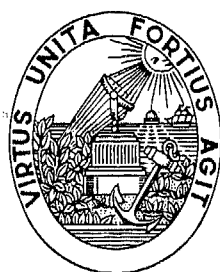


MONITORIZAÇÃO E CONTROLO DE FERMENTADORES

APLICAÇÃO AO FERMENTO DE PADEIRO

Filomena Maria da Rocha Menezes de Oliveira Soares



Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

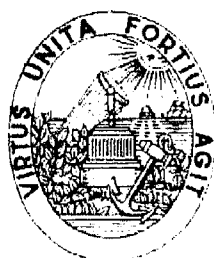
Departamento de Engenharia Química

Porto, 1997

MONITORIZAÇÃO E CONTROLO DE FERMENTADORES

APLICAÇÃO AO FERMENTO DE PADEIRO

Filomena Maria da Rocha Menezes de Oliveira Soares



Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Departamento de Engenharia Química
Porto, 1997

66648) 50477 1111

UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Engenharia
BIBLIOTECA
N.º <u>31647</u>
CDU _____
Data <u>21/12/1998</u>

MONITORIZAÇÃO E CONTROLO DE FERMENTADORES
APLICAÇÃO AO FERMENTO DE PADEIRO

Filomena Maria da Rocha Menezes de Oliveira Soares

Dissertação para Doutoramento em Engenharia Química na
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Departamento de Engenharia Química
Porto, 1997

Tese realizada sob a orientação de-

Doutor Sebastião José Cabral Feyo de Azevedo

Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

e co-orientação de-

Doutor José António Couto Teixeira

Professor Associado do Departamento de Engenharia Biológica

Universidade do Minho

Agradecimentos

Gostaria de deixar aqui registada a admiração e o agradecimento ao Doutor Sebastião Feyo de Azevedo pelo exemplo, dedicação e amizade sempre presentes na orientação deste trabalho.

O agradecimento, também, ao Doutor José Teixeira na co-orientação do trabalho e na disponibilidade demonstrada.

Ao Departamento de Electrónica Industrial da Universidade do Minho, ao qual pertenço, o meu reconhecimento pela disponibilidade e facilidades oferecidas durante a realização deste projecto.

Ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, instituição acolhedora deste trabalho, e ao Instituto de Sistemas e Robótica um registo pelo tempo que por lá passei.

Ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho um agradecimento pela recepção calorosa com que me acolheram durante a execução do trabalho experimental.

Gostaria de deixar registado o financiamento concedido pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica durante dois anos de bolsa para Doutoramento, no âmbito do Programa Ciência.

Ao Eugénio Ferreira, 'companheiro de luta do Fermento de Padeiro' um sincero obrigada pela amizade e apoio nestes anos. À Madalena Alves uma palavra amiga pelo incentivo e apoio no trabalho de laboratório.

Eduardo Soares e Nélon Lima, os meus 'professores' das lides de Microbiologia, um sincero agradecimento pelas explicações pacientes.

Quero também deixar escrito o agradecimento à 'coluna' da Rosário Oliveira, cedida para a análise de açúcares e etanol, sem a qual não poderia ter terminado o trabalho em devido tempo.

Ao Prof. Carl Mandenius o sincero reconhecimento pela gentileza e prontidão no auxílio e cedência do sensor de etanol.

À empresa Gist Brocades um agradecimento pela cedência de melaços para os estudos experimentais.

Pelo acompanhamento e partilha do trabalho experimental um obrigada às Cristinas, a Rocha e a Susana.

Ao Sr. Santos um obrigada pela prontidão de auxílio na resolução de problemas técnicos da instalação experimental.

Na ajuda no aspecto gráfico da tese um registo ao colega António Barros Ferreira. Ao Nuno Faria uma palavra amiga pelo eficiente serviço de 'Secretariado' !...

À Estela Bicho e ao Paulo Garrido um obrigada pelo seu apoio na distribuição do serviço docente e pelo constante incentivo.

Pelo *Resumé*, pelo apoio e disponibilidade de ajuda e pela infinita paciência, o meu agradecimento à Né e à Belinha.

A todos os colegas do DEI, do DEB e do laboratório do Professor Sebastião Feyo o meu sincero agradecimento.

A todos que me acompanharam nesta jornada e que partilharam todos os altos e baixos que este trabalho implicou um reconhecimento carinhoso.

Ao Fernando, ao Bernardo e a meus Pais um Obrigada pelo apoio e paciência gentilmente oferecidos neste 'longo' tempo de trabalho.

Sumário

No presente trabalho apresenta-se um estudo teórico e experimental sobre métodos com base em modelos para a análise e operação de bioreactores. O estudo engloba modelização e análise dinâmicas, métodos de monitorização e de estimativa de parâmetros e projecto de controlo. Utilizou-se o processo de produção de fermento de padeiro como veículo para os estudos experimentais, os quais incluem a utilização de meios (alimentação) semi-sintéticos e de meios industriais.

A estrutura de desenvolvimento teórico utilizada para o projecto dos observadores do estado do processo e para o projecto de controladores não-lineares, alternativos aos controladores clássicos, tem como base um modelo dinâmico generalizado de fermentadores, tal como proposto recentemente (1990) por Bastin e Dochain.

Construiu-se uma plataforma experimental constituída no essencial por - (i) uma unidade de processo, incluindo um fermentador de cinco litros, sensores para medições em linha e elementos finais de controlo (bombas peristálticas); (ii) um espectrómetro de massa para análise dos gases de saída; e (iii) uma unidade de controlo digital local e um computador de supervisão e controlo. Para este último, desenvolveu-se especificamente um programa em Microsoft Visual Basic 3.0, com funções, em tempo-real, de aquisição de dados (via porta série e via interface AD/DA), de observação de estado e de controlo, e com possibilidade de comunicação com outras plataformas informáticas.

Desenvolveu-se e validou-se experimentalmente um modelo teórico para estudo do processo de crescimento da levedura, em meios semi-sintéticos e industriais. Nos estudos com melaços assumiu-se, nos modelos teóricos, um tratamento dito de 'substrato concentrado equivalente', aproximação essa que se verificou válida.

Questões chave na análise e operação de bioreactores são a dificuldade (inexactidão) de medições em linha e a incerteza nos modelos cinéticos. No presente trabalho exploraram-se, teórica e experimentalmente, métodos de estimação do estado em que medindo apenas duas variáveis de estado e as taxas de transferência gasosa para o oxigénio e para o dióxido de carbono, é possível observar as restantes variáveis. Em termos de simulação, os resultados obtidos na estimação de biomassa, glucose e etanol, usando medidas de dióxido de carbono e oxigénio, apontam para um bom desempenho dos estimadores. Na verificação experimental, provou-se a sensibilidade dos algoritmos face ao rigor das medições, em especial a determinação das taxas de transferência gasosa. Testaram-se, também, métodos de estimativa de cinéticas instantâneas, com base no conhecimento do estado, que revelaram problemas de aplicação experimental análogos aos mencionados para a observação do estado.

Em relação ao controlo, estudaram-se algoritmos linearizantes com base em modelos completos e em modelos reduzidos do processo, em termos comparativos com métodos clássicos (algoritmos PID discretos). O estudo foi limitado ao controlo de trajectórias de etanol, através da manipulação da alimentação de substratos. Em relação à problemática das incertezas e variabilidade das características cinéticas, adoptaram-se, nos estudos de controlo não-linear, técnicas de adaptação, em-linha, de parâmetros relevantes das leis de controlo. Uma vez mais os controladores foram inicialmente testados em simulação e posteriormente validados em laboratório. Os resultados apontam para uma maior robustez e desempenho mais favorável do algoritmo adaptativo. Em particular estes algoritmos incorporam directamente características de antecipação de perturbações nas concentrações da alimentação. O controlador PID, embora com uma notável capacidade de controlo mínimo, é sensível à introdução de perturbações e sofre da não-existência de adaptação automática dos parâmetros do controlador para situações diferentes das que foi sintonizado.

Globalmente, a falta de conhecimento ainda existente sobre o comportamento fundamental dos microorganismos, caracterizado por uma reconhecida variabilidade, e a dificuldade de recolher, em linha e em tempo-real, informação fiável sobre o estado do processo, relevam a importância do desenvolvimento de linhas de estudo, envolvendo de forma complementar, os métodos mecanísticos apresentados neste trabalho e métodos da área da inteligência artificial.

Palavras-chave: Monitorização. Modelização. Observadores de estado. Sensores por programação. Estimadores de parâmetros. Controlo de Processos. Fermento de Padeiro. *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Monitoring and Control of Fermenters - Application to baker's yeast

In this work a theoretical and experimental study on the analysis and operation of bioreactors is presented. It includes dynamical analysis, a study on process monitoring and parameter estimation and, furthermore, the design and implementation of model based non-linear control laws. Baker's yeast fermentation at laboratory scale, with semi-synthetic and industrial feed, has been employed as the experimental vehicle for the studies.

The theoretical framework, for the design of the state observers and of the non-linear control laws, is based on the generalised dynamical model of fermenters, proposed in 1990 by Bastin and Dochain.

An experimental rig was constructed. The rig includes, viz. - (i) a process unit, with a five litre fermenter, equipped with on-line sensors and final control elements (peristaltic pumps); (ii) a mass spectrometer for the analysis of the exhaust gases; and (iii) a digital control unit and a supervisory control computer. For the latter, a software package has been developed (*in Microsoft Visual Basic 3.0*, running in *Windows*), which includes tasks of data acquisition, on-line state and parameter estimation and fermenter control.

A theoretical model for the production of baker's yeast was developed and tested experimentally, in semi-synthetic and industrial media. In the theoretical studies with multiple substrates (molasses) a 'lumped substrate' assumption was considered for the theoretical studies, with the substrate concentration taken as the sum of all sugars in solution. This approach was experimentally tested and on the basis of those tests accepted as valid.

Key questions in the analysis and operation of bioreactors are the lack of reliable on-line measures and the uncertainty of the kinetic models. In the present work, methods for state and parameter estimation were explored, both theoretically and experimentally. With the on-line measure of only two state variables and the measure of the gaseous transfer rate for oxygen and carbon dioxide, it has been possible to observe the other variables. Three selections of direct measures were tested, viz. - oxygen/carbon dioxide, ethanol/oxygen and ethanol/carbon dioxide. Simulation results were good for all three alternative sets of measurements. The experimental validation has clearly shown that the proposed algorithms are most sensitive to the quality of the direct and indirect measurements available. The difficult estimates of the gaseous transfer rates, through mass balances incorporating the mass spec information, are indeed a source of problems.

Referring to control studies, these were limited to developing control laws for the regulatory problem of keeping the ethanol concentration at a required pre-set level. Model-based adaptive linearizing controllers (based on full and reduced models of the process) were theoretically and experimentally studied and their performances compared with those observed when employing classical PID laws (in the digital velocity form). The results point out for a superior robustness and performance of the adaptive algorithm. The PID controller, albeit with a remarkably reasonable performance, is sensitive to perturbations and has to be fine tuned or re-tuned for the different operating conditions.

Globally, the lack of knowledge about the fundamental behaviour of the microorganisms still observed, together with the lack of reliable measurements, on-line and in real-time, lead to this recognition of the importance of developing, in parallel and with complementary objectives, two directions of research on the analysis and operation of bioreactors, one focusing on mechanistic methods, as presented in this work, and the other exploring concepts on the domain of artificial intelligence.

Resumé

Monitorization et Contrôle de Fermenteurs - Application à la Levure du pain

Dans ce travail, on présente une étude théorique et expérimentale de méthodes pour l'analyse et l'opération de bioréacteurs. L'étude comporte la modélisation et l'analyse dynamiques, la monitorization et l'estimation de paramètres et le projet du contrôleur. On a utilisé le procédé de croissance de la levure du pain comme véhicule pour les études expérimentales, utilisant alimentation semi-synthétique et alimentation industrielle.

La structure théorique employée pour le projet des observateurs de l'état et du contrôle non-linéaire, a comme support le modèle dynamique pour fermenteurs, proposé par Bastin et Dochain (1990).

On a construit une plateforme expérimentale composé par: (i) un fermenteur de cinq litres, équipé avec des capteurs pour la mesure en ligne des variables du procédé et des éléments finales de contrôle (des bombes péristaltiques); (ii) un spectrophotomètre de masse, pour l'analyse des gazes du fermenteur; et (iii) une unité digitale de contrôle et un ordinateur de monitorization et contrôle. On a développé un programme en *Microsoft Visual Basic 3.0* (en environnement *Windows*) avec des fonctions d'acquisition et traitement de données, des algorithmes d'estimation et de contrôle, et l'enregistrement en fichier du résultat de l'essai afin de l'exporter pour un programme d'analyse graphique.

Le modèle théorique pour la simulation de la production du ferment a été validé avec des données expérimentales. On a vérifié en laboratoire le comportement de la levure face à l'utilisation de mélasses comme substrat, en substitution de la glucose. On a considéré dans les modèles théoriques un traitement équivalent à celui employé dans les modèles avec un seul sucre. L'approximation a été considérée valide.

Les questions clés dans l'analyse et l'opération de bioréacteurs sont: la difficulté d'obtenir mesures en ligne fiables et l'incertitude des modèles cinétiques. Dans ce travail on a exploré, en théorie et expérimentalement, des techniques d'estimation de l'état et de paramètres. Avec la mesure de deux variables d'état et des taux de transfert d'oxygène et de dioxyde de carbone, il est possible d'observer les autres variables. On a testé trois sélections possibles de mesures directes: la couple oxygène/dioxyde de carbone, éthanol/oxygène et éthanol/dioxyde de carbone. En simulation, les résultats obtenus pour l'estimation des autres variables indiquent un bon comportement des estimateurs. La vérification expérimentale a montré que les estimateurs sont sensibles à la précision des mesures, en spécial la détermination des taux de transfert de gaz.

En ce qui concerne le contrôle, l'objectif a été l'imposition d'une concentration d'éthanol, par l'application des différents algorithmes. On a testé le contrôleur PID et le contrôleur adaptatif. Avant d'être validés en laboratoire, les algorithmes ont été testés en simulation. Les résultats montrent une performance supérieure du contrôleur adaptatif. Le PID est sensible aux charges, et la non-intégration de l'auto-sintonisation provoque un comportement déficient face à des situations diverses de celles pour qu'il a été programmé.

La connaissance insuffisante du comportement fondamental des microorganismes et la difficulté d'avoir mesures en ligne fiables relèvent l'importance du développement des recherches, employant de façon complémentaire les méthodes mécanistiques, présentés dans ce travail, et des méthodes d'intelligence artificielle.

Índice

Agradecimentos	I
Sumário.....	III
Abstract	IV
Resumé.....	V
Índice	VII
Lista de Figuras	XIV
Lista de Tabelas.....	XXII
Nomenclatura.....	XXIV
1. Introdução.....	1.1
1.1 A Biotecnologia	1.2
1.2 A fermentação	1.2
1.3 A selecção do fermento de padeiro	1.6
1.4 A monitorização, a modelização e o controlo do processo	1.7
1.5 A operação assistida por computador	1.8
1.6 Objectivos e organização da tese	1.9
1.7 Bibliografia	1.11
2. O fermento de padeiro.....	2.1
2.1 Introdução	2.2
2.2 Aspectos biológicos.....	2.5
2.2.1 A célula.....	2.5
2.2.2 A reprodução celular	2.6
2.3 Aspectos metabólicos.....	2.7
2.3.1 Fermentação da glucose	2.8
2.3.2 Respiração da glucose	2.8
2.3.3 Respiração do etanol	2.8

2.4 O processo de fabrico	2.11
2.5 Conclusões.....	2.14
2.6 Bibliografia.....	2.14
3. O processo laboratorial - materiais e métodos	3.1
3.1 Introdução.....	3.2
3.2 Estirpe	3.2
3.3 Preservação da estirpe	3.2
3.4 Meios de cultura e condições experimentais	3.3
3.5 Instalação experimental e equipamento informático	3.5
3.5.1 Fermentador e unidade de controlo digital.....	3.5
3.5.2 Sensor de Etanol	3.8
3.5.3 Espectrómetro de Massa.....	3.10
3.5.4 Recolha Automática de Amostras	3.11
3.5.5 Balança/Bomba	3.11
3.5.6 Computador central e placas de aquisição de dados.....	3.13
3.6 Medidas em linha.....	3.13
3.6.1 Variáveis ambientais	3.13
3.6.2 Concentração de etanol.....	3.14
3.6.3 Análise dos gases de saída.....	3.14
3.7 Medidas em diferido	3.14
3.7.1 Concentração de biomassa.....	3.14
3.7.2 Concentração de açúcares e etanol	3.14
3.8 Programa Monitor.....	3.15
3.8.1 Aspectos gerais.....	3.15
3.8.2 Configuração	3.16
3.8.3 Acções.....	3.17
3.8.4 Ficheiros da solução informática	3.17
3.9 Procedimento experimental	3.18
3.9.1 Realização de uma fermentação	3.18
3.9.2 Calibração das medidas em diferido.....	3.19
3.10 Métodos para a determinação experimental do ($K_L a$).....	3.19
3.10.1 Método estático	3.20
3.10.2 Método dinâmico.....	3.20
3.10.3 Método dos balanços.....	3.22
3.10.4 Correção no cálculo de $K_L a$	3.22
3.10.5 Procedimento experimental	3.23
3.11 Tabela geral de experiências efectuadas.....	3.23
3.12 Bibliografia.....	3.25

4. Modelização do processo de produção de fermento de padeiro.....	4.1
4.1 Introdução	4.2
4.2 Classes de modelos macroscópicos.....	4.2
4.3 Modelo determinístico	4.4
4.3.1 Modelos cinéticos	4.8
4.4 Modelo matemático para a produção de fermento padeiro	4.11
4.4.1 Equações cinéticas.....	4.11
4.4.2 Equações de balanço ao reator	4.15
4.4.3 Equações de transferência de massa	4.17
4.4.3.1 Correlações para os coeficientes globais de transferência de massa	4.18
4.4.3.2 Balanço à fase gasosa	4.21
4.4.3.3 Quociente Respiratório, RQ	4.24
4.5 Cálculo da produtividade média e do rendimento global	4.24
4.6 Simulação do sistema em ciclo aberto	4.25
4.6.1 Quadro de simulações.....	4.25
4.6.2 Variação positiva no caudal de alimentação de substrato	4.27
4.6.3 Variação negativa no caudal de alimentação de substrato	4.28
4.6.4 Variação positiva na concentração de glucose na alimentação	4.29
4.6.5 Variação negativa na concentração de glucose na alimentação.....	4.30
4.6.6 Variação positiva no coeficiente global de transferência de massa	4.31
4.6.7 Variação negativa no coeficiente global de transferência de massa	4.32
4.6.8 Valores de produtividades e rendimentos nas corridas de simulação.....	4.32
4.7 Análise experimental.....	4.34
4.7.1 Determinação de $K_{1,a}$	4.35
4.7.2 Análise em regime de alimentação de substrato puro	4.37
4.7.2.1 Resultados por simulação versus valores experimentais	4.38
4.7.2.2 Estimativa de parâmetros e validação experimental.....	4.44
4.7.3 Análise em regime de alimentação de melaços.....	4.59
4.7.3.1 Resultados por simulação versus valores experimentais	4.59
4.7.3.2 Estimativa de parâmetros.....	4.61
4.8 Conclusões	4.67
4.9 Bibliografia	4.67
5. Observação do estado e estimativa das cinéticas	5.1
5.1 Introdução	5.2
5.2 Algoritmos para observação do estado.....	5.5
5.3 Algoritmos para estimativa das cinéticas.....	5.6
5.3.1 Estimadores Bastin e Dochain.....	5.8
5.3.2 Estimador Pomerleau e Perrier.....	5.9

5.3.3	<i>Estimadores de dinâmica de segunda ordem</i>	5.10
5.4	Aplicação ao fermento de padeiro.....	5.11
5.4.1	<i>Caso 1 -Variáveis de estado medidas: par O-C</i>	5.13
5.4.1.1	Observador de estado.....	5.13
5.4.1.2	Estimador das cinéticas.....	5.16
5.4.2	<i>Caso 2 -Variáveis de estado medidas: par E-O</i>	5.18
5.4.2.1	Observador de estado.....	5.18
5.4.2.2	Estimador das cinéticas.....	5.19
5.4.3	<i>Caso 3 -Variáveis de estado medidas: par E-C</i>	5.21
5.4.3.1	Observador de estado.....	5.21
5.4.3.2	Estimador das cinéticas.....	5.22
5.5	Resultados por simulação.....	5.24
5.5.1	<i>Apresentação do programa desenvolvido</i>	5.24
5.5.2	<i>Casos de estudo</i>	5.24
5.5.2.1	Caso 1 - Variáveis de estado medidas: par O-C.....	5.26
5.5.2.2	Caso 2 - Variáveis de estado medidas: par O-E.....	5.29
5.5.2.3	Caso 3 - Variáveis de estado medidas: par E-C.....	5.30
5.5.2.4	Apreciação global.....	5.31
5.5.3	<i>Análise da influência da precisão das medidas nas estimativas (par O-C)</i>	5.31
5.5.3.1	Introdução de ruídos.....	5.31
5.5.3.2	Introdução de desvios nos valores medidos.....	5.33
5.5.3.3	Introdução de erro nos valores iniciais das variáveis de estado.....	5.38
5.5.3.4	Apreciação global.....	5.41
5.6	Resultados experimentais.....	5.42
5.6.1	<i>Aspectos práticos de implementação - Programa Monitor</i>	5.43
5.6.2	<i>Casos de estudo</i>	5.45
5.6.2.1	Caso 1 - Variáveis de estado medidas: par O-C.....	5.46
5.6.2.2	Caso 2 - Variáveis de estado medidas: par O-E.....	5.62
5.6.2.3	Caso 3 - Variáveis de estado medidas: par E-C.....	5.65
5.6.2.4	Apreciação global.....	5.66
5.7	Conclusões.....	5.66
5.8	Bibliografia.....	5.67
6.	Controlo clássico e controlo adaptativo	6.1
6.1	Introdução.....	6.2
6.2	O controlo clássico.....	6.5
6.3	O controlo adaptativo linearizante.....	6.6
6.3.1	<i>Aspectos gerais</i>	6.6
6.3.2	<i>Controlo adaptativo linearizante de fermentadores - solução geral</i>	6.8
6.3.3	<i>Algoritmo adaptativo linearizante com base em modelos reduzidos</i>	6.10

6.3.4 Leis de adaptação	6.11
6.4 Aplicação ao fermento de padeiro	6.12
6.4.1 Controlo PID	6.13
6.4.2 Controlo adaptativo linearizante.....	6.13
6.4.2.1 Modelo global a 3 reacções.....	6.13
6.4.2.2 Modelo parcial.....	6.16
6.5 Resultados obtidos por simulação.....	6.20
6.5.1 Apresentação do programa	6.21
6.5.2 Simulações com controlo PID.....	6.21
6.5.2.1 Estudos a níveis elevados de concentração inicial de glucose e etanol.....	6.22
6.5.2.2 Estudos a níveis baixos de concentração inicial de glucose e etanol.....	6.31
6.5.2.3 Estudos complementares.....	6.37
6.5.3 Simulações com controlo EDSO.....	6.41
6.5.3.1 Estudos a níveis elevados de concentração inicial de glucose e etanol.....	6.41
6.5.3.2 Estudos a níveis baixos de concentração de glucose e etanol.....	6.49
6.5.3.3 Estudos complementares.....	6.55
6.5.4 Comparação de desempenho de controladores.....	6.57
6.6 Resultados experimentais.....	6.62
6.6.1 Aspectos práticos de implementação.....	6.63
6.6.2 Experiências com controlo PID.....	6.63
6.6.3 Experiências com controlo EDSO.....	6.65
6.6.3.1 Fermentações em regime de alimentação de melaços	6.67
6.6.4 Comparação de desempenho de controladores.....	6.69
6.7 Conclusões	6.73
6.8 Bibliografia	6.73
7. Conclusões e perspectivas futuras	7.1

Apêndices

A.1. Técnica de manipulação da estirpe.....	A.1
A.1.1 Protocolo de activação da estirpe.....	A.1
A.1.2 Preservação da estirpe	A.1
A.1.2.1 Congelação a -80°C	A.1
A.1.2.2 Conservação em frigorífico.....	A.2
A.2. Operação da unidade de fermentação.....	A.5
A.2.1 Material e reagentes.....	A.5
A.2.2 Preparação da fermentação.....	A.5
A.2.3 Arranque da fermentação.....	A.7

A.2.4 Arranque do programa <i>Monitor</i>	A.8
A.2.5 Fim da fermentação.....	A.8
A.2.5.1 <i>Desligar fermentador</i>	A.8
A.2.5.2 <i>Desligar o programa Monitor</i>	A.9
A.2.5.3 <i>Realização de análises em diferido</i>	A.9
A.3. Métodos e técnicas de análise em-linha	A.11
A.3.1 Calibração do eléctrodo de pH.....	A.11
A.3.2 Calibração da sonda de oxigénio.....	A.11
A.3.3 Calibração do sensor de etanol.....	A.12
A.3.4 Operação do espectrómetro de massa.....	A.13
A.3.4.1 <i>Princípio de funcionamento</i>	A.13
A.3.4.2 <i>Calibrações e medições</i>	A.15
A.4. Métodos e técnicas de análise em diferido	A.17
A.4.1 Curva de calibração da biomassa	A.17
A.4.1.1 <i>Material</i>	A.17
A.4.1.2 <i>Procedimento</i>	A.17
A.4.2 Curva de calibração para etanol e açúcares no HPLC.....	A.19
A.4.2.1 <i>Procedimento de ligar/operar/desligar o HPLC</i>	A.21
A.5. O programa <i>Monitor</i>	A.25
A.5.1 Detalhes na comunicação DCU/Computador	A.25
A.5.2 Detalhes na comunicação Balança/Computador.....	A.26
A.5.3 Ficheiros de configuração de equipamento e de variáveis.....	A.26
A.6. Programas para estudos em tempo diferido	A.31
A.6.1 O programa <i>Opt</i>	A.32
A.6.2 O programa <i>Sim</i>	A.32
A.6.3 O programa <i>SimExp</i>	A.34
A.6.4 Bibliografia	A.34
A.7. Estudos adicionais da estimativa de estado e de parâmetros	A.37
A.7.1 Resultados obtidos por simulação	A.37
A.7.1.1 <i>Par O-E</i>	A.38
A.7.1.2 <i>Par E-C</i>	A.40
A.7.2 Experiências adicionais	A.43
A.7.2.1 <i>Par O-C</i>	A.43
A.7.2.2 <i>Par O-E</i>	A.44
A.7.2.3 <i>Par E-C</i>	A.48

A.8. Controladores Clásicos	A.53
A.8.1 Algoritmos de control discreto.....	A.54
A.8.2 Bibliografía.....	A.56
A.9. Control adaptativo - estimador de dinámica de segunda orden.....	A.57
A.9.1 Bibliografía.....	A.60

Lista de Figuras

Figura 1.1 Fases do crescimento de um microorganismo em cultura descontínua	1.4
Figura 2.1 Reprodução de uma célula de levedura (Ratledge, 1990)	2.5
Figura 2.2 Mapa simplificado das três vias metabólicas do fermento de padeiro: a) conjunto das três vias, b) fermentação da glucose, c) oxidação da glucose e d) oxidação do etanol	2.9
Figura 2.3 Esquema da capacidade respiratória do fermento de padeiro	2.10
Figura 2.4 Diagrama de produção de fermento de padeiro	2.12
Figura 3.1 Ampola da estirpe ATCC 32167	3.1
Figura 3.2 Esquema da instalação experimental	3.6
Figura 3.3 Determinação de $K_L a$ pelo método dinâmico	3.21
Figura 4.1 Diferentes perspectivas na modelização do crescimento de biomassa	4.3
Figura 4.2 Reactor biológico perfeitamente agitado	4.4
Figura 4.3 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (F_{ref1}) e corridas com variação de +50% no caudal de alimentação às 5, 10 e 15 horas.	4.27
Figura 4.4 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (F_{ref1}) e corridas com variação de -50% no caudal de alimentação às 5, 10 e 15 horas.	4.28
Figura 4.5 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (F_{ref2}) e corridas com variação de +50% na concentração de glucose na corrente de alimentação às 5, 10 e 15 horas.	4.29
Figura 4.6 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (F_{ref2}) e corridas com variação de -50% na concentração de glucose na corrente de alimentação às 5, 10 e 15 horas.	4.30
Figura 4.7 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (F_{ref2}) e corridas com variação de +50% no coeficiente global de transferência de massa às 5, 10 e 15 horas.	4.31
Figura 4.8 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (F_{ref2}) e corridas com variação de -50% no coeficiente global de transferência de massa às 5, 10 e 15 horas.	4.32
Figura 4.9 Produtividade nas corridas com variação a) do caudal de alimentação e b) da concentração de glucose na alimentação e do coeficiente global de transferência de massa.	4.33
Figura 4.10 Rendimentos nas corridas com variação a) do caudal de alimentação e b) da concentração de glucose na alimentação e do coeficiente global de transferência de massa	4.33
Figura 4.11 Determinação da constante de tempo do sensor de oxigénio	4.35
Figura 4.12 Determinação do $K_L a$ em água	4.36

Figura 4.13 EXPB01: Perfis de biomassa (■), glucose (▲) e etanol (●) experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.05$ l/h e $S_e=10$ g/l	4.38
Figura 4.14 EXPB02: Perfis de biomassa (■), glucose (▲) e etanol (●) experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.1$ l/h e $S_e=25$ g/l	4.38
Figura 4.15 EXPC01: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.1$ l/h e $S_e=25$ g/l	4.39
Figura 4.16 EXPC02: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.12$ l/h e $S_e=50$ g/l	4.39
Figura 4.17 EXPC03: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=100$ g/l	4.40
Figura 4.18 EXPC04: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=5$ g/l	4.40
Figura 4.19 EXPC05: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=50$ g/l	4.41
Figura 4.20 EXPC06: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=25$ g/l	4.41
Figura 4.21 EXPC07: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas)- experiência em descontínuo	4.42
Figura 4.22 Análise de sensibilidade para EXPC02: Perfil de biomassa, glucose e etanol (ver Tabela 4.11).	4.46
Figura 4.23 Análise de sensibilidade para EXPC03: Perfil de biomassa, glucose e etanol (ver Tabela 4.11)	4.46
Figura 4.24 Análise de sensibilidade para EXPC04: Perfil de biomassa, glucose e etanol (ver Tabela 4.11)	4.47
Figura 4.25 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC01 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados	4.48
Figura 4.26 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados	4.48
Figura 4.27 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC04 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados	4.49
Figura 4.28 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC06 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados	4.49
Figura 4.29 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC07 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados	4.50
Figura 4.30 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC01 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)	4.51
Figura 4.31 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC02 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)	4.52
Figura 4.32 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)	4.52

- Figura 4.33 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC04 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos) _____ 4.53
- Figura 4.34 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC05 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos) _____ 4.53
- Figura 4.35 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC06 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos) _____ 4.54
- Figura 4.36 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC07 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos) _____ 4.54
- Figura 4.37 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os valores estimados de q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$ _____ 4.57
- Figura 4.38 Perfil de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os valores estimados de q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$, $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ _____ 4.57
- Figura 4.39 Perfil de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para o caso f1 - valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura e para o caso f1m - valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados _____ 4.58
- Figura 4.40 EXPE01 - perfil de biomassa, substrato e etanol para o caso de valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura (lit) e de valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para a glucose(gluc). _____ 4.60
- Figura 4.41 EXPE02 - perfil de biomassa, substrato e etanol para o caso de valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura (lit) e de valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para a glucose (gluc). _____ 4.60
- Figura 4.42 EXPE04 - perfil de biomassa, substrato e etanol para o caso 1 - valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura (lit) e para o caso 2 - valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para a glucose (gluc). _____ 4.61
- Figura 4.43 EXPE01 - perfil de biomassa, substrato e etanol com os parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ estimados _____ 4.63
- Figura 4.44 EXPE02 - perfil de biomassa, substrato e etanol com os parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ estimados _____ 4.63
- Figura 4.45 EXPE04 - perfil de biomassa, substrato e etanol com os parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ estimados _____ 4.64
- Figura 4.46 Perfil de biomassa, substrato e etanol para a EXPE01 com os parâmetros da literatura (lit), com os valores estimados (opt) e com o valor médio dos parâmetros estimados (med) _____ 4.65

Figura 4.47 Perfil de biomassa, substrato e etanol para a EXPE02 com os parâmetros da literatura (lit) , com os valores estimados (opt) e com o valor médio dos parâmetros estimados (med) _____	4.66
Figura 4.48 Perfil de biomassa, substrato e etanol para a EXPE04 com os parâmetros da literatura (lit), com os valores estimados (opt) e com o valor médio dos parâmetros estimados (med)_____	4.66
Figura 5.1 Observador de estado: medidas par O-C _____	5.13
Figura 5.2 Observador do estado: medidas par E-O _____	5.18
Figura 5.3 Observador do estado: medidas par E-C _____	5.21
Figura 5.4 Validação das estimativas das cinéticas através do quociente respiratório (SIMA04) _____	5.26
Figura 5.5 SIMA04 - modelo teórico e estimativa do estado e das cinéticas _____	5.27
Figura 5.6 Validação da estimativa das cinéticas através do quociente respiratório (SIME02) _____	5.28
Figura 5.7 SIME02- modelo teórico e estimativa do estado e das cinéticas _____	5.28
Figura 5.8 SIME03 - Perfis de estado e cinéticas para o par O-E _____	5.29
Figura 5.9 SIMA08 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C _____	5.30
Figura 5.10 SIMR01 - Perfil de alimentação _____	5.32
Figura 5.11 SIMR01 - Perfil das medidas O, C, OTR e CTR _____	5.32
Figura 5.12 SIMR01 - Observação do estado e estimativa das cinéticas _____	5.33
Figura 5.13 Variações introduzidas em F, O, C, OTR e CTR _____	5.34
Figura 5.14 Estudo da influência de desvios de $\pm 10\%$ em OTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino) _____	5.35
Figura 5.15 Estudo da influência de desvios de $\pm 30\%$ em OTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino) _____	5.36
Figura 5.16 Estudo da influência de desvios de $\pm 10\%$ em CTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino) _____	5.37
Figura 5.17 Estudo da influência de desvios de $\pm 30\%$ em CTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino) _____	5.38
Figura 5.18 Perfis das variáveis estimadas e das cinéticas - erro no valor $X(0)$ _____	5.39
Figura 5.19 Perfis das variáveis estimadas e das cinéticas - erro no valor $S(0)$ _____	5.40
Figura 5.20 Perfis das variáveis estimadas e das cinéticas - erro no valor $E(0)$ _____	5.41
Figura 5.21 EXPC03 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso). _____	5.47
Figura 5.22 EXPA04 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reactor _____	5.47
Figura 5.23 EXPA04 - Valores de O, C, OTR e CTR experimentais (traço fino) e do modelo teórico (traço grosso) _____	5.48
Figura 5.24 EXPA04 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso) e taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	5.49
Figura 5.25 EXPA04 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR experimental igual ao de simulação _____	5.50

Figura 5.26 EXPA04 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR e O experimentais iguais aos de simulação _____	5.51
Figura 5.27 EXPA04 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR e CTR experimentais iguais aos de simulação _____	5.52
Figura 5.28 EXPA08 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reator _____	5.53
Figura 5.29 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando $S(0)=0.3$ g/l _____	5.54
Figura 5.30 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando $S(0)=2.0$ g/l _____	5.55
Figura 5.31 EXPA08 - Valores de OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	5.56
Figura 5.32 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR experimental igual ao de simulação _____	5.57
Figura 5.33 EXPA08 - Quociente respiratório considerando OTR experimental igual ao de simulação _____	5.58
Figura 5.34 EXPA08 - Valores de OTR experimental com $\alpha=0.97$ (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	5.59
Figura 5.35 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso), considerando $\alpha=0.97$ no cálculo de OTR experimental _____	5.59
Figura 5.36 EXPA08 - Valores de RQ experimentais (traço fino) e o observado (traço grosso), considerando $\alpha=0.97$ no cálculo de OTR experimental _____	5.60
Figura 5.37 EXPA08 - Valores de OTR experimental $\alpha=0.975$ (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	5.61
Figura 5.38 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso), considerando $\alpha=0.975$ no cálculo de OTR experimental _____	5.61
Figura 5.39 EXPA08 - Valores de O, E, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	5.62
Figura 5.40 EXPA08 - Valores de X, S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	5.63
Figura 5.41 EXPA08 - Valores de X, S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando $\alpha=0.975$ no cálculo de OTR experimental _____	5.64
Figura 5.42 EXPA08 - Valores de X, S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	5.65
Figura 6.1 Ciclo fechado de controlo com um controlador digital _____	6.5
Figura 6.2 Controlo convencional e controlo linearizante _____	6.6
Figura 6.3 Modelo de referência para o erro de convergência _____	6.7
Figura 6.4 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de +50% às 5 (PIIS5+), 10 (PIIS10+) e 15 horas (PIIS15+): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.25

Figura 6.5 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de -50% às: 5 (PI1S5-), 10 (PI1S10-) e 15 horas (PI1S15-): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.26
Figura 6.6 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de +50% às 5 (PI1K5+), 10 (PI1K10+) e 15 horas (PI1K15+): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.27
Figura 6.7 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de -50% às 5 (PI1K5-), 10 (PI1K10-) e 15 horas (PI1K15-): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.28
Figura 6.8 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (PI1E5+), 10 (PI1E10+) e 15 horas (PI1E15+): perfis de etanol. _____	6.29
Figura 6.9 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (PI1E5+), 10 (PI1E10+) e 15 horas (PI1E15+): perfis de caudal de alimentação. _____	6.29
Figura 6.10 Alteração do valor de referência de -50% às 5 (PI1E5-), 10 (PI1E10-) e 15 horas (PI1E15-): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.30
Figura 6.11 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2. _____	6.32
Figura 6.12 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2S10+. _____	6.33
Figura 6.13 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2S10-. _____	6.34
Figura 6.14 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2K10+. _____	6.35
Figura 6.15 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2K10-. _____	6.35
Figura 6.16 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2E10+. _____	6.36
Figura 6.17 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso PI1E1r. _____	6.38
Figura 6.18 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso PID1E1r. _____	6.38
Figura 6.19 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso PID2E1r. _____	6.39
Figura 6.20 Perfis de etanol e caudal de alimentação obtidos nos estudos do controlador P/PI _____	6.40
Figura 6.21 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de +50% às 5 (E1S5+), 10 (E1S10+) e 15 horas (E1S15+): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.43
Figura 6.22 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de -50% às : 5 (E1S5-), 10 (E1S10-) e 15 horas (E1S15-): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.44
Figura 6.23 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de +50% às 5 (E1K5+), 10 (E1K10+) e 15 horas (E1K15+): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.45
Figura 6.24 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de -50% às 5 (E1K5-), 10 (E1K10-) e 15 horas (E1K15-): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.46
Figura 6.25 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (E1E5+), 10 (E1E10+) e 15 horas (E1E15+): perfis de etanol. _____	6.47
Figura 6.26 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (E1E5+), 10 (E1E10+) e 15 horas (E1E15+): perfis de caudal de alimentação. _____	6.47
Figura 6.27 Alteração do valor de referência de -50% às 5 (E1E5-), 10 (E1E10-) e 15 horas (E1E15-): perfis de etanol e caudal de alimentação. _____	6.48
Figura 6.28 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2. _____	6.50
Figura 6.29 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2S10+. _____	6.51
Figura 6.30 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2S10-. _____	6.52
Figura 6.31 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2K10+. _____	6.53
Figura 6.32 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2K10-. _____	6.53
Figura 6.33 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2E10+. _____	6.54
Figura 6.34 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso E1E1r. _____	6.55

Figura 6.35 Controlo EDSO sem antecipação - variação de +50% em S_e .	6.56
Figura 6.36 Controlo EDSO sem antecipação - variação de -50% em S_e .	6.57
Figura 6.37 Produtividade em ciclo aberto e em ciclo fechado para as corridas com introdução de cargas e referência variável.	6.58
Figura 6.38 Rendimento global em ciclo aberto e em ciclo fechado para as corridas com introdução de cargas e referência variável.	6.58
Figura 6.39 Valores de ITAE obtidos em ciclo aberto e em ciclo fechado para as corridas com introdução de cargas e referência variável.	6.59
Figura 6.40 Valores de ITAE obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de cargas e referência variável.	6.59
Figura 6.41 Valores de ITAE, produtividade e rendimento obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de ruído.	6.60
Figura 6.42 Valores de produtividade e rendimento obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com diferentes condições iniciais.	6.61
Figura 6.43 Valores de do critério ITAE obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com diferentes condições iniciais.	6.61
Figura 6.44 EXPA14 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.64
Figura 6.45 EXPA15 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.64
Figura 6.46 EXPA16 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.65
Figura 6.47 EXPA07 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.66
Figura 6.48 EXPA08 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.66
Figura 6.49 EXPA11 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.67
Figura 6.50 EXPA12 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.67
Figura 6.51 EXPE01 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.68
Figura 6.52 EXPE04 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.68
Figura 6.53 EXPE03 - perfis de etanol e caudal de alimentação.	6.69
Figura 6.54 Produtividades das experiências EXPA e EXPE	6.70
Figura 6.55 Rendimentos das experiências EXPA e EXPE	6.71
Figura 6.56 Critério ITAE para as fermentações em ciclo fechado.	6.73
Figura A.3.1 Exemplo de uma curva de calibração do sensor de etanol	A.13
Figura A.4.1 Exemplo de uma curva de calibração para a Biomassa	A.19
Figura A.4.2 Exemplo de uma curva de calibração para a Sacarose	A.20
Figura A.4.3 Exemplo de uma curva de calibração para a Frutose	A.20
Figura A.4.4 Exemplo de uma curva de calibração para a Glucose	A.21
Figura A.4.5 Exemplo de uma curva de calibração para o Etanol	A.21
Figura A.5.1 Configuração do ficheiro <i>conf1.int</i>	A.28
Figura A.7.1 SIMA08 - Perfis de estado e cinéticas para o par O-E	A.38
Figura A.7.2 SIMA10 - Perfis de estado e cinéticas para o par O-E	A.39
Figura A.7.3 SIMA10 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C	A.40
Figura A.7.4 SIME02 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C	A.41

Figura A.7.5 SIME03 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C _____	A.42
Figura A.7.6 EXPE04 - Valores de O, C, OTR e CTR experimentais _____	A.43
Figura A.7.7 EXPE04 - Perfil de alimentação _____	A.43
Figura A.7.8 EXPE04 - Valores de X, S e E experimentais (pontos) e o observado (traço fino) _____	A.44
Figura A.7.9 EXPA10 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reactor _____	A.44
Figura A.7.10 EXPA10 - Valores de O, E, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	A.45
Figura A.7.11 EXPA10 - Valores de X, S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	A.46
Figura A.7.12 EXPE03 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reactor _____	A.47
Figura A.7.13 EXPE03 - Valores de O, E, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	A.47
Figura A.7.14 EXPE03 - Valores de X, S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	A.48
Figura A.7.15 EXPA10 - Valores de X, S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	A.49
Figura A.7.16 EXPE03 - Valores de E, C, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino) _____	A.50
Figura A.7.17 EXPE02 - Valores de X, S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	A.51
Figura A.7.18 EXPE03 - Valores de X, S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso) _____	A.52

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Principais elementos presentes em 1 kg de fermento de padeiro seco	2.3
Tabela 2.2 Composição típica dos melaços	2.4
Tabela 3.1 Meio de cultura para produção de fermento padeiro	3.3
Tabela 3.2 Condições experimentais	3.4
Tabela 3.3 Características do equipamento da instalação experimental	3.7
Tabela 3.4 Ligações do cabo de comunicação DCU/computador*	3.8
Tabela 3.5 Especificações do analisador MGS-5	3.10
Tabela 3.6 Ligações a efectuar na bomba para comando remoto	3.12
Tabela 3.7 Ligações do cabo de comunicação Balança/computador	3.12
Tabela 3.8 Interfaces de aquisição de dados.	3.13
Tabela 3.9 Ficheiros do pacote Monitor	3.18
Tabela 3.10 Tabela geral de experiências	3.24
Tabela 4.1 Classes de modelos	4.3
Tabela 4.2 Influência do modo de operação de reactores biológicos no modelo dinâmico geral	4.8
Tabela 4.3 Modelos cinéticos mecanísticos para a <i>S. cerevisiae</i> .	4.11
Tabela 4.4 Equações cinéticas do fermento de padeiro	4.14
Tabela 4.5 Parâmetros cinéticos	4.15
Tabela 4.6 Valores dos coeficientes de rendimento	4.17
Tabela 4.7 Quadro resumo das simulações efectuadas	4.26
Tabela 4.8 Valores iniciais das variáveis de estado	4.26
Tabela 4.9 Variação do $K_L^{O_2}$ com a concentração de biomassa	4.37
Tabela 4.10 Valores de produtividades médias e rendimentos globais para as experiências EXPB01, EXPB02 e EXPC01 a EXPC07	4.44
Tabela 4.11 Parâmetros cinéticos utilizados para análise de sensibilidade heurística	4.45
Tabela 4.12 Valores obtidos para q_s^{max} e q_o^{max}	4.50
Tabela 4.13 Comparação da função objectivo para as situações de parâmetros otimizados e parâmetros médios.	4.55
Tabela 4.14 EXPE01-Valores da função objectivo nas corridas de estimativa de parâmetros	4.62
Tabela 4.15 EXPE02-Valores da função objectivo nas corridas de estimativa de parâmetros	4.62
Tabela 4.16 EXPE04-Valores da função objectivo nas corridas de estimativa de parâmetros	4.62

Tabela 4.17 Parâmetros estimados nas experiências EXPE01, EXPE02 e EXPE04	4.64
Tabela 5.1 Partições induzidas de K e correspondente matriz A	5.14
Tabela 5.2 Partições induzidas de K e correspondente matriz A	5.18
Tabela 5.3 Partições induzidas de K e correspondente matriz A	5.21
Tabela 5.4 Estudos efectuados em simulação	5.25
Tabela 5.5 Estudos efectuados no tratamento de resultados experimentais	5.46
Tabela 6.1 Equações de estado para os modelos parciais	6.16
Tabela 6.2 Quadro resumo do modelo de entrada/saída	6.19
Tabela 6.3 Condições iniciais de base das corridas de simulação	6.22
Tabela 6.4 ITAE, produtividade e rendimento para os quatro níveis de E_{ref} .	6.23
Tabela 6.5 Quadro resumo das simulações efectuadas	6.24
Tabela 6.6 Análise das simulações com alteração da referência e introdução de perturbações	6.31
Tabela 6.7 Novas condições iniciais das corridas de simulação	6.31
Tabela 6.8 ITAE, produtividades e rendimentos para o estudo de novas condições iniciais.	6.36
Tabela 6.9 Parâmetros do controlador PID para análise de introdução de ruído	6.37
Tabela 6.10 Condições iniciais para estudos do controlador P/PI	6.39
Tabela 6.11 Parâmetros do controlador P e PI.	6.39
Tabela 6.12 Quadro resumo das simulações efectuadas	6.42
Tabela 6.13 Análise comparativa nas simulações com alteração da referência e introdução de perturbações - controlo EDSO	6.49
Tabela 6.14 ITAE, produtividades e rendimentos para o estudo de novas condições iniciais - EDSO.	6.55
Tabela 6.15 Caracterização de experiências	6.70
Tabela A.5.1 Configuração do ficheiro de equipamento <i>confl.hdw</i>	A.29
Tabela A.5.2 Configuração do ficheiro de variáveis - <i>Confl.var</i>	A.30
Tabela A.6.1 Programas de simulação	A.31

Nomenclatura

Letras Latinas Maiúsculas

A	matriz função de coeficientes de rendimento	
C	concentração de dióxido de carbono na fase líquida.....	(g/l)
C	matriz (diagonal) de calibração	
C	acção de controlo	
C*	concentração de saturação de dióxido de carbono dissolvido.....	(g/l)
C _{est}	acção de controlo em estado estacionário	
C _{G,CO₂}	concentração molar de dióxido de carbono na fase gasosa	(mol/l)
C _{L,i} *	concentração mássica de saturação na fase líquida para o componente i	(g/l)
C _{L,i}	concentração mássica na fase líquida para o componente i	(g/l)
C _{Xcultura}	concentração de biomassa na cultura.....	(g/l)
C _{XSolPadrão}	concentração de biomassa na solução padrão.....	(g/l)
D	controlador digital	
D	taxa de diluição.....	(1/h)
D _L ⁱ	difusividade de fase líquida para o componente i.....	(m/h)
DO	densidade óptica	
DO%	oxigénio dissolvido	(%)
D _r	diâmetro do reactor	(m)
D _s	diâmetro do agitador	(m)
E	concentração de etanol.....	(g/l)
Err	erro (diferença entre a referência e a medida)	
ErrMedio	erro médio	
F	vector de taxas de transferência mássica para a fase líquida (por unidade de volume de líquido no reactor).....	(g/l/h)
F _e	caudal volumétrico de entrada no reactor na forma líquida.....	(l/h)
F _i	taxa de transferência mássica para a fase líquida (por unidade de volume de líquido no reactor), para o componente i	(g/l/h)
Fobj	função objectivo	
F _s	caudal volumétrico de saída do reactor na forma líquida	(l/h)
G	caudal molar de gás	(mol/h)
G _{ho}	retentor de sinal de ordem zero	
H	matriz diagonal função das concentrações das variáveis de estado.....	(g/l)
H _{CO₂}	constante de Henry para o dióxido de carbono	
K	matriz de coeficientes de rendimento ou coeficientes estequiométricos	
K _C	ganho proporcional do controlador	
K _i	parâmetro de inibição	
K _j	parâmetro de saturação para o componente j	
K _L ⁱ	coeficiente global de transferência de massa para o componente i	(1/h)
K _m	parâmetro de afinidade dos microorganismos ao substrato	
L	matriz n×1 de permutação de linhas	
M, M _i	massa molar; massa molar do componente i.....	(g)
Med	média	
N	velocidade de agitação	(rph)
O	concentração de oxigénio dissolvido.....	(g/l)

