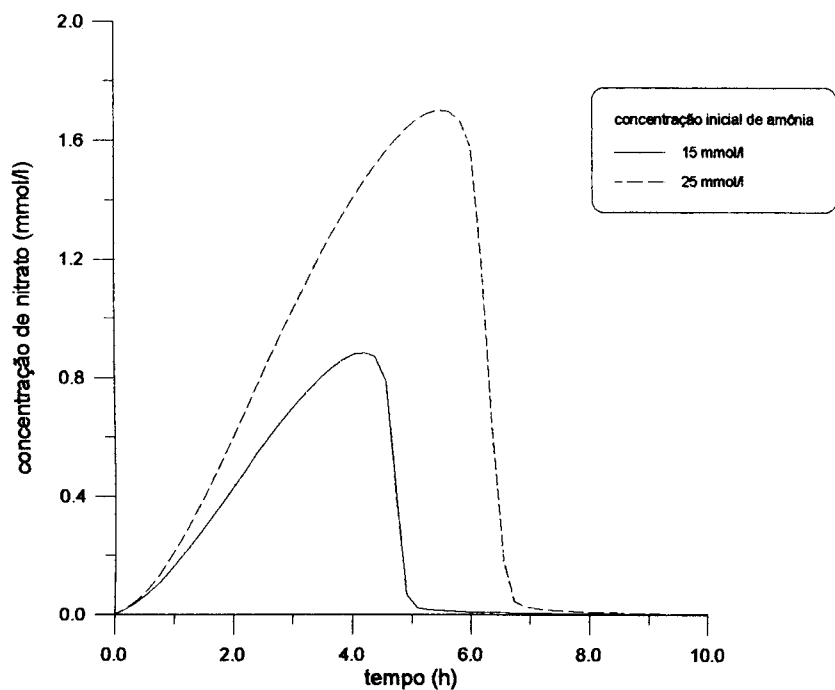


Figura (7.6) - Simulação do comportamento dinâmico da concentração de nitrato durante o experimento de pulso de amônia, utilizando o modelo completo desenvolvido.

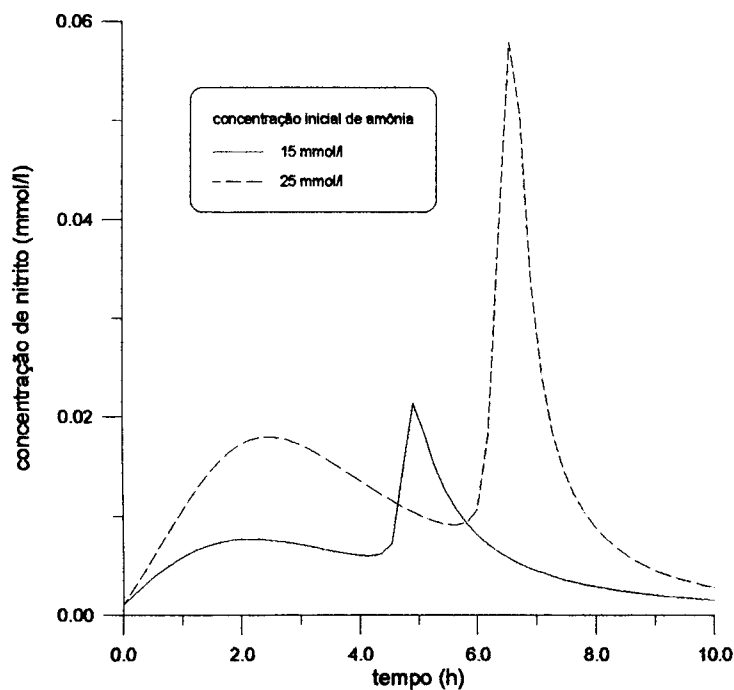


Figura (7.7) - Simulação do comportamento dinâmico da concentração de nitrito durante o experimento de pulso de amônia, utilizando o modelo completo desenvolvido.

É interessante observar que o pequeno pico de nitrito, que é sempre observado imediatamente após o pulso, é automaticamente criado pelo modelo sem qualquer implementação de inibição ou efeito de choque. Também há uma boa concordância entre os resultados simulados e experimentais de nitrito e nitrato. A ocorrência do pico de nitrito é obviamente conectado com o rápido desaparecimento do pico de nitrato, o qual é muito sensível à presença de amônia.

A Figura (6.4) apresenta o resultado da simulação do comportamento dinâmico da concentração de células. Verifica-se que o modelo não consegue prever qualitativamente a queda na concentração de células no início do experimento de pulso. Esse fato, porém, não sensibiliza significativamente as curvas de concentração dos compostos nitrogenados que é o interesse do trabalho.

Baseado na concordância qualitativa razoável dos resultados experimentais transientes e simulados, conclui-se que as considerações em que o modelo é baseado é coerente e pode representar os possíveis caminhos de nitrito e nitrato na célula sob condições de excesso de amônia durante o crescimento não limitado em carbono.

7.5 - Modelo Simplificado

Tendo em conta os bons resultados qualitativos obtidos na simulação do modelo completo, pretende-se simplificar o modelo para que este se apresente em uma forma mais útil, ou seja, com um menor número de parâmetros que possam ser estimados. Para tanto, algumas simplificações serão feitas com o cuidado de não alterar a representabilidade do modelo.

A Equação (7.22), que mostra a variação da concentração de amônia no meio fermentativo, deve ser satisfeita também no estado estacionário. Esta equação pode ser escrita para o estado estacionário, levando-se em conta, também, a equação de transporte (Equação (7.9)), na forma:

$$r_{NH_3}^T = \frac{F^o}{V_X} \cdot (C_{NH_3}^o - C_{NH_3}) = k_T \cdot (C_{NH_3} - X_{NH_3}) \quad (7.30)$$

A Equação (7.30) mostra que o coeficiente de transferência de massa que tem a área interfacial específica de troca de massa embutida deve ser muito grande para satisfazer essa equação, uma vez que no estado estacionário tanto a concentração de amônia dentro e fora da célula tende a um valor próximo de zero e sua diferença também.

Com base nessa constatação de que o modelo só é satisfeito se o coeficiente de transferência de massa for muito alto, considerar-se-á que o coeficiente de transferência de massa é infinito e portanto as concentrações no meio fermentativo serão consideradas idênticas às concentrações intracelulares.

Considerando que as constantes de tempo das Equações que representam o comportamento dinâmico das enzimas (Equação (7.11)) são muito maiores que as constantes de tempo das outras Equações diferenciais envolvidas no modelo, as concentrações de enzimas atingirão o equilíbrio muito mais rapidamente que as outras concentrações. Apesar de não haver interesse no comportamento dinâmico das concentrações enzimáticas que são verdadeiramente hipotéticas, esta consideração pode acarretar prejuízos na representação do comportamento de outras variáveis. Matematicamente esta simplificação pode ser escrita como se a derivada da concentração de enzima fosse igual a zero. Assim a Equação (7.14) deve ser reescrita explicitando as concentrações de enzima na forma da Equação (7.31).

$$X_{E_i} = \frac{r_{E_i} - r_i}{\mu} \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.31)$$

A Equação (7.31) pode ser melhor escrita considerando as Equações (7.1) e (7.8) que descrevem r_{E_i} e r_i como segue:

$$X_{E_i} = \frac{k_{E_i}}{k_i + k_{E_i} + \mu} \cdot X_{E_i}^* \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.32)$$

Muito embora a velocidade específica de crescimento não seja constante, a experiência na simulação do modelo completo mostrou que a soma dos parâmetros K_i e K_{E_i} é sempre muito maior que μ que tem como valor máximo $0,255 \text{ h}^{-1}$ calculado experimentalmente no

capítulo 3. Essa consideração significa dizer que o efeito da variação das concentrações intracelulares devido ao crescimento da célula é muito menor que devido às reações intracelulares e portanto podem ser desprezados. Assim, será considerado que o grupamento que multiplica a concentração de equilíbrio da Equação (7.32) é constante e será definido um novo parâmetro A_i (Equação (7.33)) que por conveniência inclui também o parâmetro ($X_{E_i}^{MAX}$) advindo das equações de definição das diversas concentrações de equilíbrio das enzimas ($X_{E_i}^*$) e o parâmetro k_i advindo da velocidade de formação de produtos (r_i).

$$A_i = \frac{k_{E_i} \cdot X_{E_i}^{MAX} \cdot k_i}{k_i + k_{E_i} + \mu} \quad i=1,2,3,4,N \quad (7.33)$$

Sendo,

A_i = parâmetro suposto constante [mmol N/h-l células].

Levando-se em conta as considerações e simplificações realizadas até aqui, pode-se reescrever as equações das velocidades de formação de produto (r_i) utilizando as equações (7.8), (7.32), (7.2), (7.3), (7.4), (7.5), (7.7) e a definição da constante A_i (Equação (7.33)), na forma:

$$r_1 = A_1 \cdot \frac{C_{NH_3}}{C_{NH_3} + K_{M_1}} \cdot (1 - fr_c) \quad (7.34)$$

$$r_2 = A_2 \cdot \frac{C_{NO_2}}{C_{NO_2} + K_{M_2}} \quad (7.35)$$

$$r_3 = A_3 \cdot \frac{C_{NO_3}}{C_{NO_3} + K_{M_3} + K_{I_3} \cdot C_{NH_3}} \quad (7.36)$$

$$r_4 = A_4 \cdot \frac{C_{NO_2}}{C_{NO_2} + K_{M_4} + K_{I_4} \cdot C_{NH_3}} \quad (7.37)$$

$$r_N = A_N \cdot \frac{C_{NH_3}}{C_{NH_3} + K_{MN}} \quad (7.38)$$

Sendo,

A_1 , A_2 , A_3 , A_4 e A_N = constantes [mmol N/h-l células].

O caminho metabólico para o carbono só é importante para o modelo porque a concentração intracelular de carbono influencia na fração da enzima MMO comprometida com a oxidação da amônia. Porém, observando o comportamento dinâmico da concentração intracelular de carbono nos resultados simulados do modelo completo, observa-se que a concentração de carbono não varia significativamente principalmente durante todo o período em que amônia está presente em excesso, período este em que os resultados experimentais foram levantados e em que tem-se interesse de representar. Para o período em que a concentração de amônia se torna baixa, a concentração de carbono tem um ligeiro aumento, porém esta já não é mais importante para o modelo pois a concentração de enzimas responsável pela oxidação da amônia tende a zero e a oxidação da amônia torna-se desprezível. Assim, a Equação da fração de MMO comprometido com o carbono (Equação (7.6)) é simplificada e reescrita na forma da Equação (7.39) tendo em vista também a consideração de que a concentração intracelular de amônia é igual à extracelular.

$$fr_c = \frac{1}{1 + A + B \cdot C_{NH_3}} \quad (7.39)$$

Onde,

A = constante adimensional.

B = constante [l/mmol N].

Com as considerações acima o modelo da assimilação de nitrogênio pode agora ser representado simplifcadamente por apenas quatro Equações diferenciais resultantes das Equações de balanço de massa. A Equação diferencial resultante do balanço de massa para as células secas, Equação (7.23), continua a mesma. As Equações diferenciais que representam as variações das concentrações de amônia, nitrato e nitrito no caldo de fermentação, que de acordo com as simplificações realizadas são iguais às concentrações intracelulares, são obtidas adicionando-se convenientemente - de forma que o termo de transporte desapareça - as Equações de variação da concentração de nitrogênio extra e intracelular. Desta forma as Equações (7.40), (7.41) e (7.42) são obtidas somando-se respectivamente as Equações ((7.22) e (7.15)), ((7.20) e (7.16)) e ((7.21) e (7.17)) e, também, tendo-se em conta que a velocidade de produção de enzimas é igual a velocidade de formação de produto, uma vez que foi considerado que o estado estacionário para a formação de enzimas é atingido muito rapidamente.

$$\frac{dC_{NH_3}}{dt} = \frac{F^o \cdot (C_{NH_3}^o - C_{NH_3}) - \mu \cdot C_{NH_3} \cdot V_X + V_X(r_4 - r_1 - r_N)}{V + V_X} \quad (7.40)$$

$$\frac{dC_{NO_2}}{dt} = \frac{-F^o \cdot C_{NO_2} - \mu \cdot C_{NO_2} \cdot V_X - V_X(r_1 + r_3 - r_2 - r_4)}{V + V_X} \quad (7.41)$$

$$\frac{dC_{NO_3}}{dt} = \frac{-F^o.C_{NO_3} - \mu.C_{NO_3} + V_x(r_2 - r_3)}{V + V_x} \quad (7.42)$$

As Equações envolvidas no modelo simplificado são mostradas, para maior clareza de apresentação, na figura (7.42).

7.6 - Obtenção dos Parâmetros para o Modelo Simplificado

7.6.1 - Definição de Constantes

Analisando melhor o modelo à luz dos resultados experimentais pode-se perceber que os parâmetros tipo Michaelis-Menten (K_M) das Equações (7.34), (7.35), (7.36), (7.37) e (7.38) não podem ser considerados parâmetros e sim constantes.

Em estado estacionário as concentrações de nitrito, nitrato e amônia são tão baixas que não é possível a aferição experimental, portanto não há dados experimentais disponíveis para esses compostos no estado estacionário. As constantes tipo Michaelis-Menten das Equações de velocidade em questão devem ser também baixas para garantir que essas velocidades não sejam nulas e sejam diferentes em diferentes estados estacionários. No estado dinâmico, onde tem-se os resultados experimentais, há um excesso de amônia, nitrito e nitrato e os valores baixos das constantes podem ser desprezados frente ao valor das concentrações desses compostos.

Sendo assim, as constantes não têm qualquer papel a desempenhar no estado transiente e qualquer tentativa de utilizá-las como parâmetro seria desastroso na estimação desses parâmetros, em virtude da ausência de dados experimentais em estado estacionário, necessários para a estimação desses.

