



Mário Gonçalo Duarte Mouro Franco Teixeira

Licenciado em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Estratégias de alimentação para a optimização do processo de produção de PHAs por via bacteriana

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio,
Professor Auxiliar, DQ-FCTUNL

Júri:

Presidente: Prof^a. Doutora Maria Ascensão Carvalho Fernandes Miranda Reis

Arguente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira

Copyright © Mário Gonçalo Duarte Mouro Franco Teixeira, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química

**Estratégias de alimentação para a optimização do
processo de produção de PHAs por via bacteriana**

Mário Gonçalo Duarte Mouro Franco Teixeira

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador

Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio

Lisboa

Novembro 2011

Agradecimentos

Ao meu orientador, o Professor Doutor Mário Eusébio, queria expressar o meu agradecimento pelo facto de me ter acompanhado e orientado ao longo da elaboração deste trabalho, pela grande disponibilidade e boa vontade com que sempre me recebeu para esclarecimento de dúvidas, amizade e apoio demonstrado.

Um agradecimento para a Joana Pais pela paciência e disponibilidade que demonstrou ao longo de todo o trabalho ajudando com todas as minhas dúvidas.

Um obrigado à Doutora Filomena Freitas pelo aconselhamento e auxílio que prestou no laboratório 610.

Quero agradecer à Professora Doutora Ascensão Miranda Reis por ter permitido a utilização do laboratório 610.

A todos os meus amigos que tive o prazer de conhecer durante o meu percurso académico na FCT/UNL, que me acompanharam ao longo do curso em especial ao Murilo, Sónia, Carolina, Carlos, Ricardo, Alexandra e Cátia pelas conversas, pausas, gargalhadas que me proporcionaram. A todos eles, o meu sincero obrigado.

Por último quero agradecer à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã pelo todo o apoio e compressão que tiveram comigo durante todo o curso. Nos bons e nos maus momentos tiveram sempre uma palavra de incentivo e de coragem.

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de estratégias de alimentação de lactose, presente no soro de leite, para a produção de PHB a partir de uma cultura *Escherichia coli* recombinante.

Foram implementadas no BioCTR, *software* desenvolvido na FCT/UNL, estratégias de controlo de adição de lactose baseadas no valor de pH com adição de amónia quando o pH desce e lactose quando o pH sobe de forma a evitar a ausência prolongada de lactose. Foram realizados 2 ensaios experimentais para estudar a influência da concentração de lactose e dois para estudar a influência do meio de crescimento, MR e LB, na produção de PHB utilizando o BioCTR para controlo e monitorização.

Para concentrações de lactose acima de 20 g/L existe acumulação de ácidos orgânicos e possivelmente inibição da produção de PHB. Conclui-se que é necessário manter a concentração de lactose abaixo das 20 g/L, no entanto, é necessário evitar períodos de ausência de lactose para não desactivar os genes responsáveis pela produção de PHB. Nos dois últimos ensaios manteve-se a concentração abaixo das 10 g/L, evitando ausência de lactose no meio. Conclui-se que a utilização de meio LB permite produzir maiores quantidades de PHB com uma menor quantidade de ácidos orgânicos produzidos.

Foi construído um modelo dinâmico capaz de traduzir a produção de biomassa e PHB e de consumo de lactose e amónia. Foram identificados parâmetros de rendimento de consumo de lactose e de crescimento de biomassa.

Foram aplicadas técnicas de PCA e PLS com os resultados experimentais obtidos. Através da aplicação de PCA foi possível verificar que existem variáveis monitorizadas que possuem comportamentos semelhantes ao longo dos ensaios. Pela aplicação do PLS foi possível estimar as concentrações de lactose e biomassa partindo das variáveis monitorizadas pelo sistema de monitorização e controlo BioCTR.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, PHB, Modelo dinâmico, PCA, PLS, estratégias de alimentação

Abstract

The objective was the development of feeding strategies of lactose, present in cheese whey, for PHB production by recombinant *Escherichia coli* in fed-batch culture.

The control and monitoring strategies were implemented into in-house developed software, BioCTR. The feeding of ammonia and lactose was controlled by the pH value. Ammonia (the nitrogen source) is added when pH decreases and lactose (the carbon source) is added when pH increases. Two experimental assays were done to study the influence of lactose concentration and two other to study the influence of the growth medium, MR and LB, in the PHB production using BioCTR for control and monitoring.

For lactose concentrations higher than 20 g/L there organic acids accumulation and a possible PHB production inhibition were observed. From this, it is possible to conclude that it is necessary to maintain the lactose concentration below 20g/L; at the same time, it is necessary to avoid de absence of lactose to prevent the inactivation of the genes responsible for the PHB production. In the last two experimental studies, the lactose concentration was maintained below 10 g/L and while prevented lack of lactose in the medium. It was verified that using LB medium the production of PHB is higher and the production of organic acids was lower.

It was built a dynamic model capable to describe biomass and PHB production and consumption of lactose and ammonia. It was also identified parameters as yields of consumption of lactose and growth rate of biomass.

Techniques as PCA and PLS were applied to the experimental data. Through PCA application, it was possible to verify that some variables have similar behaviors during all the laboratorial studies. It was possible to estimate biomass and lactose concentrations from the monitored variables registered by monitoring and control software BioCTR by the application of PLS techniques.

Keywords: *Escherichia coli*, PHB, Dynamic Model, PCA, PLS, feeding strategies

Abreviaturas

PHA – Polihidroalcanoato

PHB ou P[3-HB] – Poli (3-Hidroxibutirato) Ou Polihidroxibutirato

PCA – *Principal Components Analysis*

SVD – *Singular Value Decomposition*

OLS – *Ordinary Least-Squares regresssion*

PLS – *Partial Least-Squares regression*

PCR – *Principal Component Regresssion*

ANN – *Artificial Neural Network*

MLR – *Multiple Linear Regression*

NIPALS – *Non-linear Iterative Partial Least Squares*

PRESS – *Predicted Residual Error Sum of Squares*

Índice de matérias

Resumo	ix
Abstract	xi
Abreviaturas	xiii
Índice de matérias	xv
Índice de figuras	xix
Índice de tabelas	xxiii
1. Introdução	1
1.1. Relevância e objectivo do trabalho	1
1.2. Polihidroxibutirato como alternativa aos polímeros sintéticos	1
1.3. Estado da Técnica	4
2. Técnicas de identificação	9
2.1. Análise de dados multivariada	9
2.1.1. Conceitos	9
2.1.2. Variável Linear Latente	11
2.2. Análise de Componentes Principais	14
2.2.1. Aplicações e Objectivos	15
2.3. Calibração Multivariada	15
2.4. Regressão por Mínimos Quadrados	16
2.5. Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos	20
2.5.1. Modelação das taxas de crescimento	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Estratégias aplicadas	25
3.2. Preparação de amostras	26
3.2.1. Crescimento e concentração celular	26
3.2.2. Quantificação de PHB	26
3.2.3. Quantificação de Lactose	26
3.2.4. Quantificação de Ácidos Orgânicos Voláteis	26
3.3. Métodos Analíticos	27
3.3.1. Crescimento e concentração celular	27
3.3.2. Quantificação de PHB	27
3.3.3. Quantificação de Lactose	27
3.3.4. Quantificação de Ácidos Orgânicos Voláteis	28

3.3.5.	Quantificação de Amónia	28
3.3.6.	Determinação do coeficiente de transferência de massa de oxigénio	28
3.4.	Cálculos	28
3.5.	Controlo do Processo biológico em rector	30
3.6.	Culturas.....	30
3.7.	Monitorização do processo	30
4.	Resultados e Discussão	33
4.1.	Aplicação experimental de diferentes estratégias de alimentação	33
4.1.1.	Estratégia 1: Alimentação com soro de leite por pulsos	33
4.1.2.	Estratégia 2: alimentação de soro de leite por uma estratégia mista de pulsos e em contínuo	36
4.1.3.	Estratégia 3: alimentação de fonte de carbono comercial com base no valor de pH usando meio de cultura MR.	42
4.1.4.	Estratégia 4: alimentação de fonte de carbono comercial com base no valor de pH usando meio de cultura LB	46
4.2.	Determinação experimental do coeficiente de transferência de massa de oxigénio	51
4.3.	Modelo dinâmico.....	53
4.3.1.	Abordagem sem ajuste dos parâmetros cinéticos	55
4.3.2.	Abordagem com ajuste dos parâmetros entre cada pulso.....	57
4.3.3.	Abordagem com ajuste de todos parâmetros por meio de um algoritmo de optimização não linear.....	59
4.4.	Análise de Componentes Principais	61
4.4.1.	Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 1	61
4.4.2.	Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 2	63
4.4.3.	Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 3	65
4.4.4.	Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 4	67
4.4.5.	Aplicação do PCA aos resultados experimentais de todas as estratégias.....	69
4.5.	Regressão Linear por Mínimos Quadrados	71
4.5.1.	Aplicação do PLS aos resultados experimentais da estratégia 1	72
4.5.2.	Aplicação da PLS aos resultados experimentais da estratégia 2	75
5.	Conclusões	79
6.	Bibliografia	83
A.	Listagem dos resultados experimentais e cálculo dos parâmetros cinéticos.....	I
B.	Cálculo do valor de K_S e K_N usando os resultados experimentais	XV
C.	Curvas da saturação de oxigénio para diferentes velocidades de agitação	XVII

D. Demonstração e dedução do modelo dinâmico apresentado para a produção de PHB por meio de uma cultura <i>Escherichia Coli</i> recombinante	XIX
--	-----

Índice de figuras

Figura 1-1 – Formula e estrutura molecular do PHA (Serafim, et al., 2003)	2
Figura 1-2 – Esquema metabólico simplificado da biossíntese da PHB a partir da <i>Escherichia Coli recombinante</i> usando como fonte de carbono glucose(Sang Yup Lee, et al., 2005)	6
Figura 1-3 – Caminho metabólico simplificado para a produção PHB a partir de soro de leite (Koller, et al., 2007).	7
Figura 2-1 – Variável Linear Latente(Gasteiger, 2003)	12
Figura 2-2 – Projecção de um vector característico que define uma variável latente(Gasteiger, 2003)	13
Figura 2-3 – Projecção no plano resulta em 2 gráficos: um dos scores outro dos <i>loadings</i> (Gasteiger, 2003).....	14
Figura 3-1 – BioCTR: editor de sequências para programação dos algoritmos de controlo .	31
Figura 3-2 – BioCTR: Painel de Controlo do processo de fermentação.....	31
Figura 3-3 – BioCTR: Painel de Monitorização das variáveis do processo.....	32
Figura 3-4 – BioCTR: exemplo de monitorização onde se ilustra a adição de um pulso de lactose devido à subida do valor de pH.....	32
Figura 4-1 – Estratégia 1: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa experimental ao longo do tempo.....	33
Figura 4-2 – Estratégia 1: Concentração de lactose e variação do pH <i>online</i> ao longo do tempo.....	34
Figura 4-3 – Estratégia 1: Concentração e velocidade de consumo de lactose e variação do pO ₂ <i>online</i> ao longo do tempo.....	34
Figura 4-4 – Estratégia 1: Concentração de lactose e a variação da percentagem de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento <i>online</i> (%O ₂ /ar).....	35
Figura 4-5 – Estratégia 1: Pressão de oxigénio (pO ₂), de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigénio (%O ₂ /ar) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo.....	36
Figura 4-6 – Estratégia 2: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa ao longo do tempo.....	37
Figura 4-7 – Estratégia 2: Concentração de lactose e variação do pH <i>online</i> ao longo do tempo.....	38
Figura 4-8 – Estratégia 2: Concentração de lactose e variação do pO ₂ <i>online</i> ao longo do tempo.....	38
Figura 4-9 – Estratégia 2: Concentração de lactose e a variação da percentagem de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento <i>online</i> (%O ₂ /ar).....	39

Figura 4-10 – Estratégia 2: Pressão de oxigénio (pO_2), de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigénio ($\%O_2/ar$) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo.....	39
Figura 4-11 – Estratégia 2: Concentração de amónia, biomassa activa e PHB ao longo do tempo.....	40
Figura 4-12 – Estratégia 2: Concentração de biomassa activa (X), PHB (no topo) e ácidos orgânicos (na base) ao longo do tempo	41
Figura 4-13 – Estratégia 2: Concentração de biomassa activa (X) e Piruvato e %PHB ao longo do tempo.....	42
Figura 4-14 – Estratégia 3: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa ao longo do tempo.....	42
Figura 4-15 – Estratégia 3: Concentração de lactose e variação do pH <i>online</i> ao longo do tempo.....	43
Figura 4-16 – Estratégia 3: Pressão de oxigénio (pO_2), de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigénio ($\%O_2/ar$) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo.....	44
Figura 4-17 – Estratégia 3: Concentração de amónia, biomassa activa e PHB ao longo do tempo.....	44
Figura 4-18 – Estratégia 3: Concentração de biomassa activa (X), PHB (no topo) e ácidos orgânicos (na base) ao longo do tempo	45
Figura 4-19 – Estratégia 3: Concentração de biomassa activa (X),formato e %PHB ao longo do tempo.....	46
Figura 4-20 – Estratégia 4: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa ao longo do tempo.....	47
Figura 4-21 – Estratégia 4: Concentração de lactose e variação do pH <i>online</i> ao longo do tempo.....	47
Figura 4-22 – Estratégia 4: Pressão de oxigénio (pO_2), de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigénio ($\%O_2/ar$) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo.....	48
Figura 4-23 – Estratégia 4: Concentração de biomassa activa (X), PHB (no topo) e ácidos orgânicos (na base) ao longo do tempo	49
Figura 4-24 – Estratégia 4: Concentração de biomassa activa (X),piruvato, formato e %PHB ao longo do tempo.....	50
Figura 4-25 – Concentração de saturação Oxigénio Dissolvido em água em função da temperatura (Fonte: http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms52.cfm)	51
Figura 4-26 – Ensaio de determinação do coeficiente de transferência de massa em diferentes velocidades.	52

Figura 4-27 – Coeficiente de transferência de massa em função da velocidade de agitação para o regime de funcionamento das estratégias	52
Figura 4-28 – Comparação entre os resultados obtidos pelo modelo e os resultados experimentais para a estratégia 1.	56
Figura 4-29 – Comparação dos resultados obtidos por ajuste dos parâmetros pulso a pulso com os resultados experimentais da estratégia 1	58
Figura 4-30 – Comparação entre os resultados obtidos pelo ajuste dos parâmetros através algoritmo de otimização não linear e os resultados experimentais obtidos para a estratégia 2.....	60
Figura 4-31 – Estratégia 1: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais	62
Figura 4-32 – Estratégia 1: Representação dos <i>loadings</i> (a) e <i>scores</i> (b).....	63
Figura 4-33 – Estratégia 2: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais	64
Figura 4-34 – Estratégia 2: Representação dos <i>loadings</i> (a) e <i>scores</i> (b).....	65
Figura 4-35 – Estratégia 3: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais	66
Figura 4-36 – Estratégia 3: Representação dos <i>loadings</i> (a) e <i>scores</i> (b).....	67
Figura 4-37 – Estratégia 4: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais	68
Figura 4-38 – Estratégia 4: Representação dos <i>loadings</i> (a) e <i>scores</i> (b).....	69
Figura 4-39 – Todas as estratégias: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais	70
Figura 4-40 – Todas as estratégias: Representação dos <i>loadings</i> (a) e <i>scores</i> (b).....	71
Figura 4-41 – Estratégia 1: PRESS em função do número de componentes PLS	73
Figura 4-42 – Estratégia 1: Resposta Ajustada/Observada de biomassa e da lactose	74
Figura 4-43 – Estratégia 1: Parcimónia	74
Figura 4-44 – Estratégia 2: PRESS em função do número de componentes PLS	75
Figura 4-45 – Estratégia 2: Resposta Ajustada/Observada de biomassa e da lactose	76
Figura 4-46 – Estratégia 2: Parcimónia	76
Figura 4-47 – PRESS do conjunto de treino em função do número de componentes PLS... ..	77
Figura 4-48 – Resposta Ajustada/Observada de biomassa e da lactose pelo conjunto de validação para os resultados obtidos na estratégia 2	78
Figura A-1 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 1	III
Figura A-2 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 2	VII
Figura A-3 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 3	XI
Figura A-4 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 4	XIV

Figura B-1 – Determinação da constante de saturação de lactose	XV
Figura B-2 – Determinação da constante de saturação de amónia.....	XV
Figura C-1 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 200rpm.....	XVII
Figura C-2 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 300rpm.....	XVII
Figura C-3 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 600rpm.....	XVII
Figura C-4 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 700rpm.....	XVIII
Figura C-5 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 900rpm.....	XVIII
Figura C-6 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 1000rpm	XVIII

Índice de tabelas

Tabela 2-1 – Tabela resumo do algoritmo de aplicação da técnica PLS (Gasteiger, 2003)..	19
Tabela 2-2 – Tipos de funcionamento de um reactor biológico	23
Tabela 3-1 – Resumo das estratégias de alimentação e arejamento utilizadas nos ensaios experimentais	25
Tabela 4-1 – Parâmetros cinéticos calculados a partir dos resultados experimentais.....	50
Tabela 4-2 – Parâmetros utilizados no modelo de simulação	55
Tabela 4-3 – Parâmetros e condições de operação utilizadas no ajuste pulso a pulso.....	57
Tabela 4-4 – Resultados obtidos para os parâmetros cinéticos ajustados pulso a pulso.....	58
Tabela 4-5 – Parâmetros e condições de operação utilizadas no ajuste por optimização não linear	59
Tabela 4-6 – Resultados obtidos para os parâmetros cinéticos ajustados por optimização não linear.....	59
Tabela 4-7 – Estratégia 1: Variância explicada e acumulada para os resultados experimentais da Estratégia 1	62
Tabela 4-8 – Estratégia 2: Variância explicada e acumulada	63
Tabela 4-9 – Estratégia 3: Variância explicada e acumulada	65
Tabela 4-10 – Estratégia 4: Variância explicada e acumulada	67
Tabela 4-11 – Todas as estratégias: Variância explicada e acumulada	69
Tabela A-1 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 1 (Parte 1).....	I
Tabela A-2 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 1 (Parte 2).....	II
Tabela A-3 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 1	II
Tabela A-4 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB, CDW e biomassa activa relativos à estratégia 1	III
Tabela A-5 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 1	III
Tabela A-6 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR à da estratégia 2 (Parte 1)	IV
Tabela A-7 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR à da estratégia 2 (Parte 2)	V
Tabela A-8 – Valores de concentração de lactose relativos à estratégia 2.....	5
Tabela A-9 – Valores de concentração de amónia relativos à estratégia 2	VI
Tabela A-10 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 2	VI

Tabela A-11 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB,CDW e biomassa activa relativos à estratégia 2.....	VII
Tabela A-12 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 2.....	VII
Tabela A-13 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 3 (Parte 1).....	VIII
Tabela A-14 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 3 (Parte 2).....	IX
Tabela A-15 – Valores de concentração de amónia relativos à estratégia 3	X
Tabela A-16 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 3	10
Tabela A-17 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB,CDW e biomassa activa relativos à estratégia 3.....	XI
Tabela A-18 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 3.....	XI
Tabela A-19 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 4	XII
Tabela A-20 – Valores de concentração de amónia relativos à estratégia 4	XIII
Tabela A-21 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 4	XIII
Tabela A-22 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB,CDW e biomassa activa relativos à estratégia 4.....	XIV
Tabela A-23 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 4.....	XIV

1. Introdução

1.1. Relevância e objectivo do trabalho

O crescente interesse da aplicação de bioplásticos em áreas diversas quer na indústria alimentar ou em medicina, aliado com uma maior consciência ambiental tem aumentado o nível de investimento em investigação para ultrapassar o maior obstáculo dos bioplásticos face aos plásticos de origem petroquímica que são os elevados custos de produção. Estes custos estão associados em grande parte ao elevado preço da fonte de carbono e às condições de operação.

Para diminuir os custos associados à fonte de carbono tem vindo a ser testadas fontes alternativas e renováveis, como é exemplo o soro de leite. Soro de leite é o principal subproduto do fabrico do queijo e representa 85-95% do leite transformado. Estes meios são complexos e para além conter a fonte de carbono possui outros compostos com que fazem variar a composição.

Devido à complexidade dos sistemas biológicos, nomeadamente das vias metabólicas presentes nos organismos produtores, é necessário desenvolver metodologias que permitam estimar parâmetros e propriedades a partir de variáveis obtidas por sensores *online* para otimizar a produção diminuindo assim os custos de produção. A aplicação destas metodologias permite evitar gastos em análises quantitativas de biomassa, lactose e PHB presente no caldo fermentativo.

Este trabalho surge da necessidade de criar metodologias e estratégias de alimentação que permitam otimizar a produção de polihidroxibutirato (PHB) a partir de uma cultura de *Escherichia coli* recombinante.

1.2. Polihidroxibutirato como alternativa aos polímeros sintéticos

Plásticos de consumo quotidiano são muito utilizados pois são muito moldáveis, versáteis na sua aplicação e possuem um baixo custo para além de terem uma vida útil muito longa. Devido à sua aplicação em grande escala tem-se revelado ser um grave problema ambiental. Como resposta à uma crescente preocupação ambiental devido aos problemas causados pela produção e acumulação de resíduos plásticos de origem petroquímica bem como cada vez maior escassez de fontes de combustíveis fósseis, muitos países iniciaram planos para diminuir esta quantidade de resíduos e iniciaram projectos de investigação de polímeros biodegradáveis a partir de fontes renováveis de carbono. Estes novos polímeros biodegradáveis devem possuir propriedades semelhantes aos polímeros de

origem petroquímica e serem completamente e rapidamente degradados pelo meio ambiente (Sang Yup Lee, 1996).

No mercado existem diversos tipos de polímeros biodegradáveis, como por exemplo polihidroxialcanoatos (PHA), polilactato (PLA) e poliglicolatos (PGA) (Serafim, Lemos, & Reis, 2003).

Os polihidroalcanoatos (PHA) são poliésteres sintetizados por inúmeras bactérias e armazenados como reserva energética. Os PHAs são os mais fortes candidatos a substituir os polímeros de origem sintética. Estes apresentam propriedades semelhantes a muitos dos plásticos utilizados no quotidiano (caso do polipropileno e de borrachas sintéticas) e apresentam a vantagem de quando degradados libertam dióxido de carbono e água (Fonseca, 2003).

Na Figura 1-1 estão representadas os vários tipos de PHAs existentes pela sua fórmula e estrutura molecular. Dos diversos PHAs existentes, o mais conhecido e caracterizado é o poli (3-hidroxi butirato) ou polihidroxi butirato (P[3-HB] ou PHB).

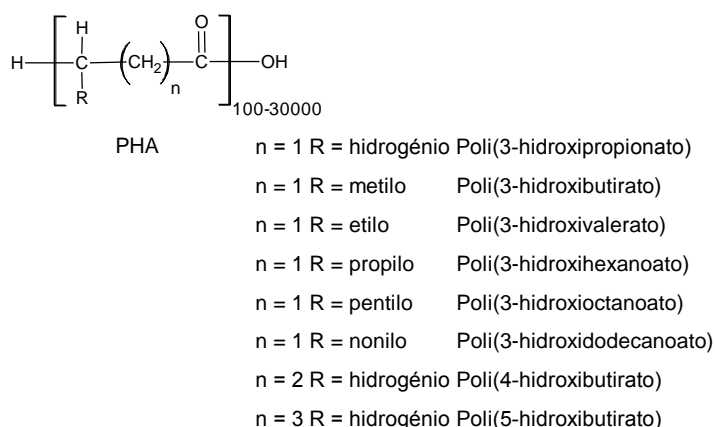


Figura 1-1 – Formula e estrutura molecular do PHA (Serafim, et al., 2003)

As propriedades e características presentes no PHB são semelhantes às do polipropileno: é um termoplástico, biodegradável, pode ser produzido a partir de recursos renováveis, não tóxico, possui elevado grau de polimerização, insolúvel em água, altamente cristalino se for extraído do seu ambiente natural, opticamente activo, isotático (i.e., regularidade esteroquímica das unidades repetidas) e por fim piezoeléctrico (i.e a capacidade de gerar corrente eléctrica como resposta de uma pressão mecânica) (Steinbüchel & Fuchtenbusch, 1998).

Os PHAs apresentam vantagens a nível ambiental faces aos plásticos de origem petroquímica, mas maior obstáculo da massificação continua a ser o elevado custo de produção. Estes custos estão associados às necessidades e exigências nutricionais dos microrganismos produtores. Para uma aplicação bem-sucedida de um sistema de produção

de PHAs é necessário a implementação de condições óptimas para efectuar a fermentação (Fonseca, 2003; Serafim, et al., 2003). O substrato, principalmente a fonte de carbono, é o composto que mais contribui para o custo total da produção de PHAs. Uma avaliação económica do processo de produção de PHB concluiu que as fontes de carbono representam 40% do custo total da produção (Choi & Lee, 1999). Estes custos elevados depois reflectem-se no preço final do PHAs. Um quilo de PHB custa entre 15-30 dólares comparado com o polipropileno que custa 0.70 dólares por quilo (Khanna & Srivastava, 2007).

Tem vindo a ser feitos estudos sob a utilização de fontes de carbono renováveis, tais como, o amido e soro de leite. Amido é uma fonte renovável de carbono disponível em grandes quantidades. Antes de se efectuar a fermentação, é necessário hidrolisar para glucose e este processo requiere 2 passos: liquefacção e sacarificação (Choi & Lee, 1999). A utilização deste substrato tem-se obtido resultados interessantes (Fonseca, 2003).

Outra fonte renovável de carbono que tem vindo a ser utilizada é soro de leite. Soro de leite é o principal subproduto do fabrico do queijo e da caseína de leite. O soro de leite representa 85-95% do leite transformado. O soro de leite possui 55% dos nutrientes presentes no leite, entre eles inclui-se a lactose (4.5 – 5% w/v), lípidos (0.4 – 0.5% w/v) e sais minerais tais como NaCl e KCl (Siso, 1996). Já foram feitos vários estudos utilizando esta fonte de carbono renovável e recorrendo a diferentes modificações genéticas feitas à *Escherichia coli* recombinante (S.Y. Lee, Middelberg, & Lee, 1997).

De modo reduzir os custos, tem sido feita investigação no desenvolvimento de novas linhas de bactérias recombinantes que utilizam fontes de carbono renováveis e as respectivas técnicas de cultivo. Objectivo é substituir os organismos produtores naturais de PHAs. Estes organismos naturais necessitam de longos tempos de replicação, tem temperaturas de cultivo muito limitativas, resistentes à lise e exigem condições limitativas de nutrientes. Microorganismos como a *Escherichia coli* não tem a capacidade de sintetizar e degradar PHAs. No entanto, esta possui um crescimento rápido sob temperatura elevadas (37°C) e são fáceis de fazer a lise permitindo a extracção do polímero armazenado além de ser bom transportador de genes. Com a disponibilidade dos genes necessários à biossíntese de PHAs clonados a partir dos produtores naturais (Fonseca, 2003) tornando possível utilização destes outros microorganismos.

A *Escherichia coli* é muito utilizada como bactéria hospedeira de vectores de clonagem vindos dos produtores naturais. O motivo da sua utilização é por se tratar de um sistema muito bem caracterizado. A *Escherichia coli* apresenta as vantagens, tais como, capacidade de armazenar 80% da sua massa celular seca em PHAs, utilização de fontes de carbono, como a sacarose e a lactose, e fontes renováveis tal como o soro de leite, além de não degradar os PHAs acumulado, produz PHAs desde do início do cultivo e necessitar de

menor um controlo durante o processo pois não existem condições limitativas de modo a induzir a produção (Fonseca, 2003; Sang Yup Lee, 1996; Steinbüchel & Fächtenbusch, 1998).

Pelas razões apresentadas anteriormente, os microorganismos recombinantes tem sido cada vez mais utilizados na produção de bio polímeros e para a expressão dos genes de outros produtos ou caminhos metabólicos de interesse industrial.

O PHB pode ser aplicado em embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosmética e em produtos farmacêuticos. Pode ser aplicado em filmes flexíveis sacos, embalagens para alimentos, filmes agrícolas, produtos de consumo e em produtos injectáveis como talheres e embalagens.

Apresenta a vantagem de ser bio compatível e ser facilmente absorvido pelo organismo o que poderá ser empregue na área da medicina sendo usado como fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que podem libertar gradualmente medicamentos na corrente sanguínea (Coutinho et al., 2004).

1.3. Estado da Técnica

Como já foi referido anteriormente, o desenvolvimento de metodologias é necessário para tornar os processos biotecnológicos mais competitivos de modo a alcançar valores elevados de produtividade com mínimo de custos. Com estes objectivos recorre-se a três abordagens de modo a encontrar uma resposta a este problema: biológica (ou bioquímica), tecnológica e matemática (Ferreira, 1995; Ferreira & Azevedo, 2007).

A aplicação da abordagem biológica (ou bioquímica) tem como objectivo melhorar o desempenho do processo e das próprias enzimas por meio da selecção de microorganismos e meios de cultura ou através de manipulações genéticas. Esta abordagem é o objectivo da Engenharia Genética e da Microbiologia.

Foi revisto por Tian em 2009 vários tipos de microorganismos produtores de PHA, sejam naturais ou recombinantes, culturas puras ou mistas e diversas fontes de carbono. Concluiu que a utilização de *Escherichia coli* K24K consegue atingir elevadas concentrações celulares (70.1 g/L) e uma percentagem elevada de conteúdo em PHAs (72.9%), uma taxa produtividade específica de 30.4 mg/g.h e recorrendo como fonte de carbono o soro de leite (Tian et al., 2009).

Existem várias bactérias que produzem PHAs sem necessidade de efectuar alterações genéticas, muitas vezes designados microorganismos produtores naturais. Foram testados microorganismos produtores naturais de PHAs utilizando como fonte de carbono renovável o soro de leite, com o objectivo de compreender o potencial da sua utilização a

nível industrial. *Haloflex mediterranei* seria uma boa candidata a um estudo mais profundo devido à estabilidade, baixo risco de contaminação e menores custos de esterilização (Koller et al., 2007). Esta bactéria apresentou uma percentagem em conteúdo em PHAs de 50% e uma produtividade específica de 9.1 mg/g.h.

Comparando os microorganismos recombinantes com os produtores naturais é notar que a maior percentagem acumulada em PHAs e maior produtividade foram observados em organismos recombinantes. A utilização destes microorganismos pode apresentar ser uma mais-valia a nível industrial.

Foram feitos estudos com várias estirpes de *Escherichia coli* e várias concentrações de fonte de carbono. S.Y Lee (S.Y. Lee, et al., 1997) concluiu que as estirpes GCSC4401 e GCSC6576 cultivadas em meio R podem produzir e acumular grandes quantidades de PHB com diferentes concentrações de soro de leite utilizadas. O meio R é um meio de cultura apenas contem os compostos necessários para o crescimento celular e produção de PHB, o mesmo que dizer que é um meio específico para este microorganismo. Para as estirpes escolhidas utilizou uma concentração em soro de leite de 30g/L e obteve-se respectivamente 79% e 81% de conteúdo em PHB.

A abordagem tecnológica focaliza-se no desenvolvimento de melhores técnicas, como processos imobilizados, novas concepções de reactores, e condições operacionais, como regimes de funcionamento (contínuo, semi - contínuo e descontínuo). Esta abordagem por vezes vem associada à abordagem matemática. A abordagem matemática recorre à modelação dos processos e à utilização de estratégias de monitorização e controlo dos reactores biológicos.

A aplicação da abordagem tecnológica é o objectivo da Engenharia Biológica/Bioquímica e da abordagem matemática da Engenharia de Sistemas e Processos, Biologia de Sistemas e da Bioinformática.

O cruzamento destas duas abordagens foi feito para analisar diferentes tipos de culturas e reactores através da medição e determinação de variáveis em função da produtividade final. Para fazer esta análise, Glassey e sua equipa recorreram a técnicas de análise de dados multivariada, caso da Análise de Componentes Principais e da Regressão Linear Parcial por Mínimos Quadrados. Aplicação da Análise de Componentes Principais teve objectivo perceber as influências dos meios de cultura e respectivas produtividades na sua aplicação na produção de um antibiótico em escala piloto e industrial. E a aplicação da Regressão Linear Parcial por Mínimos Quadrados testou a possibilidade de partindo das variáveis monitorizadas a previsão da produtividade final do processo. (Cunha, Glassey, Montague, Albert, & Mohan, 2002)

Um modo de compreender a produção de PHB em meio complexos como os meios biológicos é possível pelo estudo das vias metabólicas presentes nos organismos produtores, seja naturais ou recombinantes.

Existem descrições das vias metabólicas para produção de PHB tanto em microorganismos naturais produtores, caso da *Ralstonia eutropha* (Sang Yup Lee, Hong, Park, Wegen, & Middelberg, 2005), como recombinantes, caso da *Escherichia Coli* (Carlson, Wlaschin, & Srienc, 2005; Sang Yup Lee, et al., 2005) representada na Figura 1-2

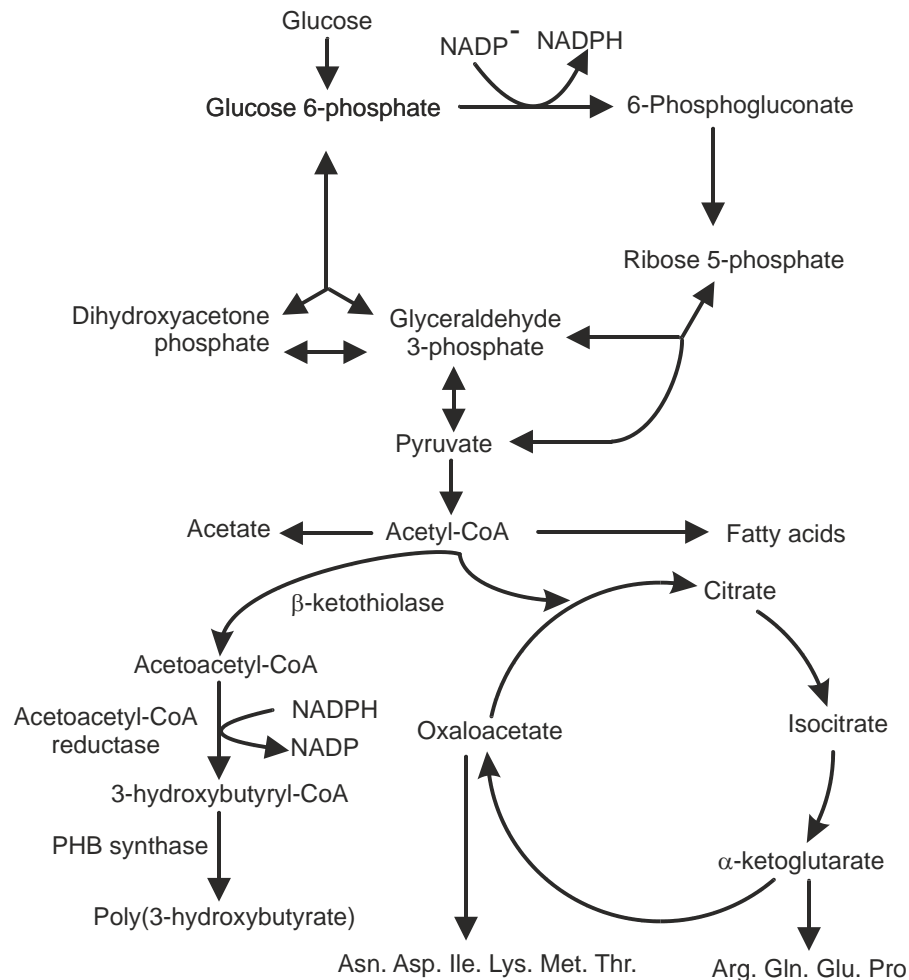


Figura 1-2 – Esquema metabólico simplificado da biossíntese da PHB a partir da *Escherichia Coli recombinante* usando como fonte de carbono glucose(Sang Yup Lee, et al., 2005)

No caso particular do soro de leite, Koller (Koller, et al., 2007) apresenta 3 possíveis rotas para produção de PHA a partir desta fonte de carbono renovável: a conversão directa em PHA que é possível na *Escherichia Coli* recombinante (Figura 1-3), hidrólise da lactose em galactose e glucose (por via química ou enzimática) e depois a conversão em PHA como na *Pseudomonas hydrogenovora* e por fim conversão da lactose em ácido láctico e de seguida PHA comum aos produtores naturais de PHAs.

Este modelo também foi usado no ajuste de parâmetros do modelo para diferentes cenários de concentração de oxigénio dissolvido, com valor constante, variações periódicas de oxigénio e controlo através da concentração de lactato.

Em 2000, Sang Yup Lee e a sua equipa utilizou uma estratégia de alimentação de soro de leite para a produção de PHB partindo de uma cultura de *Escherichia Coli* recombinante baseada no valor de pH. Se o valor de pH no meio subir mais que 0.1 do *set-point* estabelecido (pH=6.95) um volume de lactose é adicionado automaticamente até que a concentração de lactose no meio atinja o valor de 20 g/L. Este volume é calculado pelo *software* de controlo e monitorização do bioreactor, AFS3.42 desenvolvido pela *New Brunswick Scientific Co.* Por observação dos resultados experimentais também conclui que a concentração de oxigénio dissolvido poderá ter influência na produção de PHB. Também foram feitos ensaios com diferentes valores de oxigénio dissolvido e em diferentes fases conclui que quando o valor de *set-point* quando e como é alterado pode ter influencia tanto no crescimento celular como na produção de PHB(Ahn, Park, & Lee, 2000).

A abordagem matemática é utilizada após a concepção e optimização do processo sob o ponto de vista das abordagens biológica e tecnológica. A introdução de melhoramentos no desempenho pela abordagem matemática poderão ser muito relevantes nomeadamente na melhoria da produtividade.

A abordagem biológica (ou bioquímica) pode melhorar significativamente o baixo rendimento na produção de metabolitos secundários. Através da aplicação da engenharia genética poderá introduzir incrementos de 50 vezes dependendo dos processos. A abordagem tecnológica permitirá melhoramentos na ordem dos 50%(Ferreira & Azevedo, 2007).

2. Técnicas de identificação

Nos próximos capítulos serão explicados os conceitos da análise de dados multivariada e de calibração multivariada e a sua aplicação na Análise de Componentes Principais (PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados (PLS) e Modelo Dinâmico Geral de Reactor Biológico.