O^*	concentração de saturação de oxigénio dissolvido	(g/l)
Prod	produtividade	(g/l/h)
P	vector dos sinais desacoplados	
P	pressão total	(atm)
Pot	potência.....	(w)
P_{no}	número de potência	
Q	vector de taxas de transferência mássica da fase líquida para a fase gasosa (por unidade de volume de líquido no reactor)	(g/l/h)
Q	caudal de arejamento	(m ³ /h)
Q_e	caudal volumétrico de entrada de gás.....	(l/h)
Q_s	caudal volumétrico de saída de gás	(l/h)
Q_i	taxa de transferência mássica da fase líquida para a fase gasosa (por unidade de volume de líquido no reactor), para o componente i	(g/l/h)
Q_o	velocidade de consumo de oxigénio	(l/h)
R	constante dos gases perfeitos	
R	coeficiente de correlação	
R	matriz de fragmentação	
R^{-1}	matriz de desconvolução	
Rend	rendimento global	
R_n	ruído normalmente distribuído	
R_u	variável aleatória com distribuição pseudo-uniforme	
S_i	intensidade (ou altura) total do pico ou sinal	
S_{ij}	contribuição do componente j para a intensidade do pico da massa i	
S	vector dos sinais gerados pelo espectrómetro	
S	concentração de glucose	(g/l)
S_e	concentração de glucose no meio de alimentação.....	(g/l)
$S_{e,i}$	concentração do componente i no meio de alimentação.....	(g/l)
T	temperatura absoluta	(K)
T	período de amostragem.....	(h)
U	vector que representa o balanço entre entradas e/ou saídas de substratos e produtos gasosos	(g/l/h)
V	volume de líquido no reactor	(l)
V	sinal eléctrico em tensão.....	(V)
V_G	volume de fase gasosa.....	(l)
V_{gas}	velocidade linear do gás.....	(m/s)
X	concentração em biomassa.....	(g/l)
$Y_{x/s}^o$	coeficiente de rendimento biomassa/glucose na fase oxidativa em glucose	
$Y_{x/s}^r$	coeficiente de rendimento biomassa/glucose na fase redutiva em glucose	
$Y_{x/e}^r$	coeficiente de rendimento biomassa/etanol na fase redutiva em glucose	
$Y_{x/e}^{oe}$	coeficiente de rendimento biomassa/etanol na fase oxidativa em etanol	
$Y_{x/o}^o$	coeficiente de rendimento biomassa/oxigénio na fase oxidativa em glucose	
$Y_{x/o}^{oe}$	coeficiente de rendimento biomassa/oxigénio na fase oxidativa em etanol	
$Y_{x/c}^o$	coeficiente de rendimento biomassa/dióxido de carbono na fase oxidativa em glucose	
$Y_{x/c}^r$	coeficiente de rendimento biomassa/dióxido de carbono na fase redutiva em glucose	
$Y_{x/c}^{oe}$	coeficiente de rendimento biomassa/dióxido de carbono na fase oxidativa em etanol	
Z	vector transformação de estado resultante de uma partição no modelo de estado	(g/l)

Letras Minúsculas

a	razão de coeficientes estequiométricos oxigénio/glucose
b	vector auxiliar do cálculo do vector F
f	vector auxiliar do cálculo do vector F
h	elemento da matriz H
k	parâmetro responsável pela extensão do intervalo de número aleatórios gerados
k_i	coeficientes de rendimento
k_{ij}	coeficientes de rendimentos ou coeficientes estequiométricos do componente j na reacção i
n	número de variáveis de estado
n _{exp}	número de pontos experimentais
m	número de reacções
p	característica da matriz K; vector com posições de pólos no plano z (0 a 1)
p_i	pressão parcial do componente i..... (atm)
q_s	taxa específica (total) de consumo de glucose..... (1/h)
q_s^{\max}	taxa específica máxima de consumo de glucose..... (1/h)
q_s^o	taxa específica de consumo oxidativo de glucose..... (1/h)
q_s^r	taxa específica de consumo respirativo de glucose..... (1/h)
q_e^o	taxa específica de consumo oxidativo de etanol..... (1/h)
q_0^{\max}	taxa específica máxima de consumo de oxigénio..... (1/h)
t	tempo(h)
r	característica da matriz K
r_i	velocidade de reacção i (g/l/h)
y	variável controlada
Y	fracção molar
$Y_{e,i}$	fracção molar (ou volúmica) do componente i na corrente gasosa de entrada
$Y_{s,i}$	fracção molar (ou volúmica) do componente i na corrente gasosa de saída

Letras Gregas Maiúsculas

Γ	matriz de ganhos dos estimadores
Ω	matriz de ganhos dos estimadores

Letras Gregas Minúsculas

α	parâmetro correctivo no cálculo de OTR por balanço à fase gasosa
δ	grau relativo (ordem da equação diferencial)
ϕ	vector regressor
γ	ganho
φ	vector de velocidades de reacção
λ_1	parâmetro da lei de controlo
μ	taxa específica de crescimento..... (1/h)
μ_e^{\max}	taxa específica máxima de crescimento oxidativo em etanol..... (1/h)
μ_e^o	taxa específica de crescimento respirativo em etanol (1/h)
μ_{\max}	taxa específica máxima de crescimento (1/h)
μ_s^r	taxa específica de crescimento fermentativo em glucose..... (1/h)
μ_s^o	taxa específica de crescimento respirativo em glucose (1/h)

θ	vector de parâmetros do modelo	
τ	período natural de oscilação.....	(h)
τ_D	constante de tempo derivativo.....	(h)
τ_i	constante de tempo integral	(h)
τ_s	tempo de resposta do eléctrodo de oxigénio.....	(h)
ξ	vector de estado constituído pelas concentrações dos componentes.....	(g/l)
$\xi_{Ge,i}$	concentração mássica do componente i na corrente gasosa de entrada no reactor	(g/l)
$\xi_{Gs,i}$	concentração mássica do componente i na corrente gasosa à saída do reactor.....	(g/l)
ξ_i	variável de estado (concentração do componente i)	(g/l)
$\xi_{L,i}$	concentração mássica do componente i no reactor (fase líquida)	(g/l)
$\xi_{L,i}^*$	concentração mássica de saturação do componente i no reactor (fase líquida)	(g/l)
ρ	densidade do meio	(kg/m ³)
ρ_j	taxa específica de reacção j	(1/h)
ω	ganho	
ψ	matriz de transformação de estado	
ζ	coeficiente de amortecimento	

Índices

1, 2	designa partição
ac	ácido
alim	alimentação
b	base
e	entrada
exp	experimental
est	estimado
f	condições finais da fermentação
inoc	inóculo
lit	literatura
m	medida
max	máximo
med	médio
meio	meio do fermentador
min	mínimo
mod	modelo
o	início da fermentação
opt	otimizado
R	respirativo
RF	respiro-fermentativo
r	partição de dinâmica rápida
ref	valor de referência para a variável controlada
l	partição de dinâmica lenta
s	saída
sol	solução
pipetar	quantidade a pipetar

Siglas

AD/DA	Conversor Analógico/Digital e Digital/Analógico
ATC	Ácidos Tri-Carboxílicos
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine-Tri-Phosphate
CER	Carbon Dioxide Evolution Rate
CR	Carriage Return

CTR	Carbon Transfer Rate
CTS	Clear To Send
DCU	Digital Control Unit
DDE	Dynamic Data Exchange
DTR	Data Terminal Ready
EBO	Estimador Baseado num Observador
EDSO	Estimador de Dinâmica de Segunda Ordem
EFB	European Federation of Biotechnology
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
GND	Ground
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
ITAE	Integral of Time-weighted Absolute Error (Integral do erro absoluto pesado pelo tempo)
LF	Line Feed
LVT	Linear Variante no Tempo
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen (forma reduzida de NAD)
OTR	Oxygen Transfer Rate
OUR	Oxygen Uptake Rate
PID	Proporcional, Integral e Derivativo
PTN	Pressão e Temperatura Normais (1 atm e 0 °C)
PTV	Pressão, Temperatura e Volume
r.p.h.	rotações por hora
r.p.m.	rotações por minuto
RQ	Respiratory Quotient (Quociente Respiratório)
R	estado Respiratório do processo
RF	estado Respiro-fermentativo do processo
RXD	Receive Data
slpm	standard liter per minute
TXD	Transmit Data
u.m.a.	unidade de massa atómica
v.v.m	volume de ar por volume de reactor por minuto

1. Introdução

Sumário

Neste capítulo é apresentado o contexto simultaneamente com o objecto e veículo de estudo deste trabalho.

Faz-se uma breve referência ao conceito de Biotecnologia e de Fermentação, justificando-se a selecção da levedura de fermento de padeiro como objecto de estudo.

São focados os aspectos associados à monitorização, modelização e controlo de processos biotecnológicos, bem como aspectos referentes à operação assistida por computador.

Finalmente, apresentam-se os objectivos e a organização da tese.

- 1.1 A Biotecnologia
 - 1.2 A fermentação
 - 1.3 A selecção do fermento de padeiro
 - 1.4 A monitorização, a modelização e o controlo do processo
 - 1.5 A operação assistida por computador
 - 1.6 Objectivos e organização da tese
 - 1.7 Bibliografia
-

1.1 A Biotecnologia

A EFB ('European Federation of Biotechnology') definiu biotecnologia como sendo o uso integrado da bioquímica, microbiologia e ciências de engenharia com vista a uma aplicação industrial de biosistemas (células de origem animal, vegetal ou microbiana, suas partes e análogos moleculares) para a obtenção de bens e serviços. Dito de outro modo, a biotecnologia é a aplicação de agentes biológicos no fornecimento de bens e serviços (Scragg, 1988).

O uso do termo biotecnologia poderia indicar um só assunto mas a essência da biotecnologia é a sua natureza multidisciplinar. É necessário juntar engenheiros químicos, microbiólogos, bioquímicos e químicos e engenheiros de sistemas para se conseguir obter sucesso na aplicação prática da biotecnologia. Este sucesso significa, além do sucesso científico, sucesso também a nível económico, o que introduz mais factores a ter em conta, principalmente quando se trata de processos em grande escala onde é necessário um investimento considerável em matérias-primas, mão-de-obra e energia. Considerações deste tipo podem muitas vezes levar ao uso de processos contínuos em vez de descontínuos, ou vice-versa.

Um processo biotecnológico pode então definir-se como aquele em que há uma utilização dos microorganismos (fermentos, bactérias, etc.) e/ou enzimas, podendo ter como objectivo a síntese de compostos químicos intracelulares (proteínas) ou extracelulares (antibióticos), a produção de biomassa (caso da produção de fermento de padeiro), de alimentos (bebidas), de energia (biogás, etanol) e ainda a despoluição biológica de efluentes.

1.2 A fermentação

O termo 'fermentação' tem um significado diferente para bioquímicos e microbiólogos industriais. O seu significado bioquímico tem a ver com a produção de energia através da degradação de compostos orgânicos, enquanto que industrialmente é usado para descrever qualquer processo de produção que envolva crescimento microbiano, o que inclui a generalidade dos processos biotecnológicos.

Fermentações comercialmente relevantes

Há quatro grupos principais de fermentações comercialmente relevantes (Stanbury e Whitaker, 1984) :

- a) As que produzem biomassa como produto final (produção de levedura de padeiro e de células microbianas para serem usadas como alimento humano ou animal - 'single cell protein');
- b) As que produzem enzimas microbianas (proteases, pectinases, amilases);
- c) As que produzem metabolitos microbianos (etanol);
- d) As que modificam um composto adicionado à fermentação - processos de transformação (produção de vinagre e antibióticos).

Neste último grupo as células microbianas são usadas para converter um composto num outro estruturalmente relacionado e economicamente mais valioso. As reacções incluem desidrogenações, oxidações, hidroxilações, descarboxilações, desidratações e condensações, isomerizações, nitrificações e desnitrificações. Estes processos microbianos têm vantagens em relação aos processos químicos tradicionais: são específicos, operam a baixas temperaturas e não implicam o uso de catalisadores metálicos fortemente poluentes. Embora a produção de vinagre seja o processo mais conhecido (conversão de etanol em ácido acético), a maioria destes processos envolve a produção de compostos de alto valor acrescentado (antibióticos). Em muitos destes processos são utilizadas células ou enzimas imobilizadas devido às grandes quantidades de biomassa necessárias para catalisar uma só reacção. Estas enzimas ou células imobilizadas podem ser vistas como catalisadores reutilizáveis.

Os grupos (a), (b) e (c) englobam-se numa categoria mais geral de reacções de crescimento microbiano e estão dependentes da fase de crescimento em que o microorganismo se encontra.

Modos de operação

Os processos biotecnológicos podem operar de três modos distintos: operação descontínua, contínua e semi-contínua.

No decorrer da fermentação descontínua não é adicionado nenhum substrato, nem removido nenhum produto. Alguns processos farmacêuticos são efectuados deste modo.

Durante a fermentação contínua o substrato é adicionado e o produto retirado, mantendo constante o volume do reactor. Um exemplo de aplicação é o tratamento biológico de águas residuais.

Na operação semi-contínua o volume do reactor varia ao longo do tempo, por manipulação do caudal de alimentação de substrato.

Cultura descontínua típica

Num processo em cultura descontínua típico (Bailey e Ollis, 1986) o número de células vivas varia com o tempo de acordo com a figura 1.1. Depois de uma fase de latência (1), que ocorre após a inoculação da cultura e pode ser considerada como um período de adaptação, onde não há aumento visível do número de células, ocorre uma ligeira fase de aceleração (2), seguida duma fase de crescimento exponencial (3), em que as células crescem a uma taxa de crescimento máxima e constante. Naturalmente que as células não se podem multiplicar indefinidamente em cultura fechada e, após uma curta fase de desaceleração (4), aparece uma fase estacionária (5). Nesta altura a população atinge o seu tamanho máximo. Eventualmente poderá ocorrer um declínio do número de células viáveis numa última fase - fase de morte celular (6).

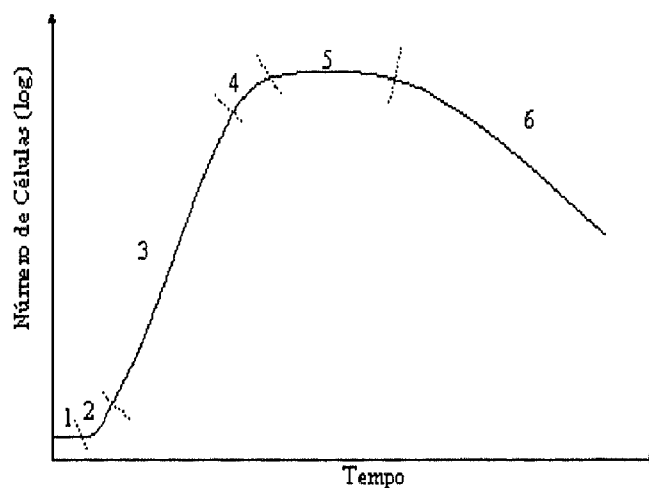


Figura 1.1 Fases do crescimento de um microorganismo em cultura descontínua

Cada fase tem grande importância nos processos microbianos. Por exemplo, se se pretender obter um máximo de densidade celular no fim do processo, é importante minimizar a duração da fase de latência e maximizar a taxa de crescimento e a duração da fase exponencial.

Durante a fase exponencial produzem-se metabolitos essenciais ao crescimento das células como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polissacáridos, entre outros. Estes produtos são designados por metabolitos primários e muitos deles têm uma importância económica considerável. A nível industrial são produzidos por fermentação etanol, ácido cítrico, acetona e butanol, ácido glutâmico, lisina, vitaminas, geralmente com grandes rendimentos.

Durante a fase estacionária ou em fases de crescimento muito lento algumas culturas microbianas sintetizam compostos que aparentemente não têm nenhuma função no metabolismo celular - metabolitos secundários. Muitos destes metabolitos têm actividade anti-microbiana, outros são inibidores de enzimas específicos, alguns são promotores de crescimento e muitos têm propriedades farmacológicas (antibióticos, vitaminas). Assim, os metabolitos secundários são a base de muitos processos fermentativos, apresentando normalmente um alto valor comercial devido a um baixo rendimento. As enzimas são normalmente incluídas neste grupo.

Operação semi-contínua

O conceito de operação semi-contínua é utilizado desde o início do século 20 (Whitaker, 1980). Na produção de biomassa a partir de malte *wort*, admitiu-se que a concentração em malte deveria ser mantida baixa, de forma a evitar a produção de etanol.

Neste modo de operação conseguem-se, no final da fermentação, rendimentos do produto desejado superiores aos obtidos nas fermentações contínuas e nas descontínuas. A operação semi-contínua é superior aos dois outros modos, principalmente em fermentações com produção paralela de produtos não desejados. Uma das vantagens é a flexibilidade no controlo da concentração de substratos limitantes, evitando a ocorrência de inibição ou repressão catabólica. Por tudo isto, a operação semi-contínua foi aceite para a produção de biomassa. Esta técnica tem, adicionalmente, vindo a ser empregue na produção industrial de antibióticos, amino-ácidos, enzimas, vitaminas, biomassa, polissacáridos, culturas de DNA recombinante e vários compostos orgânicos de importância comercial (Lee, 1990).

O objectivo predominante de produção é alcançar rendimentos elevados, sendo a economia de energia um objectivo secundário. O rendimento de um processo estará sempre limitado por considerações termodinâmicas e estequiométricas para as vias bioquímicas que

constituem o metabolismo celular. Um objectivo global será expresso em termos de concentração, pureza e rendimento do processo.

Operação contínua

Neste modo de operação (Bailey e Ollis, 1986; Brown, 1990) existe uma corrente de alimentação e uma corrente de remoção de produto.

Existem várias técnicas de controlo de culturas contínuas, sendo a mais divulgada e utilizada a técnica de cultura em *chemostat*. Nesta cultura o meio de alimentação contém em excesso todos os nutrientes necessários ao crescimento excepto um. A taxa de alimentação do nutriente em falha determina a taxa de crescimento do organismo.

Entre os problemas associados a este tipo de cultura (que pode demorar vários dias) destaca-se o problema da contaminação.

1.3 A selecção do fermento de padeiro

O fermento de padeiro, utilizado nas indústrias de panificação para fazer levedar a massa, é composto, essencialmente, por células vivas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A sua utilização nas indústrias de panificação e da cerveja torna-a um microorganismo de importância industrial.

O interesse científico está associado e é complementar aos interesses prático e económico. Como eucariótido, a *Saccharomyces cerevisiae*, é genética e estruturalmente mais complexa que as bactérias. Estas serão as razões da sua popularidade como microorganismo experimental em estudos básicos de estrutura celular, funções e metabolismo e, em consequência, existe hoje informação disponível significativa sobre aspectos de morfologia, fisiologia, bioquímica e genética da *Saccharomyces cerevisiae*.

A Federação Europeia de Biotecnologia, através dos grupos *Working Party on Bioreactor Performance* e *Working Party on Measurement and Control*, tem incentivado (ou incentivou em anos recentes) a utilização desta levedura como caso de estudo para comparação e validação de resultados entre os vários laboratórios de investigação na Europa. O Grupo de Investigação do Porto, em que o presente trabalho está enquadrado, tem vindo a participar nesse esforço de colaboração europeia, tendo-se empenhado

particularmente, em colaboração com a Universidade do Minho, em analisar a nível do laboratório o comportamento experimental, utilizando fontes de alimentação industriais.

1.4 A monitorização, a modelização e o controlo do processo

As estratégias e tipos de controlo empregues na indústria química podem, também, ser aplicados à indústria alimentar. No entanto, existem dois problemas no controlo de processos de fermentação (Andersen, 1990). O primeiro é a falta de sensores em linha adequados e fiáveis para a medição das variáveis de controlo, nomeadamente, biomassa e produtos. Esta área tem sido objectivo de estudo e desenvolvimento nos últimos anos e, como consequência, novos sensores têm aparecido no mercado (Pons, 1992; Hatch e Veilleux, 1995; Sipior *et al.*, 1996; Schügerl *et al.*, 1996). O outro problema consiste na falta de conhecimento sobre os processos em análise. Alguns microorganismos, como a *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Escherichia coli*, têm sido estudados nas últimas décadas, restando, no entanto, algumas questões por resolver. Os processos de fermentação lidam com organismos vivos, nos quais ocorrem um vasto número de reacções bioquímicas. Os microorganismos possuem um sistema regulatório complexo e o sistema de controlo externo manipula apenas o ambiente externo, sempre com o objectivo de afectar os mecanismos intracelulares.

A preocupação actual de investigação na área da modelização em processos biotecnológicos (Bastin e Morris, 1992) centra-se nos problemas de identificação de sistemas e planeamento de experiências, no recurso a técnicas de redução de modelos e na aplicação de métodos alternativos, como sejam estudos explorando a utilização de redes neuronais (Teissier *et al.*, 1996) e de modelos híbridos (Schubert *et al.*, 1994; Saxén e Saxén, 1996; Feyo de Azevedo *et al.*, 1997).

Na área de controlo tem vindo a desenvolver-se esforços significativos na procura de métodos de estimativa de estados (Bastin e Dochain, 1990; Beluhan *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 1996; Petkov e Davis, 1996) e na concomitante utilização de estratégias de controlo com base em modelos, na utilização de sistemas periciais (Halme e Karim, 1991; Aynsley *et al.*, 1993; Konstantinov *et al.*, 1993), na aplicação de lógica difusa e de redes neuronais (Karim e Rivera, 1992; Montague e Morris, 1994; Georgieva e Patarinska, 1996).

Recentemente tem-se assistido à publicação de livros na área da monitorização e controlo de processos biotecnológicos, livros esses com uma orientação didáctica: Omstead (1990), Schügerl (1991), Pons (1992), Volesky e Votruba (1992).

1.5 A operação assistida por computador

A operação assistida por computador de processos industriais representa, hoje em dia, uma metodologia de trabalho vital para a competitividade industrial.

Desde as funções de aquisição de dados, passando pela interpretação dos mesmos, em-linha e em tempo real, até ao controlo do processo propriamente dito, incluindo a utilização de sistemas periciais, o computador assume uma duplicidade de funções na operação de processos, não só como ferramenta de estudos, mas também na sua qualidade de meio fundamental de execução das estratégias desejadas (Oliveira *et al.*, 1994; Feye de Azevedo *et al.*, 1996a; Feye de Azevedo *et al.*, 1996b).

Uma instalação experimental, laboratorial e piloto e uma instalação industrial, deverá ter no seu projecto os meios instrumentais, computacionais e de programas que permitam de um modo flexível, desenvolver e testar metodologias e soluções para os problemas acima mencionados que ainda hoje limitam os rendimentos de unidades industriais.

Existem na literatura diversos artigos referentes à automatização dos processos biotecnológicos, focando os requisitos e metodologias adoptadas, bem como propostas de soluções para implementação prática (Omstead, 1990; Williams, 1990; Lübbert, 1991, Somleitner *et al.*, 1991; Locher *et al.*, 1991; Royce, 1993).

É certo que existem no mercado soluções informáticas que, na generalidade, satisfazem requisitos básicos de aquisição de dados e de controlo. Contudo, num projecto de médio prazo que vise o desenvolvimento de estratégias de controlo de processos, a aquisição de programas comerciais revela-se, frequentemente, dispendiosa e/ou limitante:

- ou porque, se trata de programas fechados, logo, não são passíveis de adaptações e expansão;
- ou, por se basearem em sistemas operativos menos frequentes (caso do MicroMFCs, correndo em *Concurrent-DOS* (Kappel *et al.*; 1991, Pons *et al.*, 1996);

- ou por exigirem plataformas dispendiosas e não disponíveis com facilidade (como por exemplo, o programa CIF que corre em VAX/VMS (Dors *et al.*, 1991);
- ou ainda, e como último exemplo, por dificuldades habituais de portabilidade.

Assim, entende-se que seja frequente encontrar nos vários grupos de investigação os seus próprios desenvolvimentos informáticos de maior ou menor complexidade (Endo e Nagamune, 1987; Andersen, 1990; Teixeira *et al.*, 1992; Siimes *et al.*, 1995; Miskiewicz e Wilczynski, 1996).

Foi esta a razão porque, também neste trabalho se optou pelo desenvolvimento de programas próprios não só para estudos de simulação do processo de produção de fermento de padeiro, como também para a monitorização e controlo da instalação experimental.

1.6 Objectivos e organização da tese

A metodologia de trabalho seguida pela equipa de investigação em que este trabalho se enquadrou engloba etapas de modelização de processos, estimativa de parâmetros do modelo, controlo e consequente validação experimental.

O presente trabalho vem no seguimento de um doutoramento efectuado por um elemento do grupo em 1995 (Eugénio Ferreira), sob o título 'Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos'.

Neste contexto, e no essencial, este trabalho estuda métodos de modelização determinística, de estimativa de parâmetros (cinéticas), de observação de estado e de controlo clássico e adaptativo com aplicação ao caso particular da produção semi-contínua de fermento de padeiro, utilizando meios puros e meios industriais, não só mas principalmente a nível laboratorial.

Em relação com os estudos teóricos, desenvolveram-se ferramentas informáticas para estudos em tempo-diferido de algoritmos de operação em ciclo aberto, bem como dos mencionados algoritmos para observação de estado e controlo.

Em relação com os estudos experimentais, foram objectivos o projecto e montagem de uma instalação à escala laboratorial de produção de fermento de padeiro, o desenvolvimento de técnicas de análise laboratorial e ainda o desenvolvimento de um programa de monitorização e controlo do processo.

O trabalho está dividido em sete capítulos e apêndices.

No Capítulo 2, que se segue, focam-se aspectos biológicos, morfológicos e processuais do fermento de padeiro.

O Capítulo 3 apresenta a instalação experimental para a produção laboratorial de fermento de padeiro em regime semi-contínuo, com a descrição detalhada do equipamento utilizado, assim como o procedimento de trabalho adoptado. São focados, também, os métodos para determinação experimental do coeficiente global de transferência de massa para o oxigénio (determinado neste trabalho).

O Capítulo 4 diz respeito ao estudo em ciclo aberto do fermento de padeiro, em simulação e experimentalmente. Numa primeira fase, e numa análise genérica, discutem-se algumas abordagens à modelização do processo.

Limitando-se o estudo à produção de fermento de padeiro, apresenta-se o modelo matemático determinístico (equações de balanço ao rector, equações cinéticas e de transferência de massa) utilizado em simulação. Com referência a este, descrevem-se os programas de simulação desenvolvidos para estudos em ciclo aberto, em ciclo fechado, testando diferentes algoritmos de controlo, incluindo técnicas de observação de estado e estimativa das cinéticas, e programas para a estimativa em diferido de parâmetros do modelo.

Procedeu-se a um estudo por simulação - tanto quanto possível exaustivo - da produção semi-contínua de fermento de padeiro. Este estudo foi efectuado em ciclo aberto, deixando-se os testes de controlo para capítulo posterior. Assim, alteraram-se perfis e concentrações de glucose de alimentação e coeficientes de transferência de massa. Pretendeu-se com esta análise adquirir o conhecimento necessário para se efectuarem os estudos subsequentes.

Finalmente, foram apresentados e tratados resultados experimentais para corridas quer em regime de alimentação de glucose quer em regime de alimentação com melaços. Este ponto foi efectuado em quatro fases: comparação dos valores obtidos por simulação e os experimentais; realização de uma análise de sensibilidade, de modo a avaliar quais os parâmetros com maior influência no modelo; estimativa desses parâmetros através de técnicas de regressão não-linear; validação experimental dos parâmetros estimados.

No Capítulo 5 apresentam-se as técnicas de observação do estado e estimativa das cinéticas implementadas neste trabalho e que têm por base os algoritmos de Bastin e

Dochain (1990). As técnicas foram estudadas extensivamente em simulação, testando-se as alternativas de pares de medidas disponíveis. Testou-se, também, a robustez dos algoritmos face a ruídos e erros nas medidas. Os algoritmos de estimação foram validados experimentalmente em corridas semi-contínuas, a caudal constante ou programado e em regime de alimentação de um só substrato e em regime de alimentação de melaços.

No Capítulo 6 apresentam-se os algoritmos de controlo clássico (PID) e controlo adaptativo analisados e implementados neste trabalho. Efectuaram-se diversas corridas em simulação, as quais foram posteriormente validadas experimentalmente. Também neste caso se trabalhou com glucose pura e com melaços.

Finalmente, no Capítulo 7 resumem-se as conclusões gerais do trabalho efectuado bem como são referidas perspectivas futuras de desenvolvimento.

A componente experimental significativa do trabalho pode ser apreciada pelo conjunto de apêndices apresentados, em que se descrevem os métodos, protocolos e procedimentos desenvolvidos, tanto na sua componente de bioengenharia como na sua componente informática de sistemas e controlo.

1.7 Bibliografia

- Aynsley, M., Hofland, A., Morris, A.J., Montague, G.A., Di Massimo, C. Artificial Intelligence and the Supervision of Bioprocesses (Real-Time Knowledge-Based Systems and Neural Networks). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 48: Bioprocess Design and Control*, (A. Fiechter, Ed.) Springer-Verlag, Berlin, p. 1-28, 1993.
- Andersen, M.Y. *Multivariable Identification for Control of a Continuous Yeast Fermentation*, Dissertação de Doutoramento, Technical University of Denmark, Lyngby, 1990.
- Bailey, J., Ollis, D., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, New York, 1986.
- Bastin, G., Dochain, D. *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.
- Bastin G., Morris, A.J. Proposal for a Research Programme in Bioprocess Science, Part 2: Modelling and Control. *Biotech Forum Europe*, 9:11/12, 763-764, 1992.
- Beluhan, D., Gosak, D., Pavlovic, N., Vampola, M. Biomass Estimation and Optimal Control of the Baker's Yeast Fermentation Process. *Computers Chem. Engng.*, 19, S387-S392, 1995.
- Brown, A. Fed-batch and Continuous Culture. *Fermentation* (B. McNeil e L. M. Harvey, Eds.) IRL Press, Oxford, 113-130, 1990.
- Dors, M., Behrendt, J., Kreibaum, U., Havlik, I., Wingelsdorf, R., Lübbert, A. CIF. a User Friendly Process Management System of a New Software Generation. *Biotech. Forum Europe.*, 8:10, 612-620, 1991.

- Endo, I., Nagamune, T. A Database System for Fermentation Processes. *Bioprocess Engineering*, 2, 111-114, 1987.
- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Feyo de Azevedo, F., Pimenta, P., Oliveira, F. Computer-based Studies on Bioprocess Engineering I - Tools for Process Analysis. *Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering*, (A. Moreira, K. Wallace, Eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 3-26, 1996a.
- Feyo de Azevedo, F., Pimenta, P., Oliveira, F., Ferreira, E., Computer-based Studies on Bioprocess Engineering II - Tools for Process Operation. *Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering*, (A. Moreira, K. Wallace, Eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 27-49, 1996b.
- Feyo de Azevedo, S., Dahm, B., Oliveira, F., Hybrid Modelling of Biochemical Processes: A Comparison with the Conventional Approach, *Computers and Chem. Engng.*, 21 suppl, S751-S756, 1997.
- Georgieva, O., Patarinska, T. Modeling and Control of Batch Fermentation Processes under Conditions of Uncertainty. *Bioprocess Engineering*, 14, 299-306, 1996.
- Halme, A., Karim, N. Expert Systems for Biotechnology. *Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2^a ed., (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), vol. 4: Measuring, Modelling and Control (K. Schügerl, Ed. vol.), VCH, Weinheim, cap. 19, 625-636, 1991.
- Hatch, R., Veilleux, B. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* in Commercial Baker's Yeast Fermentation *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 371-374, 1995.
- Kappel, W., Diehl, U., Lauterbach, U., haß, V., Munack, A. Implementation of Applications-Specific Programs in a Standard Software-Package. *Biotech.Forum Europe.*, 8:10, 608-611, 1991
- Karim, M.N., Rivera, S.L. Artificial Neural Networks in Bioprocess State Estimation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol. 46: Modern Biochemical Engineering*, (A. Fiechter, Ed.) Springer-Verlag, Berlin, p. 1-34, 1992.
- Konstantinov, K., Aarts, R., Yoshida T. Expert Systems in Bioprocess Control: Requisite Features. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol. 48: Bioprocess Design and Control*, (A. Fiechter, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, p. 169-191, 1993.
- Lee, K. *Feedback Optimization of Fed-batch Baker's Yeast Fermentation*. Dissertação de Doutoramento, Purdue University, USA, 1990.
- Locher, Sonnleitner, B., G., Fiechter, A. Automatic Bioprocess Control. 2. Implementations and Practical Experiences. *J. Biotechnol.*, 19, 127-144, 1991.
- Lübbert, A. Automation in Biotechnology. *Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2^a ed., (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), vol. 4: Measuring, Modelling and Control (K. Schügerl, Ed. vol.), VCH, Weinheim, cap. 17, 561-602, 1991.
- Miskiewicz, T., Wilczynski, S. A Real-time Feed Rate Control System for Pilot Plant Baker's Yeast Production. *Biotechnology Letters*, 18:1, 1-6, 1996.
- Montague, G.A., Morris, A.J. Neural-Network Contributions in Biotechnology. *Trends in Biotechnol.*, 12, 8, 312-323, 1994.
- Oliveira, F., Ferreira, E.C., Feyo de Azevedo, S. Requisitos e Realização de uma Instalação Experimental para Estudos de Modelização e Controlo em Processos de Fermentação, *1º Encontro Nacional de Controlo Automático - CONTROLO'94*, Vol. II, 71-76, Lisboa, 1994.

- Oliveira, R., Ferreira, E., Oliveira, F., Feyo de Azevedo, S. A Study on the Convergence of Observer-Based Kinetics Estimators in Stirred Tank Bioreactors *J. Proc. Control*, 6, 367-371, 1996.
- Omstead, D.R. *Computer Control of Fermentation Processes*, CRC Press, Boca Raton FL, 1990.
- Petkov, S., Davis, R. On-line Biomass Estimation using a Modified Oxygen Utilization Rate. *Bioprocess Engineering*, 15, 43-45, 1996.
- Pons, M.-N. *Bioprocess Monitoring and Control*, Carl Hanser Verlag, Munique, 1992.
- Pons, A., Dussap, C., Péquignot, C., Gros, J. Metabolic Flux Distribution in *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 for Various Carbon Sources. *Biotechnology Bioengineering*, 51, 177-189, 1996.
- Royce, P.N. A Discussion of Recent Developments in Fermentation Monitoring and Control from a Practical Perspective. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 13:2, 117-149, 1993.
- Saxén, B., Saxén, H. A Neural-Network Based Model of Bioreaction Kinetics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 74:2, 124-131, 1996.
- Schügerl, K. (Ed. vol.) *Measuring, Modelling and Control. Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2^a ed., Vol. 4, (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), VCH, Weinheim, 1991.
- Schügerl, K., Lorenz, T., Lübbert, A., Niehoff, J., Scheper, T., Schmidt, W. Pros Ans Cons: On-line Versus Off-line Analysis of Fermentations. *Trends in Biotechnol.*, 1, 11-15, 1996.
- Scragg, A. H. *Biotechnology for Engineers*, Ellis Horwood Limited, 1988.
- Schubert, J., Simutis, R., Dors, M., Havlik, I., Lübbert, A. Hybrid Modelling of Yeast Production Processes - Combination of a priori Knowledge on Different Levels of Sophistication. *Chem. Eng. Tech.*, 17, 10-20, 1994.
- Siimes, T., Pokkinen, M., Holmberg, A., Linko, P. Flexible Computer-aided Design, Monitoring and Data Management System for Biocatalyst Production. *Bioprocess Engineering*, 12, 141-146, 1995.
- Sipior, J., Randers-Eichhorn, L., Lakowicz, J., Carter, G., Rao, G. Phase Fluorometric Optical Carbon Dioxide Gas Sensor for Fermentation Off-Gas Monitoring. *Biotechnol. Progress*, 12, 266-271, 1996.
- Sonnleitner, B., Locher, G., Fiechter, A. Automatic Bioprocess Control. 1. A General Concept. *J. Biotechnol.*, 19, 1-18, 1991.
- Stanbury, P., Whitaker, A. *Principles of Fermentation Technology*, 2^a ed., Pergamon Press, 1984.
- Teissier, P., Perret, B., Latrille, E., Barillere, J., Corrieu, G. Yeast Concentration Estimation and Prediction with Static and Dynamic Neural Network Models in Batch Cultures. *Bioprocess Engineering*, 14, 231-235, 1996.
- Teixeira, J., Sousa, L., Feyo de Azevedo, S., Mota, M. Monitoring and Control of a Fed-Batch Fermentation. *Chemical Engineering Education*, Spring, 94-97, 1992.
- Volesky, B., Votruba, J. *Modeling and Optimization of Fermentation Processes*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992.
- Williams, D. Problems of Measurement and Control in Biotechnological Processes. *Chemical Engineering Problems in Biotechnology*, (M.A. Winkler, Ed.), Elsevier Applied Science, London, cap. 4, 167-213, 1990.
- Whitaker, A., *Process Biochemistry*, Vol. 15, 10, 1980.

2. O fermento de padeiro

Sumário

Neste capítulo é apresentado o fermento de padeiro, desde os aspectos biológicos e morfológicos até breve referência ao processo de fabrico industrial.

- 2.1 Introdução
 - 2.2 Aspectos biológicos
 - 2.3 Aspectos metabólicos
 - 2.4 O processo de fabrico
 - 2.5 Conclusões
 - 2.6 Bibliografia
-

2.1 Introdução

A produção industrial de fermento de padeiro iniciou-se há mais de 100 anos na Europa, provavelmente na Holanda, havendo sinais da sua utilização há já alguns milhares de anos (Trivedi *et al.*, 1986). Até ao século passado, os padeiros recorriam às cervejeiras para fornecimento da chamada levedura de cerveja. Quando estas alteraram o processo de produção da cerveja, de levedura de fermentação alta para uma levedura de fermentação baixa, as padarias passaram a não poder utilizar este novo tipo de levedura (fraco poder gasificante e sabor amargo), recorrendo à levedura de destilaria, que foi sendo substituída lentamente pelo fermento produzido em pequenas fábricas, emergindo desde então uma nova indústria.

O processo de fabrico do fermento de padeiro foi sendo aperfeiçoado ao longo do século passado, tendo havido vários saltos tecnológicos, como a introdução de arejamento contínuo na fermentação (devido a Marquardt em 1879, segundo Trivedi *et al.*, 1986) e a alimentação lenta de açúcar ao reactor (entre 1915 e 1920). Esta última contribuição foi proposta independentemente por dois cientistas, o dinamarquês S. Sak e o alemão F.F. Hayduck. Este tipo de processo de alimentação foi denominado de *Zulaufverfahren* ou processo *Zulauf*. Historicamente, esta proposta corresponde à introdução da operação semi-contínua (“*fed-batch*”) em fermentadores, método hoje muito utilizado noutros processos biotecnológicos. Novos progressos foram implementados com a utilização de culturas puras e com a utilização de melaços (em 1920). Desde aí o processo tem sido aperfeiçoado mais no pormenor que no projecto geral (Bellgardt e Yuan, 1991). Recentemente a atenção tem sido dirigida para o controlo automático do processo. O objectivo é controlar a adição de substrato de modo a manter uma elevada produtividade, evitando assim perda de rendimento por excesso de glucose no meio e consequente produção de etanol. Em 1961, Rungeldier e Braun propuseram o princípio de controlo da alimentação de melaços baseado na concentração de etanol nos gases de saída do reactor. No entanto, a falta de sensores a baixo custo e fiáveis dificultou a implementação prática desta técnica. Para informações mais detalhadas sobre o desenvolvimento do processo de fabrico do fermento de padeiro sugere-se a consulta de literatura especializada (Reed e Peppler, 1973, Skinner *et al.*, 1980, Reed e Nagodawithana, 1990).

O fermento de padeiro é produzido aerobicamente num meio rico em melaços, amónia, sais, fosfatos, vitaminas e anti-espuma. Em produções comerciais a maioria destes componentes são fornecidos pelos melaços e pela água.

Tendo como base a análise elementar do fermento de padeiro seco, é possível calcular a respectiva composição qualitativa e quantitativa. A Tabela 2.1 apresenta uma composição típica (Kristiansen, 1993). De referir que se trata de uma composição média, a qual pode diferir com a estirpe e com as condições químicas e físicas do meio.

Tabela 2.1 Principais elementos presentes em 1 kg de fermento de padeiro seco

<i>Elemento</i>	<i>Composição média (g)</i>
Carbono	480
Oxigénio	310
Azoto	80
Hidrogénio	70
Potássio	20
Fósforo	15
Magnésio	3
Cálcio	2
Enxofre	2
Resto	18
Total	1000
Zn, Fe, Cu, Na, Mn, Mo	vestígios

Os melaços de cana e de beterraba são os substratos utilizados na produção de fermento de padeiro. A sacarose presente nos melaços é hidrolisada no exterior da célula pela enzima invertase e é transportada para as células de fermento de padeiro como glucose e frutose. A composição dos melaços varia com a tecnologia utilizada nas refinarias e também com as condições de agricultura do país e, entre anos diferentes, depende das condições climáticas. É um facto que estas variações na qualidade dos melaços constituem um problema na produção de fermento de padeiro. A composição típica dos melaços é apresentada na Tabela 2.2 (Kristiansen, 1993).

Tabela 2.2 Composição típica dos melaços

<i>Elemento</i>	<i>Concentração (%)</i>
Água	17-25
Sacarose	30-40
Glucose	4-9
Frutose	5-12
Outras substâncias redutoras	1-5
Outros polissacáridos	2-5
Composto de azoto	2-6
Ácidos sem azoto	2-8
Fosfolípidos, esteroi	0.1-1

Outros requisitos nutricionais são o azoto e o oxigénio. A fonte de azoto, além de já estar presente nos melaços, é adicionada ao meio sob a forma de amónia, sais de amónia ou ureia. No caso do oxigénio, as necessidade médias são cerca de 1 g de oxigénio por grama de biomassa produzida.

A fermentação da levedura de panificação decorre a 30 °C. Isto é um compromisso entre a temperatura à qual se obtém um rendimento máximo de biomassa em açúcar (28.5 °C) e a temperatura à qual se atinge a taxa de crescimento máxima (32 °C).

O perfil de pH é, também, uma solução de compromisso (Kristiansen, 1993). É vantajoso operar a um pH baixo para evitar a contaminação. Contudo, a taxa de crescimento é máxima para pH 4.0-5.5. Assim, o valor utilizado é cerca de 4 para a maior parte do processo fermentativo. Perto do fim, aumenta-se o pH até cerca de 5.5 devido a requisitos de qualidade; a pH baixo, os pigmentos presentes nos melaços são facilmente absorvidos pela levedura e a concentração de amónia que cora a levedura é maior. Para se conseguir um produto final mais claro, o pH é aumentado, preferencialmente suspendendo a alimentação de amónia, o que resulta, também, na cessação da gemulação e na acumulação de polissacáridos intracelulares.

Segundo Kristiansen (1993) uma fermentação industrial típica apresenta uma produtividade volumétrica cerca de 2.5-3 kg/m³/h.

2.2 Aspectos biológicos

2.2.1 A célula

As leveduras, microorganismos eucariotas, são cerca de cinco a dez vezes maiores em diâmetro que os procariotas (caso das bactérias). Possuem um núcleo e um número de organelos celulares dentro do citoplasma.

As leveduras constituem um grupo do tipo fungo com forma predominantemente unicelular e reprodução vegetativa por gemulação. As leveduras são representadas por 39 géneros e cerca de 400 espécies, distinguindo-se as espécies pelas características morfológicas e fisiológicas (Andersen, 1990).

As células de levedura têm, normalmente, uma forma oval, com tamanhos típicos de 4-8 μm x 5-16 μm . Os principais componentes celulares são: parede celular, membrana citoplasmática, mitocôndrias, ribosomas, núcleo, vacúolos e inclusões diversas (Figura 2.1).

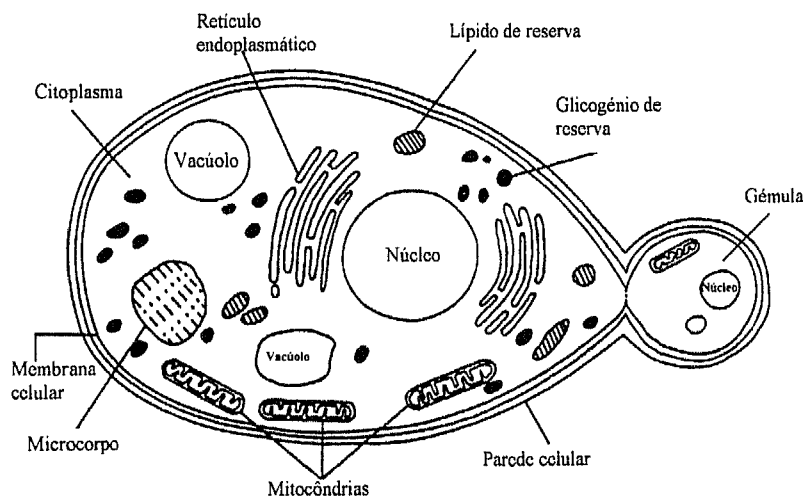


Figura 2.1 Reprodução de uma célula de levedura (Ratledge, 1990)

Dada a sua natureza rígida, a parede celular serve como escudo protector da célula. É fina nas células jovens, espessando-se com a idade. Os principais constituintes da parede celular são polissacáridos, proteínas e lípidos. Entre as proteínas distingue-se a enzima invertase, responsável pela hidrólise dos di- e trissacáridos impermeáveis.

Junto à superfície interna da parede celular encontra-se a membrana citoplasmática, a qual regula a troca de nutrientes e metabolitos pela sua permeabilidade selectiva.

É bem conhecido que a presença de etanol impede o crescimento celular. Este efeito inibitório pelo etanol é parcialmente devido ao seu efeito no transporte de alguns açúcares (por exemplo, glucose) e amino-ácidos através da membrana citoplasmática. No entanto, essas concentrações de etanol são elevadas; no caso da glucose fala-se em 15 g/l (van Uden, 1985).

As mitocôndrias variam em número e estão distribuídas perto da membrana citoplasmática. Uma vez que as mitocôndrias contêm as enzimas respiratórias, são consideradas como as 'casas de força' da célula, responsáveis pela conversão aeróbia de energia.

O núcleo é um organelo bem definido, circundado por uma membrana nuclear semi-permeável, com funções metabólicas e reprodutivas. A informação genética está aqui localizada, o que o torna peça chave na divisão celular.

O citoplasma é o fluido que envolve os organelos e preenche a célula.

Os ribosomas encontram-se no citoplasma e estão envolvidos na síntese proteica.

No citoplasma encontram-se várias enzimas que tomam parte activa no mecanismo glicolítico. O glicogénio é o principal polissacárido distribuído pelo citoplasma.

2.2.2 A reprodução celular

A maioria das leveduras pode reproduzir-se assexualmente por gemulação (também chamada reprodução vegetativa) ou, em condições adversas, pode reproduzir-se sexualmente por esporulação. No caso natural da gemulação, as células mãe, que já reproduziram pelo menos uma vez, e as células filhas, que ainda vão reproduzir, crescem e formam uma gémula no início da reprodução. Esta gémula cresce e depois de ter recebido toda a informação genética da célula mãe, separa-se (tempo de formação cerca de trinta minutos). O número de cicatrizes é indicativo da idade da célula. Durante o seu tempo de vida a célula produz em média 24 células filhas. Detalhes sobre a reprodução das células podem encontrar-se na literatura de microbiologia (Pelczar *et al.*, 1988).

2.3 Aspectos metabólicos

Nutricionalmente, todas as leveduras são microorganismos heterotróficos (organismos que podem obter energia e fonte de carbono a partir de compostos orgânicos), cujo crescimento depende de uma variedade de compostos orgânicos e alguns nutrientes minerais (Reed e Pepler, 1973). Metabolicamente, as leveduras são predominantemente anaeróbios facultativos, ou seja, tanto crescem na ausência de ar (fermentação) como na sua presença (respiração ou metabolismo oxidativo). A presença de oxigênio induz alterações no metabolismo de fermentação para respiração. Esta mudança metabólica, conhecida desde 1876 como efeito Pasteur, resulta no aumento de açúcares utilizados e no aumento dos rendimentos obtidos.