Não tendo qualquer influência na fase dinâmica do modelo (que é a fase de interesse), essas constantes podem ser fixadas desde que sejam baixas, ou seja, muito menor que as concentrações de nitrito, nitrato e amônia da fase dinâmica. Porém, essas constantes não podem ser totalmente desconsideradas porque elas garantem a consistência do modelo no

Equações algébricas:

$$r_1 = A_1 \cdot \frac{C_{NH_3}}{C_{NH_3} + K_{M_1}} \cdot (1 - fr_c)$$

$$r_2 = A_2 \cdot \frac{C_{NO_2}}{C_{NO_2} + K_{M_2}}$$

$$r_3 = A_3 \cdot \frac{C_{NO_3}}{C_{NO_3} + K_{M_3} + K_{I_3} \cdot C_{NH_3}}$$

$$r_4 = A_4 \cdot \frac{C_{NO_2}}{C_{NO_2} + K_{M_4} + K_{I_4} \cdot C_{NH_3}}$$

$$r_N = A_N \cdot \frac{C_{NH_3}}{C_{NH_3} + K_{M_N}}$$

$$\mu = \frac{r_N \cdot Y_{NW}}{\rho_X}$$

$$fr_c = \frac{1}{1 + A + B \cdot C_{NH_3}}$$

$$F = \alpha \cdot (V - V^0) + F^0$$

$$V = V^0 + \Delta V^0 \cdot e^{-\alpha t}$$

Equações diferenciais:

$$\frac{dC_{NH_3}}{dt} = \frac{F^0 \cdot (C_{NH_3}^0 - C_{NH_3}) - \mu \cdot C_{NH_3} \cdot V_X + V_X \cdot (r_4 - r_1 - r_N)}{V + V_X}$$

$$\frac{dC_{NO_2}}{dt} = \frac{-F^0 \cdot C_{NO_2} - \mu \cdot C_{NO_2} \cdot V_X + V_X \cdot (r_1 + r_3 - r_2 - r_4)}{V + V_X}$$

$$\frac{dC_{NO_3}}{dt} = \frac{-F^0 \cdot C_{NO_3} - \mu \cdot C_{NO_3} \cdot V_X + V_X \cdot (r_2 - r_3)}{V + V_X}$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - \frac{F^0}{V} \right) \cdot C_X$$

Figura (7.8) - Equações envolvidas no modelo simplificado de incorporação e transformação de nitrogênio.

estado estacionário. Quando as concentrações tendem a valores próximos a zero essas constantes garantem que as velocidades de reação tendem a valores próximos a zero também

o que não aconteceria se essas constantes fossem desconsideradas. Assim será escolhido arbitrariamente o valor 0.01 para representar todas as constantes tipo Michaelis-Menten das Equações do modelo.

Da mesma forma que as constantes tipo Michaelis-Menten as constantes de inibição K_{i3} e K_{i4} que representam a seletividade no consumo de substrato não devem ser consideradas parâmetros e sim constantes. A cultura prefere consumir amônia como fonte de nitrogênio a nitrato e nitrito. A filosofia do modelo é que esses parâmetros mantenham as velocidades de redução de nitrato a nitrito e de nitrito a amônia próximas a zero na disponibilidade do substrato amônia em concentrações razoáveis. Desta forma, o valor dessa constante não tem qualquer importância para o modelo durante a fase de consumo de amônia contanto que sejam grandes o suficiente para manter as citadas velocidades de redução próximas à zero. O valor das constantes de inibição passam a ter papel de importância para o modelo quando a concentração de amônia desce a determinado nível. O valor dessas constantes definirão a que nível de concentração de amônia as comportas do consumo das fontes de nitrogênio nitrato e nitrito serão abertas. Como esse nível é muito baixo e impossível de ser detectado experimentalmente, o valor dessas constantes também não podem ser otimizados. Optou-se então por definir essas constantes como sendo igual a 10 e deixar que essas por sua vez definam o nível de amônia em que outros substratos são consumidos significativamente e a concentração de amônia no estado estacionário.

Com as considerações acima o número de parâmetros desconhecidos do modelo simplificado fica reduzido a 7 parâmetros e todas as condições iniciais são conhecidas.

7.6.2 - Estimativa do Parâmetro A_N

Quando da simplificação do modelo completo, todas as velocidades de formação de enzimas foram consideradas muito rápidas comparadas com outras velocidades envolvidas no modelo. Dessa forma o modelo perdeu a capacidade de representar alguma forma de adaptação, ou seja, um atraso na resposta do crescimento celular ao estímulo de aumento da concentração de substrato. Mesmo levando-se em conta um período de adaptação onde seria necessário primeiro a produção de enzimas para que se possa ter um aumento na velocidade

de crescimento, pode-se considerar que a enzima E_N chega a níveis de equilíbrio muito mais rápido que o tempo do processo como um todo. Se essa consideração for válida haverá um momento (t_E) nos experimentos em que a concentração dessa enzima será constante e portanto a derivada de sua concentração com relação ao tempo (Equação (7.11)) será nula e as simplificações já realizadas decorrentes da consideração de derivada nula serão válidas. Pode-se, então, utilizar as Equações (7.23) , (7.25) e (7.38) na forma da Equação (7.43) que será válida apenas para tempos maiores que t_E durante a fase dinâmica do modelo com excesso de amônia. Foi considerado também, como já discorrido anteriormente a respeito, que a constante tipo Michaelis-Menten (K_{MN}) é desprezível nessa fase quando comparado à concentração de amônia.

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\frac{Y_{NW} \cdot A_N}{\rho_X} - \frac{F}{V} \right) \cdot C_X \quad (7.43)$$

A Equação (7.43) pode ser resolvida analiticamente desde que o regime hidrodinâmico de trabalho esteja em estado estacionário garantindo-se que o termo F e V assumam valores constantes e iguais respectivamente a F^o e V^o . Obtém-se então a Equação (7.44).

$$\ln C_X = \left(\frac{Y_{NW} \cdot A_N}{\rho_X} - \frac{F^o}{V^o} \right) \cdot t + C_o \quad (7.44)$$

Onde,

C_o = constante adimensional.

Concluindo, existe uma região dos resultados experimentais dinâmicos de tempo maior que o tempo t_E em regime hidrodinâmico estacionário em que a Equação (7.44) é válida, sendo assim possível a obtenção do produto de parâmetros $Y_{NW} \cdot A_N / \rho_X$ de forma independente dos outros parâmetros e utilizando apenas os resultados experimentais dinâmicos de crescimento celular.

As Figuras (7.9), (7.10) e (7.11) apresentam a variação experimental da concentração

de células representado pelo logaritmo da absorbância contra o tempo para os três experimentos realizados. Observa-se para os três experimentos que após o tempo de aproximadamente 2.5 horas o comportamento experimental pode ser considerado linear como estabelecido pela Equação (7.44).

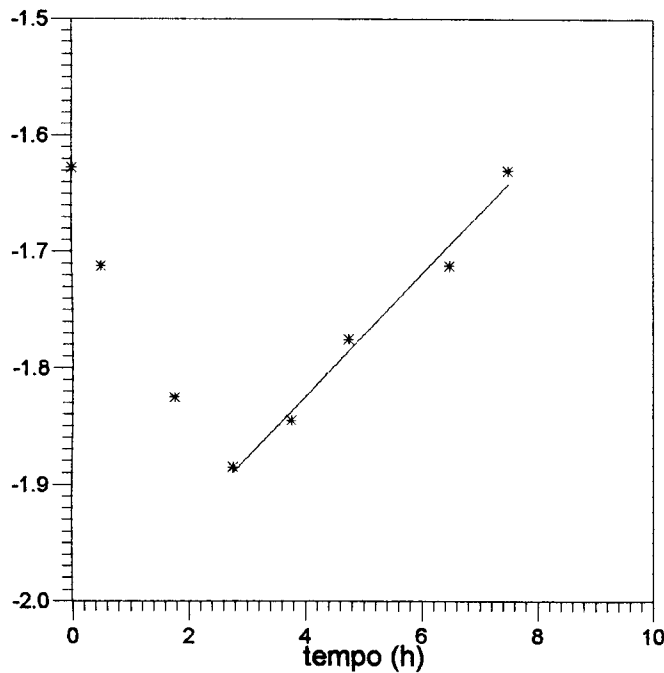


Figura (7.9) - Logaritmo da absorbância do meio fermentativo diluído, durante teste de pulso. $[D(t=0-)=0,086 \text{ h}^{-1}$, $C_{\text{NH}_3}(t=0+)=14,3 \text{ mmol/l}$].

Os pontos experimentais para tempos maiores que 2.5 h foram correlacionados por regressão linear. As retas resultantes das correlações apresentam coeficiente angular de 0,052, 0,043 e 0,048 respectivamente para os dados experimentais das figuras (7.9), (7.10) e (7.11). Esses valores de coeficiente linear conduzem, utilizando a Equação (7.44), a valores do produto de parâmetros ($Y_{\text{NW}} \cdot A_{\text{N}} / \rho_{\text{X}}$) de 0,139, 0,128 e 0,131 [h^{-1}] respectivamente. Tem-se assim um valor médio do grupamento de parâmetros acima de 0,133 [h^{-1}] que será usado na simulação do modelo simplificado no cálculo da velocidade específica de crescimento (Equação (7.13)).

Note-se que também é necessário o cálculo explícito do parâmetro A_{N} para representar o consumo de nitrogênio para o crescimento celular.

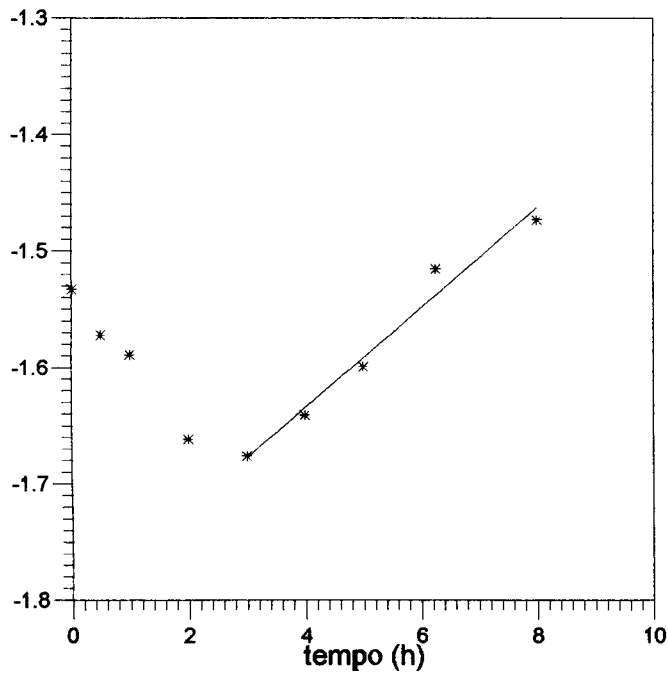


Figura (7.10) - Logaritmo da absorvância do meio fermentativo diluído, durante teste de pulso. $[D(t=0-)=0,085\text{ h}^{-1}, C_{\text{NH}_3}(t=0+)=19,1\text{ mmol/l}]$.

O fator de conversão de nitrogênio em células úmidas pode ser escrito em função do fator de conversão de nitrogênio em células secas na forma da Equação(7.45).

$$Y_{NW}=u.Y_{NX} \tag{7.45}$$

O coeficiente de proporcionalidade u define a relação entre a massa de células úmidas e a massa de células secas e tem unidades $[\text{g células úmidas/g células secas}]$, Y_{NX} é o fator de conversão de nitrogênio em células secas $[\text{g células secas/mmol nitrogênio}]$, e Y_{NW} é o fator de conversão de nitrogênio em células úmidas $[\text{g células úmidas/mmol nitrogênio}]$.

Durante os testes de pulsos a cultura cresceu com excesso de nitrogênio. Assim, será considerado que o acúmulo de carbono é mínimo e portanto usar-se-á o menor valor do fator de conversão de nitrogênio em células secas (Y_{NX}) encontrado experimentalmente que corresponde ao calculado para níveis de atividade celular máxima. O valor do fator de

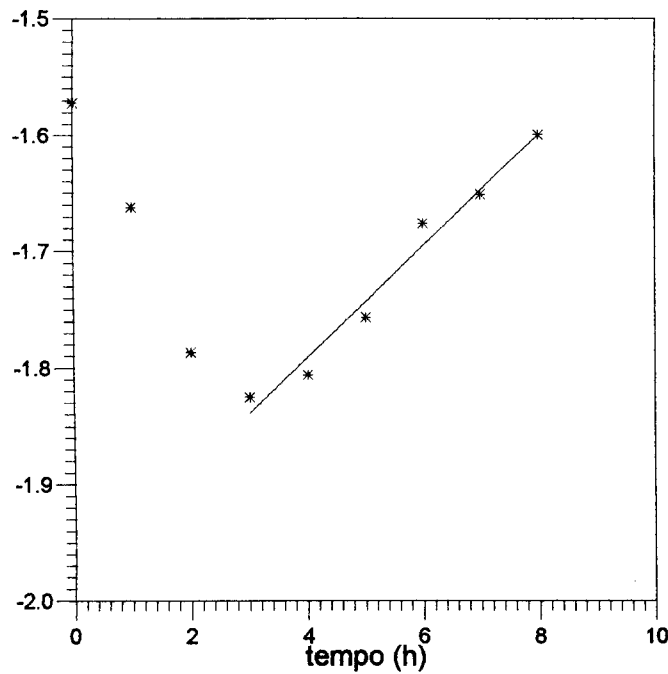


Figura (7.11) - Logaritmo da absorbância do meio fermentativo diluído, durante teste de pulso. $[D(t=0-)=0,083 \text{ h}^{-1}$, $C_{\text{NH}_3}(t=0+)=21,7 \text{ mmol/l}$].

conversão determinado experimentalmente é $0,147 \text{ [g células secas / mmol nitrogênio]}$ o que representa um fator de conversão de nitrogênio em células úmidas (Y_{NW}) de $0,490 \text{ [g células úmidas / mmol de nitrogênio]}$, adotando-se um valor típico de teor de umidade para células bacterianas de 70% , correspondendo a um valor de u de $3,33 \text{ [g células úmidas/g células secas]}$.

O parâmetro A_N pode agora ser calculado utilizando os valores obtidos para $Y_{\text{NW}} \cdot A_N / \rho_X$ e tendo-se em conta um valor da massa específica das células úmidas (ρ_X) em torno de $1000 \text{ [g células úmidas/l]}$. Esses resultados conduzem a um valor de $271 \text{ [mmoles nitrogênio/g células secas-h]}$ que será adotado como a estimativa do parâmetro A_N .

7.6.3 - Estimativa de Parâmetros

Os seis parâmetros restantes do modelo simplificado devem ser otimizados de tal

forma que minimizem o erro entre os resultados experimentais obtidos e os resultados advindos da simulação do modelo. Para tanto, foi desenvolvido um programa de otimização de parâmetros (apêndice D) que utiliza o método SIMPLEX como colocado em Himmelblau (1970) para a busca dos parâmetros ótimos.

A função objetivo (FO) a ser minimizada no processo de otimização de parâmetros foi definida como o somatório dos erros entre as variáveis medidas experimentalmente e previstas pelo modelo conforme Equação (7.46).

$$FO = \sum_{k=1}^{N_{exp}} \sum_{j=1}^{N_{var}} \sum_{i=1}^{N_k} \lambda_j |C_{i,j,k} - C_{i,j,k}^{exp}| \quad (7.46)$$

Onde,

i = índice que designa o ponto experimental.

j = índice que designa a variável.

k = índice que designa o experimento.