2.1. Análise de dados multivariada

Em análise de dados multivariada é comum serem referidos termos como objecto, característica e propriedade. Objecto pode ser definido como item real ou abstracto, tipicamente são amostras, estruturas químicas ou processos. Um conjunto de características define um objecto. Característica é uma variável medida ou calculada como por exemplo uma concentração ou valor de pH. A aplicação de métodos estatísticos necessita um número razoável de objectos e de características.

A informação recolhida pode ser condensada numa matriz denominada de \mathbf{X} em que cada linha corresponde a um objecto (n) e cada coluna a uma característica (m). A interpretação geométrica de cada objecto pode ser vista como um ponto ou mesmo um vector usando as características como coordenadas e depois são projectadas num espaço de dimensão m . É aplicada a hipótese de objectos próximos terem algo em comum, por exemplo propriedades físicas.

Adicionalmente uma coluna-y ou matriz-Y pode ter uma ou mais informações referentes a propriedades dos objectos. Uma propriedade pode caracterizar os objectos, apesar de por vezes a sua determinação ser difícil ou indirecta. As propriedades mais comuns são de compostos presentes numa mistura complexa. Aplicação em métodos quimiométricos, usualmente tem como objectivo a previsão de um propriedade-y que é descrita pelas características-x.

2.1.1. Conceitos

A aplicação de transformações matemáticas nos dados das características pode ter uma maior ou menor influência na sua interpretação.

As transformações matemáticas mais utilizadas são a centralização e a transformação. Seja m_j a média e s_j o desvio-padrão ou variância da característica j .

A centralização (Equação 2-1) resulta numa característica cujo valor da média é zero:

$$x_{ij}(\text{centralização}) = x_{ij}(\text{original}) - m_j$$

Equação 2-1

A análise de dados multivariada é usualmente simplificada pela aplicação da transformação de centralização das características. Esta transformação altera o *centróide* dos dados para a origem, como consequência a informação acerca da origem do espaço característico é perdida.

A transformação (Equação 2-2) resulta numa característica padronizada de valor de média zero e desvio-padrão (ou variância) de um, assim todas as características terão igual peso estatístico na sua interpretação.

$$x_{ij}(\text{transformação}) = \frac{[x_{ij}(\text{original}) - m_j]}{s_j}$$

Equação 2-2

Cada característica x_j pode ser descrita pela sua média, m_j (Equação 2-3), e pela sua variância, v_j (Equação 2-4).

$$m_j = \frac{1}{n} \sum x_{ij} \quad (i = 1 \dots n)$$

Equação 2-3

$$v_j = \frac{1}{n-1} \sum (x_{ij} - m_j)^2 \quad (i = 1 \dots n)$$

Equação 2-4

A variância total, v_{total} , é a soma de todas as variâncias de todas as características. O valor da variância pode ser revelador da quantidade de informação traduzida pelos objectos.

A relação entre duas características j e k pode ser descrita pela co-variância c_{jk} (Equação 2-5).

$$c_{jk} = \frac{1}{n-1} \sum (x_{ij} - m_j) \cdot (x_{ik} - m_k) \quad (i = 1 \dots n)$$

Equação 2-5

O coeficiente de correlação (Equação 2-6), r_{jk} , é a co-variância normalizada e independente da padronização feita às características. Varia entre -1 e +1, para variáveis transformadas r_{jk} e c_{jk} são iguais.

$$r_{jk} = \frac{c_{jk}}{s_j s_k}$$

Equação 2-6

As variâncias e co-variâncias de dados multivariável X pode ser condensada na matriz C (Equação 2-7), que é simétrica e com as variâncias na diagonal principal.

$$C = \frac{1}{n-1} \cdot X^T \cdot X$$

Equação 2-7

Características altamente correlacionadas tornam a matriz **C** singular ou quase singular o que torna a sua inversão praticamente impossível. Isto acontece:

- Pelo menos uma característica for proporcional a outra;
- Pelo menos uma característica for combinação linear de outras características;
- Pelo menos uma característica for constante;
- Se o numero de características for superior ao numero de objectos.

Características colineares são muito comuns em Quimiometria, sendo assim é preciso ter em atenção os métodos que não precisam da matriz inversa (**C⁻¹**). Como alternativa, as características originais são inicialmente transformadas em variáveis, não ou pouco correlacionadas, como é caso da Análise de Componentes Principais e na Regressão por Mínimos Quadrados.

A distância entre objectos no espaço pode ser vista como medida da sua similaridade. A distância entre dois objectos é caracterizado pelos vectores **a** e **b** (em cada componente **m**) e pode ser determinada de diferentes modos. Muito frequentemente utiliza-se a distância euclidiana (Equação 2-8).

$$d^2(\text{euclidiana}) = \sum (a_j - b_j)^2 \quad (j = 1 \dots n)$$

$$d^2(\text{euclidiana}) = (a - b)^T (a - b)$$

Equação 2-8

O co-seno do ângulo α entre os vectores objecto (Equação 2-9) pode ser usado como medida de similaridade. Esta medida é independente do tamanho do vector. Esta distância é designada de distância *Mahalanobis*. Sendo assim são considerados os valores relativos das características.

$$\cos \alpha = \frac{a^T \cdot b}{\sqrt{(a^T \cdot a)(b^T \cdot b)}}$$

Equação 2-9

A distância que melhor caracteriza a distribuição espacial dos objectos (que é caracterizada pela matriz co-variância **C**) Esta distância é usada para a classificação de objectos consoante o valor da distância às referências.

2.1.2. Variável Linear Latente

O principal objectivo da análise de dados multivariada é determinar uma combinação formal, seja uma função matemática ou algoritmo mais generalizado, das características definindo novas variáveis, denominadas de variáveis lineares latentes (em inglês *scores*)

que revelam a informação mais relevante do problema. Dependendo do objectivo da análise, diferentes critérios matemáticos podem ser utilizados.

1. Para as componentes principais, o critério aplicado é o máximo de variância das variáveis latentes, fornecendo uma representação das distâncias euclidianas entre objectos.
2. Para uma variável discriminante, a separação entre diferentes objectos é necessária.
3. As variáveis latentes com o valor máximo de correlação a uma propriedade relevante, y , são usadas em calibração multivariável.

Para uma melhor visualização de dados multivariável recorre-se a gráficos de dispersão necessitando pelo menos duas variáveis latentes que correspondem às coordenadas.

Em muitos métodos quimiométricos, as variáveis latentes *lineares* tomam a forma da Equação 2-10:

$$u = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_mx_m = \mathbf{x}^T \mathbf{b}$$

Equação 2-10

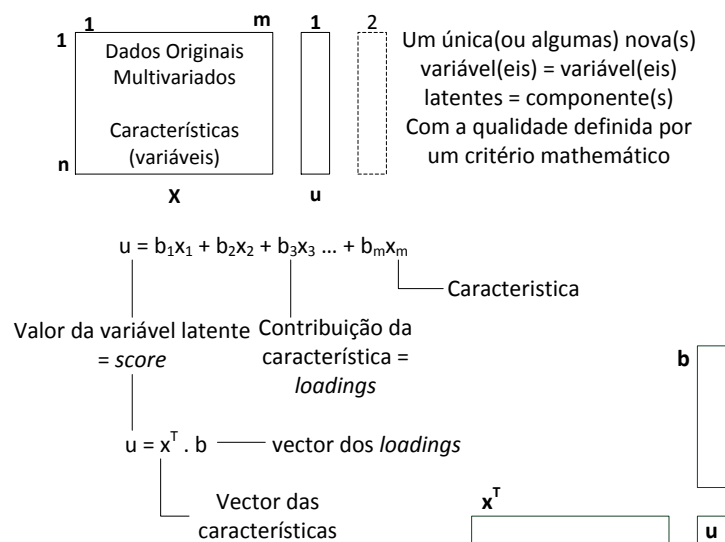


Figura 2-1 – Variável Linear Latente(Gasteiger, 2003)

Os coeficientes das características (em inglês *loadings*) são representados por b_j . Estes descrevem a contribuição individual de cada característica das variáveis latentes.

Os coeficientes das características formam o vector b . A variável latente de um objecto é o produto escalar do vector transposto das características e o vector dos coeficientes das características. O vector dos coeficientes das características é padronizado para tamanho unitário e define a direcção no espaço considerado.

A Figura 2-1 ilustra graficamente o conceito de variável linear latente.

A equação ($u=x^T \cdot b$) descreve a projecção do vector x num eixo definido pelo vector b definido por Equação 2-11 e pela Figura 2-2. O vector das variáveis latentes u para n objectos (definido por X) é:

$$u = X \cdot b$$

Equação 2-11

Caso mais do que uma variável latente seja calculada, o vector dos coeficientes das características forma a matriz B e matriz das variáveis latentes U definida pela Equação 2-12.

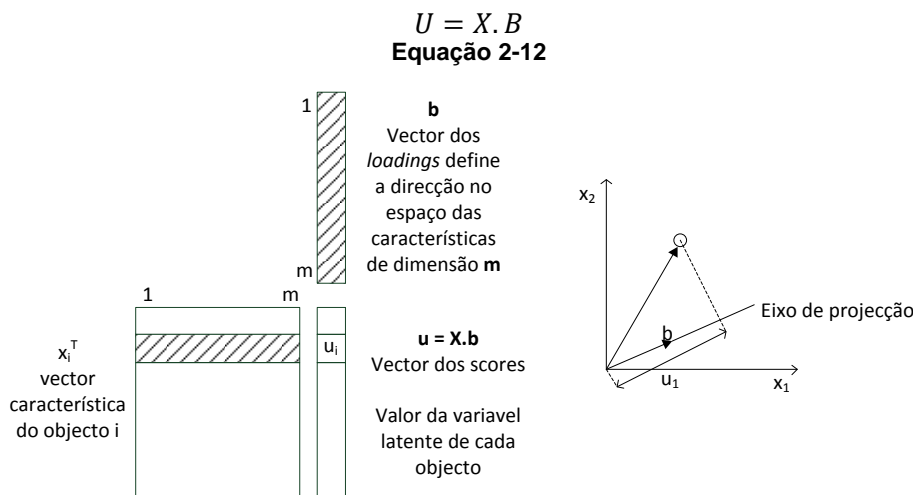


Figura 2-2 – Projecção de um vector característico que define uma variável latente(Gasteiger, 2003)

Em alguns métodos, como é o caso da Análise de Componentes Principais, qualquer par (j,k) do vector dos coeficientes das características é ortogonal, logo B é ortonormado (Equação 2-13).

$$b_j^T \cdot b_k = 0$$

Equação 2-13

Qualquer que seja o par de variáveis latentes define uma projecção de uma característica de dimensão m num plano. O que resulta no gráfico de dispersão que é usualmente mais utilizado para visualizar dados multivariados.

A representação gráfica de duas variáveis latentes em que são usadas como coordenadas e cada ponto que corresponde a um objecto (Figura 2-3). As distâncias entre objectos são aproximações das distâncias num espaço multivariável. Sendo assim os grupos de aglomerados (ou *clusters*) de objectos semelhantes são observados facilmente.

A representação dos coeficientes de duas variáveis latentes em que são usadas como coordenadas cada ponto das características. Este gráfico indica as semelhanças entre as características (Figura 2-3).

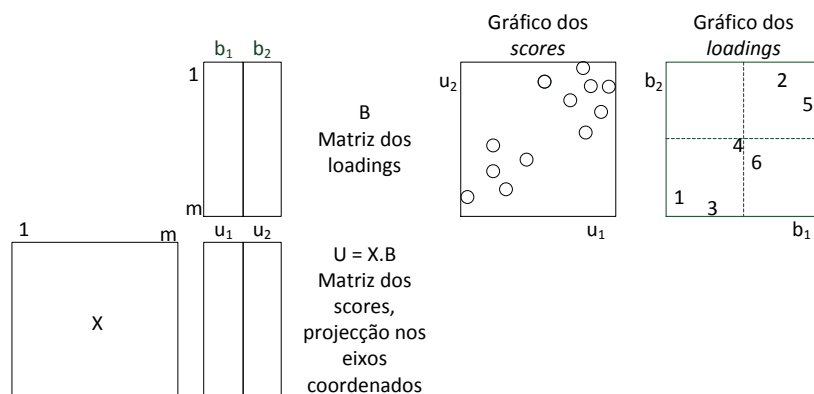


Figura 2-3 – Projecção no plano resulta em 2 gráficos: um dos *scores* outro dos *loadings*(Gasteiger, 2003)

2.2. Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (ou PCA¹), esta técnica de análise exploratória multivariada mais utilizada em Quimiometria. Esta técnica transforma um conjunto de variáveis correlacionadas num conjunto de variáveis independentes, que são combinações lineares das variáveis originais denominadas de componentes principais. A Análise de Componentes Principais pode ser descrita como um método de redução dos dados mas também permite resumir informação de variáveis correlacionadas em uma ou mais combinações linearmente independentes que representem a maioria da informação presente nas variáveis originais.

As componentes principais podem ser utilizadas como indicadores que resumem a informação disponível nas variáveis originais.

Para executar a Análise de Componentes Principais é necessário um procedimento matemático iterativo para a determinação das matrizes de *loadings* e *scores*.

O método mais utilizado na Análise de Componentes Principais é a decomposição de valores singulares (SVD²). Este método algébrico é implementado em vários pacotes de *software*, como é caso do *MathWorks* MATLAB. Qualquer matriz **X** (de dimensão **n x m**) pode ser decomposta como o produto de 3 matrizes: T_0 , **S** e **P** (Equação 2-14).

$$X = T_0 \cdot S \cdot P^T$$

Equação 2-14

$$T = T_0 \cdot S$$

Equação 2-15

T_0 (de dimensão **n x m**) tem os *scores* normalizados vindo da análise de componentes principais (vector de comprimento unitário) os *scores* da Análise de Componentes Principais são obtidos (Equação 2-15).

¹ Terminologia Inglesa, *Principal Components Analysis*

² Terminologia Inglesa, *Singular Value Decomposition*

S é uma matriz diagonal (de dimensão $m \times m$) que contém os denominados valores singulares. P^T é a matriz dos *loadings* transposta (de dimensão $m \times m$)

Os vectores dos *loadings* calculados a partir da Análise de Componentes Principais da matriz X são iguais aos valores próprios (ou *eigenvalues*) da matriz co-variância de X . Um método que permite calcular os valores próprios é a rotação de *Jacobi*. Os valores próprios são as variâncias dos *scores*.

Através do estudo e interpretação da estrutura variância – co-variância de um certo fenómeno, em que são medidas várias variáveis, é possível determinar as relações entre variáveis. Este último ponto é o objectivo principal da Análise de Componentes Principais. Estas componentes principais podem ser utilizadas em análises posteriores, como em técnicas estatísticas como por exemplo na Regressão Linear Múltipla que exige que variáveis sob estudo sejam independentes.

2.2.1. Aplicações e Objectivos

Os *scores* vindos da Análise de Componentes Principais são não correlacionados, isto significa que o coeficiente de correlação entre os *scores* e de qualquer das componentes principais é zero. Análise de Componentes Principal pode ser aplicado para aproximar a matriz X quem tem informação correlacionada pela matriz aT , que contem os a *scores* não correlacionados vindos da Análise de Componentes Principais (Equação 2-16).

$$X = a T \cdot a P^T + E$$

Equação 2-16

O número de componentes principais utilizados, a , determina o grau de ajuste X ; E é a matriz dos resíduos.

A relevância de um componente principal é determinada pela variância dos seus *scores* que expressa em percentagem do total de variância. O número de componentes principais com valor de variância é relevante e mede a independência linear presente na matriz X .

2.3. Calibração Multivariada

A calibração multivariada é uma técnica utilizada em análise de dados multivariada. A finalidade desta técnica é desenvolver um modelo matemático que descreva as relações entre um conjunto de variáveis-x e um ou mais de variáveis-y.

A técnica de calibração mais clássica é a Regressão Linear Simples (ou OLS³), que pode ser complementada por técnicas mais poderosas ou mais robustas, tais como a

³ Terminologia Inglesa, *Ordinary Least-Squares regression*

Regressão por Componentes Principais (ou PCR⁴), Regressão por Mínimos Quadrados (ou PLS⁵) e redes neuronais artificiais (ou ANN⁶). Uma das aplicações desta técnica em quimiometria é a investigação de relações entre objectos e propriedades.

Existem dois pontos na aplicação da Regressão Linear Múltipla (ou MLR⁷) em quimiometria se devem focar:

O primeiro ponto centra-se no facto que as variáveis-x (características, variáveis de estimação) são altamente correlacionadas. A estratégia de aplicação desta técnica não consiste em escolher o subconjunto de características que estão menos correlacionadas mas sim considera aquelas que estão mais correlacionadas à medida que o número de medições aumenta, isto tem como consequência o aumento da estabilidade do modelo.

O segundo ponto foca-se na complexidade do modelo. O nível de complexidade do modelo é otimizado de modo a dar a melhor previsão da variável-y (propriedade, variáveis de resposta) e não o melhor ajuste. Tanto em PCR como em PLS, a complexidade do modelo é controlado pelo número de componentes utilizados. Um conjunto de dados, denominado de conjunto de treino, é utilizado para calcular e otimizar os parâmetros do modelo e outro conjunto de dados, denominado de conjunto de validação, não foi aplicado para a criação mas sim para testar o modelo. Se o conjunto de dados for pequeno utiliza-se a validação cruzada de modo a estimar o alcance do ajuste.

2.4. Regressão por Mínimos Quadrados

A Regressão por Mínimos Quadrados é um método que permite relacionar duas matrizes de dados, X e Y . A matriz X contem os dados que podem ser medidos aquando a amostra é retirada e a matriz Y contem os dados que foram quantificados relativos à amostra retirada.

O PLS é uma técnica situada entre a PCR, na qual as variáveis latentes intermediárias que possuem o valor máximo de variância da matriz, e a OLS, em que a última variável latente possuem o valor máximo do coeficiente de correlação da característica-y.

O critério mais aplicado em PLS é o valor máximo da co-variância entre as variáveis latentes e a(s) propriedade(s) em estudo. Aplicação deste critério combina a elevada variância presente na matriz X , que é responsável robustez do modelo, com uma elevada correlação com a propriedade de interesse. O método PLS é linear e a última variável latente é utilizada para estimar a propriedade sendo uma combinação linear das variáveis.

⁴ Terminologia Inglesa, *Principal Component Regression*

⁵ Terminologia Inglesa, *Partial Least-Squares regression*

⁶ Terminologia Inglesa, *Artificial Neural Network*

⁷ Terminologia Inglesa, *Multiple Linear Regression*

A matriz X , n linhas e m característica ou variáveis de previsão, é aplicada uma padronização por centralização. A mesma padronização é aplicada à matriz Y , com n linhas e k propriedades ou variáveis de resposta.

O algoritmo utilizado em PLS é semelhante ao aplicado em PCA mas com objectivos e métodos diferentes. Através do PLS obtém-se uma matriz T do scores a partir da matriz X e uma matriz U dos scores da matriz Y . Tanto T como U possuem o n linhas e a colunas, sendo a é o número de componentes retiradas do PLS.

As matrizes T e U traduzem X e Y mas também as combinações lineares entre as variáveis (X) e as propriedades (Y). Os x -scores e y -scores são combinações lineares das variáveis (x) e propriedades (y) e podem ser traduzidas por meio de uma relação linear.

A Equação 2-17 traduz o primeiro par saídos da primeira componente PLS:

$$u_1 = b_1 \cdot t_1 + h_1$$

Equação 2-17

Em que h representa o valor do resíduo e b o valor do declive. Se a combinação linear entre u_1 e t_1 for forte, implica que o valor dos resíduos é baixo logo o score de x da primeira componente vinda da PLS fornece uma boa previsão do score e dos dados de y . A aplicação da PLS utiliza-se mais do que uma componente do PLS para traduzir Y por meio de X . A relação entre as variáveis latentes é traduzida pela Equação 2-18:

$$U = T \cdot B + H$$

Equação 2-18

Os algoritmos empregues na determinação de um modelo PLS são de apenas interesse técnico. Já foram descritos diferentes algoritmos para diferentes tipos de informação (Rosipal & Krämer, 2006). A maioria destes algoritmos tolera alguns dados em falta. Existem algoritmos semelhantes ao NIPALS⁸ recorre a matrizes de dados originais, X e Y devidamente padronizadas. Por alternativa existem algoritmos tais como SIMPLS (Jong, 1993), utilizado no *MathWorks MATLAB*, que utilizam matrizes variância e co-variância, $X'X$, $Y'Y$ e $X'Y$, ou associações de matrizes XX' e YY' . A utilização deste tipo de algoritmos apresenta uma vantagem face a outros no caso em que o número de observações (N) é diferente do número de variáveis (K e M).

Comparando com PCA, o método PLS recorre a diferentes vectores no cálculo da matriz dos scores e dos resíduos. A Tabela 2-1 resume a aplicação genérica da técnica de PLS.

A iteração presente dos passos 1 a 9 descritos na Tabela 2-1 resulta no cálculo dos vectores dos pesos w e c para X e Y e correspondentes aos vectores dos scores t e u , respectivamente.

⁸ Terminologia inglesa, *Non-linear Iterative Partial Least Squares*

No passo 10 é calculado o vector dos *loadings*, \mathbf{p} , a partir dos dados restantes de \mathbf{X} (passo 11). Os dados restantes de \mathbf{Y} são calculados nos passos 13 e 14 com os *y-scores* calculados por meio de combinação linear traduzida pela Equação 2-17.

A primeira componente da PLS (incluindo os *scores*, *loadings*, pesos) é calculada a partir de \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Os restantes componentes são calculados pelas matrizes de resíduos e consequentemente $\mathbf{W}, \mathbf{C}, \mathbf{T}, \mathbf{U}$ não estão relacionadas com \mathbf{X} e \mathbf{Y} (excluindo as primeiras colunas) mas sim com as matrizes dos resíduos. A matriz transformação, \mathbf{W}_X (Equação 2-19), tem como objectivo calcular os *x-scores*, \mathbf{T} , (Equação 2-20), directamente da matriz \mathbf{X} .

$$\mathbf{W}_X = \mathbf{W}(\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1}$$

Equação 2-19

$$\mathbf{T} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{W}_X$$

Equação 2-20

Para \mathbf{Y} não existe esta matriz de transformação, \mathbf{W}_X , devido ao complexo processo de cálculo da matriz dos resíduos.

O mesmo algoritmo pode ser aplicado a uma única *y-propriedade*, caso a convergência seja alcançada após um ciclo através dos passos 1 a 8.

Após a criação do modelo, este pode ser utilizado para prever *y-propriedades* e *y-scores* a partir de novos dados. Os *x-scores*, \mathbf{T} , são calculados através da Equação 2-20. Os *y-scores*, \mathbf{U} , são estimados a partir os *x-scores* através da combinação linear:

$$\mathbf{U}^* = \mathbf{T} \cdot \mathbf{B}$$

Equação 2-21

E \mathbf{Y} estimado é calculado por analogia à Equação 2-16 e usando a Equação 2-20; os mesmos *x-scores* permitem prever diferentes *y-propriedades*.

$$\mathbf{Y}^* = \mathbf{U} \cdot \mathbf{C}^T = \mathbf{X} \cdot \mathbf{W}_X \cdot \mathbf{B} \cdot \mathbf{C}^T$$

Equação 2-22

Tabela 2-1 – Tabela resumo do algoritmo de aplicação da técnica PLS (Gasteiger, 2003)

Passo	Cálculo	Descrição
1	$u = y_1$	Inicialização através vector inicial dos y-scores, que também é a primeira coluna de Y
2	$w = X^T \cdot u$	Cálculo dos pesos de x que são os coeficientes para o cálculo dos x-scores por meio de uma combinação linear dos dados ou dos resíduos de x .
3	$w = \frac{w}{\ w\ }$	Escalonamento de w para tamanho unitário: $\ w\ = (w_T \cdot w)^{0.5}$
4	$t = X \cdot w$	Calculo dos x-scores
5	$c = Y^T \cdot t$	Cálculo dos pesos de y que são os coeficientes para o cálculo dos y-scores por meio de uma combinação linear dados ou resíduos de y .
6	$c = \frac{c}{\ c\ }$	Escalonamento de c para o tamanho unitário $\ c\ = (c_T \cdot c)^{0.5}$
7	$u_{novo} = Y \cdot c$	Cálculo dos novos y-scores
8	$u_{diff} = u_{novo} - u$ $\varepsilon = u_{diff}^T \cdot u_{diff}$	Verificação da convergência. Se o erro for menor que ε ($\varepsilon = 10^{-5}$). A convergência é alcançada e componente de PLS foi calculado. Continua no passo 10.
9	$u = u_{novo}$	Substituição u por u_{novo} e continua no passo 2.
10	$p = \frac{X^T \cdot t}{t^T \cdot t}$	Calculo dos x-loadings
11	$X_{res} = X - t \cdot p^T$	Cálculo da matriz de resíduos de X
12	$q = \frac{Y^T u}{u^T \cdot u}$	Cálculo dos y-loadings. Neste caso nenhum componente de Y é removido da matriz Y .
13	$b = \frac{u^T \cdot t}{t^T \cdot t}$	Cálculo do declive que define a combinação linear entre y-scores e x-scores por meio de $u = b \cdot t$.
14	$Y_{res} = Y - b \cdot t \cdot c^T$	Calculada a matriz de resíduos de Y . Os y-scores de previsão são removidos em vez de u . Este procedimento é recomendado se o propósito a regressão.
15	$t \rightarrow T$ $p \rightarrow P$ $c \rightarrow C$ $b \rightarrow B$ $w \rightarrow W$ $u \rightarrow U$ $q \rightarrow Q$	O cálculo de componentes PLS foi terminado. Os resultados t, w, p, u, c, q da componente são guardados em T, W, P, U, C, Q , respectivamente. E b é um vector da diagonal da matriz diagonal.
16	Parar	Parar de senão houver mais nenhum componente para ser calculado
17	$X = X_{res}$ $Y = Y_{res}$	Substituir X por X_{res} e Y e Y_{res} e continua com o passo 1 para calcular a componente seguinte

O PLS é um método poderoso em termos de estabelecimento de relações entre uma resposta multivariada (Y) como estimadores multivariados (X). Variáveis correlacionadas são ajustadas por um pequeno conjunto variáveis lineares latentes (componentes). O modelo final de previsão de um y-propriedade é uma combinação linear dos seus estimadores.

Como já foi referido anteriormente a complexidade de um modelo é influenciado pelos números de termos e relações não-lineares presentes nos dados. Uma maior

complexidade do modelo aplicado origina um melhor ajuste dos dados ao modelo. Também foi referido que o objectivo desta técnica não é o melhor ajuste mas sim criar um modelo capaz de prever para novos casos. Se modelo ter uma baixa complexidade originando um mau ajuste dos dados e se tiveram uma elevada complexidade leva ao ajuste de detalhes que são irrelevantes levando a um ajuste superior.

A complexidade do modelo PLS é determinada pelo número óptimo de componentes utilizadas no modelo. Para determinar esse número óptimo de componentes podem se utilizar dois métodos:

1º Método – Se o número de objectos é suficiente, este podem ser aleatoriamente divididos em 2 conjuntos de dados, conjunto de treino e conjunto de validação. O primeiro conjunto serve para desenvolver e talvez otimizar o modelo. O segundo conjunto, conjunto de validação, será utilizado para testar.

2º Método – Se conjunto de dados for pequeno, o método de validação cruzada é aplicado aleatória ao conjunto de dados em **g** grupos. Um dos grupos é para prever e os restantes para treinar e otimizar. Este procedimento é repetido até que cada grupo seja utilizado pelo menos uma vez para prever.

São utilizadas várias medidas da capacidade previsão a mais comum é denominada de PRESS⁹ (Equação 2-23).

$$PRESS = \sum (y_i^* - y_i)^2$$

Equação 2-23

Em que: $i = 1, 2, \dots, n$ é o número de objectos usados na previsão

Fazendo um gráfico de PRESS com o número de componentes utilizados (retidas do PLS) tipicamente indicam uma diminuição no caso conjunto de treino mas uma aproximação mais ou menos clara para um conjunto de previsão.

2.5. Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos

A dinâmica presente nos processos em reactores biológicos é consequência de três factores:

- Cinética de crescimento dos microorganismos;
- Tipo e hidrodinâmica do reactor;
- Modo de alimentação de substrato e nutrientes.

Num reactor biológico a dinâmica e variação de quantidade ou concentração de cada componente pode ser explicada por dois fenómenos:

⁹ Terminologia inglesa: *Predicted Residual Error Sum of Squares*, em português Erro residual previsto por mínimos quadrados

- O fenómeno de transformação e conversão (reações química, bioquímicas e biológicas) de alguns componentes noutros componentes;
- O fenómeno de transferência de massa (convecção/difusão) por trocas de líquido e/ou de gás do reactor biológico com o ambiente exterior.

O modelo que traduz dinâmica de reactor perfeitamente agitado e mistura homogénea é obtido através de um balanço macroscópico aos componentes envolvidos num determinado esquema reaccional. Este balanço macroscópico é um sistema constituído por um reactor obtido pelo seguinte balanço genérico pela Equação 2-24:

$$\text{Acumulação} = \text{Conversão} + \text{Entrada} - \text{Saída}$$

Equação 2-24

A descrição dinâmica baseia-se um sistema de equações não lineares do espaço de estados denominado de Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos definido por Bastin & Dochain (Bastin & Dochain, 1990). Um determinado esquema reaccional é composto por m reações n componentes. O modelo possui n equações diferenciais escritas para a concentração de cada componente, tem denominado de variável de estado. A dinâmica da concentração de cada componente C_i é traduzida na Equação 2-25:

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=1}^m (\pm) \frac{1}{Y_{ij}} r_j - DC_i + F_i - Q_i$$

Equação 2-25

$$D = \frac{F_e}{V}$$

Equação 2-26

Em que:

- C_i – Variável de estado (concentração do componente i);
- Y_{ij} – Rendimento do componente i na reação j ;
- r_j – Taxa de reação ou taxa de crescimento j ;
- F_i – Caudal mássico de alimentação ao reactor na forma líquida (por unidade de volume de líquido no reactor) para o componente i ;
- Q_i – Caudal mássico de alimentação ao reactor na forma gasosa (por unidade de volume de líquido no reactor) para o componente i ;
- D – Taxa de diluição (D^{-1} é o tempo de residência) é definida como a razão entre o caudal volumétrico (F_e) e o volume (V) de líquido no reactor (Equação 2-26)

Os valores dos rendimentos (Y_{ij}) são estritamente positivos. O termo correspondente apresenta o sinal negativo quando i representa um reagente e o sinal positivo com i

representa um produto de reacção. Estes rendimentos são adimensionais (unidades de massa/unidades de massa) traduzem a taxa de reacção em relação à taxa de crescimento da biomassa. Os componentes não intervenientes numa dada reacção apresentam os coeficientes nulos.

O modelo geral pode ser reescrito sob a forma matricial (Equação 2-27):

$$\frac{dC}{dt} = k r(C, t) - DC + F - Q$$

Equação 2-27

Em que:

- C – Vector de estado constituído pelas concentrações dos componentes: $C^T = [C_1, C_2, \dots, C_n]$;
- k – Matriz de rendimentos $k = [k_{ij}]$;
- r – Vector de taxas de reacção ou taxas de crescimento $r^T = [r_1, r_2, \dots, r_m]$;
- F – Vector dos caudais mássicos de entradas líquida no reactor (por unidade de volume de líquido no reactor) $F^T = [F_1, F_2, \dots, F_n]$;
- Q – Vector dos caudais mássicos das saídas gasosas no reactor (por unidade de volume de líquido no reactor) $Q^T = [Q_1, Q_2, \dots, Q_n]$;

Nas equações anteriormente apresentada foram demonstrados os dois fenómenos anteriores descritos:

- O termo r/Y descreve a cinética das reacções que ocorrem no interior no reactor biológico
- E o termo $-DC + F - Q$ descrevem os fenómenos de transporte presentes no reactor.

Adicionalmente poderá ser necessária uma equação da variação do volume de líquido no reactor. Este termo depende do modo operação do reactor (Equação 2-28).

$$\frac{dV}{dt} = F_e - F_s$$

Equação 2-28

Em que: F_s é o caudal volumétrico da corrente saída do reactor.

O Modelo Dinâmico Geral de Reactor Biológicos é aplicável nos três tipos de operação de um reactor biológico

A tabela seguinte (Tabela 2-2) faz um resumo do efeito dos caudais, alimentação ou saída, volume do meio e taxa de diluição.

Tabela 2-2 – Tipos de funcionamento de um reactor biológico

	Descontínuo	Semi-Contínuo	Contínuo
F_e	0	$F_e(t)$	$F_e(t) = F_s(t)$
F_s	0	0	$F_e(t) = F_e(t)$
dV/dt	0	$F_e(t)$	0
V	Constante	$V(t)$	Constante
D	0	$D(t) = F_e(t)/V(t)$	Constante

O tipo de operação condiciona o modo como o volume de meio varia com o tempo sendo limitado por um valor mínimo e máximo. As variações das variáveis do processo estão relacionadas como a forma de como varia a taxa de diluição, D , sendo que o perfil de variação pode ser crescente, decrescente ou contante dependendo do perfil do tipo de alimentação, $F_e(t)$.

2.5.1. Modelação das taxas de crescimento

A notação $r(C,t)$ usada na equação do modelo significa que as taxas de crescimento do vector r são funções do estado C não lineares e variáveis no tempo. As cinéticas de crescimento dos microorganismos são normalmente traduzidas, em termos do vector r , pela Equação 2-29:

$$r_j(C) = \mu_j(C)X$$

Equação 2-29

Em que: μ_j – Taxa específica de crescimento na reacção j ; X – Concentração dos microorganismos (biomassa);

A Equação 2-29 traduz o facto da cinética de crescimento ser directamente proporcional à concentração da biomassa. A taxa específica de crescimento é entendida como a variação à biomassa. A taxa específica de crescimento é entendida como a variação da biomassa por unidade de tempo de concentração de biomassa (Equação 2-30).

$$\mu = \frac{1}{XV} \left(\frac{dXV}{dt} \right)$$

Equação 2-30

A tradução matemática de μ depende de diversos factores como o substrato, biomassa, produto, oxigénio dissolvido, metabolitos inibitórios, pH, temperatura entre outros.

Existem inúmeros modelos que traduzem estas dependências entre factores, (Bastin & Dochain, 1990) possui um apêndice onde são ilustrados 50 modelos cinéticos.

Entre os modelos mais utilizados e foi utilizado neste trabalho é o modelo de *Monod* que se baseia na equação de *Michaelis –Menten*.

3. Materiais e Métodos

Foram realizados 4 ensaios experimentais (Pais, Joana Tese de Doutoramento em curso) em colaboração com o grupo de Engenharia Bioquímica e Bioprocessos, com o objectivo de estudar diferentes estratégias de alimentação de fonte de carbono, com o intuito de otimizar o crescimento celular e a produção de PHB.

No decorrer de cada ensaio, foram retiradas amostras para avaliar quantitativamente a fonte de carbono (lactose), azoto (amónia), crescimento celular e produção de PHB.

3.1. Estratégias aplicadas

Neste trabalho foi utilizada uma estirpe de *Escherichia Coli* geneticamente modificada. A modificação genética consistiu na inserção dos genes que codificam as proteínas responsáveis pela síntese de PHB. Estes genes são activados na presença de lactose.

Tabela 3-1 – Resumo das estratégias de alimentação e arejamento utilizadas nos ensaios experimentais

Meio		Condições
Estratégia 1	MR ¹⁰ , soro de leite dissolvido em água	Alimentação: por pulsos: 10g/L <[Lactose]< 20 g/L. Controlo do pH: NH ₄ OH. Controlo de pO ₂ = 60% (na fase exponencial) e 30% (na fase estacionária) com agitação e adição de oxigénio puro.
Estratégia 2	MR, soro de leite dissolvido em água	Fase Exponencial Alimentação: por pulsos: 20g/L <[Lactose]< 50g/L. Controlo do pH: NH ₄ OH. Controlo de pO ₂ = 60% com agitação e adição de oxigénio puro.
		Fase estacionária Alimentação em contínuo: [Lactose]> 30g/L Controlo do pH: NH ₄ OH. Controlo de pO ₂ = 30% com agitação e adição de oxigénio puro.
Estratégia 3	MR, lactose comercial em água	Alimentação: por pulsos: [Lactose] <10g/L. Controlo do pH: NH ₄ OH. Controlo de pO ₂ = 60% com agitação e adição de oxigénio puro.
Estratégia 4	LB ¹¹ , lactose comercial em água	Alimentação: por pulsos: [Lactose] <10g/L Controlo do pH: NH ₄ OH. Controlo de pO ₂ = 60% com agitação e adição de oxigénio puro.

¹⁰ O meio MR é meio de cultura definido que possui os compostos necessários para o crescimento celular e para a produção PHB. O meio MR é específico para o crescimento da bactéria em estudo.

¹¹ O meio LB é um meio de cultura rico, que ao contrário do meio MR, pode ser utilizado para o crescimento de várias culturas.

3.2. Preparação de amostras

Antes da aplicação de qualquer método analítico foi necessário preparar as amostras para a aplicação dos mesmos.

3.2.1. Crescimento e concentração celular

Uma amostra de caldo de volume conhecido foi filtrada a vácuo através de uma membrana de 0.2 μ m de poro e previamente pesada, tendo sido seca a 100°C até obtenção de peso celular seco constante. Após a secagem, a membrana com a biomassa foi novamente pesada.

3.2.2. Quantificação de PHB

Antes da quantificação foi necessária a centrifugação a 10000rpm de uma amostra de meio fermentativo retirada durante a experiência de 1mL durante 10 minutos. A *pellet* de biomassa foi recolhida, dissolvida numa solução de NaCl 0.9% (w/v) e de novo centrifugada a 10000rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação da amostra, o sobrenadante foi retirado e as *pellets* foram conservadas em nitrogénio líquido antes de serem liofilizadas (*Telstar, Cryodos*). A biomassa foi liofilizada durante 24 horas a aproximadamente -50°C e 0.07mbar em vácuo.

Retiram-se aproximadamente 2mg de biomassa e adicionou-se 1mL de uma solução de metanol com 20% de ácido sulfúrico e 1mL de clorofórmio contendo aproximadamente 0.88mg/mL de heptadecano (padrão interno). As amostras foram digeridas num termobloco durante 3horas e meio. Após arrefecer foram adicionados 500 μ L de água destilada e agitadas durante 1 minuto num vórtice. Posteriormente, foram retirados 800 μ L da fase orgânica e transferidos para tubos de 2mL com peneiros moleculares (0.3nm, *Merck*).

3.2.3. Quantificação de Lactose

Para quantificação da lactose, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi diluído 20x usando uma solução de H₂SO₄ a 0.01N. Após a diluição, as amostras foram filtradas por meio de uma membrana de 0.2 μ m de poro. Para analisar a lactose presente na solução de soro, as amostras foram diluídas 1000x.