O metabolismo das leveduras, e como em muitos microorganismos, consiste em mecanismos de formação ou degradação de energia (catabolismo) e mecanismos de consumo de energia ou de bio-sintetização (anabolismo), os quais envolvem transferência de átomos, grupos de átomos ou elétrons. O crescimento microbiano é o resultado balanceado destas reações de oxidação-redução. Parte da energia libertada pelo catabolismo é utilizada na síntese de proteínas ou outros compostos necessários à célula, processo esse assegurado pelo ATP (adenosina tri-fosfato).

Em condições aeróbias a levedura *S. cerevisiae* pode crescer em glucose como única fonte de carbono e energia. Estão envolvidos três mecanismos principais, a saber (Andersen, 1990):

	<i>i. Fermentação da glucose</i>
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2 ATP$	(2.1)
	<i>ii. Oxidação da glucose</i>
$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + (16-28) ATP$	(2.2)
	<i>iii. Oxidação do etanol</i>
$C_2H_5OH + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O + (6-11) ATP$	(2.3)

Em condições aeróbias e para concentrações de glucose inferiores a 90-100 mg/l (Woehrer e Roehr, 1981), a glucose é oxidada produzindo dióxido de carbono e água com um rendimento energético máximo de 16 a 28 moles de ATP.

Na ausência de oxigénio ou se houver glucose em excesso no meio, ocorre fermentação da glucose. Esta reacção é a que apresenta um rendimento energético menor, dado que a fermentação da glucose tem como prioridade a produção de etanol.

Na presença de baixas concentrações de glucose, ou na sua ausência, ocorre a respiração do etanol. De referir que a glucose é o substrato preferencial.

2.3.1 Fermentação da glucose

No interior da célula, no citoplasma, a glucose é degradada em piruvato (glicólise) segundo a via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). O piruvato, por sua vez, é transformado em acetaldeído pela acção da enzima piruvato descarboxilase (Figura 2.2-b). O acetaldeído é, de seguida, reduzido a etanol pelo NADH (coenzima reduzida)- reacção catalisada pela desidrogenase. Através desta última reacção o NAD é regenerado.

2.3.2 Respiração da glucose

Na presença de oxigénio, o piruvato entra no ciclo ATC (ácido tricarboxílico) sob o efeito da enzima piruvato desidrogenase (Figura 2.2-c). No ciclo, o piruvato é completamente oxidado em CO_2 e a coenzima oxidada NAD tem o papel de aceitador de electrões. O NADH entra na cadeia respiratória, onde o oxigénio, funcionando como aceitador de electrões, se transforma em H_2O . Esta transferência de electrões origina a produção de uma importante quantidade de energia (Pomerleau, 1990). Estas reacções ocorrem nas mitocôndrias.

2.3.3 Respiração do etanol

O etanol é convertido em acetato no citoplasma, o qual é depois oxidado no ciclo ATC nas mitocôndrias (Figura 2.2-d). O crescimento em etanol necessita da produção de certos precursores para a síntese de polissacáridos estruturais e de reserva, tal como acontece na etapa glicolítica do crescimento em glucose. A síntese destes polissacáridos, designada gluconeogénese, é efectuada por uma via inversa da via EMP. A gluconeogénese é reprimida e inibida na presença de pequenas quantidades de glucose, pelo que, quando estão presentes os dois substratos, a glucose é consumida preferencialmente.

A Figura 2.2-a) apresenta o conjunto das três vias metabólicas (Pomerleau, 1990).

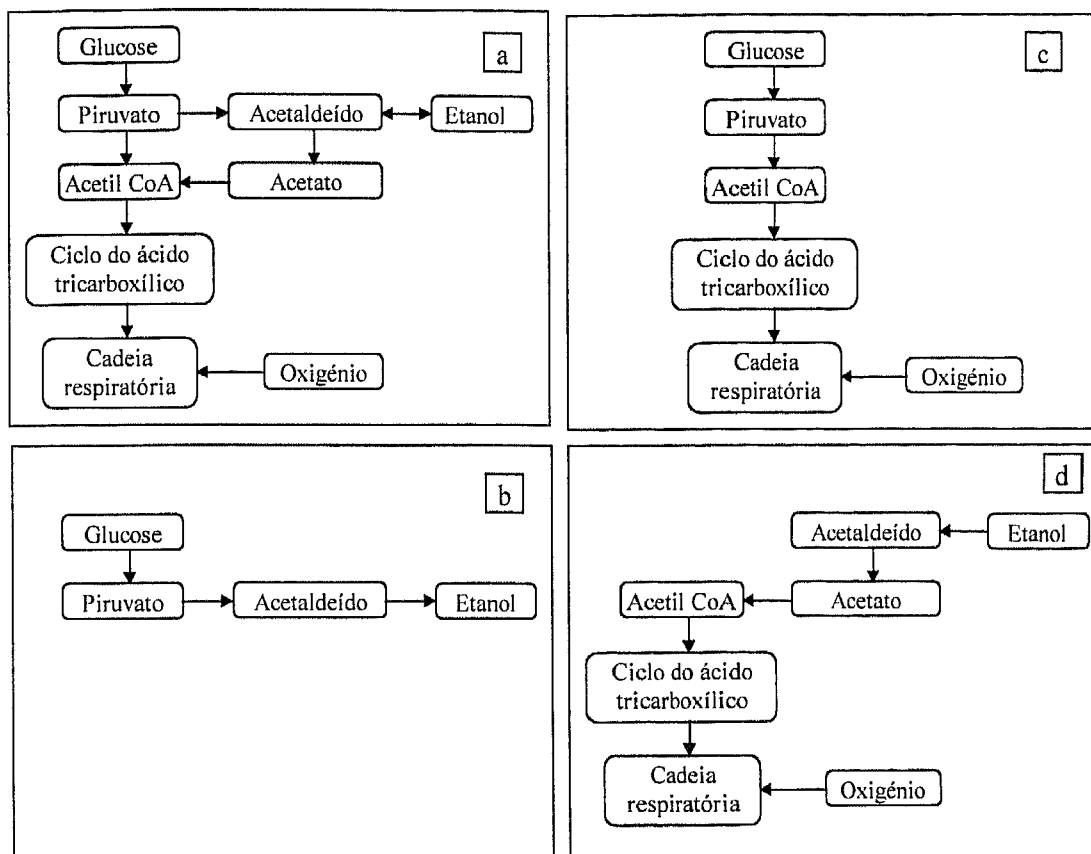


Figura 2.2 Mapa simplificado das três vias metabólicas do fermento de padeiro: a) conjunto das três vias, b) fermentação da glucose, c) oxidação da glucose e d) oxidação do etanol

Na regulação do metabolismo energético das leveduras são, normalmente, referidos dois fenômenos, o efeito Pasteur e o efeito Crabtree. O efeito Pasteur refere que, na presença de oxigênio, a fermentação é inibida pela respiração, ocasionando uma taxa de utilização de glucose inferior à verificada na situação de crescimento anaeróbio.

O efeito Crabtree refere-se à repressão do metabolismo oxidativo devido à presença de quantidades elevadas de glucose (superior a um certo valor crítico). A diminuição da capacidade de oxidação da glucose provoca uma alteração no metabolismo resultando na produção de etanol em presença de oxigênio.

Sonnleitner e Käppeli (1986) propuseram, com base na capacidade respiratória limitada das células, um novo conceito para a regulação do metabolismo da *S. cerevisiae*. Este mecanismo explica a formação do etanol como resultado de um sobre-fluxo de glucose na glicólise, o qual excede a capacidade oxidativa das células. Havendo excesso de glucose, a glicólise produzirá piruvato para além de um valor limite que o sistema respiratório consegue metabolizar. Este piruvato irá ser encaminhado para a produção de etanol. O

modelo proposto por estes autores considera a glucose, o etanol e o oxigénio como substratos da levedura.

A Figura 2.3 (adaptada de Sonnleitner e Käppeli, 1986 e Ferreira, 1995) constitui uma tentativa ilustrada de explicação do conceito de capacidade respiratória limitada, através da figura da restrição ou estrangulamento respiratório. São evidenciadas três situações relativamente à saturação da capacidade respiratória:

- fluxo sub-crítico: o fluxo total de substratos (glucose e/ou etanol) consegue passar a restrição, isto é, os substratos são metabolizados oxidativamente;
- fluxo crítico: o fluxo de substratos preenche completamente a restrição;
- fluxo supra-crítico: o fluxo de substratos excede a restrição.

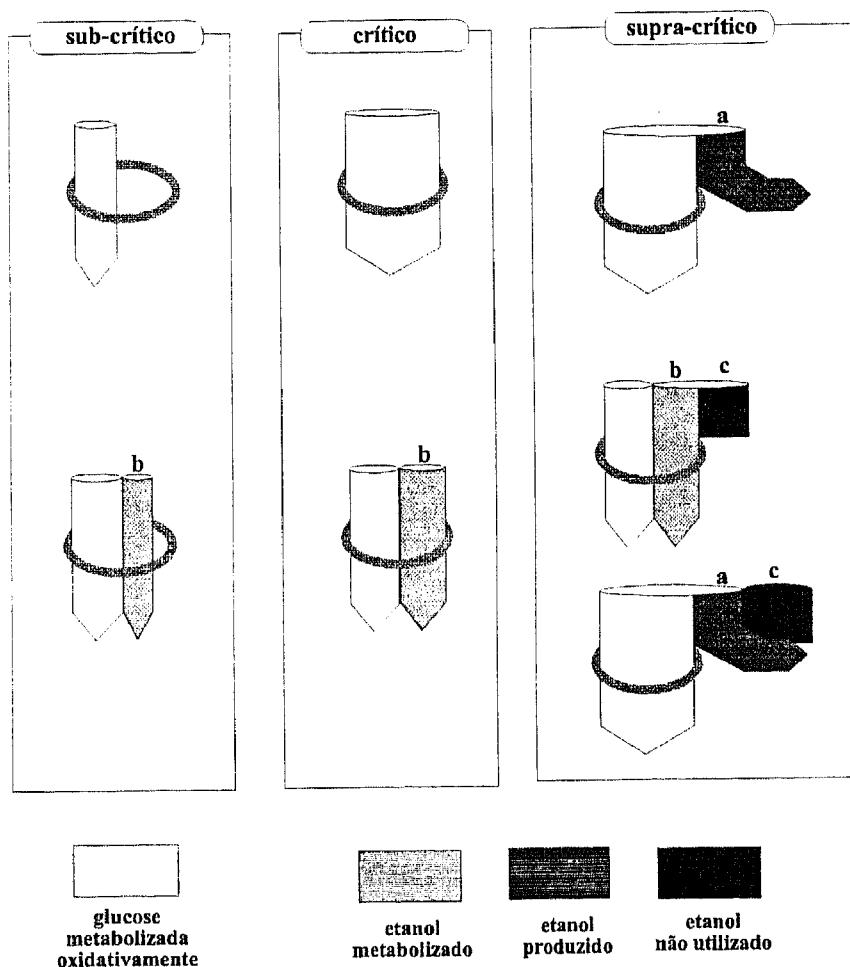


Figura 2.3 Esquema da capacidade respiratória do fermento de padreiro

Relativamente à situação de fluxo de substrato(s) supra-crítico poderão ocorrer as seguintes situações:

- fluxo de glucose supra-crítico com ou sem etanol adicional no meio:

A parte de glucose que não consegue passar o estrangulamento é metabolizada reductivamente, com produção de etanol (*a*). Na situação de existência de etanol, este não será metabolizado (*c*) porque a restrição está já preenchida com glucose e não existe nenhuma via metabólica reductiva para o etanol.

- fluxo de glucose sub-crítico com etanol adicional no meio:

Enquanto os fluxos de etanol e de glucose não preenchem o estrangulamento, o etanol é utilizado oxidativamente (*b*). Após a saturação da restrição, o etanol já não é metabolizado (*c*).

A representação matemática do modelo proposto por Sonnleitner e Käppeli (1986) é apresentada em detalhe no capítulo 4.

2.4 O processo de fabrico

Existem várias publicações com a descrição completa do processo de fabrico do fermento de padeiro, nomeadamente, Trivedi *et al.*, 1986, Kristiansen, 1993, entre outros. Neste parágrafo apresenta-se de forma resumida o processo de fabrico industrial do fermento de padeiro.

A Figura 2.4, adaptada de Berry *et al.* (1987), apresenta o diagrama de produção da levedura.

A matéria-prima principal, os melaços, é primeiramente tratada: é diluída em água e esterilizada. Várias impurezas precipitam durante o aquecimento e são posteriormente removidas por separação.

Paralelamente, no laboratório preserva-se e cultiva-se a estirpe de forma a mantê-la pura. De uma cultura em tubos inclinados, passa-se para placas de Petri e daqui para estágios de propagação de volume sucessivamente maior, onde a cultura é continuada.

Além dos melaços, azoto e fósforo devem ser adicionados ao meio sob a forma de soluções aquosas, nomeadamente, sulfato de amónio ou ureia como fonte de azoto e ácido fosfórico ou fosfato de diamónio como fonte de fósforo.

A cultura de fermento de padeiro é continuada, então, em grandes fermentadores (é comum um volume de 100 a 250 m³) com a sucessiva adição de melaços e fontes de azoto e fósforo, segundo esquema pré-definido. São, também, adicionadas grandes quantidades de

O arejamento é mantido sempre a um nível alto, nunca inferior a 1 vvm (volume de ar por volume de reactor por minuto), para evitar crescimento anaeróbio. Se a levedura cresce anaerobiamente, a taxa de crescimento é pequena, é consumido mais açúcar e é produzido etanol; além disso, a actividade enzimática é afectada pela transferência entre condições aeróbias e anaeróbias. A qualidade final do produto é reduzida (a actividade levedante é reduzida) se, durante o processo de fabrico, as condições aeróbias não forem asseguradas no reactor.

No final da fermentação, a mistura é tratada em equipamento de separação (centrifugação e filtração) de modo a concentrar e, simultaneamente lavar, o creme de levedura. Este é seguidamente arrefecido a 2-3 °C e armazenado. Daqui, o creme de levedura é filtrado e seco (de forma suave para as células não perderem a sua actividade), e, finalmente, extrudido e embalado em blocos. As embalagens são armazenadas a frio, mantendo a sua actividade por mais de um ano.

A qualidade pode ser definida de vários modos. Na produção de fermento de padeiro são consideradas duas propriedades fundamentais: a estabilidade do produto e a actividade levedante. As condições aeróbias favorecem a obtenção de uma biomassa rica em polissacáridos e com baixo teor proteico, o que melhora a estabilidade do produto. Esta é a razão pela qual se deve parar a alimentação de amónia e de melaços antes da fase final da fermentação. Deste modo, a levedura assimila e acumula o substrato não utilizado, em particular os polissacáridos que são utilizados como fornecedores de energia durante o armazenamento. Mas, por outro lado, a actividade levedante é indicada pela percentagem de proteínas presentes, o que é contrário aos requisitos de estabilidade. No processo de produção de fermento padeiro deve balancear-se entre elevada concentração de proteínas e elevada concentração de polissacáridos. É recomendável uma ligeira produção de etanol de forma a induzir o sistema enzimático da via catabólica fermentativa, evitando, assim, um longo período de adaptação, aquando da utilização do fermento (Pomerleau, 1990).

Yuan *et al.* (1995) desenvolveram uma técnica para medição automática da actividade levedante, a qual é considerada pelos autores, como sendo o principal índice de qualidade do fermento de padeiro.

ar esterilizado de modo a manter condições aeróbias de crescimento. Nalguns casos, também se utiliza agitação. O processo decorre por um período de 12 a 18 horas, dependendo do fermentador e da concentração de células desejada.

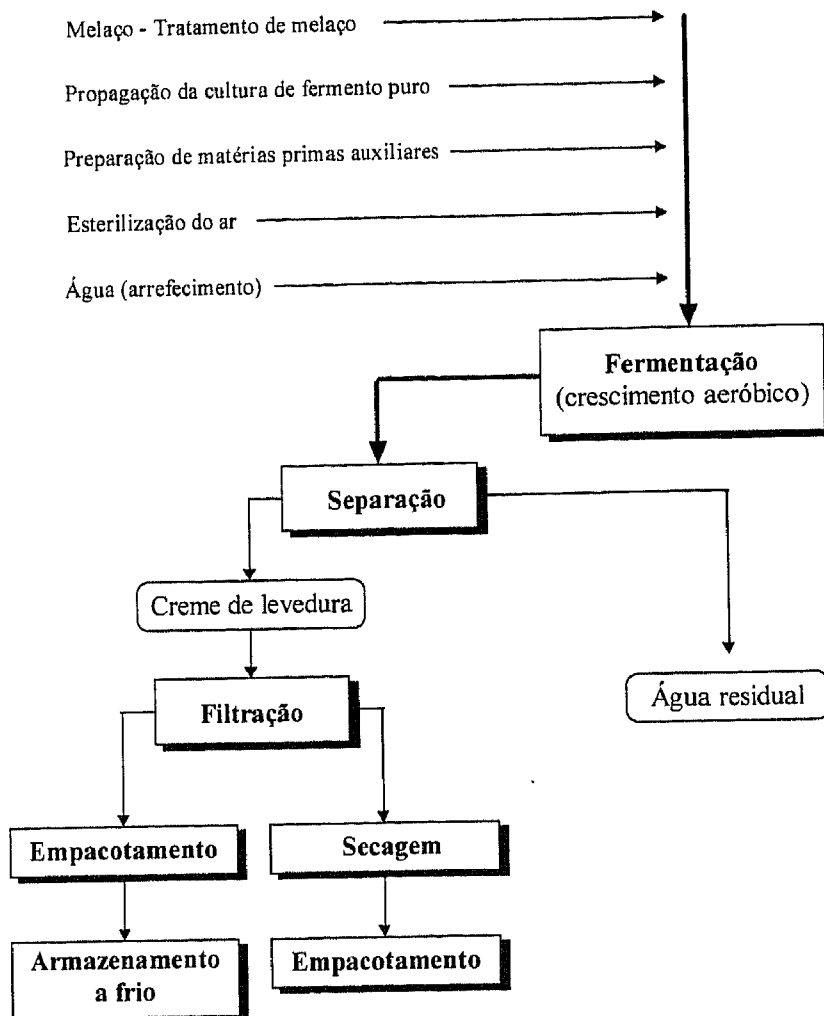


Figura 2.4 Diagrama de produção de fermento de padeiro

Para se obter um rendimento de biomassa em açúcar elevado é necessário manter a concentração de açúcares abaixo do ponto onde a produção de etanol é iniciada, o que é conseguido com a adição gradual de açúcares fermentáveis à solução fortemente arejada e agitada, evitando assim uma concentração inicial muito elevada. O reactor é, por isso, operado no modo semi-contínuo, com um perfil de alimentação que segue normalmente uma curva crescente até se atingir uma dada concentração de biomassa (Kristiansen, 1993). A partir daí, é mantida constante e suspende-se a alimentação durante a última hora da fermentação.

2.5 Conclusões

Neste capítulo fez-se uma apresentação do fermento de padeiro, focando os aspectos biológicos, morfológicos e, de forma resumida, o processo de fabrico industrial.

2.6 Bibliografia

- Andersen, Y. *Multivariable Identification and Control of a Continuous Yeast Fermentation*, Dissertação de Doutoramento, Technical University of Denmark, Lyngby, 1990.
- Bellgardt, K., Yuan, J. Process Models: Optimization of Yeast Production - A Case Study. *Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2ª ed., (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), vol. 4: Measuring, Modelling and Control (K. Schügerl, Ed. vol.), VCH, Weinheim, cap. 12, 383-406, 1991.
- Berry, D., Stewart, G., Russel, I., *Yeast Biotechnology*, Allen & Unwin, London, 1987.
- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Kristiansen, B. (Ed.), *Integrated Design of a Fermentation Plant - The Production of Baker's Yeast*, VCH, Weinheim, 1993.
- Pelczar, M., Reid, R., Chan, E.C.S. *Microbiology*, McGraw-Hill, New York, 1988.
- Pomerleau, Y. *Modélisation et Contrôle d'un Procédé Fed-Batch de Culture des Levures à Pain (Saccharomyces cerevisiae)*. Dissertação de Doutoramento, Université de Montreal, 1990.
- Ratledge, C. Yeast Physiology - A Micro Synopsis, *Proc. Int. Workshop on Bioreactor Performance - Integrated Aspects of Physiology and Physics: Yeast as a Model Organism* (ÖGBPT - Austrian Assoc. of Bioprocess Technology, Ed.), 37-67, 1990.
- Reed, G., Pepler, H., *Yeast Technology*, The AVI Publishing Company, Inc., Connecticut, 1973.
- Reed, G., Nagodawithana, W., *Yeast Technology*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.
- Rundeldier, K., Braun, E., *Method and Device for Controlling and Growth of Microbial Cultures*, U. S. Patent 3, 002, 894, October 3, 1961.
- Skinner, F., Passmore, S., Davenport, R. (Eds.) *Biology and Activity of Yeast*, Academic Press, London, 1980.
- Sonnleitner, B., Käpelli, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 927-937, 1986.
- Trivedi, N.B., Jacobson, G., Tesch, W. Baker's Yeast, *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 24:1, 75-109, 1986.
- van Uden, N., Ethanol Toxicity and Ethanol Tolerance in Yeasts, *Annual Reports on Fermentation Processes*, 8, (Ed. G. T. Tsao), Academic Press, 1985.
- Woehrer, W., Roehr, M. Regulatory Aspects of Baker's Yeast Metabolism in Aerobic Fed-batch Cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 567-581, 1981.

Yuan, J., Yan, L., Zhou, Y., Bellgardt, K., Microcomputer-coupled System for Measuring the Fermentative Activity of Baker's Yeast, *Process Control and Quality*, 7, 13-20, 1995.

3. O processo laboratorial - materiais e métodos

Sumário

No presente capítulo apresenta-se em detalhe a instalação experimental à escala laboratorial para a produção de fermento padeiro, bem como os métodos analíticos envolvidos na determinação das variáveis relevantes no processo.

São referidos, também, os cuidados a ter na realização do trabalho experimental e apresentam-se, em particular, os métodos de determinação do coeficiente global de transferência de massa.

- 3.1 Introdução
 - 3.2 Estirpe
 - 3.3 Preservação da estirpe
 - 3.4 Meios de cultura
 - 3.5 Condições experimentais
 - 3.6 Instalação experimental e equipamento informático
 - 3.7 Medidas em linha
 - 3.8 Medidas em diferido
 - 3.9 Programa *Monitor*
 - 3.10 Procedimento experimental
 - 3.11 Métodos para a determinação experimental do ($K_L a$)
 - 3.12 Tabela geral de experiências efectuadas
 - 3.13 Bibliografia
-

3.1 Introdução

A instalação experimental utilizada neste trabalho foi projectada em colaboração com o Doutor E. C. Ferreira (Ferreira, 1995) e encontra-se no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, em Braga.

Neste capítulo referem-se as técnicas e métodos utilizados na realização experimental de produção semi-contínua de fermento de pão. De modo a não se tornar fastidioso para o leitor, apresenta-se em Apêndice uma descrição detalhada dos protocolos de execução.

3.2 Estirpe

O microorganismo seleccionado para estudo foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* H1022 (ATCC 32167). A escolha desta estirpe deveu-se à disponibilidade de informação dos estudos já efectuados pela equipa de investigação do Prof. Armin Fietcher do ETH, Zurique, Suíça (Rieger *et al.*, 1983; Sonnleitner e Käpelli, 1986; Fietcher e Seghezzi, 1992; Münch *et al.*, 1992ab; Locher *et al.*, 1993).

3.3 Preservação da estirpe

A estirpe, comprada à ATCC, encontrava-se liofilizada (Figura 3.1) tendo sido desenvolvido e aplicado um protocolo de activação. O procedimento adoptado é descrito no Apêndice A.1.1.

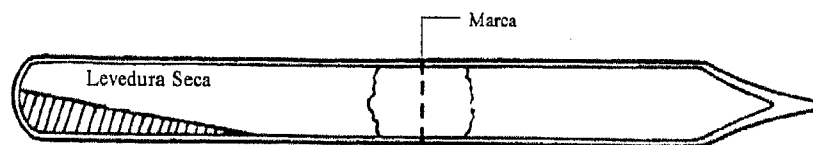


Figura 3.1 Ampola da estirpe ATCC 32167

A estirpe é conservada de três modos diferentes: congelada em arca frigorífica a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desde 1993, com o objectivo de preservação a longo prazo), no frigorífico em tubos inclinados rolhados (para preservação a médio prazo) e, também, no frigorífico em tubos

inclinados, ditos de trabalho (para utilização diária). A descrição detalhada de cada um dos procedimentos encontra-se no Apêndice A.1.2.

3.4 Meios de cultura e condições experimentais

Meios de cultura

O meio de cultura semi-sintético utilizado nas fermentações semi-contínuas para produção de fermento padeiro está indicado na Tabela 3.1. O meio é esterilizado em autoclave a 121 °C durante 20-30 minutos.

Tabela 3.1 Meio de cultura para produção de fermento padeiro

<i>Composto</i>	<i>Conc. Inóculo (g/l)</i>	<i>Conc. Meio Inicial (g/l)</i>	<i>Conc. Alimentação Substrato (g/l)</i>
Açúcares ⁽¹⁾	5 ou 30 ⁽²⁾	1 ou 5 ⁽²⁾	Variável ou 25 ⁽²⁾
KH ₂ PO ₄	5	5	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	2	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4	0.4	0.4
Extracto de levedura	1	1	1
Água destilada	q.b.	q.b.	q.b.

⁽¹⁾ Os açúcares utilizados podem ser glucose comercial ou melaços.

⁽²⁾ Concentração a utilizar consoante os objectivos da fermentação.

Chama-se meio inicial ao volume inicial do fermentador (o ponto de partida da fermentação); inóculo ao volume de 10% do volume inicial do fermentador, o qual corresponde a uma fermentação prévia em matraz inoculado com a estirpe proveniente de tubos inclinados; alimentação de substrato refere-se ao volume adicionado na fermentação semi-contínua.

Na Tabela 3.1 referem-se diferentes valores para a concentração de açúcares (glucose comercial ou melaços) no inóculo, no meio e na alimentação de substrato, respectivamente, 5 ou 30, 1 ou 5 e variável ou 25. Esta selecção está relacionada com o modo de realização da experiência, não existindo nenhuma correlação de valores entre colunas. Isto é, se o inóculo for preparado de manhã, ficando na incubadora orbital a 30°C e 150 rpm durante 5 h, utiliza-se 5 g/l de açúcar; se o inóculo for preparado de véspera, ficando durante cerca de

16 h na incubadora, então, a concentração de açúcares deverá necessariamente ser superior (30-40 g/l) de modo as células estarem ainda viáveis no final deste estágio.

Em relação à concentração de açúcares no meio inicial, esta depende dos objectivos da experiência em causa. Depois de inoculado, o fermentador deverá estar 4 a 6 h a operar em modo descontínuo. Se se pretender uma experiência de controlo da concentração de etanol em valores baixos, dever-se-á trabalhar com concentrações de açúcar no meio mais baixas, de modo a que o açúcar seja usado na produção de biomassa e não na produção de etanol.

Quanto à concentração na corrente de alimentação de substrato, ela depende apenas do objectivo da experiência a realizar para efeito de estudos comparativos referentes à adição total de açúcares.

O melaço utilizado foi disponibilizado pela empresa Gist Brocades, situada em Matosinhos. Trata-se de um melaço de cana tratado que é utilizado industrialmente. O melaço é constituído essencialmente por sacarose, frutose e glucose. Após diluição prévia, a concentração total de açúcares é de 67 g/l. Apesar do melaço conter alguns nutrientes necessários à fermentação, nomeadamente a fonte azotada, optou-se por adicionar ao meio todos os nutrientes utilizados nas corridas com glucose pura.

Condições experimentais

As condições experimentais mantidas constantes no decorrer da fermentação encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Condições experimentais

<i>Variável</i>	<i>Valor de referência</i>
Temperatura	30°C
pH	4.0
Velocidade de agitação	500 r.p.m.*
Arejamento	3.5 slpm

* Nalgumas experiências este valor foi reduzido a metade ao fim de 10-12 h, o que corresponde à introdução de uma perturbação no sistema.

3.5 Instalação experimental e equipamento informático

A Figura 3.2 (Ferreira, 1995) apresenta o esquema da instalação experimental desenvolvida para a produção semi-contínua de fermento de padeiro.

Na Tabela 3.3 apresentam-se as principais características dos vários equipamentos da instalação. Passa-se, de seguida, a referir em detalhe cada um dos equipamentos da instalação.

3.5.1 Fermentador e unidade de controlo digital

As fermentações descontínuas e semi-contínuas efectuem-se num fermentador BIOSTAT MD5 (B. Braun, Alemanha) com capacidade máxima de 5 litros, equipado com camisa de refrigeração, arejamento e motor de agitação. Dispõe, também, de sensores de temperatura, pH e oxigénio dissolvido.

O processo é monitorizado e controlado localmente por uma Unidade de Controlo Digital Directo (DCU-*Digital Control Unit*). Esta unidade permite controlar a temperatura do vaso de cultura, a velocidade de agitação, o caudal de arejamento, o pH e a tensão de oxigénio. Qualquer um destes ciclos de controlo contém um controlador tipo PID (Proporcional, Integral e Derivativo) funcionando em regulação ou em servo comando. Neste último caso, são permitidas variações em degrau ou em rampa. A actuação nos diversos elementos finais de controlo é, também, da sua responsabilidade através de unidades internas, nomeadamente a actuação das válvulas para adição de ácido e base no controlo de pH, no aquecimento/arrefecimento da água da camisa de controlo de temperatura, na velocidade de agitação e caudal de arejamento. Estes dois últimos permitem, através do controlo em cascata, o controlo da tensão de oxigénio dissolvido.

O fornecimento de ar ao fermentador é efectuado através de uma bomba de membrana instalada no DCU, a qual tem uma capacidade máxima de 3.5 slpm. O ar antes de ser aspirado pela bomba atravessa dois filtros em série: uma pedra porosa (75 μm) e uma membrana de forma a obter ar limpo de partículas e estéril. O caudal mássico de entrada é medido e regulado por um medidor/controlador Hi-Tec F201C-FB (Bronkhurst, Holanda) do tipo térmico (Cascetta e Vigo, 1988).

A calibração dos eléctrodos de pH e oxigénio dissolvido é realizada através da unidade de controlo digital.

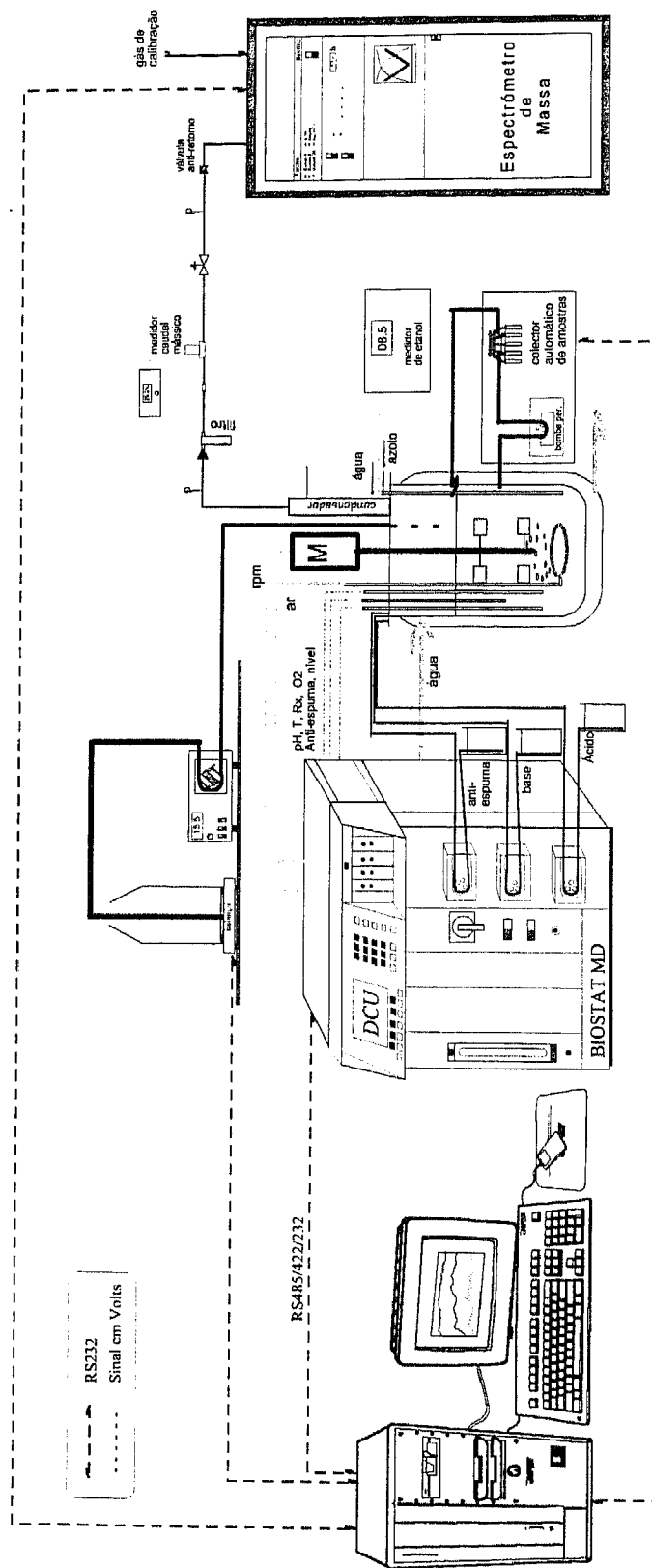


Figura 3.2 Esquema da instalação experimental

Tabela 3.3 Características do equipamento da instalação experimental

<i>Componente</i>	<i>Descrição</i>
Fermentador BIOSTAT MD5 (B. Braun, Alemanha)	vaso de cultura em vidro de boro-silicato; capacidade máxima 5 L
Agitação	veio de agitação com 3 impulsores de 6 lâminas cada; motor com potência de 55 W
Sonda de pH (INGOLD, Suíça)	eléctrodo combinado de vidro; medição electroquímica
Sonda de oxigénio dissolvido (INGOLD, Suíça)	tipo polarográfico; mede a pressão parcial (tensão) de oxigénio
Sonda de temperatura	Pt-100
Sistema de arejamento (alimentação de ar ambiente)	bomba de ar com membrana; filtro de 75 µm, medidor/controlador de caudal de ar; rotâmetro; filtro de membrana; anel difusor
Camisa de controlo da temperatura	bomba centrífuga para circulação de água; válvula solenóide; resistência eléctrica 600W
Controlo do pH	2 bombas peristálticas de velocidade constante; recipiente com ácido fosfórico; recipiente com amoníaco; controlador “tudo/nada”
Unidade de Medida e Controlo Digital DCU (B. Braun)	Sistema de microprocessador de VMEbus 16 bit; interface com o operador: consola com teclado e monitor LCD.
Sistema de alimentação de substrato: - Bomba 503U (Watson Marlow, RU) - Balança PM4800 (Mettler, Suíça)	bomba peristáltica de velocidade variável; balança com duas gamas: 0 - 1.00 kg, precisão 0.01 g; 1 - 4.0 kg, precisão 0.1 g
Tratamento do gás de saída	condensador; refrigerador de dupla serpentina do tipo Dimroth
Espectrómetro de massa BIOQUAD (Ledamass, Inglaterra)	analisador em-linha dos gases de saída do fermentador
Sensor de etanol em linha (MGS-5, Bionova, Suécia)	sonda e medidor
Colector automático de amostras (MX3 Biosampler, New Brunswick Scientific, EUA)	recolha automática de 12 amostras a tempos programados

O DCU permite a comunicação com um computador de monitorização através das portas série RS485 ou RS232. Assim, é possível o envio da caracterização da fermentação em termos das variáveis ambientais, temperatura, pH, oxigénio dissolvido. Por outro lado, o computador de monitorização pode actuar directamente no fermentador, nomeadamente nos valores de referência dos ciclos de controlo. As ligações do cabo de comunicação RS232 computador/DCU (porta *peripheral*) figuram na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Ligações do cabo de comunicação DCU/computador*

<i>DCU (9 pinos)</i>	<i>Computador (9 pinos)</i>
2 GND	5 GND
3 TXD	2 RXD
4 RXD	3 TXD
8 CTS	4 DTR
9 DTR	8 CTS

* As siglas em inglês significam: GND-ground, RXD-receive data, TXD-transmit data, CTS-clear to send, DTR-data terminal ready.

Os dados são transferidos entre DCU/computador segundo o princípio Mestre/Escravo, isto é, a transmissão de dados só pode ser iniciada pelo computador.

3.5.2 Sensor de Etanol

A medida em linha da concentração de etanol dissolvido é efectuada por um analisador contínuo para determinação de hidrocarbonetos voláteis: MGS-5 (Bionova Instruments, Huddinge, Suécia). O analisador detecta as moléculas de voláteis através de um semiconductor policristalino de óxido de estanho, o qual é selectivo à passagem de certos gases, nomeadamente de etanol (Mandenius *et al.*, 1983; Axelsson *et al.*, 1988). O MGS-5 utiliza uma membrana tubular de silicone (com cerca de 8 cm longitudinais) permeável aos gases para separar as moléculas do líquido. Dado que muitos voláteis tem uma pressão parcial relativamente elevada, vaporizam rapidamente, penetrando e passando através da membrana. A sua hidrofobicidade impede a água de a atravessar. Os microporos da membrana permitem um fluxo contínuo de moléculas dos voláteis a serem analisados.

O MGS-5 consiste em duas partes: a sonda, colocada numa das portas do fermentador, através da qual as moléculas do volátil a analisar são arrastadas; e o analisador propriamente dito, contendo os detectores e a electrónica para o controlo da medida a efectuar. A

concentração no líquido apresenta-se num visor, em percentagem, e é disponibilizada para o exterior num sinal de corrente ou tensão.

O analisador tem duas linhas de entrada de gases - uma para o gás de arrasto, azoto, à pressão relativa de 5 bar e a um caudal de 20 ml/min, outra para a entrada de ar comprimido cujo objectivo é ventilar o interior do analisador (o caudal de entrada é ajustado por uma válvula). Este deverá operar fechado de forma a que a temperatura se mantenha estável no seu interior. A função do gás de arrasto é transportar as moléculas de etanol do ponto de amostragem até à unidade de detecção e garantir que seja mantido um gradiente da pressão de vapor do etanol ao longo da membrana.

O princípio de funcionamento é o seguinte. O volátil a analisar é conduzido pelo gás de arrasto desde a sonda até ao analisador. Aí passa pelo detector de gás do tipo *Taguchi* (TGS 822, Figaro Eng. Inc., Japão) constituído por um cilindro de meio centímetro de um semiconductor policristalino de óxido de estanho aquecido a 250 °C. No MGS-5, a temperatura estável, o detector está envolvido numa atmosfera de azoto, apresentando uma resistência eléctrica relativamente elevada. Na presença de etanol, a resistência eléctrica diminui. Isto é devido à reacção química que ocorre entre o etanol e o óxido de estanho, ou seja, há doação de electrões da molécula de etanol para a molécula do óxido de estanho, o que dá origem a um aumento da condutividade eléctrica do semiconductor. Devido à temperatura elevada na superfície do detector a reacção com o etanol é rápida, e os produtos da reacção são rapidamente evaporados, dando lugar a novas moléculas de etanol a serem analisadas. O sinal eléctrico produzido é directamente proporcional à concentração de etanol no meio de fermentação.

Para cada utilização é necessária uma calibração do sensor com soluções padrão de etanol.

A Tabela 3.5 apresenta as especificações do analisador MGS-5.

Em caso de realização frequente de fermentações, e uma vez que a estabilização do analisador requer cerca de 10 horas e sendo baixo o consumo de azoto, aconselha-se a não desligar nem o analisador, nem o gás de arrasto.

Tabela 3.5 Especificações do analisador MGS-5

<i>Característica</i>	<i>Descrição</i>
Método	semicondutor policristalino
Gama de medida	0-50 g/l etanol
Precisão	± 3%
Tempo de resposta	aprox. 6 minutos
Gás de arrasto	azoto
Consumo de gás	6 kg por mês
Operação	contínua
Dimensão	380x300x155 mm
Peso	12 kg
Sinal eléctrico de saída	0-20 mA/0-10 V
Tensão	220/240 V
Detector	Figaro Engineering TGS 822
Ar de instrumentação	ar comprimido
Tempo de inicialização	30 minutos
Tempo de estabilização	10 horas

3.5.3 Espectrómetro de Massa

A aplicação de espectrometria de massa à análise de gases de fermentação tem vindo a revelar-se uma técnica de grande utilidade na quantificação dos componentes de uma mistura gasosa (Heinzle e Reuss, 1987; Heinzle, 1987; Heinzle e Dunn, 1991; Heinzle, 1992).

A composição dos gases de saída do fermentador é determinada por um espectrómetro de massa BIOQUAD (Ledamass, Inglaterra) do tipo quadripolo, com gama de massas de 200 Da (u.m.a.). O aparelho é constituído por um sistema de vácuo, um analisador de gás quadripolo e uma entrada capilar com possibilidade de aquecimento para evitar a condensação do gás. O vácuo é criado com auxílio de duas bombas rotativas e um bomba turbo-molecular. O analisador é constituído por um emissor de rádio frequência, fonte de alimentação, amplificador e unidade de controlo (designado *Satellite*).

O espectrómetro de massa é um equipamento que exige uma técnica de utilização e calibração rigorosa. No Apêndice A.3.4 referem-se em detalhe o princípio de funcionamento e os protocolos de utilização e calibração.

O espectrómetro é comandado por um programa comercial (*RGA for Windows*, versão 2.2) a correr num computador PC486 compatível, em ambiente *Microsoft Windows* (versão 3.1). O computador comunica com a unidade *Satellite* através da ligação série assíncrona, RS232C. O programa permite a selecção da válvula do canal a analisar, a configuração da leitura (precisão, velocidade de varrimento), a aquisição do espectro e sua representação gráfica (gráfico de barras, analógico, variação ao longo do tempo). As alturas dos picos do espectro são apresentadas proporcionalmente ao valor respectivo da pressão parcial (em Torr).

O *RGA for Windows* está preparado para comunicar com outros programas que corram em paralelo no mesmo computador. A troca de dados é feita através do protocolo padrão DDE (*Dynamic Data Exchange*). A comunicação com o programa *Monitor* é efectuada segundo este protocolo.

3.5.4 Recolha Automática de Amostras

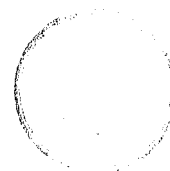
A instalação dispõe de um aparelho para recolha automática de amostras MX3 Biosampler (New Brunswick Scientific, Edison NJ, EUA) que permite a recolha de doze amostras em tempos pré-definidos. A amostragem é efectuada pela circulação contínua do meio de cultura do fermentador até ao colector e de volta ao fermentador, através de uma bomba peristáltica pertencente ao próprio aparelho. Na altura programada o meio de cultura é encaminhado para o frasco respectivo. O sistema é refrigerado pela passagem de um fluido criogénico (água com anti-congelante) bombeado de uma máquina de frio (Frigomix, B. Braun, Alemanha) e a temperatura controlada a -4°C .

A introdução dos tempos de amostragem e a activação do respectivo programa de execução é efectuada via consola e visualizada através de visor de sete segmentos.

O amostrador dispõe, também, de uma placa de comunicação série RS232, pelo que pode ser comandado por computador.

3.5.5 Balança/Bomba

A alimentação automática de substrato nas corridas semi-contínuas é efectuada através de uma bomba peristáltica de velocidade variável 503 U (Watson Marlow, RU).



A bomba é comandada por computador através de uma placa de aquisição AD/DA. A escolha do modo de funcionamento automático/manual, a inibição do painel frontal, o sentido de rotação da bomba e, finalmente o arranque/paragem da bomba, são efectuados por sinais digitais. A velocidade de rotação é imposta via sinal analógico em tensão ou em corrente. A Tabela 3.6 apresenta as ligações a efectuar e a identificação dos pinos respectivos.

Tabela 3.6 Ligações a efectuar na bomba para comando remoto

<i>Ligações</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tipo</i>
6-19	inibe botão frontal para definição de sentido de rotação	digital
9-21	permite actuação no botão de funcionamento manual no painel frontal	digital
14-17	velocidade de rotação	analógico (0-10 V)
5	sentido de rotação (1=sentido ponteiros do relógio)	digital
7	arranque/paragem (1=arranque)	digital
8*	automático/manual (1=automático)	digital

* Funciona em alternativa à ligação 9-21.

A actuação correcta na bomba necessita de uma calibração prévia com o tubo de circulação utilizado.

O matraz da alimentação de substrato está colocado numa balança PM4800 (Mettler, Suíça) com duas gamas: de 0 a 1.00 kg, com precisão de 0.01g e de 1 a 4.0 kg, com precisão 0.1 g. A quantidade de substrato adicionado ao fermentador é contabilizado por diferença de peso do matraz. Esta operação é efectuada por um computador central, ao qual a balança está ligada via porta série RS232.

As ligações do cabo de comunicação com o computador figuram na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 Ligações do cabo de comunicação Balança/computador

<i>Balança (15 pinos)</i>	<i>Computador (25 pinos)</i>
2 RXD	2 TXD
12 TXD	3 RXD
13 GND	7 GND

3.5.6 Computador central e placas de aquisição de dados

O 'cérebro' da instalação experimental é um computador PC486 compatível com 16 Mbytes de memória RAM. Neste computador corre o programa *Monitor*, responsável pela monitorização e controlo do processo (ver parágrafo 3.8).

A Tabela 3.8 apresenta as interfaces de aquisição de dados instalados no computador central.

Tabela 3.8 Interfaces de aquisição de dados.

<i>Placa</i>	<i>Marca</i>	<i>Modelo</i>
8 portas série RS232C	Advantech, Tailândia	PCL744
AD/DA com 8 entradas e 2 saídas analógicas e 16 entradas e saídas digitais	Advantech, Tailândia	PCL718
2 portas série COM1 e COM2	-	-
Rede Ethernet	Hewlett-Packard, EUA	EtherTwist

A placa PCL744 contém oito portas de comunicação série RS232, seleccionadas por programa. A placa dispõe de um suporte lógico de comunicações (*driver*), PCL744.dll (*Direct Link Library*), o qual permite a programação e troca de informação de um modo rápido e expedito. A esta placa estão ligados o DCU e a balança para comunicação com o computador através de protocolo próprio. O medidor de etanol e a bomba estão ligados ao computador via PCL718, através de sinais digitais e/ou sinais analógicos de 0-10 V. A placa de rede *Ethernet* tem como finalidade a eventual ligação futura a um computador de supervisão.

3.6 Medidas em linha

3.6.1 Variáveis ambientais

As variáveis ambientais, temperatura, pH, oxigénio dissolvido são registadas via unidade de controlo digital directo do fermentador (ver Apêndices A.3.1 e A.3.2 para descrição do processo de calibração das sondas de pH e oxigénio dissolvido).

3.6.2 Concentração de etanol

A concentração em linha de etanol é determinada pelo MGS-5 (ver parágrafo 3.5.2.). O sinal do medidor, em tensão, é convertido em concentração através de uma calibração prévia (ver Apêndice A.3.3 para descrição do processo de calibração).

3.6.3 Análise dos gases de saída

O gás de saída do fermentador atravessa um condensador de dupla serpentina do tipo *Dimroth* e um filtro para desumidificação, e é encaminhado para a válvula de entrada no espectrómetro (número 6).

De forma a garantir condições semelhantes quer na fase de calibração quer na de análise, essencial para se obter uma resposta linear por parte do aparelho (Drinkwine e Lichtman, 1973), os caudais e pressões dos gases em ambas as medições foram regulados manualmente de forma a minimizar as diferenças entre eles. Para isso, introduziu-se uma válvula de agulha (Nupro, EUA) na linha que vai desde a válvula de admissão no espectrómetro até à entrada capilar e um medidor de caudal mássico Hi-Tec F-111C-HA (Bronkhurst, Holanda).

No Apêndice A.3.4 apresenta-se uma descrição detalhada do processo de determinação e calibração dos gases de saída do fermentador.

3.7 Medidas em diferido

3.7.1 Concentração de biomassa

O modo de determinar a concentração de biomassa é por leitura de densidade óptica num espectrofotómetro (modelo 7850, Jasco) e respectiva correlação com o peso seco. A leitura é efectuada a 620 nm contra um branco com água. Normalmente, é necessário diluir a amostra para transpor a medição para a gama linear (0 a 0.9 unidades de absorvância).

No Apêndice A.4.1 apresenta-se uma descrição detalhada do protocolo de calibração.

3.7.2 Concentração de açúcares e etanol

A concentração de açúcares e etanol é determinada por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), usando um detector de índice de refração (830-RI, Jasco), um forno e

controlador de temperatura (Chrompack, Middelburg, Holanda) e uma bomba 880-PU (Jasco, Tóquio, Japão).

Utilizou-se inicialmente uma coluna Polyspher® CH CA (Merck, Darmstadt, Alemanha). Por dificuldade de operação (sobreposição de picos) ao fim de um certo número de análises, mudou-se para uma coluna Aminex® HPX-87N (Bio-Rad, Richmond, EUA). As condições de operação e protocolos de análise e calibração encontram-se no Apêndice A.4.2.