C = variável prevista pelo modelo.

C^{exp} = variável medida experimentalmente.

λ_j = peso relativo da variável j.

N_k = número de pontos experimentais para o experimento k.

N_{var} = número de variáveis dinâmicas..

N_{exp} = número de experimentos considerados.

FO = valor da função objetivo.

As variáveis que foram medidas experimentalmente e que portanto podem participar da composição da função objetivo são a concentração de células no fermentador e as concentrações de amônia, nitrato e nitrito no fermentador. A variável concentração de células não será considerada na função objetivo, uma vez que o modelo simplificado não é capaz de representar a queda acentuada na concentração de células no período inicial do experimento. Assim, o número de variáveis (N_{var}) será igual a 3 e o índice que designa a variável (j) terá valores 1,2,3 designando respectivamente as concentrações de amônia, nitrato e nitrito.

O objetivo do peso (λ_j) é trazer as diferentes variáveis para a mesma ordem de grandeza uma vez que os valores medidos diferem em muito entre si. Esse peso é considerado

constante para todos os resultados experimentais de uma mesma variável. Os pesos adotados para o processo de otimização estão resumidos na Tabela 7.1.

Obviamente os pesos adotados refletem a importância que se dá aos dados experimentais das diversas variáveis e tem influência direta nos parâmetros otimizados do modelo.

j	componente	faixa experimental	peso adotado (λ_j)
1	amônia	0-22 mmol/l	0.01
2	nitrato	0-3,5 mmol/l	0.1
3	nitrito	0-0,25 mmol/l	1

Tabela 7.1 - Pesos adotados para as variáveis dinâmicas no processo de estimação de parâmetros.

Os parâmetros mostrados na Tabela (7.2) foram obtidos otimizando-se os parâmetros do modelo para os dados experimentais de pulso. A segunda coluna representa os parâmetros estimados utilizando apenas os resultados experimentais do pulso com 50 mmol de amônia. Na terceira coluna, os parâmetros apresentados são resultantes da estimação quando utilizados os resultados experimentais dos pulsos de 30 e 50 mmol de amônia e a quarta coluna utilizando todos os resultados experimentais de pulso obtidos no trabalho. Assim, a referida tabela mostra também a evolução dos valores dos parâmetros obtidos à medida que aumentava-se o número de resultados experimentais. Os dados experimentais utilizados são apresentados no apêndice C e no capítulo 6 em forma gráfica.

As Figuras (7.12), (7.13) e (7.14) mostram como os pontos experimentais desses experimentos são correlacionados pelo modelo utilizando os valores de parâmetros ótimos obtidos.

Parâmetro	Pulso 50 mmol amônio	Pulso 30 mmol amônio + Pulso 50 mmol amônio	Pulso 30 mmol amônio + Pulso 40 mmol amônio + Pulso 50 mmol amônio
A ₁	458	433	462
A ₂	76	70	61
A ₃	161	149	154
A ₄	140	116	151
A	0,0229	0,0221	0,0273
B	0,00848	0,00772	0,00583
Função Objetivo	1,71	2,34	3,81

Tabela 7.2 - Valores dos parâmetros encontrados por um processo de otimização. ($A_N=271$).

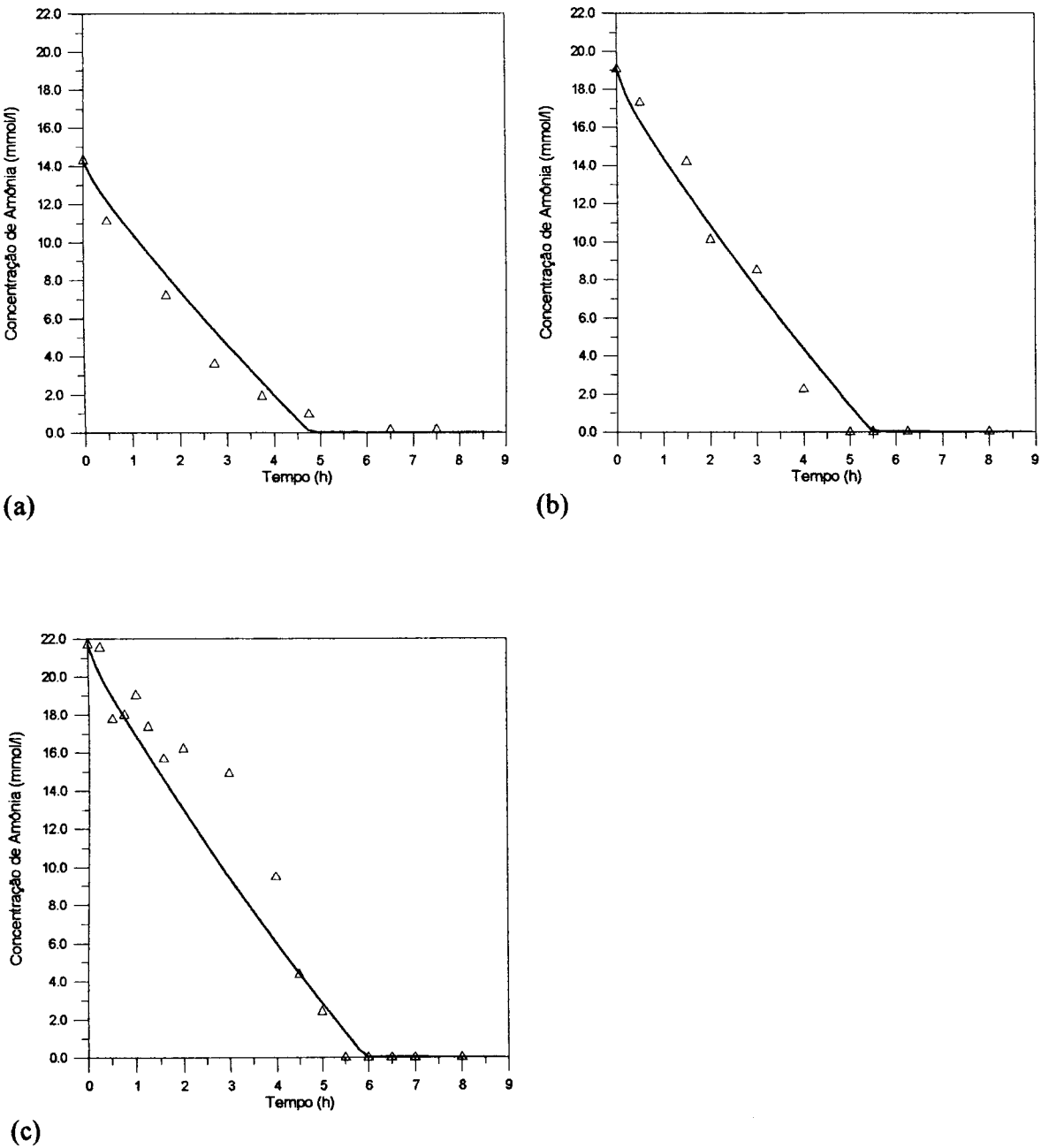


Figura 7.12 - Representação pelo modelo simplificado dos dados experimentais de concentração de amônia durante os testes de pulso de amônia, utilizando os parâmetros estimados. [(a) $C_{NH_3}(t=0+)=14,3\text{ mmol/l}$; (b) $C_{NH_3}(t=0+)=19,1\text{ mmol/l}$; (c) $C_{NH_3}(t=0+)=21,7\text{ mmol/l}$].

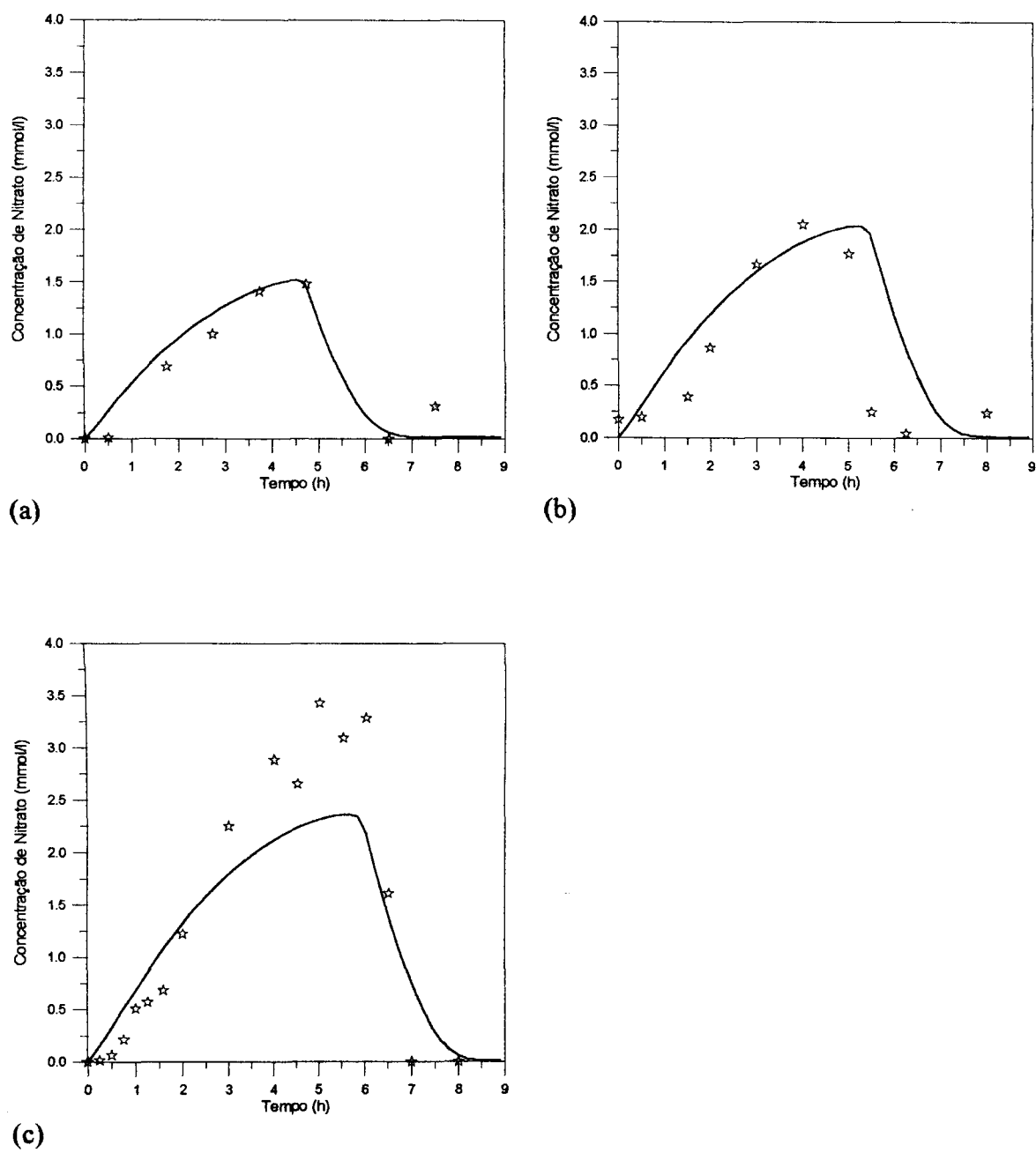


Figura 7.13 - Representação pelo modelo simplificado dos dados experimentais de concentração de nitrato durante os testes de pulso de amônia, utilizando os parâmetros estimados. [(a) $C_{NH_3}(t=0+)=14,3 \text{ mmol/l}$; (b) $C_{NH_3}(t=0+)=19,1 \text{ mmol/l}$; (c) $C_{NH_3}(t=0+)=21,7 \text{ mmol/l}$].

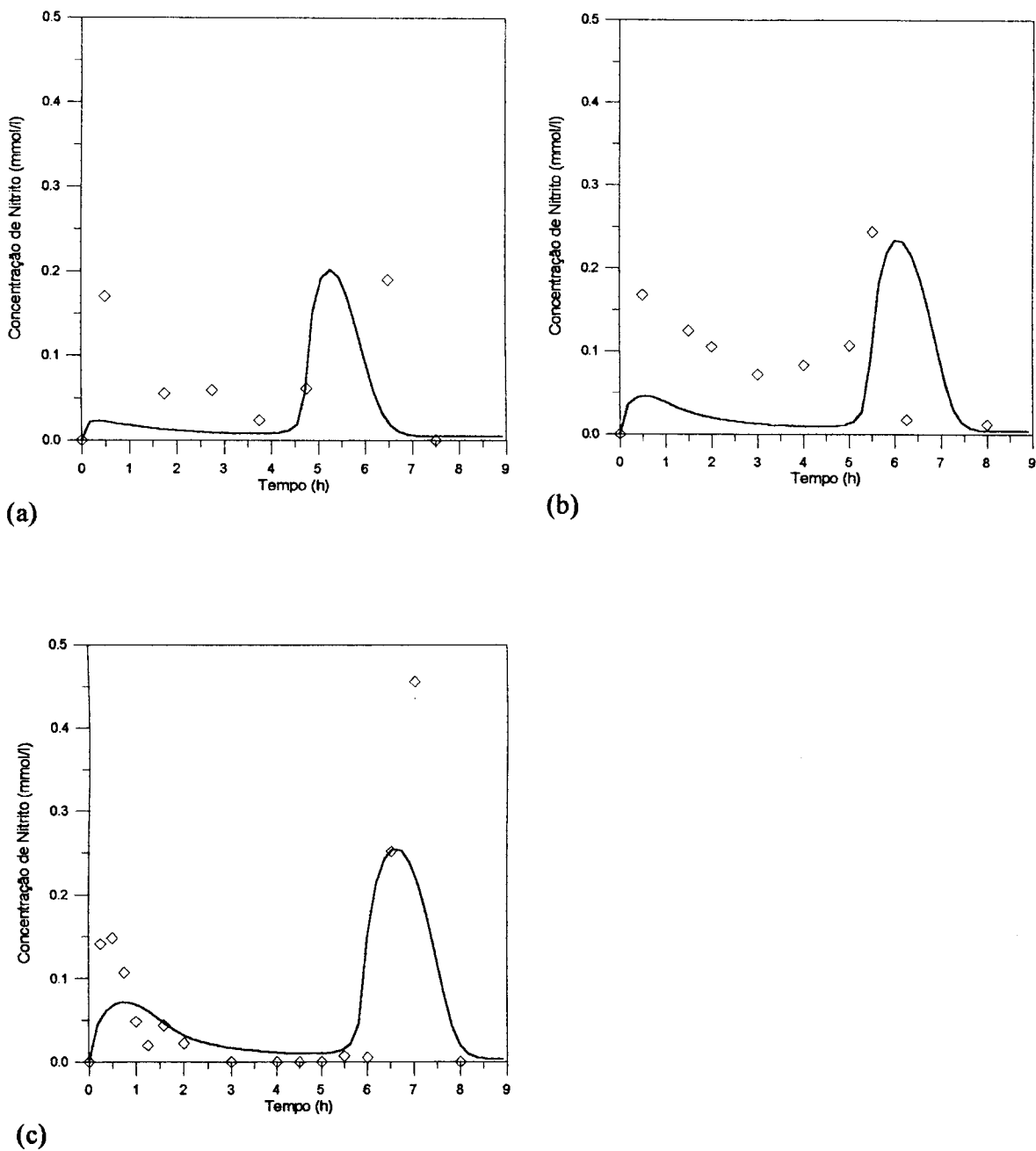


Figura 7.14 - Representação pelo modelo simplificado dos dados experimentais de concentração de nitrito durante os testes de pulso de amônia, utilizando os parâmetros estimados. [(a) $C_{NH_3}(t=0+)=14,3 \text{ mmol/l}$; (b) $C_{NH_3}(t=0+)=19,1 \text{ mmol/l}$; (c) $C_{NH_3}(t=0+)=21,7 \text{ mmol/l}$].