3.2.4. Quantificação de Ácidos Orgânicos Voláteis

Para a quantificação de ácidos orgânicos voláteis (lactato, acetato, propionato, butirato, valerato, *formato*, *succinato* e piruvato), as amostras foram diluídas 20x usando

uma solução de H₂SO₄ a 0.01N. Após diluição, as amostras foram filtradas por uma membrana de 0.2µm de poro.

3.3.Métodos Analíticos

3.3.1. Crescimento e concentração celular

O crescimento celular foi monitorizado através da medição da absorvância a um comprimento de onda 600nm, usando um espectrofotômetro (*Eliosα, ThermoSpectronic*). A quantificação da concentração celular (ou CDW¹²) foi definida como o peso celular por litro de caldo de fermentação. O valor de CDW foi determinado pela Equação 3-1:

$$CDW(g/l) = \frac{m_1 - m_2}{V}$$

Equação 3-1

Em que: m₁ é a massa de membrana com biomassa (g) após a secagem, m₂ é a massa de membrana (g) e V é o volume de cultura filtrado (L).

3.3.2. Quantificação de PHB

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa. O equipamento de análise (GC, *Chromopack SP900*) estava equipado com um detector de chama iônico a 220°C. 1mL da fase de clorofórmio foi injectado numa coluna *CPWAX* (60m,0.53mm,1mm,*Varian*) usando hélio como fase móvel com um caudal de arrastamento equivalente a 100KPa. As temperaturas utilizadas no programa de análise de HB foram: 40-100°C (10°C/min),100-175°C (3°C/min),175-220°C (10°C/min) e 220°C durante 1 minuto.

Foi construída uma curva de calibração que relaciona a razões entre as áreas dos picos de HB e heptadecano e as razões entre as concentrações que foram obtidas pela preparação de padrões de co-polímero HB/HV (88%/12%,Merck) sujeitas à mesma preparação das amostras.

3.3.3. Quantificação de Lactose

A concentração de lactose foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta-eficiência (HPLC¹³).

¹² Terminologia inglesa, *Celular Dry Weight*

¹³ Terminologia inglesa, *High Performance Liquid Chromatography*

3.3.4. Quantificação de Ácidos Orgânicos Voláteis

Para a quantificação de ácidos orgânicos foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta-eficiência (HPLC). Utilizou-se um equipamento que possuía uma coluna *Aminex HPX-87H (Biorad)* acoplado a um detector de índice de refração (IR). Como fase móvel foi usada uma solução de H_2SO_4 a 0.01N com taxa de eluição de 0.6mL/min e uma temperatura de operação de 50°C.

3.3.5. Quantificação de Amónia

A quantificação de amónia foi determinada usando eléctrodo de amónia (*Thermo Electron Corporation, Orion 9512*). Para a quantificação de amónia foram utilizados padrões de NH_4Cl .

3.3.6. Determinação do coeficiente de transferência de massa de oxigénio

Para a determinação do coeficiente de transferência de massa de oxigénio foram feitos ensaios a diversas velocidades de agitação. Foram utilizadas velocidades de agitação entre o valor mínimo de agitação de 200 rpm e o valor máximo de 1000 rpm.

As condições utilizadas entre cada ensaio foram as mesmas que utilizadas as mesmas condições de temperatura (37°C) e o caudal de arejamento (3v.v.m¹⁴) utilizadas em cada estratégia. Substituíram-se os meios de cultura por água sendo assumido que ambas possuem a mesma densidade. Entre cada ensaio de determinação, o bioreactor foi inertizado com árgon de modo a retirar todo oxigénio dissolvido.

Utilizou-se o *software* de controlo e monitorização BioCTR para registar os valores de pressão de oxigénio dissolvido (pO_2) em função do tempo.

3.4. Cálculos

O conteúdo em PHB (%PHB) foi determinado pela Equação 3-2:

$$\%PHB = \frac{m_{PHB}}{m_{celulas}} \times 100$$

Equação 3-2

Em que: m_{PHB} é a massa de PHB em mg e $m_{celulas}$ é a massa de células obtido depois da liofilização.

¹⁴ Sigla: Volume de oxigénio por Volume de ar por minuto.

A concentração de PHB ([PHB]) foi determinada pela Equação 3-3:

$$[PHB] = \frac{\%PHB}{100} \times CDW$$

Equação 3-3

A concentração de biomassa activa (X) foi determinada pela subtracção entre a concentração celular (CDW) e concentração de PHB, Equação 3-4.

$$X = CDW - [PHB]$$

Equação 3-4

A taxa de crescimento específica (μ) é definida como a variação da concentração da biomassa activa por unidade de tempo. O valor máximo da taxa de crescimento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinado pela regressão linear simples da fase exponencial $\ln X$ e tempo.

Os rendimentos de PHB ($Y_{PHB/S}$) e biomassa activa ($Y_{X/S}$) produzidos em função da lactose consumida foram calculados dividindo PHB ou biomassa activa produzidos pela concentração de lactose consumida.

A produtividade volumétrica de PHB (r_{PHB}) é definida com a massa de PHB produzida por volume de reactor e unidade de tempo. Calculada pela Equação 3-5:

$$r_{PHB} = \frac{[PHB]}{t}$$

Equação 3-5

Produtividade específica de PHB (q_{PHB}) é definida como a produção de PHB por massa de biomassa activa presente no reactor, por unidade de tempo. Calculada pela

Equação 3-6:

$$q_{PHB} = \frac{[PHB]}{X \cdot t} = \frac{r_{PHB}}{X}$$

Equação 3-6

Para determinar o coeficiente de transferencia de massa ($K_L a'$) de oxigénio partiu-se do balanço global ao oxigénio (Equação 3-7):

$$\frac{dO_2}{dt} = K_L a' (O_{2L}^* - O_{2L}) - \frac{1}{Y_{X/O_2}} \cdot \mu \cdot X$$

Equação 3-7

Como foi descrito no capítulo 3.3.6 na determinação experimental não foi utilizado nenhum tipo de cultura. Logo o segundo termo da Equação 3-7 pode ser desprezado:

$$\frac{dO_2}{dt} = K_L a' (O_{2L}^* - O_{2L})$$

Equação 3-8

Resolvendo a Equação 3-8, ficamos com a seguinte expressão:

$$\int \frac{1}{(O_{2L}^* - O_{2L})} dO_2 = K_L a' \cdot t \Leftrightarrow -\ln(O_{2L}^* - O_{2L}) = K_L a' \cdot t$$

Equação 3-9

Em que: O_{2L}^* é a concentração de saturação de oxigénio em solução, O_{2L} é a concentração de oxigénio em solução e $K_L a'$ é o coeficiente de transferência de massa global.

Para o cálculo do valor $K_L a'$, utilizou-se a zona linear do gráfico pO_2 em função do tempo, zona essa onde não existe saturação de oxigénio. O valor do coeficiente de transferência de massa global é o declive dessa recta.

3.5. Controlo do Processo biológico em reactor

A temperatura foi mantida a 37°C e a pressão de oxigénio dissolvido (pO_2) foi mantido a 60%.

A pressão de oxigénio foi controlada automaticamente pelo aumento da agitação até às 1000 rpm e variando a concentração de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento. O caudal de arejamento do fermentador foi mantido a 3 v.v.m.

O pH da cultura foi controlado a 6.8 pela adição automática de uma solução de NH_4OH a 28% (w/v).

3.6. Culturas

Inóculos: em cada estratégia o inóculo foi de 20% (v/v). Nas três primeiras estratégias, o inóculo foi obtido em meio definido (MR), na quarta estratégia usou-se meio rico (LB). Todos os meios foram suplementados com 1% (w/v) de lactose.

3.7. Monitorização do processo

Os valores de pH, pO_2 , velocidade de agitação, percentagem de oxigénio puro adicionado à corrente de arejamento, volumes de oxigénio puro adicionado e amónia adicionados foram registados pelo sistema de controlo e monitorização BioCTR.

O sistema de controlo e monitorização BioCTR foi desenvolvido utilizando *NI Labview* na FCT-UNL (Eusébio, 2006).

Foram implementadas no BioCTR estratégias de controlo de adição de lactose baseadas no valor de pH.

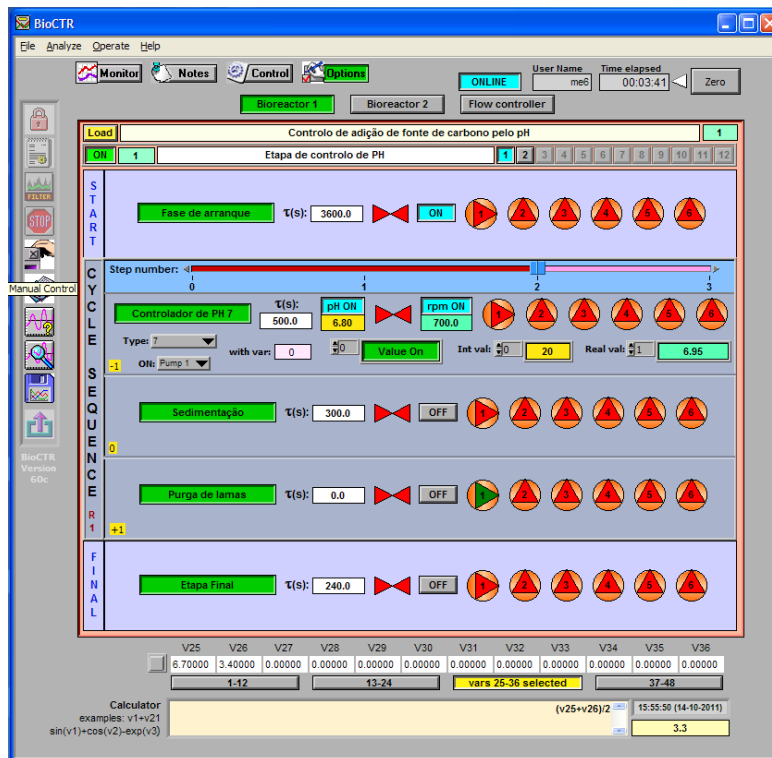


Figura 3-1 – BioCTR: editor de seqüências para programação dos algoritmos de controlo

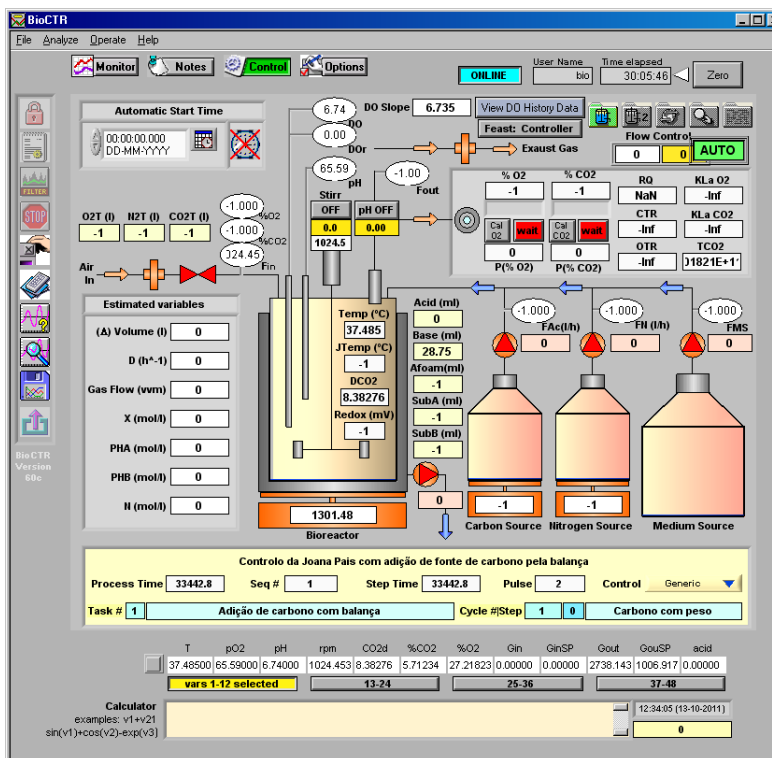


Figura 3-2 – BioCTR: Painel de Controlo do processo de fermentação

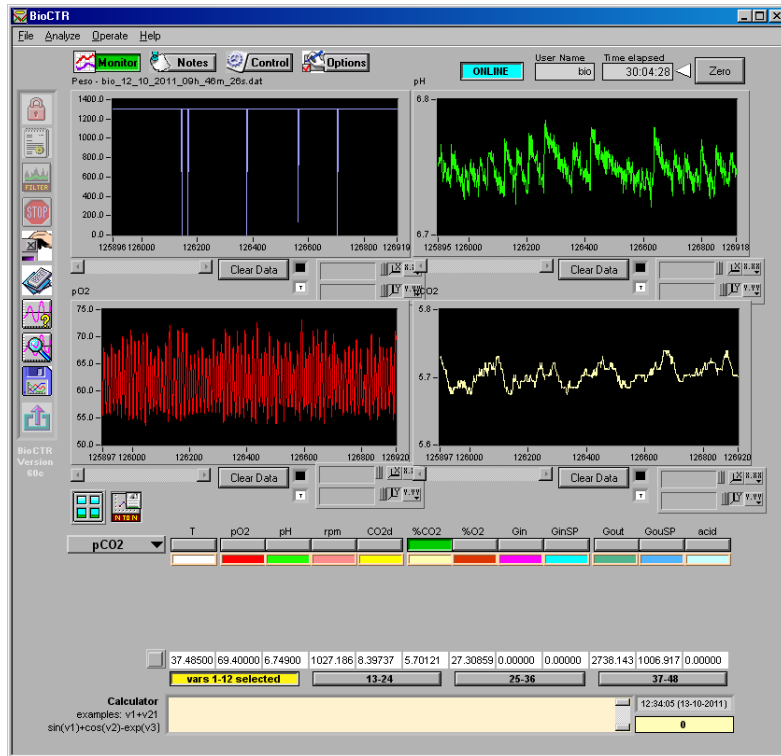


Figura 3-3 – BioCTR: Painel de Monitorização das variáveis do processo

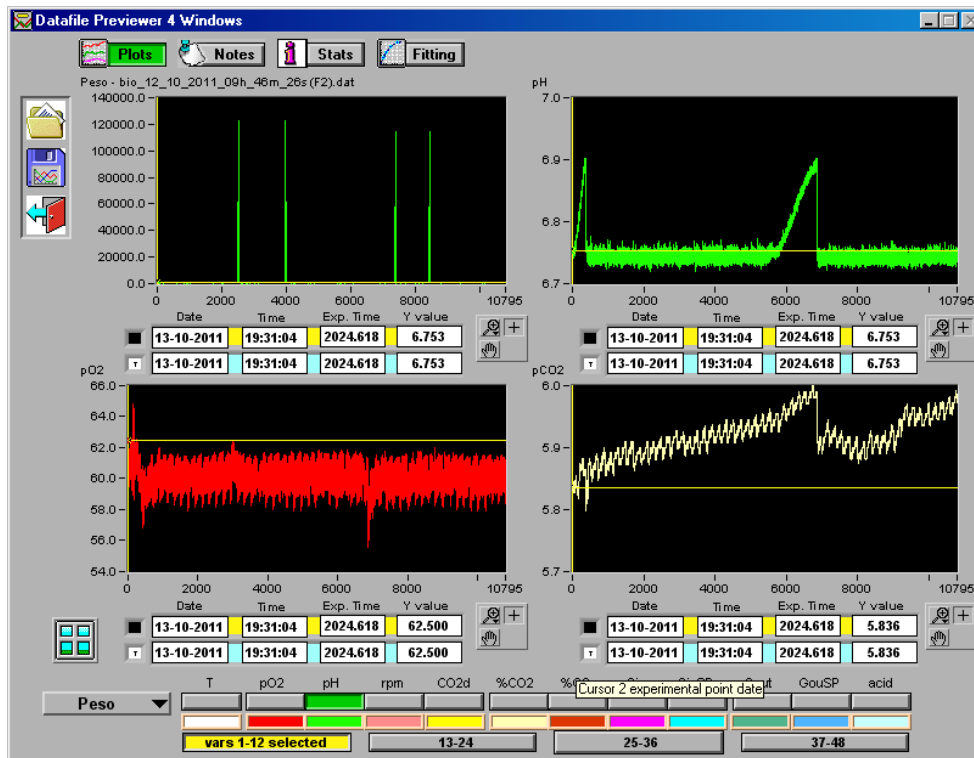


Figura 3-4 – BioCTR: exemplo de monitorização onde se ilustra a adição de um pulso de lactose devido à subida do valor de pH

4. Resultados e Discussão

4.1. Aplicação experimental de diferentes estratégias de alimentação

4.1.1. Estratégia 1: Alimentação com soro de leite por pulsos

Esta estratégia de alimentação foi feita através de pulsos de soro de leite. O volume dos pulsos foi ajustado a uma concentração de lactose entre 10g/L a 20g/L. A estratégia de alimentação iniciou-se com um valor de *set-point* de pressão de oxigénio dissolvido de 60%. Após o valor de densidade óptica ter alcançado valor de 100, o valor de *set-point* de pressão de oxigénio dissolvido foi alterado para 30%.

No gráfico da Figura 4-1 estão representadas as concentrações de lactose, PHB e biomassa activa no decorrer da aplicação da estratégia.

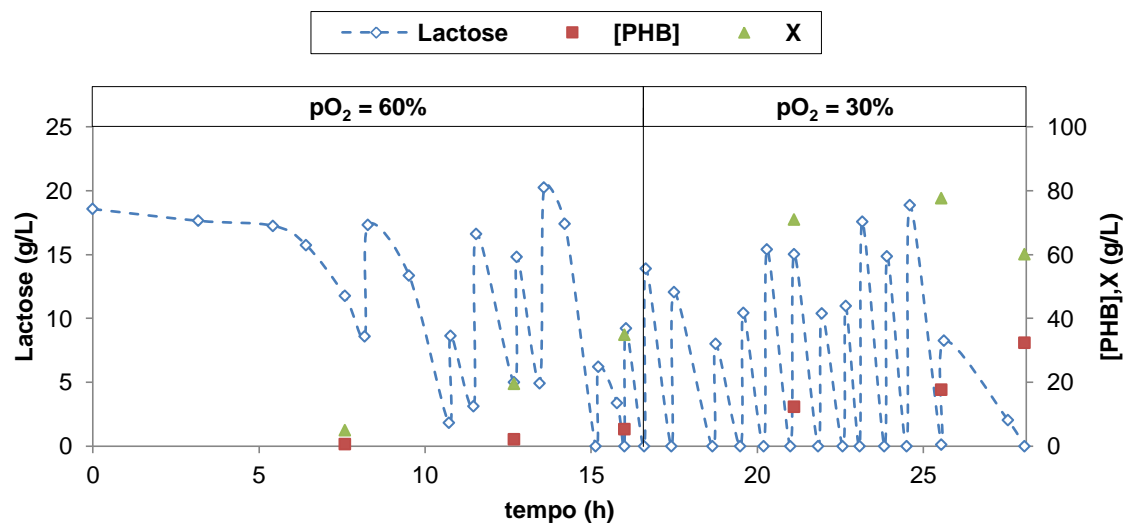


Figura 4-1 – Estratégia 1: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa experimental ao longo do tempo

É possível observar pelo gráfico da Figura 4-1 que existiram curtos períodos de tempo em que o valor da concentração de lactose foi nulo. Apesar de existência destes períodos, o crescimento celular não foi prejudicado. No entanto, estes períodos de ausência de lactose podem ter afectado a produção de PHB. Como já foi referido, os genes de produção de PHB são activados na presença de lactose.

De modo a estudar estratégias que evitem os períodos em que o valor da concentração de fonte de carbono seja zero, avaliaram-se as variáveis registadas pelo sistema de monitorização e controlo BioCTR.

Os gráficos das figuras seguintes apresentam a variação de pH (Figura 4-2), pO_2 (Figura 4-3) e percentagem de oxigénio puro adicionada ao caudal de arejamento (Figura 4-4) e concentração de lactose durante a estratégia.

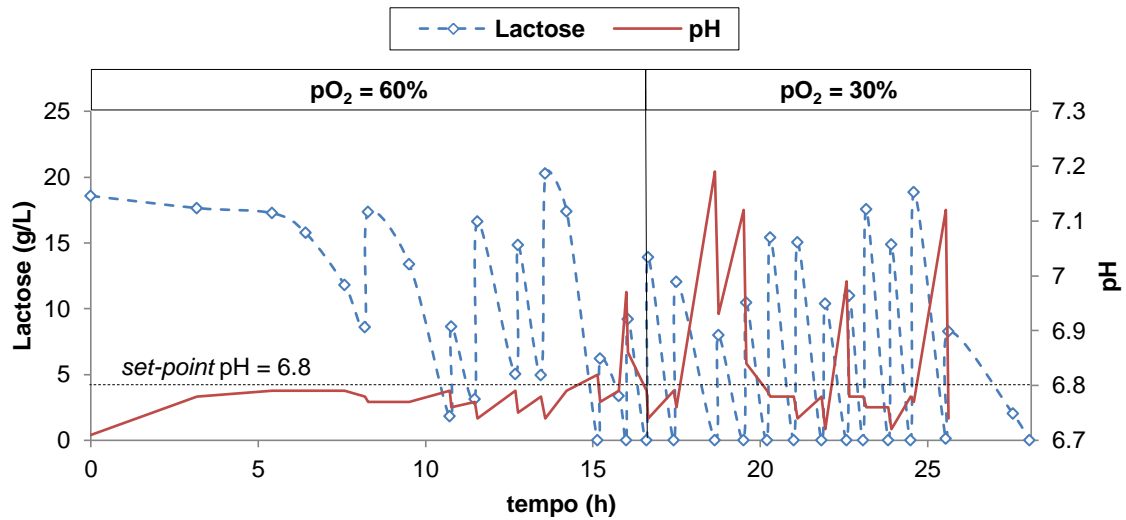


Figura 4-2 – Estratégia 1: Concentração de lactose e variação do pH *online* ao longo do tempo.

Pelo gráfico da Figura 4-2 é possível verificar a existência de alguns períodos em que o valor da lactose é nulo, o valor de pH esteve acima do valor de *set-point* estabelecido. No entanto, observou-se que nem sempre se verifica esse facto. A produção de ácidos orgânicos teve efeito no pH, fazendo o valor baixar. Por sua vez, a existência destes compostos fez aumentar a adição de amónia, de modo a manter o valor do pH estabelecido. Este aumento de adição de amónia poderá levar à acumulação podendo prejudicar a produção de PHB.

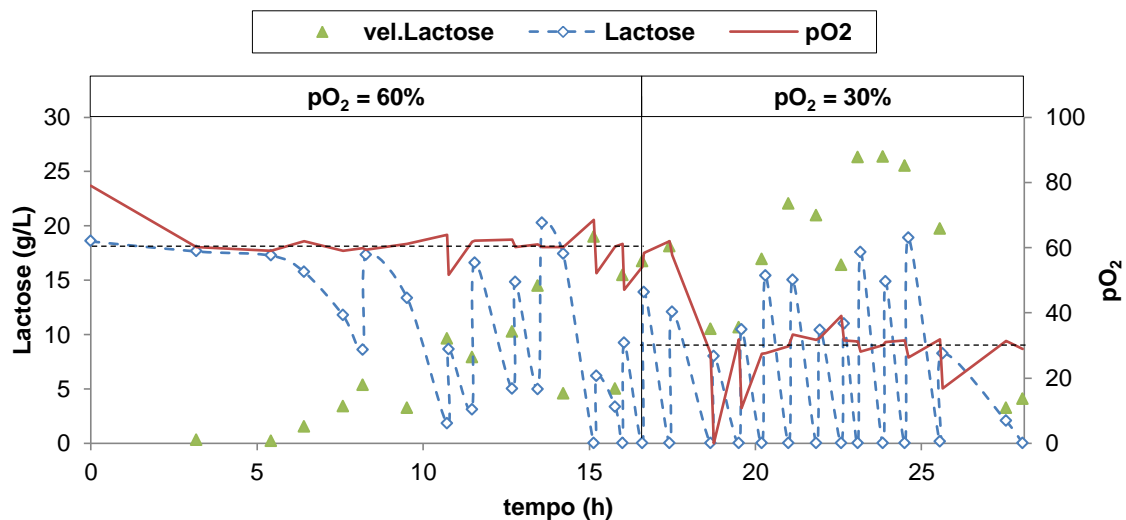


Figura 4-3 – Estratégia 1: Concentração e velocidade de consumo de lactose e variação do pO_2 *online* ao longo do tempo.

Pelo gráfico da Figura 4-3 verifica-se que a alteração do *set-point* da percentagem de oxigénio dissolvido de 60% para 30% teve como consequência o aumento da velocidade consumo de fonte de carbono. Não existiram variações indicativas no valor percentagem de oxigénio dissolvido nos períodos em que existiu ausência de fonte de carbono na cultura.

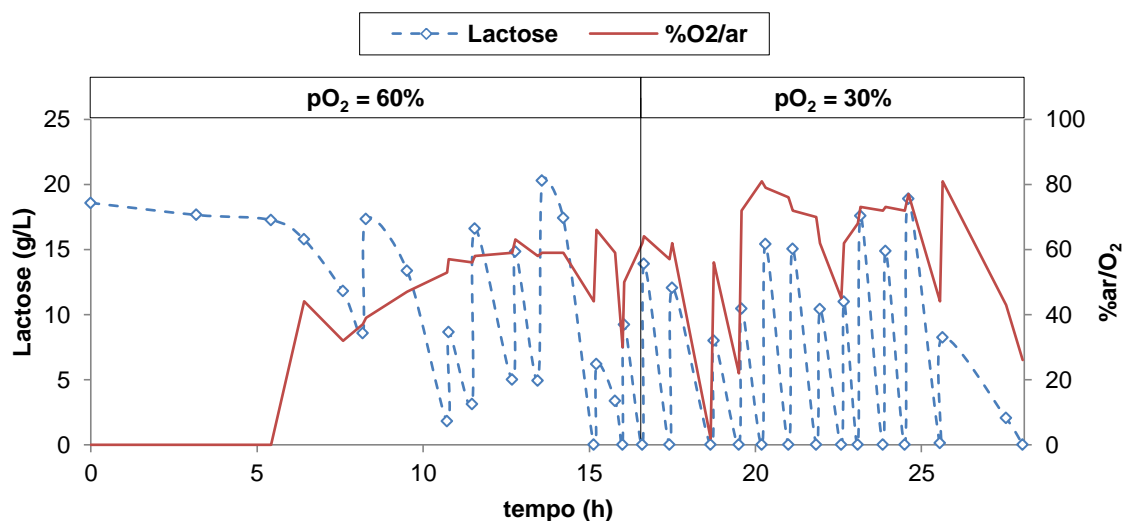


Figura 4-4 – Estratégia 1: Concentração de lactose e a variação da percentagem de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento *online* ($\%O_2/ar$)

No gráfico da Figura 4-4 observam-se variações de percentagem de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento ao longo da estratégia. É possível observar que existiram algumas variações da percentagem de oxigénio adicionado relacionadas com ausência de lactose na cultura, no entanto nem sempre se verifica este facto.

O gráfico da Figura 4-5 representa as necessidades de oxigénio da cultura através das variáveis de controlo (pO_2 , velocidade de agitação e $\%O_2/ar$).

Observando o gráfico da Figura 4-5 a partir das 5 horas até ao final da estratégia, a velocidade de agitação manteve-se no valor máximo para manter a pressão de oxigénio nos valores de controlo, 60% e a 30%. Em termo do oxigénio adicionado ao caudal de arejamento variou durante experiência de modo a manter os *set-point's* estabelecidos e acompanhar as necessidades da cultura.

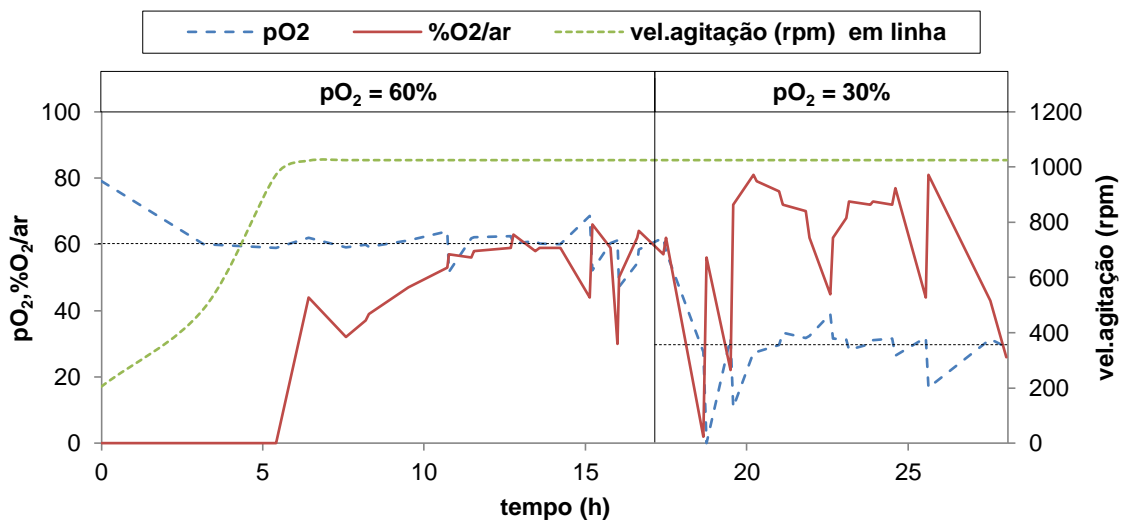


Figura 4-5 – Estratégia 1: Pressão de oxigênio (pO_2), de oxigênio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigênio ($\%O_2/ar$) e velocidade de agitação ($vel.agitação$) ao longo do tempo

Pela análise da estratégia foi possível concluir os seguintes pontos:

- Os momentos de ausência de lactose na cultura poderão ter prejudicado a produção e acumulação de PHB.
- A subida do valor de pH acima do *set-point* estabelecido ($pH=6.8$) poderá indicar ausência de lactose no meio.

4.1.2. Estratégia 2: alimentação de soro de leite por uma estratégia mista de pulsos e em contínuo

Esta estratégia de alimentação de soro de leite foi feita através de pulsos e em contínuo. Durante a fase exponencial, o volume dos pulsos foi ajustado de modo a manter os valores de concentração de lactose entre 20g/L a 50g/L. Durante a fase estacionária, a alimentação foi feita de modo contínuo de forma a manter os valores de concentração de lactose menor que 30 g/L. A estratégia de alimentação inicia-se com um valor de *set-point* de pressão de oxigênio dissolvido de 60%. Após o valor de densidade óptica ter alcançado valor de 100, o valor de *set-point* de pressão oxigênio dissolvido foi alterado para 30%.

No gráfico da Figura 4-6 estão representadas as concentrações de lactose, PHB e biomassa activa no decorrer da estratégia.

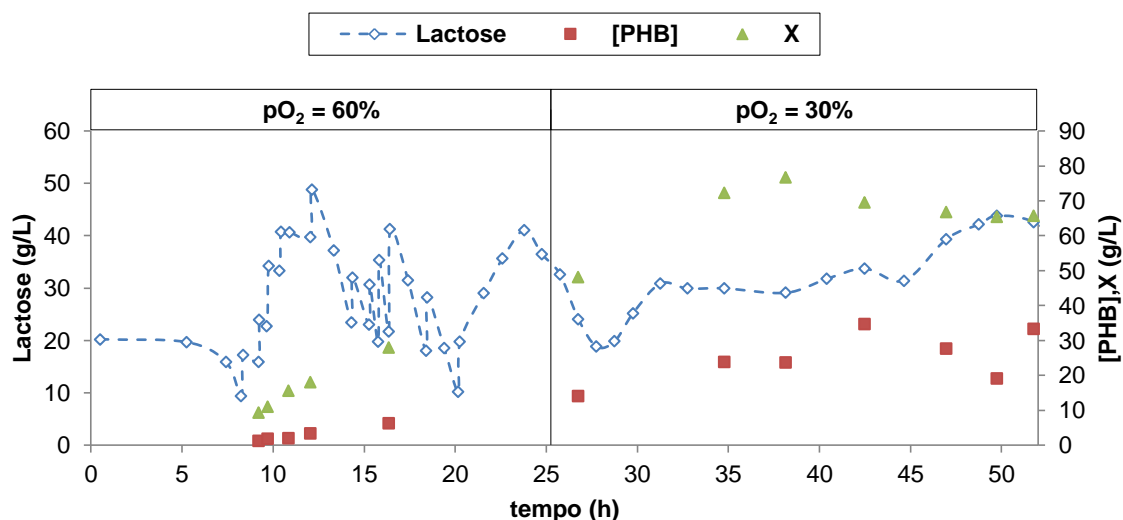


Figura 4-6 – Estratégia 2: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa ao longo do tempo

Ao contrário da estratégia anterior, como se pode observar através do gráfico da Figura 4-6 não existiu qualquer período em que o valor da concentração de lactose teve valor zero. A alteração do *set-point* da pressão de oxigénio dissolvido foi feita antes de alcançar a fase estacionária. Como não existiram períodos de ausência de lactose durante a estratégia seria espectável uma maior quantidade de PHB armazenado. Ao contrário da estratégia anterior (Figura 4-1), nesta estratégia, a lactose não assumiu valores nulos. Este facto poderá ser benéfico para a síntese de polímero.

Partindo das mesmas variáveis analisadas na estratégia anterior foi feita a mesma análise de modo a compreender o comportamento da lactose ao longo do tempo.

Os gráficos das figuras seguintes apresentam a variação de pH (Figura 4-7), pO_2 (Figura 4-8) e percentagem de oxigénio puro adicionada ao caudal de arejamento (Figura 4-9) e concentração de lactose ao longo tempo.

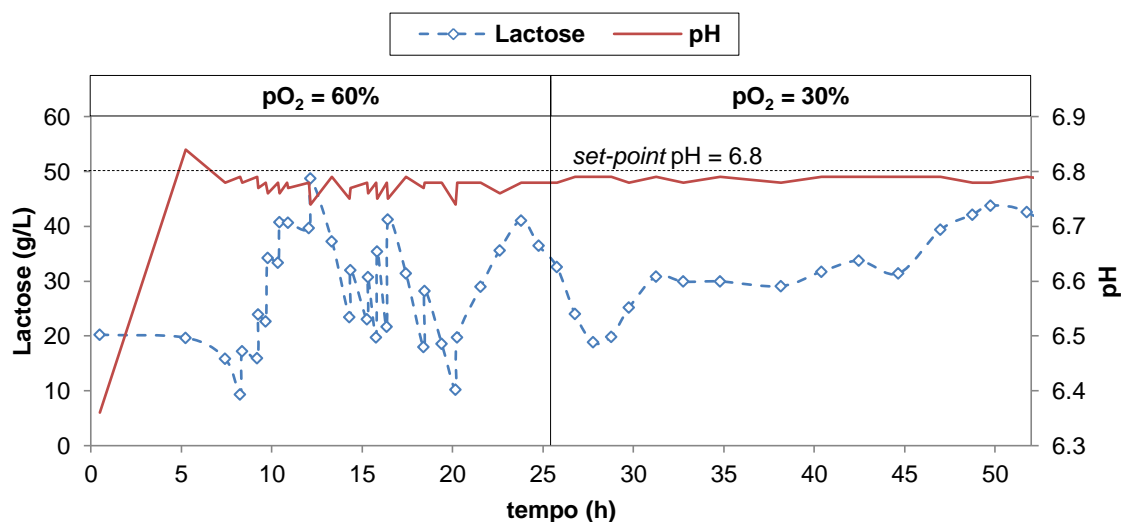


Figura 4-7 – Estratégia 2: Concentração de lactose e variação do pH *online* ao longo do tempo.

Nesta estratégia, ao contrário da estratégia anterior (Figura 4-2) não existiram períodos ausência de lactose. Pelo gráfico da Figura 4-7 é possível observar que o valor de pH apenas num momento, cerca das 5 horas, em que o valor de pH esteve acima do *set-point* mas não foi indicador da ausência de lactose no meio. A produção de ácidos orgânicos poderá ter tido influência o valor de pH.

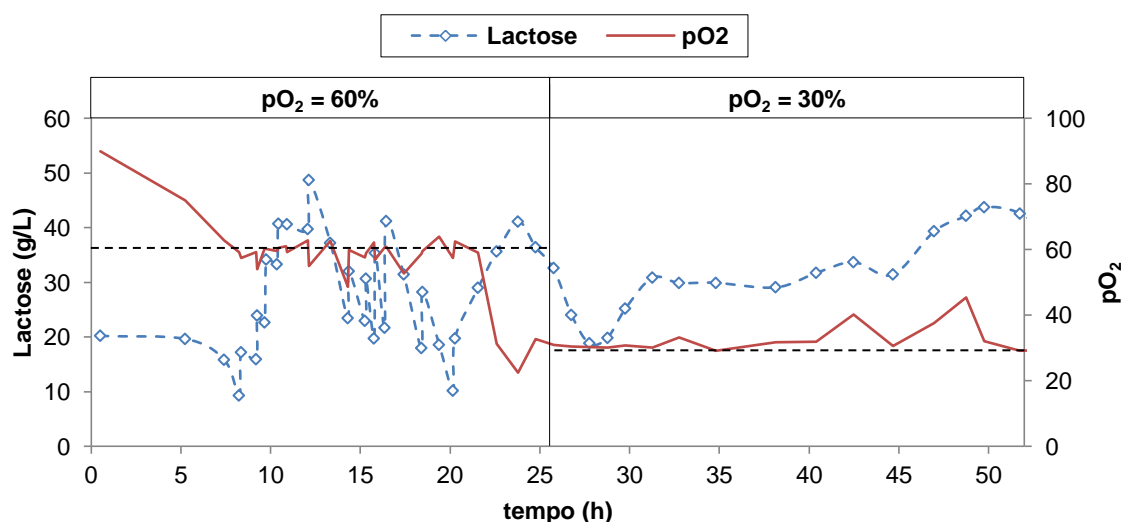


Figura 4-8 – Estratégia 2: Concentração de lactose e variação do pO₂ *online* ao longo do tempo.

No gráfico da Figura 4-8 verificaram-se alguns períodos (entre 7 e as 20 horas) durante os quais o valor de *set-point* de pressão de oxigênio dissolvido (60%) baixou a medida que fonte de carbono foi consumida. Após a alteração do *set-point* do oxigênio dissolvido, a alimentação de fonte de carbono foi feita em modo contínuo, não existiram variações significativas no valor da pressão de oxigênio dissolvido que comprovem o que se verificou na fase em que o valor de *set-point* de oxigênio dissolvido foi de 60%.