A medida em diferido de etanol funciona como comprovativo da medida em linha, sendo efectuada em simultâneo com a análise de açúcares.

3.8 Programa *Monitor*

3.8.1 Aspectos gerais

O programa *Monitor* corre num computador PC486 compatível, em ambiente *Microsoft Windows 3.1*. A linguagem de programação utilizada foi o *Microsoft Visual Basic 3.0* (versão profissional). É uma linguagem com estrutura modular, baseada em acontecimentos e caracterizada por objectos. Possui diversas funções pré-definidas, que permitem elaborar, com um esforço moderado, programas de fácil interacção com o utilizador. Numa posição crítica, pode apontar-se o facto de o modelo multi-tarefa cooperativo característico do *Windows* não constituir verdadeiramente um ambiente multi-tarefa. Esta questão poderá ser resolvida utilizando o *Windows NT* com a implementação da multi-tarefa. No entanto, e até ao momento, o programa *Monitor* assume a multi-tarefa do *Windows 3.1*, o que não afecta particularmente o controlo do processo.

O programa *Monitor*, desenvolvido pela autora para monitorização e controlo da produção de fermento padeiro (Oliveira *et al.*, 1994) engloba as seguintes funções tipo:

- aquisição de dados;
- interpretação de dados;
- controlo do processo.

Na designação aquisição de dados consideram-se as funções de entrada de dados em linha, análise e armazenamento dos mesmos em ficheiro, monitorização da fermentação em gráfico e/ou tabela, registo de alarmes de erro, entre outros.

Por interpretação de dados entende-se o conjunto de metodologias que, no essencial, têm como objectivo a observabilidade do estado e a estimativa das cinéticas características dos processos biotecnológicos.

No terceiro nível de funções encontra-se o módulo de controlo do processo, em que estão incluídas as técnicas clássicas (controlo Proporcional Integral e Derivativo) e as estratégias avançadas de controlo adaptativo.

3.8.2 Configuração

A configuração global do sistema é constituída por dois blocos de informação - i) o relacionado com o equipamento (ficheiros *confl.hdw* e *confl.int*), e ii) o bloco contendo a identificação e caracterização das variáveis utilizadas (ficheiro *confl.var*). Pretendeu-se, tanto quanto possível, que o programa desenvolvido não fosse específico de um sistema. Assim, os ficheiros *confl.hdw* e *confl.var* devem ser fornecidos pelo utilizador, através do sistema de gestão de bases de dados *Microsoft Access* para armazenar a informação em forma de tabelas. Na actualização dos ficheiros de configuração não é exigida ao operador um conhecimento profundo do *Access* mas apenas a sequência básica de operações para o realizar.

A configuração do equipamento, ficheiro *confl.hdw*, consiste, no essencial, na identificação completa dos periféricos utilizados, caracterizando todos os canais de comunicação de cada interface (por exemplo, parâmetros do protocolo série, resolução e gamas dos canais A/D e D/A). A configuração do equipamento contém, também, um ficheiro texto, o *confl.int*, com os comandos específicos do protocolo de comunicação do fermentador, da balança e do espectrómetro de massa.

A configuração das variáveis (ficheiro *confl.var*) abrange um número diverso de parâmetros, dependendo do tipo de variável em questão - variáveis medidas em linha, calculadas internamente ou de controlo. Para cada uma refere-se: i) o nome; ii) a designação; iii) unidade; iv) o tipo de variável; v) o equipamento e o canal de comunicação; vi) fórmula de cálculo para as variáveis determinadas internamente; vii) níveis de alarme; viii) períodos de amostragem e gravação; ix) especificação do traçado gráfico; x) calibração sinal/propriedade; xi) valor inicial da variável.

3.8.3 Acções

Os algoritmos de observação do estado e estimativa das cinéticas implementados em linha (chamados EDSO) encontram-se descritos em detalhe no capítulo 5. Para a identificação são necessárias as medidas de oxigénio e dióxido de carbono dissolvidos e os valores das respectivas taxas de transferência; estas últimas são calculadas internamente pelo programa. O valor da taxa de diluição é, também, necessário. As variáveis determinadas são, então, biomassa, glucose e etanol.

No bloco de controlo estão implementadas várias opções de funcionamento: experiências sem controlo automático, a caudal constante, a caudal programado, a diluição constante ou a diluição programada. Em experiências de controlo estão implementados o algoritmo clássico PID e o algoritmo de controlo adaptativo EDSO (ver capítulo 6).

A estrutura modular do programa permite, num futuro, a incorporação de novos blocos de funções, nomeadamente, aplicação de redes neuronais a identificação e a controlo.

3.8.4 Ficheiros da solução informática

Os ficheiros necessários à execução do programa e a respectiva função apresentam-se na Tabela 3.9.

No Apêndice A.5 apresentam-se detalhes da comunicação série com a unidade de controlo digital directo e com a balança, assim como os aspectos práticos de implementação dos três ficheiros de configuração.

Os dois últimos ficheiros da Tabela 3.9 dizem respeito a um pacote de rotinas comerciais. Este pacote de rotinas programado em *Microsoft Visual Basic, MicroHelp Muscle for Visual Basic/Windows 2.10* (MicroHelp, Inc., Georgia, EUA) permite a utilização de algumas funções não definidas pelo *Visual Basic*, nomeadamente a comunicação com a placa A/D e D/A e a análise e interpretação de funções definidas como texto em ficheiro.

Tabela 3.9 Ficheiros do pacote Monitor

<i>Programa</i>	<i>Instalação</i>	<i>Função</i>
<i>Monitor.exe</i>	directório de trabalho	programa principal
<i>confl.hdw</i>	directório de trabalho	ficheiro de configuração de equipamento
<i>confl.var</i>	directório de trabalho	ficheiro de configuração de variáveis
<i>confl.int</i>	directório de trabalho	ficheiro de configuração de equipamento
PCL744.dll	Windows\System	<i>driver</i> da placa de 8 portas série PCL744
PCL744.cnf	Windows\System	ficheiro da placa de 8 portas série PCL744
MUSCLE.VBX	Windows	pacote de rotinas
MHMU2.LIC	Windows	licença do pacote de rotinas

3.9 Procedimento experimental

A realização experimental do processo de produção de fermento de padeiro é constituída por várias etapas as quais deverão seguir uma metodologia. Apresenta-se neste capítulo uma referência breve aos passos a executar. No Apêndice A.2 referem-se em detalhe o procedimento e particularidades de cada fase do trabalho de operação laboratorial. No Apêndice A.3 apresentam-se os protocolos de calibração das medidas em-linha, nomeadamente, pH, oxigénio dissolvido, etanol dissolvido (utilizando o MGS-5) e gases de saída do fermentador. Em relação às medições em diferido, biomassa, açúcares e etanol dissolvido, apresenta-se no Apêndice A.4 os protocolos de calibração e operação.

3.9.1 Realização de uma fermentação

As etapas a executar na preparação e realização de uma experiência são:

Calibração das medidas em-linha

- Calibração dos eléctrodos de pH e O₂;
- Calibração do sensor de etanol;
- Calibração do espectrómetro de massa: medição da composição do ar e de gases de calibração de composição conhecida.

Preparação da fermentação

Esta fase diz respeito à preparação do inóculo, do meio inicial e do matraz de alimentação, à preparação do fermentador e do material auxiliar para a esterilização em autoclave.

Arranque da fermentação

Este ponto engloba as operações de inoculação do matraz, preparação, montagem e estabilização do fermentador e do equipamento auxiliar e posterior inoculação do fermentador. Contém, também, a programação do colector para a recolha automática de amostras.

Arranque do programa *Monitor*

Este ponto contém as operações de inicialização e preparação do programa *Monitor* para a implementação dos algoritmos de estimação do estado e das cinéticas e das técnicas de controlo a testar, assim como, a gravação em ficheiro.

Fim da fermentação

A fase final da fermentação consiste em desligar o fermentador, o equipamento auxiliar e o programa Monitor, assim como em analisar as amostras retiradas, medindo a concentração de biomassa, etanol e açúcares. As operações de lavagem do material e arrumação da bancada de trabalho também se incluem neste ponto.

3.9.2 Calibração das medidas em diferido

O procedimento bem como as curvas de calibração para a biomassa, para os açúcares e etanol encontra-se descrito em detalhe no Apêndice A.4.

3.10 Métodos para a determinação experimental do (K_La)

A determinação do valor do coeficiente global de transferência de massa para o oxigénio (K_La) de um fermentador é essencial para a avaliação da eficiência do arejamento e para quantificar o efeito das variáveis de operação no fornecimento de oxigénio. Descrevem-se, de seguida, alguns métodos experimentais para a sua determinação.

3.10.1 Método estático

Neste método, apresentado inicialmente por Wise (1951), desareja-se activamente o líquido, fazendo borbulhar azoto, e regista-se a descida na concentração de oxigénio dissolvido. Reactiva-se, depois, o arejamento e a agitação e segue-se a recuperação da concentração de oxigénio. O método é realizado apenas com meio de fermentação ou com meio de fermentação com biomassa inactiva (usam-se inibidores de respiração como a azida de sódio 5 mM).

A equação que segue a concentração de oxigénio dissolvido a partir do início do arejamento é:

$$\frac{dO}{dt} = K_L a (O^* - O) \quad (3.1)$$

Integrando a equação (3.1) entre 0 e t, correspondendo o instante 0 ao ponto em que se reinicia o arejamento e t ao tempo final da experiência, vem:

$$\ln\left(1 - \frac{O}{O^*}\right) = -K_L a \cdot t \quad (3.2)$$

em que:

O é a concentração de oxigénio dissolvido

O* é a concentração de saturação de oxigénio dissolvido

O traçado de $\ln\left(1 - \frac{O}{O^*}\right)$ em função do tempo é uma linha recta de declive $-K_L a$.

3.10.2 Método dinâmico

Taguchi e Humphrey (1966) utilizaram a actividade respiratória das células activas de modo a baixar o nível de oxigénio no fermentador antes de iniciar o arejamento.

Este método tem a vantagem de ser realizado durante uma fermentação, o que dá uma visão mais realista da eficiência do fermentador. O procedimento consiste na paragem do arejamento, o que implica numa diminuição na concentração de oxigénio dissolvido devido à respiração das células. Retoma-se o arejamento antes de se atingir a concentração crítica, O_{crit} (concentração abaixo da qual a taxa específica de consumo de oxigénio é limitada, o que se nota pela relação não linear da concentração com o tempo na fase de descida). A Figura 3.3 apresenta a evolução da concentração de oxigénio nesta técnica de análise. O

declive da linha A'B na Figura 3.3 é uma medida da taxa de respiração da cultura. Nesta zona:

$$\frac{dO}{dt} = Q_o X = \text{constante} \quad (3.3)$$

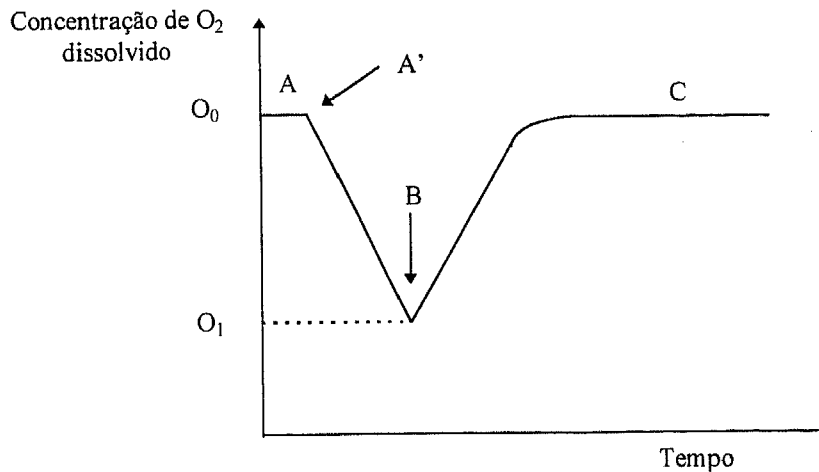


Figura 3.3 Determinação de K_LA pelo método dinâmico

Como a medição de oxigênio dissolvido é feita em minutos, a concentração de biomassa, X, não varia e a velocidade de consumo de oxigênio, Q_o, é constante.

Na zona de subida, BC, o aumento na concentração de oxigênio é devido ao balanço entre a taxa de transferência de oxigênio para a solução e o seu consumo pela células, ou seja:

$$\frac{dO}{dt} = K_L a (O^* - O) - Q_o X \quad (3.4)$$

Em estado pseudo-estacionário (zona A da Figura 3.3),

$$K_L a (O^* - O_o) = Q_o X \quad (3.5)$$

onde O_o representa a concentração de oxigênio em estado estacionário (no início e no fim da fermentação).

Substituindo esta equação na (3.4) e integrando vem

$$\ln\left(\frac{O_o - O}{O_o - O_1}\right) = -K_L a \cdot (t - t_1) \quad (3.6)$$

em que O_1 é a concentração de oxigénio no ponto B e t_1 representa o momento em que se reiniciou o arejamento.

Traçando o gráfico $\ln\left(\frac{O_0 - O}{O_0 - O_1}\right)$ em função de $(t - t_1)$ o declive da recta é o coeficiente global de transferência de massa.

O método dinâmico tem a vantagem de não interromper seriamente o metabolismo da biomassa. Em certos casos é bastante falível, nomeadamente, quando existe micélio ou polissacáridos, bolhas de ar podem ficar aderentes aos sólidos falseando a curva de descida do oxigénio dissolvido. Por outro lado, se houver um arejamento superficial significativo é necessário uma almofada de azoto na superfície livre do líquido.

3.10.3 Método dos balanços

É o método mais rigoroso, mas também mais caro no ponto de vista do equipamento exigido.

A técnica de análise consiste na determinação da concentração e caudal de oxigénio gasoso à entrada e à saída do reactor. A diferença, em massa, dá a quantidade de oxigénio transferida para o sistema, OTR .

O valor de $K_L a$ pode ser determinado, por

$$OTR = K_L a (O^* - O) \quad (3.7)$$

3.10.4 Correção no cálculo de $K_L a$

Ju e Sundararajan (1995) propõem uma correção ao cálculo do coeficiente global de transferência de massa, tomando em consideração o tempo de resposta do eléctrodo (τ_s). O valor de $(K_L a)'$, determinado experimentalmente pelo método dinâmico, é corrigido segundo a equação (3.8) para se obter o verdadeiro valor do coeficiente global, $K_L a$.

$$\frac{1}{(K_L a)'} = \frac{1}{K_L a} + \tau_s \quad (3.8)$$

O procedimento seguido consistiu em transferir rapidamente a sonda de uma solução isenta de oxigénio para o fermentador cheio de água destilada, estabilizado nas condições

de operação, e registar a evolução da medida de oxigénio. A constante de tempo do sensor é calculada pelo tempo que demora a atingir 63% do valor final da resposta (Seborg, 1991).

É recomendável que o eléctrodo tenha uma constante de tempo muito inferior ao $K_L a$.

3.10.5 Procedimento experimental

Tendo em vista as considerações do parágrafo anterior procedeu-se, inicialmente à determinação do tempo de resposta do eléctrodo de oxigénio utilizado.

Foram, seguidamente, determinados os valores de $K_L a$ em água e no meio de fermentação segundo o método estático.

No final realizaram-se diversas experiências, segundo o método dinâmico, a vários caudais de arejamento e velocidades de agitação.

Os resultados obtidos para o coeficiente global de transferência de massa encontram-se no capítulo 4.

3.11 Tabela geral de experiências efectuadas

A Tabela 3.10 identifica o conjunto de experiências seleccionadas para estudo no âmbito dos objectivos propostos neste trabalho. É indicado o capítulo (ou capítulos) em que os resultados são analisados.

De referir que, por uma questão de uniformização, os valores de produtividade e rendimento global foram calculados para 16.5 horas de operação, excepto para a EXPA07, cujo valor foi 17.5 horas. Este facto deveu-se à não existência de valores necessários ao cálculo dos indicadores acima referidos para o tempo escolhido.

Nas experiências EXPA05, EXPA06 e EXPA13 não se calcularam os indicadores, também neste caso por falta de informação. Esta última deveu-se a problemas ocorridos durante a fermentação, nomeadamente, mal funcionamento do amostrador automático, o que provocou a perda de amostras (EXPA05 e EXPA06), e o mau funcionamento da balança, que provocou o cálculo errado do volume do fermentador (EXPA13).

As corridas EXPE dizem respeito a fermentações em regime de alimentação de melaços.

Tabela 3.10 Tabela geral de experiências

Exp.	S inoc (g/l)	S meio (g/l)	S alim (g/l)	Fe (l/h)	Xo (g/l)	So (g/l)	EO (g/l)	V(O) (l)	tdesc (h)	X(O) (g/l)	S(O) (g/l)	E(O) (g/l)	tf (h)	X(tf) (g/l)	S(tf) (g/l)	E(tf) (g/l)	V(tf) (l)	X(16.5) (g/l)	S(16.5) (g/l)	E(16.5) (g/l)	V(16.5) (l)	Pród (g/l/h)	Rend (gX/gS)	Capitulo
EXPA01	30	5	15	Pgm				2.20	6.0	1.027	6.013	0.215	16.5	5.506	0.000	0.000	4.86	5.506	0.000	0.000	4.86	0.558	0.426	6
EXPA02	30	5	15	Pgm				2.20	6.0	0.671	1.756	1.833	16.5	5.396	0.000	0.175	4.95	5.396	0.000	0.175	4.95	0.556	0.449	6
EXPA04	30	5	15	Pgm				2.20	6.0	0.794	1.671	2.250	16.5	3.880	0.000	0.000	4.98	3.880	0.000	0.000	4.98	0.383	0.367	4,6
EXPA09	30	5	15	Pgm				2.20	6.0	0.578	1.102	2.040	16.5	2.701	0.000	1.714	4.87	2.701	0.000	1.714	4.87	0.270	0.275	6
EXPA03	30	5	25	0.15	0.726	3.260	1.780	2.20	3.0	1.755	0.112	4.119	16.5	7.452	0.000	2.044	4.62	7.452	0.000	2.044	4.62	0.766	0.492	6
EXPA05	25	5	25	EDSO				2.20	4.0	0.280	3.667	0.706	19.0											
EXPA06	25	5	25	EDSO	0.170	5.340	0.660	2.20	4.5	0.868	3.600	1.500	16.0											
EXPA07	25	2	25	EDSO	0.670	0.150	1.250	2.20	2.0	0.790	0.100	1.576	17.5	8.310	0.000	0.000	4.93	8.310	0.000	0.000	4.93	0.871	0.612	6
EXPA08	25	1	25	EDSO				2.20	2.0	0.201	0.030	0.558	19.5	7.672	0.000	0.495	4.26	5.067	0.000	0.622	3.50	0.809	0.438	5,6
EXPA11	30	2	25	EDSO				2.20	3.0	0.715	0.545	2.372	19.5	8.919	0.000	0.754	4.59	6.294	0.018	0.650	3.95	0.807	0.469	6
EXPA12	5	1	25	EDSO				2.20	2.0	0.167	0.597	1.383	21.0	5.626	0.000	0.556	4.00	5.795	0.000	0.445	3.60	0.887	0.489	6
EXPA10	25	1	25	PID				2.20	2.0	0.186	1.185	0.505	18.0	5.436	0.000	2.552	4.98	5.107	0.000	1.513	4.98	0.546	0.315	5,6
EXPA13	5	1	25	PID				2.20	3.0	0.319	0.000	1.150	16.5	2.302	0.118	4.707		2.302	0.118	4.707				
EXPA14	5	1	25	PID				2.20	3.0	0.557	0.000	1.280	17.5	8.590	0.000	0.709	4.98	7.631	0.000	0.708	4.75	0.832	0.467	6
EXPA15	5	1	25	PID				2.20	2.5	0.407	0.000	0.972	18.0	7.304	0.000	0.499	4.95	6.963	0.000	0.553	4.77	0.762	0.561	6
EXPA16	1	5	25	PID				2.20	2.5	0.410	0.050	0.937	16.5	7.602	0.000	0.782	4.78	7.602	0.000	0.872	4.78	0.832	0.301	6
EXP01	5	5	10	0.05	0.018	4.331	0.000	2.75	6.5	0.226	3.130	0.720	24.0	2.948	0.022	0.021	3.85	2.489	0.000	0.040	3.58	0.605	0.492	4
EXP02	5	5	25	0.1	0.021	4.465	0.000	2.75	7.0	0.254	2.985	0.637	21.0	4.641	0.000	0.096	4.85	4.165	0.000	0.155	4.40	0.647	0.356	4
EXPC01	25	10	25	0.1	0.050	2.414	0.239	3.30	4.0	0.297	1.276	0.810	18.0	6.411	0.027	1.786	4.65	4.843	0.025	1.627	4.57	1.009	0.466	4
EXPC02	30	5	50	0.12	0.217	4.967	0.628	2.75	6.5	1.201	1.463	2.273	19.5	11.434	0.000	0.721	4.23	9.209	0.000	0.889	4.06	1.577	0.331	4
EXPC03	50	5	100	0.15	0.202	4.335	0.818	2.75	6.5	1.545	0.292	2.933	18.0	7.173	0.020	16.163	4.89	6.484	0.053	13.304	4.72	0.811	0.106	4,5
EXPC04	30	50	5	0.15	0.202	38.507	0.843	2.75	6.5	1.400	25.443	3.800	18.0	3.750	1.922	7.930	4.70	4.040	0.096	6.108	4.51	0.495	0.175	4
EXPC05	30	5	50	0.15	0.242	4.379	0.612	2.75	6.3	0.380	1.534	1.948	18.0	4.870	0.000	2.080	4.95	7.320	0.000	2.454	4.75	1.022	0.264	4
EXPC06	30	5	25	0.15	0.155	4.830	1.021	2.75	6.2	1.455	0.000	1.896	19.5	6.644	0.000	0.042	4.70	5.336	0.000	0.071	4.50	0.693	0.323	4
EXPC07	30	22.8	0		0.222	21.000	0.330	2.75	17.0	0.222	21.000	0.330		3.180	0.002	6.709	2.75	3.180	0.002	6.709	2.75	0.179	0.141	4
EXP01																								4
EXPE02	2.5	0.52	13	0.15				2.20	3.0	0.365	0.036	0.311	16.5	6.125	0.000	0.000	4.00	6.125	0.000	0.000	4.00	0.798	0.735	4,5
EXPE01	2.5	0.52	13	EDSO				2.20	3.0	0.384	0.036	0.364	16.5	5.905	0.000	0.000	4.90	5.905	0.000	0.000	4.90	0.631	0.719	4,5,6
EXPE03	26.8	0.52	13	EDSO				2.20	5.0	1.433	0.000	1.440	16.5	7.367	0.048	0.000	4.98	7.367	0.048	0.000	4.98	0.731	0.707	4,5,6
EXPE04	2.5	0.52	13	EDSO				2.20	2.5	0.327	0.071	0.651	16.5	5.945	0.000	0.523	4.86	5.945	0.000	0.523	4.86	0.642	0.765	4,5,6

*EDSO - experiências com controle adaptativo linearizante; PID - experiências com controle proporcional

3.12 Bibliografia

- Axelsson, J., Mandenius, C., Holst, O., Hagander, P., Mattiasson, B. Experience in using an Ethanol Sensor to Control Molasses Feed-Rates in Baker's Yeast Production, *Bioprocess Eng.*, 3, 1-9, 1988.
- Cascetta, F., Vigo, P. *Flowmeters A Comprehensive Survey and Guide to Selection*, Instrument Society of America, North Carolina, 1988.
- Drinkwine, M.J., Lichtman, D. *Partial Pressure Analysers and Analysis*, American Vacuum Society, 1973.
- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Fiechter, A., Seghezzi, W. Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells. *J. Biotechnol.*, 27, 27-45, 1992.
- Heinzle, E. Mass Spectrometry for On-line Monitoring of Biotechnological Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 35: Biotechnology Methods*, (A. Fiechter, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1-45, 1987.
- Heinzle, E. Present and Potential Applications of Mass Spectrometry for Bioprocess Research and Control, *J. Biotechnology (Special Issue: High-Tech Analyses in Modern Biotechnology)*, 25:1/2, 81-114, 1992.
- Heinzle, E., Dunn, I.J., Methods and Instruments in Fermentation Gas Analysis. *Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2^a ed., (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), vol. 4: Measuring, Modelling and Control (K. Schügerl, Ed. vol.), VCH, Weinheim, cap.2, 27-74, 1991.
- Heinzle, E., Reuss, M. *Mass Spectrometry in Biotechnological Process Analysis and Control*, Plenum Press, New York, 1987.
- Ju, L., Sundararajan, A. The Effects of Cells on Oxygen Transfer in Bioreactors, *Bioprocess Engineering*, 13, 271-278, 1995.
- Locher, G., Hahnemann, U., Sonnleitner, B., Fiechter, A. Automatic Bioprocess Control. 4. A Prototype Batch of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 29, 57-74, 1993.
- Mandenius, C., Holst, O., Mattiasson, B. Monitoring of Ethanol in Production of Baker's Yeast using an Improved Membrane Gas Sensor, *Acta Chem. Scand., Ser. B.*, 37, 746-748, 1983.
- Münch, T., Sonnleitner, B., Fiechter, A. The Decisive Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle Behaviour for Dynamic Growth Characterization. *J. Biotechnol.*, 22, 329-352, 1992a.
- Münch, T., Sonnleitner, B., Fiechter, A. New Insights into the Synchronization Mechanism with Forced Synchronous Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 24, 299-314, 1992b.
- Oliveira, F., Ferreira, E.C., Feyer de Azevedo, S. Requisitos e Realização de uma Instalação Experimental para Estudos de Modelização e Controlo em Processos de Fermentação, *1^o Encontro Nacional de Controlo Automático - CONTROLO'94*, Vol. II, 71-76, Lisboa, 1994.
- Rieger, M., Kämpfli, O., Fiechter, A. The Role of Limited Respiration in the Incomplete Oxidation of Glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 653-661, 1983.
- Sonnleitner, B., Kämpfli, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 927-937, 1986.

Taguchi, H., Humphrey, A. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. *J. Ferm. Technol.*, 44 (12), 881-889, 1966.

Wise, W. The Measurement of the Aeration of Culture Media. *J. Gen Microbiol.*, 5, 167-177, 1951.

4. Modelização do processo de produção de fermento de padeiro

Sumário

Neste capítulo é apresentado um modelo matemático geral para o reactor semi-contínuo, bem como o modelo cinético.

Aplicou-se a metodologia ao processo de produção de fermento de padeiro. Através de programas elaborados pela autora testou-se o modelo teórico, efectuando um estudo tanto quanto possível exaustivo da produção de levedura.

Finalmente, apresentam-se os resultados experimentais obtidos em ciclo aberto, os quais são comparados com os obtidos com o modelo teórico de simulação. De forma a minimizar os desvios verificados entre eles procedeu-se a uma análise de sensibilidade heurística, seguida de estimativa de parâmetros e posterior validação experimental. Este processo foi aplicado às corridas em regime de alimentação de substrato puro e de melaços.

- 4.1 Introdução
 - 4.2 Classes de modelos macroscópicos
 - 4.3 Modelo determinístico
 - 4.4 Modelo matemático para a produção de fermento padeiro
 - 4.5 Cálculo da produtividade média e do rendimento global
 - 4.6 Simulação do sistema em ciclo aberto
 - 4.7 Análise experimental
 - 4.8 Conclusões
 - 4.9 Bibliografia
-

4.1 Introdução

Modelização é uma palavra chave nas áreas da Ciência e da Engenharia, em especial na Engenharia de Controlo. Nesta área a utilização de modelos tem como finalidade:

- a compreensão do processo em estudo;
- prever o comportamento de um processo;
- simular partes de um processo;
- o projecto do controlador.

Um modelo para simulação do processo pode basear-se em leis físicas (modelo físico) ou em equações matemáticas, não físicas (modelo de entrada-saída ou modelo de caixa negra).

Um modelo deverá ser simples mas robusto, ou seja, deverá existir um compromisso entre precisão e complexidade. Nos modelos físicos, o valor dos parâmetros utilizados deverá ser procurado na literatura ou, se possível, determinado experimentalmente. Nos modelos de caixa negra, modelo de entrada-saída, os parâmetros são identificados através de experiências devidamente projectadas.

Finalmente, e o mais importante, o modelo deverá ser validado com resultados experimentais.

4.2 Classes de modelos macroscópicos

A Tabela 4.1 resume as classes de modelos genericamente aceites, salientando o contraste entre cada classe (a que se chamou classe *rival*).

Na modelização de um reactor é importante salientar a existência de dois sistemas: o reactor no seu todo e o subsistema constituído pela biomassa, o qual pode ser visto como pequenos reactores dentro do reactor físico. Os fenómenos cinéticos, de transporte e dinâmicos do sistema biomassa são diferentes dos do sistema reactor (Kristiansen, 1993). A Figura 4.1 sumariza as diferentes aproximações e representações adoptadas para o sistema células/reactor (Bailey e Ollis, 1986).

Tabela 4.1 Classes de modelos

<i>Classe de modelos</i>	<i>'Classe rival'</i>
Determinístico	Estocástico
Descritivo	Preditivo
Contínuo no tempo	Discreto no tempo
Parâmetros concentrados	Parâmetros distribuídos
Não estruturado	Estruturado
Não-segregado	Segregado

Esta perspectiva, inicialmente apresentada por Tsuchiya *et al.* (1966), classifica os sistemas microbianos segundo o número de componentes da representação celular e se as células são ou não um conjunto heterogéneo de entidades distintas. Representações celulares com vários componentes designam-se *estruturadas*, contrariamente às representações com um só componente que são *não-estruturadas*. Neste último caso, as reacções que ocorrem no reactor são expressas em termos de concentrações externas, considerando em estado estacionário os valores intrínsecos da biomassa; pode dizer-se que é feita uma descrição macroscópica do sistema.

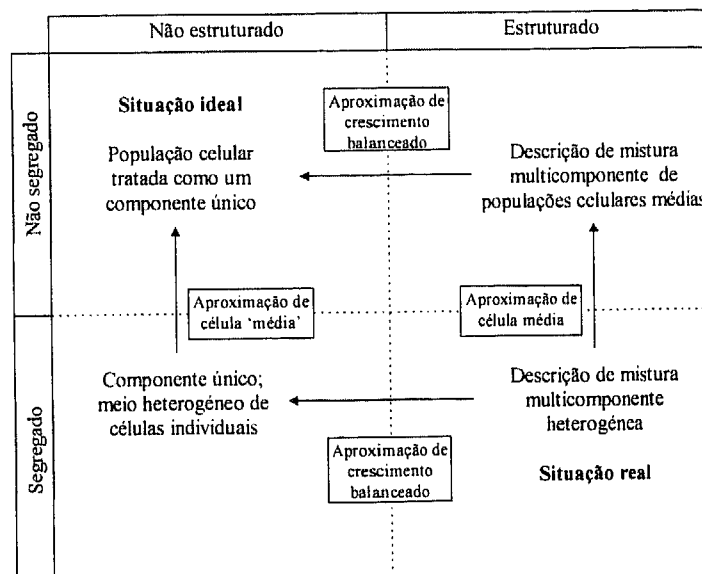


Figura 4.1 Diferentes perspectivas na modelização do crescimento de biomassa

Em qualquer ponto da fermentação existem células nos vários ciclos de vida, e no final aumenta a fracção de células completamente desenvolvidas. Os modelos *segregados* entram em linha de conta com estas considerações, o que, em estudos qualitativos específicos do fermento se torna particularmente importante. Em contrapartida, os *não-segregados*

assumem propriedades celulares médias, em que se assume que o crescimento total da biomassa não é afectado.

A situação real diz respeito a modelos segregados e estruturados. No entanto, no caso presente, adoptou-se a representação de sistema ideal, modelo não-segregado e não-estruturado, aliado à hipótese de sistema perfeitamente agitado.

4.3 Modelo determinístico

Os processos biotecnológicos que ocorrem num reactor são bastante complexos, envolvendo um elevado número de reacções e de espécies. Um modelo que pretenda descrever com todo o rigor estes fenómenos pode resultar numa descrição matemática demasiado complexa, a qual poderá não ser útil no ponto de vista do engenheiro de controlo. Assim, considera-se, no modelo adoptado, apenas as reacções e componentes relevantes no processo.

Modelo geral

O modelo determinístico para reactores biológicos com agitação perfeita, Figura 4.2, (assume-se composição homogénea de um componente no meio líquido) é obtido através de um balanço macroscópico aos componentes envolvidos num dado esquema reaccional e de um balanço global.

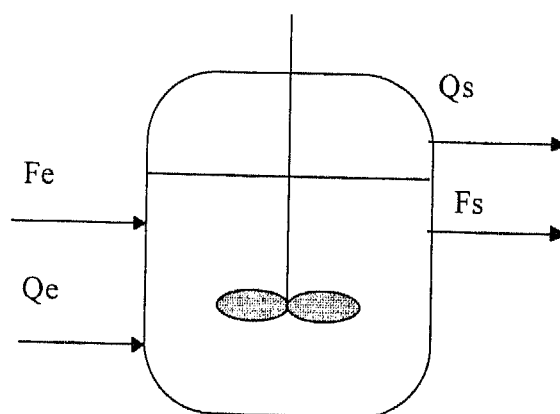


Figura 4.2 Reactor biológico perfeitamente agitado

A lei de conservação de massa inclui a análise quantitativa de dois fenómenos (eq.4.1):

- o fenómeno de transformação ou conversão (reacções químicas, bioquímicas e biológicas) de reagentes;
- o fenómeno de transporte/transferência de massa (convecção, difusão) por trocas de líquido e/ou de gás do reactor biológico com o ambiente (representado genericamente na eq.4.1 por *Entrada-Saída*).

$$ACUMULAÇÃO = CONVERSÃO + (ENTRADA - SAÍDA) \quad (4.1)$$

Para um dado esquema reaccional, composto por n componentes, o modelo é constituído por um sistema de $n+1$ equações diferenciais ordinárias (correspondentes à concentração de cada componente na fase líquida e à massa no fermentador). A dinâmica da concentração das variáveis de estado, ξ_i e a equação de balanço global, assumindo densidades constantes, podem ser, então, escritas da seguinte forma:

$$\frac{d\xi_i}{dt} = -r_i - D\xi_i + F_i - Q_i \quad i=1, \dots, n \quad (4.2)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_e - F_s \quad (4.3)$$

em que:

- ξ_i variável de estado (concentração do componente i);
- r_i velocidade de reacção do componente i (se i for reagente apresenta o sinal '+' e se for produto o sinal '-');
- F_i taxa de transferência mássica para a fase líquida (por unidade de volume de líquido no reactor), para o componente i ;
- Q_i taxa de transferência mássica da fase líquida para a fase gasosa (por unidade de volume de líquido no reactor), para o componente i ;
- D taxa de diluição (D^{-1} é o tempo de residência);
- F_e caudal volumétrico de entrada no reactor;
- F_s caudal volumétrico de saída do reactor.

A taxa de diluição é definida como a razão entre o caudal volumétrico de alimentação (F_e^{-1}) e o volume (V) de líquido no reactor:

¹ Chama-se a atenção do leitor para um detalhe de nomenclatura: F_i e o vector F designam taxas mássicas de transferência para a fase líquida e F_e e F_s designam, respectivamente, caudais volumétricos de entrada e saída do reactor.

$$D \equiv \frac{F_e}{V} \quad (4.4)$$

O termo r_i pode ser escrito de diversas formas conforme o conhecimento que se tenha das cinéticas em jogo.

Para o mesmo esquema reaccional com n componentes e m reacções e designando o termo r_i pelo somatório do produto da taxa de reacção j pelo coeficiente estequiométrico do componente i nessa reacção, ou seja, $\sum_{j \& i} (\pm) k_{ij} \varphi_j$, obtém-se:

$$\frac{d\xi_i}{dt} = \sum_{j \& i} (\pm) k_{ij} \varphi_j - D\xi_i + F_i - Q_i \quad i=1, \dots, n \quad j=1, \dots, m \quad (4.5)$$

em que

- k_{ij} coeficientes de rendimentos do componente i na reacção j ;
- φ_j taxa cinética da reacção j (por exemplo: velocidade de crescimento do microorganismo);
- $j \& i$ significa que o somatório é efectuado nas reacções de índice j envolvendo o componente de índice i .

A esta descrição dinâmica baseada num sistema de equações diferenciais não lineares na representação em espaço de estados, Bastin e Dochain (1990), adequadamente designaram *Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos*.

Os coeficientes k_{ij} são valores estritamente positivos. O termo correspondente apresenta o sinal “-” quando i é reagente e o sinal “+” quando i é produto da reacção. Estes coeficientes são adimensionais (unidades de massa de um componente por unidades de massa de outro componente) em consequência de se exprimir a velocidade de uma reacção em relação à velocidade de um componente, dito *nominal* (Bastin e Dochain, 1990) ou *normalizador* (Chen, 1992). Nessa reacção o coeficiente associado ao componente nominal é, obviamente, igual à unidade. Os componentes não intervenientes numa dada reacção apresentam coeficientes, naturalmente, nulos (zeros estruturais). A dimensão ($n \times m$) da matriz K é tal que n é maior ou igual a m , isto é, o número de componentes é igual ou superior ao número de reacções.

O modelo geral pode ser escrito usando a seguinte representação matricial (complementado pela eq 4.3 para a variação do volume do fermentador):

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi, t) - D\xi + F - Q \quad (4.6)$$

em que

- ξ vector de estado constituído pelas concentrações dos componentes $\xi^T = [\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_n]$;
 K matriz de coeficientes de rendimentos ou coeficientes estequiométricos $K = [k_{ij}]$;
 φ vector de taxas cinéticas das reacções $\varphi^T = [\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_m]$;
 F vector de taxas de transferência mássica para a fase líquida (por unidade de volume de líquido no reactor), $F^T = [F_1, F_2, \dots, F_n]$;
 Q vector de taxas de transferência mássica da fase líquida para a fase gasosa (por unidade de volume de líquido no reactor): $Q^T = [Q_1, Q_2, \dots, Q_n]$.

Nesta equação estão evidenciados os dois fenómenos físicos que ocorrem num reactor biológico:

- o termo $K\varphi$ descreve a cinética das reacções químicas, biológicas ou bioquímicas;
- os termos $-D\xi + F - Q$ descrevem a dinâmica dos fenómenos de transporte no reactor.

Vectores de transferência (F e Q)

A grande parte dos processos de fermentação são aeróbios, necessitando, portanto, da presença de oxigénio. Este último pode ser visto como um substrato adicional. A oxidação da glucose origina dióxido de carbono e água. Há, então, por um lado o consumo de oxigénio e por outro a produção de dióxido de carbono, o que implica trocas de massa entre a fase líquida e a fase gasosa.

Quando um substrato i está presente na corrente aquosa de alimentação do reactor, a taxa mássica de alimentação desse substrato (por unidade de volume de líquido no reactor) será directamente proporcional à concentração de substrato $S_{e,i}$:

$$F_i = DS_{e,i} \quad (4.7)$$

Se o substrato é fornecido por transferência da fase gasosa, é necessário incluir um termo representativo dessa transferência. A transferência de oxigénio da fase gasosa para a líquida é representada por OTR (*Oxygen Transfer Rate*).

A transferência de dióxido de carbono da fase líquida para a gasosa é referida como CTR (*Carbon Dioxide Transfer Rate*).

Modos de operação

O *Modelo Dinâmico Geral de Reactores Biológicos* é aplicável nas três situações particulares de operação de um reactor biológico: descontínuo, semi-contínuo e contínuo.

Na Tabela 4.2 (Ferreira, 1995) pode inferir-se o efeito do modo de operação do reactor nos caudais de alimentação e de saída de meio, no termo de acumulação, no volume de meio e na taxa de diluição.

Tabela 4.2 Influência do modo de operação de reactores biológicos no modelo dinâmico geral

<i>Variável</i>	<i>Modo Descontínuo</i>	<i>Modo Semi-contínuo</i>	<i>Modo Contínuo</i>
F_e	0	$F_e(t)$	$F_e(t) = F_s(t)$
F_s	0	0	$F_s(t) = F_e(t)$
dV/dt	0	$F_e(t)$	0
V	Constante	$V(t)^a$	Constante
D	0	$D(t) = F_e(t)/V(t)^b$	Constante

a. O volume de meio crescerá ao longo do tempo, tendo como limite superior a capacidade do reactor.

b. A taxa de diluição, D , poderá ser crescente, decrescente ou constante, dependendo do perfil de alimentação em substrato, isto é, da função $F_e(t)$.

4.3.1 Modelos cinéticos

A taxa de reacção é normalmente uma função complexa das condições de operação e do estado do processo. O vector das taxa cinéticas das reacções, $\varphi(\xi, t)$ na equação (4.6), significa que as taxas de reacção são variáveis no tempo e são funções não lineares do estado ξ . A modelização analítica desta função tem sido o objecto de estudo intensivo por vários investigadores.

Bastin e Dochain (1990) adoptaram uma formulação baseada no facto segundo o qual uma reacção só se realiza na presença de todos os reagentes, ou seja, se um reagente se esgotar a taxa de reacção será nula. Assim, propuseram a seguinte equação para a modelização das taxas de reacção:

$$\varphi_j(\xi, t) \equiv \rho_j(\xi, t) \left(\prod_{k \in J} \xi_k \right) \quad (4.8)$$

com

$$0 \leq \rho_j(\xi, t) \leq \rho_{\max} \quad (4.9)$$

e em que a notação $k\&j$ significa que a multiplicação Π é efectuada para os componentes (incluem os que possuem função autocatalítica, como é o caso da biomassa) de índice k que são reagentes na reacção j .

A função $\rho_j(\xi, t)$, denominada *taxa específica de reacção*, é um parâmetro desconhecido, variável no tempo, mas, em geral, com variação mais lenta que φ .

Definindo o vector ρ e a matriz $H(\xi)$ como se segue:

$$\rho^T = [\rho_1, \dots, \rho_m] \quad (4.10)$$

$$H(\xi) = \text{diag} \left\{ \prod_{j=1, \dots, m} \xi_k \right\}_{k\&j} \quad (4.11)$$

em que a notação “diag” é utilizada para representar matriz diagonal:

$$\text{diag} \left\{ \prod_{j=1, \dots, m} \xi_k \right\}_{k\&j} = \begin{bmatrix} \prod_{k\&1} \xi_k & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \prod_{k\&2} \xi_k & \dots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \prod_{k\&m} \xi_k \end{bmatrix} \quad (4.12)$$

O modelo dinâmico geral (4.6) é, deste modo, reescrito na seguinte forma:

$$\frac{d\xi}{dt} = KH(\xi, t)\rho(\xi) - D\xi + F - Q \quad (4.13)$$

No caso particular em que as taxas de reacção equivalem a taxas de crescimento microbiano, as cinéticas de crescimento dos microorganismos são normalmente traduzidas, em termos do vector φ , pela seguinte definição:

$$\varphi_j(\xi) \equiv \mu_j(\xi)X \quad (4.14)$$

em que

μ_j taxa específica de crescimento na reacção j ;
 X concentração dos microorganismos (biomassa).

A equação (4.14) traduz o facto de a cinética de crescimento ser directamente proporcional à concentração da biomassa. A taxa específica de crescimento é entendida como a variação da concentração de biomassa por unidade de tempo (taxa de crescimento) e por unidade de concentração de biomassa (proveniente do crescimento em cultura descontínua):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4.15)$$

A tradução matemática da dependência de μ com diversos factores (substrato, biomassa, produto, oxigénio dissolvido, metabolitos inibitórios, pH, temperatura, intensidade da luz, entre outros) tem originado os mais diversos modelos cinéticos. Bastin e Dochain (1990) dedicam um apêndice do seu livro a listar cerca de 50 modelos cinéticos que ilustram essas dependências.

A proposta de Monod (1942) para a modelização da taxa específica de crescimento é, talvez, a mais conhecida e utilizada pela comunidade científica das áreas de biotecnologia e microbiologia. Trata-se de um modelo determinístico, não-segregado e não-estruturado. Não prevê a fase de latência nem a fase de morte celular. Representa, unicamente, a dependência de μ com a concentração de um substrato limitante e tem a forma de uma equação hiperbólica de saturação semelhante a outras utilizadas em cinética enzimática e em fenómenos de absorção:

$$\mu(t) = \frac{\mu_{\max} S(t)}{k_m + S(t)} \quad (4.16)$$

em que

μ_{\max} taxa específica máxima de crescimento;
 k_m parâmetro de afinidade dos microorganismos ao substrato;
 S concentração de substrato.

4.4 Modelo matemático para a produção de fermento padeiro

Nos parágrafos seguintes apresenta-se o modelo matemático utilizado para a produção de fermento de padeiro, constituído pelas equações de balanço mássico ao reator, com a estrutura cinética e com as relações de transferência de massa adoptadas.

4.4.1 Equações cinéticas

O número de modelos cinéticos para o fermento de padeiro é considerável. Nielsen e Villadsen (1992, 1994) apresentam num artigo de revisão alguns dos modelos mais relevantes (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Modelos cinéticos mecanísticos para a *S. cerevisiae*.

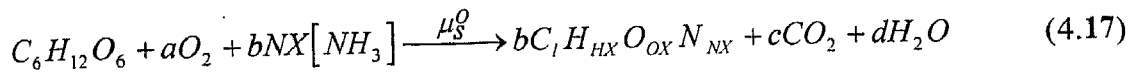
<i>Autor</i>	<i>Tipo de modelo</i>	<i>Observações</i>
Bijkerk e Hall (1977)	Modelo compartimental	Simples*
Pamment <i>et al.</i> (1978)	Modelo compartimental	Simples*
Barford e Hall (1981)	Estruturado metabolicamente	Simples*
Hall e Barford (1981)	Estruturado metabolicamente	Muito estruturado
Belgardt <i>et al.</i> (1982)	Estruturado metabolicamente	Simples*
Sonnleitner e Käppeli (1986)	Não-estruturado	Capacidade respiratória limitada
Sweere <i>et al.</i> (1988)	Não-estruturado	Capacidade respiratória limitada
Steinmeyer e Schuler (1989)	Modelo compartimental	Muito estruturado
Barford (1990a,b)	Estruturado metabolicamente	Simples*
Grosz e Stephanopoulos (1990a-c)	Estruturado metabolicamente	Simples*
Villadsen e Nielsen (1990)	Modelo compartimental	Simples*
Enfors <i>et al.</i> (1990)	Não-estruturado	Capacidade respiratória limitada

* Simples - apenas algumas variáveis intracelulares.

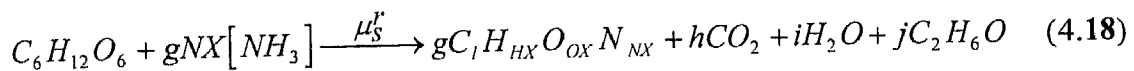
O modelo cinético de crescimento de fermento de padeiro utilizado neste trabalho é baseado no modelo apresentado por Sonnleitner e Käppeli (1986).

O crescimento de biomassa é caracterizado por três mecanismos principais e que ocorrem consoante as condições do meio de cultura:

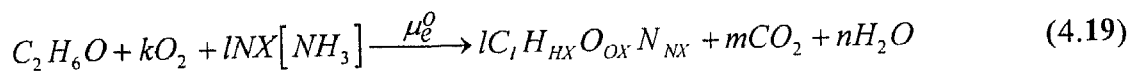
• crescimento oxidativo (respiratório) em glucose



• crescimento redutivo (fermentativo) em glucose



• crescimento oxidativo (respiratório) em etanol



Supõe-se que a fórmula química para a biomassa é $C_1H_{HX}O_{OX}N_{NX}$ e se mantém constante quer no crescimento em glucose, quer no crescimento em etanol. As respectivas taxas específicas de crescimento são identificadas por μ .

As vias metabólicas do crescimento oxidativo em glucose e etanol são governadas pela capacidade respiratória das células. Se a glucose estiver presente em pequena quantidade e houver oxigénio disponível no meio, ocorrerá apenas metabolismo oxidativo, sendo a glucose o substrato preferencial. Por outro lado, se o fluxo de glucose exceder a capacidade respiratória máxima, uma parte é catabolizado oxidativamente e o restante seguirá o catabolismo fermentativo, produzindo etanol. Neste caso não ocorre crescimento oxidativo em etanol. Esta situação corresponde ao estado respiro-fermentativo.

As equações cinéticas representativas do crescimento de fermento de padeiro, equações tipo Monod, são determinadas como se segue.

A taxa específica total de crescimento, μ , é obtida pela soma das três taxas referentes às três vias metabólicas acima mencionadas, ou seja,

$$\mu = \mu_s^o + \mu_s^r + \mu_e^o \quad (4.20)$$

Relacionando as taxas específicas de crescimento com os respectivos fluxos de substratos (glucose e etanol) e correspondentes coeficientes de rendimento, Y , (Tabela 4.6), vem:

$$\mu = Y_{x/s}^o q_s^o + Y_{x/s}^r q_s^r + Y_{x/e}^{oe} q_e^o \quad (4.21)$$

em que $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/s}^r$ representam os coeficientes de rendimento de biomassa em glucose nas fases oxidativa e redutiva, respectivamente, e $Y_{x/e}^{oe}$ é o coeficiente de rendimento de biomassa em etanol na fase oxidativa em etanol.