7.7 - Discussões sobre o Modelo Simplificado

7.7.1 - Comportamento da Concentração de Células

O aumento do volume do fermentador ocasionado pela aplicação do pulso provoca, de acordo com a Equação que representa o balanço de massa das células secas (Equação (7.23)), uma tendência de aumento na concentração de células no fermentador. Porém, os experimentos mostram o fenômeno oposto, existindo um período logo após a aplicação do pulso, onde a concentração de células diminui.

Para explicar o fenômeno afastou-se a hipótese de morte das células durante a aplicação do pulso, devido ao fato de a concentração celular cair suavemente e não abruptamente, como seria esperado no caso de *leaving* em consequência do choque provocado pelo pulso. Também não foi observada a formação de espuma, característica esta que denunciaria a presença de proteínas no meio fermentativo.

Segundo ainda a Equação (7.23), a derivada negativa da concentração celular no início dos experimentos só pode ser explicada pela diminuição da velocidade específica de crescimento em relação ao seu valor no estado estacionário de antes da aplicação do pulso. Mas, apesar da queda na velocidade específica de crescimento, não houve correspondente variação na velocidade de produção de gás carbônico. De acordo com as observações experimentais, a velocidade de produção de energia pelos microorganismos manteve-se no início do pulso (Figura (6.4), capítulo 6).

O fato poderia ser associado a um atraso na resposta do microorganismo devido à dificuldade de adaptação que o modelo não consegue representar. Haveria, assim, uma fase de adaptação em que o microorganismo ajustaria seu sistema enzimático para as novas condições de excesso de nitrogênio. Nesse caso, segundo a equação de balanço de massa para as células, também haveria uma derivada positiva se o nível de crescimento logo após a aplicação do pulso se mantivesse nos níveis do estado estacionário.

Há uma irresistível tendência de se associar o fato à uma inibição do crescimento celular causada pelo nitrito que é imediatamente formado após o pulso. Porém, apenas esse fato não consegue explicar a continuidade na produção de energia. Ainda assim é difícil explicar por que o nitrito inibiria o crescimento da célula apenas quando de seu primeiro pico

e não no segundo que, inclusive, é quantitativamente maior.

A explicação que se evidencia, então, é uma associação entre a dificuldade de se adaptar às novas condições de crescimento (fase *lag*) e ao fato de que as células consomem nesse período os estoques de carbono armazenados no estado estacionário. Dessa forma, quando da aplicação do pulso, as células continuariam a crescer em número à mesma velocidade do estado estacionário. Porém, perderiam massa do seu compartimento de reserva de carbono e aparentemente a velocidade de crescimento específica diminuiria, pois esta foi definida em relação à massa de células e não ao número de células.

No modelo simplificado a velocidade específica de crescimento é considerada como proporcional à velocidade de consumo de nitrogênio para crescimento celular. O fator de conversão de substrato em células é utilizado como o coeficiente de proporcionalidade e considerado constante, não sendo possível, portanto, a variação da velocidade específica de crescimento.

Admitindo-se, então, válido o modelo desenvolvido no capítulo 4, onde as células são divididas em dois compartimentos, o compartimento C para estoque de carbono e o compartimento A com o restante do material celular, pode-se reescrever a Equação (4.8) que define a velocidade específica de crescimento na forma da Equação (7.47).

$$\mu = (Y_{NA} - k_{CA}) \cdot r_N \cdot u \cdot 10^{-6} + Y_{MC} \cdot k_{MC} \cdot X_E (1 - X_C) \quad (7.47)$$

Onde,

X_A = fração mássica do compartimento A na célula [adimensional].

Y_{NA} = fator de conversão da fonte de nitrogênio em compartimento A [g A/mmol N].

Y_{MC} = fator de conversão da fonte de carbono em compartimento C [g C/g M].

C_N = concentração da fonte de nitrogênio no meio fermentativo [mmol N/l].

C_{Nf} = concentração da fonte de nitrogênio na alimentação do fermentador [mmol N/l].

Por esta equação, nota-se que a velocidade de crescimento específica é composta por dois termos. O primeiro é o responsável pelo crescimento devido à entrada de carbono diretamente no compartimento ativo da célula, enquanto o segundo termo representa o crescimento devido à entrada de carbono no compartimento de estoque que é regido pelo nível

de atividade enzimática para aquisição de carbono nesse compartimento (X_E).

Propõe-se assim que, quando da realização do pulso de amônia, o nível de atividade enzimática para aquisição de carbono no compartimento de estoque caia para valores próximos de zero. Essa queda poderia estar associada aos altos valores de concentração de amônia que, como visto, concorre pela mesma enzima que admite metano para a célula. Poderia, também, estar associada à inibição por nitrito que é formado seguindo-se ao pulso. Desta maneira, o que faria a velocidade de crescimento específica diminuir seria a falta de atividade na admissão de carbono para estoque, e a atividade de crescimento seria mantida consumindo o próprio estoque.

Utilizando os valores dos parâmetros encontrados no capítulo 4 e supondo um teor de água na célula (u) de 3 g células úmidas/g células secas, pode-se reescrever a Equação (7.47) na forma:

$$\mu = 0,325 \cdot 10^{-3} \cdot r_N + 0,0524 \cdot X_E (1 - X_C) \quad (7.48)$$

Através da Equação (7.48) pode-se determinar a velocidade de aquisição de nitrogênio para crescimento (r_N) para o início do teste de pulso, que corresponde à do estado estacionário imediatamente anterior ao pulso. Para o estado estacionário, a velocidade de crescimento específica é igual a velocidade de diluição (Equação (7.23)), o nível de atividade enzimática (X_E) é determinado pela sua definição (Equação (5.3), capítulo 5) e a fração do compartimento de estoque de carbono é determinado pelas relações (5.10) e (5.11) também obtidas no capítulo 5.

Para o teste de pulso com concentração inicial de amônia de 21,7 mmol/l, utilizando-se dos resultados experimentais do estado estacionário e os parâmetros obtidos no capítulo 4, obteve-se para o estado estacionário $\mu=0,083 \text{ h}^{-1}$, $X_E=0,64$ e $X_C=0,15$, implicando em uma velocidade de aquisição de nitrogênio para o estado estacionário de $r_N=168 \text{ mmol N/h-l células}$. Mantendo-se a consideração de que X_E tende a zero imediatamente após o pulso, pela Equação (7.48) obter-se-ia que $\mu=0,055 \text{ h}^{-1}$, sendo, portanto, menor que a velocidade de crescimento específica do estado estacionário. Isso pode explicar a queda inicial na velocidade específica de crescimento que leva a uma queda na concentração de células.

Para incorporar essa teoria no modelo simplificado desenvolvido é ainda necessário

se definir como o nível de atividade se recupera no tempo - que está associado à inibição à entrada de carbono no compartimento de estoque - e também como r_N varia até as condições máximas verificadas no experimento (271 mmol N/h-l células) - que está associado ao tempo de resposta do sistema às novas condições impostas pelo pulso.

Descartando as hipóteses de inibição ou de outro tipo de limitação, nota-se que o tempo de adaptação é realmente importante e deve-se direcionar o modelo para representá-lo, pois a velocidade de crescimento específica máxima alcançada com excesso de nitrogênio foi de $0,133 \text{ h}^{-1}$, muito longe ainda da velocidade específica máxima de crescimento $0,257 \text{ h}^{-1}$.

Como último comentário, não se pode esquecer que por ser o fenômeno transiente a célula sofre mudanças estruturais ou de composição e que a absorbância não é necessariamente proporcional à concentração de células. Assim, os dados experimentais relativos à queda na concentração de células têm que ser vistos com o devido cuidado.

7.7.2 - Atraso na Produção de Nitrato

Há, segundo os dados experimentais, um evidente atraso no aparecimento de nitrato que o modelo simplificado não é capaz de representar. A capacidade do modelo em prever atrasos foi perdida quando das simplificações que o tornaram não estruturado e sem os efeitos de transferência de massa. Se o atraso fosse representado no modelo, como no modelo completo, haveria um acúmulo de nitrito no início do teste de pulso que possibilitaria representar melhor o primeiro pico do nitrito, bem como a resposta inicial do nitrato.

O modelo simplificado consegue representar quantitativamente os níveis de nitrato que são alcançados, sua dependência com o tamanho do pulso e o seu tempo de permanência no meio fermentativo.

7.7.3 - Picos de Nitrito

O modelo simplificado prevê que o segundo pico de nitrito é dependente do tamanho do pulso aplicado, concordando com os resultados experimentais obtidos. A representação do modelo só não é melhor nessa área devido à carência de resultados experimentais que

representam o pico, interferindo, obviamente, pouco na função objetivo utilizada na estimação dos parâmetros.

O modelo prevê que o primeiro pico de nitrito, também, seja dependente do tamanho do pulso aplicado. Porém, ao contrário do segundo pico, os resultados experimentais não concordam com o modelo e nesse pico, quantitativamente menor que o segundo, não foi possível observar uma diferença clara de tamanho entre os diversos pulsos, sugerindo uma não dependência entre a quantidade de nitrito produzida e a quantidade de amônia aplicada no pulso. O nitrito parece surgir instantaneamente e permanece por um período de aproximadamente 3 horas.

Assim, os resultados levam à conclusão de que o fenômeno de produção de nitrito imediatamente após a aplicação do pulso não é consequência apenas das reações envolvidas no modelo, mas também de um *stress* localizado causado pela aplicação do pulso ou pelo controle de pH que não é representado pelo modelo.

7.7.4 - Caráter Inibitório na Assimilação de Amônia

O modelo consegue representar quantitativamente bem o desaparecimento da amônia do meio fermentativo para os diversos valores de pulso. Porém, existem fortes evidências que para pulsos com altas concentrações de amônia (no caso o pulso com 21,7 mmol/l de amônia) há um comportamento inibitório no processo de assimilação de amônia que logo desaparece com o desaparecimento do nitrito que é gerado nessa fase.

Esse fato está baseado em poucos dados experimentais e não é possível observá-lo para concentrações de amônia mais baixas. Mas é provável que ocorra e que seja o responsável pelo *wash-out* das células, observado para pulsos maiores que 25 mmol/l de amônia. Uma das grandes falhas do modelo é que ele não apresenta esse caráter inibitório.

Uma sugestão para explicar o fenômeno é que essa inibição estaria ligada à limitação pelo carbono, que compete com amônia pela enzima MMO. Uma vez que parte da enzima MMO esteja ocupada com amônia, devido ao grande excesso desta, faltaria MMO para a captação de carbono que começaria a ser o substrato limitante. A medida que a concentração de amônia caísse, cessaria a limitação. O modelo tenta representar essa inibição, porém, não

é previsto a troca do substrato limitante para o carbono. Considerando essa hipótese, o modelo deveria ser melhorado incluindo o metabolismo de carbono.

Uma outra sugestão é que exista uma inibição de assimilação de amônia devido ao aparecimento de nitrito no início do experimento. Parece que a inibição por nitrito, se houver, só atua se existir amônia. Isso fica evidente porque no segundo pico de nitrito, embora quantitativamente maior que o primeiro, não foi notado nenhum processo inibitório. Uma outra hipótese seria que no primeiro pico uma outra substância estaria sendo formada que não o nitrito, como por exemplo metilamina. Metilamina seria então responsável pela inibição e seria oxidada a nitrito. Quando nitrato fosse usado como fonte de nitrogênio a redução para nitrito não envolveria essa substância inibidora.

Uma solução paliativa para a representação desse fenômeno pelo modelo seria prever-se uma inibição pelo nitrito, quando de altas concentrações de amônia, que atuaria diretamente na captura de amônia para crescimento, alterando-se a velocidade de crescimento específica.

7.8 - Conclusões

O uso de modelos cinéticos estruturados que descrevem o comportamento transiente de culturas ainda é bastante limitado para aplicações práticas, devido à complexidade de se compreender e incorporar os aspectos biológicos do sistema. Várias tentativas são realizadas, como o foi nesse trabalho, de diminuir a complexidade matemática, tendo um compromisso com o senso biológico. Apesar das bases simples em que o modelo foi suportado e das simplificações que foram feitas, um modelo matematicamente complexo e com um número de parâmetros elevado foi obtido.

Como já discutido, o modelo proposto consegue representar de maneira satisfatória muitos dos aspectos da assimilação de nitrogênio pela cultura. Sugestões foram feitas no sentido de elucidar o comportamento transiente dos resultados experimentais, especialmente os fenômenos relativos ao crescimento celular e à inibição na assimilação de amônia.

Algumas propostas para melhorar o poder de representação do modelo foram colocadas. Porém, é preciso ter em mente que qualquer tentativa para a melhoria da

representação do modelo clama por maior número de variáveis dinâmicas, aumentando-se a complexidade matemática e o número de parâmetros, o que é normalmente um problema na modelagem de processos bioquímicos.

Assim, é necessário, quando possível, conferir os mecanismos e obter parâmetros por experimentos independentes. Paralelamente a isto deve-se melhorar a confiança nas técnicas de medida e na reprodução de resultados experimentais.

O processo de estimação de parâmetros pode ser melhorado tendo-se confiança no comportamento dos dados experimentais. Pode-se utilizar uma curva adaptada aos pontos experimentais. A vantagem é que ter-se-ia um número de pontos muito maior e que estes variariam de uma forma suave que se supõe acontece na realidade.

O uso do modelo desenvolvido para fins que normalmente este se presta (simulação, projeto e controle) ainda é limitado e necessita de futuros desenvolvimentos. Porém, ressalta-se um uso nobre para o modelo: ficou caracterizado que a simples montagem do modelo ajudou em muito na análise, discussão e entendimento dos dados experimentais obtidos.