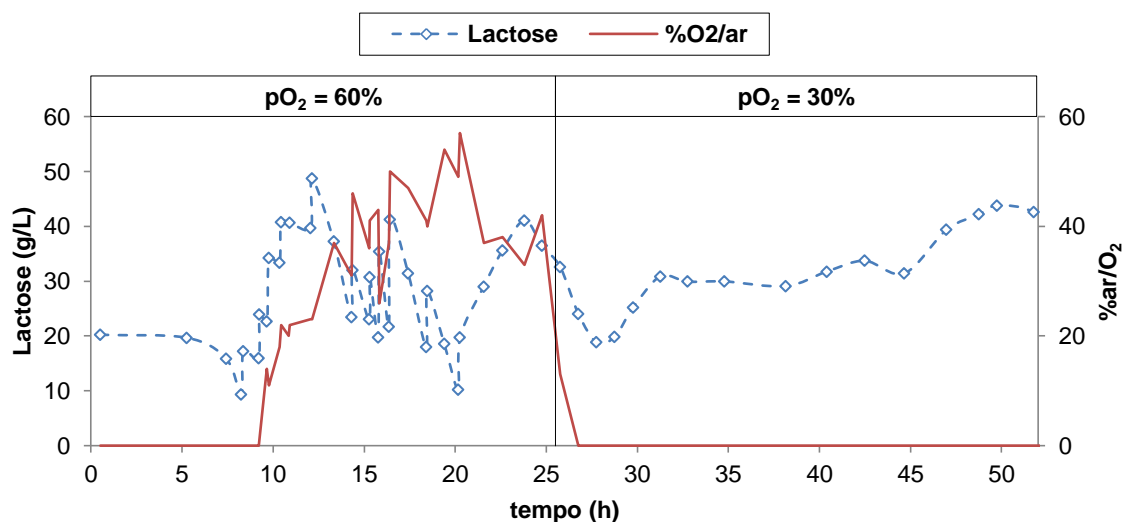


Figura 4-9 – Estratégia 2: Concentração de lactose e a variação da porcentagem de oxigênio puro adicionado ao caudal de arejamento *online* (%O₂/ar)

Na Figura 4-9 é possível observar que durante a fase em que o *set-point* de oxigênio dissolvido foi 60% houve maiores necessidades de adição de oxigênio puro ao caudal de arejamento por parte da cultura. Durante a fase em que o *set-point* de oxigênio dissolvido era de 30%, não foi adicionado oxigênio puro ao caudal de arejamento. Neste caso conclui-se que o oxigênio presente no caudal de arejamento seria suficiente para as necessidades da cultura.

O gráfico da Figura 4-10 representa as necessidades de oxigênio da cultura através das variáveis de controle (pO₂, velocidade de agitação e %O₂/ar).

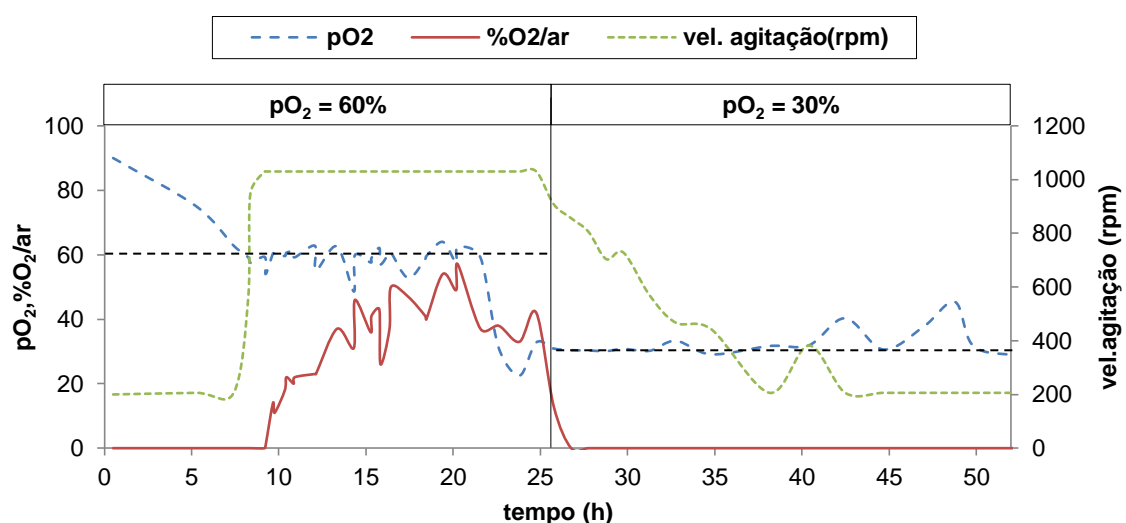


Figura 4-10 – Estratégia 2: Pressão de oxigênio (pO₂), de oxigênio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigênio (%O₂/ar) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo

Pela Figura 4-10 observa-se que durante a fase em que o *set-point* de oxigênio dissolvido a 60%, a velocidade de agitação teve no valor máximo (1000 rpm) após as 7 horas

e variando apenas no valor de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento de modo a manter a concentração de oxigénio dissolvido no valor de *set-point*.

Na fase em que *set-point* de oxigénio dissolvido foi 30%, o valor da percentagem de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigénio baixou até alcançar valor zero e os valores de velocidade de agitação assumiram os valores mínimos estabelecidos (200 rpm). Com isto, pode concluir-se que o oxigénio presente no caudal de arejamento seria suficiente para as necessidades da cultura. Pode também suspeitar-se que a cultura estivesse inibida por excesso de substrato pois a concentração de lactose (Figura 4-9) atingiu valores muito altos.

Para verificar esta hipótese sugere-se fazer um ensaio segundo nas condições de oxigénio mas com valores de concentração de lactose na alimentação mais baixos.

O gráfico da Figura 4-11 representa as concentrações de amónia, PHB e biomassa activa ao longo do tempo.

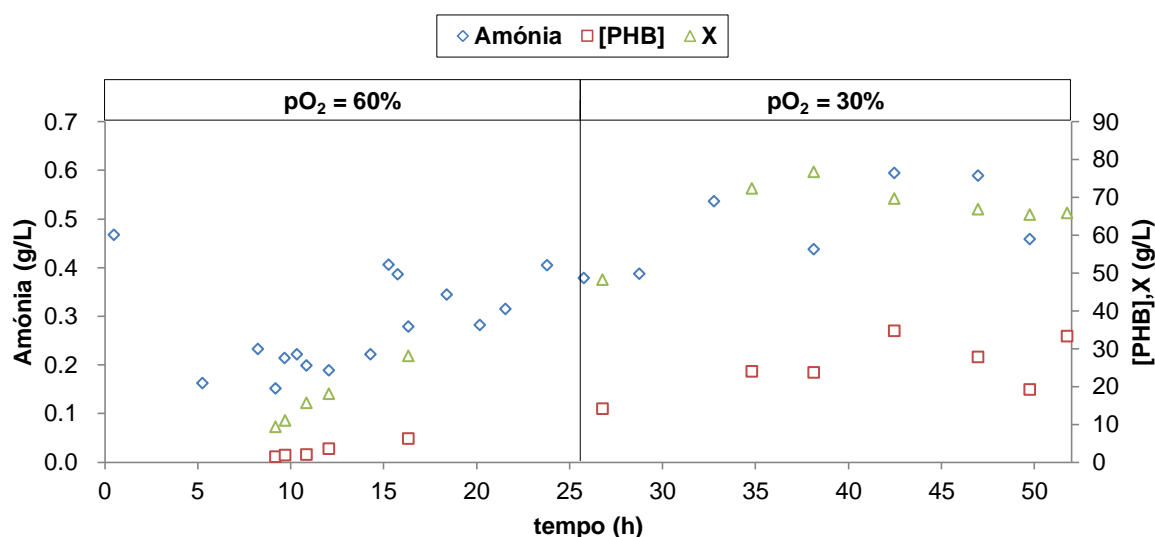


Figura 4-11 – Estratégia 2: Concentração de amónia, biomassa activa e PHB ao longo do tempo

Pela análise da Figura 4-11, poderá inferir-se que a concentração de amónia acumulada não prejudicou o crescimento celular. No entanto, na fase com *set-point* de oxigénio dissolvido de 30%, os valores de amónia acumulada foram superiores. A acumulação de amónia observada poderá ter afectado a síntese de PHB durante esta fase.

O gráfico da Figura 4-12 representa as concentrações de ácidos orgânicos produzidos, biomassa e PHB ao longo da estratégia.

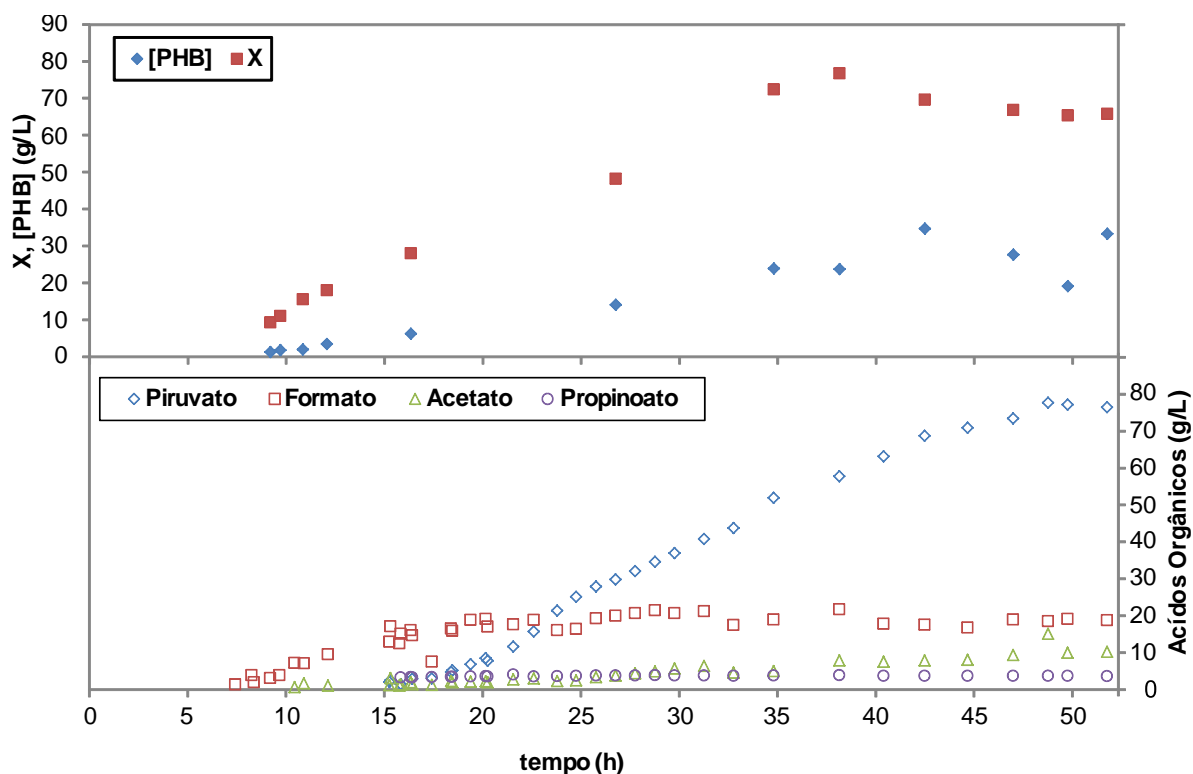


Figura 4-12 – Estratégia 2: Concentração de biomassa activa (X), PHB (no topo) e ácidos orgânicos (na base) ao longo do tempo

A produção de ácidos orgânicos como formato, acetato e propionato teve início na fase exponencial e a sua concentração permaneceu praticamente constante até ao final da cultura. É possível verificar uma concentração elevada de piruvato a partir das 31 horas. Após a alteração do *set-point* de oxigénio, a acumulação de lactose aumentou a produção de piruvato gerando acumulação no meio. A elevada produção de piruvato, originou uma descida acentuada no pH. Esta descida, por sua vez, implicou uma maior adição de amónia para manter o valor de pH estabelecido. Este levou a uma adição excessiva de amónia (Figura 4-11), o que poderá ter prejudicado a síntese de PHB. A produção de piruvato poderá ter inibido da cultura.

O gráfico da Figura 4-13 representa as concentrações de piruvato, PHB e biomassa activa no decorrer da estratégia.

Por observação da Figura 4-13 é possível concluir que a produção de piruvato poderá ter tido influência na produção de PHB. Com a produção de piruvato existe diminuição do valor de pH da cultura, como consequência existe um aumento da adição de amónia o que poderá provocar acumulação no meio (Figura 4-11).

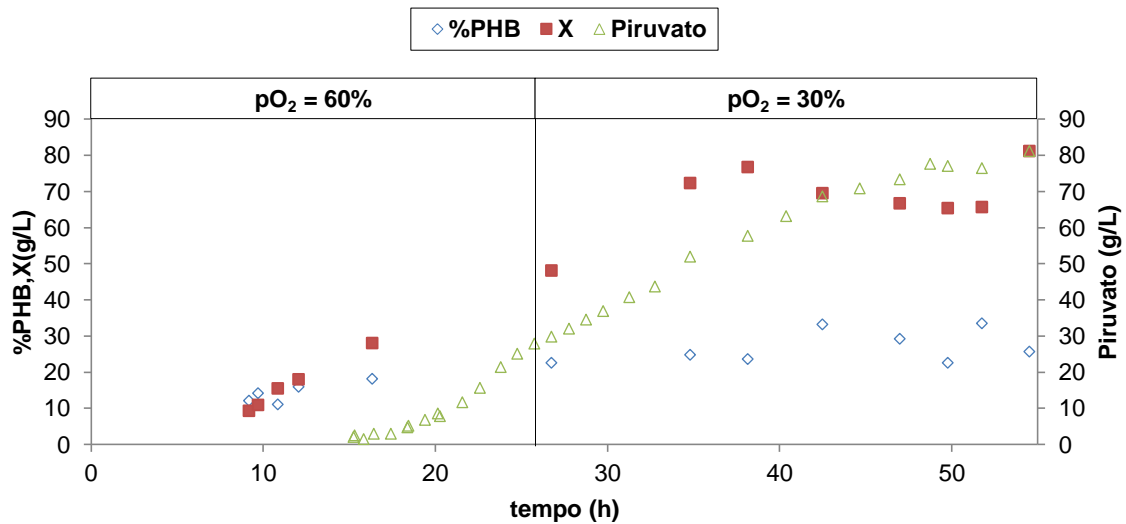


Figura 4-13 – Estratégia 2: Concentração de biomassa activa (X) e Piruvato e %PHB ao longo do tempo

4.1.3. Estratégia 3: alimentação de fonte de carbono comercial com base no valor de pH usando meio de cultura MR.

A alimentação de lactose foi feita por meio de pulsos. O volume dos pulsos foi ajustado de modo a manter o valor da concentração de lactose inferior a 10g/L. O pulso foi dado quando existiu uma subida drástica do valor de pH. O valor de *set-point* de pressão de oxigénio dissolvido foi mantido a 60%.

O gráfico da Figura 4-14 representa as concentrações de lactose, PHB e biomassa activa ao longo da estratégia.

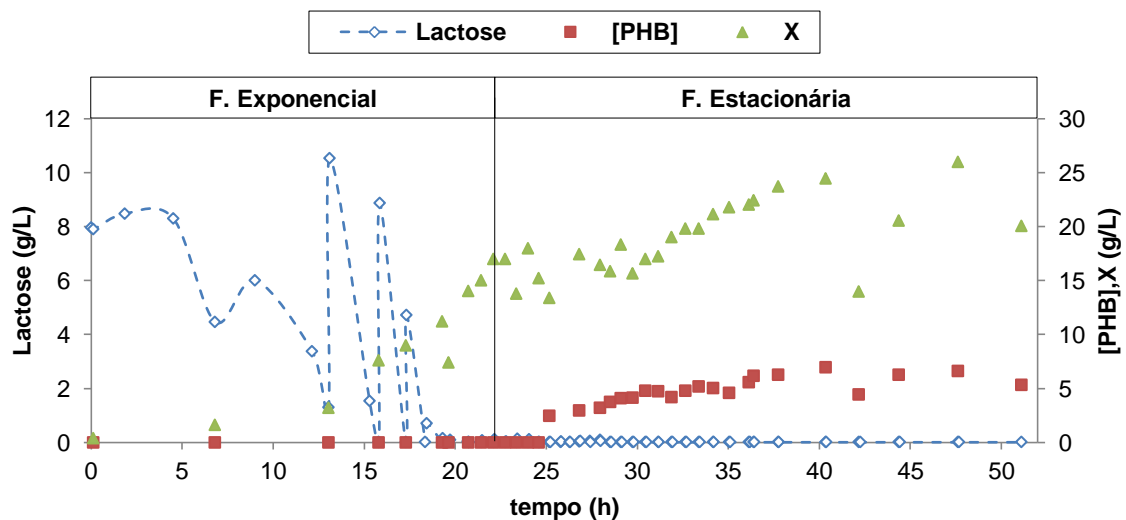


Figura 4-14 – Estratégia 3: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa ao longo do tempo

A concentração de lactose revelou-se ser muito baixa a partir das 20 horas de fermentação. Uma possível explicação foi o rápido consumo de lactose, no entanto, estes valores de concentração de lactose podem reflectir um erro de análise quantitativa (HPLC), porque estas análises foram feitas após a realização da experiência laboratorial, podendo ter ocorrido consumo de lactose na amostra durante este período.

Apesar de existência destes períodos, o crescimento celular não foi prejudicado. No entanto, a existência de períodos de ausência de lactose no caldo fermentativo pode ter afectado a produção de PHB. Como já foi referido, os genes de produção de PHB são activados na presença de lactose.

O gráfico da Figura 4-15 apresenta a variação de pH e a concentração de lactose no decorrer da estratégia.

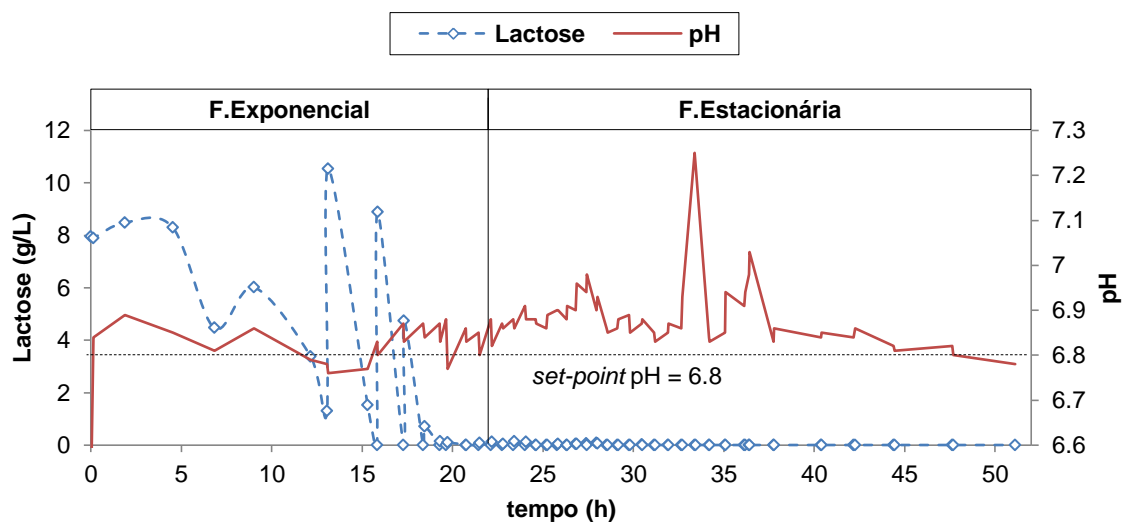


Figura 4-15 – Estratégia 3: Concentração de lactose e variação do pH *online* ao longo do tempo

Como já foi referido, esta estratégia de alimentação de lactose comercial baseou-se na subida repentina do valor de pH. Como se pode observar no gráfico da Figura 4-15 existiram vários momentos em que o valor de pH esteve acima do valor de *set-point* estabelecido.

O gráfico da Figura 4-16 apresenta as necessidades de oxigénio do caldo fermentativo através das variáveis de controlo (pO_2 , velocidade de agitação e $\%O_2/ar$).

Observa-se no gráfico da Figura 4-16 que entre as 12 horas e as 38 horas, a velocidade de agitação manteve-se no valor máximo estabelecido, para que se mantivesse oxigénio dissolvido a 60% no interior do bioreactor. É possível observar que a percentagem

de oxigénio adicionado ao arejamento encontra-se relacionada com o rápido consumo de lactose demonstrando assim grande actividade na cultura.

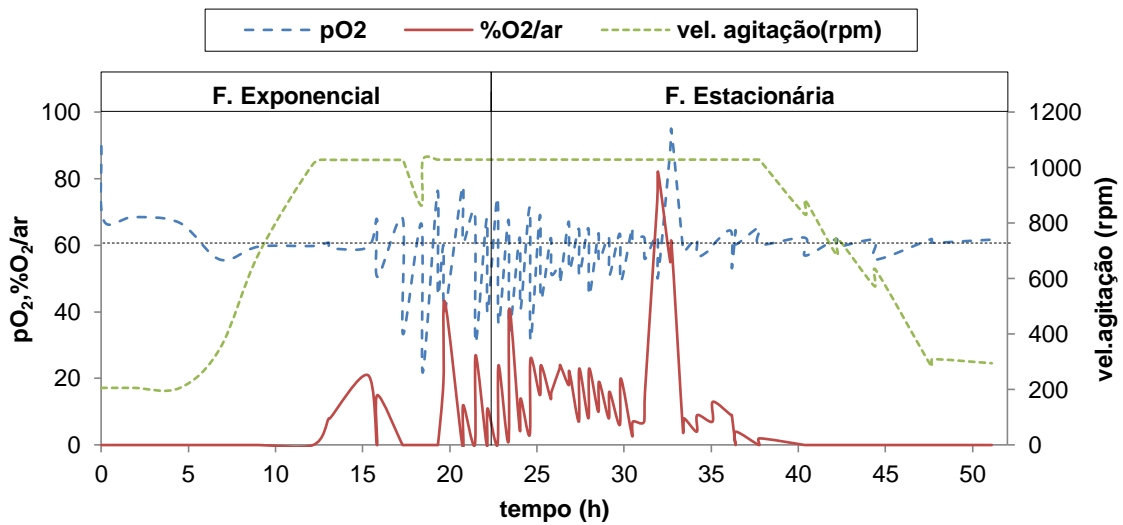


Figura 4-16 – Estratégia 3: Pressão de oxigénio (pO₂), de oxigénio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigénio (%O₂/ar) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo

O gráfico do Figura 4-17 representa as concentrações de amónia, PHB e biomassa activa ao longo da estratégia.

É possível observar gráfico da Figura 4-17 que a partir das 15 horas existe um aumento na acumulação de amónia no caldo fermentativo. Acumulação de amónia poderá ter um efeito negativo na produção de PHB por parte da cultura.

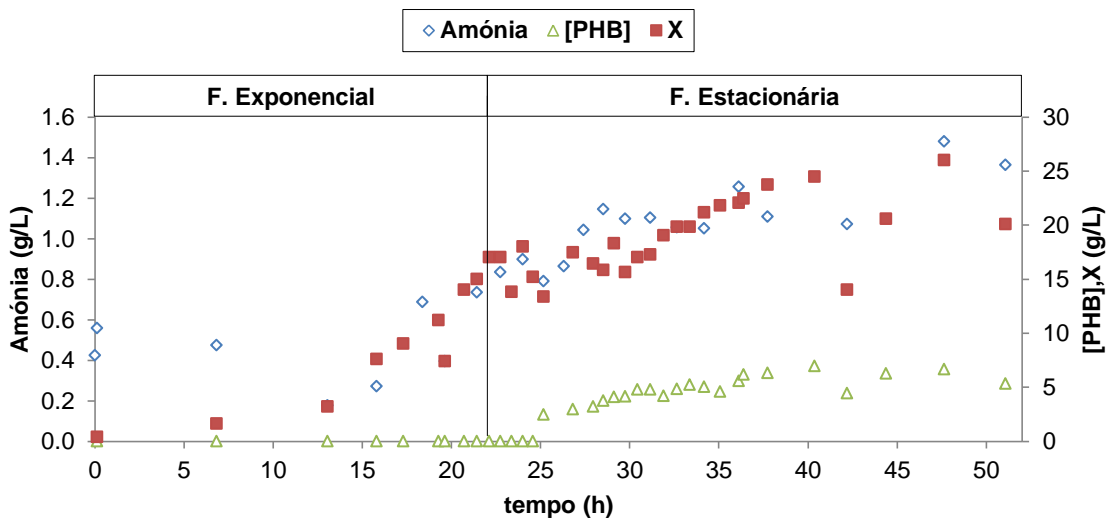


Figura 4-17 – Estratégia 3: Concentração de amónia, biomassa activa e PHB ao longo do tempo

A Figura 4-18 representa as concentrações de ácidos orgânicos produzidos, biomassa e PHB ao longo da estratégia.

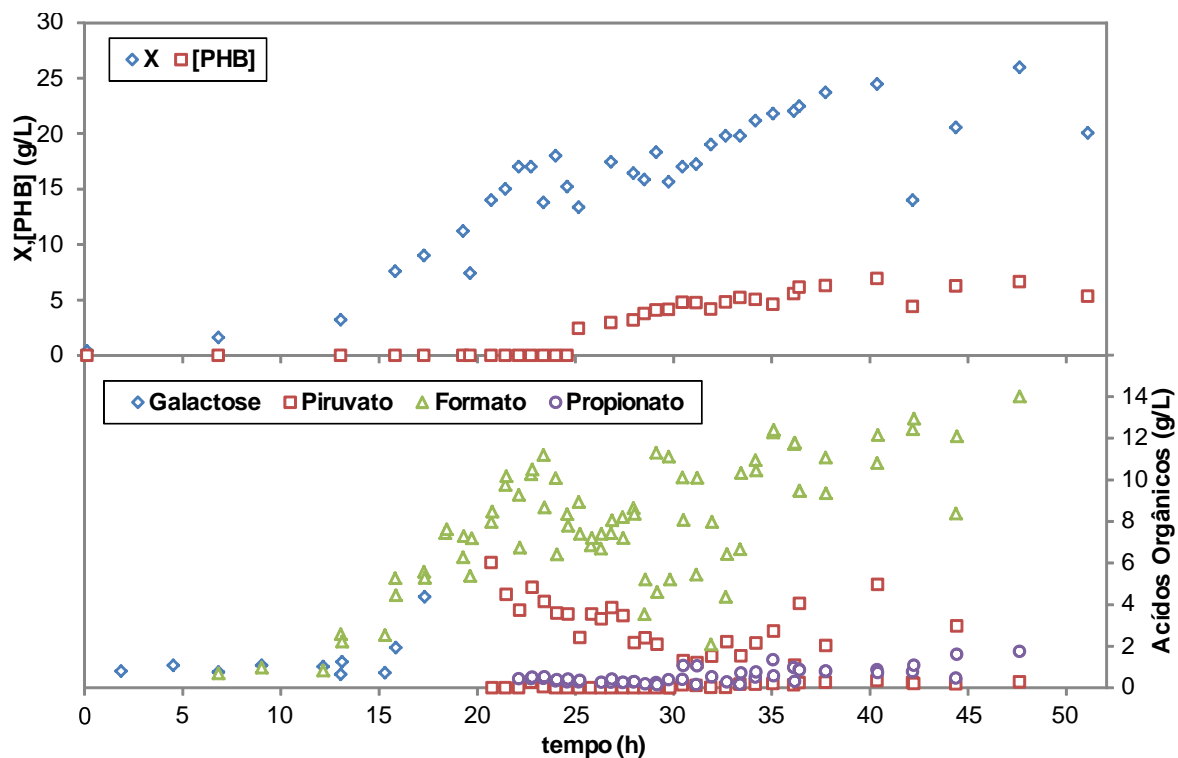


Figura 4-18 – Estratégia 3: Concentração de biomassa activa (X), PHB (no topo) e ácidos orgânicos (na base) ao longo do tempo

Como se pode observar a Figura 4-18, a produção de formato iniciou-se durante a fase exponencial às 6 horas. Existem alguns pontos ao longo da cinética, em que a cultura poderá estar a consumir ácidos orgânicos como fonte de carbono, o que justifica o decréscimo da concentração de ácidos orgânicos em alguns períodos de tempo.

No gráfico da Figura 4-19 estão representadas as concentrações de formato, PHB e biomassa activa no decorrer da estratégia.

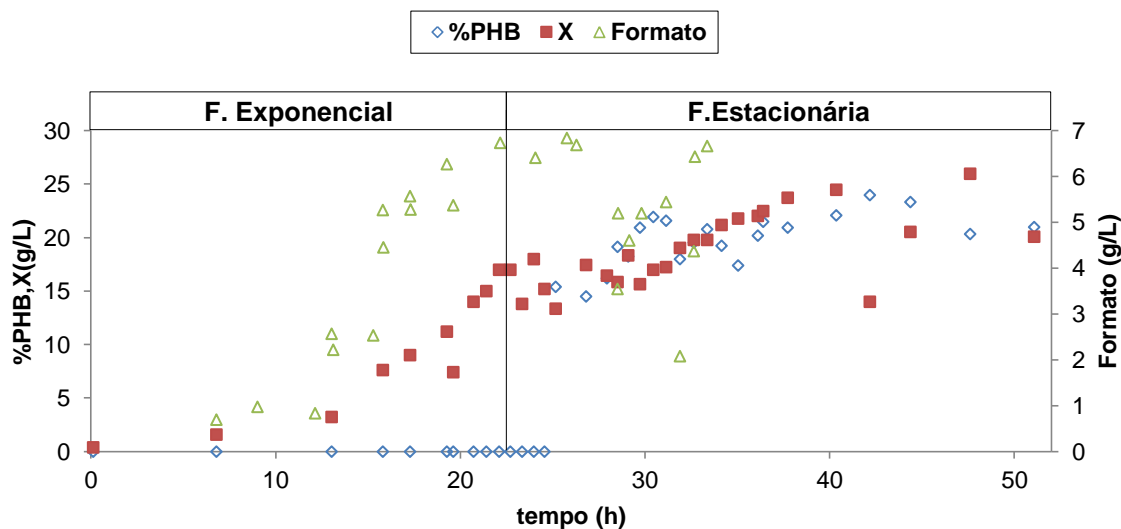


Figura 4-19 – Estratégia 3: Concentração de biomassa activa (X),formato e %PHB ao longo do tempo

Pela Figura 4-19 é possível concluir que acumulação de formato poderá dever-se ao desvio de lactose. Esta acumulação faz diminuir o valor de pH do meio fazendo aumentar o volume de amónia adicionado de modo a manter o valor de *set-point* de pH. O que levou à acumulação de amónia que é visível na Figura 4-17. É possível observar que no período entre as 25 e as 32 horas, na ausência de lactose, formato poderá ter sido utilizado como fonte de carbono.

4.1.4. Estratégia 4: alimentação de fonte de carbono comercial com base no valor de pH usando meio de cultura LB

A estratégia utilizada foi semelhante à estratégia 3 diferenciando-se no meio de cultura utilizado.

O gráfico da Figura 4-20 estão representadas as concentrações de lactose, PHB e biomassa activa durante a aplicação da estratégia.

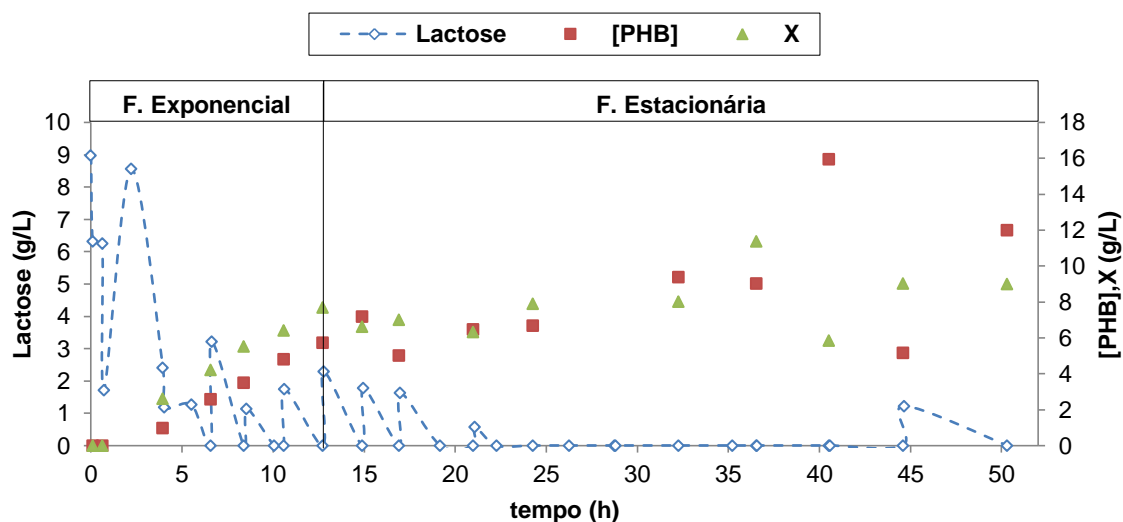


Figura 4-20 – Estratégia 4: Concentração de Lactose, PHB e biomassa activa ao longo do tempo

Pelo gráfico apresentado na Figura 4-20 é possível verificar que entre as 22h e 45h de fermentação, a concentração de lactose teve o valor zero. Possível explicação foi o rápido consumo de lactose. Estes valores também podem ser associados a erros experimentais pela aplicação do método analítico

O gráfico da Figura 4-21 apresenta a variação de pH e a concentração de lactose ao longo tempo da estratégia.

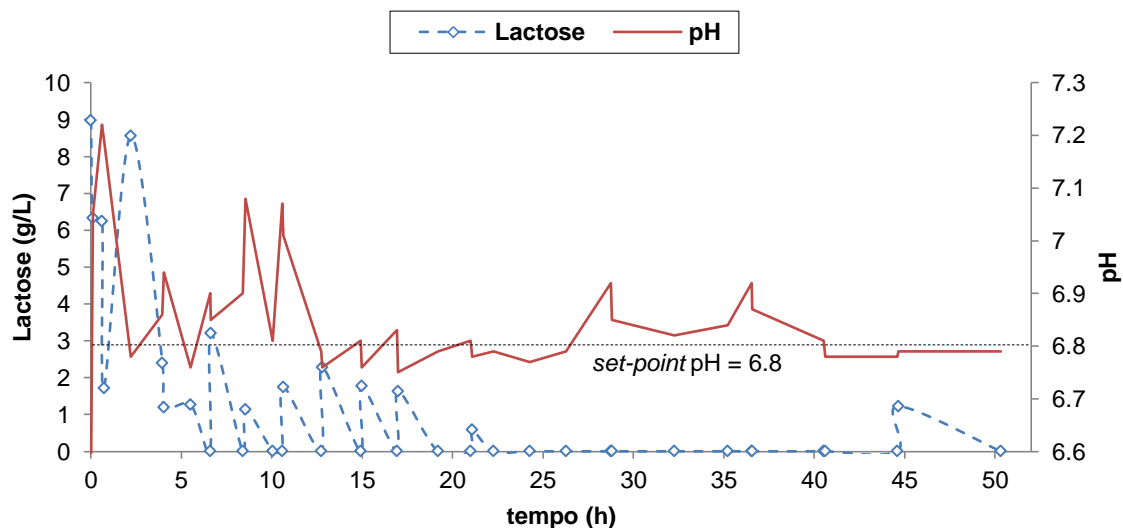


Figura 4-21 – Estratégia 4: Concentração de lactose e variação do pH *online* ao longo do tempo

A estratégia de alimentação de fonte de carbono foi igual à estratégia anterior: baseou-se na subida abrupta do valor de pH, como é possível verificar pelo gráfico da Figura 4-21.

O gráfico da Figura 4-22 apresenta as necessidades de oxigênio do caldo fermentativo através das variáveis de controlo (pO_2 , velocidade de agitação e $\%O_2/ar$).

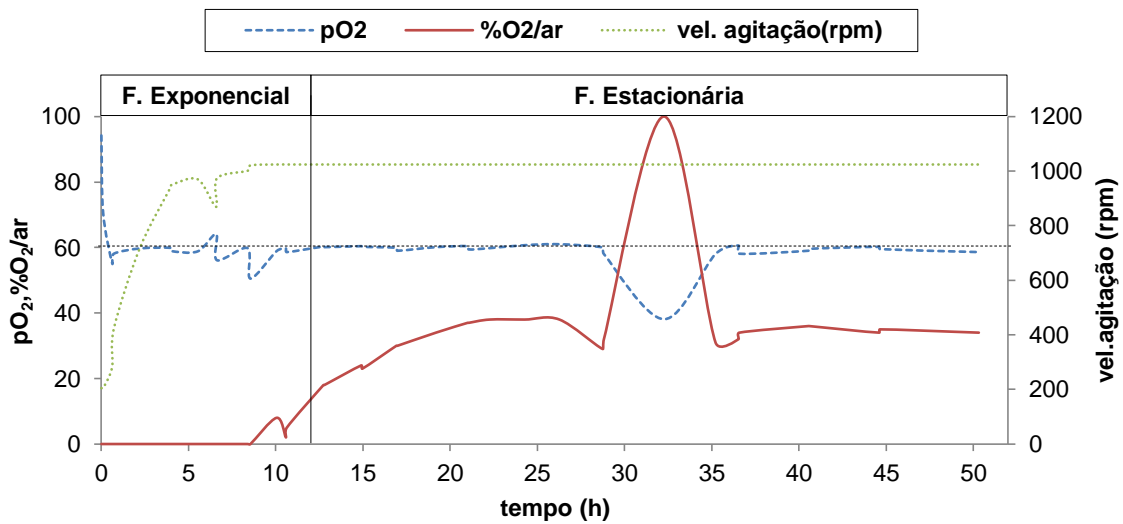


Figura 4-22 – Estratégia 4: Pressão de oxigênio (pO_2), de oxigênio puro adicionado ao caudal de arejamento de oxigênio ($\%O_2/ar$) e velocidade de agitação (vel.agitação) ao longo do tempo.

Observando o gráfico da Figura 4-22, a velocidade de agitação aumentou durante a fase exponencial e manteve-se até ao final da fase estacionária. Após 20h do início da estratégia o valor de oxigênio puro adicionado permaneceu praticamente constante (aproximadamente 25%). Houve apenas um momento, à 35ª hora, em que houve um reforço de oxigênio adicionado ao arejamento. A velocidade de agitação foi ajustada de modo a manter o pO_2 de 60%.