A utilização de etanol é influenciada pela prioridade do consumo de glucose, a qual funciona como inibidor. A taxa específica de crescimento em etanol pode ser expressa por:

$$\mu_e^o = \mu_e^{\max} \frac{E}{E + K_e} \frac{K_i}{S + K_i} \quad (4.22)$$

em que

- μ_e^{\max} taxa específica máxima de consumo de etanol
- K_e parâmetro de saturação
- K_i parâmetro de inibição
- E concentração de etanol
- S concentração de glucose

A utilização de glucose segue um processo diferente, pois existe consumo de glucose em duas vias metabólicas distintas. A taxa específica total de consumo de glucose, q_s , é, então dada por:

$$q_s = q_s^o + q_s^r \quad (4.23)$$

A taxa específica total de consumo de glucose, q_s , e a taxa específica de consumo de oxigénio, q_o , seguem uma cinética de Monod, respectivamente:

$$q_s = q_s^{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (4.24)$$

$$q_o = q_o^{\max} \frac{O}{O + K_o} \quad (4.25)$$

em que

- q_s^{\max} taxa específica máxima de consumo de glucose
- q_o^{\max} taxa específica máxima de consumo de oxigénio
- K_s, K_o parâmetros de saturação
- O concentração de oxigénio

Pela análise da equação (4.17), a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a glucose é aq_s , em que a é o coeficiente estequiométrico associado ao oxigênio. Duas situações podem ocorrer: existência de oxigênio em excesso, o que implica que a quantidade de oxigênio disponível no meio seja superior à necessária para oxidar q_s , havendo, então, lugar às vias oxidativas em glucose e em etanol (o crescimento fermentativo é nulo). Por outro lado, se o oxigênio disponível é inferior ao necessário para oxidar q_s , fica glucose em excesso no meio, dando lugar ao crescimento respiro-fermentativo em glucose (crescimento oxidativo em etanol é nulo).

A Tabela 4.4 traduz matematicamente o exposto. Em cada instante, ocorrem somente duas das três vias metabólicas apresentadas.

Tabela 4.4 Equações cinéticas do fermento de padeiro

$aq_s \leq q_o$	$aq_s > q_o$
<i>Regime Respirativo</i>	<i>Regime Respiro-Fermentativo</i>
$\mu_s^o = Y_{x/s}^o q_s$	$\mu_s^o = Y_{x/s}^o \frac{q_o}{a}$
$\mu_s^r = 0$	$\mu_s^r = Y_{x/s}^r (q_s - \frac{q_o}{a})$
$\mu_{e1}^o = \mu_e^{\max} \frac{E}{E + K_e} \frac{K_i}{S + K_i}$	
$\mu_{e2}^o = \frac{Y_{x/o}^{oc}}{Y_{x/e}^{oc}} (q_o - aq_s)$	
$\mu_e^o = \min (\mu_{e1}^o, \mu_{e2}^o)$	$\mu_e^o = 0$

Os valores dos parâmetros cinéticos utilizados (como referência) no presente trabalho, estão na Tabela 4.5 (Sonnleitner e Käppli, 1986).

Tabela 4.5 Parâmetros cinéticos

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>
q_s^{\max}	3.5 g glucose/(g biomassa.h)
q_o^{\max}	0.256 g oxigénio/(g biomassa.h)
μ_e^{\max}	0.17 h ⁻¹
K_e	0.1 g/l
K_i	0.1 g/l
K_s	0.2 g/l
K_o	0.0001 g/l
a	0.4142 g oxigénio/g glucose

4.4.2 Equações de balanço ao reactor

Por aplicação da formulação genérica de modelo dinâmico para a produção semi-continua de fermento de padeiro, em que a concentração de biomassa se designa por X, a de substrato por S, a de etanol por E, a de oxigénio por O e a concentração de dióxido de carbono por C, e que os coeficientes de rendimento (Y_i) são constantes e a dinâmica da fase gasosa pode ser desprezada, o balanço material, em termos de concentrações, pode ser escrito como:

$$\frac{dX}{dt} = -DX + (\mu_s^o + \mu_s^r + \mu_e^o)X \quad (4.26)$$

$$\frac{dS}{dt} = -DS + DS_c + \left(-\frac{\mu_s^o}{Y_{x/s}^o} - \frac{\mu_s^r}{Y_{x/s}^r}\right)X \quad (4.27)$$

$$\frac{dE}{dt} = -DE + \left(\frac{\mu_s^r}{Y_{x/e}^r} - \frac{\mu_e^o}{Y_{x/e}^{oe}}\right)X \quad (4.28)$$

$$\frac{dO}{dt} = -DO + OTR + \left(-\frac{\mu_s^o}{Y_{x/o}^o} - \frac{\mu_e^o}{Y_{x/o}^{oe}}\right)X \quad (4.29)$$

$$\frac{dC}{dt} = -DC - CTR + \left(\frac{\mu_s^o}{Y_{x/c}^o} + \frac{\mu_s^r}{Y_{x/c}^r} + \frac{\mu_e^o}{Y_{x/c}^{oe}}\right)X \quad (4.30)$$

e a equação adicional de balanço global, com $F_s=0$:

$$\frac{dV}{dt} = F = DV \quad (4.31)$$

Nas equações anteriores a variável S_e , na equação de balanço ao substrato, refere a concentração de açúcar na corrente de alimentação. OTR e CTR representam as taxas de transferência de massa para o oxigênio e o dióxido de carbono, respectivamente.

Utilizando a notação do *modelo dinâmico geral* apresentado no parágrafo 4.3, as cinco equações diferenciais ordinárias não lineares tomam a forma:

Modelo dinâmico para a produção de fermento de padeiro

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ E \\ O \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ -k_5 & 0 & -k_6 \\ k_7 & k_8 & k_9 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_s^o \\ \mu_s^r \\ \mu_c^o \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ E \\ O \\ C \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ DS_e \\ 0 \\ OTR \\ 0 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ CTR \end{bmatrix} \quad (4.32)$$

em que a correspondência de variáveis é:

$$\xi^T = [X \ S \ E \ O \ C] \quad (4.33)$$

$$K = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ -k_5 & 0 & -k_6 \\ k_7 & k_8 & k_9 \end{bmatrix} \quad (4.34)$$

$$F^T = [0 \ DS_e \ 0 \ OTR \ 0] \quad (4.35)$$

$$Q^T = [0 \ 0 \ 0 \ 0 \ CTR] \quad (4.36)$$

$$\varphi^T(\xi) = [\mu_s^o \ \mu_s^r \ \mu_c^o] X \quad (4.37)$$

Na Tabela 4.6 encontra-se a equivalência entre as variáveis Y e k referentes aos coeficientes de rendimento da cinética do fermento de padeiro e apresentam-se, também, os respectivos valores (Pomerleau e Perrier, 1990).

Tabela 4.6 Valores dos coeficientes de rendimento

<i>Coeficiente</i>	<i>1/Coeficiente</i>	<i>Valor</i>
$Y_{x/s}^o$	k_1	0.49 g biomassa/g glucose
$Y_{x/s}^r$	k_2	0.05 g biomassa/g glucose
$Y_{x/e}^r$	k_3	0.10 g biomassa/g etanol
$Y_{x/e}^{oe}$	k_4	0.72 g biomassa/g etanol
$Y_{x/o}^o$	k_5	1.20 g biomassa/g oxigénio
$Y_{x/o}^{oe}$	k_6	0.64 g biomassa/g oxigénio
$Y_{x/c}^o$	k_7	0.81 g biomassa/g dióxidoC
$Y_{x/c}^r$	k_8	0.11 g biomassa/g dióxidoC
$Y_{x/c}^{oe}$	k_9	1.11 g biomassa/g dióxidoC

4.4.3 Equações de transferência de massa

Na fermentações aeróbias, os substratos, glucose e oxigénio, deverão estar em solução antes de os microorganismos os puderem utilizar. O oxigénio é cerca de 6000 vezes menos solúvel em água que a glucose (Stanbury e Whitaker, 1984). Isto implica que não é possível fornecer à cultura o oxigénio necessário à respiração completa da glucose (ou outra fonte de carbono) de uma só vez. O oxigénio tem que ser fornecido durante a fermentação a uma taxa suficiente para satisfazer as necessidades do microorganismo. O meio mais económico, e normalmente usado, de o disponibilizar é o ar.

A quantificação da taxa de transferência gasosa é feita tendo em conta a aplicação e o equipamento disponível:

- em simulação genérica recorre-se a correlações da literatura, tanto quanto possível traduzindo a variação do K_La com as dimensões e tipo de fermentador, com o arejamento, a velocidade de agitação, e mesmo com a presença de biomassa;
- em simulação de um processo específico, para uma dada instalação experimental disponível, recorre-se a valores experimentais médios, obtidos em experiências independentes, ou ainda a correlações da literatura, sintonizadas ou não para o caso específico de cada trabalho;

- na realização experimental (incluindo monitorização e/ou controlo), e tendo equipamento disponível, é possível determinar o $K_L a$ por balanço à fase gasosa.

4.4.3.1 Correlações para os coeficientes globais de transferência de massa

Transferência de Oxigénio

A taxa de transferência de oxigénio da fase gasosa para a fase líquida pode ser escrita como:

$$OTR = \kappa_L^{O_2} a (O^* - O) \quad \text{Taxa de Transferência de Oxigénio I} \quad (4.38)$$

em que

- $\kappa_L^{O_2} a$ coeficiente global de transferência de oxigénio;
 O^* concentração de saturação de oxigénio dissolvido: 7.0 mg/l.

O valor da concentração de oxigénio é normalmente obtido, em processos de fermentação, pela utilização de sondas electroquímicas. Estas necessitam de calibração prévia, efectuada por imersão do eléctrodo num meio líquido em equilíbrio com uma fase gasosa com concentração conhecida.

O coeficiente global de transferência de oxigénio é uma medida da capacidade de arejamento do fermentador, ou seja, quanto maior o valor de $\kappa_L^{O_2} a$, maior a capacidade de arejamento do reactor. Existem na literatura várias correlações para o cálculo de $\kappa_L^{O_2} a$, traduzindo a dependência não só do arejamento, como também, do tamanho das bolhas de ar que atravessam o reactor, da agitação e da própria configuração do fermentador. Como adiante se verá (secção 4.7), a determinação destas correlações é difícil e de aplicabilidade limitada. Num estudo dedicado ao fermento de padeiro, Kristiansen (1993) sugere uma correlação para um reactor bem agitado, em que o valor de base de $(\kappa_L^{O_2} a)_o$, na ausência de biomassa, é dado por:

$$(\kappa_L^{O_2} a)_o = 3600 \left[0.026 \left(\frac{Pot}{V} \right)^{0.4} V_{gas}^{0.5} \right] \quad (4.39)$$

Nesta equação V é o volume do reactor (em m^3), V_{gas} é a velocidade linear do gás (em m/s) e Pot a potência de entrada (em W). Estes dois últimos são dados, respectivamente, por:

$$V_{gas} = \frac{4Q / 3600}{\pi D_r^2} \quad (4.40)$$

$$Pot = P_{no} \left(\frac{N}{3600} \right)^3 D_s^5 \rho \quad (4.41)$$

em que:

Q	caudal volúmico de gás (m^3/h)
D_r	diâmetro do reactor (m)
P_{no}	número de potência
N	velocidade de agitação (h^{-1})
D_s	diâmetro do agitador (m)
ρ	densidade do meio (kg/m^3)

Assim, D_r , D_s e P_{no} aparecem como parâmetros específicos do reactor, enquanto que Q e N dizem respeito às condições de operação. De referir que, P_{no} pode ser determinado através de correlações existentes na literatura (Foust *et al.*, 1960), dependendo da velocidade de agitação, do diâmetro do agitador, da potência fornecida, entre outros. No entanto, alternativamente, pode ser estimado por técnicas de regressão não-linear.

É bem conhecido (de estudos experimentais) o efeito da presença de biomassa e da temperatura na determinação do coeficiente global de transferência de massa, não havendo, no entanto, ainda, uma estrutura teórica de representação aceitável. Kristiansen (1993) sugere a utilização da seguinte relação:

$$K_L^{O_2} a = (K_L^{O_2} a)_o (1 + 0.07 X) 1.022^{T-293.15} \quad (4.42)$$

Transferência de dióxido de carbono

Em relação à taxa de transferência de dióxido de carbono, a modelização da transferência da fase líquida para a fase gasosa permite escrever a seguinte equação:

$$CTR = K_L^{CO_2} a (C - C^*)$$

Taxa de Transferência de Dióxido de Carbono I

(4.43)

com

$K_L^{CO_2}$ α coeficiente global de transferência de dióxido de carbono
 C^* concentração de saturação de dióxido de carbono na fase líquida

A determinação da concentração de dióxido de carbono dissolvido não é tão simples como no caso do oxigénio. O dióxido de carbono é cerca de 25 vezes mais solúvel em água que o oxigénio (Heinzle e Dunn, 1991). Além disso, o dióxido de carbono reage com a água segundo as reacções:



Pela avaliação das relações de equilíbrio (Jones e Greenfield, 1982) e em fermentações de levedura, a pH 4.0-5.5, pode considerar-se que o dióxido de carbono se encontra na forma CO_2 (aq.).

Dado que a membrana celular é relativamente impermeável às espécies iónicas, o dióxido de carbono produzido no interior da célula passa para o meio na forma de dióxido de carbono dissolvido.

Pela lei de Henry, a concentração de saturação de dióxido de carbono dissolvido pode ser relacionada com a pressão parcial externa de dióxido de carbono:

$$p_{CO_2} = C_G RT = C^* H_{CO_2} \quad (4.48)$$

em que

p_{CO_2} pressão parcial de dióxido de carbono
 C_G concentração molar de dióxido de carbono na fase gasosa
 R constante dos gases perfeitos
 T temperatura absoluta do sistema
 H_{CO_2} constante de Henry para o dióxido de carbono: 77 273 Pa m³Kg⁻¹ a 30 °C (Royce e Thornhill, 1991)

Royce e Thornhill (1991) sugerem uma relação entre os coeficientes de transferência de massa para o dióxido de carbono e para o oxigénio:

$$\frac{K_L^{CO_2} a}{K_L^{O_2} a} = \left(\frac{D_L^{CO_2}}{D_L^{O_2}} \right)^{2/3} = \left(\frac{2.0 \times 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}}{2.4 \times 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}} \right)^{2/3} = 0.89 \quad (4.49)$$

em que $D_L^{O_2}$ e $D_L^{CO_2}$ são as difusividades de fase líquida para o oxigénio e dióxido de carbono, respectivamente. Os valores de difusividade foram obtidos para a água a 25 °C (Incropera e de Witt, 1990). Apesar de os valores de difusividade serem função da composição e temperatura do meio, a sua razão é constante (Royce e Thornhill, 1991). Heinzle e Dunn (1991) sugerem a possibilidade de se poder considerar os dois coeficientes aproximadamente iguais.

As equações (4.38) e (4.43) foram utilizadas no programa de simulação (parágrafo 4.6) para calcular as taxas de transferência de massa do oxigénio e do dióxido de carbono, respectivamente.

4.4.3.2 Balanço à fase gasosa

O balanço mássico para o componente i , em fase gasosa a PTV constantes, considerando mistura perfeita na fase gasosa de um reactor biológico, isto é, sem variações espaciais de concentração, pode escrever-se:

$$V_G \frac{d\xi_{Gs,i}}{dt} = Q_e \xi_{Ge,i} - Q_s \xi_{Gs,i} - K_L^i a (\xi_{L,i}^* - \xi_{L,i}) V \quad (4.50)$$

em que

- V_G volume de fase gasosa (espaço fechado acima da fase líquida)
- V volume da fase líquida
- $\xi_{Ge,i}$ concentração mássica do componente i na corrente gasosa de entrada no reactor
- $\xi_{Gs,i}$ concentração mássica do componente i na corrente gasosa à saída do reactor
- $\xi_{L,i}$ concentração mássica do componente i no reactor (fase líquida)
- $\xi_{L,i}^*$ concentração mássica de saturação do componente i no reactor (fase líquida)
- $K_L^i a$ coeficiente global de transferência para o componente i
- Q_e caudal volumétrico de entrada de gás
- Q_s caudal volumétrico de saída de gás

Utilizando a Lei dos Gases Perfeitos a concentração (mássica) em fase gasosa, $\xi_{G,i}$, pode ser reescrita em função de:

- pressão parcial do componente i (p_i) e temperatura absoluta (T):

$$\xi_{G,i} = \frac{p_i M_i}{RT} \quad (4.51)$$

- pressão total (P), fracção molar do componente i (y_i) e temperatura absoluta:

$$\xi_{G,i} = \frac{P}{RT} M_i y_i \quad (4.52)$$

com M_i massa molar do componente i , R constante dos gases perfeitos.

Para o caudal volumétrico de gás em função do caudal molar, G , pode escrever-se:

$$Q = \frac{RT}{P} G \quad (4.53)$$

Substituindo estas duas últimas equações na equação (4.50), o balanço mássico a um componente na fase gasosa é reescrito na seguinte forma molar:

$$\frac{PV_G M_i}{RT} \frac{dy_{s,i}}{dt} = G_e y_{e,i} M_i - G_s y_{s,i} M_i - K'_{L,i} a (C_{L,i}^* - C_{L,i}) V \quad (4.54)$$

em que

- G_e caudal molar de entrada de gás
- G_s caudal molar de saída de gás
- $C_{L,i}^*$ concentração mássica de saturação na fase líquida para o componente i
- $C_{L,i}$ concentração mássica na fase líquida para o componente i
- $y_{e,i}$ fracção molar do componente i na corrente gasosa de entrada
- $y_{s,i}$ fracção molar do componente i na corrente gasosa de saída

Um modo de determinar o caudal de gás à saída do reactor é através do balanço de massa aos gases inertes, nomeadamente ao azoto, uma vez que não participam nas reacções e têm solubilidades em água muito baixas.

Assim, aplicando a equação (4.54) ao inerte, em que o termo de transferência é nulo e o de acumulação é desprezável, é possível estimar o caudal G_s , conhecendo-se G_e , e as composições do inerte à entrada e à saída:

$$G_s = G_e \left(\frac{y_{e,N_2}}{y_{s,N_2}} \right) \quad (4.55)$$

A equação de balanço (4.54), em estado estacionário, aplicada ao oxigénio resulta na equação seguinte:

$$OTR = K_L^{O_2} a (O^* - O) = \frac{G_e y_{e,O_2} M_{O_2} - G_s y_{s,O_2} M_{O_2}}{V} \quad (4.56)$$

Substituindo a equação (4.55), referente ao cálculo do caudal de gás à saída do reactor em função do de entrada e rearranjando vem:

<i>Taxa de Transferência de Oxigénio II</i>
$OTR = \frac{G_e y_{e,N_2} M_{O_2}}{V} \left(\frac{y_{e,O_2}}{y_{e,N_2}} - \frac{y_{s,O_2}}{y_{s,N_2}} \right) \quad (4.57)$

Seguindo um raciocínio análogo aplicado ao dióxido de carbono, obtém-se a seguinte equação:

<i>Taxa de Transferência de Dióxido de Carbono II</i>
$CTR = \frac{G_e y_{e,N_2} M_{CO_2}}{V} \left(\frac{y_{s,CO_2}}{y_{s,N_2}} - \frac{y_{e,CO_2}}{y_{e,N_2}} \right) \quad (4.58)$

As equações (4.57) e (4.58) foram utilizadas, respectivamente, na determinação experimental das taxas de transferência de massa de oxigénio e de dióxido de carbono, nos estudos em tempo real de observação do estado e de controlo (Capítulos 5 e 6). Ambas necessitam da medição da composição das correntes gasosas à entrada e à saída do reactor. Os valores típicos da composição do ar (seco) à entrada do reactor são:

- oxigénio, 20.98%;
- azoto, 78.04%;
- dióxido de carbono, 0.038%.

Aconselha-se, no entanto, a fazer uma medição da composição do ar à entrada do reactor, em cada realização de uma experiência.

4.4.3.3 Quociente Respiratório, RQ

Define-se RQ como a razão molar entre a taxa de produção de dióxido de carbono, CER , e a taxa de consumo de oxigénio, OUR , ou, aproximadamente, pela razão CTR , OTR :

$$RQ \equiv \frac{CER}{OUR} \frac{M_{CO_2}}{M_{O_2}} = \frac{CTR}{OTR} \frac{M_{CO_2}}{M_{O_2}} \quad (4.59)$$

Os valores de RQ próximos da unidade dizem respeito ao crescimento oxidativo; valores superiores referem-se à produção de etanol e valores inferiores a um significam utilização de etanol.

Alternativamente, e conhecidas as taxas cinéticas de crescimento pode calcular-se o RQ por:

$$RQ \equiv \frac{(k_7\mu_s^o + k_8\mu_s^r + k_9\mu_e^o) M_{CO_2}}{(k_5\mu_s^o + k_6\mu_e^o) M_{O_2}} \quad (4.60)$$

4.5 Cálculo da produtividade média e do rendimento global

Na operação semi-contínua de fermentadores calcula-se a produtividade média como a quantidade de biomassa produzida por unidade de tempo e por unidade de volume adicionado, a saber:

$$\text{Prod} = \frac{X_f V_f - X_o V_o}{(V_f - V_o) t_f} \quad (4.61)$$

em que o índice o diz respeito ao início da fermentação e o índice f às condições finais da mesma.

O rendimento global de biomassa relativamente ao substrato é calculado por:

$$\text{Rend} = \frac{X_f V_f - X_o V_o}{\int_0^f FS_e dt + S_o V_o - S_f V_f} \quad (4.62)$$

4.6 Simulação do sistema em ciclo aberto

4.6.1 Quadro de simulações

O programa *Opt*

Desenvolveu-se um programa de simulação do processo de produção de fermento de padeiro (programa *Opt*, Apêndice 6) em *Fortran77*, num computador *Vax 6520/2VP*, com sistema operativo *Ultrix V4.2*.

O programa *Opt* permite, em alternativa, a simulação do processo e a estimativa de parâmetros. Ambas são efectuadas segundo perfil pré-definido de alimentação de substrato, isto é, corridas a caudal constante, a diluição constante ou combinação de evolução (de caudal ou de taxa de diluição) constante e exponencial e, finalmente, perfil de alimentação introduzido por ficheiro.

Simulações efectuadas

Com o programa *Opt*, correndo na opção simulação, efectuou-se um estudo tanto quanto possível exaustivo do processo de crescimento de fermento de padeiro (Tabela 4.7).

Estudou-se a influência em ciclo aberto de uma variação no caudal de alimentação, na concentração de glucose na referida corrente e também no coeficiente global de transferência de massa.

Este estudo teve como objectivo o conhecimento do comportamento do fermento de padeiro face a perturbações externas decisivas no crescimento da biomassa, concretamente situações de estudo em que se altera a disponibilidade no meio dos dois substratos necessários ao processo de fermentação - glucose e oxigénio. Pensou-se que a variação da concentração de substrato na corrente de alimentação (a nível industrial corresponde à utilização de diferentes tipos ou diferentes lotes de melaços) e a variação do coeficiente global (em termos experimentais corresponde a uma alteração do caudal de arejamento e/ou velocidade de agitação) eram as mais significativas. A variação do caudal de alimentação, também analisada, teve como finalidade o estudo da influência dessa alteração nas variáveis de estado. As alterações foram efectuadas às 5, 10 e 15 horas, com variações de $\pm 50\%$.

Tabela 4.7 Quadro resumo das simulações efectuadas

<i>Simulação</i>	<i>Alteração</i>	<i>Tipo</i>	<i>Ocorrência</i>	<i>Referência</i>
1	F	+ 50 %	5 h	F5+
2	F	+ 50 %	10 h	F10+
3	F	+ 50 %	15 h	F15+
4	F	- 50 %	5 h	F5-
5	F	- 50 %	10 h	F10-
6	F	- 50 %	15 h	F15-
7	Se	+ 50 %	5 h	S5+
8	Se	+ 50 %	10 h	S10+
9	Se	+ 50 %	15 h	S15+
10	Se	- 50 %	5 h	S5-
11	Se	- 50 %	10 h	S10-
12	Se	- 50 %	15 h	S15-
13	$K_L a$	+ 50 %	5 h	K5+
14	$K_L a$	+ 50 %	10 h	K10+
15	$K_L a$	+ 50 %	15 h	K15+
16	$K_L a$	- 50 %	5 h	K5-
17	$K_L a$	- 50 %	10 h	K10-
18	$K_L a$	- 50 %	15 h	K15-

Condições da simulação

Nas corridas efectuadas simularam-se 20 horas de operação, partiu-se de um volume de 2 l e utilizaram-se os parâmetros da literatura (para os parâmetros cinéticos, Tabela 4.5 e para os coeficientes de rendimento, Tabela 4.6). Os valores de base para a concentração de glucose na corrente de alimentação foram de 30 g/l, e para o coeficiente global de transferência de massa para o oxigénio de 100 h^{-1} . As condições iniciais para as variáveis de estado encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 Valores iniciais das variáveis de estado

$X \text{ (g/l)}$	$S \text{ (g/l)}$	$E \text{ (g/l)}$	$O \text{ (g/l)}$	$C \text{ (g/l)}$
0.3	1.3	0.8	0.0066	0.002

4.6.2 Variação positiva no caudal de alimentação de substrato

Na Figura 4.3 apresentam-se os perfis comparativos de biomassa, glucose, etanol e oxigénio para simulações a caudal constante de 0.12 l/h (*Fref1* no gráfico) e simulações com variação de +50% às 5, 10 e 15 horas. O perfil da glucose (b) é semelhante nas quatro situações bem como o da biomassa (a), sendo de referir que neste último caso, a caudal constante se obtém uma concentração final ligeiramente inferior (cerca das 18 horas esgotou-se o etanol). As grandes diferenças verificam-se no perfil do etanol (c), onde com o aumento do caudal há maior produção de etanol. Nas primeiras quatro horas, verifica-se o regime respiro-fermentativo, isto é, a glucose, o substrato preferencial, é utilizada no crescimento da biomassa e, como está em excesso, é utilizada, também, na produção de etanol. Cerca das seis horas a concentração de glucose no meio é quase nula, de modo que se verifica também consumo de etanol - regime oxidativo. Como o perfil de oxigénio é idêntico nas quatro situações (d), uma variação positiva no caudal de alimentação de substrato, o que implica um aumento da quantidade de glucose na corrente de alimentação, dá origem à produção de etanol. Na simulação com o aumento de caudal às 5 horas atingiu-se o volume máximo do fermentador, 5 l, cerca das 18.5 horas, parando-se, portanto a alimentação. Assim, a partir desta altura verificou-se um consumo de etanol superior - declive mais acentuado na Figura 4.3-c.

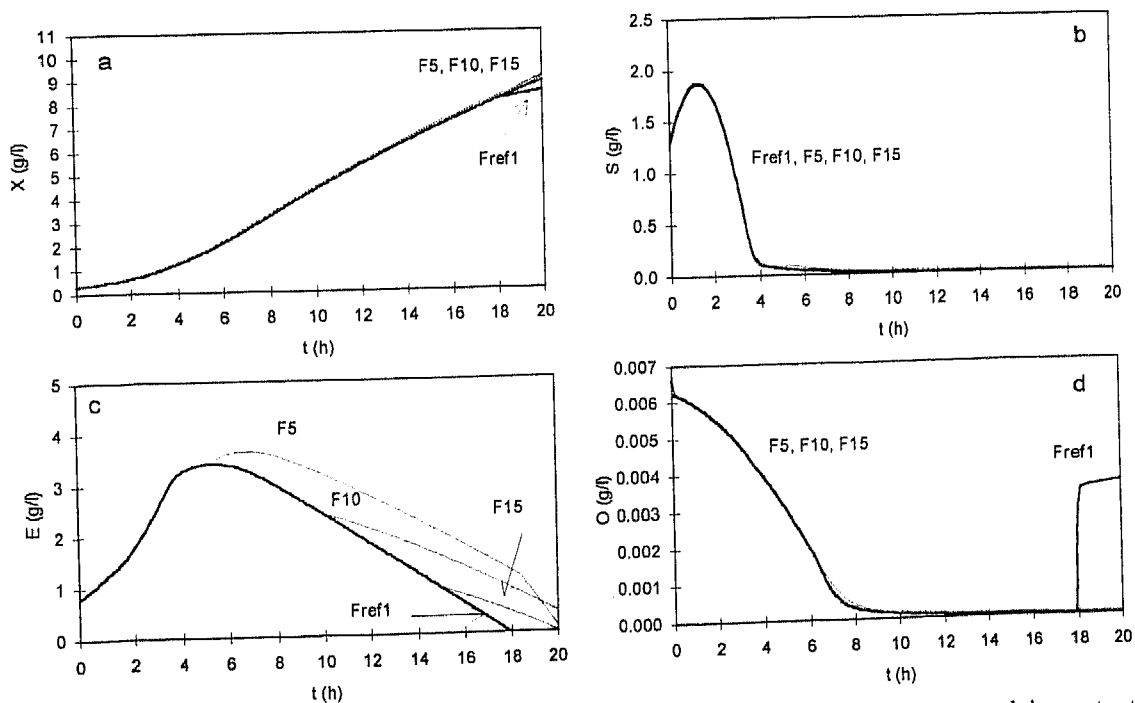


Figura 4.3 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (*Fref1*) e corridas com variação de +50% no caudal de alimentação às 5, 10 e 15 horas.

4.6.3 Variação negativa no caudal de alimentação de substrato

Na Figura 4.4 apresentam-se os perfis de biomassa, glucose, etanol e oxigénio em corridas análogas às anteriores mas com variações de -50% no caudal. A análise dos resultados obtidos nesta situação é inversa à apresentada anteriormente, isto é, uma diminuição do caudal de alimentação (equivalente a existirem menores quantidades de glucose na corrente de alimentação), e para uma capacidade respiratória idêntica ao caso anterior, faz com que o etanol seja consumido mais rapidamente - regime respiratório. A partir do momento em que a concentração de etanol é nula, a quantidade de oxigénio no meio aumenta e a taxa de crescimento de biomassa diminui (declive menos acentuado nos perfis da Figura 4.4-a). De referir que o modelo teórico adoptado não contém um termo de morte de biomassa.

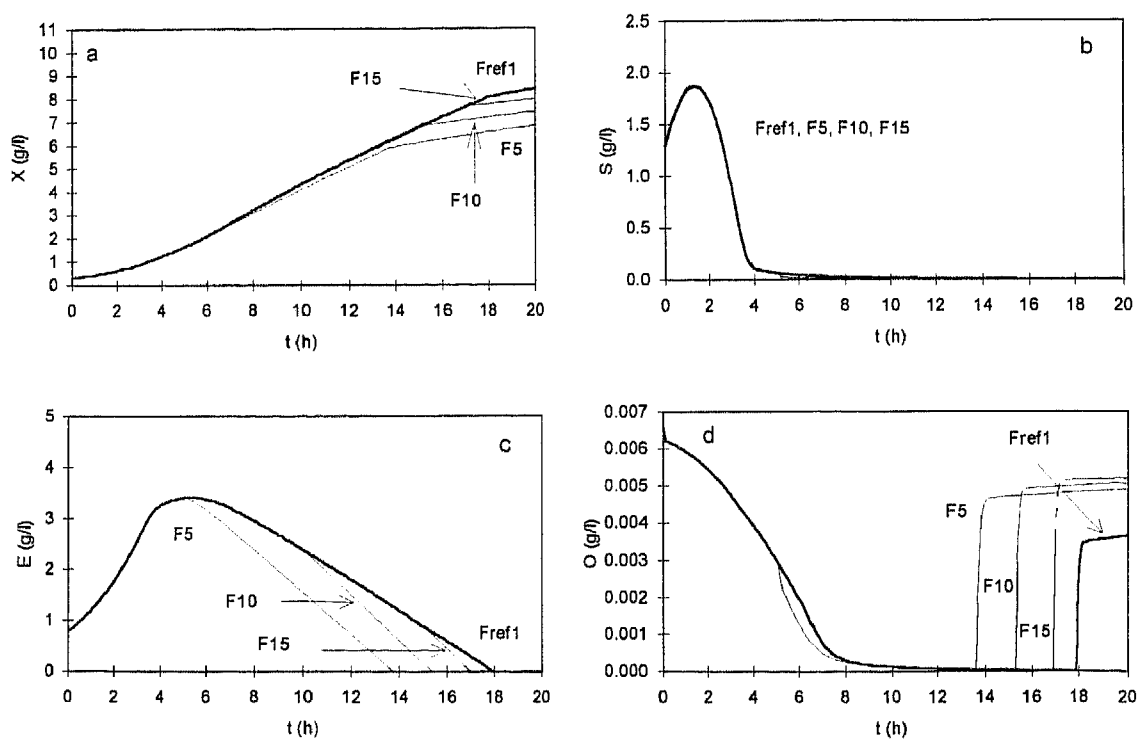


Figura 4.4 Perfis de a) biomassa , b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (Fref1) e corridas com variação de -50% no caudal de alimentação às 5, 10 e 15 horas.

4.6.4 Variação positiva na concentração de glucose na alimentação

Na Figura 4.5 apresentam-se os resultados obtidos nas corridas a caudal constante de 0.15 l/h mas com variação de +50% na concentração de glucose na corrente de alimentação às 5, 10 e 15 horas (traça-se, também, para comparação a corrida referência sem introdução de perturbações - *Fref2* no gráfico). Os perfis obtidos apontam para uma análise análoga à efectuada nas simulações com aumento do caudal de alimentação. De facto, as duas situações são semelhantes pois ambas correspondem a um aumento da quantidade de glucose no meio.

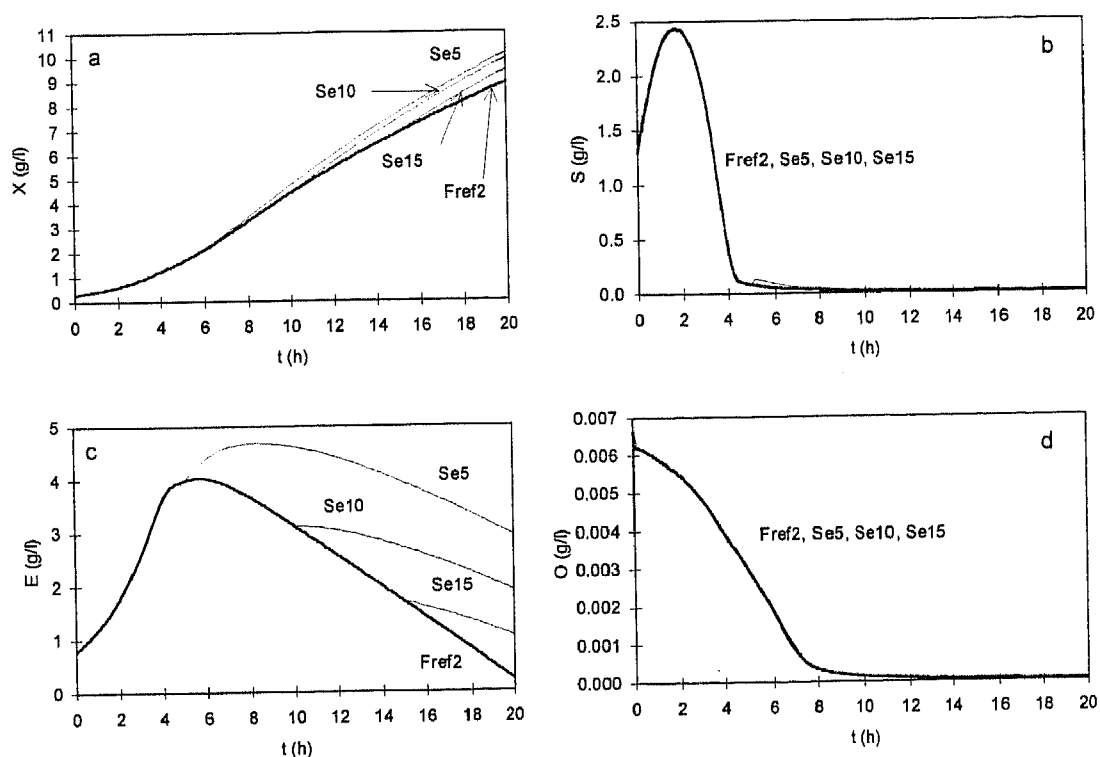


Figura 4.5 Perfis de a) biomassa , b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (*Fref2*) e corridas com variação de +50% na concentração de glucose na corrente de alimentação às 5, 10 e 15 horas.

4.6.5 Variação negativa na concentração de glucose na alimentação

Na Figura 4.6 apresentam-se os resultados obtidos nas corridas (caudal constante de 0.15 l/h) com variação de -50% na concentração de glucose na corrente de alimentação às 5, 10 e 15 horas (traça-se, também, para comparação a corrida referência sem introdução de perturbações - *Fref2* no gráfico). Os perfis obtidos apontam para uma análise análoga à efectuada nas simulações com diminuição do caudal de alimentação. De facto, também neste caso, as duas situações são semelhantes pois ambas correspondem a uma diminuição da quantidade de glucose no meio.

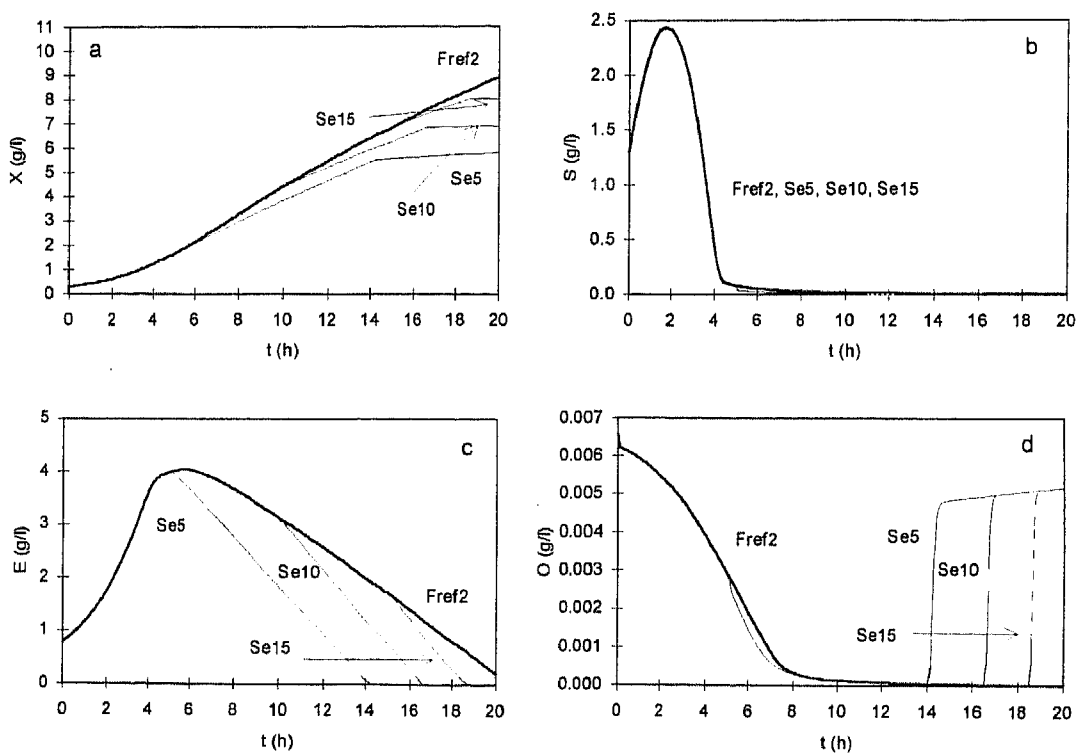


Figura 4.6 Perfis de a) biomassa , b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (*Fref2*) e corridas com variação de -50% na concentração de glucose na corrente de alimentação às 5, 10 e 15 horas.

4.6.6 Variação positiva no coeficiente global de transferência de massa

Na Figura 4.7 apresentam-se os resultados obtidos nas corridas (caudal constante de 0.15 l/h) com variação de +50% no coeficiente global de transferência de massa (valor de base 100 h^{-1}) às 5, 10 e 15 horas (traça-se, também, para comparação a corrida referência sem introdução de perturbações - *Fref2* no gráfico). Esta variação altera a quantidade de oxigênio disponível no meio, ou seja, aumenta a capacidade respiratória das células. Assim, como existe oxigênio em excesso é possível ocorrer consumo de etanol, o que implica um crescimento mais rápido da biomassa (Figura 4.7-a). No entanto, a concentração final de biomassa é análoga nas quatro situações uma vez que nas três corridas de variação do coeficiente global o etanol esgota-se, provocando uma diminuição da taxa específica de crescimento de biomassa (Figura 4.7-a).

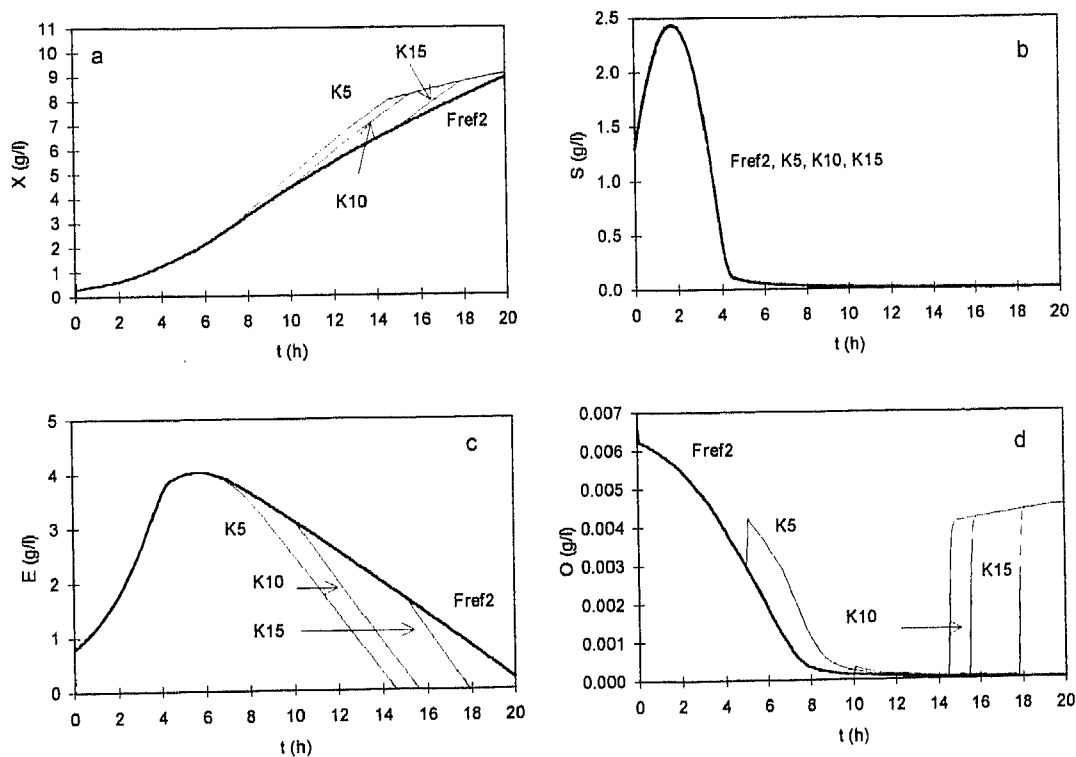


Figura 4.7 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigênio para corridas a caudal constante (*Fref2*) e corridas com variação de +50% no coeficiente global de transferência de massa às 5, 10 e 15 horas.

4.6.7 Variação negativa no coeficiente global de transferência de massa

Na Figura 4.8 apresentam-se os resultados obtidos nas corridas (caudal constante de 0.15 l/h) com variação de -50% no coeficiente global de transferência de massa (valor de base 100 h^{-1}) às 5, 10 e 15 horas (traça-se, também, para comparação a corrida referência sem introdução de perturbações - *Fref2* no gráfico). Esta situação é inversa à anterior, ou seja, diminui a quantidade de oxigénio disponível no meio. Assim, não existe oxigénio suficiente no meio para ocorrer consumo de etanol, o que implica haver um aumento da concentração de etanol e, portanto, um crescimento menor da biomassa (Figura 4.8-a).

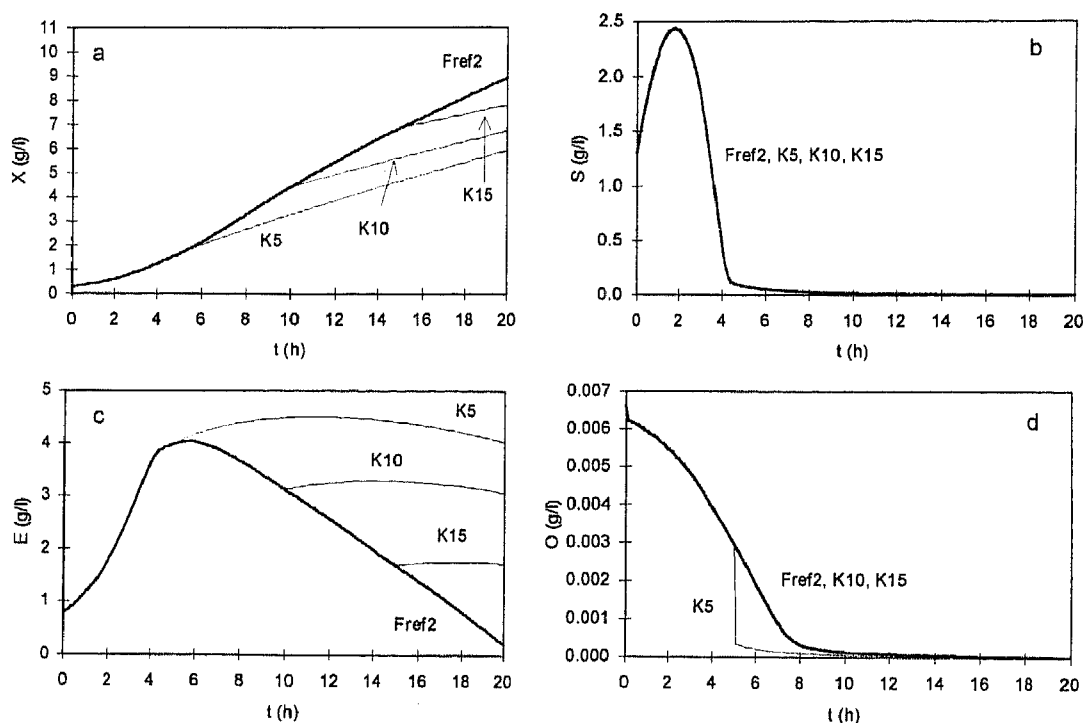


Figura 4.8 Perfis de a) biomassa , b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para corridas a caudal constante (*Fref2*) e corridas com variação de -50% no coeficiente global de transferência de massa às 5, 10 e 15 horas.

4.6.8 Valores de produtividades e rendimentos nas corridas de simulação

As Figura 4.9 e Figura 4.10 apresentam, respectivamente, os valores de produtividade média e rendimento global obtidos nas situações de caudal variável e nas situações de alteração da concentração de glucose na corrente de alimentação e do coeficiente global de transferência de massa. Pela análise das figuras é de concluir que a alteração do caudal de alimentação não altera fortemente os valores de produtividade nem os de rendimento global, o mesmo não se podendo afirmar para os dois outros casos de estudo. As variações na concentração de glucose na corrente de alimentação afectam estes dois valores de modo

inverso, isto é, se por um lado um aumento da concentração de glucose implica um aumento da produtividade, uma vez que existe mais substrato disponível no meio, implica por outro lado uma diminuição no rendimento global (razão biomassa produzida/glucose consumida), pois a glucose em excesso é utilizada também na produção do outro substrato, etanol. Em relação à variação do coeficiente global de transferência de massa uma diminuição do seu valor implica valores baixos quer para produtividade quer para o rendimento, em virtude de não haver oxigénio disponível no meio para o processo respiratório ocorrer. Assim, a glucose existente é utilizada na produção de etanol (rendimento inferior) e o crescimento da biomassa é mais lento (menor produtividade). Os valores agravam-se para perturbações que ocorram mais cedo. No caso das variações positivas, como existe oxigénio disponível ocorre consumo total de etanol, originando concentrações finais de biomassa idênticas. Deste modo, os valores de produtividade e rendimento global não sofrem significativamente com esta alteração.

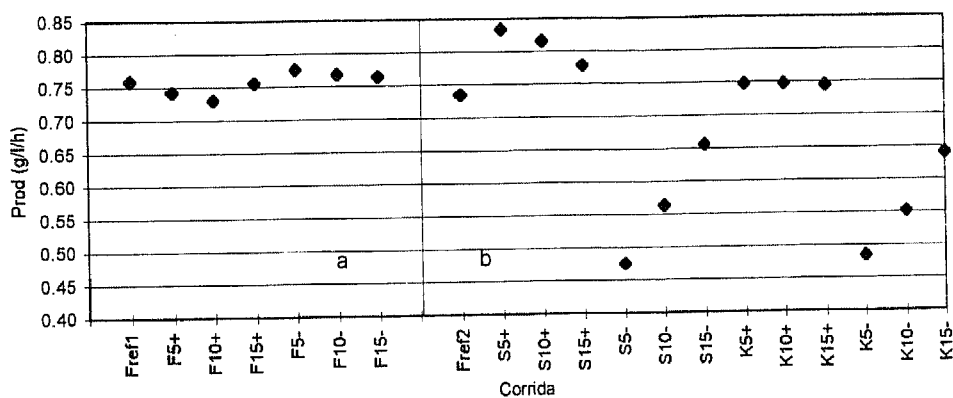


Figura 4.9 Produtividade nas corridas com variação a) do caudal de alimentação e b) da concentração de glucose na alimentação e do coeficiente global de transferência de massa.