Capítulo 8

Conclusões e Sugestões

Como contribuição para aumentar-se a competitividade do processo de produção de proteínas a partir de gás natural, a literatura foi enriquecida com dados experimentais de estado estacionário. O trabalho apresenta parâmetros que caracterizam a cultura mista de *Methylococcus capsulatus* no estado estacionário para as condições estudadas, que são relevantes para o projeto de fermentadores. Obteve-se a velocidade específica de crescimento máxima e o fator de conversão de nitrogênio e carbono em células secas.

A concentração dos compostos nitrogenados no meio fermentativo mostrou ser próxima a zero na grande região de velocidades de diluição passíveis de aplicação. Detectou-se, também, uma grande variação na composição do nitrogênio intracelular. Esse fenômeno é atribuído ao armazenamento de carbono pelas células, pois as condições de excesso de carbono lhe são propícias.

Sugere-se, para trabalhos experimentais futuros na área, a confirmação experimental do fato da célula armazenar carbono e a determinação direta do tipo de polímero utilizado para o armazenamento.

Pelos resultados experimentais de estado estacionário, mostrou-se, para a faixa de diluição de interesse prático, uma linearidade entre produtividade em células e a velocidade de diluição. Embora não desenvolvido no trabalho, essa observação tem aplicação imediata em modelos de crescimento não estruturados.

Utilizou-se a possibilidade da célula armazenar carbono para a montagem do modelo estruturado do estado estacionário. O modelo não foi suficientemente testado, necessitando de outros pontos experimentais para a confirmação da validade deste. Porém, algumas estimativas foram feitas utilizando o modelo, que prevê uma concentração de carbono no compartimento de estoque bastante alta, sugerindo assim, o polímero utilizado para o estoque de carbono. Para que o modelo seja suficientemente testado e melhorado, devem-se obter outros resultados experimentais de estado estacionário, utilizando-se variadas concentrações

de nitrogênio na alimentação de nutrientes.

Os resultados experimentais preliminares sugeriram o aprofundamento do estudo do metabolismo do nitrogênio pela célula, que mostrou ser uma preocupação microbiológica interessante e pertinente. Para tanto, realizou-se os experimentos dinâmicos de pulso de amônia.

Destes experimentos dinâmicos pode-se concluir que existe um metabolismo paralelo para a assimilação da amônia pela célula que a oxida terminalmente a nitrato, passando pelo nitrito. Conclui-se, também, que os microorganismos estão aptos a consumir todas as formas em que o nitrogênio aparece: amônia, nitrito e nitrato. O nitrito mostrou ser um forte inibidor, contudo, em pequenas quantidades, atua como fonte de nitrogênio. A amônia é o nutriente preferido pelos microorganismos em detrimento de nitrato ou nitrito.

Notou-se também uma queda na atividade de crescimento celular imediatamente após a aplicação do pulso. Contudo, os resultados mostram que a produção de energia não sofre queda equivalente. O fato é explicado por uma associação entre a fase de adaptação às novas condições de crescimento e ao consumo dos estoques de carbono armazenados durante o estado estacionário.

Realizou-se um modelo com a finalidade de representar o metabolismo paralelo da fonte de nitrogênio. O modelo é simulado e as características qualitativas da resposta da concentração dos compostos nitrogenados do sistema são reproduzidas, confirmando as bases em que o modelo é proposto.

Simplificou-se o modelo a fim de diminuir o número de parâmetros deste e, conseqüentemente, possibilitar um tratamento quantitativo para os parâmetros.

Desenvolveu-se um programa de estimação de parâmetros que tem como uma de suas características a entrada dos dados dinâmicos para vários experimentos com diferentes condições iniciais e várias variáveis, não necessariamente obtidas no mesmo tempo. O processo de otimização provou sua eficácia para um número de parâmetros relativamente elevado. Os parâmetros do modelo simplificado foram estimados, porém algumas características qualitativas foram perdidas com a simplificação.

O modelo não representa a queda na concentração de células no início do experimento. Este fato não prejudica significativamente a representação da assimilação paralela de nitrogênio. Sugestões são feitas para a continuidade no desenvolvimento do modelo

incorporando o consumo de carbono do estoque e a fase de adaptação, considerados os responsáveis pelo fenômeno.

Outra falha do modelo é não prever um caráter inibitório na assimilação da amônia quando de pulsos com altas concentrações de amônia. Algumas sugestões são expostas na tentativa de explicar o fenômeno como a troca do substrato limite para o carbono, a inibição pelo nitrito ou outra substância inibidora. Porém, mais dados experimentais devem ser levantados nessas condições para um melhor delineamento do fenômeno. As melhorias no modelo devem ser feitas incluindo, então, o metabolismo de carbono e, não estruturadamente, incorporando uma inibição pelo nitrito.

Trabalhos experimentais devem ainda ser realizados no sentido de elucidar o mecanismo de inibição pelo nitrito, ou outra substância intermediária que venha a inibir o crescimento da cultura. Esse trabalho ajudaria em muito o entendimento do processo e conseqüente modelagem do mesmo.

As melhorias propostas para o aumento da capacidade de representação do modelo têm como conseqüência um indesejável crescimento da complexidade matemática do mesmo, aumentado-se o número de parâmetros e variáveis. Porém, apresentar um modelo onde poucas variáveis e parâmetros consigam representar características de processos bioquímicos, onde um número grande de reações e controles internos se processam ao mesmo tempo, além da dificuldade experimental em se controlar variáveis que definam o estado da célula, torna a modelagem de processos bioquímicos um trabalho desafiador e fascinante.

Acredita-se que o trabalho atingiu seus objetivos, contribuindo para a elucidação de fenômenos e, principalmente, levantando dúvidas e apresentando sugestões. Acredita-se que linhas de pesquisa foram incentivadas e espera-se que se tenha contribuído para o estudo do crescimento de metilotróficos, o desenvolvimento de modelos para processos bioquímicos e para a aplicação prática do processo em estudo. Como desejo mais nobre, espera-se que o trabalho venha a colaborar na formação de recursos humanos para área de metilotróficos e de modelagem de processos bioquímicos.

Bibliografia

Abu-Ruwaida, A. S., I. M. Banad e I. Y. Hamdan (1988), "Reduction of Nucleic Acid Content in Cell Biomass of Methanol-Utilizing Mixed Bacterial Culture by Heat Treatment", *Biotechnology Letters*, Vol. 10, n° 8, Pp. 597-602.

Abu-Ruwaida, A. S., I. M. Banat e I. Y. Hamdan (1990), "Chemostat Optimization of Biomass Production of a Mixed Bacterial Culture Utilizing Methanol", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 32, No. 5, Pp. 550-555.

Agrawal, P. e H. C. Lim (1984), "The Growth Dynamics of a Methanol-Utilizing Bacterium L3 in a Batch Bioreactor", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVI, Pp. 1352-1363.

Al-Awadhi, N., T. Egli, G. Hamer, C. A. Mason (1990), "The Process Utility of Thermotolerant Methylophilic Bacteria: I. An Evaluation in Chemostat Culture", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 36, Pp. 816-820.

Anthony, C. (1978), "The Oxidation of NAD(P)H in Methylophilic", *Proceedings of the Society for General Microbiology*, Vol. 5, Part 2, Pp. 67.

Anthony, C. (1982), "The Biochemistry of Methylophilic", Academic Press, London.

Asenjo, J. A. e J. S. Suk (1986), "Microbial Conversion of Methane into Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB): Growth and Intracellular Product Accumulation in a Type II Methanophilic", *Journal of Fermentation Technology*, Vol. 64, n° 4, Pp. 271-278.

Bailey, J. E. e D. F. Ollis (1986), "Biochemical Engineering Fundamentals", 2a. edição, McGraw-Hill Chemical Engineering Series.

Bailey, M. L., J. Downs and J. W. Drozd (1978), "Nitrogen Metabolism in *Methylococcus* NCIB 11083", *Proceedings of the Society for General Microbiology*, Vol. 5, Part 2, Pp. 65-66.

Barnes, L. J., J. W. Drozd, D. E. F. Harrison e G. Hamer (1976), "Process Considerations and Techniques Specific to Protein Production from Natural Gas", *Microb. Prod. Util. Gases*, Pp. 301-315.

Bello, R. A., C. W. Robinson e M. Moo-Young (1985), "Gas Holdup and Overall Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Airlift Contactors", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVII, Pp. 369-381.

Bello, R. A., C. W. Robinson e M. Moo-Young (1984), "Liquid Circulation and Mixing Characteristics of Airlift Contactors", *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 62, Pp. 573-577.

- Bennett, I. C., A. A. Yeo e J. A. Gosling (1971), "Animal-Feed Protein Made from n-Paraffins", *Chemical Engineering*, December 27, Pp. 45-47.
- Bewersdorff, M. e Dostálek M. (1971), "The Use of Methane for Production of Bacterial Protein", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XIII, Pp. 49-62.
- Biryukov, V. V. (1990), "Single Cell Protein - From Basic Research to Production", *Proceedings of The 5th European Congress on Biotechnology*, Vol. 2, Pp. 748-753.
- Blenke, H. (1979), "Loop Reactors", *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 13, Pp. 121-214.
- Borzani, W. (1986), "Cinética de Processos Fermentativos", *Revista Brasileira de Engenharia (Caderno de Engenharia Química)*, Vol. 3, n°. 2.
- Burrows, K. J., A. Cornish, D. Scott e I. J. Higgins (1984), "Substrate Specificities of the Soluble and Particulate Methane Mono-oxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b", *Journal of General Microbiology*, Vol. 130, Pp. 3327-3333.
- Calvo, E. G. (1989), "Comments on Liquid Circulation in Airlift Reactors", *Chemical Engineering Science*, Vol. 44, n°. 5, Pp. 1269.
- Carlsen, H., L. Jørgensen e H. Degn (1991), "Inhibition by Ammonia of Methane Utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath)", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 35, Pp. 124-127.
- Carlsen, H., L. Jørgensen e H. Degn (1990), "Inhibition of the Methane Oxidation of *Methylococcus capsulatus* (Bath) by Ammonia and Methanol", Pp. 754-757.
- Chen, N. Y., E. F. Kondis e S. Srinivasan (1987), "Low-Pressure Airlift Fermenter for Single Cell Protein Production: I. Design and Oxygen Transfer Studies", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIX, Pp. 414-420.
- Chen, N. Y., S. Srinivasan, R. I. Leavitt, V. F. Coty e E. F. Kondis (1987), "Low-Pressure Airlift Fermenter for Single Cell Protein Production: II. Continuous Culture of *Pichia* Yeast", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIX, Pp. 421-428.
- Chisti, M. Y. (1989), "Airlift Bioreactor", Elsevier Applied Science, London.
- Chisti, M. Y. (1989), "Airlift Reactors - Design and Diversity", *The Chemical Engineer*, Feb, Pp. 41-43.
- Chisti, M. Y., B. Halard e M. Moo-Young (1988), "Liquid Circulation in Airlift Reactors", *Chemical Engineering Science*, Vol. 43, n°. 3, Pp. 451-457.

- Cooney, C. L. e N. Makiguchi (1977), "An Assessment of Single Cell Protein from Methanol Grown Yeast", *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, No. 7, Pp. 65-76.
- Coty, V. F. (1969), "A Critical Review of the Utilization of Methane", *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, n°. 1, Pp. 105-117.
- Dalton, H. (1977), "Ammonia Oxidation by the Methane Oxidizing Bacterium *Methylococcus capsulatus* strain Bath", *Arch. Microbiol.*, Vol. 114, Pp. 273-279.
- Dansk Bioprotein A. S. (1989), "Bioprotein", Documentação comercial.
- Davies, S. L. e R. Whittenbury (1970), "Fine Structure of Methane and Other Hydrocarbon-utilizing Bacteria", *Journal of General Microbiology*, Vol. 61, Pp. 227-232.
- Dhurjati, P., D. Ramkrishna, M. C. Flickinger e G. T. Tsao (1985), "A Cybernetic View of Microbial Growth: Modeling of Cells as Optimal Strategists", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVII, Pp. 1-9.
- Dohnal, M. (1985), "Fuzzy Bioengineering Models", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVII, Pp. 1146-1151.
- Drozd, J. W., A. Godley e M. L. Bailey (1978), "Ammonia Oxidation by Methane-Oxidising Bacteria", *Proceedings of the Society for General Microbiology*, Vol. 5, Part 2, Pp. 66-67.
- Esener, A. A., J. A. Roels e N. W. F. Kossen (1981), "The Influence of Temperature on the Maximum Specific Growth Rate of *Klebsiella Pneumoniae*", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, Pp. 1401-1405.
- Esener, A. A., J. A. Roels e N. W. F. Kossen (1981), "Fed-Batch Culture: Modeling and Applications in the Study of Microbial Energetics", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, Pp. 1851-1871.
- Esener, A. A., T. Veerman, J. A. Roels e N. W. F. Kossen (1982), "Modeling of Bacterial Growth; Formulation and Evaluation of a Structured Model", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIV, Pp. 1749-1764.
- Faust, U. e P. Präve (1983), "Biomass from Methane e Methanol", Capítulo 1, Em "Biotechnology" Vol. 3 (Editores: H.J.Rehm e G.Reed), Pp. 84-108, Verlag Chemie, Weinheim.
- Faust, U. e W. Sitting (1980), "Methanol as Carbon Source for Biomass Production in a Loop Reactor", *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 17, Pp. 63-99.
- Fox, B. G., W. A. Froland, D. R. Jollie e J. D. Lipscomb, "Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b", In *Methods in Enzymology*, Academic Press, USA, Vol. 188 (Hydrocarbons and Methylo trophy), Pp. 191-199.