O gráfico da Figura 4-23 apresenta as concentrações de ácidos orgânicos, biomassa e PHB produzidas ao longo do tempo.

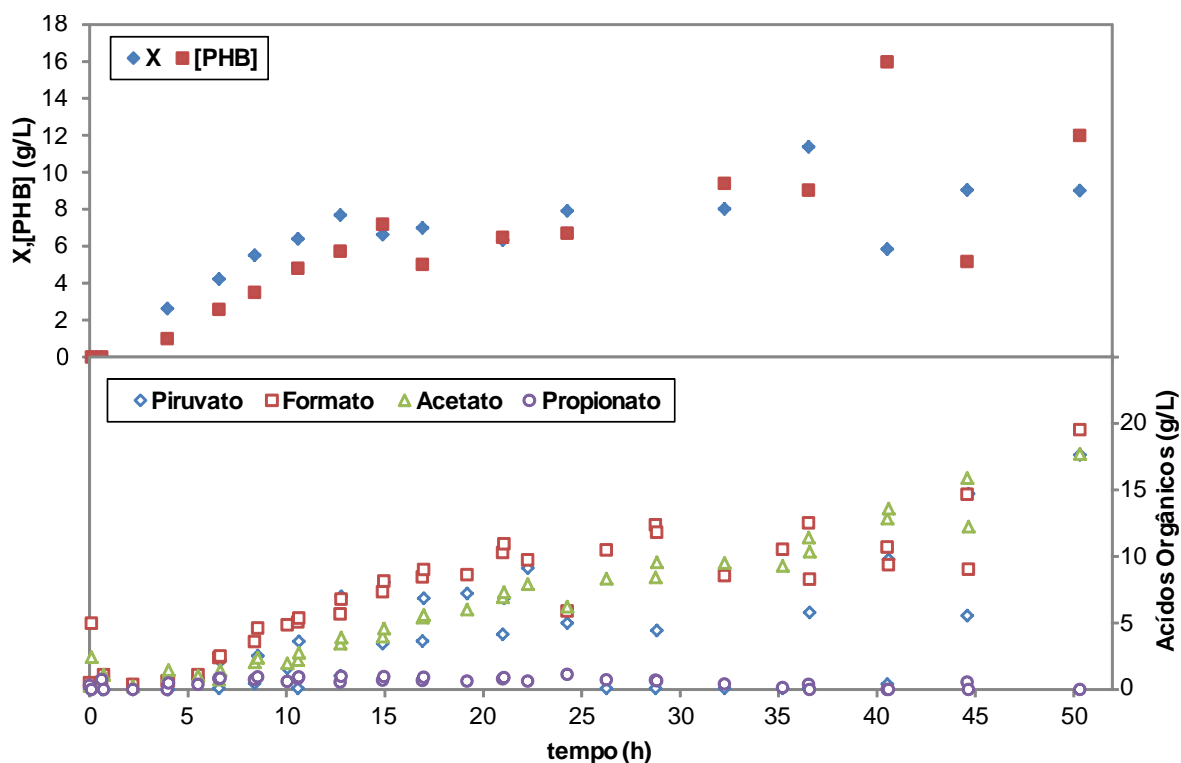


Figura 4-23 – Estratégia 4: Concentração de biomassa activa (X), PHB (no topo) e ácidos orgânicos (na base) ao longo do tempo

Por observação dos gráficos presentes na Figura 4-23 é possível observar a produção de ácidos orgânicos ao longo de estratégia. Pode-se salientar a produção de dois em particular, formato e acetato, que apresentam um padrão de produção semelhante.

No gráfico da Figura 4-24 estão representadas as concentrações de formato, PHB e biomassa activa no decorrer da estratégia.

Por observação do gráfico da Figura 4-24 é possível concluir que a produção de piruvato e formato poderão ter tido influência na produção de PHB. Com a produção de ácidos orgânicos faz tem efeito sob o valor de pH fazendo o baixar. Com esta diminuição existiu uma maior adição de amónia e a consequente acumulação (Figura 4-23). Em alguns momentos em que lactose esteve ausente (Figura 4-21), ácidos orgânicos como formato e piruvato poderão ter sido usado como fonte de carbono.

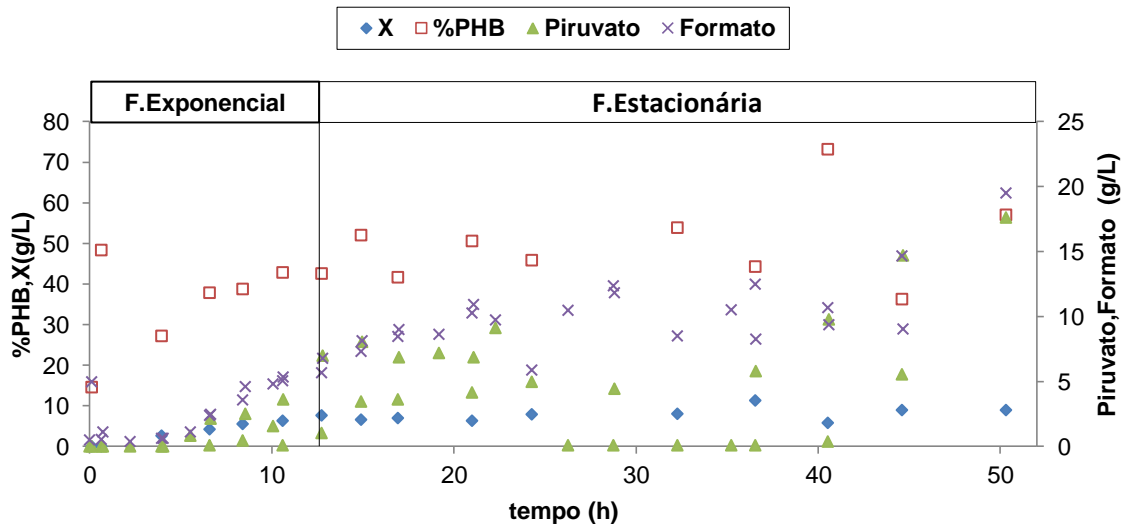


Figura 4-24 – Estratégia 4: Concentração de biomassa activa (X),piruvato, formato e %PHB ao longo do tempo

A Tabela 4-1 resume todos os parâmetros cinéticos calculados das estratégias.

Tabela 4-1 – Parâmetros cinéticos calculados a partir dos resultados experimentais

	Estratégia 1	Estratégia 2	Estratégia 3	Estratégia 4
μ (h ⁻¹)	0.24	0.26	0.16	0.12
r_{PHB} (g/L.h)	1.15	1.10	0.17	0.24
q_{PHB} (h ⁻¹)	0.01	0.01	0.01	0.01
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.23	0.35	0.06	0.08
$Y_{PHB/S}$ (gPHB/gS)	0.12	0.12	0.02	0.08
%PHB _{máx}	28.47	33.59	23.96	73.22

As estratégias 1 e 2 apresentam rendimentos biomassa/lactose serem diferentes, no entanto obtiveram taxas de crescimento específicas e percentagens máximas de PHB produzido algo semelhantes e rendimentos PHB/lactose iguais.

De todas a estratégias analisadas, a estratégia 4 foi a que apresentou a maior percentagem de PHB produzido no entanto foi a que apresentou a taxa de crescimento específica menor das quatro estratégias.

Pode concluir-se pela análise das 4 estratégias que existem pontos a considerar em estratégias futuras para a produção de PHB.

- Evitar períodos de ausência de lactose no meio, a ausência da mesma pode prejudicar tanto a produção de PHB como futuras gerações de *Escherichia Coli* recombinante.

- A alimentação de lactose deverá possuir uma concentração inferior a 20 g/L.
- Concentrações de lactose elevadas, acima do valor anteriormente referido, levam à produção de ácidos orgânicos que levam a inibição da cultura. Com concentrações menores também existe produção de ácidos orgânicos mas em quantidades menores.

- A acumulação de ácidos orgânicos levam a maior adição de amónia para manter o valor do pH no *set-point*. Esta maior adição pode levar à acumulação e à consequente inibição por amónia.

É necessário que a estratégia de alimentação de soro seja feita em contínuo com diferentes concentrações de modo a perceber a influência da concentração da alimentação na produção de PHB assim como verificar possíveis inibições por produção de ácidos orgânicos e/ou por acumulação de amónia.

4.2.Determinação experimental do coeficiente de transferência de massa de oxigénio

Para determinação do coeficiente de transferência de massa de oxigénio foi necessário determinar a concentração de saturação de oxigénio para as condições de operação de cada estratégia.

É possível observar pelo gráfico da Figura 4-25, para a temperatura do ensaio ($T=37^{\circ}\text{C}$) a concentração de saturação de oxigénio de dissolvido em água é 6.71 mg/L.

Foram feitos ensaios a para determinação a diferentes velocidades de agitação e foram determinados os coeficientes de transferência de massa de oxigénio correspondentes.

As velocidades de agitação e a fase exponencial de cada ensaio estão representados pelos gráficos da Figura 4-26. O valor do coeficiente de transferência de massa é valor do declive da recta traçada.

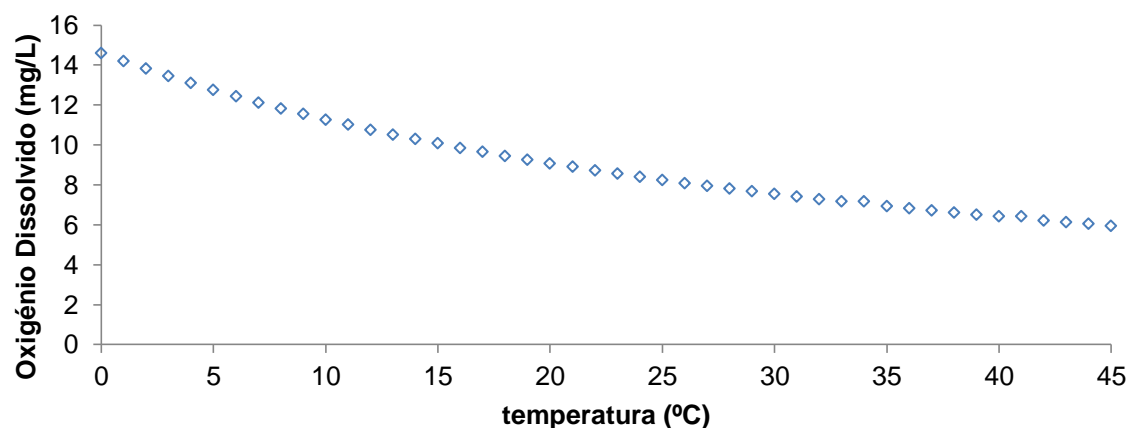


Figura 4-25 – Concentração de saturação Oxigénio Dissolvido em água em função da temperatura (Fonte: <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms52.cfm>)

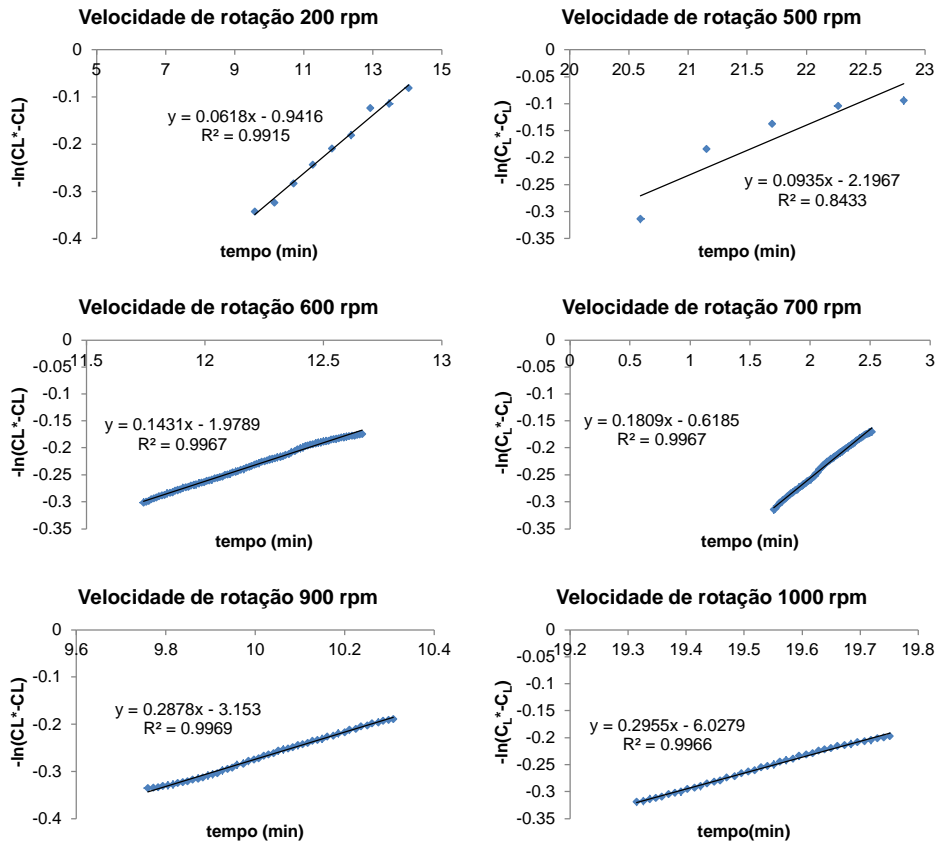


Figura 4-26 – Ensaio de determinação do coeficiente de transferência de massa em diferentes velocidades.

Após a determinação de cada coeficiente de transferência de massa estabeleceu-se um ajuste em função da velocidade de agitação que permita estimar este coeficiente numa gama de valores entre 200 e 1000 rpm (Figura 4-27).

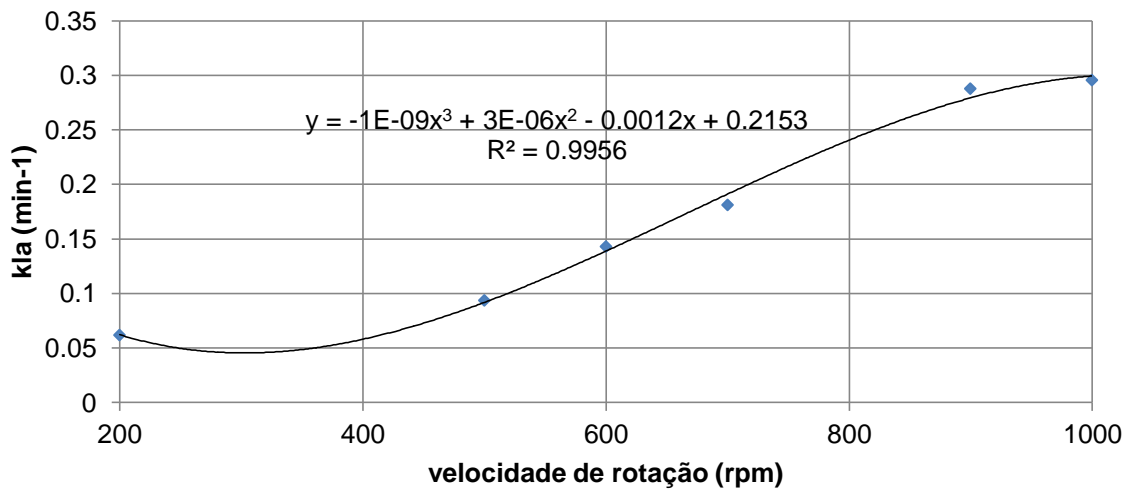
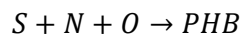
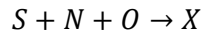


Figura 4-27 – Coeficiente de transferência de massa em função da velocidade de agitação para o regime de funcionamento das estratégias

4.3. Modelo dinâmico

O objectivo foi obter um modelo matemático que descreva a dinâmica de produção de PHB partindo uma cultura de *Escherichia Coli* recombinante. O modelo descrito tem como base o Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos descrito por Bastin & Dochain.

O mecanismo de produção de PHB por meio de cultura pura de *Escherichia Coli* recombinante pode ser descrito pelas seguintes reacções:



Neste modelo considera-se que o crescimento celular está associado à produção de polihidroxibutirato (PHB). A fonte de carbono (S) utilizada é a lactose presente no soro de leite, a fonte de azoto (N) é a amónia e oxigénio (O) está presente no caudal de arejamento do fermentador.

O modelo foi construído segundo os seguintes pressupostos:

- A cultura de *Escherichia Coli* recombinante converte directamente lactose em PHB;
- A fonte de carbono, lactose, é usada no crescimento associado de biomassa e produção de PHB (α) e de metabolitos secundários (β).
- Oxigénio presente caudal de arejamento propícia crescimento e manutenção da actividade celular;
- Fonte de azoto, neste caso amónia, foi usada para manter o funcionamento da actividade enzimática da cultura.
- No modelo não foi incluída a produção qualquer ácido orgânico resultante do metabolismo da cultura.

O modelo proposto baseia-se em balanços de massa associados a equações cinéticas:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_1(S, OD)X - DX$$

Equação 4-1

$$\frac{dS}{dt} = -v_1(S, N, OD)X + D(S_F - S)$$

Equação 4-2

$$\frac{dN}{dt} = -v_2(N)X + D(N_F - N)$$

Equação 4-3

$$\frac{dPHB}{dt} = \mu_2(S, N, OD)X - DPHB$$

Equação 4-4

$$\frac{dV}{dt} = F_S + F_N - F_{Out} = F_{in} - F_{out} = DV - F_{out}$$

Equação 4-5

Em que: X – Concentração celular, g/L; S – Concentração de Lactose; N – Concentração de Amónia; PHB – Concentração de PHB; OD – Concentração de Oxigénio Dissolvido; V – Volume de reactor; D – taxa de diluição (F_{in}/V), h^{-1} ; F_{in} – caudal volumétrico de entrada; F_{out} – caudal volumétrico de saída; F_S – caudal volumétrico de entrada de lactose; S_F – Concentração de Lactose na alimentação; F_N – Caudal de volumétrico de entrada de Amónia e N_F – Concentração de Amónia na alimentação.

As cinéticas de crescimento, consumo e produção são descritas pelas seguintes equações. Nas equações não foram considerados os seguintes pontos:

- A influência da amónia no crescimento celular não foi contabilizada;
- Não foram incluídos os termos de inibição nas equações de consumo de lactose e amónia;
- Não foram incluídos a influência da concentração de oxigénio dissolvido e do valor de pH na cultura.

$$\mu_1(S) = \frac{\mu_{máx}S}{K_S + S}$$

Equação 4-6

$$\sigma_1(S, N) = \alpha \left(\frac{\mu_{máx}S}{K_S + S} \right) \left(\frac{q_{máx}N}{K_N + N} \right) + \beta$$

Equação 4-7

$$v_1(S, N) = \frac{\mu_1(S)}{Y_{\frac{S}{X}}} + \frac{\sigma_1(S, N)}{Y_{\frac{P}{S}}}$$

Equação 4-8

$$q_1(N) = \frac{q_{máx}N}{K_N + N}$$

Equação 4-9

$$v_2(N) = \frac{q_1(N)}{Y_{\frac{X}{N}}}$$

Equação 4-10

$$\mu_2(S, N) = \frac{\sigma_1(S, N)}{Y_{\frac{PHB}{X}}} = \sigma_1(S, N) \frac{Y_{\frac{X}{S}}}{Y_{\frac{PHB}{S}}}$$

Equação 4-11

Em que: μ_1 - velocidade de produção de células; μ_2 - velocidade de produção de PHB; ν_1 e ν_2 – velocidade específica de consumo de lactose e amónia; σ_1 – velocidade específica de produção de PHB.

No modelo que está a ser estudado foi aplicado o princípio de parcimónia daí a utilização de equações cinéticas relativamente simples. O princípio de parcimónia baseia-se na utilização de um número reduzido de pressupostos e conjecturas de modo a obter um modelo simples e capaz de traduzir o máximo de informação sem comprometer a sua simplicidade. Com o aumento da complexidade do modelo aumenta o número de parâmetros tornando complicada a identificação destes, sobretudo quando estes parâmetros não são linearmente independentes.

Para testar a capacidade de previsão do modelo e identificação de parâmetros foram feitas três diferentes abordagens:

- Abordagem sem ajuste dos parâmetros cinéticos;
- Abordagem com ajuste dos parâmetros cinéticos entre cada pulso;
- Abordagem com ajuste de todos parâmetros cinéticos por meio de um algoritmo de optimização não linear.

4.3.1. Abordagem sem ajuste dos parâmetros cinéticos

Nesta abordagem foram utilizados parâmetros cinéticos determinados a partir dos resultados experimentais de uma das estratégias anteriormente analisadas. Neste caso, foram utilizados os parâmetros cinéticos e resultados experimentais da estratégia 1.

Na aplicação do modelo foram usados parâmetros cinéticos resultantes dos resultados experimentais e foram feitas as seguintes considerações:

- A alimentação de fonte de carbono foi feita por meio de pulsos. O volume do pulso é ajustado de modo a manter essa concentração no interior. Cada pulso é dado quando o valor de concentração de lactose é inferior a 0.5 g/L.
- A alimentação de amónia é feita em contínuo e a pressão do oxigénio dissolvido foi considerado contante.
- Antes do pulso de lactose ser dado é retirada uma amostra com volume fixo de 6 ml.

Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 4-2

Tabela 4-2 – Parâmetros utilizados no modelo de simulação

$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0.58	S_F (g/L)	271.37
$q_{\text{máx}}$ (h^{-1})	1.55	N_F (g/L)	280
K_S (g/L)	7.78	F_N (L/h)	0.00358
K_N (g/L)	3.3	$Y_{X/S}$ (g de X/g de S)	0.23
α	1	$Y_{\text{PHB/S}}$ (g de PHB/g de S)	0.12
β	0.5	$Y_{X/N}$ (g de X/g de N)	0.47

Os parâmetros α e β foram assumidos. Os valores rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose foram calculados de acordo com descrito no capítulo 3.4. Os valores de K_N e K_S estão calculados no anexo B. O valor do caudal de entrada de amónia é a razão entre o volume de gasto de amónia pela duração da estratégia.

No gráfico da Figura 4-28 estão representadas os resultados experimentais da estratégia 1 e a dinâmica simulada pelo modelo.

Por observação do gráfico da Figura 4-28 é possível verificar a aplicação dos parâmetros cinéticos descritos na Tabela 4-2

Tabela 4-2 juntamente com as considerações acima descritas que o modelo não descreve a dinâmica da produção. Nenhuma das variáveis de estado do modelo se ajusta aos pontos experimentais da estratégia utilizada.

Também se verifica que perto das 20 horas o bioreactor atinge a sua capacidade máxima sendo alimentação de lactose e de amónia desligada.

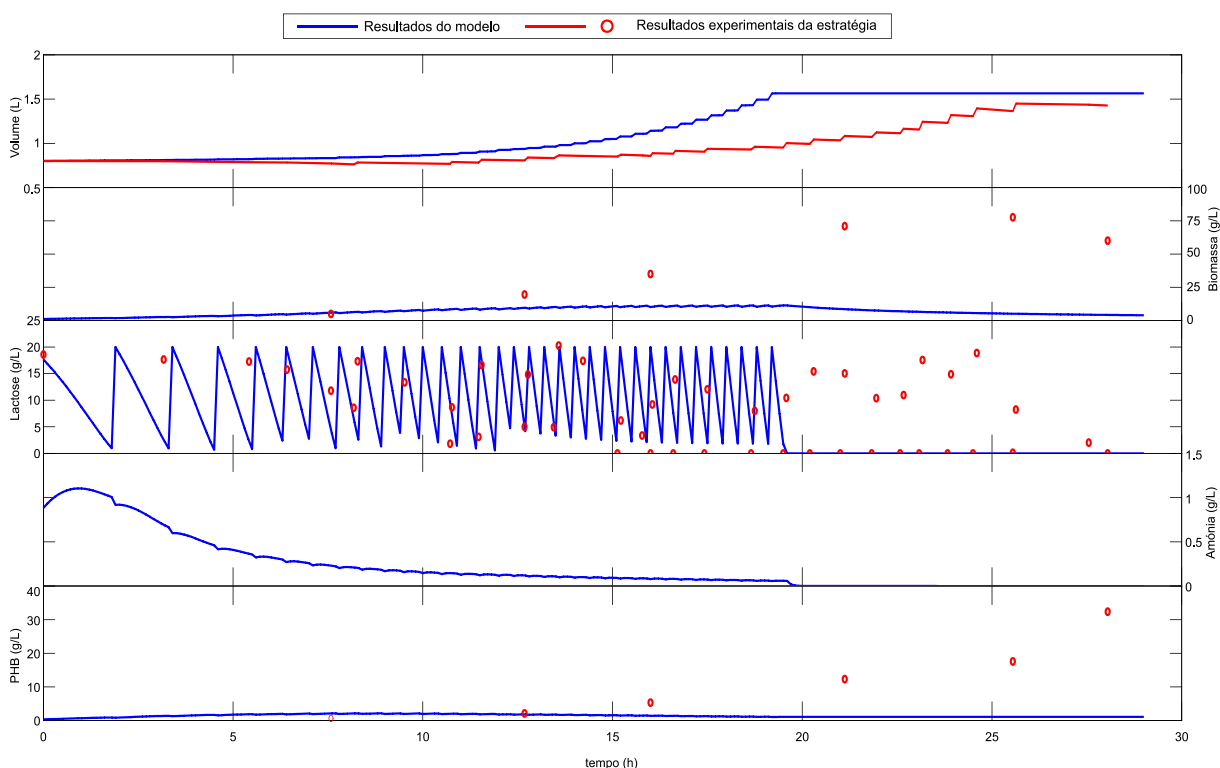


Figura 4-28 – Comparação entre os resultados obtidos pelo modelo e os resultados experimentais para a estratégia 1.

4.3.2. Abordagem com ajuste dos parâmetros entre cada pulso

Nesta abordagem foram utilizados os parâmetros cinéticos e resultados experimentais da estratégia analisada no ponto anterior. Neste caso, foram ajustados alguns dos parâmetros cinéticos aos resultados experimentais entre cada pulso. Além das considerações referidas anteriormente, foram ainda consideradas as seguintes:

- Os parâmetros utilizados têm com base os resultados experimentais obtidos para a estratégia estudada. Alguns parâmetros foram ajustados a coincidir com os pulsos experimentais e restantes foram fixos.
- Os parâmetros que foram manipulados com o objectivo de obter o ajuste aos dados experimentais foram: $\mu, \mu_{m\acute{a}x}, Y_{X/S}, Y_{P/S}$ e α . Os restantes mantiveram-se consoantes e que pode verificar na Tabela 4-3 mostra os valores parâmetros utilizados na simulação:

Tabela 4-3 – Parâmetros e condições de operação utilizadas no ajuste pulso a pulso.

$q_{m\acute{a}x} (h^{-1})$	1.55	β	0
$K_S (g/L)$	7.78	$F_N (L/h)$	0.00358
$K_N (g/L)$	3.3	$S_F (g/L)$	271.37
$Y_{X/N} (gX/gN)$	0.47	$N_F (g/L)$	280

Nota: Termo β é igual a zero, foi assumido que a fonte de carbono é apenas usada no crescimento celular e na produção de PHB, não existindo qualquer produção de metabolitos secundários.

No gráfico da Figura 4-29 estão representados os resultados experimentais da estratégia 1 e a dinâmica simulada pelo modelo. A Tabela 4-4 apresenta os valores dos parâmetros ajustados em cada pulso.

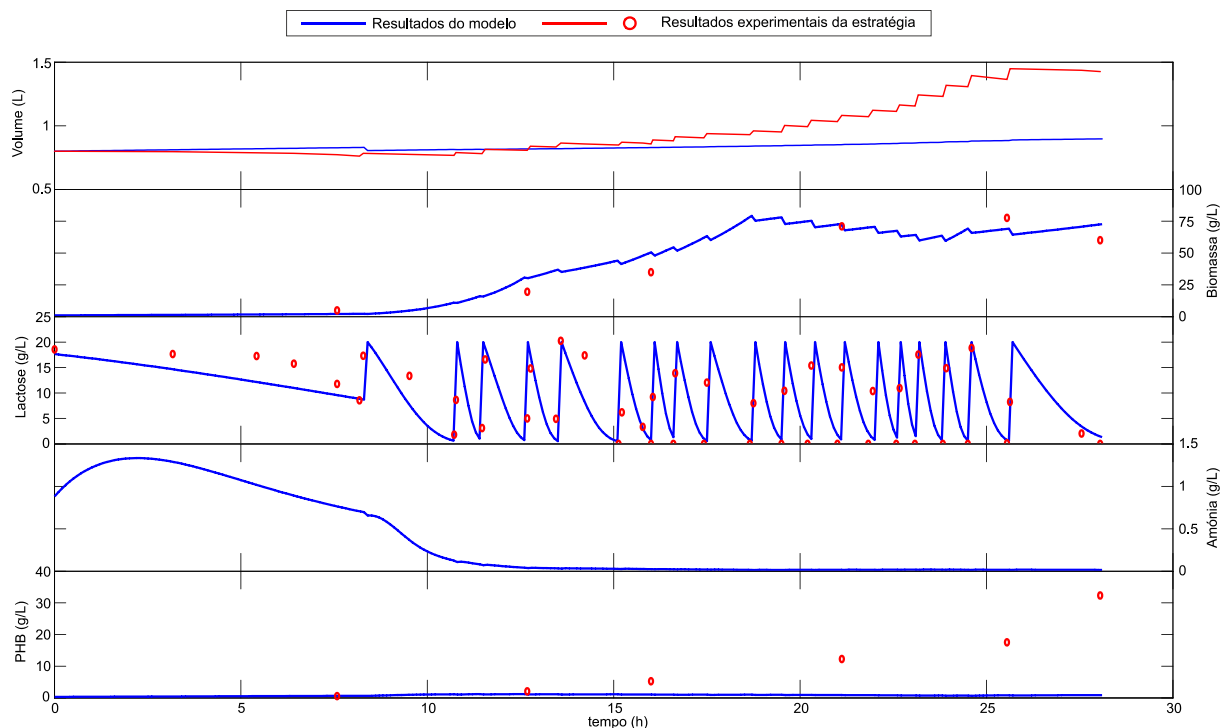


Figura 4-29 – Comparação dos resultados obtidos por ajuste dos parâmetros pulso a pulso com os resultados experimentais da estratégia 1

Tabela 4-4 – Resultados obtidos para os parâmetros cinéticos ajustados pulso a pulso

	1º Pulso	2º Pulso	3º Pulso	4º Pulso	5º Pulso	6º Pulso	7º Pulso	8º Pulso	9º Pulso	10º Pulso
$Y_{X/S}$	0.14	0.09	0.05	0.07	0.07	0.15	0.10	0.08	0.12	0.20
$Y_{PHB/S}$	0.12	0.04	0.03	0.03	0.03	0.11	0.07	0.05	0.10	0.10
$\mu_{m\acute{a}x}$	0.12	1.60	2.00	2.50	2.00	3.00	5.70	5.80	5.00	1.00
α	0.80	2.50	4.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.70	1.00
μ	0.09	0.70	0.65	0.60	0.25	0.15	0.25	0.25	0.25	0.25

	11º Pulso	12º Pulso	13º Pulso	14º Pulso	15º Pulso	16º Pulso	17º Pulso	18º Pulso	19º Pulso	20º Pulso
$Y_{X/S}$	0.15	0.15	0.14	0.15	0.10	0.08	0.10	0.10	0.20	0.50
$Y_{PHB/S}$	0.08	0.14	0.12	0.13	0.08	0.06	0.08	0.08	0.15	0.30
$\mu_{m\acute{a}x}$	1.00	2.50	1.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.30	0.10
α	1.00	2.00	1.25	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00
μ	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10	0.25	0.05	0.05

Observando a Figura 4-29 em comparação com a Figura 4-28 observa-se fazendo alterações nos parâmetros permite ajustar o modelo aos pontos experimentais entre cada pulso. Ao comparar os valores dos parâmetros (Tabela 4-4) ajustados nesta abordagem com dos parâmetros obtidos experimentalmente (Tabela 4-1). Em termos de rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose os valores não variam muito entre cada pulso. Em comparação com valores obtidos experimentalmente estes não apresentam grandes variações. Um ponto que é salientaram que o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ apresenta as maiores variações

entre pulso e o que demonstra diferentes velocidades específicas máximas ao longo do tempo.

Apesar de ser ter conseguido ajustar os parâmetros de modo a traduzir o consumo de lactose ao longo da estratégia não possível a tradução deste consumo em produção de PHB.

4.3.3. Abordagem com ajuste de todos parâmetros por meio de um algoritmo de otimização não linear.

Nesta abordagem foram ajustados os resultados experimentais de uma estratégia anteriormente analisada. Neste caso recorreu-se a função *lsqnonlin* presente no pacote de software *MathWorks MatLab*. A função *lsqnonlin* é usada em otimização não linear e tem como base a otimização por mínimos quadrados entre os dados experimentais e resultados saídos do modelo através da manipulação dos parâmetros.

Utilizaram-se os resultados experimentais da estratégia 3. Nesta abordagem todos os parâmetros do modelo foram ajustados. A Tabela 4-5 resume os parâmetros não manipulados utilizados nesta abordagem. Ainda foram feitas seguintes considerações referentes ao volume de amostragem e ao caudal de alimentação de lactose:

- A alimentação de lactose é feita em contínuo;
- A amostragem é feita de hora em hora com um volume fixo de 5 mL.

Tabela 4-5 – Parâmetros e condições de operação utilizadas no ajuste por otimização não linear

F_S (L/h)	0.016	F_N (L/h)	0.00358
K_S (g/L)	7.78	S_F (g/L)	271.37
K_N (g/L)	0.1	N_F (g/L)	280

O valor do caudal de entrada de amónia e lactose é a razão entre o volume de gasto de amónia e lactose pela duração da estratégia.

No gráfico da Figura 4-30 estão representados os resultados experimentais da estratégia e da dinâmica simulada pelo modelo. A Tabela 4-6 apresenta os valores dos parâmetros ajustados pelo algoritmo.

Tabela 4-6 – Resultados obtidos para os parâmetros cinéticos ajustados por otimização não linear

μ_{máx} (h⁻¹)	1.37	α	27.09
q_{máx} (h⁻¹)	0.45	β	0
Y_{X/S} (gX/gS)	21.50	Y_{X/N} (gX/gN)	0.26
Y_{PHB/S} (gPHB/gS)	47.64		

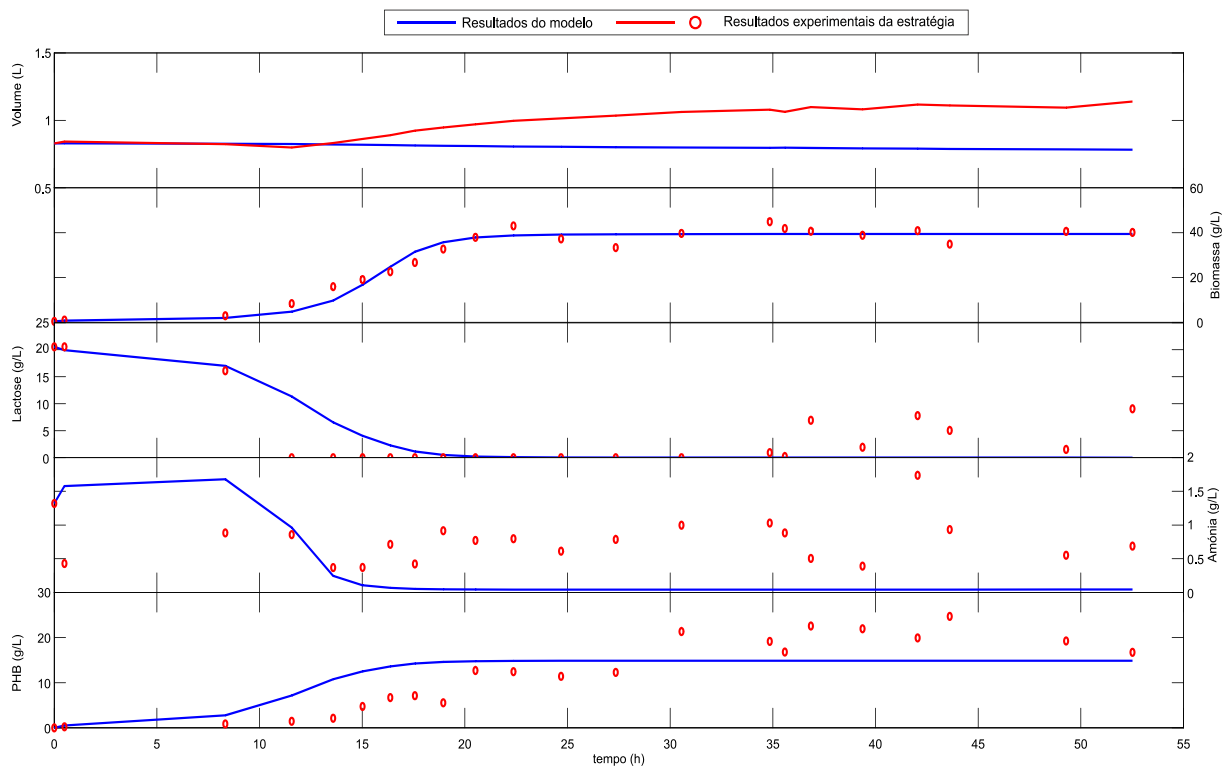


Figura 4-30 – Comparação entre os resultados obtidos pelo ajuste dos parâmetros através algoritmo de otimização não linear e os resultados experimentais obtidos para a estratégia 2

Comparando os parâmetros saídos da otimização não linear feita nesta abordagem com os parâmetros cinéticos experimentais da estratégia permite observa-se que os valores são bastante diferente não podendo concluir acerca da sua validade. A única variável de estado que o modelo não consegue reproduzir mesmo a dinâmica da amônia não se conseguiu reproduzir.

4.4. Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais permite a determinação de relações entre variáveis através do seu comportamento num conjunto de amostragem.

Para aplicação desta técnica foram utilizadas dois tipos de variáveis: registadas e calculadas. As variáveis registadas foram obtidas pelo sistema de controlo e monitorização BioCTR. Essas variáveis foram: **pH**, pressão de oxigénio dissolvido (**pO₂**), volume de oxigénio adicionado (**VO₂**), percentagem de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento (**%O₂/ar**), velocidade de agitação (**vel.agitação**) e volume de amónia adicionada (**VBase**). As variáveis calculadas foram: velocidade volumétrica de adição de oxigénio (**dO₂/dt**), velocidade volumétrica de adição de amónia (**dBase/dt**), velocidade de transferência de oxigénio (**OTR**¹⁵).