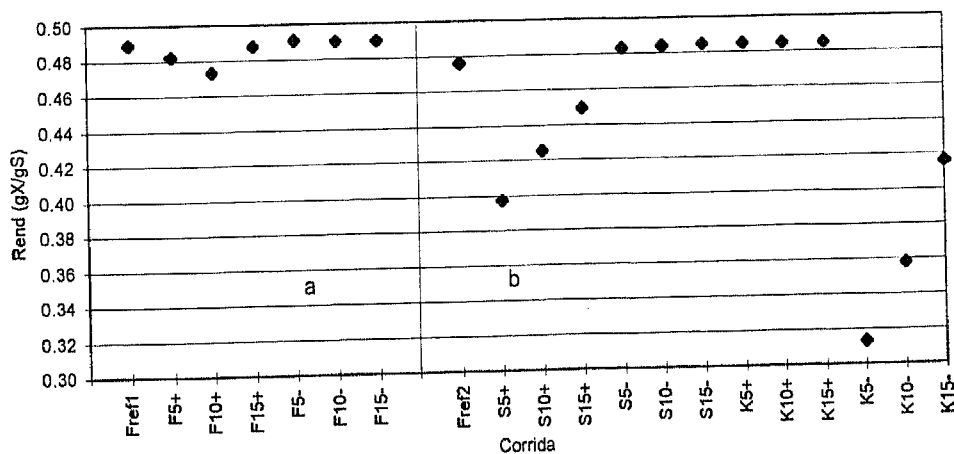


Figura 4.10 Rendimentos nas corridas com variação a) do caudal de alimentação e b) da concentração de glucose na alimentação e do coeficiente global de transferência de massa

4.7 Análise experimental

Neste sub-capítulo são apresentados os resultados obtidos na determinação experimental dos parâmetros relevantes para a simulação computacional do processo de produção de fermento de padeiro, a saber: parâmetros cinéticos e coeficiente global de transferência de massa para o oxigénio.

Faz-se a comparação entre os resultados experimentais e os correspondentes valores obtidos por simulação (EXPB01 e EXPB02 e EXPC01 a EXPC07). A reprodutibilidade das experiências é muitas vezes impossível de atingir dado que é difícil obter as mesmas condições ambientais de partida para partida, além de que, os processos biotecnológicos, lidando com seres vivos, apresentam um comportamento dinâmico não-linear. Os parâmetros do modelo podem variar no tempo, devido a eventuais alterações metabólicas da biomassa ou a modificações fisiológicas ou genéticas aleatórias e não observáveis.

Antes de se passar à fase de estimativa de parâmetros, fez-se um pequeno estudo sobre a influência de cada parâmetro no modelo, estudo designado 'análise de sensibilidade heurística', de forma a identificar quais os que deveriam ser seleccionados para o processo de estimação (EXPC02 a EXPC04).

Para as experiências EXPC01, EXPC03, EXPC04, EXPC06 e EXPC07 procedeu-se à estimativa dos parâmetros cinéticos q_s^{max} e q_o^{max} , fazendo-se, depois a validação experimental com o valor médio obtido nas várias estimativas.

Foi realizada mais uma análise de sensibilidade heurística aos restantes parâmetros do modelo.

Finalmente, repetiu-se o procedimento para o regime de alimentação com melaços.

As especificações de cada experiência encontram-se na Tabela 3.12.

Deve referir-se que a estimativa de parâmetros que foi efectuada não pretende substituir a determinação experimental dos parâmetros cinéticos e dos coeficientes de rendimento. Apenas é pretendido verificar matematicamente se os resultados obtidos nas experiências realizadas verificam os valores apresentados na literatura para esses parâmetros. Foi, aliás, objectivo de uma dissertação de Mestrado de um elemento do grupo, a determinação experimental dos coeficientes de rendimento do fermento de padeiro (Rocha, 1996).

Koren e Duvnjak (1993) apresentaram um modelo cinético para a estirpe *S. cerevisiae* ATCC 36859 em fermentações com mistura de glucose e frutose, em que a determinação dos respectivos parâmetros foi efectuada por ajuste matemático dos dados experimentais às equações do modelo.

Na sequência de figuras apresentadas os pontos referem-se aos resultados experimentais e as linhas aos resultados obtidos por simulação.

4.7.1 Determinação de $K_L a$

A metodologia seguida na determinação do coeficiente global de transferência de massa encontra-se descrita no Capítulo 3. Apresentam-se, de seguida, os resultados obtidos na determinação do tempo de resposta do sensor de oxigénio, bem como nas várias determinações de $K_L a$, com e sem biomassa.

Tempo de resposta do sensor de oxigénio

Determinou-se inicialmente o tempo de resposta do sensor de oxigénio. A Figura 4.11 apresenta os resultados obtidos de concentração de oxigénio (em %) em função do tempo, quando se transferiu rapidamente a sonda de uma solução isenta de oxigénio para o fermentador cheio de água destilada, estabilizado nas condições de operação. A constante de tempo do sensor é calculada pelo tempo que demora a atingir 63% do valor final da resposta (Seborg, 1991).

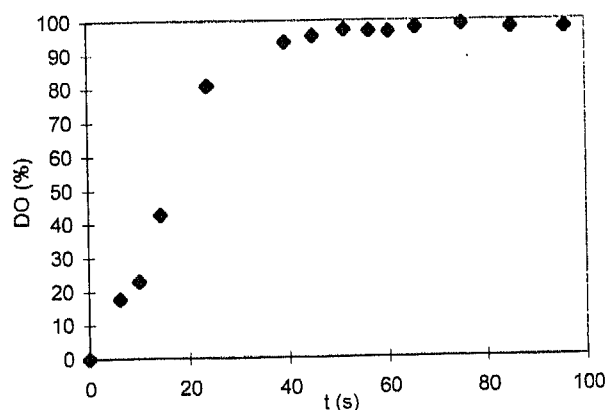


Figura 4.11 Determinação da constante de tempo do sensor de oxigénio

O valor obtido para a constante de tempo do sensor foi 18 segundos.

$K_L a$ em água

A Figura 4.12 apresenta os valores obtidos na determinação de $(k_L^{O_2} a)$ em água, nas condições de operação (30°C, 500 rpm e 3.5 slpm). O coeficiente global de transferência de massa para o oxigénio em água é igual ao valor absoluto do declive do ajuste efectuado, convertido em horas, ou seja, 47.2 h⁻¹. Entrando em linha de conta com a constante de tempo do sensor, por aplicação da equação 3.8, obtém-se o valor corrigido de $(k_L^{O_2} a)$ em água igual a 61.7 h⁻¹.

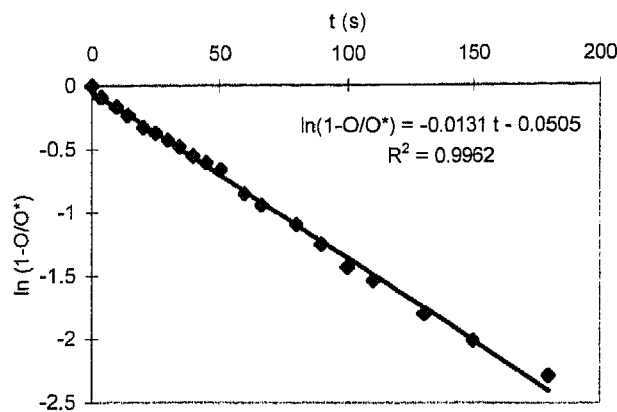


Figura 4.12 Determinação do $K_L a$ em água

 $K_L a$ em meio de cultura

Realizaram-se diversas experiências para a determinação do coeficiente global de transferência de massa para o oxigénio pelo método estático em meio de cultura (ausência de biomassa), em que se fez variar separadamente o caudal de arejamento e a velocidade de agitação. Rearranjando a equação (4.39), e associando os termos referentes ao diâmetro do agitador e do reactor e ao número de potência às constantes a determinar por regressão não-linear, obteve-se a seguinte correlação para o cálculo do $(k_L^{O_2} a)_o$ em função da velocidade de agitação, N , e do caudal de arejamento, Q :

$$(k_L^{O_2} a)_o = e^{-28.8} N^{2.82} Q^{0.37} \quad (4.63)$$

em que N vem em rph e Q em m³/h. Saliente-se que os valores de $(k_L^{O_2} a)_o$ utilizados no ajuste foram previamente corrigidos com o tempo de resposta do sensor.

Nas condições de operação utilizadas, caudal de arejamento de 3.42 slpm e velocidade de agitação de 500 rpm, obteve-se o valor de $(K_L^{O_2} a)_o = 122 \text{ h}^{-1}$.

$K_L a$ em presença de biomassa

Para determinação do coeficiente global na presença de biomassa utilizou-se o método dinâmico (descrito no Capítulo 3). Os valores da variação deste coeficiente com a biomassa, apresentam-se na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Variação do $K_L^{O_2} a$ com a concentração de biomassa

$X \text{ (g/l)}$	$K_L^{O_2} a \text{ (h}^{-1}\text{)}$
0.267	150
0.756	96
1.256	100
1.393	129
1.599	142

Pela análise da tabela, não é possível um correlacionamento aceitável dos valores em referência, como de alguma forma esperado, de acordo com a literatura (Kristiansen, 1993). É, no entanto claro que os valores obtidos correspondem a situações em regime de fornecimento de oxigénio em excesso. Da análise anteriormente apresentada (secção 4.6.8) o valor da literatura utilizado ($K_L a = 100 \text{ h}^{-1}$) corresponde a um limite inferior desse patamar de não influência de oxigénio, pelo que se decidiu adoptar este valor de $K_L a$ para o desenvolvimento do modelo para a simulação do processo de produção de fermento de padeiro.

Importa realçar de novo (ver secção 4.4.3) que nas aplicações de estimativa de parâmetros e de controlo, em-linha e em tempo real, se aplica o cálculo de OTR e CTR pelo método dos balanços à fase gasosa, anteriormente apresentados no parágrafo 4.4.3.2.

4.7.2 Análise em regime de alimentação de substrato puro

Apresenta-se, de seguida, a análise dos resultados obtidos nas experiências realizadas utilizando glucose como a única fonte de carbono.

4.7.2.1 Resultados por simulação versus valores experimentais

Da Figura 4.13 à Figura 4.21 são apresentados os perfis experimentais e os obtidos por simulação de biomassa, glucose e etanol (EXPB01 e EXPB02 e EXPC01 a EXPC07). Na simulação foram utilizados os valores para os parâmetros cinéticos e para os coeficientes de rendimento referidos na literatura. As experiências decorreram segundo condições e procedimento mencionados no capítulo 3. Todas as fermentações foram efectuadas a caudal de alimentação constante (0.12 l/h a 0.15 l/h) e com uma concentração de substrato na corrente de alimentação entre 25 a 100 g/l e com um volume inicial do fermentador de 2.5 l.

É de referir que nas duas experiências do grupo EXPB a corrente de alimentação é constituída apenas por glucose, enquanto que nas experiências do grupo EXPC a referida corrente contém todos os nutrientes, segundo receita apresentada na Tabela 3.1.

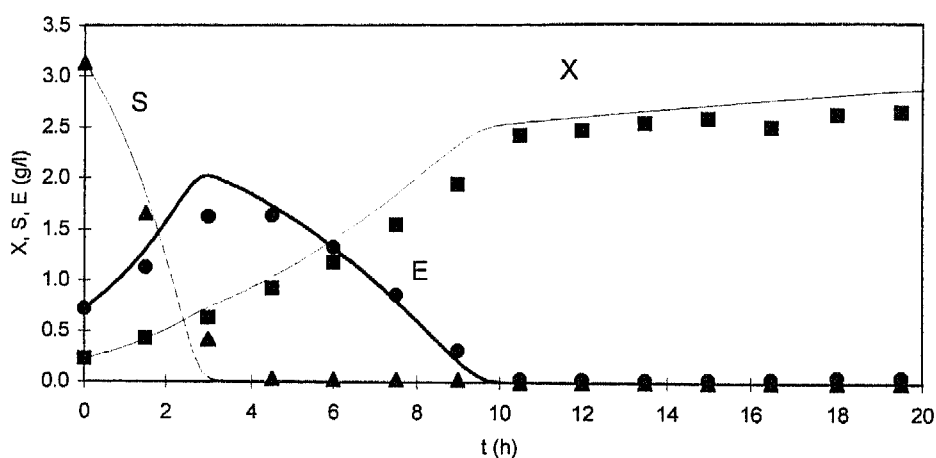


Figura 4.13 EXPB01: Perfis de biomassa (■), glucose (▲) e etanol (●) experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.05$ l/h e $S_e=10$ g/l

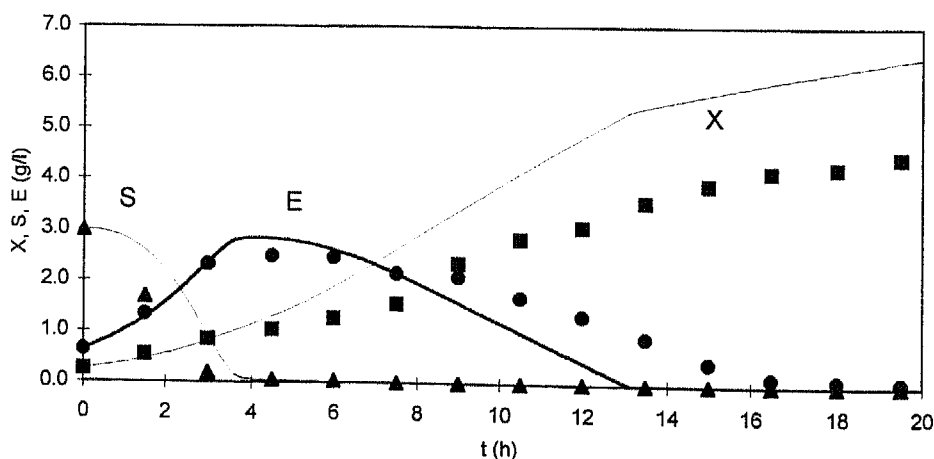


Figura 4.14 EXPB02: Perfis de biomassa (■), glucose (▲) e etanol (●) experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.1$ l/h e $S_e=25$ g/l

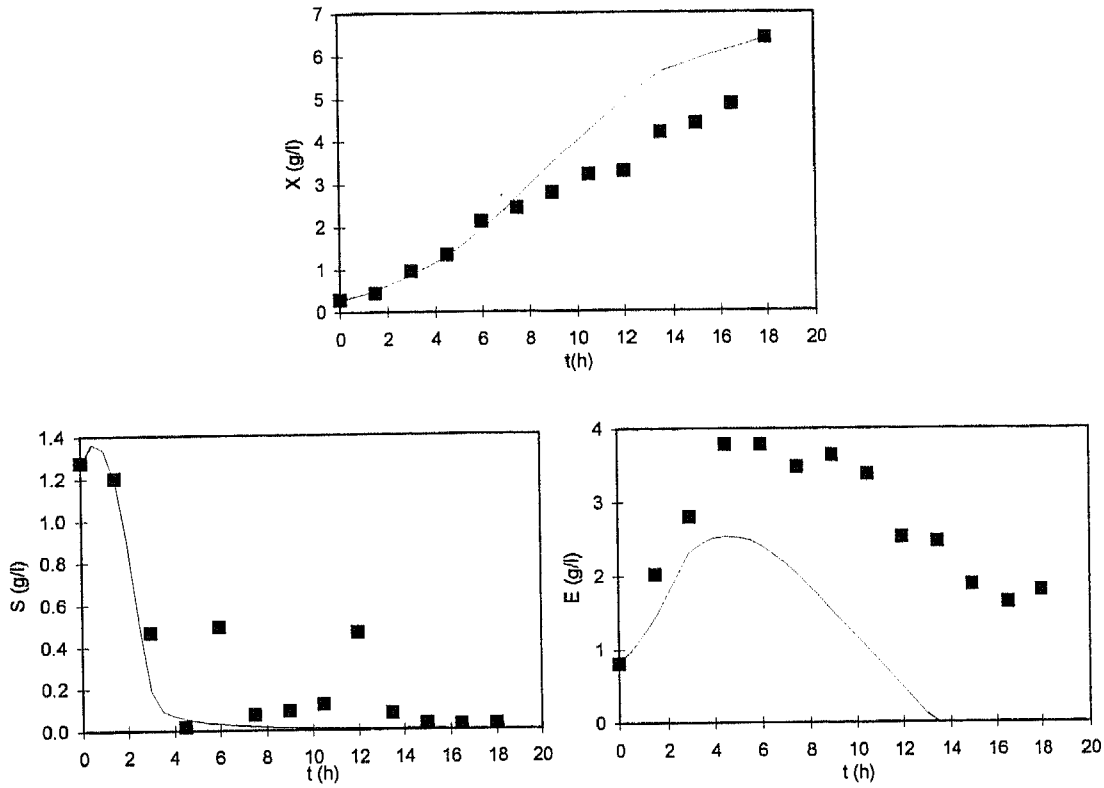


Figura 4.15 EXPC01: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.1$ l/h e $S_e=25$ g/l

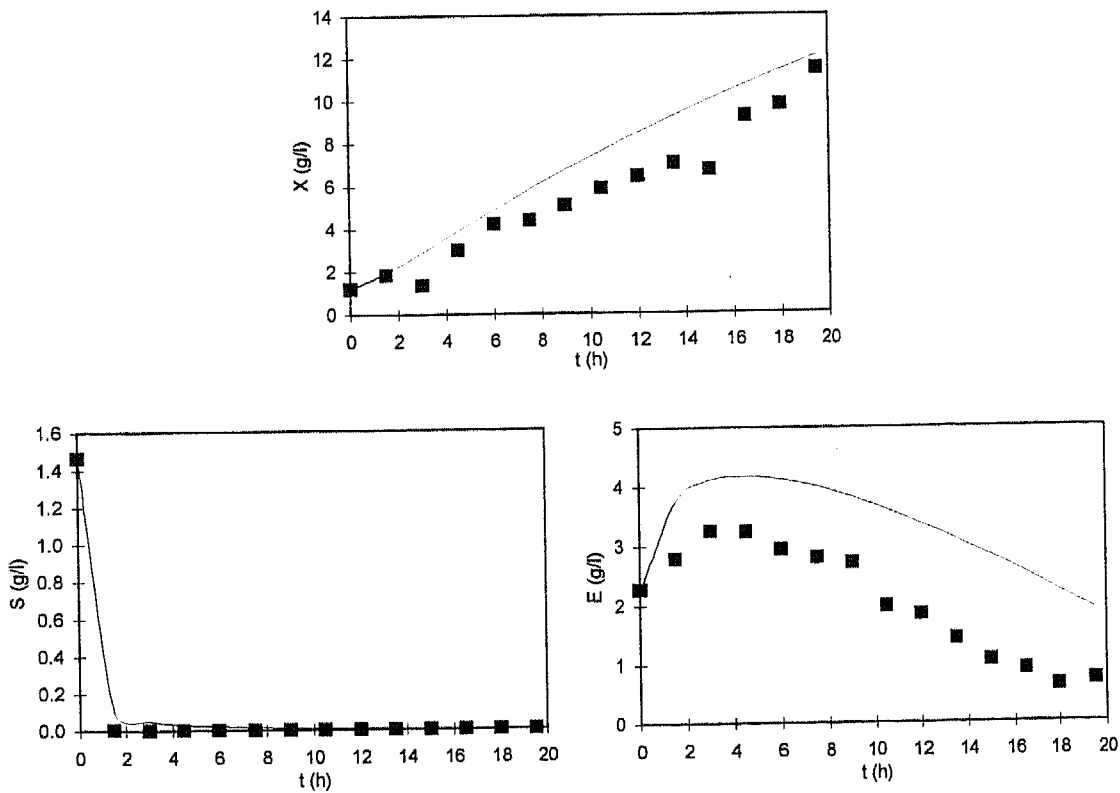


Figura 4.16 EXPC02: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.12$ l/h e $S_e=50$ g/l

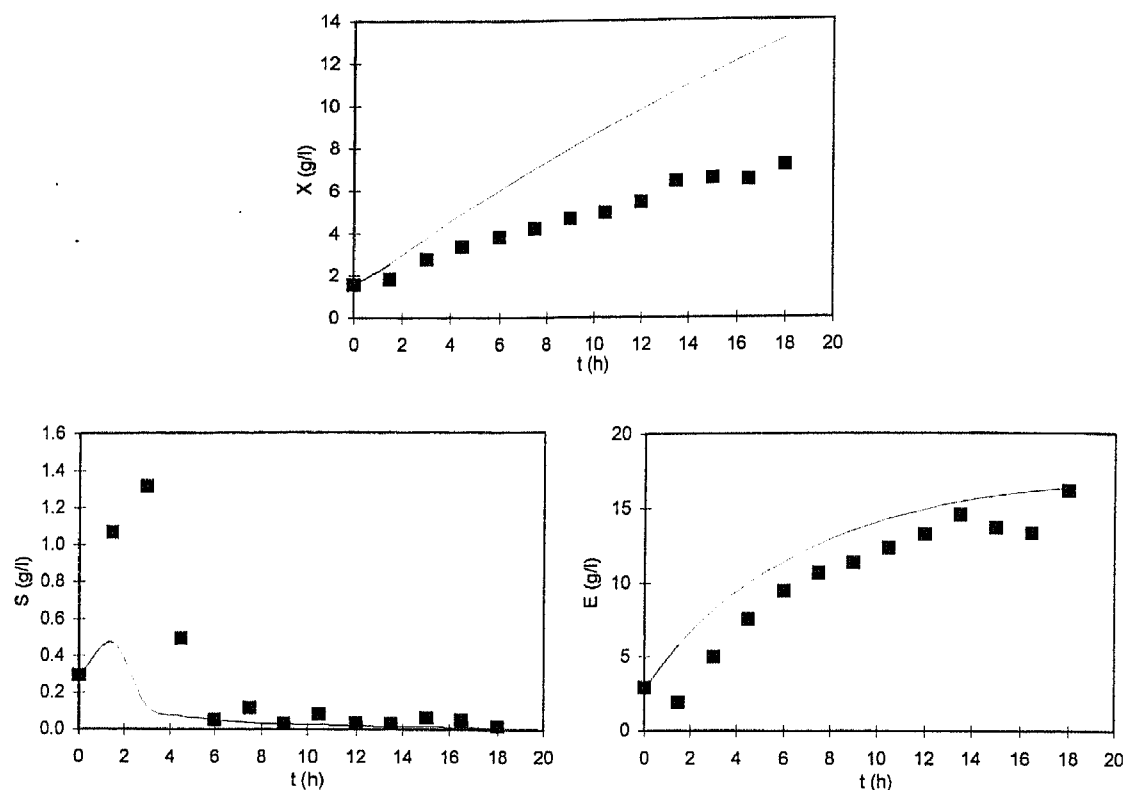


Figura 4.17 EXPC03: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=100$ g/l

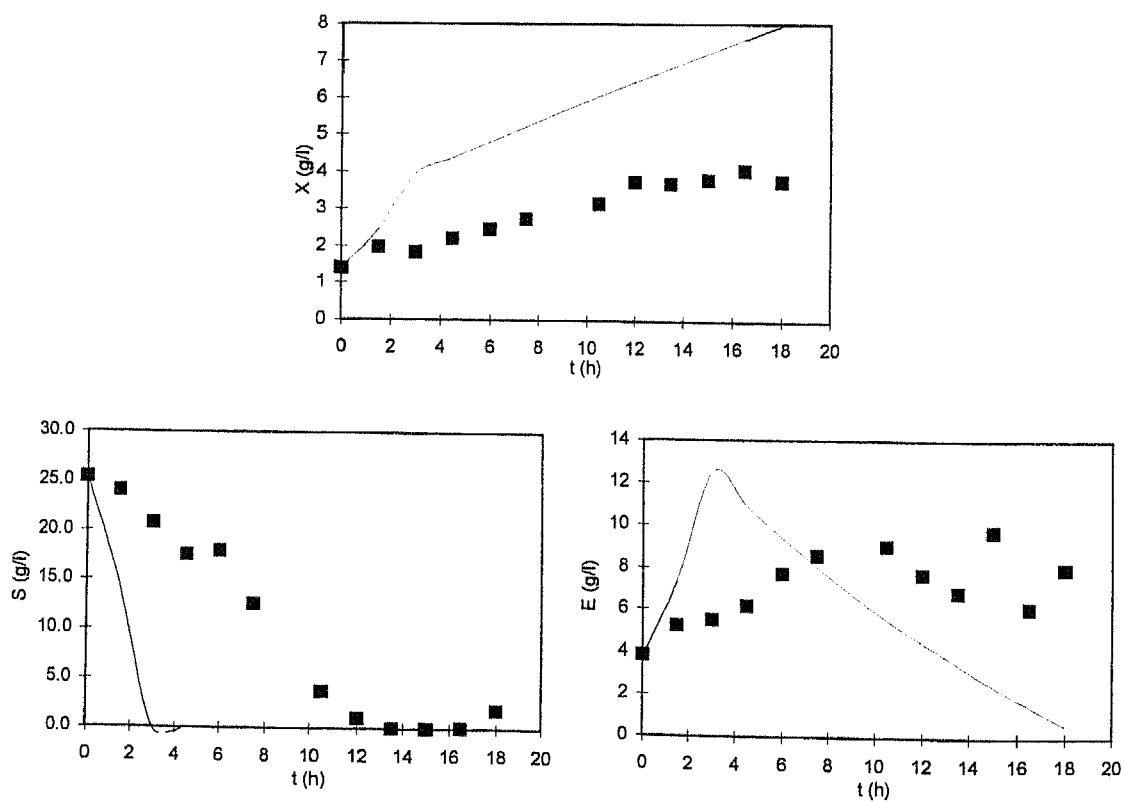


Figura 4.18 EXPC04: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=5$ g/l

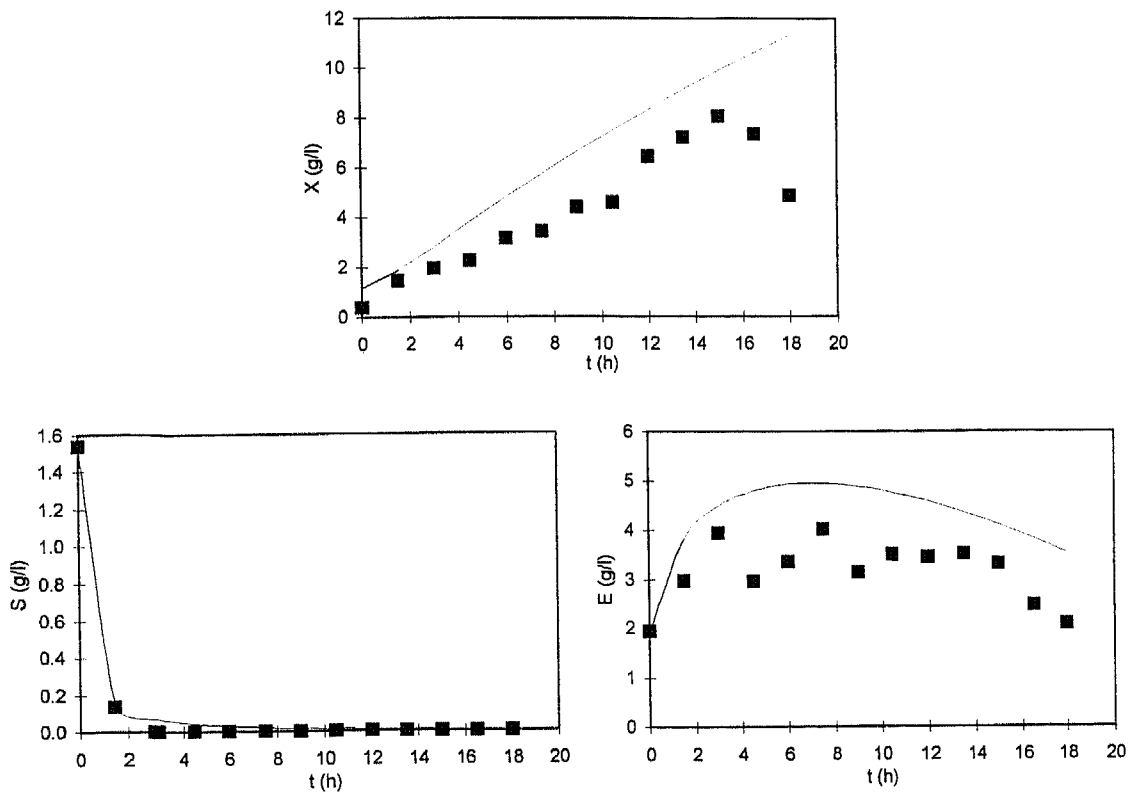


Figura 4.19 EXPC05: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=50$ g/l

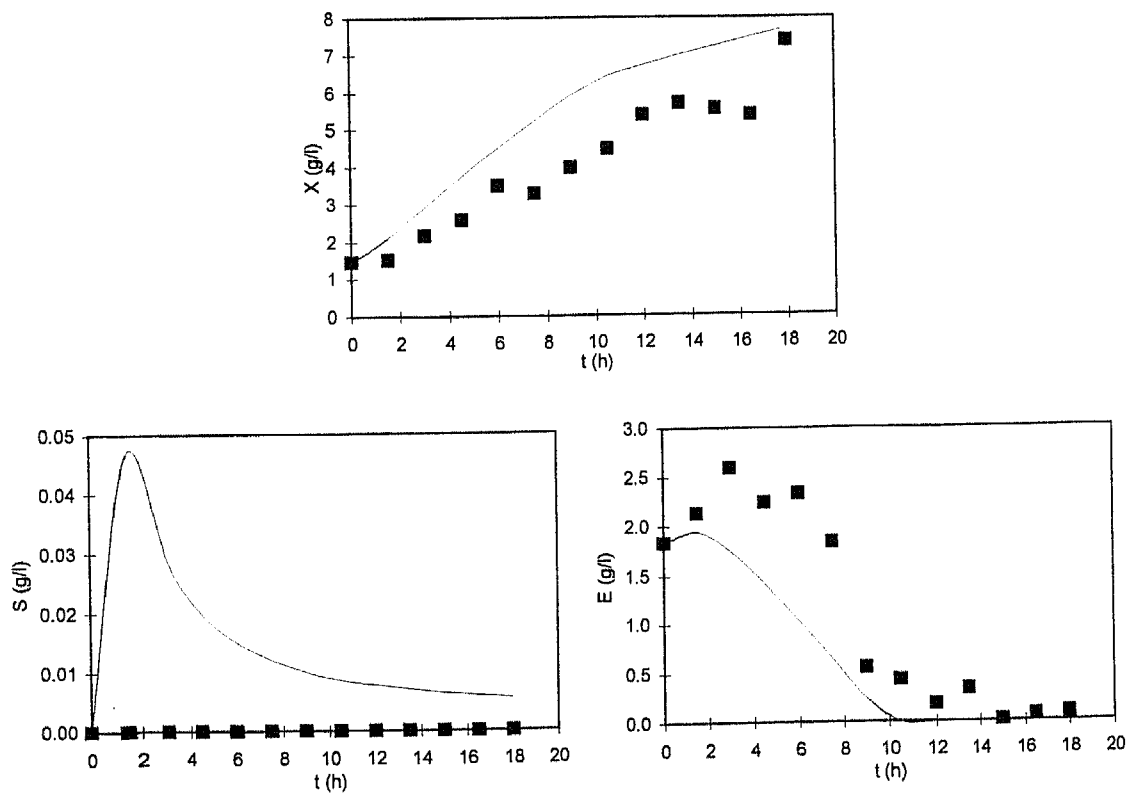


Figura 4.20 EXPC06: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas), com $F=0.15$ l/h e $S_e=25$ g/l

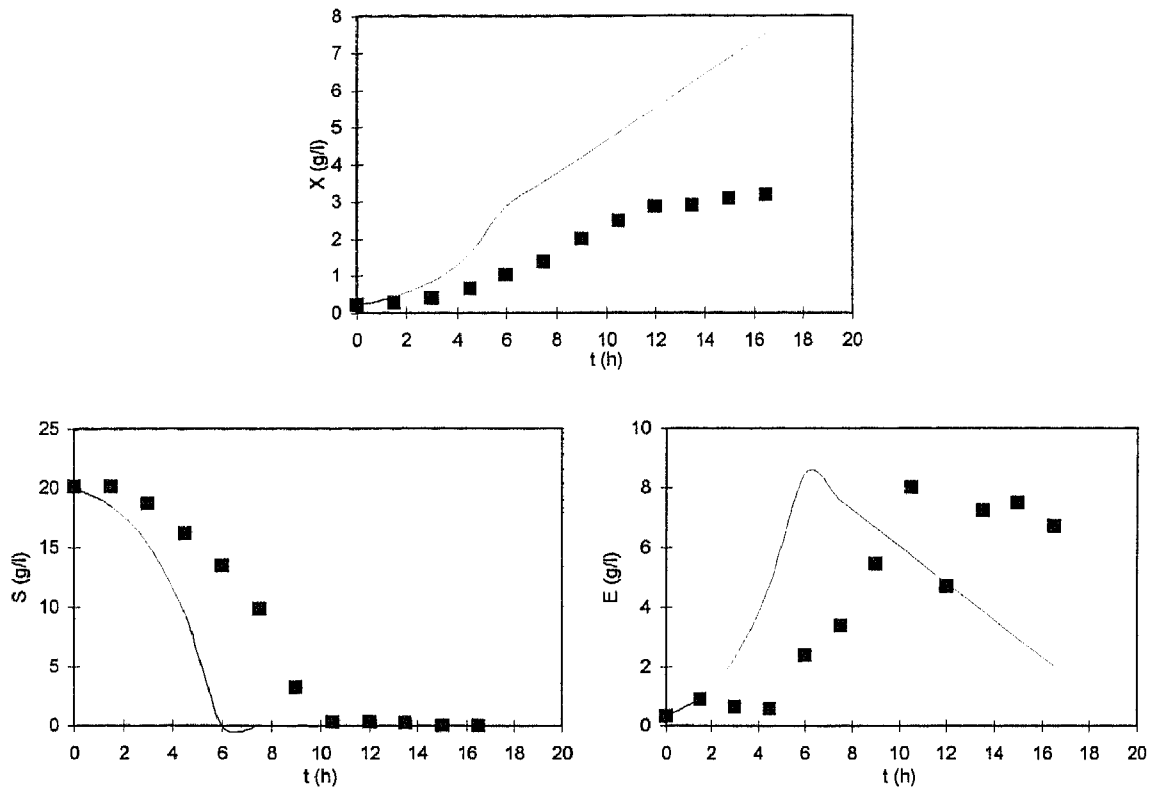


Figura 4.21 EXPC07: Perfis de biomassa, glucose e etanol experimentais (pontos) e por simulação (linhas)- experiência em descontínuo

A análise das figuras foi feita em termos da avaliação da qualidade do modelo teórico (empregando valores da literatura para os parâmetros cinéticos) e em termos comparativos de valores de produtividades médias e rendimentos globais obtidos em cada experiência, tendo em conta a diferença nas quantidades de glucose fornecidas.

As nove experiências analisadas não apresentam iguais resultados em termos de validação do modelo teórico utilizado. São exemplo os resultados obtidos na EXPB01 (Figura 4.13) e na experiência EXPC04 (Figura 4.18). Na primeira, os resultados experimentais coincidem com o modelo de simulação; o mesmo não poderá dizer-se da EXPC04. Esta última é, aliás, a que apresenta piores resultados. Pensa-se que possam não só ter ocorrido erros nas medições experimentais, mas também, e principalmente, que os parâmetros cinéticos utilizados na literatura poderem não ser válidos nas condições em que decorreu a experiência. Efectivamente, esta fermentação decorreu em moldes diferentes das restantes, em termos de quantidade de açúcar fornecido. Assim, a concentração de glucose no meio de fermentação foi dez vezes superior e a na corrente de alimentação era de apenas 5 g/l (contra os 25 a 100 g/l nas restantes fermentações). Houve, no início da fermentação uma quantidade excessiva de glucose no meio.

A experiência EXPC07 não apresenta bons resultados, mas tratou-se de uma fermentação em regime descontínuo, o que pode levar a uma não correspondência dos parâmetros cinéticos utilizados.

A Tabela 4.10 resume os valores de produtividades médias e rendimentos globais calculados para as nove experiências, valores esses já apresentados na Tabela 3.12.

Da análise da Tabela 4.10 pode concluir-se o seguinte:

- a experiência EXPC07, realizada em regime descontínuo, é a que apresenta piores resultados quer em termos de produtividade quer em termos de rendimento global. A operação semi-contínua para a produção de fermento de padeiro é, sem dúvida, mais eficiente.
- entre as fermentações semi-contínuas, as que apresentam valores mais baixos de produtividade são as EXPB01, EXPB02 e EXPC04. Em todas, a quantidade de glucose fornecida aparenta ser insuficiente para o crescimento da biomassa. Além de que, nas experiências do grupo EXPB a corrente de alimentação era constituída apenas por glucose, o que poderá apontar para uma eventual carência de nutrientes necessários ao crescimento da biomassa.
- continuando a analisar as fermentações semi-contínuas, as que apresentam valores mais baixos para a razão (biomassa produzida/glucose consumida) são as experiências EXPC03 e EXPC04. Em ambas há uma alimentação excessiva de glucose: no primeiro caso a corrente de alimentação contém 100 g/l de glucose; no segundo a corrente de alimentação contém apenas 5 g/l, mas o meio inicial de cultura no fermentador contém 50 g/l (contra os 5 g/l normalmente empregues). Esse excesso de glucose é utilizado, também, para produzir etanol (ver parágrafo 4.4.1 para cinéticas de crescimento do fermento de padeiro), fazendo, necessariamente, baixar o rendimento global.

Em resumo, e em forma de conclusão, existe um compromisso na quantidade de glucose fornecida ao sistema. Se, por um lado, pequenas quantidades levam a produtividades baixas, os correspondentes valores para os rendimentos globais são razoáveis (a pequena quantidade de glucose fornecida é empregue para produzir biomassa e não etanol). O inverso também se aplica.

Os resultados apontam para um 'ótimo', de que a EXPC01 é um exemplo: produtividade 1.01 g/l/h e rendimento 0.47 g biomassa/g glucose.

Tabela 4.10 Valores de produtividades médias e rendimentos globais para as experiências EXPB01, EXPB02 e EXPC01 a EXPC07

<i>Experiência</i>	<i>Produtividade média (g/lh)</i>	<i>Rendimento global (gbiomassa/gsubstrato)</i>
EXPB01	0.60	0.49
EXPB02	0.65	0.36
EXPC01	1.01	0.47
EXPC02	1.58	0.33
EXPC03	0.81	0.11
EXPC04	0.49	0.18
EXPC05	1.02	0.26
EXPC06	0.69	0.32
EXPC07	0.18	0.14

4.7.2.2 Estimativa de parâmetros e validação experimental

De forma a minimizar os desvios verificados nalgumas experiências entre os valores experimentais e os obtidos por simulação (apresentados no parágrafo anterior), procedeu-se à estimativa de alguns parâmetros do modelo, utilizando o programa *Opt*, correndo na opção optimização.

A função objectivo utilizada foi o somatório do quadrado do desvio relativo para a biomassa, glucose e etanol, nomeadamente:

$$Fobj = \sum_{i=1}^{nexp} \left(\frac{X_i^{mod} - X_i^{exp}}{X_i^{exp}} \right)^2 + \sum_{i=1}^{nexp} \left(\frac{S_i^{mod} - S_i^{exp}}{S_i^{exp}} \right)^2 + \sum_{i=1}^{nexp} \left(\frac{E_i^{mod} - E_i^{exp}}{E_i^{exp}} \right)^2 \quad (4.64)$$

em que os índices *exp* referem-se a valores experimentais e os índices *mod* a valores obtidos pelo modelo teórico; *nexp* é o número de pontos experimentais.

Define-se erro médio como:

$$ErroMedio = \sqrt{\frac{Fobj}{3 nexp}} \quad (4.65)$$

em que o valor 3 diz respeito às três variáveis de estado utilizadas no cálculo da função objectivo (biomassa, açúcar e etanol).

Primeira análise de sensibilidade heurística

Antes de se iniciar o processo de estimativa de parâmetros é necessário identificar quais os que têm um papel importante no modelo. Para tal, realizou-se uma análise de sensibilidade, dita 'heurística', na medida em que se baseou numa avaliação empírica de resultados. O processo consistiu na selecção de alguns parâmetros para análise, nomeadamente os parâmetros cinéticos q_s^{max} , q_o^{max} e μ_e^{max} , e realizaram-se diversas simulações em que se variou apenas um deles, tendo sempre como base os valores da literatura. Registou-se, posteriormente, em gráfico os resultados obtidos para cada situação.

Este estudo foi repetido para três experiências EXPC02, EXPC03 e EXPC04.

A Tabela 4.11 resume os valores dos parâmetros utilizados na análise efectuada. Para a EXPC02 só se efectuaram as cinco primeiras corridas.

Tabela 4.11 Parâmetros cinéticos utilizados para análise de sensibilidade heurística

Simulação	q_s^{max}	q_o^{max}	μ_e^{max}
0*	3.5	0.256	0.17
1	10.0	0.256	0.17
2	3.5	1.0	0.17
3	3.5	0.256	10.0
4	0.35	0.256	0.17
5	3.5	0.256	0.01
6	3.5	0.01	0.17

* Valores da literatura.

Da Figura 4.22 à Figura 4.24 apresentam-se os resultados obtidos em termos de perfis de biomassa, glucose e etanol para as três experiências em análise. Nos gráficos, os índices de 0 a 6 referem-se às condições da simulação em termos dos valores dos parâmetros cinéticos (Tabela 4.11). Assim, por exemplo, x4 indica o perfil teórico de biomassa obtido na simulação 4, ou seja, pela consulta da Tabela 4.11, corresponde à utilização dos parâmetros 0.35, 0.256 e 0.17 para, respectivamente, q_s^{max} , q_o^{max} e μ_e^{max} .

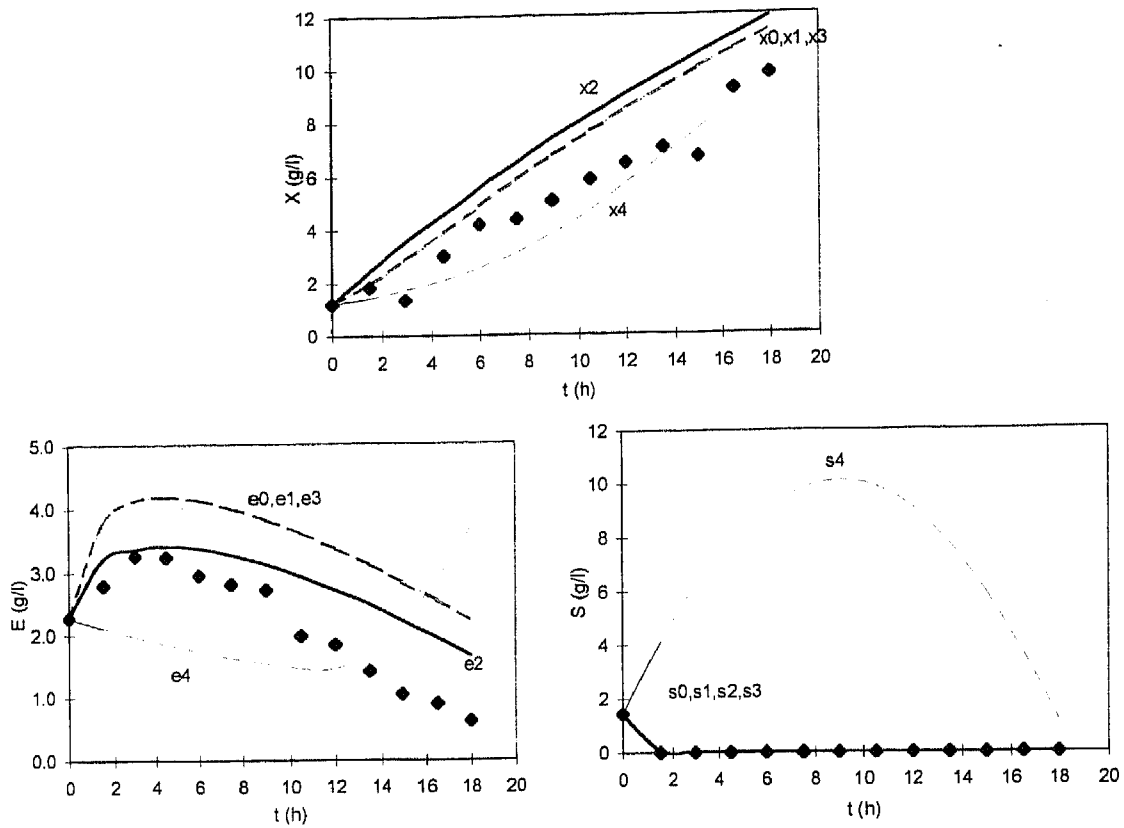


Figura 4.22 Análise de sensibilidade para EXPC02: Perfis de biomassa, glucose e etanol (ver Tabela 4.11).

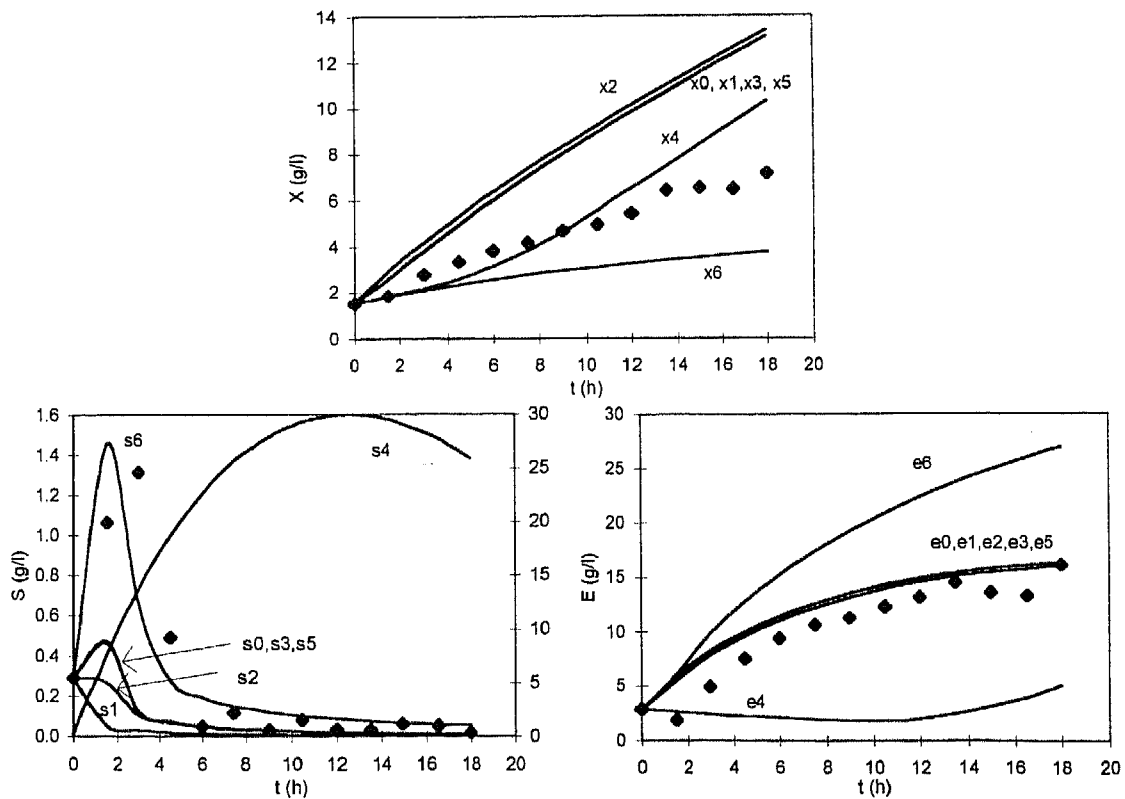


Figura 4.23 Análise de sensibilidade para EXPC03: Perfis de biomassa, glucose e etanol (ver Tabela 4.11)

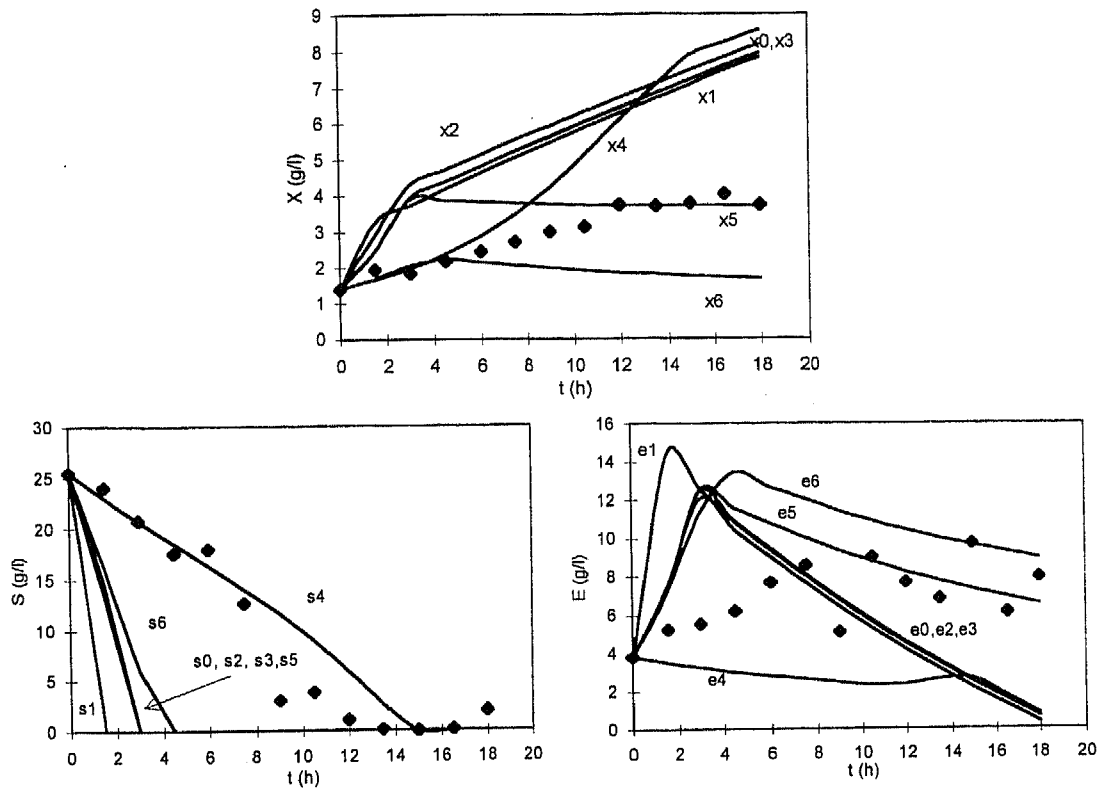


Figura 4.24 Análise de sensibilidade para EXPC04: Perfis de biomassa, glucose e etanol (ver Tabela 4.11)

A análise das figuras anteriores, leva a concluir que a influência da taxa específica máxima de crescimento em etanol poderá ser desprezada face à influência significativa dos outros dois parâmetros.