- Fredrickson, A. G. (1976), "Formulation of Structured Growth Models", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XVIII, Pp. 1481-1486.
- Furigo Jr. A., M. H. Jørgensen e E. C. Biscaia Jr. (1994), "Comportamento Dinâmico da Assimilação de Nitrogênio em uma Cultura Metanotrófica", *IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá.
- Furigo Jr., A., M. H. Jørgensen e E. C. Biscaia Jr. (1994), "Produção de Proteínas a partir de Gás Natural: Caracterização do Estado Estacionário", *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Vol. 2, Pp. 1351-1356, São Paulo.
- Furigo Jr., A., M. H. Jørgensen (1993), "Nitrogen Limited Growth of a Methanotrophic Culture", *Bioprocess Engineering*, Vol. 9, No. 2/3, Pp. 119-127.
- Furigo Jr., Agenor (1986), "Características Hidrodinâmicas e de Transferência de Massa em Contatores Air-Lift", Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas SP.
- Goldberg, I. e J. S. Roken (eds.) (1991), "Biology of Methyloprotophytes", Butterworth-Heinemann, USA.
- Gottschalk, G. (1985), "Bacterial Metabolism", 2nd Edition, Springer-Verlag, New York.
- Green J. e H. Dalton (1985), "Protein B of Soluble Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 260, nº. 29, Pp. 15795-15801.
- Hamer, G., D. E. F. Harrison, H. H. Topiwala e A. Gabriel (1976), "The conversion of Natural Gas into Protein for Use in Compounded Animal Feeds", *Int. Chem. Eng. Symp. Ser.*, Vol. 44, nº. 5, Pp. 65-72.
- Hamer, G., I. Y. Hamdan e A. E. Humphrey (1981), "A Route for SCP Production Using Volatile Liquid Hydrocarbon Feedstocks", *Adv. Biotechnol. (Proc. Int. Ferment. Symp)*, Pp. 395-399.
- Harder, A. e J. A. Roels (1982), "Application of Simple Structured Models in Bioengineering", *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 21, Pp. 55-107.
- Himmelblau, D. M. (1970), "Process Analysis by Statistical Methods", John Wiley.
- Hiss, H e W. Borzani (1949), "A Generalized Kinetic Model for the Study of Microbial Growth", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXV, Pp. 3079-3087.
- Hong, J. (1989), "Yield Coefficients for Cell Mass and Product Formation", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 33, Pp. 506-507.

- Hutton, W. E. e C. E. Zobell (1953), "Production of Nitrite from Ammonia by Methane Oxidizing Bacteria", *J. Bacteriol.*, Vol. 27, Pp. 216-219.
- Jørgensen, L. (1987), "Investigations on Growth and Metabolism at Methanotrophs", Dsc. Thesis, Ødense University, Dinamarca.
- Jørgensen, L. e H. Degn (1983), "Mass Spectrometric Measurements of Methane and Oxygen Utilization by Methanotrophic Bacteria", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 20, Pp. 331-335.
- Kafarov, V.V., A. Y. Vinarov e L. S. Gordeev (1987), "Modeling of Bioreactors", *International Chemical Engineering*, Vol. 27, n°. 4, Pp. 615-641.
- Kompala, D. S., D. Ramkrishna e G. T. Tsao (1984), "Cybernetic Modeling of Microbial Growth on Multiple Substrates", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVI, Pp. 1272-1281.
- Kompala, D. S., D. Ramkrishna, N. B. Jansen e G. T. Tsao (1986), "Investigation of Bacterial Growth on Mixed Substrates: Experimental Evaluation of Cybernetic Models", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVIII, Pp. 1044-1055.
- Kosaric, N. e J. E. Zajic (1974), "Microbial Oxidation of Methane and Methanol", *Advances on Biochemical Engineering*, Vol. 3, Pp. 89-125.
- Lamb, S. C. e J. C. Garver (1980), "Interspecific Interactions in a Methane-Utilizing Mixed Culture", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXII, Pp. 2119-2135.
- Lamb, S. C. e J. C. Garver (1980), "Batch- and Continuous-Culture Studies of a Methane-Utilizing Mixed Culture", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXII, Pp. 2097-2118.
- Large, P. J. e C. W. Bamforth (1988), "Methylo trophy and Biotechnology", Longman Scientific & Technical, London.
- Laskin, A. I. (1977), "Ethanol as a Substrate for Single Cell Protein Production", *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, No. 7, Pp. 91-103.
- Leak, D. J. e H. Dalton (1986), "Growth Yields of Methanotrophs - 1. Effect of Copper on the Energetics of Methane Oxidation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 23, Pp. 470-476.
- Leak, D. J. e H. Dalton (1986), "Growth Yields of Methanotrophs - 2. A Theoretical Analysis", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 23, Pp. 477-481.
- Lin, S. B. e H. H. Wang (1983), "*Bdellovibrio* in Methylo trophic Bacteria", *Biotechnology Letters*, Vol. 5, No. 8, Pp. 549-554.

- Linton, J. D. e R. E. Cripps (1978), "The Occurrence and Identification of Intracellular Polyglucose Storage Granules in *Methylococcus* NCIB 11083 Grown in Chemostat Culture on Methane", *Arch. Microbiol.*, Vol. 117, Pp. 41-48.
- Luttmann, R., H. Buchholz, W. Zakrzewski e K. Schügerl (1982), "Identification of Mass-Transfer Parameters and Process Simulation of SCP Production Process in Airlift Tower Reactors with an External Loop", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIV, Pp. 817-835.
- Luttmann, R., M. Thoma, H. Buchholz e K. Schügerl (1983), "Model Development, Parameter Identification, and Simulation of the SCP Production Process in Air Lift Tower Bioreactors with External Loop - I", *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 7, n°. 1, Pp. 43-50.
- Luttmann, R., M. Thoma, H. Buchholz e K. Schügerl (1983), "Model Development, Parameter Identification, and Simulation of the SCP Production Process in Air Lift Tower Bioreactors with External Loop - II", *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 7, n°. 1, Pp. 51-63.
- McManamey, W. J., D. A. J. Wase e S. Raymahasay (1985), "Gas Holdup in an External-Loop Air-Lift Fermentor with a Contaminated Gas Distributor", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVII, Pp. 1092-1094.
- Monod, J. (1950), "La Technique de Culture Continue Théorie e Applications", *Annales de L'institut Pasteur*, Vol. 79, Pp. 390-410.
- Monod, J. (1949), "The Growth of Bacterial Cultures", *Ann. Rev. Microbiol.*, Vol. 3, Pp. 371-394.
- Moresi, M. (1981), "Optimal Design of Airlift Fermenters", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, Pp. 2537-2560.
- Moresi, M., G. B. Gianturco e E. Sebastiani (1983), "The Ejector-Loop Fermenter: Description and Performance of the Apparatus", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXV, Pp. 2889-2904.
- Murrell J. C. e H. Dalton (1983), "Ammonia Assimilation in *Methylococcus capsulatus* (Bath) and other Obligate Methanotrophs", *Journal of General Microbiology*, Vol. 129, Pp. 1197-1206.
- Murrell, J. C. e H. Dalton (1983), "Purification and Properties of Glutamine Synthetase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)", *Journal of General Microbiology*, Vol. 129, Pp. 1187-1196.
- Nielsen, J e K. Nikolajsen (1988), "Review and Discussion of Literature on Mathematical Models on Microbial Systems", Relatório técnico, Department of Biotechnology, The Technical University of Denmark.

Nielsen, J., C. Emborg, K. Halberg e J. Villadsen (1989), "Compartment Model Concept Used in the Design of Fermentation with Recombinant Microorganisms", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.34, Pp. 478-486.

O'Neill, J. G. e J. F. Wilkinson (1977), "Oxidation of Ammonia by Methane-oxidizing Bacteria and the Effects of Ammonia on Methane Oxidation", *Journal of General Microbiology*, Vol. 100, Pp. 407-412.

Ouyoung, P. K., H. N. Chang e M. Moo-Young (1988), "Determination of Gas-Liquid Mass Transfer Coefficient in a Bubble Column by an Eigenvalue Method", *Chemical Engineering Science*, Vol. 43, nº. 4, Pp. 821-827.

Papoutsakis, E., H. C. Lim e G. T. Tsao (1978), "SCP Production on C₁ Compounds", *AIChE Journal*, Vol. 24, nº. 213, Pp. 406-417.

Papoutsakis, E., W. Hirt, H. C. Lim (1981), "Bacterial Utilization of Pure and Mixed C₁ Compounds for Single Cell Protein Production", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, Pp. 235-242.

Peillex, J., M. Fardeau, R. Boussand, J. Navarro e J. Belaich (1988), "Growth of *Methanococcus thermolithotrophicus* in Batch and Continuous Culture on H₂ and CO₂: Influence of Agitation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 29, Pp. 560-564.

Pilkington, S. J. e H. Dalton (1990), "Soluble Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath", In *Methods in Enzymology*, Academic Press, USA, Vol. 188 (Hydrocarbons and Methylophony), Pp. 181-190.

Prévot, A. R. (1977), "Biosynthese Bactérienne du Méthane ed des Pétroles - Pour L'an 2000", Maloine S.A. , Paris.

Prior, S. D. e H. Dalton (1985), "The Effect of Copper Ions on Membrane Content and Methane Monooxygenase Activity in Methanol-grown Cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath)", *Journal of General Microbiology*, Vol. 131, Pp. 155-163.

Prokop, A., P. Janik, M. Sobotka e V. Krumphanzl (1983), "Hidrodynamics, Mass Transfer and Yeast Culture Performance of a Column Bioreactor with Ejector", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXV, Pp. 1147-1160.

Queiroz, M. S. (1986), "Produção de Proteína a partir de Gás Natural", 7º. *Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Rio de Janeiro.

Queiroz, M. S., (1988), "Produção de Proteína a partir de Gás Natural (Parte 2): Seleção do Reator", 2º. *Seminário Internacional sobre Gás Natural*, Salvador.

- Ramkrishna, D., A. G. Fredrickson e H. M. Tsuchiya (1966), "The Dynamics of Microbial Growth (II) A Distributed, Structured Model", *Journal of Fermentation Technology*, Vol. 44, Pp. 210-217.
- Ramkrishna, D., A. G. Fredrickson e H. M. Tsuchiya (1967), "Dynamics of Microbial Propagation: Models Considering Inhibitors and Variable Cell Composition", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. IX, Pp. 129-170.
- Ramkrishna D., D. S. Kompala e G. T. Tsao (1987), "Are Microbes Optimal Strategists?", *Biotechnology Progress*, Vol. 3, n° 3, Pp. 121-126.
- Rimmington, A. (1985), "Single-cell Protein: The Soviet ReVol.ution?", *New Scientist*, June, Pp. 12-15.
- Rimmington, A. (1987), "The impact of Biotechnology upon Agriculture in the USSR Part I", *International Industrial Biotechnology*, June/July, Pp. 334-338.
- Rimmington, A. (1989), "Biotechnology Falls Foul of the Environment in the USSR", *Biotechnology*, Vol. 7, Pp. 783-788.
- Roels, J. A. (1983), "Energetics and Kinetics in Biotechnology", Elsevier Biomedical Press, The Netherlands.
- Schlegel, H. G. e B. Bowien (1989), "Autotrophic Bacteria", Springer-Verlag, USA.
- Schügerl, K. (1984), "Nonmechanically Agitated Bioreactor Systems", In: Murray Moo-Young (Eds.): *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2, Pp. 99-118, Pergamon Press.
- Schügerl, K. (1982), "Characterization and Performance of Single- and Multistage Tower Reactor with Outer Loop for Cell Mass Production", *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 22, Pp. 94-224.
- Schügerl, K., J. Lücke (1977), "Bubble Column Bioreactors", *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 7, Pp. 1-84.
- Schumpe, A., G. Quicker e W. Deckwer (1982), "Gas Solubilities in Microbial Culture Media", *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 24, Pp. 1-38.
- Scrimshaw, N. S. (1985), "Acceptance of Single-cell Protein for Human Food Applications", *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 4, Pp. 673-684.
- Sheehan, B. T. e Johnson M. J. (editores) (1971), "Production of Bacterial Cells from Methane", *Applied Microbiology*, Vol. 22, n° 3, Pp. 511-515.

- Siegel, M. H., J. C. Merchuk e K. Schügerl (1986), "Air-Lift Reactor Analysis: Interrelationships Between Riser, Downcomer, and Gas-Liquid Separator Behavior, Including Gas Recirculation Effects", *AIChE Journal*, Vol. 32, n°. 10, Pp. 1585-1596.
- Solomons, G. L. (1983), "Single Cell Protein", *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 1, Pp. 21-58.
- Stanley, S. H. e H. Dalton (1982), "Role of Ribulose-1,5-biphosphate Carboxylase/Oxygenase in *Methylococcus capsulatus* (Bath)", *Journal of General Microbiology*, Vol. 128, Pp. 2927-2935.
- Steinmeyer, D. E. e M. L. Shuler (1989), "Structured Model for *Saccharomyces Cerevisiae*", *Chemical Engineering Science*, Vol. 44, n°. 9, Pp. 2017-2030.
- Stringer, D. A. (1985), "Acceptance of Single-cell Protein for Animal Feeds", *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 4, Pp. 685-694.
- Sun, Y., T. Nozawa e S. Furusaki (1988), "Gas Holdup and Volumetric Oxygen Transfer Coefficiente in a Three-Phase Fluidized Bed Bioreactor", *Journal of Chemical Engineering of Japan*, Vol. 21, n°. 1, Pp. 15-24.
- Swaminathan, S., S. R. Joshi e N. M. Parhad (1989), "Bioconversion to Single Cell Protein: A Potential Resource Recovery from Paper Mill Solid Waste", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 67, No. 6, Pp. 427-429.
- Taylor, S. C., H. Dalton e C. S. Dow (1981), "Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Carbon Assimilation in *Methylococcus capsulatus* (Bath)", *Journal of General Microbiology*, Vol. 122, Pp. 89-94.
- Toukdarian, A. E. e M. E. Lidstrom, "Nitrogen Metabolism in a New Obligate Methanotroph, *Methylosinus* Strain 6", *Journal of General Microbiology*, Vol. 130, Pp. 1827-1837.
- Turner, B. G., D. Ramkrishna e N. B. Jansen (1988), "Cybernetic Modeling of Bacterial Cultures at Low Growth Rates: Mixed-Substrate Systems", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 32, Pp. 46-54.
- Turner, B. G. e D. Ramkrishna (1988), "Revised Enzyme Synthesis Rate Expression in Cybernetic Models of Bacterial Growth", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 31, Pp. 41-43.
- Van Dijken, J. P. e W. Harder (1975), "Growth Yields of Microorganisms on Methanol and Methane. A Theoretical Study", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XVII, Pp. 15-30.
- Verlaan P., A. M. M. Van Eijs, J. Tramper, K. Van't Riet e K. Ch. A. M. Luyben (1989), "Estimation of Axial Dispersion in Individual Sections of an Airlift-Loop Reactor", *Chemical Engineering Science*, Vol. 44, n°. 5, Pp. 1139-1146.

Villadsen, J. (1989), "Simulation of Biochemical Reactions", *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 13, n°. 4/5, Pp. 385-395.

Wang, D. I. C. (1968), "Proteins from Petroleum", *Chemical Engineering*, Aug 26, Pp. 99-108.

Wehner, J. F. e R. H. Wilhelm (1956), "Boundary Conditions of Flow Reactor", *Chemical Engineering Science*, Vol. 6, Pp. 89-93.

Whittenbury, R., K. C. Phillips e J. F. Wilkinson (1970), "Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria", *Journal of General Microbiology*, Vol. 61, Pp. 205-218.