Para a aplicação e interpretação da Análise de Componentes Principais são necessários executar os seguintes passos:

1º Passo – Padronização dos dados de modo a terem igual peso estatístico na sua interpretação.

2º Passo – Análise de variância acumulada de cada componente principal. Esta análise permite quantificar a informação presente no modelo.

3º Passo – Interpretação dos gráficos dos *loadings* e dos *scores* para 2 componentes principais. A proximidade entre os vectores dos *loadings* revela comportamentos semelhantes ao longo do modelo. A proximidade entre cada ponto dos *scores* revela comportamentos semelhantes em cada momento de amostragem.

Esta técnica foi aplicada para todos os resultados experimentais obtidos de cada estratégia. As tabelas dos valores utilizados representados no Anexo A.

4.4.1. Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 1

Com base dos resultados registados no decorrer da estratégia, foi construída uma matriz com dados de **pH**, **VBase**, **pO₂**, **vel.agitação**, **VO₂**, **%O₂/ar**, **dO₂/dt**, **dBase/dt**, **OTR**. A partir desta matriz foram calculadas as componentes principais e as respectivas variâncias.

Através da Tabela 4-7 e Figura 4-31 é possível observar as percentagens de variância explicada e acumulada de cada componente principal calculada.

¹⁵ Terminologia inglesa: *Oxygen Transfer Rate* em português Taxa de Transferência de Massa de Oxigénio

Tabela 4-7 – Estratégia 1: Variância explicada e acumulada para os resultados experimentais da Estratégia 1

Número de Componentes	Variância explicada por cada componente (em %)	Variância Acumulada por cada componente (em %)
1	53.48	53.48
2	20.17	73.64
3	11.73	85.37
4	7.00	92.37
5	4.58	96.95
6	1.82	98.78
7	1.08	99.86
8	0.08	99.94
9	0.06	100.00

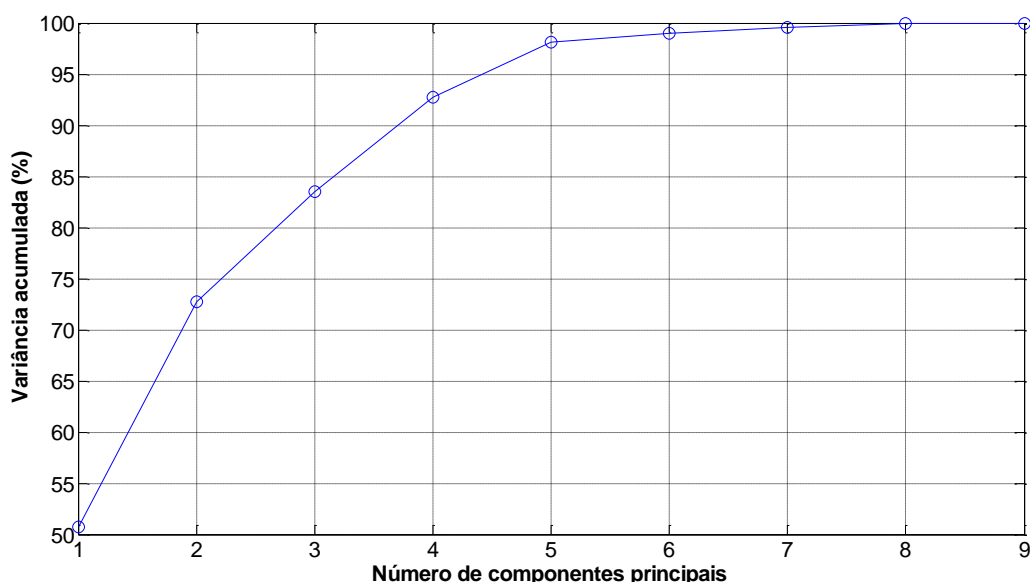


Figura 4-31 – Estratégia 1: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais

Através da análise da Figura 4-31 e da Tabela 4-7 com aumento de componentes principais a percentagem da variância acumulada aumenta, isto é, com o aumento de componentes consegue-se traduzir mais informações acerca do sistema em estudo.

Podendo verificar que através utilização de 2 componentes permite explicar 73.64% e 3 componentes 85.37% da variância total do sistema. Podendo concluir-se a utilização de apenas 2 componentes permite ter uma noção geral do comportamento entre variáveis e amostras, tendo como vantagem principal que é possível obter uma representação gráfica destes 2 componentes principais.

O gráfico a) da Figura 4-32 apresenta os *loadings* que traduzem os comportamentos de cada variável e o gráfico b) apresenta os *scores* que traduzem o comportamento de cada amostra.

Devido à proximidade das variáveis, **VBase** e **VO₂** assim como **dO₂/dt** e **dBase/dt**, referentes ao volume de adição de amónia e de oxigénio e respectivas velocidades de

adição, conclui-se que estas variáveis apresentam comportamentos muito semelhantes ao longo da estratégia.

No gráfico dos *scores* da Figura 4-32 é possível observar que existem 2 *clusters* bem definidos por pontos muito próximos o que revela comportamentos muito semelhantes a quando da amostragem podendo reflectir a proximidade do comportamento das variáveis dos clusters analisados no gráfico a).

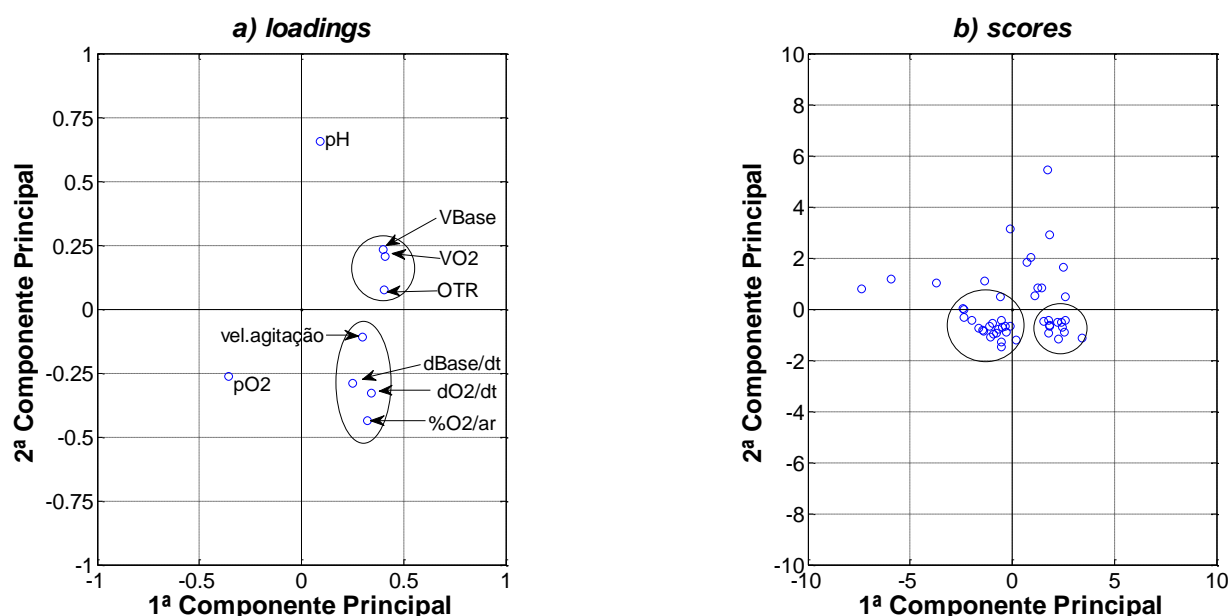


Figura 4-32 – Estratégia 1: Representação dos *loadings* (a) e *scores* (b)

4.4.2. Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 2

Com base dos resultados registados no decorrer da estratégia, foi construída uma matriz com dados de *pH*, *VBase*, *pO₂*, *vel.agitação*, *VO₂*, *%O₂/ar*, *dO₂/dt*, *dBase/dt*, *OTR*. A partir desta matriz foi calculada as componentes principais e as respectivas variâncias.

Através da Tabela 4-8 e da Figura 4-33 estão representadas a percentagem de variância explicada e acumulada de cada componente principal calculada.

Tabela 4-8 – Estratégia 2: Variância explicada e acumulada

Número de Componentes	Variância explicada por cada componente (em %)	Variância Acumulada por cada componente (em %)
1	50.72	50.72
2	22.06	72.77
3	10.73	83.51
4	9.21	92.72
5	5.42	98.14
6	0.81	98.95
7	0.59	99.54
8	0.37	99.92
9	0.08	100.00

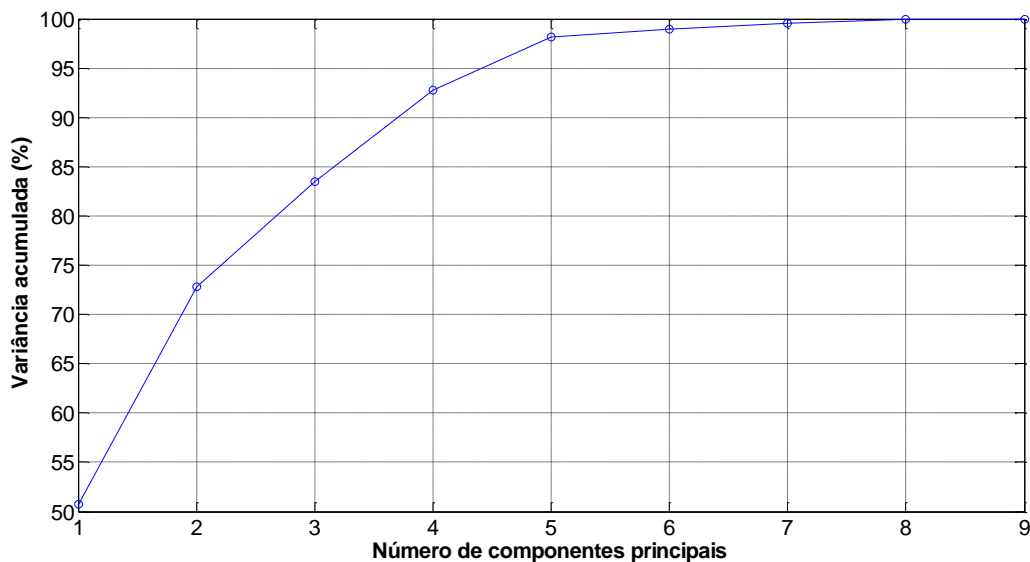


Figura 4-33 – Estratégia 2: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais

Através da análise da Tabela 4-8 e Figura 4-33 com aumento de componentes principais a percentagem da variância acumulada aumenta, isto é, o aumento de componentes consegue traduzir mais informações acerca do sistema em estudo.

Podendo verificar que a utilização de 2 componentes permite explicar 72.77% e 3 componentes permitem 83.51% variância total do sistema. Pode-se concluir que análise com 2 componentes permite ter uma noção geral do comportamento entre variáveis e amostras.

O gráfico a) da Figura 4-34 apresenta os *loadings* que traduzem os comportamentos de cada variável e o gráfico b) apresenta os *scores* que traduzem o comportamento de cada amostra.

Devido à proximidade das variáveis, **VBase** e **VO2** referentes aos volumes de amónia e oxigénio adicionados, conclui-se que estas variáveis apresentam comportamentos muito semelhantes ao longo da estratégia.

O gráfico dos *scores* observe-se 2 *clusters* bem definidos por pontos muito próximos o que revela comportamentos muito semelhantes a quando da amostragem podendo reflectir a proximidade do comportamento das variáveis presentes no gráfico a).

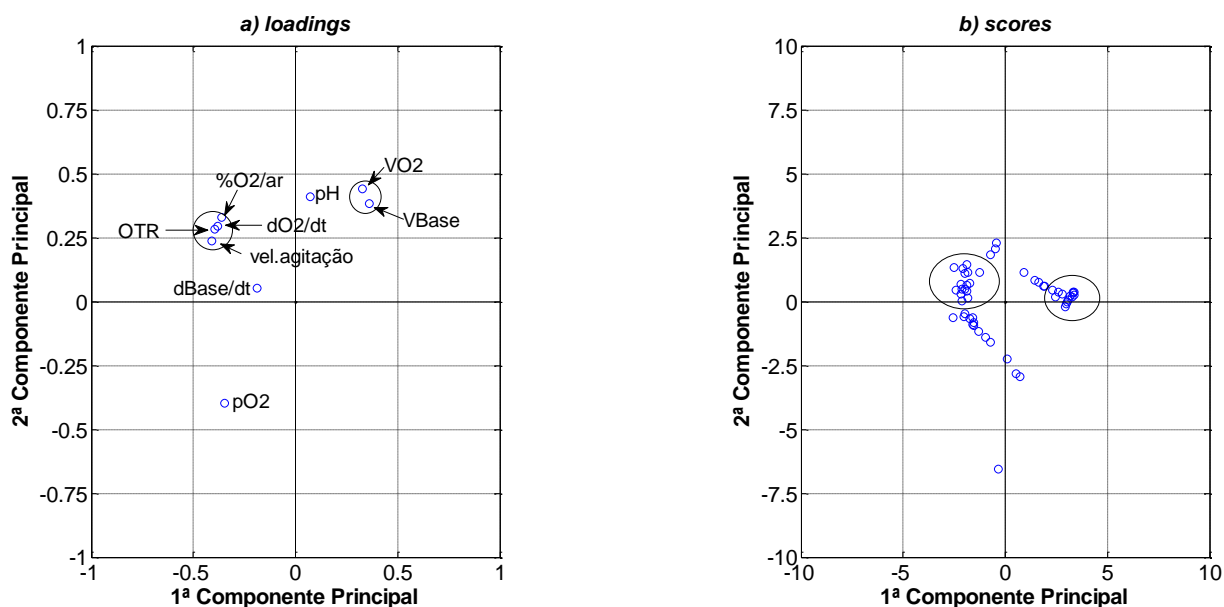


Figura 4-34 – Estratégia 2: Representação dos *loadings* (a) e *scores* (b)

4.4.3. Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 3

Com base dos resultados registados no decorrer da estratégia foi construída uma matriz com dados de *pH*, *VBase*, *pO₂*, *vel.agitação*, *VO₂*, *%O₂/ar*, *dO₂/dt*, *dBase/dt* e *OTR* em função do tempo. A partir desta matriz foi calculada as componentes principais e as respectivas variâncias.

Através da Tabela 4-9 e Figura 4-35 que representam a percentagem de variância explicada e acumulada de cada componente principal.

Tabela 4-9 – Estratégia 3: Variância explicada e acumulada

Número de Componentes	Variância explicada por cada componente (em %)	Variância Acumulada por cada componente (em %)
1	28.03	28.03
2	24.32	52.34
3	15.94	68.29
4	12.11	80.40
5	7.78	88.18
6	6.64	94.82
7	4.83	99.66
8	0.21	99.87
9	0.13	100.00

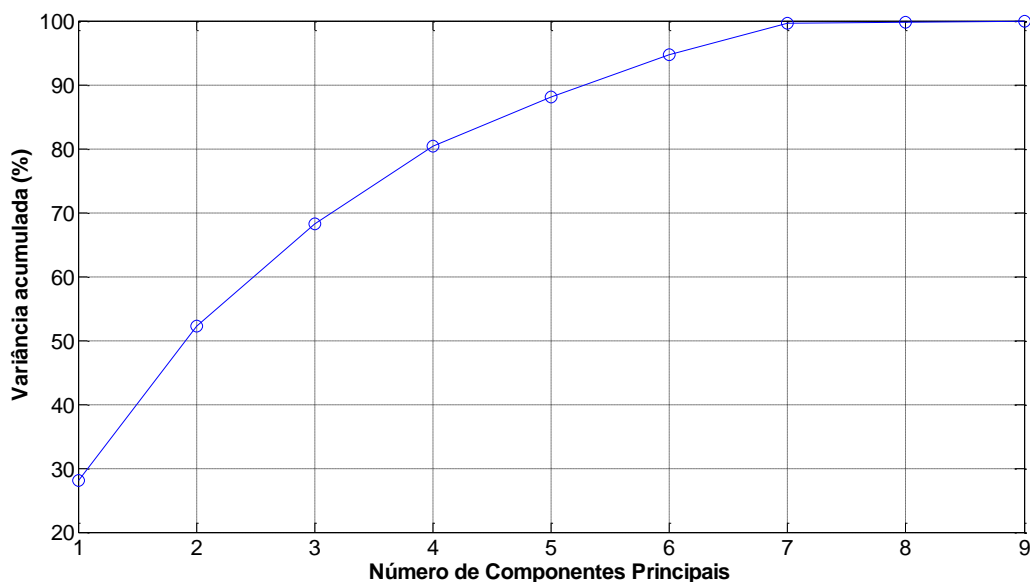


Figura 4-35 – Estratégia 3: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais

Pode ser verificado através da Figura 4-35 e Tabela 4-9 utilizando 2, 3 e 4 componentes principais permite explicar respectivamente 52.34%, 68.29% e 80.40% da variância acumulada explicada pelo modelo. Podendo concluir-se que analisando 3 componentes permite ter uma noção geral do comportamento entre variáveis e amostras. Mais do que 3 componentes a análise torna-se complicada devido a ser impossível fazer uma representação gráfica de uma dimensão superior a 3. No gráfico da Figura 4-36 foram representadas 2 componentes de modo a facilitar a visualização de conjuntos quer por parte dos *scores* ou dos *loadings*.

O gráfico a) da Figura 4-36 apresenta os *loadings* que traduzem os comportamentos de cada variável e o gráfico b) apresenta os *scores* que traduzem o comportamento de cada amostra.

O gráfico dos *loadings* é possível verificar 3 conjuntos de variáveis presentes no primeiro e quarto quadrante. O primeiro conjunto é composto pelas variáveis **VO₂** e **VBase**, o segundo é composto por **pO₂**, **pH** e **dBase/dt** e o último por **dO₂/dt**, **%O₂/ar**, **vel.agitação** e **OTR**.

Devido à proximidade das variáveis, **VBase** e **VO₂** referentes ao volume de amónia e oxigénio adicionados, conclui-se que estas variáveis apresentam comportamentos muito semelhantes ao longo da estratégia.

O gráfico dos *scores* observa-se 1 *cluster* bem definido por pontos muito próximos o que revela comportamentos muito semelhantes a quando da amostragem podendo reflectir a proximidade do comportamento das variáveis presentes no gráfico a).

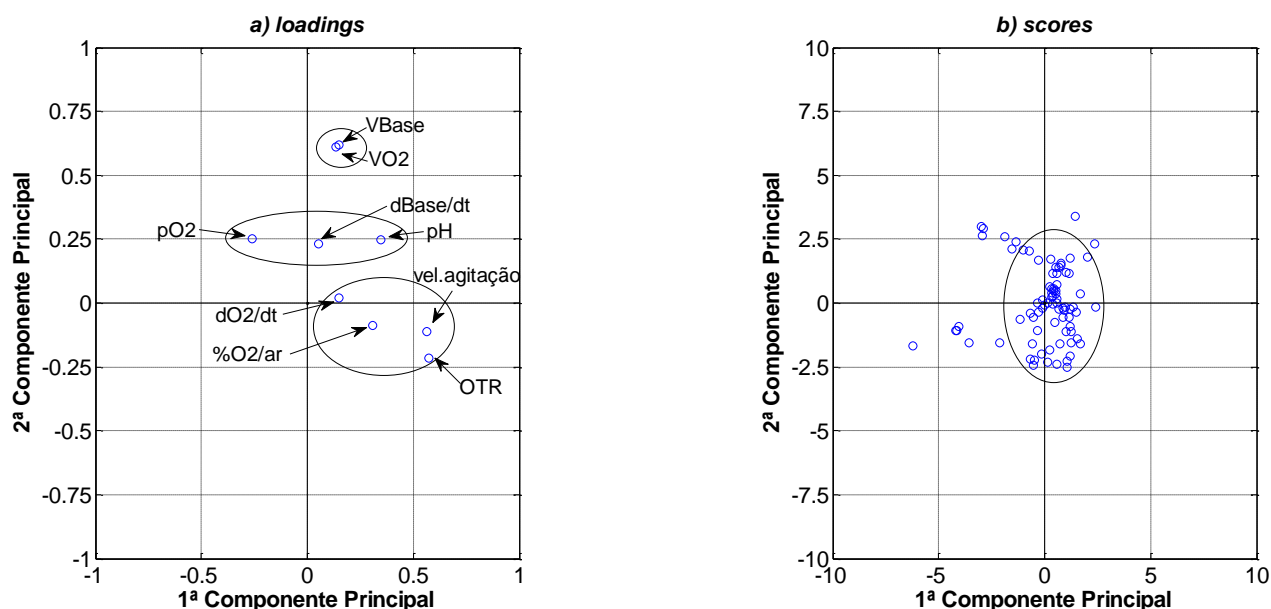


Figura 4-36 – Estratégia 3: Representação dos *loadings* (a) e *scores* (b)

4.4.4. Aplicação do PCA aos resultados experimentais da estratégia 4

Com base dos resultados registados no decorrer da estratégia foi construída uma matriz com dados de *pH*, *VBase*, *pO₂*, *vel.agitação*, *VO₂*, *%O₂/ar*, *dO₂/dt*, *dBase/dt* e *OTR* em função do tempo. A partir desta matriz foi calculada as componentes principais e as respectivas variâncias.

Através da Tabela 4-10 e Figura 4-37 e que representam a percentagem de variância explicada e acumulada de cada componente principal.

Tabela 4-10 – Estratégia 4: Variância explicada e acumulada

Número de Componentes	Variância explicada por cada componente (em %)	Variância Acumulada por cada componente (em %)
1	51.21	51.21
2	17.26	68.47
3	10.47	78.95
4	9.30	88.25
5	6.41	94.66
6	4.63	99.30
7	0.51	99.81
8	0.13	99.94
9	0.06	100.00

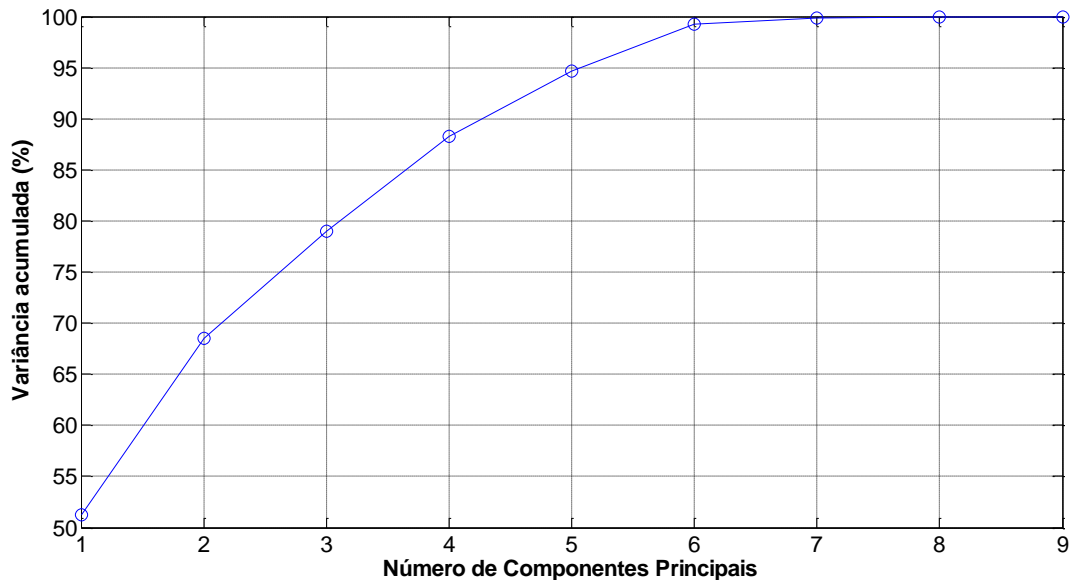


Figura 4-37 – Estratégia 4: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais

Pode ser verificado através da e Figura 4-37 utilizando 2,3 e 4 componentes permitem explicar respectivamente 68.47%, 78.95% e 88.25% da variância acumulada explicada pelo modelo. Pode-se concluir que analisando 3 componentes permite ter uma noção geral do comportamento entre variáveis e amostras. Mais do que 3 componentes a análise torna-se complicada devido a ser impossível fazer uma representação gráfica de uma dimensão superior a 3.

Para uma melhor visualização dos comportamentos entre variáveis e amostras representa-se para 2 componentes principais o 2 gráficos. O gráfico a) da apresenta os *loadings* que traduzem os comportamentos de cada variável e o gráfico b) apresenta os *scores* que traduzem o comportamento de cada amostra.

O gráfico dos *loadings* é possível verificar 2 conjuntos de variáveis presentes no segundo e no terceiro quadrante e existem 2 variáveis que possuem comportamento distintos face às restantes (*pH, pO₂*).

Devido à proximidade das variáveis, *VB_{base}* e *VO₂* assim como *dO₂/dt* e *dB_{base}/dt*, referentes aos volume de amónia e oxigénio adicionado e respectivas velocidades de adição, conclui-se que estas variáveis têm comportamentos muito semelhantes ao longo da cinética. Além da proximidade da variável *%O₂/ar* revela que a percentagem de oxigénio revela em importante.

O gráfico dos *scores* verifica 1 *cluster* bem definido por pontos muito próximos o que revela comportamentos muito semelhantes a quando a retirada das amostras podendo reflectir a proximidade do comportamento das variáveis *VB_{base}, VO₂, dO₂/dt* e *dB_{base}/dt*.

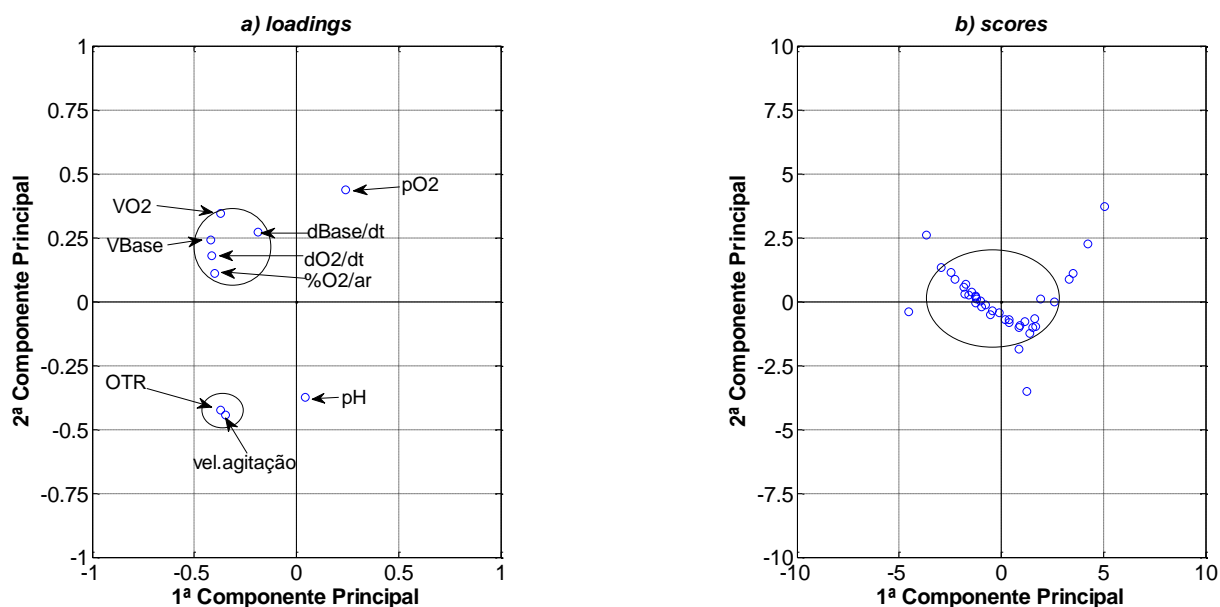


Figura 4-38 – Estratégia 4: Representação dos *loadings* (a) e *scores* (b)

Comparando os resultados obtidos para as quatro estratégias verifica-se que através da análise de PCA que as variáveis **VB**ase, **VO**₂, **OTR** e **%O**₂/**ar** estão relacionadas. Por outro lado, variáveis como o **pH** e **pO**₂ são variáveis controladas pelo sistema de controlo e monitorização apresentam um comportamento distinto de todas outras.

4.4.5. Aplicação do PCA aos resultados experimentais de todas as estratégias

Com base dos resultados registados de todas as estratégias foi construída uma matriz com dados de **pH**, **VB**ase, **pO**₂, **vel.agitação**, **VO**₂, **%O**₂/**ar**, **dO**₂/**dt**, **dB**ase/**dt** e **OTR** em função do tempo de cada estratégia. A partir desta matriz foi calculada as componentes principais e as respectivas variâncias.

Através da Tabela 4-11 e Figura 4-39 que representam a percentagem de variância explicada e acumulada de cada componente principal.

Tabela 4-11 – Todas as estratégias: Variância explicada e acumulada

Número de Componentes	Variância explicada por cada componente (em %)	Variância Acumulada por cada componente (em %)
1	34.84	34.84
2	18.88	53.73
3	11.99	65.73
4	10.48	76.21
5	9.28	85.49
6	7.78	93.26
7	4.48	97.74
8	2.10	99.84
9	0.16	100.00

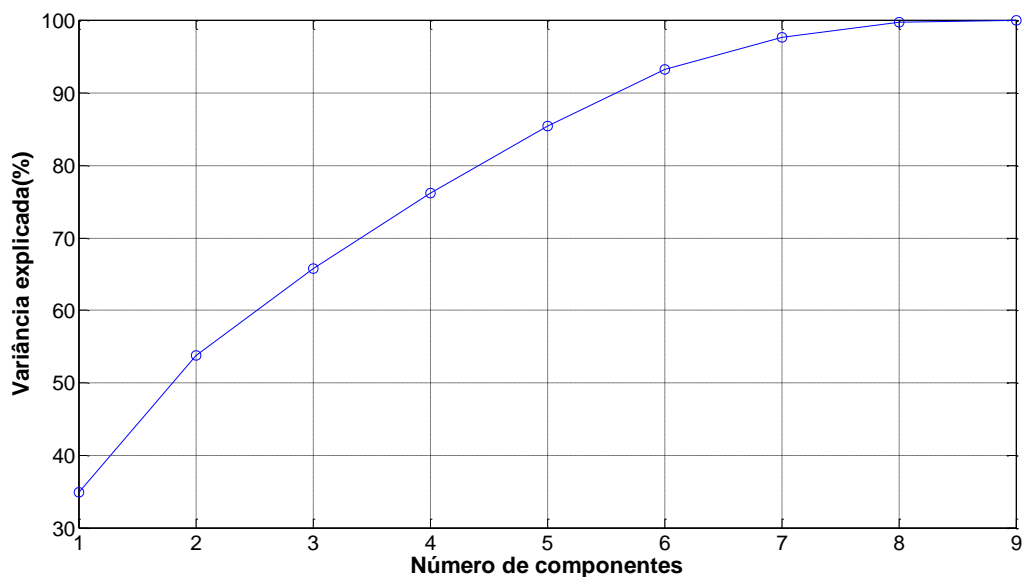


Figura 4-39 – Todas as estratégias: Variância Acumulada (em %) em função dos componentes principais

Pode ser verificado através da e Figura 4-39 utilizando 2,3,4 e 5 componentes permitem explicar respectivamente 53.73 %, 65.73%, 76.21% e 85.49% da variância acumulada explicada pelo modelo. Pode-se concluir que analisando 5 componentes permite ter uma noção geral do comportamento entre variáveis e amostras. Mais do que 3 componentes a análise torna-se complicada devido a ser impossível fazer uma representação gráfica de uma dimensão superior a 3.

Para uma melhor visualização dos comportamentos entre variáveis e amostras representa-se para 2 componentes principais o 2 gráficos. O gráfico a) da apresenta os *loadings* que traduzem os comportamentos de cada variável e o gráfico b) apresenta os *scores* que traduzem o comportamento de cada amostra.

O gráfico dos *loadings* é possível verificar 3 conjuntos de variáveis presentes no primeiro e quarto quadrante. O primeiro conjunto é composto pelas variáveis **VO₂** e **VBase**, o segundo é composto e **dO₂/dt**, **%O₂/ar**, **dBase/dt** e o último por **vel.agitação** e **OTR**.

Devido à proximidade das variáveis, **VBase** e **VO₂** assim como **dO₂/dt** e **dBase/dt**, referentes aos volume de amónia e oxigénio adicionado e respectivas velocidades de adição, conclui-se que estas variáveis têm comportamentos muito semelhantes ao longo da cinética. Além da proximidade da variável **%O₂/ar** revela que a percentagem de oxigénio revela em importante.

O gráfico dos *scores* verifica 1 *cluster* bem definido por pontos muito próximos o que revela comportamentos muito semelhantes a quando a retirada das amostras podendo reflectir a proximidade do comportamento das variáveis anteriormente referidas.

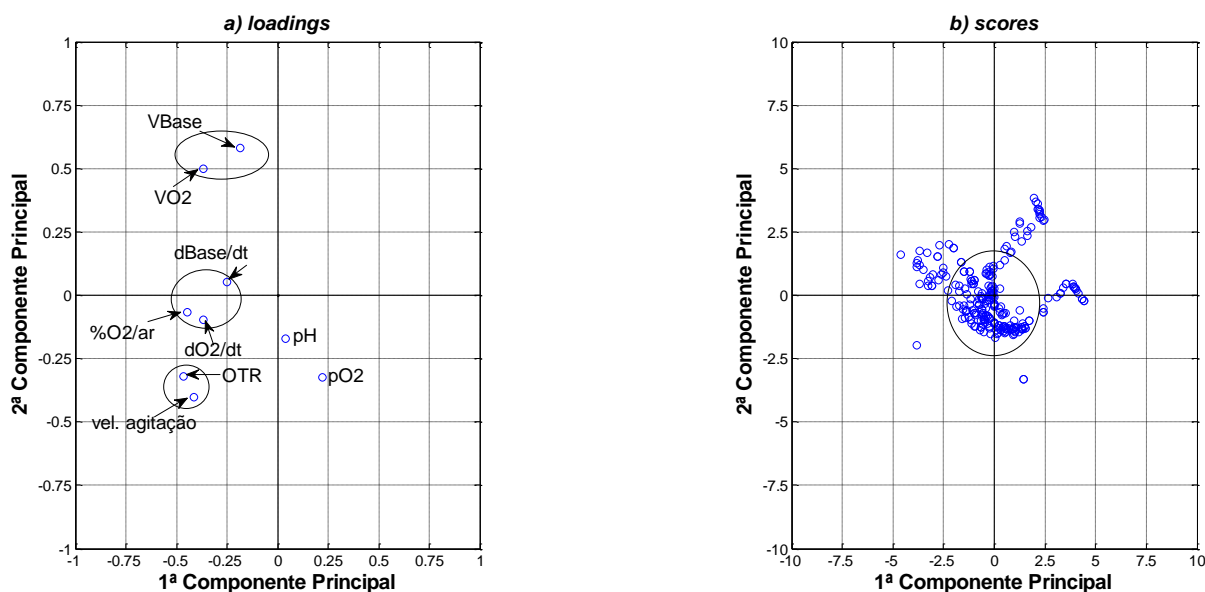


Figura 4-40 – Todas as estratégias: Representação dos *loadings* (a) e *scores* (b)

4.5. Regressão Linear por Mínimos Quadrados

A Regressão Linear por Mínimos Quadrados permite a estimativa de propriedades partindo das relações e comportamentos das variáveis de um conjunto de amostras.

Na aplicação desta técnica foram utilizadas as variáveis registadas pelo sistema de controlo e monitorização BioCTR. As variáveis registadas foram: **pH**, pressão de oxigénio dissolvido (**pO₂**), volume de oxigénio adicionado (**VO₂**), percentagem de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento (**%O₂/ar**), velocidade de agitação (**vel. agitação**), Volume de base adicionada (**VBase**).

Para a aplicação da Regressão Linear por Mínimos Quadrados são necessários os seguintes passos:

1º Passo – Determinação do número de componentes necessários para o ajuste do modelo através do método de validação cruzada.

2º Passo – Verificação do ajuste do modelo com o número de componentes PLS escolhidas através do método de validação cruzada.

O coeficiente de determinação (r^2) é uma medida de qualidade que determina a capacidade do modelo para estimar os valores da(s) propriedade(s) em estudo (Equação 4-12). O valor de r^2 varia entre 0 e 1, e quanto maior for o valor mais explicativo é o modelo utilizado. A soma dos quadrados dos resíduos (RSS¹⁶) é o valor do erro entre dados experimentais e os valores calculados pelo modelo PLS utilizado (Equação 4-13). A soma

¹⁶Terminologia inglesa, *Residual Sum of Squares*

total dos quadrados (TSS¹⁷) é o valor do erro entre os dados experimentais e a média de cada propriedade (Equação 4-14).

$$r^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS}$$

Equação 4-12

$$RSS = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2$$

Equação 4-13

$$TSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

Equação 4-14

3º Passo – Explicação da influência do peso de cada variável consoante o número de componentes utilizadas.

4º Passo – Criação de 2 conjuntos, um de treino e outro de validação.

5º Passo – Determinação do número de componentes PLS a partir do conjunto de treino.

6º Passo – Validação do modelo usando com conjunto de validação com o número de componentes PLS escolhidas e os valores dos coeficientes de regressão obtidos pelo conjunto de treino.

Esta técnica foi aplicada para todos os resultados experimentais de duas estratégias, cujos valores estão no Anexo A. A uma das estratégias foram aplicados os passos 4 a 6 de modo a testar a capacidade de previsão.

4.5.1. Aplicação do PLS aos resultados experimentais da estratégia 1

A Figura 4-41 apresenta um gráfico da capacidade de previsão denominada por Erro Residual Previsto por Mínimos Quadrados (PRESS¹⁸) em função do número de componentes PLS utilizadas para os resultados experimentais obtidos na estratégia 1.

Por análise do gráfico da Figura 4-41 é possível verificar que o erro médio previsto diminui à medida que o número de componentes principais vindas do PLS aumenta. Por outras palavras, com o aumento do número de componentes utilizadas aumenta a complexidade tornando, no entanto, o modelo cada vez mais robusto.