Estimativa de q_s^{max} e q_o^{max}

Da Figura 4.25 à Figura 4.29 apresentam-se os perfis de biomassa, glucose e etanol para as cinco experiências estudadas (EXPC01, EXPC03, EXPC04, EXPC06 e EXPC07), em que os perfis de simulação foram obtidos com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados em cada caso.

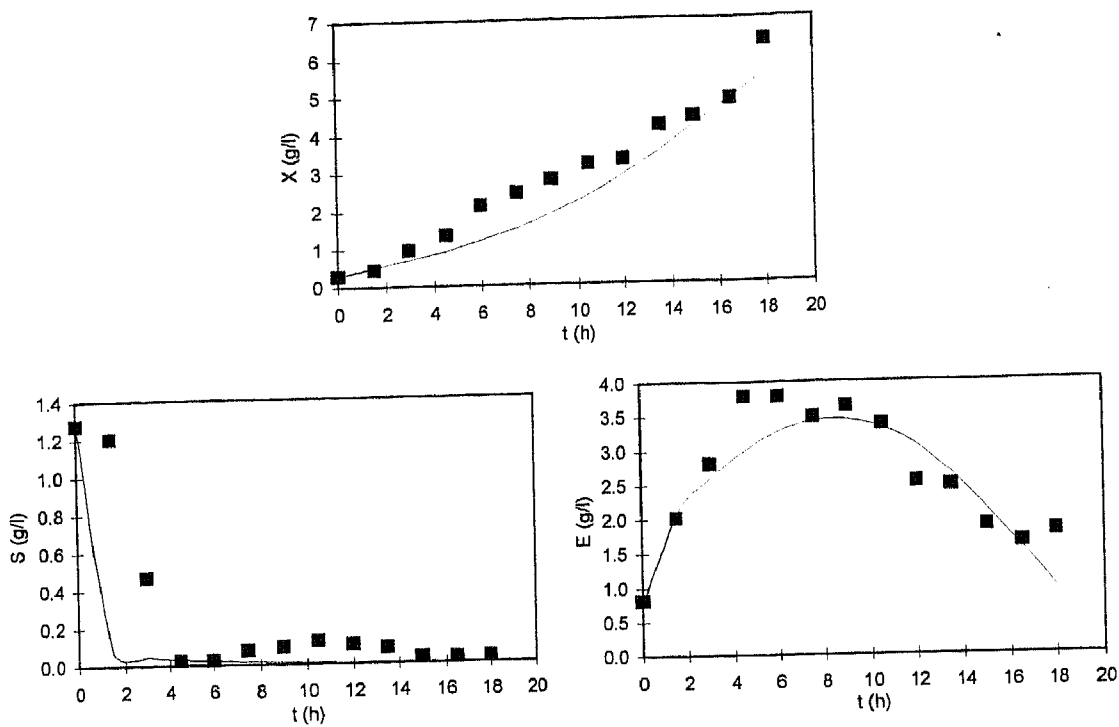


Figura 4.25 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC01 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados

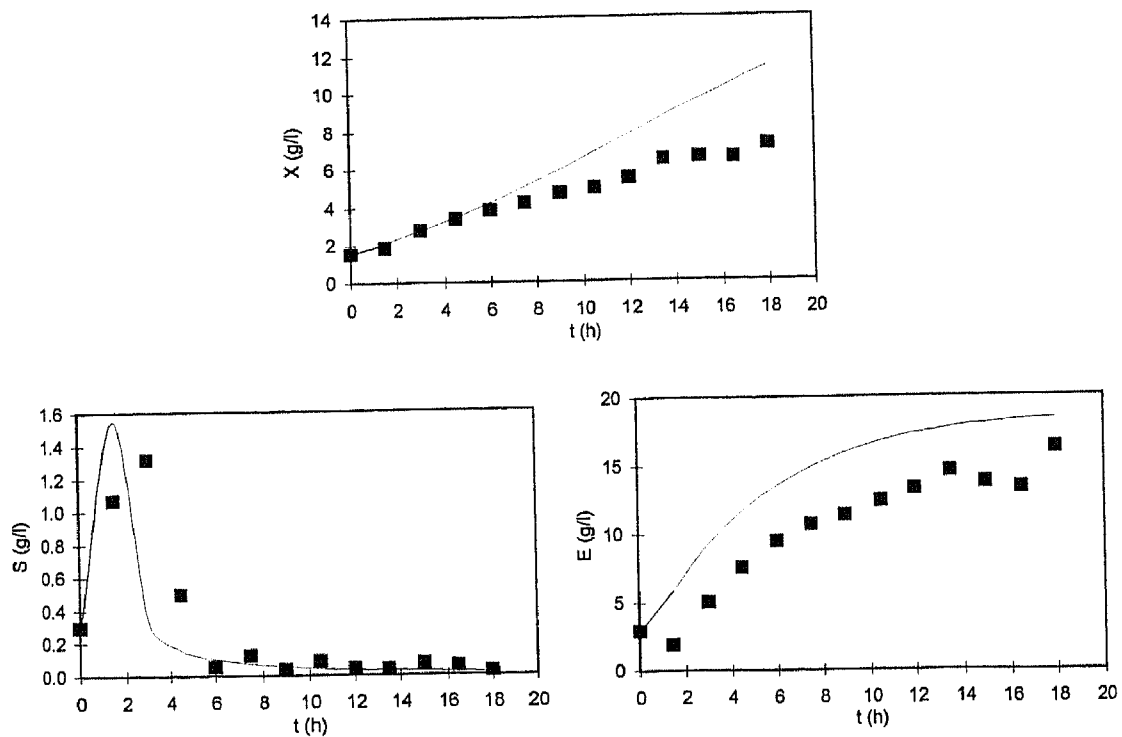


Figura 4.26 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados

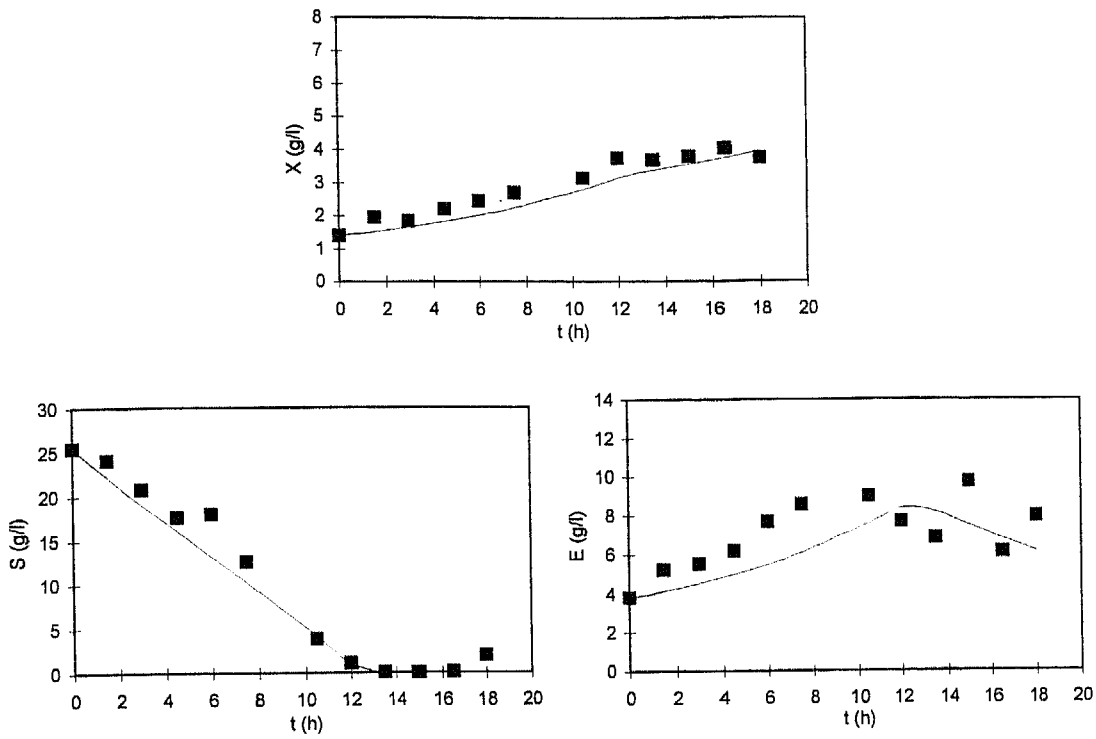


Figura 4.27 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC04 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados

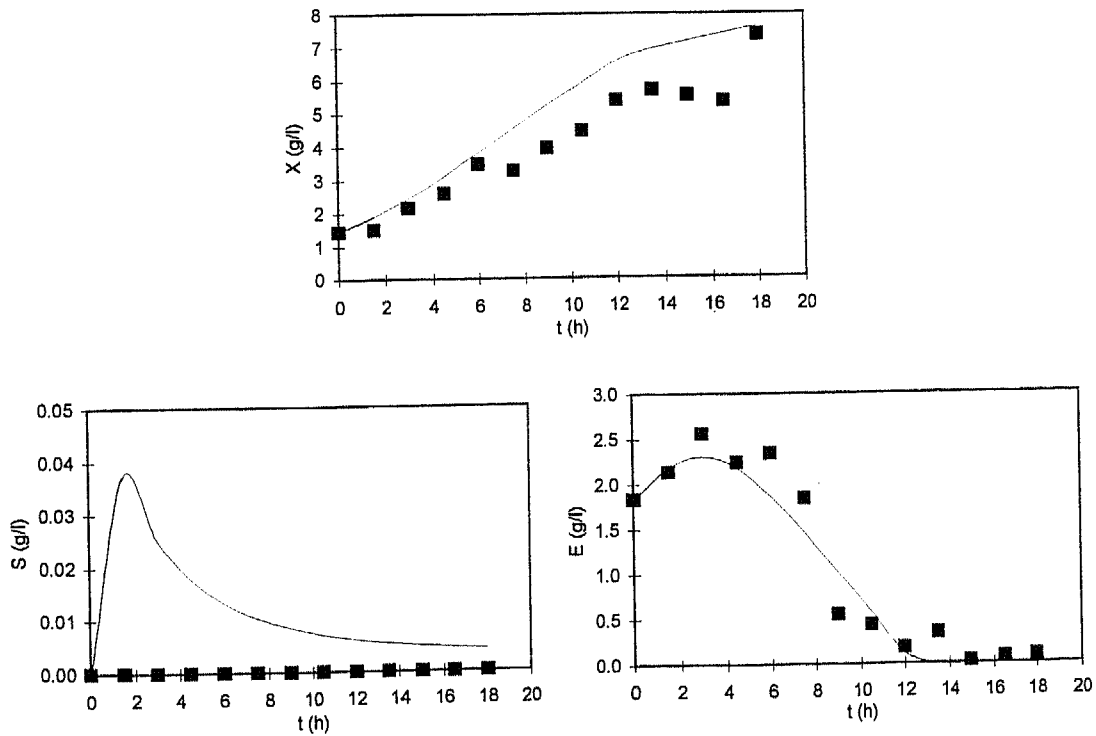


Figura 4.28 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC06 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados

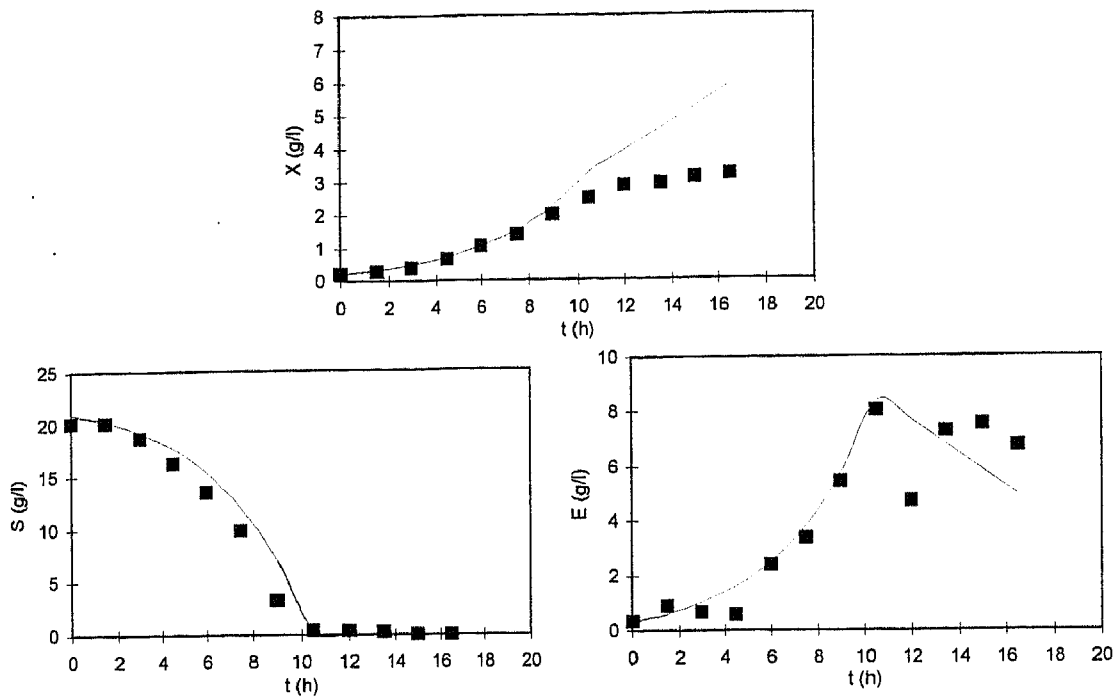


Figura 4.29 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC07 com os valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados

A Tabela 4.12 resume os valores de q_s^{max} e q_o^{max} obtidos em cada corrida, bem como o valor médio de cada parâmetro (obtido pela média dos valores otimizados em cada experiência tratada). Para estudo comparativo, apresentam-se, também, os valores da literatura. Para cada experiência está indicado o valor obtido no cálculo da função objectivo e o erro médio (secção 4.7.2.2).

Tabela 4.12 Valores obtidos para q_s^{max} e q_o^{max}

Experiência	q_s^{max}	q_o^{max}	Função objectivo	Erro médio
EXPC01	8.31	0.154	9.35	0.490
EXPC03	3.16	0.114	11.54	0.544
EXPC04	0.79	0.071	3.33	0.304
EXPC06	4.65	0.184	6.90	0.421
EXPC07	1.78	0.1625	11.72	0.571
Média	3.74	0.137		
Literatura	3.5	0.256		

Existe de facto uma disparidade nos valores obtidos nas cinco corridas. O valor médio de q_s^{max} é aproximadamente igual ao da literatura, o que não acontece com o valor de q_o^{max} ,

o qual é cerca de metade do valor da literatura.

Validação experimental

Com os valores médios de q_s^{max} e q_o^{max} obtidos anteriormente repetiram-se as simulações, com o objectivo de verificar se o valor médio é mais eficiente no ajuste do modelo aos resultados experimentais do que o valor da literatura.

As simulações foram efectuadas não só para as corridas utilizadas na estimativa de parâmetros, mas também para as experiências EXPC02 e EXPC05, de forma a validar a técnica de ajuste em partidas que não contribuíram para o cálculo do valor médio.

Da Figura 4.30 à Figura 4.36 apresentam-se os perfis de biomassa, glucose e etanol para cada experiência obtidos com os parâmetros da literatura (1 no gráfico), com os valores estimados (2 no gráfico) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 no gráfico).

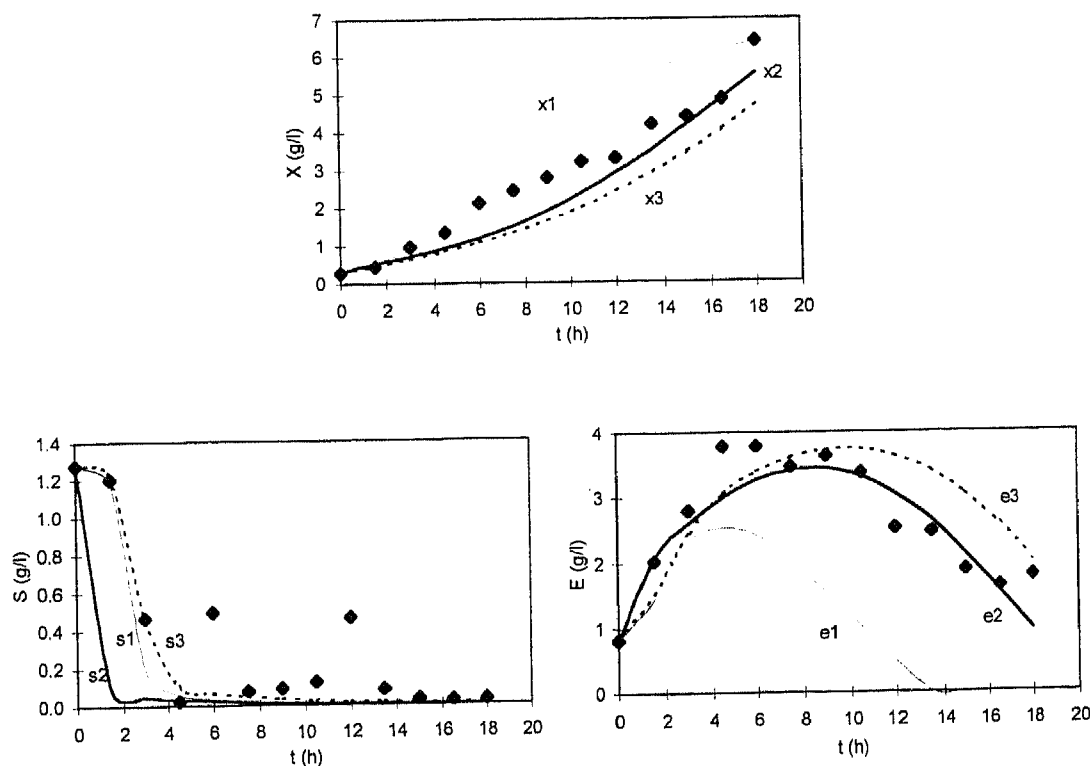


Figura 4.30 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC01 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

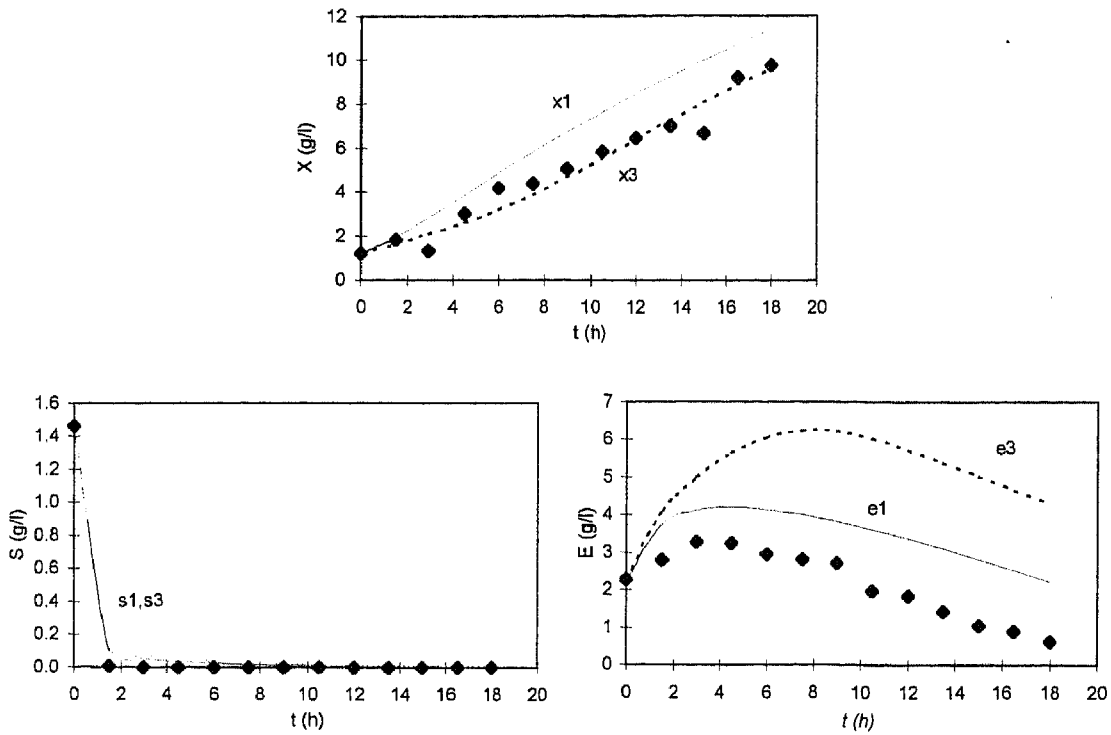


Figura 4.31 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC02 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

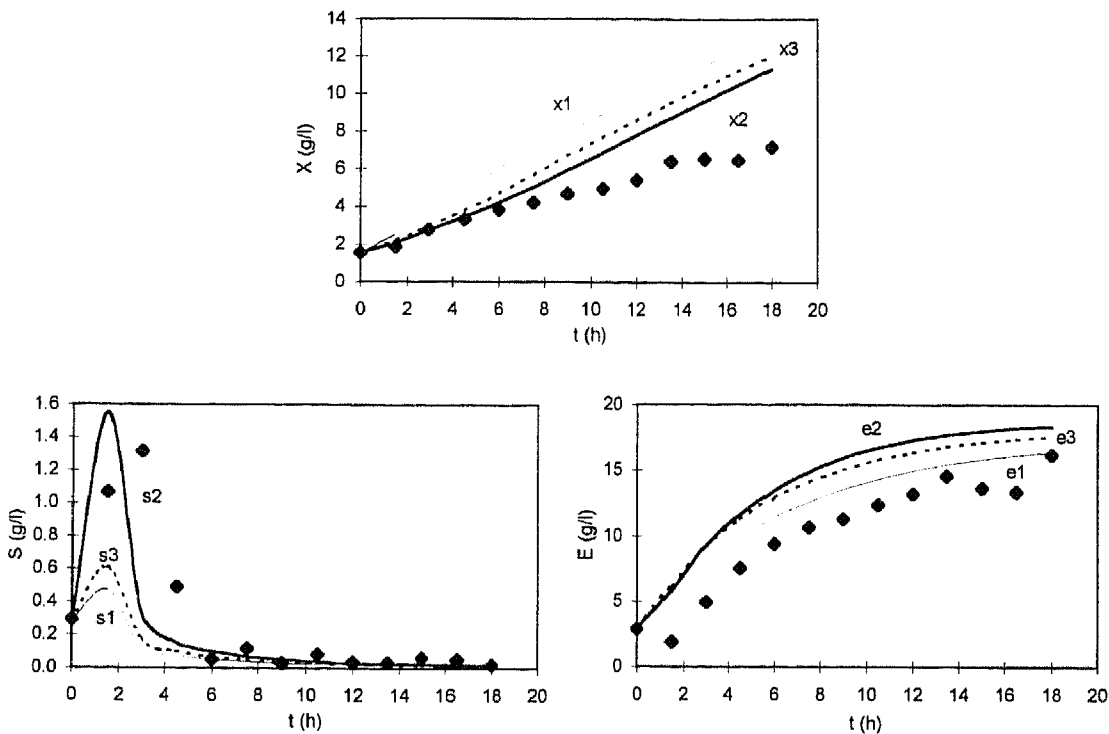


Figura 4.32 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

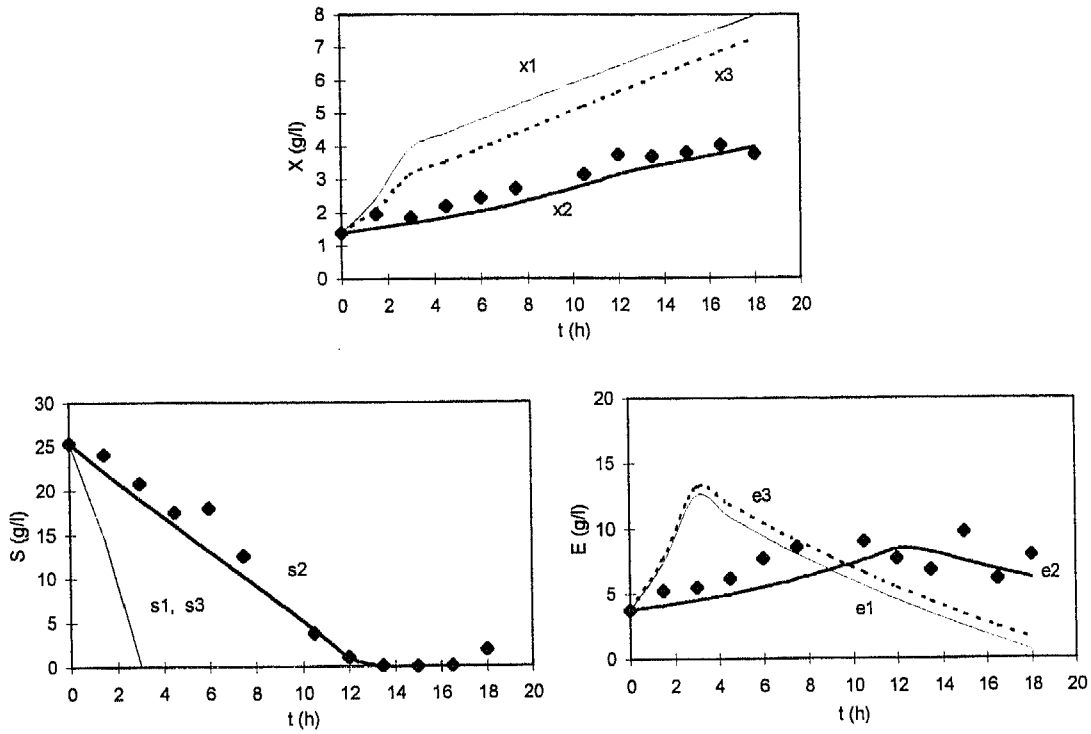


Figura 4.33 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC04 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

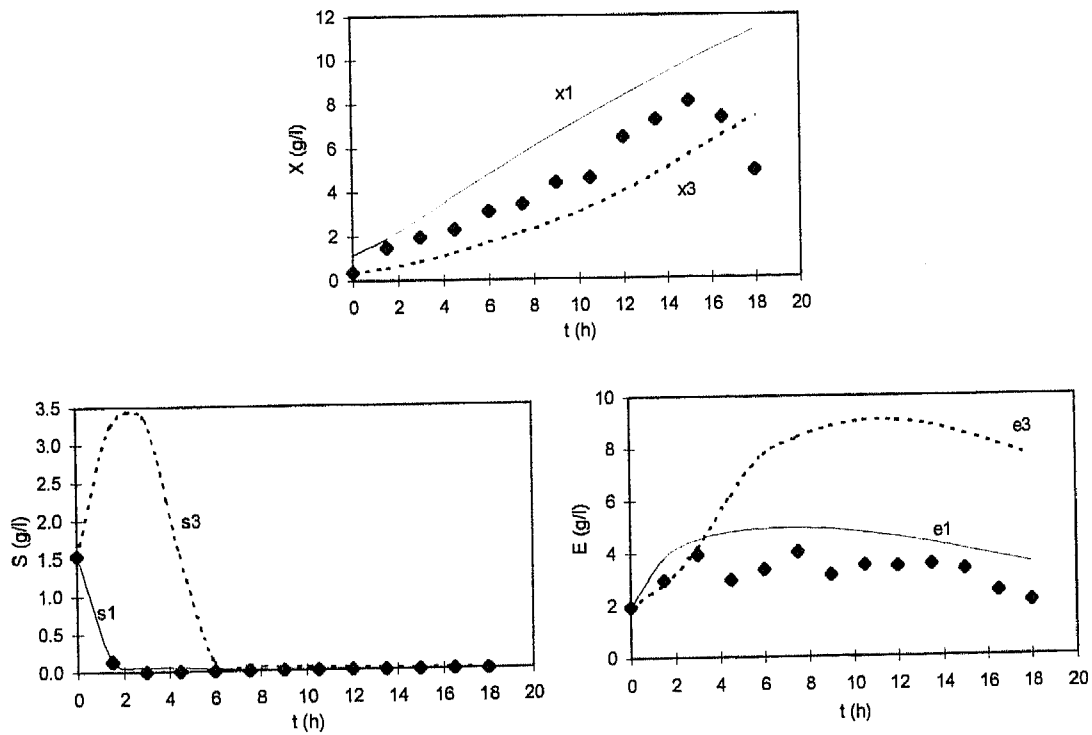


Figura 4.34 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC05 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

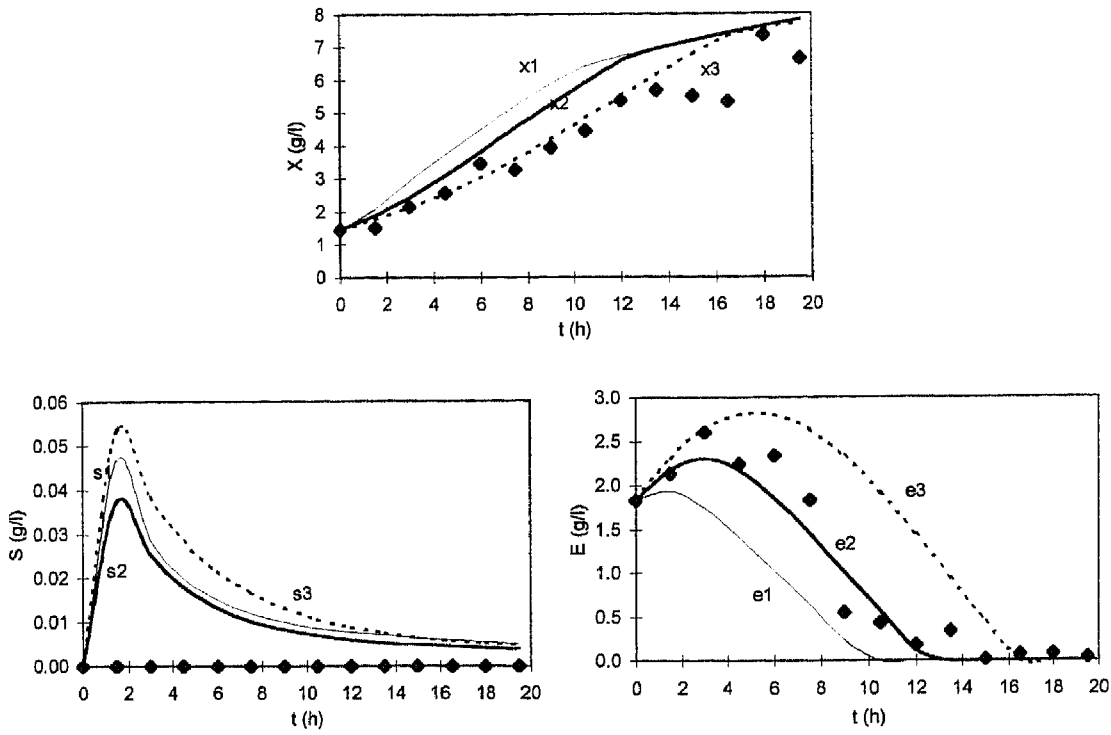


Figura 4.35 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC06 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

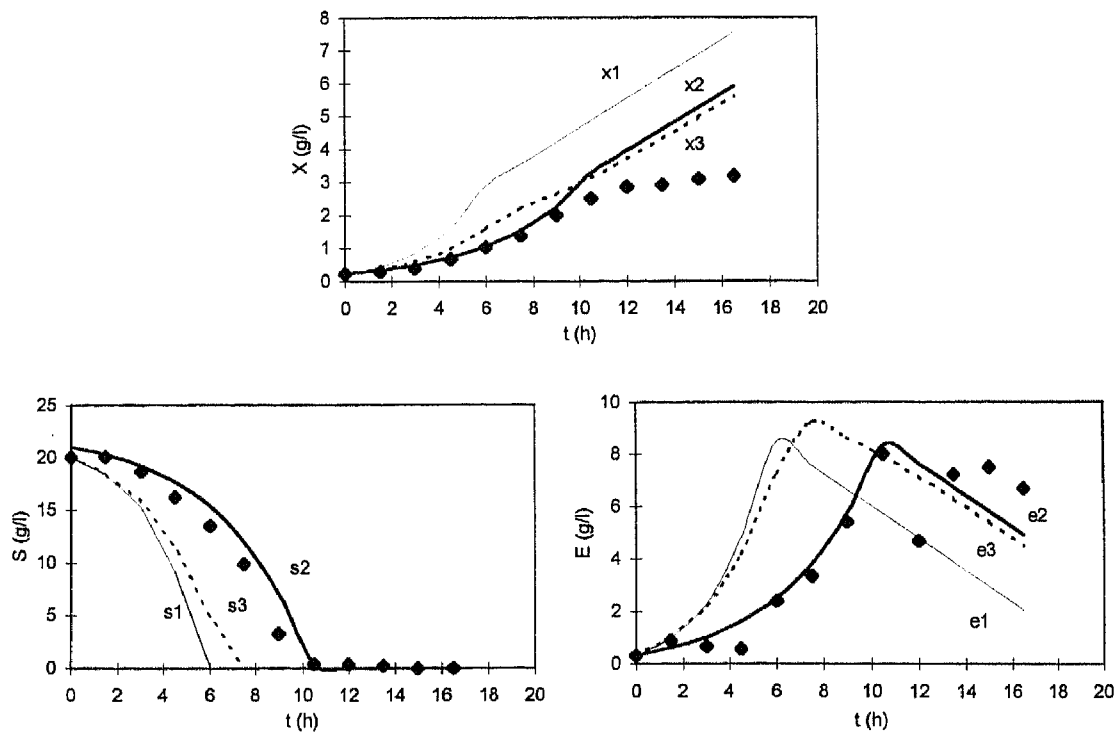


Figura 4.36 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC07 com os parâmetros da literatura (1 nos gráficos), com os valores estimados (2 nos gráficos) e com o valor médio de q_s^{max} e q_o^{max} (3 nos gráficos)

Na Tabela 4.13 apresentam-se os valores da função objectivo em cada caso de estudo e para as situações de parâmetros otimizados e parâmetros médios.

Tabela 4.13 Comparação da função objectivo para as situações de parâmetros otimizados e parâmetros médios.

Experiência	Função objectivo	Função objectivo
	Valores Otimizados	Valores Médios
EXPC01	9.35	27.3
EXPC02		294.4
EXPC03	11.54	13.2
EXPC04	3.33	72.7
EXPC05		> 1000
EXPC06	6.90	690.6
EXPC07	11.72	62.9

Os resultados obtidos reflectem (e estão de acordo com) o que é conhecido das dificuldades de modelização de processos biotecnológicos por via estritamente determinística.

Nos perfis de etanol da EXPC02 e EXPC05 (corridas de validação) os valores médios originam um ajuste pior que os valores da literatura. Nos restantes as diferenças entre os resultados obtidos com os parâmetros da literatura e os obtidos com a média não apresentam diferenças significativas. Claro está que, para todas as experiências, os melhores ajustes são os obtidos com o valor estimado na corrida em estudo.

Segunda análise de sensibilidade heurística

Numa tentativa de melhorar os ajustes obtidos realizaram-se novos estudos de sensibilidade para a experiência EXPC03. Assim, os resultados desta análise foram:

- parâmetro q_s^{max} - só influencia o perfil de glucose;
- parâmetro μ_e^{max} - não influencia nenhum dos perfis;

- parâmetro q_o^{max} - influencia de modo contrário o perfil de biomassa e de etanol, isto é, melhora o de biomassa mas piora o perfil de etanol e vice-versa;
- parâmetro K_{La} - influencia de modo contrário o perfil de biomassa e de etanol, isto é, melhora o de biomassa mas piora o perfil de etanol e vice-versa;
- parâmetro K_s - só influencia o perfil de glucose;
- parâmetro K_o - influencia de modo contrário o perfil de biomassa e de etanol, isto é, melhora o de biomassa mas piora o perfil de etanol e vice-versa;
- parâmetros K_e e K_i - não influenciam nenhum dos perfis;
- rendimentos - os rendimentos que afectam os perfis são $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$, $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$.

Com esta nova análise (de que se dispensou o traçado gráfico para não se tornar fastidioso), tentou-se melhorar o ajuste obtido na EXPC03. Assim, com os valores estimados de q_s^{max} e q_o^{max} procedeu-se à estimativa conjunta dos rendimentos $Y_{x/s}^r$ e $Y_{x/e}^r$. A Figura 4.37 apresentam os novos perfis de biomassa, glucose e etanol.

Comparando estes perfis com os representados na Figura 4.26, referentes à estimativa de q_s^{max} e q_o^{max} , verifica-se uma melhoria significativa nos ajustes.

Seguidamente, com os quatro parâmetros estimados, repetiu-se o processo mas estimando os valores de $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ (Figura 4.38).

Verifica-se, ainda neste caso, uma melhoria significativa nos ajustes.

De salientar que, os seis parâmetros ajustados foram estimados dois a dois.

Ensaiou-se o mesmo tipo de estudo para as experiências EXPC01 e EXPC04. Nestes casos não se observaram alterações significativas no modelo, pelo que se abstém de apresentar os resultados obtidos.

Globalmente, é aparente uma variabilidade do comportamento metabólico dos microorganismos, que terá, do ponto de vista matemático, uma relação com a variabilidade de parâmetros característicos, concretamente, de coeficientes de rendimento.

Este problema, de algum conhecimento escondido neste tipo de processos, tem vindo a ser estudado, a nível mundial, recorrendo a formulações de modelos diversos dos mecanísticos, que dão origem aos chamados modelos híbridos (Lübbert e Simutis, 1994; Fayo de Azevedo *et al.*, 1997).

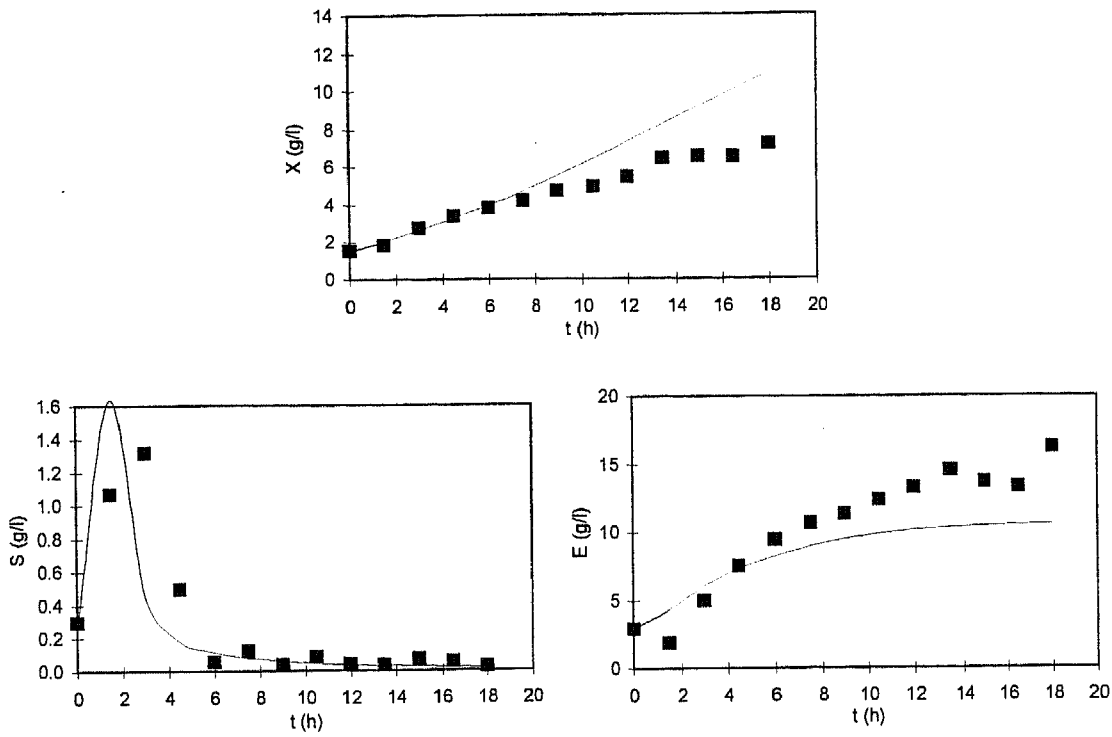


Figura 4.37 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os valores estimados de q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$

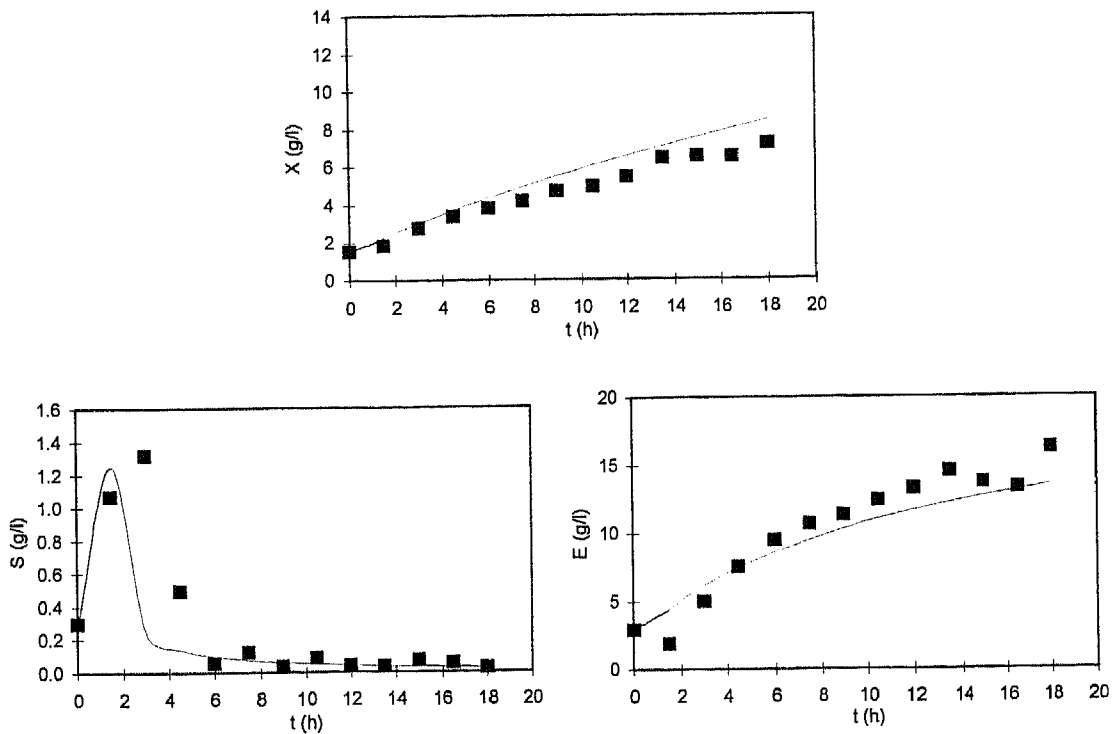


Figura 4.38 Perfis de biomassa, glucose e etanol para a EXPC03 com os valores estimados de q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$, $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$

Simulações com os parâmetros estimados

Com o objectivo de comparar qual a influência dos parâmetros estimados, q_s^{max} e q_o^{max} , nos perfis das variáveis de estado realizaram-se duas simulações nas mesmas condições, variando apenas o valor desses mesmos parâmetros cinéticos. Trata-se de simulações a caudal de alimentação constante e igual a 0.12 l/h, concentração de glucose nessa corrente de 30 g/l, volume inicial no reactor de 2 l, com duração de 20 horas. No caso 1 (f1 no gráfico), utilizaram-se os valores da literatura, 3.5 e 0.256, e no caso 2 (f1m no gráfico), os valores estimados anteriormente, 3.74 e 0.137, respectivamente. A Figura 4.39 apresenta os perfis comparativos obtidos para biomassa, glucose, etanol e oxigénio.

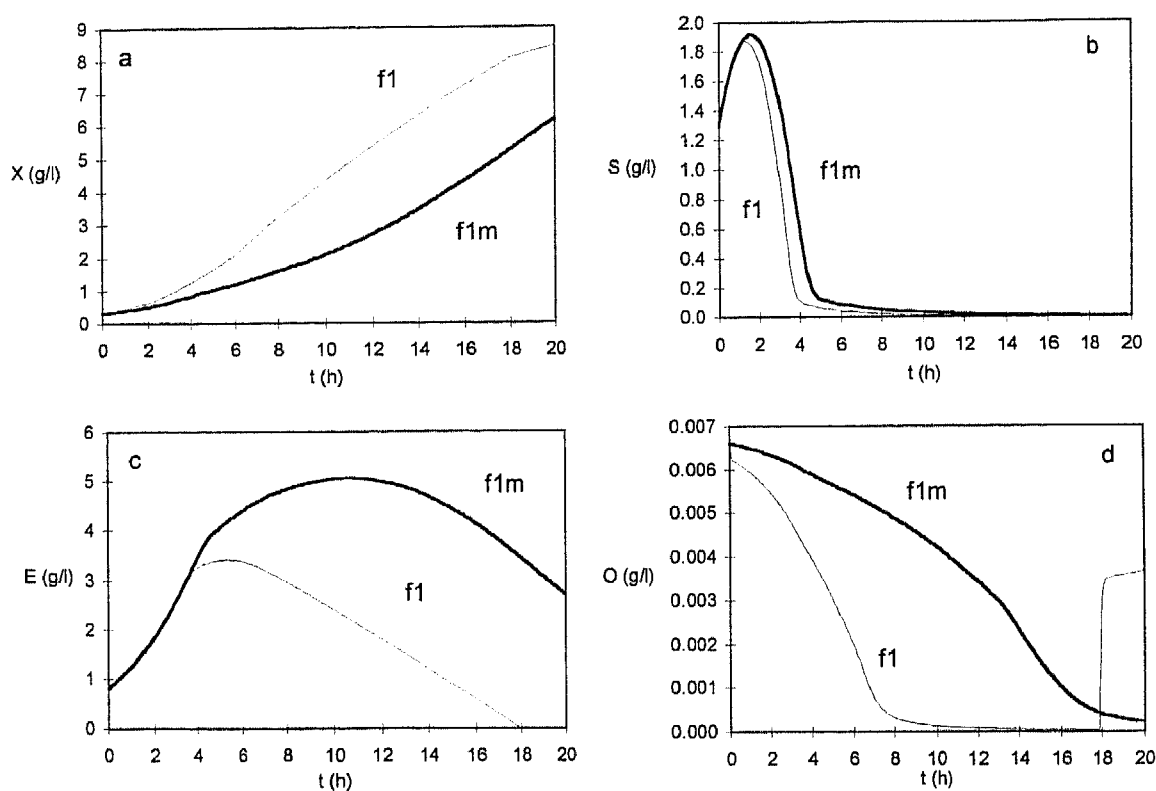


Figura 4.39 Perfis de a) biomassa, b) glucose, c) etanol e d) oxigénio para o caso f1 - valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura e para o caso f1m - valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados

Os valores de q_s^{max} da literatura e estimados são aproximadamente iguais (diferenças de 6%) enquanto que os de q_o^{max} são substancialmente diferentes (cerca de 50%). A taxa específica máxima de consumo de oxigénio estimada é menor que a da literatura, pelo que a quantidade de oxigénio disponível no meio é superior (Figura 4.39-d). Assim sendo, como se consome menos oxigénio, também serão maiores as quantidades de glucose e etanol em

solução - consumo de substratos inferior. Como consequência a quantidade de biomassa produzida é inferior à prevista pelo modelo da literatura (30% menos).