Whittenbury, R., S. L. Davies e J. F. Davey (1970), "Exospores and Cysts Formed by Methane-utilizing Bacteria", *Journal of General Microbiology*, Vol. 61, Pp. 219-226.

Nomenclatura

A	compartimento ativo da célula; constante adimensional.
A_1	constante [mmol N/h-l células].
A_2	constante [mmol N/h-l células].
A_3	constante [mmol N/h-l células].
A_4	constante [mmol N/h-l células].
A_N	constante [mmol N/h-l células].
B	constante [l/mmol N].
C	variável prevista pelo modelo; compartimento de estoque de carbono da célula; carbono.
C_o	constante adimensional.
C_C	concentração de carbono na fase líquida [mmol C/l].
C^{exp}	variável medida experimentalmente.
C_G	concentração de carbono na fase gasosa [mmol C/l].
C_N	concentração da fonte de nitrogênio no meio fermentativo [mmol N/l].
C_{Nf}	concentração da fonte de nitrogênio na alimentação do fermentador [mmol N/l].
C_{NH_3}	concentração extracelular de amônia [mmol N/l células].
$C_{NH_3}^o$	concentração de amônia na alimentação [mmol N/l].
C_{N_i}	concentração extracelular do componente N_i [mmol N/l].
C_{NO_2}	concentração extracelular de nitrito [mmol N/l células].
C_{NO_3}	concentração extracelular de nitrato [mmol N/l células].
C_X	concentração de células secas [g/l].

C_{x_w}	concentração de células úmidas [g/l].
D	velocidade de diluição [h^{-1}].
$D^{\max}$	velocidade de diluição máxima [h^{-1}].
$\left. \frac{dM_x}{dt} \right _x$	variação da massa de células secas para crescimento [g/h].
$\left. \frac{dV_x}{dt} \right _x$	variação do volume de células para crescimento [l/h].
E	complexo enzima-reagente.
E_1	sistema enzimático ou complexo enzima-nitrogênio responsável pela oxidação da amônia a nitrito.
E_2	sistema enzimático ou complexo enzima-nitrogênio responsável pela oxidação do nitrito a nitrato..
E_3	sistema enzimático ou complexo enzima-nitrogênio responsável pela redução do nitrato a nitrito.
E_4	sistema enzimático ou complexo enzima-nitrogênio responsável pela redução do nitrito a amônia.
E_L	enzima livre.
E_N	sistema enzimático ou complexo enzima-nitrogênio responsável pela utilização da amônia para produção de células.
F	vazão volumétrica à saída do fermentador [l/h].
F^o	vazão volumétrica da alimentação [l/h].
f_A	fração mássica de carbono no compartimento A [g/g].
f_C	fração mássica de carbono no compartimento C [g/g].
FO	valor da função objetivo.
f_{r_C}	fração de MMO comprometida com a incorporação do carbono[adimensional].
f_x	fração mássica de carbono das células secas [g/g].

H	constante de Henry $\left[\frac{\text{mmol C/l fase gas.}}{\text{mmol C/l fase liq.}} \right]$.
i	índice que designa o ponto experimental.
j	índice que designa a variável.
k	índice que designa o experimento.
k_{CA}	constante de velocidade da reação $C \rightarrow A$ [g C/mmol N].
K_C	constante [mmol C/l células].
K_{C_I}	constante [mmol C/mmol N].
k_{E_i}	constante [h^{-1}].
k_i	constante [h^{-1}].
K_{I_3}	constante adimensional.
K_{I_4}	constante adimensional.
$K_L a$	coeficiente volumétrico de transferência de massa [h^{-1}].
K_{M_1}	constante [mmol N/l células].
K_{M_2}	constante [mmol N/l células].
K_{M_3}	constante [mmol N/l células].
K_{M_4}	constante [mmol N/l células].
k_{MC}	constante de velocidade da reação $M \rightarrow C$ [h^{-1}].
K_{M_N}	constante [mmol N/l células].
k_T	constante de transferência de massa [h^{-1}].
k_μ	constante [h^{-1}].
M	fonte de carbono (metano).
MMO	enzima metano-monooxigenase.
N	nitrogênio em determinada forma.
N_1	amônia.

N_2	nitrito.
N_3	nitrato.
N_{exp}	número de experimentos considerados.
N_k	número de pontos experimentais para o experimento k.
N_{var}	número de variáveis dinâmicas.
P	produto.
PHB	Poli- β -Hidroxibutirato.
r_1	velocidade de formação de produto via o sistema enzimático E_1 [mmol N/h-l células].
r_2	velocidade de formação de produto via o sistema enzimático E_2 [mmol N/h-l células].
r_3	velocidade de formação de produto via o sistema enzimático E_3 [mmol N/h-l células].
r_4	velocidade de formação de produto via o sistema enzimático E_4 [mmol N/h-l células].
r_{CA}	velocidade de consumo de compartimento C para produção de compartimento A [g/l-h].
r_C^T	velocidade de transporte de carbono para o interior da célula [mmol C/h-l células].
r_{E_1}	velocidade de formação do complexo enzima-nitrogênio E_1 . [mmol N/l células - h].
r_{E_2}	velocidade de formação do complexo enzima-nitrogênio E_2 . [mmol N/l células - h].
r_{E_3}	velocidade de formação do complexo enzima-nitrogênio E_3 . [mmol N/l células - h].
r_{E_4}	velocidade de formação do complexo enzima-nitrogênio E_4 . [mmol N/l células - h].

	h].
r_{E_i}	velocidade de formação do complexo enzima i-nitrogênio (E_i) [mmol N/l células-h].
r_{E_N}	velocidade de formação do complexo enzima-nitrogênio E_N . [mmol N/l células-h].
r_i	velocidade de formação do produto via o sistema enzimático i [mmol N/h-l células].
r_{MC}	velocidade de consumo da fonte de carbono para estoque no compartimento C [g/l-h].
r_N	velocidade de consumo de nitrogênio para o crescimento celular [mmol N/h-l células].
r_{NA}	velocidade de consumo de nitrogênio para incorporação no compartimento A [mmol /l-h].
$r_{N_i}^T$	velocidade de transporte do componente N_i para o interior da célula [mmol N/h-l células].
$r_{NH_3}^T$	velocidades de transporte de amônia para o interior das células [mmol N/h-l células].
$r_{NO_2}^T$	velocidades de transporte de nitrito para o interior das células [mmol N/h-l células].
$r_{NO_3}^T$	velocidades de transporte de nitrato para o interior das células [mmol N/h-l células].
r_X	velocidade de crescimento celular [g células secas/h-l].
SCP	<i>single cell protein</i> .
t	tempo [h].
u	relação entre a massa de células úmidas e massa de células secas [g/g].

V	volume do fermentador [l].
V^o	volume do fermentador em estado estacionário [l]..
V_X	volume das células úmidas[l].
X	células.
X_A	fração mássica do compartimento A na célula [adimensional].
X_C	fração mássica do compartimento C na célula [adimensional]; concentração intracelular de carbono [mmol C/l células].
X_E	atividade enzimática da célula para estocagem de carbono [adimensional].
$X_{E_1}^{MAX}$	constante [mmol N/l células].
$X_{E_2}^*$	concentração intracelular de equilíbrio do complexo
$X_{E_2}^{MAX}$	constante [mmol N/l células úmidas].
$X_{E_3}^*$	concentração intracelular de equilíbrio do complexo E_3 [mmol N/l células].
$X_{E_3}^{MAX}$	constante [mmol N/l células].
$X_{E_4}^*$	concentração intracelular de equilíbrio do complexo E_4 [mmol N/l células].
$X_{E_4}^{MAX}$	constante [mmol N/l células].
X_{E_i}	concentração intracelular do complexo E_i [mmol N/l células].
$X_{E_i}^*$	concentração intracelular de equilíbrio do complexo E_i [mmol N/l células].
$X_{E_N}^*$	concentrações intracelulares de equilíbrio do complexo E_N [mmol N/l células].
$X_{E_N}^{MAX}$	constante [mmol N/l células].
X_{NH_3}	concentração intracelular de amônia [mmol N/l células].
X_{N_i}	concentração intracelular do componente N_i [mmol N/l de células].

X_{NO_2}	concentração intracelular de nitrito [mmol N/l células].
X_{NO_3}	concentração intracelular de nitrato [mmol N/l células].
Y_{MC}	fator de conversão da fonte de carbono em compartimento C [g C/g M].
Y_{NA}	fator de conversão da fonte de nitrogênio em compartimento A [g A/mmol N].
Y_{NC}	relação estequiométrica entre o consumo de carbono e nitrogênio usados para o crescimento celular [mmol C/mmol N].
Y_{NX}	fator de conversão de nitrogênio em células secas [g células secas/mmol N].
Y_{NX}^{max}	fator de conversão de nitrogênio em células secas na condições de velocidade específica de crescimento máxima [g células secas/mmol N].
Y_{NW}	fator de conversão de nitrogênio em células úmidas [g cél. úmidas/mmol N].
α	constante de proporcionalidade [h ⁻¹].
ΔV^o	volume do pulso de substrato [l].
λ_i	peso relativo da variável j.
μ	velocidade específica de crescimento [h ⁻¹].
ρ_x	massa específica das células [g células úmidas/l células].

Apêndice A

Desenvolvimento do Meio Mineral

Durante os primeiros experimentos de cultivo de *Methylococcus capsulatus* realizados em fermentador agitado clássico e, também, testes em fermentador tipo *loop fermentor*, utilizou-se um meio mineral desenvolvido anteriormente que empregava como fonte de nitrogênio uma mistura de amônia e nitrato. Este meio mineral mostrou-se inadequado para o fermentador não convencional, pois notava-se o aparecimento de nitrito e conseqüente redução da velocidade específica de crescimento e morte celular.

Considerou-se que a formação de nitrito dava-se pela redução do nitrato na seção de retorno (downcomer) do fermentador não convencional, uma vez que nesta seção a aeração é praticamente inexistente.

Assim, decidiu-se substituir o nitrato do meio mineral por amônia, mantendo-se a composição do meio que vinha sendo utilizado com sucesso em fermentadores agitados clássicos. Porém, a substituição de um ânion (nitrato) por um cátion (amônia na forma de amônio) não foi uma tarefa simples, pois outros ânions (sulfatos, fosfatos e cloretos) deveriam obrigatoriamente ser adicionados.

As duas maiores dificuldades foram: a preocupação de que um excesso de fosfato e outros ânions pudessem inibir o crescimento da cultura, e os precipitados que apareceram no novo meio (CaSO_4 , CaHPO_4).

Whittenbury *et al.* (1970) trabalharam com bactérias utilizadoras de metano e mostram que concentrações de fosfato maiores que 21,1 mmol/l e concentrações de cloreto maiores que 9,3 mmol/l inibem linhagens utilizadas em sua pesquisa. Apesar dos autores não darem informações sobre quais linhagens foram inibidas, decidiu-se preparar um meio mineral de forma que as concentrações de fosfato e cloreto no meio fermentativo fossem menores que estes limites.

Para resolver os problemas de precipitação, adicionou-se inicialmente na solução uma certa quantidade de citrato, que atuava como um agente complexante, principalmente para

metais pesados. Whittenbury *et al.*, no trabalho mencionado, utilizou de um complexante para esse fim quando trabalhou em faixa de pH neutro. Outros autores que trabalharam com íons amônio não utilizaram qualquer agente complexante, porém, seus experimentos foram realizados com baixas concentrações de íons amônio. Para se obter altas concentrações de células no fermentador são necessários valores altos de concentração de íons amônio no meio mineral.

O citrato adicionado ao meio também é uma fonte adicional de carbono e, em consequência disso, contaminações freqüentes foram observadas no meio mineral, muito embora o pH desse meio fosse bastante baixo. Para evitar problemas de contaminação, decidiu-se não utilizar o agente complexante e os problemas de precipitação foram sanados diminuindo-se o pH do meio mineral para aproximadamente 2,1. O meio mineral, então, foi testado durante um mês para baixas velocidades de diluição.

A Tabela (A.1) mostra a composição do meio mineral com a mistura amônia e nitrato, utilizado com sucesso em experimentos no fermentador agitado clássico, e do meio com amônia como a única fonte de nitrogênio, desenvolvido no trabalho. Cada meio é apresentado em duas colunas: a primeira coluna mostra a relação entre o número de moles dos diversos íons e o número de moles de nitrogênio; a segunda mostra a composição do meio concentrado. Antes de ser usado o meio é diluído até a concentração de nitrogênio desejada para o experimento.

A baixa concentração de sódio do meio mineral é devido ao controle de pH feito com hidróxido de sódio, que adiciona íons Na^+ no meio fermentativo, elevando sua concentração a níveis suficientes. Isso significa, para o meio mineral de amônia desenvolvido, uma adição de 7,9 mmol Na^+/l de meio ($1,99\text{E}-3$ mol $\text{Na}^+/\text{mol N}$).

A concentração de nitrogênio no meio desenvolvido está apta a render uma concentração de células no fermentador de 70 g/l, considerando um fator de conversão de nitrogênio em células de 175 g células/mol N. Portanto, mais que o suficiente para propósitos práticos.

Embora possa parecer que as concentrações de fosfato e cloreto excedam os mencionados por Whittenbury como valores críticos, deve ser considerado que a concentração no meio fermentativo não é a mesma do meio mineral de alimentação para o processo contínuo. Como exemplo, consideraremos o caso mais crítico da concentração de fosfato.

íon	meio mineral com amônia e nitrato		meio mineral com amônia	
	mol/mol N	mmol/l (máx.)	mmol/mol N	mmol/l (máx.)
NO ₃ ⁻	0,530	442	0	0
PO ₄ ⁻	0,137	114	0,313	125
SO ₄ ⁻	0,281	234	0,503	201
Cl ⁻	0,108	89,8	0,0763	30,5
NH ₄ ⁺	0,470	392	1,00	400
Mg ⁺⁺	0,0469	39,1	0,0508	20,3
K ⁺	0,0705	58,8	0,0750	30,0
Ca ⁺⁺	0,0933	77,8	0,0375	15,0
Na ⁺	0,0683E-3	0,0570	0,0743E-3	0,0297
Fe ⁺⁺⁺	0,666E-3	0,555	0,723E-3	0,289
Cu ⁺⁺	0,313E-3	0,261	0,340E-3	0,136
Ni ⁺⁺	1,94E-6	1,62E-3	2,10E-6	0,841E-3
Mn ⁺⁺	4,80E-6	4,00E-3	5,05E-6	2,02E-3
Co ⁺⁺	19,5E-6	16,3E-3	21,0E-6	8,41E-3
Zn ⁺⁺	64,1E-6	53,5E-3	69,8E-6	27,9E-3
B ⁺⁺⁺	6,73E-6	5,62E-3	10,5E-6	4,21E-3
Mo ⁺⁷	52,5E-6	43,7E-3	74,3E-6	29,7E-3

Tabela (A.1) - Composição dos meios minerais.