¹⁷Terminologia inglesa, *Total Sum of Squares*

¹⁸Terminologia inglesa, *Predicted Residual Error Sum of Squares*

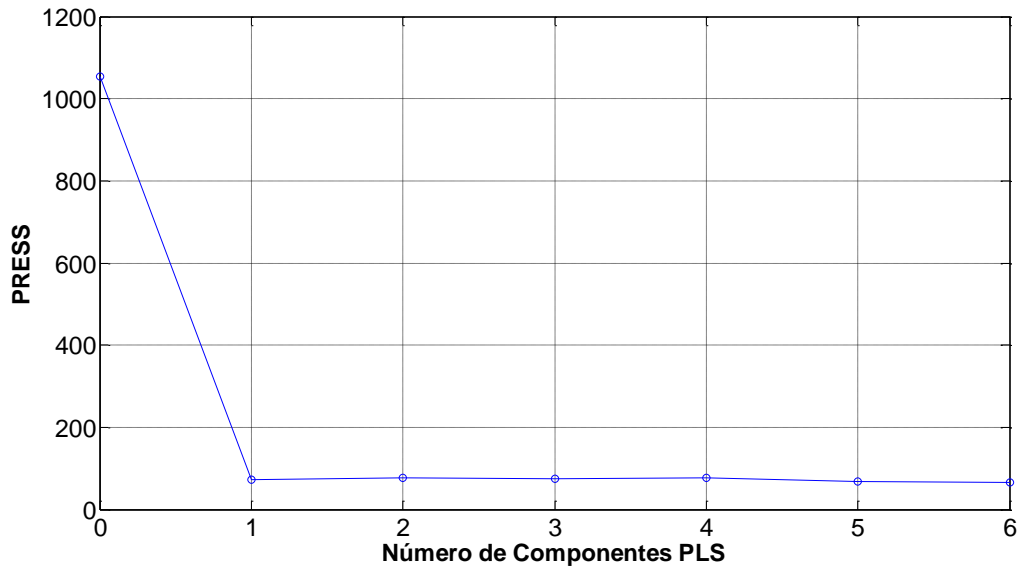


Figura 4-41 – Estratégia 1: PRESS em função do número de componentes PLS

Conclui-se que a utilização de 4 componentes é suficiente para o modelo que permita estimar duas propriedades: a concentração de biomassa e a lactose. É necessário relembrar que o objectivo da aplicação do PLS não é obter o melhor ajuste mas sim um modelo que traduza a maior quantidade de informação, usando a menor complexidade possível, ou seja, aplicar o princípio de parcimónia.

A Figura 4-42 apresenta as respostas ajustadas e observadas e o RSS, TSS e r^2 da de biomassa e lactose por 4 componentes.

Na estimativa da biomassa, a utilização de 4 componentes são suficientes para obter uma boa estimativa a partir das variáveis medidas registadas pelo sistema de controlo e monitorização.

No caso da estimativa da lactose, a utilização de 4 componentes não permite obter um bom ajuste ao devido ao facto da concentração de lactose valor zero em muitos pontos desta propriedade. Mesmo com o aumento das componentes o resultado seria o mesmo.

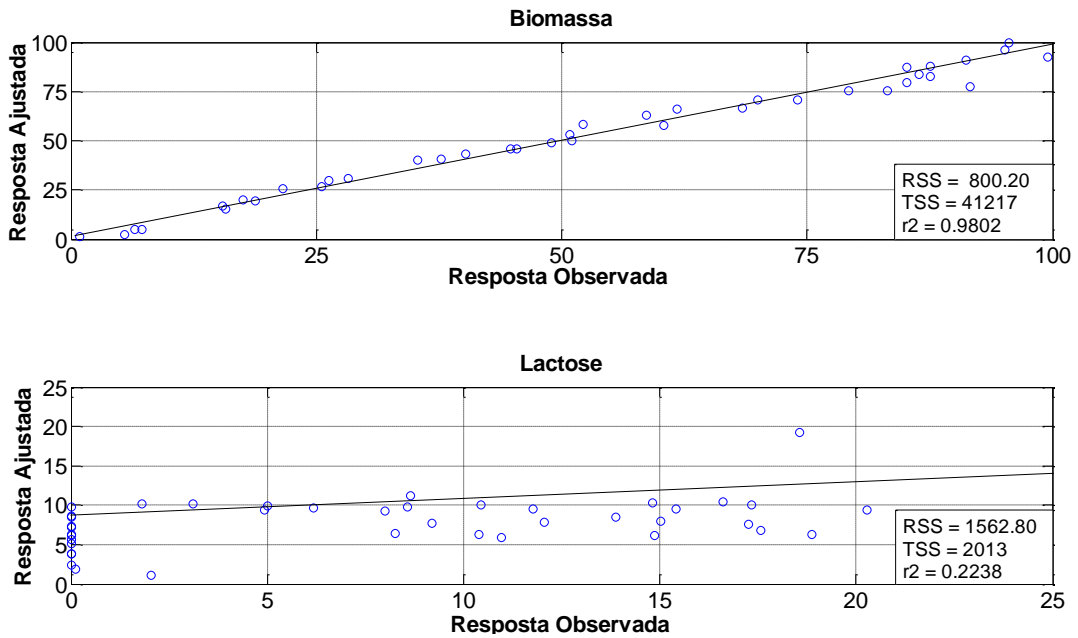


Figura 4-42 – Estratégia 1: Resposta Ajustada/Observada de biomassa e da lactose

A Figura 4-43 apresenta um gráfico que ilustra os pesos de cada variável em cada componente utilizada. Esta figura permitir compreender qual é influência de cada variável em cada componente.

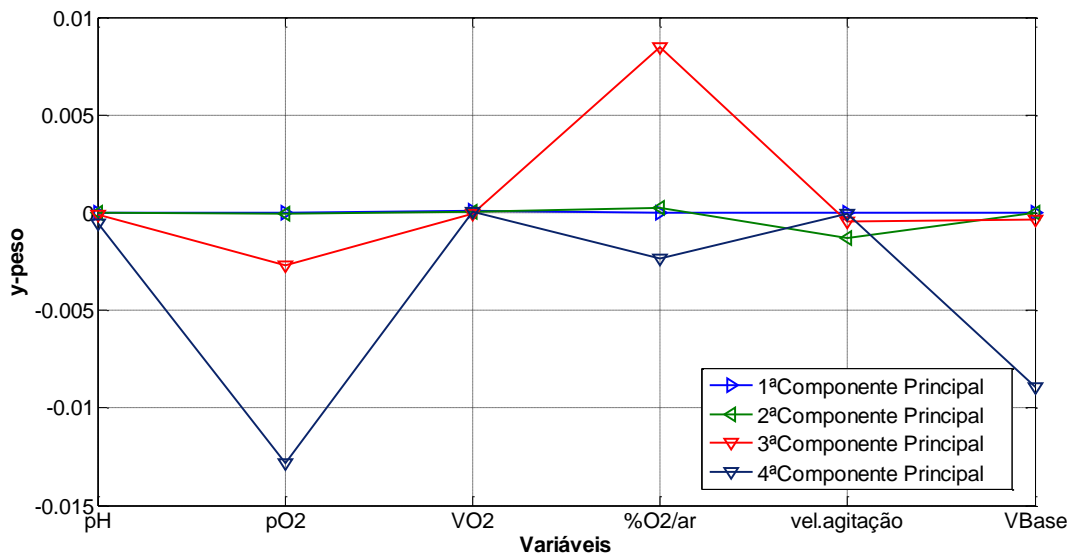


Figura 4-43 – Estratégia 1: Parcimónia

Para 4 componentes as variáveis que apresentam maior influência na estimativa das propriedades são pressão de oxigénio dissolvido (pO_2), a percentagem de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento ($\%O_2/ar$) e volume de amónia adicionada (V_{Base}).

4.5.2. Aplicação da PLS aos resultados experimentais da estratégia 2

A Figura 4-44 apresenta o gráfico da PRESS em função do número de componentes PLS utilizadas para os resultados experimentais obtidos na estratégia 2.

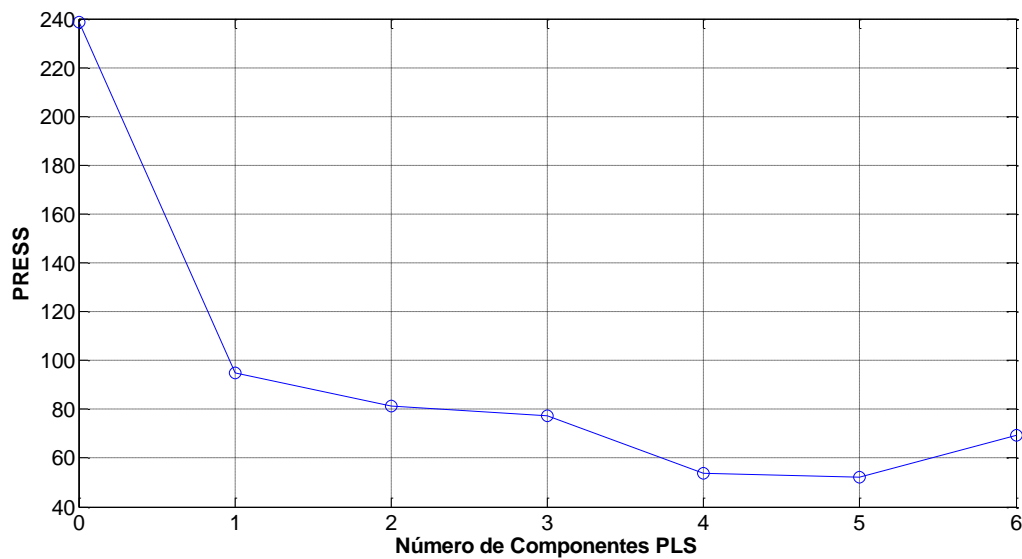


Figura 4-44 – Estratégia 2: PRESS em função do número de componentes PLS

Por análise do gráfico da Figura 4-44 é possível verificar que o erro médio previsto diminui à medida que o número de componentes principais vindas do PLS aumenta. Conclui-se que a utilização de 4 componentes é suficiente para o modelo que permita estimar duas propriedades: a concentração de biomassa e de lactose.

A Figura 4-45 apresenta as respostas ajustadas e observadas e o RSS, TSS e r^2 da de biomassa e lactose por 4 componentes.

Na estimativa da biomassa e lactose, as 4 componentes utilizadas são mais que suficientes para obter boa uma estimativa partir das variáveis medidas *online*.

Utilização desta estratégia permitirá um melhor estudo da influência das variáveis na estimativa das propriedades em estudo.

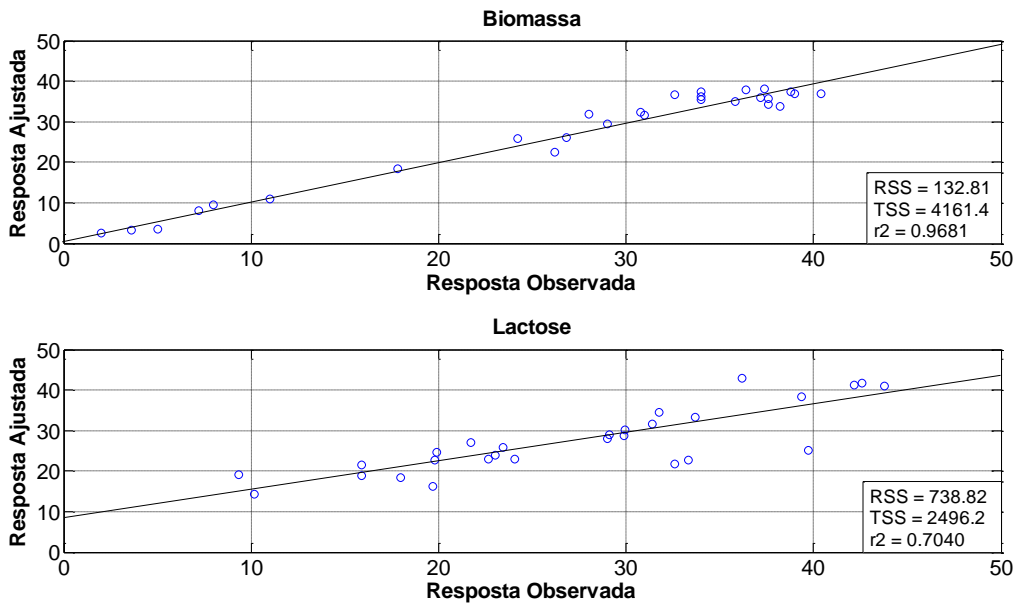


Figura 4-45 – Estratégia 2: Resposta Ajustada/Observada de biomassa e da lactose

O gráfico da Figura 4-46 apresenta um gráfico que ilustra os pesos de cada variável em cada componente utilizada. Esta figura permitir compreender qual é influência de cada variável em cada componente e modo a reduzir o número de variáveis.

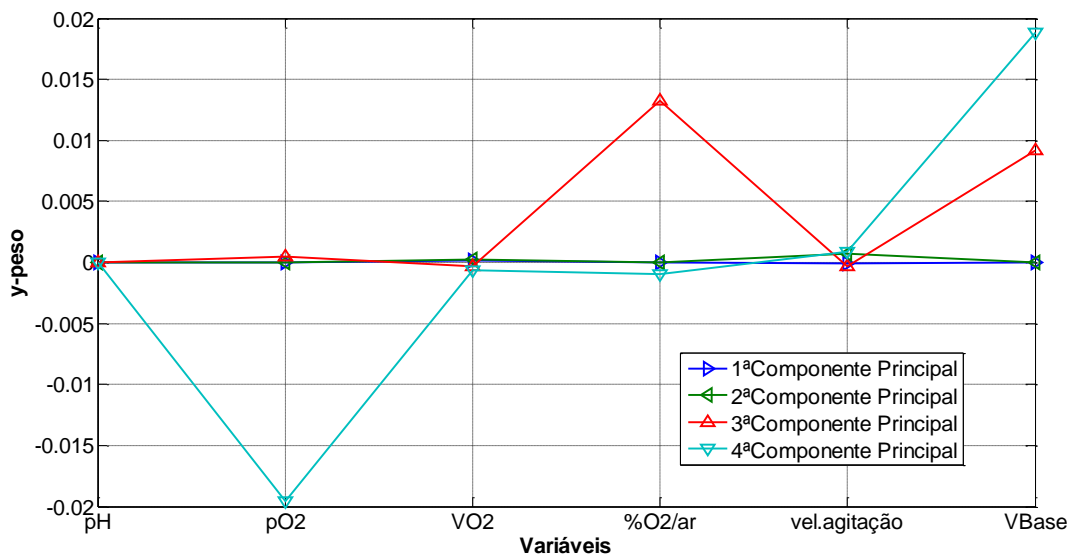


Figura 4-46 – Estratégia 2: Parcimónia

Para 4 componentes as variáveis que apresentam maior influência na estimativa das propriedades são pressão de oxigénio dissolvido (pO_2), a percentagem de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento ($\%O_2/ar$) e volume de amónia adicionada (V_{Base}).

Para determinar a capacidade de previsão de um modelo PLS recorreu-se a 2 conjuntos de dados.

O primeiro conjunto é denominado de conjunto de treino composto por duas matrizes, variáveis e propriedades. O objectivo deste conjunto é a determinação dos coeficientes de regressão que permitam a estimativa das propriedades a partir das variáveis registradas pelo BioCTR.

O segundo conjunto é conjunto de validação composto apenas por uma matriz das variáveis. Após a determinação dos coeficientes de regressão calcula-se as propriedades ajustadas por esses e compara-se com os valores observados de modo a testar a capacidade de previsão.

O gráfico da Figura 4-47 apresenta um gráfico do PRESS em função do número de componentes PLS utilizadas no conjunto de treino.

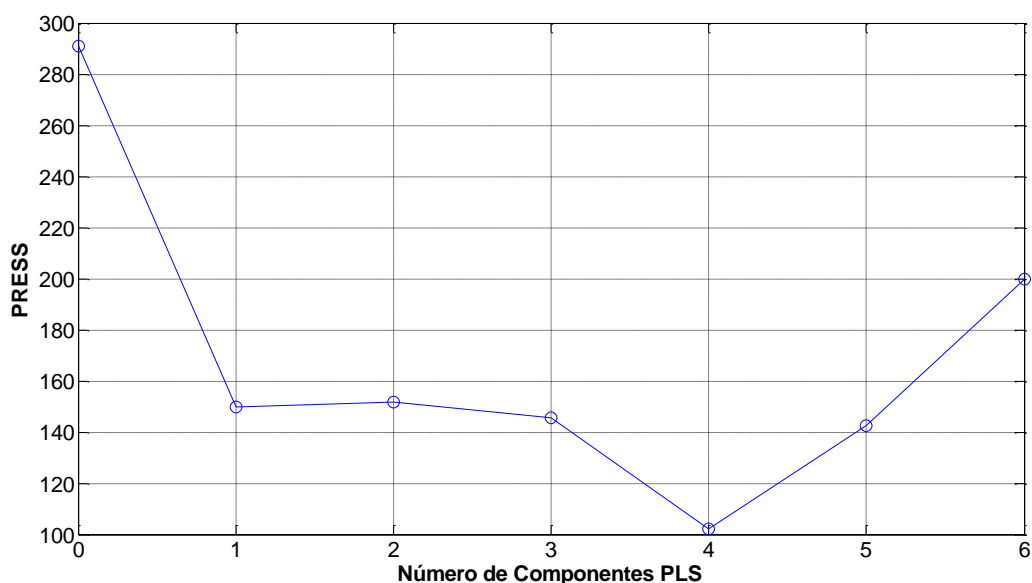


Figura 4-47 – PRESS do conjunto de treino em função do número de componentes PLS

Pela análise da Figura 4-47 verifica-se que o PRESS diminui à medida que o número de componentes vindas do PLS aumenta. Mas quando o número de componentes é superior a 4, o erro médio previsto sobe tornando o modelo impreciso.

Conclui-se que 4 componentes serão suficientes para traduzir o modelo que permita estimar as duas propriedades, concentração de biomassa e lactose.

Após a aplicação do conjunto de treino ao modelo PLS com 4 componentes, utilizaram-se os coeficientes de regressão calculados que são usados para estimar novos valores de propriedades a partir das variáveis do conjunto de validação.

O gráfico da Figura 4-48 apresenta a comparação entre os resultados obtidos por através do ajuste dos coeficientes de regressão obtidos pelo conjunto de treino aplicados ao conjunto de validação e resultados obtidos experimentalmente.

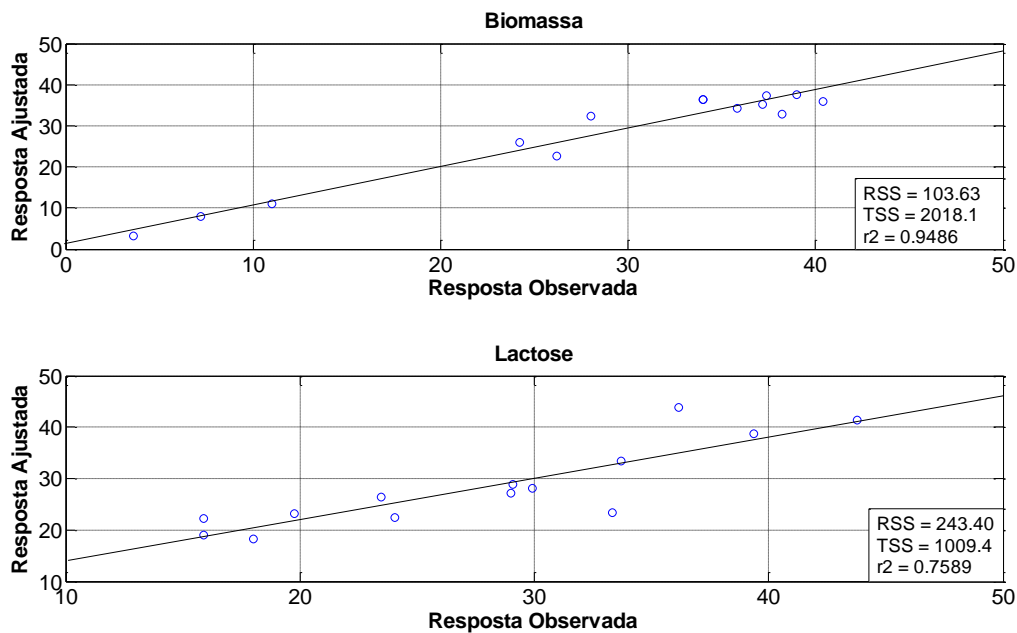


Figura 4-48 – Resposta Ajustada/Observada de biomassa e da lactose pelo conjunto de validação para os resultados obtidos na estratégia 2

Pela análise da Figura 4-48 foi possível concluir que para a estimativa da concentração biomassa e de lactose, as 4 componentes utilizadas são suficientes para obter uma estimativa razoável partindo das variáveis medidas *online*.

Através da aplicação desta técnica é possível a criação de um modelo matemático que parte das variáveis monitorizadas e registadas pelo sistema BioCTR e tem a capacidade de previsão de propriedades como a concentração de biomassa activa e lactose.

5. Conclusões

Neste trabalho foi utilizada uma cultura de *Escherichia coli* geneticamente modificada. A modificação genética consistiu na inserção dos genes que codificam as proteínas responsáveis pela síntese de PHB. A activação destes genes é feita através da presença de lactose no meio.

Foram implementadas estratégias de controlo no sistema de monitorização e controlo BioCTR que prevê 2 fases: uma de crescimento ou exponencial e uma segunda fase estacionária ou de produção activa. A alimentação de lactose é feita por pulsos quando o valor de pH atinge um valor superior ao *set-point* mantendo a concentração de lactose no meio acima de um valor mínimo. Utiliza-se esta estratégia para evitar ausência prolongada de lactose que poderá contribuir para a diminuição de produção de PHB. Isto porque, como referido anteriormente, é a lactose que activa os genes que codificam as proteínas envolvidas na síntese do polímero. O controlo de pH é feito adicionando uma base. Se a velocidade de degradação da lactose diminuir ou deixar de existir lactose no meio o pH aumenta e neste caso é adicionado um novo pulso de fonte de carbono. A adição de fonte de carbono e de azoto pode ser controlada por meio de balanças, ou adicionando pulsos com uma duração fixa. Na realidade usou-se uma estratégia mista porque a dinâmica de variação do peso da balança é lenta o que leva a que seja adicionado um excesso de fonte de carbono em relação ao desejado, pelo que este valor é corrigido com o tempo de adição. Além do controlo da adição de fontes de carbono e azoto, o programa ainda permite a monitorização de variáveis **pH**, pressão de oxigénio dissolvido (**pO₂**), volume de oxigénio adicionado (**VO₂**), percentagem de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento (**%O₂/ar**), velocidade de agitação (**vel.agitação**) e volume de amónia adicionada (**VBase**). O programa permite a construção de ciclos de operação de forma a manter constantes o tempo de residência hidráulico (**TRH**) e o tempo de retenção de lamas (**TRL**).

Foram realizados quatro ensaios experimentais com o objectivo de estudar diferentes estratégias de alimentação de fonte de carbono, com o intuito de otimizar o crescimento celular e a produção de PHB. Estes foram separados em 2 grupos de estudo: os dois primeiros ensaios serviram para estudar a influência da concentração de lactose verificando qual é o efeito na dinâmica de consumo de lactose na produção de PHB e os 2 últimos para verificar qual a influência do meio de crescimento na produção de PHB.

Nos dois primeiros ensaios experimentais usou-se lactose comercial como fonte de carbono em meio MR. O pH foi controlado com um *set-point* de 6.8 e o pO₂ com um *set-point* de 60% durante a fase de crescimento e de 30% durante a fase de produção activa. Usou-se uma solução aquosa com 28% em volume de amónia para controlar o pH e como fonte de azoto. Seria de esperar que disponibilizando maiores quantidades de lactose se obteriam maiores quantidades de PHB, ou seja, a produção de PHB seria maior pela

utilização de concentração de lactose maiores na alimentação. Mas pela observação dos resultados experimentais e comparação dos parâmetros cinéticos calculados das estratégias 1 e 2 verifica-se que os valores das produtividades e de conteúdo em PHB são semelhantes. Possivelmente o metabolismo da *Escherichia coli recombinante* desviou parte da lactose, que poderia ser canalizada para a produção de PHB, para a produção de ácidos orgânicos. Quando a concentração de lactose na alimentação é superior a 20 g/L verificou-se que existiu grande produção e acumulação de ácidos orgânicos, nomeadamente de piruvato, originando uma diminuição do valor de pH e uma possível inibição da produção de PHB e do crescimento. Este facto leva a adição de uma solução concentrada com 28% em volume de amónia que foi utilizada para manter o valor de pH no *set-point*, esta base também foi utilizada como fonte de azoto. Esta adição de amónia também levou à sua acumulação originando uma possível inibição da cultura pela amónia. Também se verificou que a ausência de lactose na cultura poderá ter tido uma influência negativa na produção de PHB prejudicando as gerações futuras do organismo produtor.

Com base nas observações anteriores foram feitos mais 2 ensaios experimentais com meio de cultura diferentes, usando como estratégia a adição de pulsos de lactose pela subida do valor de pH, sendo os pulsos dados de forma a manter a concentração de lactose abaixo de 10 g/L e o pO_2 a 60%. A manutenção da concentração de lactose em valores baixo tem como objectivo evitar a sua acumulação e a possível inibição por parte dos ácidos orgânicos produzidos. Utilizando o meio LB obteve-se maior percentagem de PHB produzido em comparação com meio MR.

Esta estratégia parece ser promissora, no entanto, necessita de ser complementada com controlo da concentração de lactose com a medição em linha da taxa de respiração e a medição em linha da concentração celular no caldo de fermentação. Desta forma poderá ser possível relacionar a taxa de consumo de oxigénio com as velocidades de crescimento e de produção de PHB. Por esta via poder-se-á otimizar o processo tendo em vista o aumento da produtividade. Como não temos sensores disponíveis para realizar estas medidas em linha é necessário utilizar algoritmos de predição. Com este intuito foram feitos estudos de modelação e foram aplicadas técnicas de PCA e PLS utilizando os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais realizados. Estas técnicas possibilitam a implementação de novas estratégias de controlo e monitorização.

Nos estudos de modelação, o objectivo foi construir um modelo simples com base nos princípios da parcimónia. Neste caso, o objectivo foi a construção de modelo é, sobretudo, a previsão da dinâmica da produção de biomassa e PHB e de consumo de lactose e amónia. No modelo construído não estão incluídas as dinâmicas do consumo de oxigénio nem de produção de ácidos orgânicos. Após a aplicação do modelo verificou-se que o modelo permite seguir a dinâmica do consumo de lactose e da produção de biomassa

e permitindo a identificação de alguns parâmetros de crescimento e consumo, tais como, os rendimentos biomassa/substrato e PHB/lactose. Este modelo será complementado no futuro com as dinâmicas de consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono e ácidos orgânicos.

Complementadas as análises dos ensaios experimentais foram aplicadas técnicas de PCA, onde é possível a identificação de variáveis de processo que apresentam comportamentos semelhantes e distintos. Complementando com as conclusões retiradas dos ensaios experimentais, verificou-se tanto o **pH** e **pO₂** apresentam comportamentos distintos face às restantes variáveis monitorizadas. Por outro lado, o volume de adicionado de oxigénio (**VO₂**) juntamente com a percentagem de oxigénio adicionado ao caudal de arejamento (**%O₂/ar**) e de amónia (**VBase**) apresentam comportamento semelhante ao longo dos ensaios experimentais.

A aplicação do PLS aos ensaios experimentais permitiu a criação um modelo partindo de combinações lineares das variáveis obtidas pelo sistema de monitorização e controlo permitindo a estimativa de propriedades como a concentração de biomassa e de lactose. A aplicação desta técnica permite a criação de um modelo com capacidades de previsão mas no entanto será necessário aperfeiçoar o modelo utilizando resultados experimentais que incluam a dinâmica das variáveis **pH** e **pO₂**. Nos resultados experimentais utilizados, estas duas variáveis estão a ser controladas pelo que o seu valor é constante durante a maior parte do tempo. A dinâmica de variação do **pH** e do **pO₂** foi retirada utilizando o **VO₂** e o **VBase** no modelo.

Através da aplicação das técnicas de identificação, PCA e PLS, foi possível concluir foi possível verificar as variáveis que apresentam comportamentos semelhantes e o seu contributo para a produção de PHB e biomassa e consumo de lactose. Estas técnicas apresentam uma oportunidade e boa base para a criação de sensores de *software*.

Estas técnicas serão no futuro integradas no *software* de monitorização e controlo já existente. A integração destas ferramentas permitirá não só um melhor acompanhamento das dinâmicas de consumo de soro de leite e a produção de PHB bem a criação de novas estratégias de alimentação, nomeadamente estratégias de alimentação em contínuo, com o objectivo de otimizar a produção evitando a acumulação de lactose, amónia e ácidos orgânicos.

6. Bibliografia

- Ahn, W. S., Park, S. J., & Lee, S. Y. (2000). Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3.
- Bastin, G., & Dochain, D. (Eds.). (1990). *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*. Amesterdão: Elsevier Science Publishers.
- Carlson, R., Wlaschin, A., & Srienc, F. (2005). Kinetic Studies and Biochemical Pathway Analysis of Anaerobic Poly-(R)-3-Hydroxybutyric Acid Synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 7.
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 8.
- Coutinho, B. C., Miranda, G. B., Sampaio, G. R., Souza, L. B. S. d., Santana, W. J., & Coutinho, H. D. M. (2004). A Importância e as Vantagens Do Polihidroxibutirato (Plástico Biodegradável). *Holos*, 3, 5.
- Cunha, C. C. F., Glassey, J., Montague, G. A., Albert, S., & Mohan, P. (2002). An assessment of seed quality and its influence on productivity estimation in an industrial antibiotic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(6), 9.
- Eusébio, M. F. J. (2006). *Development of a universal interface for monitoring and control of chemical and biochemical processes*. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Ferreira, E. C. (1995). *Identificação e Controlo Adaptativo De Processo Biotecnológicos*. Universidade do Porto, Porto.
- Ferreira, E. C., & Azevedo, S. F. d. (2007). Modelação, Monitorização e Controlo de Reactores Biológicos. In M. M. d. Fonseca & J. A. Teixeira (Eds.), *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações* (pp. 193 - 230). Lisboa: Lidel.
- Fonseca, G. G. (2003). *Produção de polihidroxialcanoatos por Escherichia coli recombinante*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Gasteiger, J. (Ed.). (2003). *Handbook of Chemoinformatics From Data to Knowledge* (Vol. 3). Weinhein: Wiley-VCH Verlag.
- Jong, S. d. (1993). SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 18, 12.
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2007). Polyhydroxybutyrate - An Alternative to Plastics. *BIOBEAM*.
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlić, A., & Braunegg, G. (2007). Potential of Various Archae- and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey. *Macromolecular Bioscience*, 7(2), 8.

- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria *Trends in Biotechnology*, 14(11), 7.
- Lee, S. Y., Hong, S. H., Park, S. J., Wegen, R. v., & Middelberg, A. P. J. (2005). Metabolic Flux Analysis on the Production of Poly(3-hydroxybutyrate). In A. Steinbüchel (Ed.), *Biopolymers Online* (pp. 249 - 257): John Wiley and Sons.
- Lee, S. Y., Middelberg, A. P. J., & Lee, Y. K. (1997). Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 19(10), 2.
- Popova, S. B. (2007). Adaptive Control For PHB Production. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, XI(1), 10.
- Rosipal, R., & Krämer, N. (2006). Overview and recent advances in partial least squares *Lecture Notes in Computer Science* (pp. 34-51): Springer.
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., & Reis, M. A. M. (2003). Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas. *Boletim de Biotecnologia*(76), 5.
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57(1), 11.
- Steinbüchel, A., & Fächtenbusch, B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production *Trends in Biotechnology*, 16(10), 8.
- Tian, P.-Y., Shang, L., Ren, H., Mi, Y., Fan, D.-D., & Jiang, M. (2009). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. *African Journal of Biotechnology*, 8, 5.

A. Listagem dos resultados experimentais e cálculo dos parâmetros cinéticos

Este anexo inclui as tabelas dos resultados experimentais relativos às quatro experiências efectuadas e a determinação dos parâmetros cinéticos, nomeadamente, a taxa específica de crescimento, a produtividade específica e volumétrica e os rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose.

Estratégia 1

A Tabela A-1 e a Tabela A-2 mostram os resultados registados pelo BioCTR e valores de concentração de lactose relativos à estratégia 1.

Tabela A-1 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 1 (Parte 1)

t (h)	pH	pO ₂	VO ₂ (L)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	VBase (mL)	[Lactose] (g/L)
0.00	6.71	79	0	0	205	0	18.57
3.17	6.78	60.1	0	0	486	2	17.65
5.42	6.79	59	0	0	973	5	17.26
6.42	6.79	62	121	44	1023	7	15.75
7.58	6.79	59.1	270	32	1025	9	11.78
8.18	6.78	59.9	384	37	1025	11	8.57
8.28	6.77	59.3	393	39	1025	11	17.33
9.52	6.77	61.1	662	47	1025	15	13.36
10.72	6.79	63.9	964	53	1025	19	1.81
10.77	6.76	51.7	977	57	1025	19	8.65
11.47	6.77	61.8	1175	56	1025	22	3.10
11.55	6.74	62.2	1195	58	1025	22	16.60
12.68	6.79	62.5	1522	59	1025	26	5.00
12.77	6.75	60.2	1540	63	1025	27	14.82
13.45	6.78	61	1749	58	1025	29	4.93
13.58	6.74	60.2	1786	59	1025	30	20.27
14.22	6.79	60.1	1968	59	1025	32	17.39
15.13	6.82	68.6	1235	44	1025	36	0.00
15.22	6.77	52.2	2254	66	1025	36	6.19
15.78	6.79	60.4	2416	59	1025	38	3.35
16.00	6.97	61.2	2457	30	1025	38	0.00
16.05	6.86	47.1	2467	50	1025	38	9.20
16.60	6.79	54.2	2608	62	1025	41	0.00
16.65	6.74	58.4	2625	64	1025	41	13.89
17.42	6.79	62	2848	57	1025	44	0.00
17.50	6.76	57.8	2869	62	1025	45	12.05
18.65	7.19	27.6	3079	2	1025	48	0.00
18.75	6.93	0	3085	56	1025	48	7.99
19.50	7.12	31.8	3320	22	1025	52	0.00
19.58	6.84	10.8	3335	72	1025	52	10.44
20.20	6.79	27.4	3563	81	1025	55	0.00

Tabela A-2 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 1 (Parte 2)

t(h)	pH	pO ₂	VO ₂ (L)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	V _{Base} (mL)	[Lactose] (g/L)
20.30	6.78	27.6	3605	79	1025	56	15.41
21.00	6.78	29.7	3858	76	1025	60	0.00
21.12	6.74	33.3	3900	72	1025	61	15.03
21.83	6.78	31.7	4154	70	1025	65	0.00
21.95	6.72	32.4	4187	62	1025	66	10.39
22.58	6.99	39	4409	45	1025	70	0.00
22.67	6.78	31.6	4429	62	1025	70	10.96
23.08	6.78	31.2	4577	68	1025	74	0.00
23.17	6.76	28.1	4605	73	1025	75	17.56
23.83	6.76	30	4839	72	1025	81	0.00
23.92	6.72	31.1	4868	73	1025	82	14.87
24.50	6.78	31.5	5071	72	1025	88	0.00
24.60	6.77	26.4	5106	77	1025	90	18.86
25.55	7.12	31.9	5449	44	1025	98	0.12
25.63	6.74	16.8	5472	81	1025	98	8.25
27.55	7.17	31.4	5779	43	1025	106	2.03
28.05	7.65	29	5864	26	1025	106	0.00

Na Tabela A-3 estão apresentados os valores de concentração de PHB, biomassa activa e conteúdo em PHB relativas à estratégia 1.

Tabela A-3 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 1

t (h)	%PHB	[PHB] (g/L)	X (g/L)
7.58	9.39	0.58	4.89
12.68	10.97	2.06	19.54
16.00	13.68	5.27	34.93
16.12	14.75	12.27	70.93
17.07	17.61	17.57	77.63
28.05	28.47	32.35	60.05

A taxa de crescimento específica (μ) é definida como a variação da concentração da biomassa activa por unidade de tempo. O valor máximo da taxa de crescimento específica ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinado pela regressão linear simples da fase exponencial $\ln X$ e tempo. A Figura A-1 mostra os resultados do cálculo da taxa de crescimento específica usando os resultados obtidos na estratégia 1.

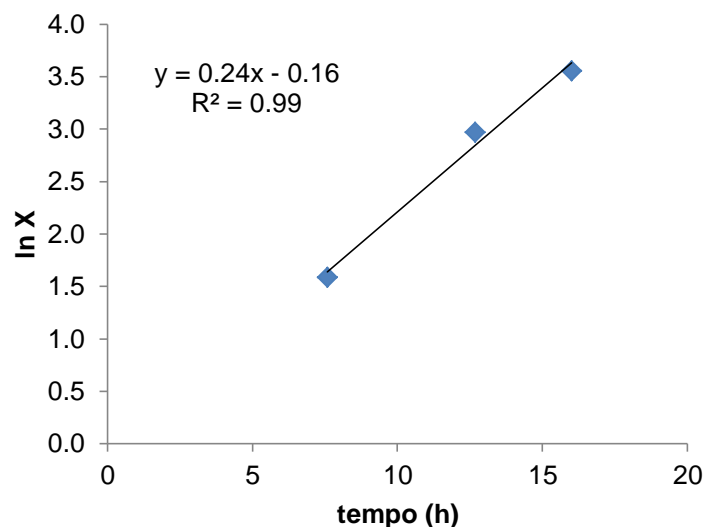


Figura A-1 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 1

A Tabela A-4 apresenta os valores usados para o cálculo da produtividade volumétrica e específica e os rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose. Os cálculos encontram-se descritos no capítulo 3.4 e resumidos na Tabela A-5.

Tabela A-4 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB, CDW e biomassa activa relativos à estratégia 1

[Lactose] na alimentação (g/L)	230.00
Tempo total (h)	28.05
Volume gasto de Lactose (L)	1.13
[PHB]_{máx} (g/L)	32.35
X_{máx} (g/L)	77.63

Tabela A-5 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 1

μ (h⁻¹)	0.24
r_{PHB} (g/(L.h))	1.15
q_{PHB} (h⁻¹)	0.01
Y_{X/S} (gX/gS)	0.23
Y_{PHB/S} (gPHB/gS)	0.12
%PHB_{máx}	28.47

Estratégia 2

A Tabela A-6 e a Tabela A-7 os resultados registados pelo BioCTR relativos à estratégia 2.

Tabela A-6 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR à da estratégia 2 (Parte 1)

t (h)	pH	pO ₂	VO ₂ (L)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	VBase (mL)
0.00	6.36	90	0	0	200	0
0.50	6.84	75.1	0	0	206	0
3.25	6.78	62.8	0	0	206	0
5.25	6.79	59.2	0	0	561	7
7.42	6.78	57.5	0	0	945	11
8.25	6.79	59.3	0	0	1030	13
8.37	6.77	54	3	1	1030	14
9.20	6.78	60.4	67	14	1030	16
9.25	6.76	60.3	75	11	1030	17
9.67	6.78	59.6	106	18	1030	18
9.77	6.76	60.6	115	22	1030	18
10.35	6.78	61.1	178	20	1030	20
10.43	6.77	59.2	185	22	1030	21
10.85	6.78	62.8	244	23	1030	23
10.92	6.74	55.1	252	23	1030	23
12.07	6.79	62.6	429	37	1030	28
12.13	6.75	48.6	442	31	1030	28
13.33	6.77	59.9	644	46	1030	33
14.30	6.78	57.6	808	36	1030	37
14.37	6.76	59	824	41	1030	37
15.27	6.78	62.1	982	43	1030	40
15.32	6.75	57	992	26	1030	41
15.77	6.78	60.7	1089	37	1030	42
15.83	6.75	60.8	1105	50	1030	42
16.35	6.79	52.8	1203	47	1030	44
16.43	6.77	58.7	1220	41	1030	44
17.42	6.78	59.6	1468	40	1030	48
18.40	6.78	64	1714	54	1030	50
18.47	6.74	57.5	1731	49	1030	51
19.40	6.78	62.5	1937	57	1030	53
20.17	6.78	59.1	2074	37	1030	55
20.27	6.76	31.3	2091	38	1030	55
21.57	6.78	22.5	2287	33	1030	60
22.60	6.78	32.8	2401	42	1030	62
23.80	6.78	30.9	2426	13	908	65
24.77	6.79	30.4	2426	0	856	67

Tabela A-7 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR à da estratégia 2 (Parte 2)

t (h)	pH	pO ₂	VO ₂ (L)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	VBase (mL)
25.77	6.79	30.3	2426	0	805	69
26.77	6.79	30.1	2426	0	704	71
27.77	6.78	30.8	2426	0	728	73
28.77	6.79	30.2	2426	0	569	74
29.77	6.78	33.3	2426	0	467	76
31.27	6.79	29.1	2426	0	443	79
32.77	6.78	31.7	2426	0	206	82
34.80	6.79	31.9	2426	0	382	85
38.15	6.79	40.3	2426	0	206	89
40.40	6.79	30.6	2426	0	206	92
42.48	6.79	37.7	2426	0	206	95
44.67	6.78	45.4	2426	0	206	98
46.98	6.78	32.1	2426	0	206	100
48.77	6.79	29.1	2426	0	206	103
49.77	6.78	29.8	2426	0	206	103
51.77	6.79	31.6	2426	0	206	106
54.52	6.79	31.6	2426	0	206	108

As tabelas seguintes apresentam as concentrações de lactose (Tabela A-8) e de amónia (Tabela A-9) relativas à estratégia 2.

Tabela A-8 – Valores de concentração de lactose relativos à estratégia 2

t (h)	[Lactose] (g/L)
0.50	20.21
5.25	19.67
7.42	15.88
8.25	9.33
8.37	17.18
9.20	15.90
9.25	23.91
9.67	22.68
9.77	34.19
10.35	33.33
10.43	40.77
10.92	40.65
12.07	39.71
12.13	48.76
13.33	37.22
14.30	23.45
14.37	32.01
15.27	23.00
15.32	30.70
15.77	19.78
15.83	35.36
16.35	21.73
16.43	41.21
17.42	31.44
18.40	18.00

18.47	28.23
19.40	18.54
20.17	10.17
20.27	19.76
21.57	29.01
22.60	35.63
23.80	41.09
24.77	36.45
25.77	32.58
26.77	24.05
27.77	18.82
28.77	19.88
29.77	25.18
31.27	30.86
32.77	29.91
34.80	29.94
38.15	29.09
40.40	31.74
42.48	33.71
44.67	31.41
46.98	39.37
48.77	42.17
49.77	43.79
51.77	42.60
54.52	36.17

Tabela A-9 – Valores de concentração de amónia relativos à estratégia 2

t(h)	Amónia (g/l)
0.50	0.47
5.25	0.16
8.25	0.23
9.20	0.15
9.67	0.21
10.35	0.22
10.85	0.20
12.07	0.19
14.30	0.22
15.27	0.41
15.77	0.39

16.35	0.28
18.40	0.34
20.17	0.28
21.57	0.31
23.80	0.40
25.77	0.38
28.77	0.39
32.77	0.54
38.15	0.44
42.48	0.59
46.98	0.59
49.77	0.46
54.52	0.55

Na Tabela A-10 estão apresentados os valores de concentração de PHB, biomassa activa e conteúdo em PHB relativas à estratégia 2.

Tabela A-10 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 2

t (h)	%PHB	[PHB] (g/L)	X (g/l)
9.20	12.17	1.29	9.31
9.70	14.20	1.82	10.98
10.85	11.08	1.94	15.56
12.07	15.93	3.41	17.99
16.35	18.12	6.20	28.00
26.77	22.63	14.08	48.12
34.80	24.82	23.87	72.33
54.52	25.71	28.08	81.12
38.15	23.60	23.70	76.70
42.48	33.25	34.65	69.55
46.98	29.29	27.65	66.75
49.77	22.59	19.07	65.33
51.77	33.59	33.26	65.74

A taxa de crescimento específica (μ) é definida como a variação da concentração da biomassa activa por unidade de tempo. O valor máximo da taxa de crescimento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinado pela regressão linear simples da fase exponencial $\ln X$ e tempo. A Figura A-2 mostra os resultados do cálculo da taxa de crescimento específica usando os resultados obtidos na primeira experiência.

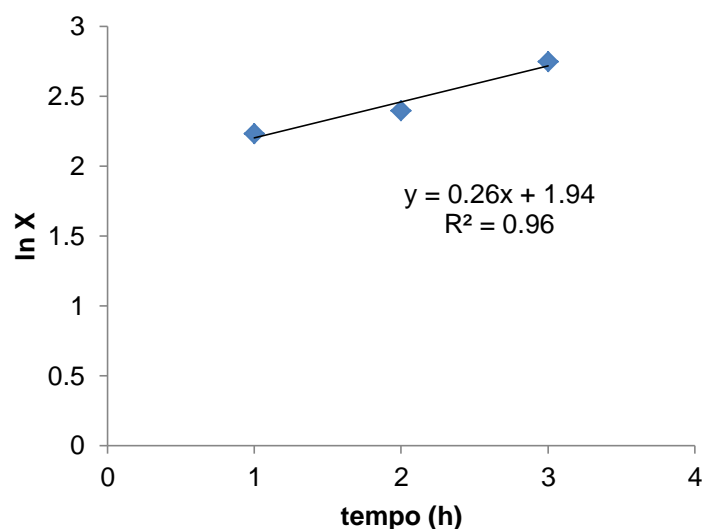


Figura A-2 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 2

A Tabela A-4 apresenta os valores usados para o cálculo da produtividade volumétrica e específica e os rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose. Os cálculos encontram-se descritos no capítulo 3.4 e resumidos na Tabela A-5.

Tabela A-11 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB, CDW e biomassa activa relativos à estratégia 2

[Lactose] na alimentação (g/L)	273.37
Tempo total (h)	54.52
Volume gasto de Lactose (L)	1.04
[PHB]_{máx} (g/L)	34.65
X_{máx} (g/L)	81.12

Tabela A-12 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 2

μ (h⁻¹)	0.26
r_{PHB} (g/(L.h))	1.10
q_{PHB} (h⁻¹)	0.01
Y_{X/S} (gX/gS)	0.35
Y_{PHB/S} (gPHB/gS)	0.12
%PHB_{máx}	33.59

Estratégia 3

A Tabela A-13 e a Tabela A-14 mostram os resultados registados pelo BioCTR e valores de concentração de lactose relativos à estratégia 3.

Tabela A-13 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 3 (Parte 1)

t (h)	pH	pO ₂	VO ₂ (l)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	V _{Base} (ml)	[Lactose] (g/L)
0.00	6.46	89.8	0	0	206	0	7.96
0.13	6.84	67.5	0	0	206	0	7.90
1.87	6.89	68.5	0	0	206	0	8.48
4.52	6.85	66.7	0	0	206	0	8.30
6.82	6.81	55.7	0	0	349	0	4.47
9.02	6.86	59.6	0	0	688	3	6.01
12.15	6.79	59.8	0	0	1013	7	3.37
13.05	6.78	60.8	21	8	1028	8	1.30
13.12	6.76	59.2	22	8	1028	8	10.54
15.30	6.77	59.4	167	21	1028	17	1.53
15.82	6.83	67.8	209	0	1028	18	0.00
15.85	6.80	50.5	210	15	1028	18	8.88
17.28	6.87	68.2	373	0	1028	25	0.00
17.32	6.83	33.3	372	0	1028	25	4.73
18.37	6.87	66.5	486	0	863	31	0.00
18.45	6.84	21.8	486	0	1029	31	0.71
19.28	6.87	76.1	567	0	1029	36	0.00
19.32	6.83	45.2	567	0	1029	36	0.14
19.63	6.88	60.1	602	19	1029	39	0.00
19.72	6.77	40.4	610	43	1029	39	0.10
20.72	6.86	77.4	612	0	1029	45	0.00
20.77	6.83	60.9	712	12	1029	45	0.00
21.43	6.85	69.6	788	0	1029	50	0.00
21.48	6.80	30.7	789	27	1029	50	0.08
22.12	6.88	68	858	0	1029	55	0.00
22.17	6.82	39.8	859	11	1029	55	0.11
22.73	6.87	74.4	923	0	1029	59	0.00
22.80	6.86	36.4	925	24	1029	59	0.03
23.37	6.88	67.7	987	1	1029	63	0.00
23.42	6.86	34.3	988	41	1029	63	0.14
24.00	6.91	62.3	1050	5	1029	67	0.00
24.07	6.88	41	1052	14	1029	67	0.12
24.58	6.88	71.3	1108	3	1029	70	0.00
24.63	6.87	31.5	1109	26	1029	70	0.00
25.17	6.86	69	1172	15	1029	73	0.00
25.23	6.89	43.9	1173	24	1029	73	0.00
25.78	6.90	62.1	1235	14	1029	77	0.00
25.83	6.90	51.3	1237	16	1029	77	0.04
26.30	6.88	54	1292	23	1029	80	0.00
26.33	6.91	48.9	1293	24	1029	80	0.00
26.82	6.90	67.1	1354	18	1029	83	0.04

Tabela A-14 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 3 (Parte 2)

t (h)	pH	pO ₂	VO ₂ (l)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	V _{Base} (ml)	[Lactose] (g/L)
26.87	6.96	52.6	1356	22	1029	83	0.05
27.40	6.94	65	1411	7	1029	86	0.05
27.43	6.98	51.1	1412	23	1029	86	0.00
27.95	6.90	65.1	1466	8	1029	89	0.09
28.00	6.93	45	1476	23	1029	89	0.05
28.52	6.86	63.4	1519	10	1029	91	0.00
28.57	6.85	55.4	1521	19	1029	91	0.00
29.12	6.86	62.5	1568	8	1029	94	0.00
29.17	6.88	51.1	1570	16	1029	94	0.00
29.75	6.89	63.5	1619	6	1029	97	0.00
29.82	6.85	49.1	1620	20	1029	97	0.01
30.45	6.87	65	1674	3	1029	100	0.02
30.50	6.88	61.6	1675	7	1029	100	0.00
31.15	6.85	62.4	1725	7	1029	103	0.00
31.20	6.83	55.9	1726	16	1029	103	0.00
31.90	6.85	62.9	1889	73	1029	106	0.00
31.95	6.87	50.7	1908	82	1029	106	0.00
32.65	6.86	88.7	2187	55	1029	109	0.00
32.72	6.93	94.6	2212	61	1029	109	0.00
33.38	7.25	58.7	2463	4	1029	113	0.00
33.43	7.22	58	2464	8	1029	113	0.00
34.17	6.84	62	2497	4	1029	116	0.00
34.20	6.83	56.6	2498	9	1029	116	0.00
35.07	6.85	59.2	2543	7	1029	119	0.00
35.10	6.94	60.1	2545	13	1029	119	0.00
36.13	6.91	64.3	2637	9	1029	123	0.00
36.18	6.94	53.1	2639	9	1029	123	0.00
36.40	6.98	64.5	2733	0	1029	129	0.00
36.42	7.03	60.3	2733	4	1029	129	0.00
37.75	6.83	65.3	2793	0	1029	135	0.00
37.77	6.86	60.2	2793	2	1029	135	0.00
40.37	6.84	62.3	2818	0	832	143	0.00
40.40	6.85	56.9	2818	0	882	143	0.00
42.18	6.84	61.9	2818	0	687	151	0.00
42.25	6.86	59.6	2818	0	744	151	0.00
44.38	6.82	61.6	2818	0	572	161	0.00
44.43	6.81	55.7	2818	0	632	161	0.00
47.63	6.82	61.9	2818	0	284	171	0.00
47.68	6.80	60.8	2818	0	309	171	0.00
51.10	6.78	61.7	2818	0	295	183	0.00

Na Tabela A-15 estão apresentados os valores de concentração de amónia relativa à estratégia 3.

Tabela A-15 – Valores de concentração de amónia relativos à estratégia 3

t (h)	Amónia (g/L)		
0.00	0.00	26.30	23.97
0.13	0.00	27.40	23.53
6.82	0.00	28.52	25.88
13.05	2.36	29.75	27.18
15.82	6.42	31.15	28.51
18.37	11.01	32.65	30.12
19.63	13.96	34.17	31.42
21.43	17.51	36.13	35.86
22.73	17.91	37.75	42.55
24.00	21.47	42.18	49.80
25.17	22.99	47.63	53.26
		51.10	55.40

Na Tabela A-16 estão apresentados os valores de concentração de PHB, biomassa activa e conteúdo em PHB relativas à estratégia 3.

Tabela A-16 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 3

t (h)	%PHB	[PHB] (g/l)	X (g/l)
0.13	0.00	0.00	0.40
6.82	0.00	0.00	1.60
13.05	0.00	0.00	3.20
15.82	0.00	0.00	7.60
17.28	0.00	0.00	9.00
19.28	0.00	0.00	11.20
19.63	0.00	0.00	7.40
20.72	0.00	0.00	14.00
21.43	0.00	0.00	15.00
22.12	0.00	0.00	17.00
22.73	0.00	0.00	17.00
23.37	0.00	0.00	13.80
24.00	0.00	0.00	18.00
24.58	0.00	0.00	15.20
25.17	15.40	2.43	13.37
26.82	14.50	2.96	17.44

27.95	16.20	3.18	16.42
28.52	19.14	3.75	15.85
29.12	18.23	4.08	18.32
29.75	20.95	4.15	15.65
30.45	21.95	4.79	17.01
31.15	21.61	4.75	17.25
31.90	18.00	4.18	19.02
32.65	19.52	4.80	19.80
33.38	20.79	5.20	19.80
34.17	19.24	5.04	21.16
35.07	17.42	4.60	21.80
36.13	20.17	5.57	22.03
36.40	21.49	6.15	22.45
37.75	20.95	6.29	23.71
40.37	22.07	6.93	24.47
42.18	23.96	4.41	13.99
44.38	23.32	6.25	20.55
47.63	20.34	6.63	25.97
51.10	20.98	5.33	20.07

A taxa de crescimento específica (μ) é definida como a variação da concentração da biomassa activa por unidade de tempo. O valor máximo da taxa de crescimento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinado pela regressão linear simples da fase exponencial $\ln X$ e tempo. A Figura A-3 mostra os resultados do cálculo da taxa de crescimento específica usando os resultados obtidos na primeira experiência.

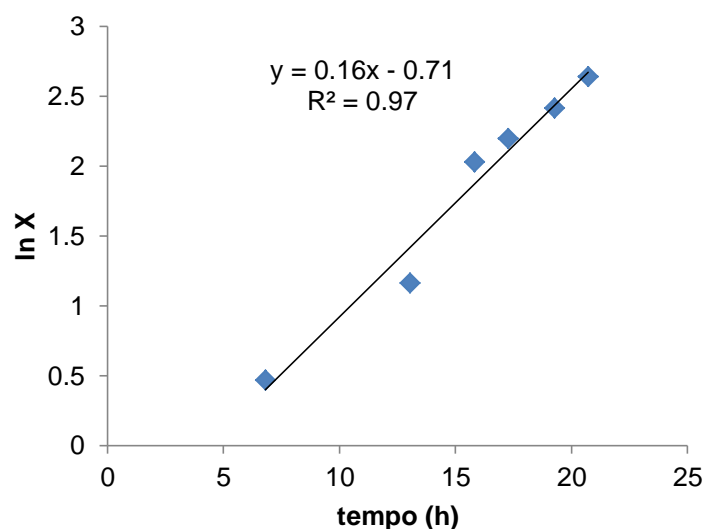


Figura A-3 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 3

A Tabela A-17 apresenta os valores usados para o cálculo da produtividade volumétrica e específica e os rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose. Os cálculos encontram-se descritos no capítulo 3.4 e resumidos na Tabela A-18.

Tabela A-17 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB, CDW e biomassa activa relativos à estratégia 3

[Lactose] na alimentação (g/L)	228.52
Tempo total (h)	51.10
Volume gasto de Lactose (L)	1.93
[PHB]_{máx} (g/L)	6.93
X_{máx} (g/L)	25.97

Tabela A-18 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 3

μ (h⁻¹)	0.16
r_{PHB} (g/(L.h))	0.17
q_{PHB} (h⁻¹)	0.01
Y_{X/S} (gX/gS)	0.06
Y_{PHB/S} (gPHB/gS)	0.02
%PHB_{máx}	23.96

Estratégia 4

A Tabela A-19 mostra os resultados registados pelo BioCTR e valores de concentração de lactose relativos à estratégia 4.

Tabela A-19 – Resumo dos dados recolhidos pelo BioCTR e concentração de lactose relativos à da estratégia 4

t (h)	pH	pO ₂	VO ₂ (l)	%O ₂ /ar	vel.agitação (rpm)	VBase (ml)	[Lactose] (g/L)
0.00	6.49	94.2	0	0	205	0	8.97
0.10	7.05	70.7	0	0	205	0	6.32
0.62	7.22	55.3	0	0	282	0	6.24
0.72	7.19	58.1	0	0	423	0	1.71
2.20	6.78	59.7	0	0	717	0	8.56
3.95	6.86	59.9	0	0	938	4	2.40
4.02	6.94	58.9	0	0	949	4	1.19
5.52	6.76	58.8	0	0	970	5	1.26
6.58	6.90	64.1	1	0	869	9	0.00
6.63	6.85	56.1	1	0	974	9	3.21
8.38	6.90	59.8	4	0	1001	15	0.00
8.55	7.08	50.5	4	0	1021	15	1.14
10.05	6.81	58.9	21	8	1024	18	0.00
10.58	7.07	59.7	37	2	1024	19	0.00
10.63	7.01	58.6	38	5	1024	19	1.75
12.73	6.79	60.3	155	18	1024	23	0.00
12.78	6.76	60.1	159	18	1024	23	2.28
14.90	6.81	60.4	380	24	1024	28	0.00
14.97	6.76	60.2	385	23	1024	28	1.77
16.92	6.83	59.9	634	30	1024	32	0.00
16.98	6.75	59.0	645	30	1024	32	1.63
19.18	6.79	60.1	981	34	1024	37	0.00
21.00	6.81	60.4	1296	37	1024	41	0.00
21.07	6.78	59.4	1308	37	1024	41	0.58
22.27	6.79	59.8	1528	38	1024	44	0.00
24.27	6.77	60.7	1896	38	1024	48	0.00
26.27	6.79	61.0	2266	38	1024	53	0.00
28.75	6.92	60.0	2673	29	1024	56	0.00
28.82	6.85	58.0	2683	32	1024	56	0.00
32.27	6.82	38.1	3666	100	1024	65	0.00
35.22	6.84	58.0	4195	31	1024	65	0.00
36.53	6.92	60.6	4391	32	1024	68	0.00
36.58	6.87	58.1	4397	34	1024	68	0.00
40.53	6.81	59.0	5084	36	1024	78	0.00
40.60	6.78	59.6	5092	36	1024	78	0.00
44.60	6.78	60.2	5787	34	1024	89	0.00
44.65	6.79	59.5	5797	35	1024	90	1.23
50.32	6.79	58.6	6737	34	1024	107	0.00

Na Tabela A-20 estão apresentados os valores de concentração de amónia relativa à estratégia 4.

Tabela A-20 – Valores de concentração de amónia relativos à estratégia 4

t (h)	Amónia (g/L)
0.00	0.00
0.10	0.00
0.62	0.00
3.95	1.48
6.58	2.80
8.38	4.44
10.58	4.61
12.73	5.36
14.90	6.30
16.92	6.70
21.00	8.24
24.27	10.57
28.75	12.19
32.27	13.93
36.53	15.01
40.53	17.36
44.60	19.39
50.32	23.87

Na Tabela A-21 estão apresentados os valores de concentração de PHB, biomassa activa e conteúdo em PHB relativas à estratégia 4.

Tabela A-21 – Valores de concentração PHB, biomassa activa e percentagem em PHB relativos à estratégia 4

t (h)	%PHB	[PHB] (g/l)	X (g/l)
0.10	14.58	0.00	0.00
0.62	48.41	0.00	0.00
3.95	27.22	0.98	2.62
6.58	37.85	2.57	4.23
8.38	38.76	3.49	5.51
10.58	42.86	4.80	6.40
12.73	42.68	5.72	7.68
14.90	52.07	7.19	6.61
16.92	41.73	5.01	6.99
21.00	50.59	6.47	6.33
24.27	45.85	6.69	7.91
32.27	53.94	9.38	8.02
36.53	44.27	9.03	11.37
40.53	73.22	15.96	5.84
44.60	36.33	5.16	9.04
50.32	57.09	11.99	9.01

A taxa de crescimento específica (μ) é definida como a variação da concentração da biomassa activa por unidade de tempo. O valor máximo da taxa de crescimento específica ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinado pela regressão linear simples da fase exponencial $\ln X$ e tempo. A Figura A-4 mostra os resultados do cálculo da taxa de crescimento específica usando os resultados obtidos na primeira experiência.

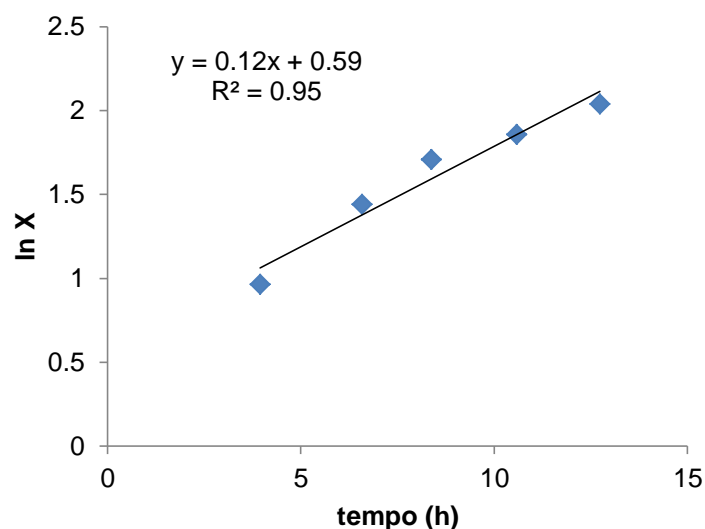


Figura A-4 – Determinação da taxa de crescimento específica da estratégia 4

A Tabela A-22 apresenta os valores usados para o cálculo da produtividade volumétrica e específica e os rendimentos biomassa/lactose e PHB/lactose. Os cálculos encontram-se descritos no capítulo 3.4 e resumidos na Tabela A-23.

Tabela A-22 – Valores de concentração e volume gasto de lactose na alimentação, tempo de duração da estratégia e valores máximos de PHB, CDW e biomassa activa relativos à estratégia 4

[Lactose] na alimentação (g/L)	212.21
Tempo total (h)	50.32
Volume gasto de Lactose (L)	0.67
[PHB]_{máx} (g/L)	15.96
[X]_{máx} (g/L)	11.37

Tabela A-23 – Parâmetros cinéticos relativos à estratégia 4

μ (h⁻¹)	0.12
r_{PHB} (g/(L.h))	0.24
q_{PHB} (h⁻¹)	0.01
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.08
$Y_{\text{PHB}/S}$ (gPHB/gS)	0.08
%PHB_{máx}	73.22

B. Cálculo do valor de K_S e K_N usando os resultados experimentais

Para a determinação do valor de K_S ou constante de saturação de lactose foram feitos 5 ensaios experimentais com diferentes concentrações de lactose, entre as 10g/L e 50 g/L, na alimentação (Pais, Joana Tese de Doutoramento em curso) em colaboração com o grupo de Engenharia Bioquímica e Bioprocessos. Após os ensaios foram determinadas as velocidades de consumo.

O valor de K_S é o valor de concentração de lactose que corresponde à metade da velocidade máxima de consumo como se pode observar pela Figura B-1.

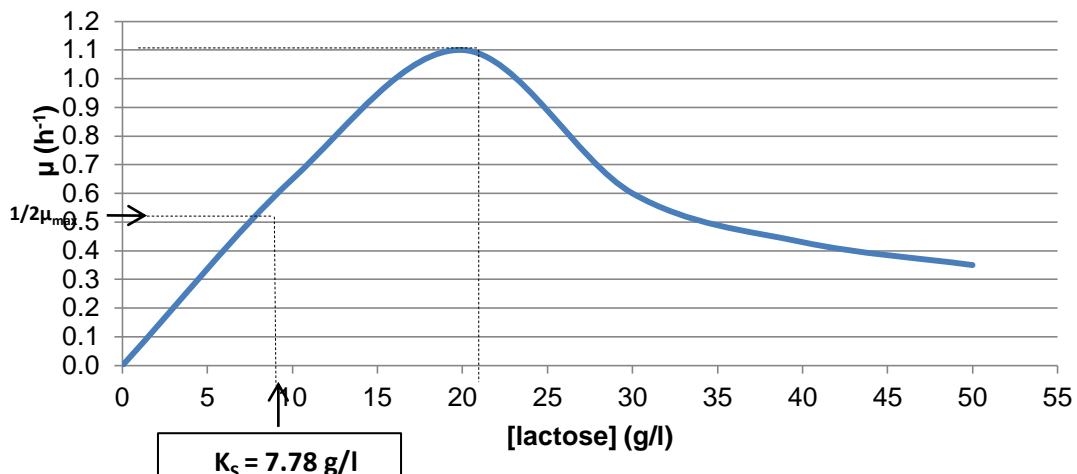


Figura B-1 – Determinação da constante de saturação de lactose

A determinação do valor de K_N ou constante de saturação de amónia foi determinada de evolução da concentração de amónia das amostras retiradas ao longo da estratégia 3. Após os ensaios foram determinadas as velocidades de consumo.

A Figura B-2 ilustra a determinação do valor de K_N , é o valor de concentração de amónia que é metade da velocidade máxima de consumo de amónia.

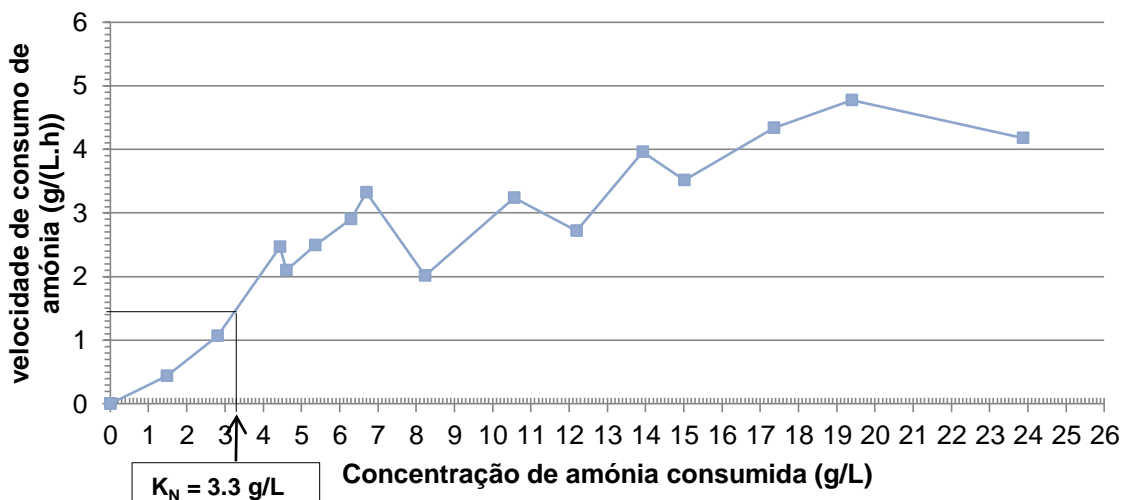


Figura B-2 – Determinação da constante de saturação de amónia.

C. Curvas da saturação de oxigénio para diferentes velocidades de agitação

As figuras seguintes apresentam os valores de pressão de oxigénio dissolvido registados pelo sistema BIOCTR para diferentes velocidades de agitação.

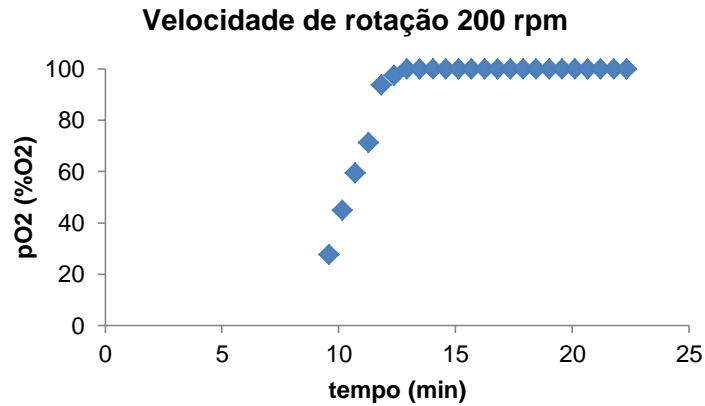


Figura C-1 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 200rpm

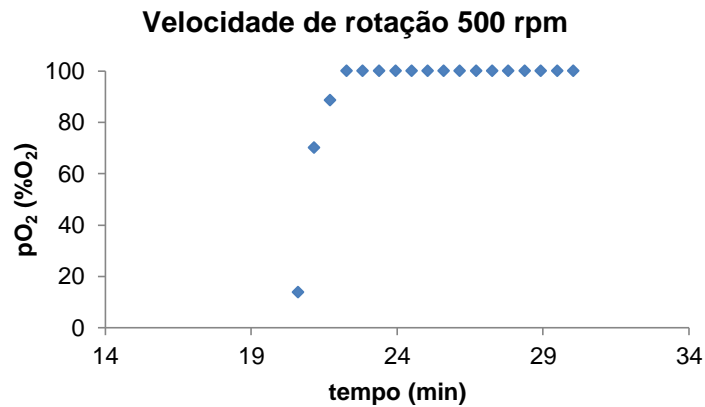


Figura C-2 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 300rpm

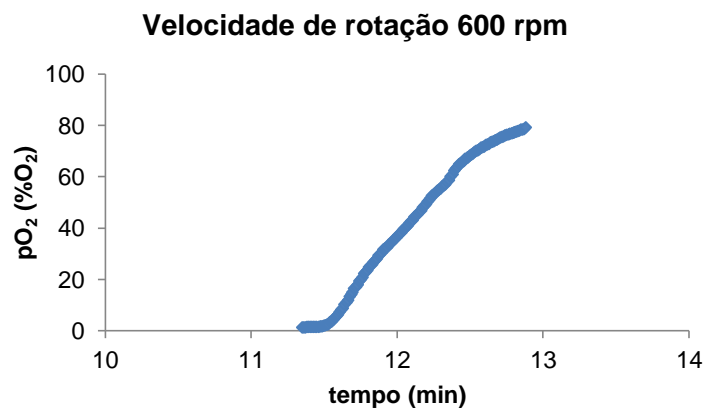


Figura C-3 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 600rpm

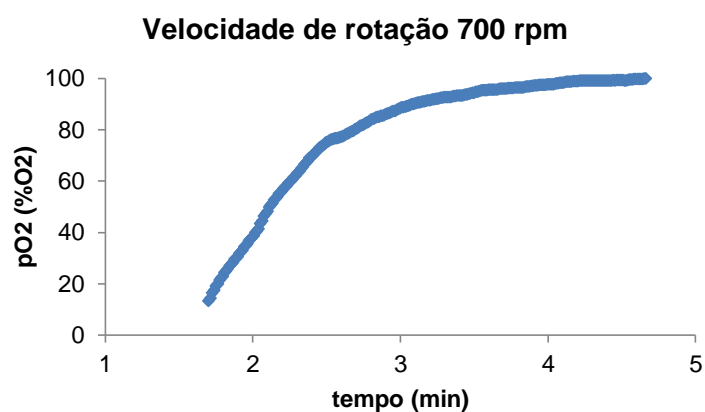


Figura C-4 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 700rpm

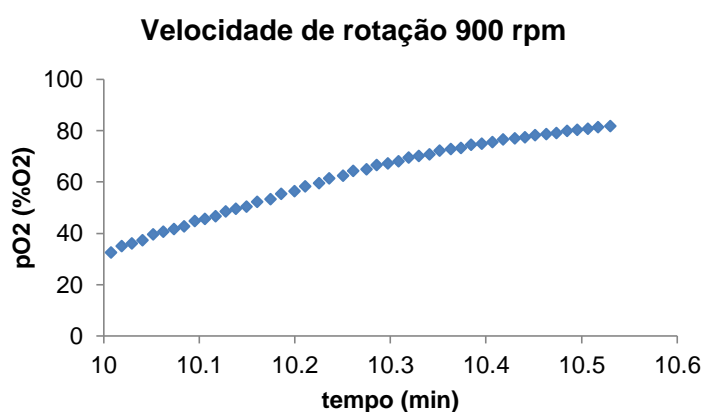


Figura C-5 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 900rpm

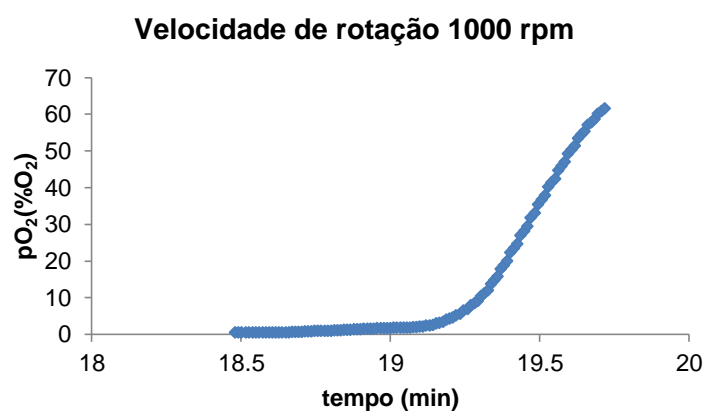


Figura C-6 – Variação da pressão de oxigénio dissolvido em função a uma velocidade de agitação de 1000rpm

D. Demonstração e dedução do modelo dinâmico apresentado para a produção de PHB por meio de uma cultura *Escherichia Coli* recombinante

O modelo descrito tem como base o Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos descrito por Bastin & Dochain.

Volume (V)

$$\frac{dV}{dt} = F_S + F_N - F_{out}$$

Como,

$$F_{in} = F_S + F_N$$

E,

$$D = \frac{F_{in}}{V}$$

Logo,

$$\frac{dV}{dt} = DV - F_{out}$$

Biomassa (X)

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu_1 XV - F_{out}X$$

$$X \frac{dV}{dt} + V \frac{dX}{dt} = \mu_1 XV - F_{out}X$$

$$V \frac{dX}{dt} = \mu_1 XV - F_{out}X - X \frac{dV}{dt}$$

$$V \frac{dX}{dt} = \mu_1 XV - F_{out}X - (F_{in} - F_{out})X$$

$$V \frac{dX}{dt} = \mu_1 XV - F_{in}X$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_1 XV}{V} - \frac{F_{in}}{V}X$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_1 X - DX$$

Lactose (S)

$$\frac{d(SV)}{dt} = -v_1 XV + F_{in}S_{in} - F_{out}S$$

$$S \frac{dV}{dt} + V \frac{dS}{dt} = -v_1 XV + F_{in}S_{in} - F_{out}S$$

$$V \frac{dS}{dt} = -v_1 XV + F_{in}S_{in} - F_{out}S - S \frac{dV}{dt}$$

$$V \frac{dS}{dt} = -v_1 XV + F_{in} S_{in} - F_{out} S - S(F_{in} - F_{out})$$

$$V \frac{dS}{dt} = -v_1 XV + F_{in} S_{in} - S F_{in}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{v_1 XV}{V} + \frac{F_{in}}{V} (S_{in} - S)$$

$$\frac{dS}{dt} = -v_1 X + D(S_{in} - S)$$

Amónia (N)

$$\frac{d(NV)}{dt} = -q_1 XV + F_{in} N_{in} - F_{out} N$$

$$N \frac{dV}{dt} + V \frac{dN}{dt} = -q_1 XV + F_{in} N_{in} - F_{out} N$$

$$V \frac{dN}{dt} = -q_1 XV + F_{in} N_{in} - F_{out} N - N \frac{dV}{dt}$$

$$V \frac{dN}{dt} = -q_1 XV + F_{in} N_{in} - F_{out} N - N(F_{in} - F_{out})$$

$$V \frac{dN}{dt} = -q_1 XV + F_{in} N_{in} - N F_{in}$$

$$V \frac{dN}{dt} = -q_1 XV + F_{in} (N_{in} - N)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{q_1 XV}{V} + \frac{F_{in}}{V} (N_{in} - N)$$

$$\frac{dN}{dt} = -q_1 X + D(N_{in} - N)$$

PHB

$$\frac{d(PHBV)}{dt} = \mu_2 XV - F_{out} PHB$$

$$PHB \frac{dV}{dt} + V \frac{dPHB}{dt} = \mu_2 XV - F_{out} PHB$$

$$V \frac{dPHB}{dt} = \mu_2 XV - F_{out} PHB - PHB \frac{dV}{dt}$$

$$V \frac{dPHB}{dt} = \mu_2 XV - F_{out} PHB - (F_{in} - F_{out}) PHB$$

$$V \frac{dPHB}{dt} = \mu_2 XV - F_{in} PHB$$

$$\frac{dPHB}{dt} = \frac{\mu_2 XV}{V} - \frac{F_{in}}{V} PHB$$

$$\frac{dPHB}{dt} = \mu_2 X - D PHB$$