Em fermentador de mistura contínuo, pode-se escrever para o estado estacionário que:

$$(C_{Pf}-C_P) \cdot Y_{PX} = (C_{Nf}-C_N) \cdot Y_{NX}$$

Na equação Y_{PX} e Y_{NX} são os fatores de conversão de, respectivamente, fósforo e nitrogênio em células [mol/mol], C_P e C_N são as concentrações de íons fosfato e íons amônio [mol/l], e C_{Pf} e C_{Nf} são as concentrações de íons fosfato e íons amônio da alimentação [mol/l].

Como o nitrogênio é o nutriente limitante, a concentração de nitrogênio no meio fermentativo é pequena quando comparada com a concentração de nitrogênio da alimentação. Assim, pode-se reescrever a equação apresentada na forma:

$$\frac{C_P}{C_{NF}} = 1 - \frac{Y_{NX} \cdot C_{NF}}{Y_{PX} \cdot C_{PF}}$$

Considerando $Y_{NX} = 4$ moles de células¹/mol N e $Y_{PX} = 17$ moles de células/mol N, a concentração de fosfato no meio fermentativo será de aproximadamente 25 % da concentração de fosfato no meio mineral de alimentação.

Em alguns experimentos preliminares foram utilizados o meio mineral com citrato (1,7 g/l) como agente complexante. Obviamente, a concentração de sulfato não é a mesma da apresentada na Tabela (A.1), uma vez que utilizou-se uma quantidade menor de ácido sulfúrico.

Para futuros desenvolvimentos do meio mineral sugere-se testar a utilização de uréia como fonte de nitrogênio. Esta teria a vantagem de ser neutra e, conseqüentemente, não haveria necessidade de adição de ânions, além da facilidade na purificação das células no que tange à possíveis contaminações por íons.

¹relativo à um mol de carbono.

Apêndice B

Resultados Experimentais do Estado Estacionário

velocidade de diluição (h ⁻¹)	concentração de células secas (g/l)	concentração de nitrogênio no meio fermentativo (mmol/l)	fração mássica de nitrogênio na célula calculada via balanço de massa (%)	concentração de nitrogênio total no meio fermentativo, obtido por Kjeldahl (g/l)	fração mássica de nitrogênio na célula obtida via medida direta (%)	fator de conversão de nitrogênio em células secas (g/mol)
0,010	6,30	0	5,56			252,0
0,036	6,20	0	5,65	0,350	5,65	248,0
0,056	5,50	0	6,36	0,349	6,35	220,0
0,071	4,80	0	7,29			192,0
0,079	5,13	0	6,82	0,349	6,80	205,2
0,083	4,45	0	7,87			178,0
0,084	4,30	0	8,14			172,0
0,085	4,40	0	7,95			176,0
0,087	4,10	0	8,54			164,0
0,093	3,90	0	8,97			156,0
0,100	4,44	0	7,88	0,351	7,91	177,6
0,139	3,70	0	9,46			148,0
0,144	3,92	0	8,93	0,347	8,85	156,8
0,164	3,80	0	9,21	0,350	9,21	152,0
0,190	3,70	0	9,46	0,345	9,32	148,0
0,210	3,68	0	9,51	0,349	9,48	147,2
0,214	3,65	0	9,59			146,0
0,218	3,45	0	10,14	0,345	10,00	138,0
0,224	3,57	0,1	9,76			143,4
0,240	2,90	4,0	10,14	0,349	10,10	138,1
0,250	1,51	15,0	9,27	0,354	9,54	151,0
0,255	0,56	21,0	10,00			140,0
0,257	0	25,0		0,351		

velocidade de diluição (h ⁻¹)	concentração de células secas (g/l)	produção de células (g/d)	produtividade e em células (g/l-h)	concentração total de carbono (g/l)	fração mássica de carbono na célula (%)	produção de CO ₂ (mol/d)	consumo de carbono (mol/d)	massa molar das células (g/mol)	fator de conversão de carbono em células (mol/mol)
0,010	6,30	2,65	0,063	3,497	55,51	0,257	0,38	21,62	0,323
0,036	6,20	9,92	0,223	3,199	51,60	0,456	0,88	23,26	0,485
0,056	5,50	14,74	0,308	2,907	52,85	0,593	1,24	22,71	0,524
0,071	4,80	16,49	0,341						
0,079	5,13	19,44	0,405	2,801	54,60	0,869	1,75	21,98	0,505
0,083	4,45	20,47	0,369						
0,084	4,30	18,58	0,361						
0,085	4,40	19,04	0,374						
0,087	4,10	17,92	0,357						
0,093	3,90	17,94	0,363						
0,100	4,44	20,20	0,444						
0,139	3,70	25,38	0,514						
0,144	3,92	27,51	0,565	2,011	51,30	1,157	2,33	23,39	0,505
0,164	3,80	29,9	0,623	1,930	50,79	1,243	2,51	23,63	0,504
0,190	3,70	33,63	0,703						
0,210	3,68	37,43	0,773						
0,214	3,65	37,5	0,781						
0,218	3,45	36,1	0,752	1,639	47,51	1,303	2,73	25,26	0,524
0,224	3,57	38,4	0,800						
0,240	2,90	33,21	0,696	1,409	48,59	1,229	2,57	24,70	0,523
0,250	1,51	17,95	0,378	0,702	46,49	0,884	1,58	25,81	0,440
0,255	0,56	6,58	0,143	0,273	48,75	0,324	0,59	24,62	0,453
0,257	0	0	0,000			0	0,00		

Apêndice C

Resultados Experimentais dos Testes de Pulso

tempo (h)	absorbância (620 nm) do meio fermentativo diluído 25 vezes	concentração de amônia do meio fermentativo (mmol/l)	concentração de nitrato do meio fermentativo (mmol/l)	concentração de nitrito do meio fermentativo (mmol/l)
0	0,2076	21,7	0	0
0,25		21,5	0,02	0,141
0,50		17,7	0,07	0,148
0,75		18,0	0,21	0,107
1,0	0,1898	19,0	0,51	0,048
1,25		17,3	0,57	0,020
1,58		15,7	0,68	0,044
2,0	0,1675	16,2	1,22	0,022
3,0	0,1612	14,9	2,25	0
4,0	0,1643	9,5	2,89	0
4,5		4,4	2,65	0
5,0	0,1726	2,4	3,43	0
5,5		0	3,09	0,007
6,0	0,1871	0	3,29	0,006
6,5		0	1,61	0,252
7,0	0,1918	0	0	0,456
8,0	0,2020	0	0	0
velocidade de diluição ($t=0-$) = $0,083 \text{ h}^{-1}$ volume do fermentador ($t=0-$) = $2,3 \text{ l}$ concentração de células secas ($t=0+$) = $4,3 \text{ g/l}$ volume do pulso = 125 ml de meio ($C_{\text{NH}_3}=0,4 \text{ M}$).				

tempo (h)	absorbância (620 nm) do meio fermentativo diluído 25 vezes	concentração de amônia do meio fermentativo (mmol/l)	concentração de nitrato do meio fermentativo (mmol/l)	concentração de nitrito do meio fermentativo (mmol/l)
0	0,2159	19,1	0,17	0
0,5	0,2076	17,3	0,20	0,167
1,5	0,2041	14,2	0,39	0,125
2,0	0,1898	10,1	0,86	0,105
3,0	0,1871	8,5	1,66	0,071
4,0	0,1938	2,2	2,04	0,083
5,0	0,2020	0	1,77	0,106
5,5		0	0,25	0,244
6,25	0,2197	0	0,04	0,018
8,0	0,2291	0	0,24	0,012

velocidade de diluição ($t=0-$) = $0,085 \text{ h}^{-1}$

volume do fermentador ($t=0-$) = 2,1 l

concentração de células secas ($t=0+$) = 4,3 g/l

volume do pulso = 100 ml de meio ($C_{\text{NH}_3}=0,4 \text{ M}$).

tempo (h)	absorbância (620 nm) do meio fermentativo diluído 25 vezes	concentração de amônia do meio fermentativo (mmol/l)	concentração de nitrato do meio fermentativo (mmol/l)	concentração de nitrito do meio fermentativo (mmol/l)
0	0,1964	14,3	0	0
0,5	0,1805	11,1	0,01	0,170
1,5	0,1612	7,2	0,69	0,055
2,75	0,1518	3,6	1,00	0,059
3,75	0,1580	1,9	1,40	0,024
4,75	0,1694	0,97	1,48	0,061
6,5	0,1805	0,14	0	0,190
7,5	0,1959	0,16	0,31	0
velocidade de diluição ($t=0-$) = $0,087 \text{ h}^{-1}$ volume do fermentador ($t=0-$) = 2,1 l concentração de células secas ($t=0+$) = 4,2 g/l volume do pulso = 75 ml de meio ($C_{\text{NH}_3}=0,4 \text{ M}$).				

Apêndice D

Programa de Estimação de Parâmetros e Simulação

Tendo em vista a necessidade de estimação de parâmetros, e não havendo disponibilidade de nenhum programa que atendesse às necessidades do trabalho, foi desenvolvido um conjunto de programas que auxiliaram na tarefa da estimação e visualização dos resultados, principalmente quando do desenvolvimento do modelo de assimilação e dissimilação da fonte de nitrogênio.

Uma das principais características do aplicativo, desenvolvido para DOS em linguagem C, e que não era atendida nos processos de estimação de parâmetros clássicos disponíveis, é a montagem da Função Objetivo (Equação (7.46)) que norteia a busca dos parâmetros. No caso específico desse trabalho, o programa, no cálculo do valor da Função Objetivo, faz a integração das equações diferenciais envolvidas no modelo para as concentrações de células, amônia, nitrato e nitrito. Porém, a integração do conjunto das variáveis dinâmicas é realizada para os diversos conjuntos de resultados experimentais dinâmicos fornecidos pelo usuário, que normalmente têm valores iniciais diferentes.

A busca do mínimo da Função Objetivo é realizada utilizando o algoritmo de Nelder com pequenas modificações do que o apresentado por Himmelblau (1970). Este método se baseia na montagem, no espaço gerado pelos parâmetros, de poliedros flexíveis, conhecidos como SIMPLEX. Este método foi escolhido por não envolver derivadas e, praticamente, garantir a convergência para um ponto de mínimo. O interesse principal foi, então, robustez e não velocidade.

A Figura (D.1) apresenta os diversos módulos desenvolvidos no aplicativo e suas interações. As principais realizações de cada módulo são apresentadas a seguir.

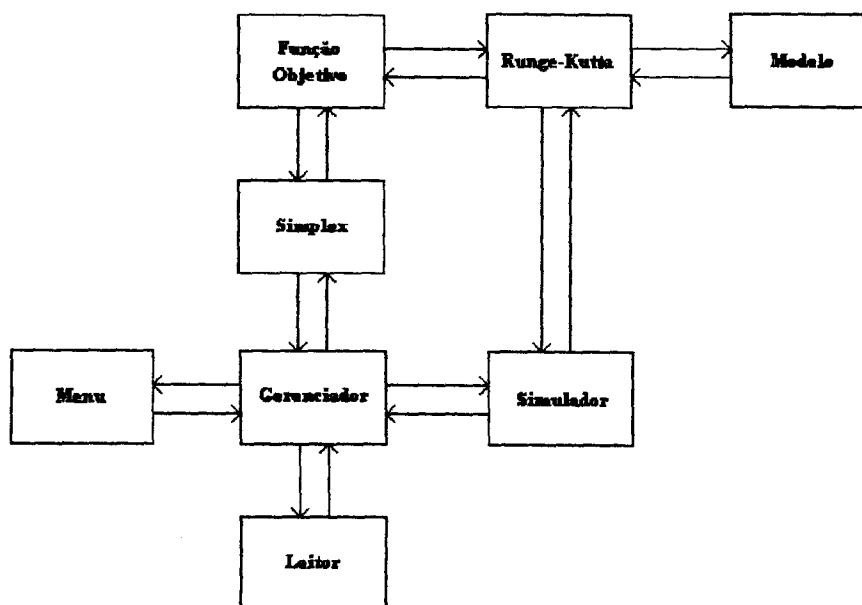


Figura (D.1) - Módulos desenvolvidos no aplicativo para estimação de parâmetros e visualização, e suas interações.

Gerenciador

Gerencia a aplicação, recebe e apresenta o resultado final da estimação de parâmetros.

Menu

É a interface com o usuário onde este dirige o aplicativo. O usuário pode definir o objetivo do problema: estimação ou simulação, bem como parar o programa ou modificar as principais variáveis do sistema, como vértice inicial do poliedro, nome do arquivo onde os dados experimentais estão armazenados, pesos das variáveis envolvidas, tolerância para o critério de parada do Simplex e para o critério de divisão de passo do Runge-Kutta, etc..

Leitor

Lê o arquivo de dados experimentais (dinâmicos de pulso) especificado pelo usuário em **Menu**. Organiza esses dados, calculando o número de experimentos e o número de dados experimentais em cada um deles.

Simulador

Simula o modelo utilizando os parâmetros estimados ou os parâmetros especificados pelo usuário em **Menu**. Apresenta os resultados da simulação através de uma interface gráfica, juntamente com o conjunto de resultados experimentais especificados pelo usuário.

Simplex

Cria o poliedro regular inicial a partir de um ponto no espaço de parâmetros e a distância entre os vértices (sugerido pelo usuário em **Menu**); realiza o algoritmo de Nelder para a busca de novos parâmetros e, também, testa a convergência definida pelo usuário.

Função Objetivo

Recebe do **Simplex** o vetor de parâmetros a ser testado e retorna o valor da função objetivo de acordo com a Equação (7.46).

Runge-Kutta

Realiza a integração com passo variável pelo método de Runge-Kutta 4ª. ordem.

Modelo

É o modelo a ser testado que contém o conjunto de equações diferenciais, devendo ser definido pelo usuário.

O aplicativo mostrou-se eficiente para a obtenção de um número razoavelmente grande de seis parâmetros, utilizando uma função objetivo complexa, pois três conjuntos de resultados experimentais dinâmicos foram envolvidos. O programa apresenta uma razoável interface gráfica que agiliza o trabalho exaustivo de tentativas na busca dos valores dos parâmetros otimizados. O pacote computacional permite, também, diversos testes em tempo de execução, como mudança nos resultados experimentais, pesos para as variáveis dinâmicas, valor inicial do conjunto de parâmetros e tolerâncias.

A maior deficiência do aplicativo, e que deve ser melhorada em futuros desenvolvimentos, é a não possibilidade de testar vários modelos em tempo de execução. Para se testar um modelo novo é necessário reescrever a função do modelo, compilá-la e criar um novo executável.