4.7.3 Análise em regime de alimentação de melaços

Apresenta-se, de seguida, a análise dos resultados obtidos nas experiências realizadas utilizando melaços como fonte de carbono (EXPE01, EXPE02 e EXPE04).

As experiências decorreram segundo condições e procedimento mencionados no capítulo 3. A fermentação EXPE02 foi efectuada a caudal de alimentação constante (0.15 l/h), decorrendo as outras segundo alimentação programada (o modo de programação do caudal encontra-se fora do âmbito deste capítulo; no capítulo 6 apresenta-se em detalhe o seu cálculo) e com uma concentração de substrato na corrente de alimentação de 13 g/l e com um volume inicial do fermentador de 2 l.

O modelo teórico aplicado, incluindo o modelo cinético, é o mesmo utilizado nas simulações em regime de alimentação de glucose. Considerou-se a soma dos três açúcares presentes (sacarose, frutose e glucose) como sendo apenas um substrato.

4.7.3.1 Resultados por simulação versus valores experimentais

Para cada experiência simularam-se duas situações: caso 1, utilização dos parâmetros cinéticos da literatura e caso 2, utilização dos valores médios de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para o regime de alimentação de substrato simples.

Da Figura 4.40 à Figura 4.42 apresentam-se os perfis de biomassa, substrato e etanol obtidos experimentalmente e nos dois casos de simulação, para as três experiências em estudo.

Em todas as experiências a utilização dos valores estimados para a glucose levam a resultados inferiores aos obtidos com os parâmetros da literatura, especialmente nos perfis de etanol. Em todos existe, também, um desvio final entre os valores experimentais e os do modelo teórico.

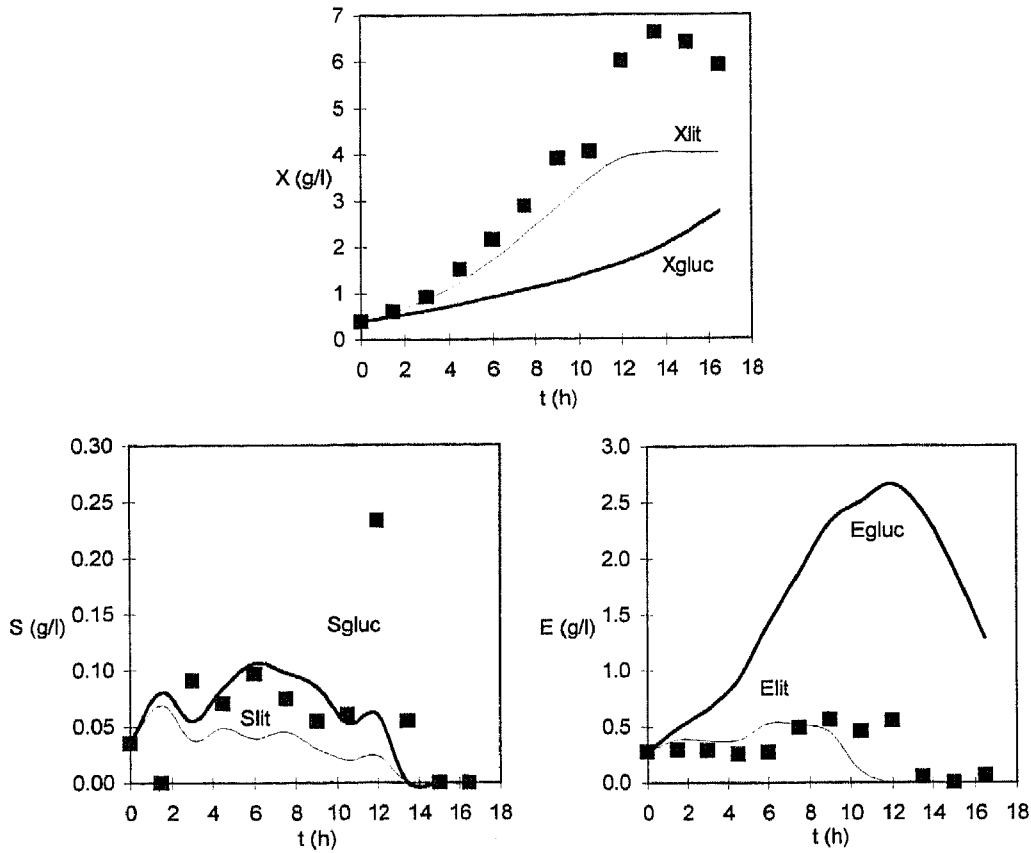


Figura 4.40 EXPE01 - perfis de biomassa, substrato e etanol para o caso de valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura (lit) e de valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para a glucose(gluc)

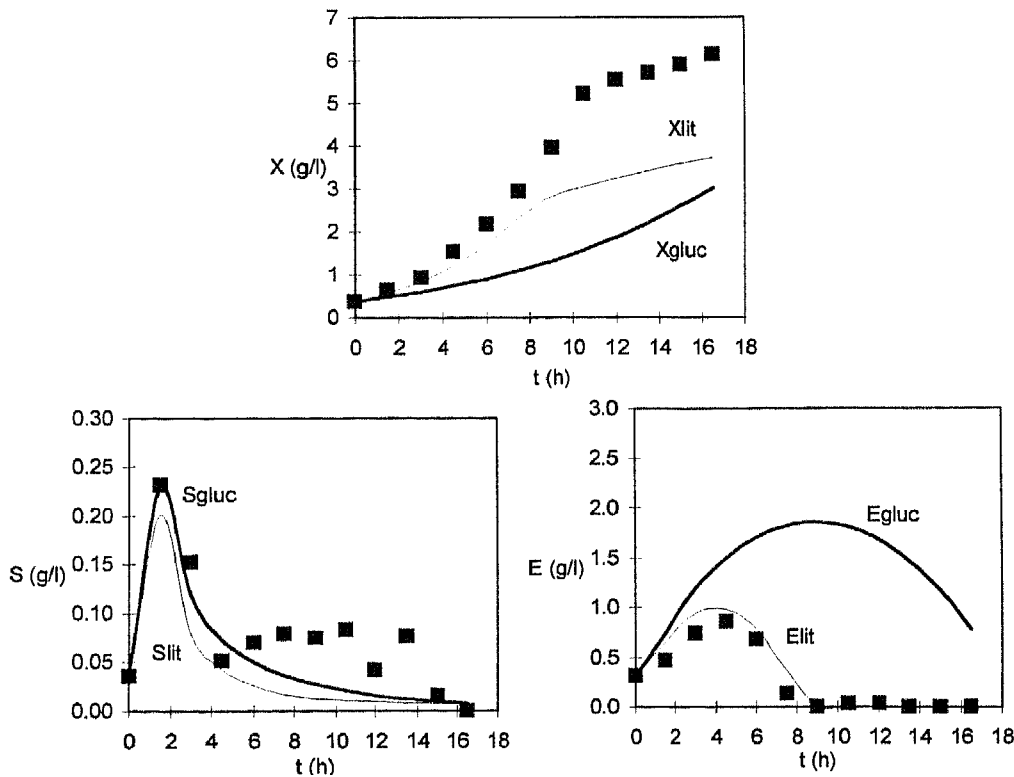


Figura 4.41 EXPE02 - perfis de biomassa, substrato e etanol para o caso de valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura (lit) e de valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para a glucose (gluc)

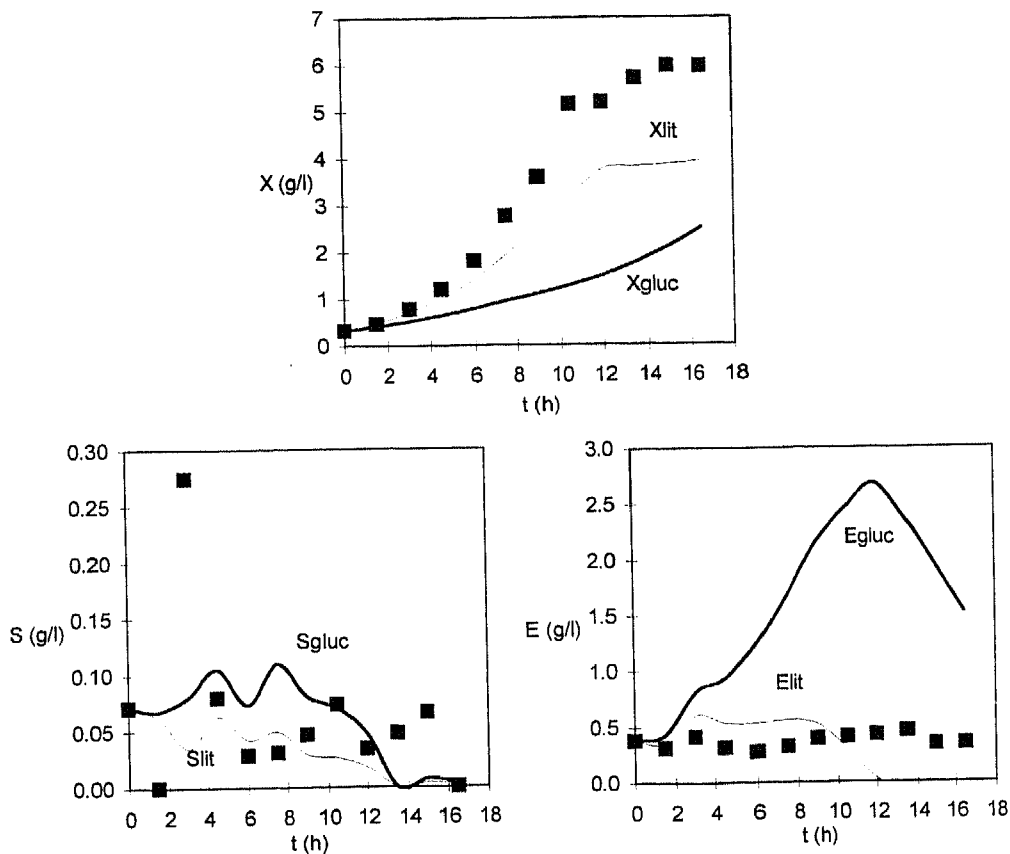


Figura 4.42 EXPE04 - perfis de biomassa, substrato e etanol para o caso 1 - valores de q_s^{max} e q_o^{max} da literatura (lit) e para o caso 2 - valores de q_s^{max} e q_o^{max} estimados para a glucose (gluc)

4.7.3.2 Estimativa de parâmetros

Para as experiências EXPE01, EXPE02 e EXPE04 procedeu-se à estimativa de parâmetros cinéticos e rendimentos de modo a ajustar o modelo aos resultados experimentais. Foram estimados simultaneamente os parâmetros q_s^{max} e q_o^{max} ; com os valores obtidos, procedeu-se à estimativa conjunta dos rendimentos $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$.

De igual forma, estimaram-se os rendimentos $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$, o parâmetro cinético para a taxa específica máxima de crescimento em etanol, μ_e^{max} , e o coeficiente global de transferência de massa, $K_L a$. Estes foram os escolhidos por serem os que eventualmente afectariam os perfis das variáveis de estado.

Nas Tabela 4.14 a Tabela 4.16 figuram os valores obtidos para a função objectivo e o erro médio em cada corrida de estimação de parâmetros para as experiências EXPE01, EXPE02 e EXPE04, respectivamente.

Pela análise das tabelas verifica-se que a influência dos parâmetros μ_e^{max} e $K_{L,a}$ no modelo adoptado é nula, sendo, também, a influência dos rendimentos $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$ só notória na EXPE04.

Tabela 4.14 EXPE01-Valores da função objectivo nas corridas de estimativa de parâmetros

Parâmetro estimado	Literatura	q_s^{max}, q_o^{max}	$Y_{x/s}^o, Y_{x/o}^o$	$Y_{x/s}^r, Y_{x/e}^r$	μ_e^{max}	$K_{L,a}$
F. objectivo	9.14	7.30	3.69	3.69	3.69	3.69
Erro Médio	0.504	0.450	0.320	0.320	0.320	0.320

Tabela 4.15 EXPE02-Valores da função objectivo nas corridas de estimativa de parâmetros

Parâmetro estimado	Literatura	q_s^{max}, q_o^{max}	$Y_{x/s}^o, Y_{x/o}^o$	$Y_{x/s}^r, Y_{x/e}^r$	μ_e^{max}	$K_{L,a}$
F.objectivo	10.86	6.77	6.71	6.70	6.70	6.70
Erro Médio	0.549	0.434	0.431	0.431	0.431	0.431

Tabela 4.16 EXPE04-Valores da função objectivo nas corridas de estimativa de parâmetros

Parâmetro estimado	Literatura	q_s^{max}, q_o^{max}	$Y_{x/s}^o, Y_{x/o}^o$	$Y_{x/s}^r, Y_{x/e}^r$	μ_e^{max}	$K_{L,a}$
F.objectivo	11.13	10.26	7.49	7.41	7.42	7.42
Erro Médio	0.556	0.534	0.456	0.454	0.454	0.454

Da Figura 4.43 à Figura 4.45 apresentam-se os perfis de biomassa, substrato e etanol experimentais e os obtidos com a estimativa dos parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ nas três experiências estudadas.

Em todos os perfis de biomassa observa-se um desvio na fase final de operação entre o modelo e os valores experimentais. Em relação aos perfis de substrato, os desvios são mais acentuados; neste caso pensa-se que as pequenas quantidades de açúcares presentes em solução possam provocar erros nas medições experimentais. A aplicação do modelo de um substrato a experiências em regime de alimentação de melaços, considerando a soma dos vários açúcares como sendo um só substrato, é tão (ou tão pouco) válida como no caso do regime de alimentação com glucose pura.

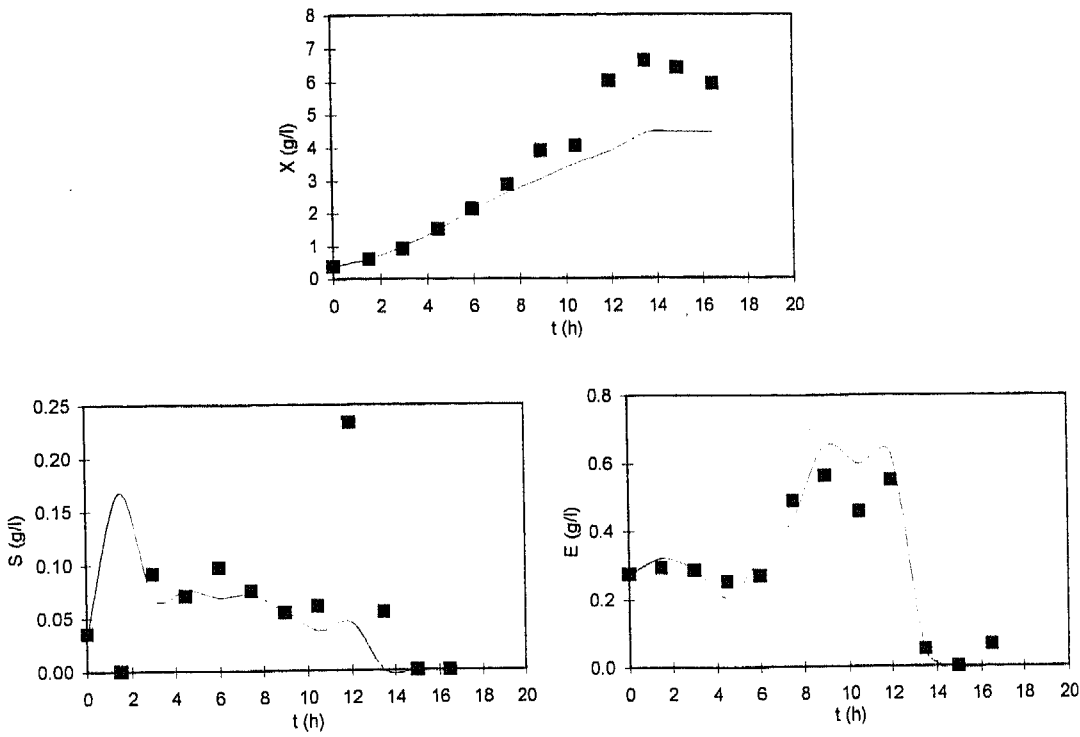


Figura 4.43 EXPE01 - perfis de biomassa, substrato e etanol com os parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ estimados

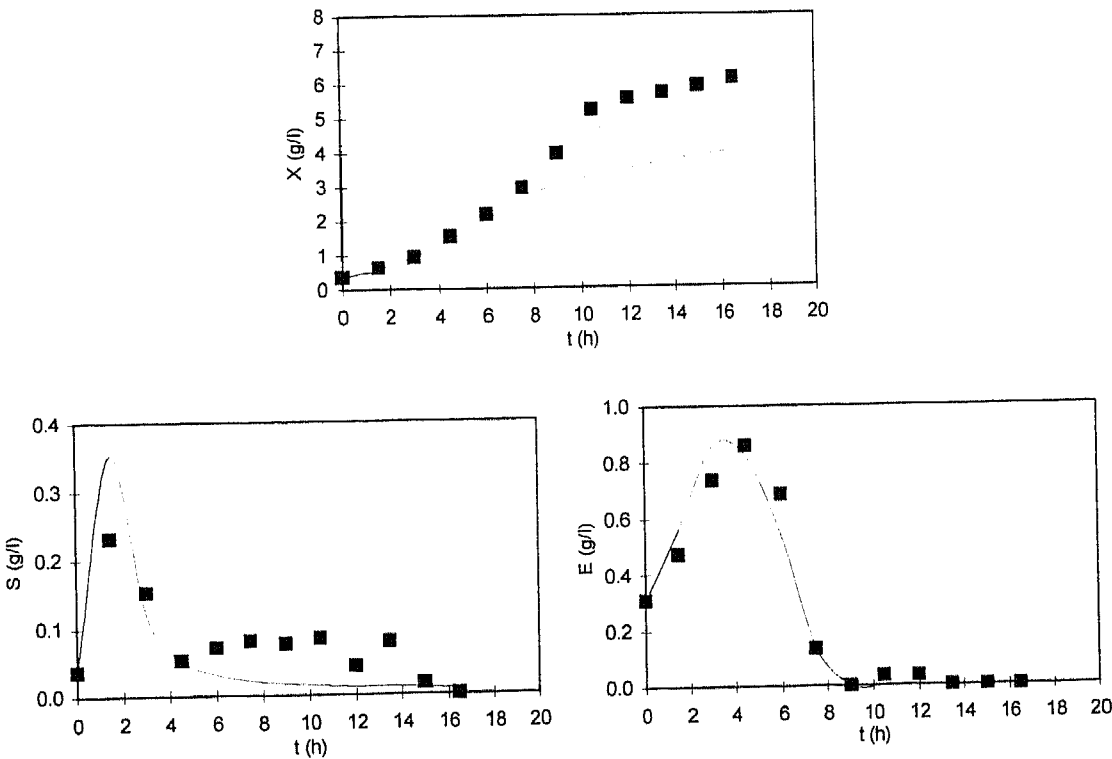


Figura 4.44 EXPE02 - perfis de biomassa, substrato e etanol com os parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ estimados

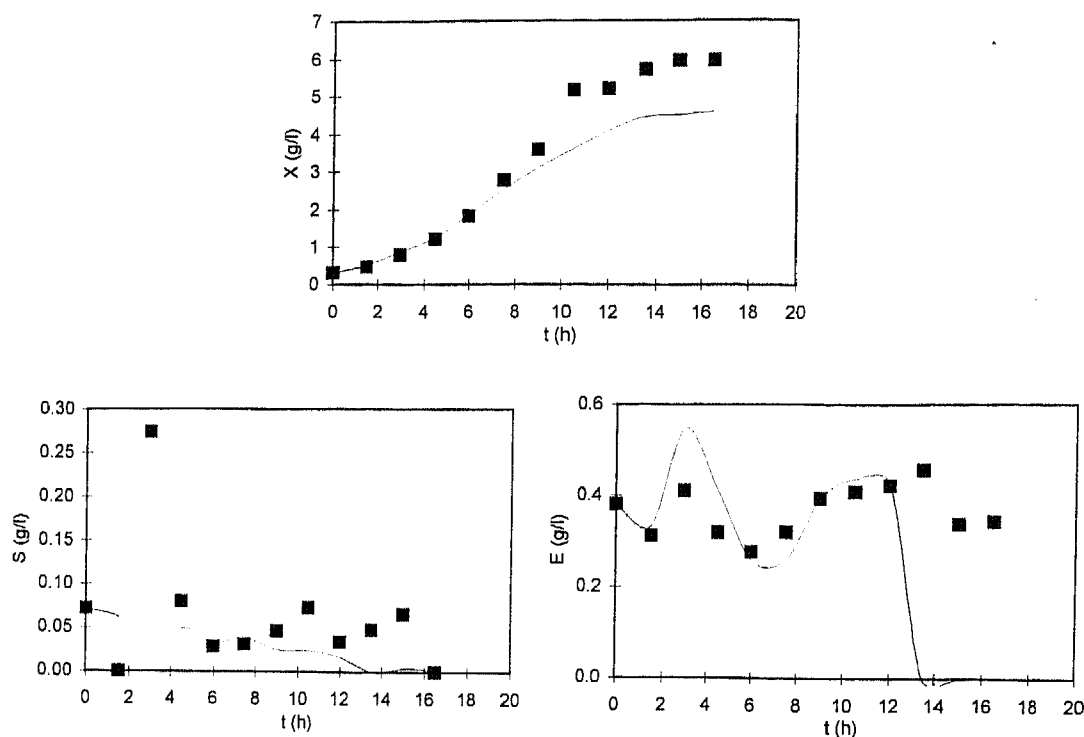


Figura 4.45 EXPE04 - perfis de biomassa, substrato e etanol com os parâmetros q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ estimados

A Tabela 4.17 apresenta os valores obtidos para os oito parâmetros estimados nas experiências EXPE01, EXPE02 e EXPE04, bem como o valor médio e os valores da literatura para corridas com glucose pura.

Tabela 4.17 Parâmetros estimados nas experiências EXPE01, EXPE02 e EXPE04

Caso	q_s^{max}	q_o^{max}	$Y_{x/s}^o$	$Y_{x/o}^o$	$Y_{x/s}^r$	$Y_{x/e}^r$	μ_e^{max}	K_{La}
EXPE01	3.02	0.268	0.568	0.84	0.060	0.119	0.164	100.2
EXPE02	2.55	0.275	0.530	0.88	0.037	0.079	0.175	100.1
EXPE04	3.33	0.270	0.589	0.96	0.002	0.004	0.170	99.2
Média	2.97	0.271	0.562	0.89				
Literatura	3.5	0.256	0.49	1.2	0.05	0.1	0.17	100

De referir que não foi considerada a média dos parâmetros $Y_{x/s}^r$, $Y_{x/e}^r$, μ_e^{max} e o coeficiente global de transferência de massa, K_{La} , por não serem relevantes no modelo em estudo.

Simulação com os valores médios dos parâmetros estimados

Com os valores médios de q_s^{max} , q_o^{max} , $Y_{x/s}^o$ e $Y_{x/o}^o$ obtidos anteriormente repetiram-se as simulações, com o objectivo de verificar se o valor médio é mais eficiente no ajuste do modelo aos resultados experimentais do que o valor da literatura.

Da Figura 4.46 à Figura 4.48 apresentam-se os perfis de biomassa, substrato e etanol para cada experiência obtidos com os parâmetros da literatura (lit no gráfico), com os valores estimados (opt no gráfico) e com o valores médios os parâmetros estimados (med no gráfico).

A utilização do valor médio dos parâmetros em estudo não origina diferenças significativas nos perfis das variáveis de estado.

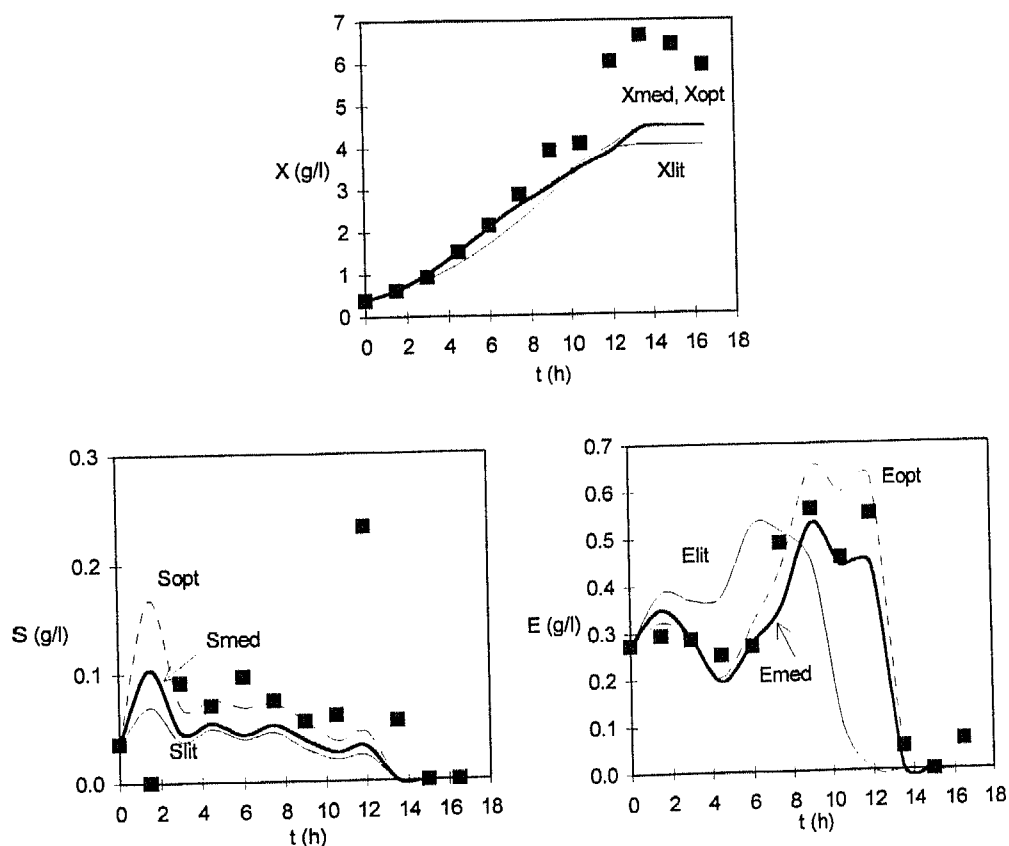


Figura 4.46 Perfis de biomassa, substrato e etanol para a EXPE01 com os parâmetros da literatura (lit), com os valores estimados (opt) e com o valor médio dos parâmetros estimados (med)

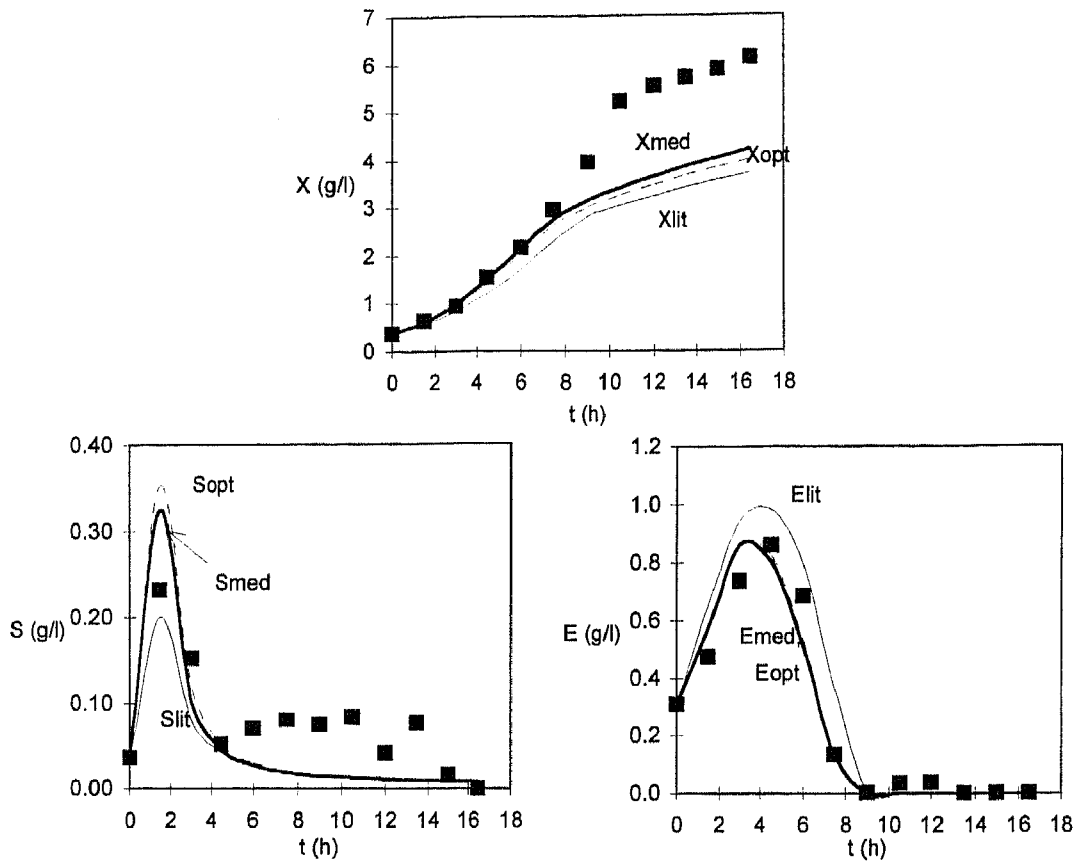


Figura 4.47 Perfis de biomassa, substrato e etanol para a EXPE02 com os parâmetros da literatura (lit), com os valores estimados (opt) e com o valor médio dos parâmetros estimados (med)

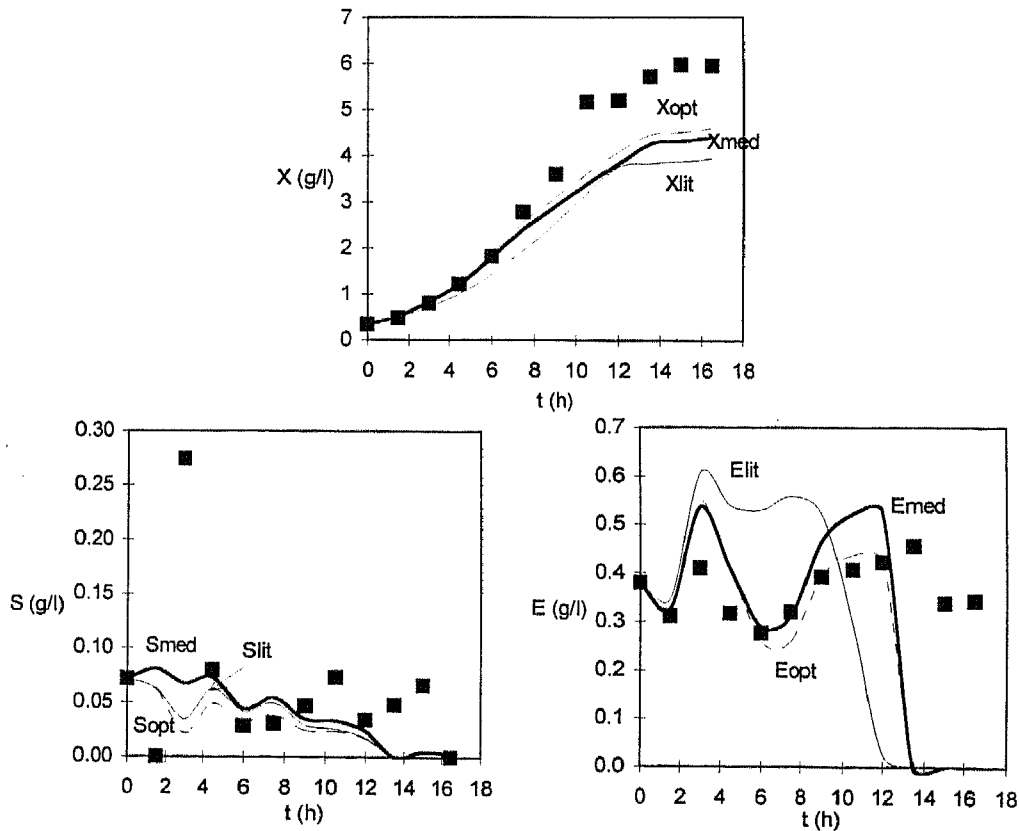


Figura 4.48 Perfis de biomassa, substrato e etanol para a EXPE04 com os parâmetros da literatura (lit), com os valores estimados (opt) e com o valor médio dos parâmetros estimados (med)

4.8 Conclusões

Em termos laboratoriais, apresentou-se o modelo matemático determinístico genérico para um reactor semi-contínuo. O modelo engloba equações de balanço, de transferência de massa e equações cinéticas. A metodologia foi aplicada ao processo de produção de fermento de padeiro.

O modelo teórico foi testado por simulação, através de programas desenvolvidos em *Fortran 77*. Efectuou-se um estudo comparativo entre os resultados obtidos por simulação e os valores experimentais em corridas efectuadas em ciclo aberto quer em regime de alimentação com glucose pura quer com melaços. Este estudo englobou uma análise de sensibilidade heurística e estimativa de parâmetros do modelo. Os parâmetros ajustados foram as taxas máximas de consumo de glucose e etanol.

A hipótese efectuada nas corridas em regime de alimentação de melaços, de considerar a concentração de substrato como a soma da concentração dos açúcares presentes em solução, originou um comportamento equivalente ao apresentado pelas corridas em regime de glucose pura.

Tudo indica que o problema da modelização de processos de fermentação deva ser encarado de forma diversa relativamente à abordagem mecanística clássica. A inerente variabilidade do comportamento dos microorganismos leva à necessidade de captura de conhecimento do processo, que se pode considerar como 'conhecimento escondido'. A utilização crescente de métodos que combinam a aproximação mecanística com métodos da área da Inteligência Artificial é apontada como uma área de futuro na resolução destes problemas.

4.9 Bibliografia

- Bailey, J., Ollis, D., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, New York, 1986.
- Barford, J., A General Model for Aerobic Yeast Growth: Batch Growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 907-920, 1990a.
- Barford, J., A General Model for Aerobic Yeast Growth: Continuous Culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 921-927, 1990b.
- Barford, J., Hall, R. A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1735-1762, 1981.

- Bastin, G., Dochain, D. *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.
- Bellgardt, K., Kuhlmann, W., Meyer, H. Deterministic Growth Model of *Saccharomyces cerevisiae*, Parameter Identification and Simulation, in *Proceedings of the IFAC Modelling and Control of Biotechnical Processes.*, Helsinki, 67-74, 1982.
- Bijkerk, A., Hall, R. A Mechanistic Model of the Aerobic Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioengng.*, 19, 267-296, 1977.
- Chen, L. *Modelling, Identifiability and Control of Complex Biotechnological Systems*, Dissertação de Doutorado, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, 1992.
- Enfors, S.-O., Hedenberg, J., Olsson, K. Simulation of the Dynamics in the Baker's Yeast Process. *Bioprocess Eng.*, 5, 191-198, 1990.
- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutorado, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Feyo de Azevedo, S., Dahm, B., Oliveira, F., Hybrid Modelling of Biochemical Processes: A Comparison with the Conventional Approach, *Computers and Chem. Engng.*, 21 suppl, S751-S756, 1997.
- Foust, A., Wenzel, L., Clump, C., Maus, L., Andersen, L. *Principles of Unit Operations*, John Wiley & Sons, New York, 1990.
- Grosz, R., Stephanopoulos, G., Physiological, Biochemical and Mathematical Studies of Micro-aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* I. Hysteresis, Oscillations and Maximum Specific Ethanol Productivities in Chemostat Culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1006-1019, 1990a.
- Grosz, R., Stephanopoulos, G., Physiological, Biochemical and Mathematical Studies of Micro-aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* II. Intracellular Metabolite and Enzyme Assays at Steady State Chemostat Culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1020-1029, 1990b.
- Grosz, R., Stephanopoulos, G., Physiological, Biochemical and Mathematical Studies of Micro-aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* III. Mathematical Model of Cellular Energetics and Catabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1030-1040, 1990c.
- Incropera, F., de Witt, D. *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*, John Wiley, Chichester, 1990.
- Jones, R.P., Greenfield, P.F. Effect of Carbon Dioxide on Yeast Growth and Fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 4, 210-223, 1982.
- Hall, R., Barford, J Simulation of the Integration of the Internal Energy Metabolism and the Cell Cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioengng.*, 23, 1763-1795, 1981.
- Heinzle, E., Dunn, I.J. Methods and Instruments in Fermentation Gas Analysis. *Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2ª ed., (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), vol. 4: Measuring, Modelling and Control (K. Schügerl, Ed. vol.), VCH, Weinheim, cap. 2, 27-74, 1991.
- Kishoni, E., Internal Report, Delft University of Technology, 1988.
- Koren, D., Duvnjak, Z. Kinetics of Selective Fermentation of Glucose from Glucose/Fructose Mixtures using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. *Acta Biotechnol.*, 35, 4, 311-322, 1993.
- Kristiansen., B. (Ed.), *Integrated Design of a Fermentation Plant-The Production of Baker's Yeast*, VCH, Weinheim, 1993.
- Lübbert, A., Simutis, R., Using Measurement Data in Bioprocess Measurement and Control, *Trends in Biotechnol.*, 12, 304-311, 1994.
- Monod, J. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*, Hermann, Paris, 1942.

- Nielsen, J., Villadsen, J. Modelling of Microbial Kinetics. *Chem. Eng. Sci.*, 47:17/18, 4225-4270, 1992.
- Nielsen, J., Villadsen, J. *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, 1994.
- Pamment, N., Hall, R., Barford, J. Mathematical Modelling of Lag Phases in Microbial Growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 318-349, 1978.
- Pomerleau, Y., Perrier, M., Estimation of Multiple Specific Growth Rates in Bioprocesses, *A.I.Ch.E. J.*, 36:2, 207-215, 1990.
- Rocha, C. *Optimização de Estratégias de Alimentação para Identificação de Parâmetros de um Modelo de Fermento de Padeiro*, Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Portugal, 1996.
- Royce, P.N.C., Thornhill, N.F. Estimation of Dissolved Carbon Dioxide Concentrations in Aerobic Fermentations. *A.I.Ch.E. J.*, 37:11, 1680-1686, 1991.
- Sonnleitner, B., Käpelli, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 927-937, 1986.
- Stanbury, P., Whitaker, A. *Principles of Fermentation Technology*, 2^a ed., Pergamon Press, 1984.
- Steinmeyer, D., Shuler, M. Structured Model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Engng. Sci.*, 44, 2017-2030, 1989.
- Sweere, A.P.J., Matla, Y.A., Zandvliet, J., Luyben, K.Ch.A.M., Kossen, N.W.F. Experimental Simulation of Glucose Fluctuations: the Influence of Continually Changing Glucose Concentrations on the Baker's Yeast Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 109-115, 1988.
- Tsuchiya, T., Fredrickson, A., Aris, R., J. H., Dynamics of Microbial Cell Populations, *Advances in Chemical Engineering*, 6, 125-132, 1966.
- Villadsen, J., Nielsen, J. Modelling of Fermentation Kinetics, in *Proceedings of European Congress Biotechnology.*, Copenhagen, 259-266, 1990.

5. Observação do estado e estimativa das cinéticas

Sumário

Neste capítulo são apresentados os algoritmos para a observação do estado e a estimativa das cinéticas aplicados ao caso da produção de fermento de padeiro.

Estudaram-se por simulação e experimentalmente três opções de pares de medidas para a observação do estado.

Foi verificada a sensibilidade do método a erros nas medições, através de estudos em linha e/ou em diferido.

- 5.1 Introdução
 - 5.2 Algoritmos para observação do estado
 - 5.3 Algoritmos para estimativa das cinéticas
 - 5.4 Aplicação ao fermento de padeiro
 - 5.5 Resultados por simulação
 - 5.6 Resultados experimentais
 - 5.7 Conclusões
 - 5.8 Bibliografia
-

5.1 Introdução

As exigências para melhorar a qualidade de um produto e para maximizar a produtividade de um processo de fermentação exigem, normalmente, informação fiável e em-linha das variáveis do processo. A instalação de instrumentação é uma possível solução para esta necessidade. No entanto, ela pode implicar custos proibitivos e/ou, com a tecnologia disponível, as medições em-linha podem não ser fiáveis.

Embora se fale da dificuldade de medição de algumas variáveis em processos biológicos, este mesmo problema existe noutras indústrias, nomeadamente, nas indústrias alimentares, de polimerização, em processos de polimerização e separação (Di Massimo *et al.*, 1993).

Na maioria das indústrias de fermentação, as estratégias de controlo baseiam-se em medições em diferido para a supervisão do processo. Isto implica, a recolha de amostras do fermentador, a análise no laboratório e finalmente a actuação no processo, manualmente ou pelo sistema de controlo, de modo a corrigir eventuais desvios. Esta estratégia tem consequências no controlo do sistema. A análise em diferido exige um laboratório de suporte e um operador qualificado, exigências essas que se traduzem em custos de operação elevados. Assim sendo, a frequência de amostragem é reduzida. Como resultado, o operador actua no processo face a informações atrasadas, o que pode levar a um controlo deficiente (Di Massimo *et al.*, 1993).

Halme (1987) apresenta os problemas nas medições e na estimação nos processos biológicos, indicando três modos de reduzir as dificuldades encontradas:

- sensores mais eficientes;
- sistemas de amostragem e análise automáticos;
- estimação das variáveis que não são mensuráveis em-linha.

As três áreas têm sido alvo de estudo e de intensa investigação. Neste trabalho estudaram-se por simulação e experimentalmente algumas técnicas de estimação do estado e das cinéticas.

O método mais simples, mas também o menos robusto, é obter a estimação de uma variável não-mensurável através de correlações de variáveis facilmente medidas, ignorando

ruídos e erros nas leituras (Maher *et al*, 1995). Em relação às cinéticas de crescimento, uma técnica simples é adoptar uma estrutura analítica e calibrar os respectivos coeficientes cinéticos a partir de dados experimentais. No entanto, esta técnica é muitas vezes incerta, devido à difícil reprodutibilidade de experiências. Os processos biológicos podem variar no tempo, mesmo que as condições ambientais permaneçam constantes (Gee e Ramirez, 1996). A razão para este facto é que estes processos envolvem organismos vivos com a capacidade de adaptação e mudança independentemente das condições ambientais. Em 12-15 gerações, as características de fermentação de uma estirpe podem ser alteradas, resultando num produto completamente diferente. Existem na literatura (Bastin e Dochain, 1990) várias expressões analíticas que entram em consideração com a limitação e/ou inibição do crescimento por algumas variáveis do processo.

Desde o início dos anos 80 têm surgido na literatura, técnicas numéricas para a estimação do estado e das cinéticas. Os processos de fermentação são inerentemente não-lineares, de modo que os algoritmos de estimação deverão ser baseados em estruturas não-lineares, ou aproximados a um modelo linear com adaptação.

Uma técnica de estimação típica é o filtro de Kalman estendido (Dekkers, 1983; Stephanopoulos e San, 1984; Bellgardt *et al*, 1986; Pons e Engasser, 1989; Lee, 1990; Stephanopoulos e Park, 1991; Agarwal e Bonvin, 1991; Tham *et al*, 1991; Estler, 1995; Gee e Ramirez, 1996). No entanto, é sabido que esta metodologia é por vezes difícil de aplicar a problemas que envolvam sistemas não-lineares, de parâmetros variantes no tempo, em particular na presença de medições com ruído (Ljung, 1987). Além de que a estabilidade e a convergência do método não é garantida. Outras desvantagens apresentadas pelo método consistem na necessidade de dispor à priori de bastantes dados do processo, incluindo dados estatísticos, além da estrutura do algoritmo ser complexa (Cazzador e Ljubenova, 1995).

Dochain e Bastin (1984) exploraram a estrutura não-linear do processo biológico de forma a desenvolver um observador não-linear de estabilidade garantida (Dochain e Bastin, 1986; Flaus *et al*, 1989; Pomerleau e Perrier, 1990, 1992; Ljubenova e Ignatova, 1994; Oliveira *et al*, 1995, 1996). Os recentes desenvolvimento de técnicas de observação com base em modelos e estimadores de parâmetros com base em observadores poderão ultrapassar as dificuldades de falta de informação e/ou tecnologia apropriada de medida.

Nos últimos anos tem surgido um enorme interesse na aplicação de redes neuronais artificiais a processos de fermentação. Além da possibilidade da rede lidar com não-linearidades do processo, outras características consistem na capacidade de se ajustar dinamicamente às variações ambientais e/ou de parâmetros, na possibilidade de inferir regras gerais a partir de exemplos específicos e em reconhecer invariâncias em dados complexos de grande dimensão. Dados uma série de exemplos, a rede consegue estabelecer as relações entre os dados de treino. Um estimador genericamente estruturado baseado em redes neuronais poderá ter grande aplicação em esquemas de estimação de estado e cinéticas (Thibault *et al.*, 1990; Linko e Zhu, 1991; Karim e Rivera, 1992; Di Massimo *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Montague e Morris, 1994, Teissier *et al.*, 1996).

A utilização de lógica difusa tem tido, também, aplicação no campo da estimação de estado e de parâmetros em processos biológicos (Simutis *et al.*, 1992a, 1992b, 1993).

Mais recentemente fala-se na aplicação de modelos híbridos na estimação de parâmetros (Lübbert e Simutis, 1994; Fu e Barford, 1994; Saxén e Saxén, 1996). Este tipo de formulação combina modelos do processo com base em balanços materiais com a aplicação de redes neuronais artificiais na determinação das taxas cinéticas de crescimento. No momento de escrita do presente trabalho, foi publicado um artigo do Grupo, em que a autora colaborou, sobre a utilização de modelos híbridos na determinação das cinéticas de crescimento (Feyo de Azevedo *et al.*, 1997).

Outras técnicas simples têm sido propostas para a estimação da biomassa. Beluhan *et al.* (1995) desenvolveram um método de observação em linha de biomassa, com base nas equações de manutenção. As variáveis de entrada do observador são as concentrações de oxigénio e de dióxido de carbono na corrente gasosa de saída do fermentador. Os parâmetros do modelo necessários para um desempenho eficiente do observador são os coeficientes de rendimento. Cazzador e Ljubenova (1995) desenvolveram um estimador adaptativo estável para a taxa específica de crescimento, com base na medição da taxa de consumo de oxigénio. Petkov e Davis (1996) apresentam um procedimento para estimar a biomassa em fermentações descontínuas a partir da análise da corrente gasosa de saída. Utilizaram, primeiro, o coeficiente respiratório e depois uma modificação da taxa de consumo de oxigénio para estimar biomassa.

5.2 Algoritmos para observação do estado

No presente trabalho estudaram-se teórica e experimentalmente os algoritmos de observação do estado inicialmente propostos por Bastin e Dochain (1990), os quais se baseiam no *modelo dinâmico geral de reactores biológicos*, apresentado no capítulo 4.

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi, t) - D\xi + F - Q \quad (5.1)$$

Seja, então, que são conhecidas por medida directa p variáveis de estado, definidas pelo vector ξ_1 .

Um observador do estado consiste num algoritmo para reconstruir as variáveis de estado não medidas em-linha, ξ_2 (de dimensão $n-p$), a partir das variáveis medidas, ξ_1 (de dimensão p). Neste processo, admitem-se conhecidos os coeficientes de rendimento (matriz K de dimensão $n \times m$) e, também por medição em linha a taxa de diluição D e os vectores F e Q . As taxas de reacção $\varphi(\xi)$ são desconhecidas. Como condição de aplicabilidade do método, dever-se-á ter o número p de variáveis de estado medidas igual ou superior à característica da matriz K (*Característica* (K)= r).

Defina-se uma partição do vector de estado em duas partes ξ_1, ξ_2 como:

$$\begin{bmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \end{bmatrix} = L\xi \quad (5.2)$$

em que L é uma matriz $n \times n$ de permutação de linhas tal que as correspondentes partições induzidas de K, F e Q são escritas como:

$$\begin{bmatrix} K_1 \\ K_2 \end{bmatrix} = LK, \quad \begin{bmatrix} F_1 \\ F_2 \end{bmatrix} = LF, \quad \begin{bmatrix} Q_1 \\ Q_2 \end{bmatrix} = LQ \quad (5.3)$$

em que $K_1 \in \mathbb{R}^{p \times m}$, $K_2 \in \mathbb{R}^{(n-p) \times m}$, $\xi_1, F_1, Q_1 \in \mathbb{R}^p$ e $\xi_2, F_2, Q_2 \in \mathbb{R}^{(n-p)}$.

O modelo dinâmico geral é reescrito como sendo:

$$\frac{d\xi_1}{dt} = K_1\varphi(\xi_1, \xi_2, t) - D\xi_1 + F_1 - Q_1 \quad (5.4)$$

$$\frac{d\xi_2}{dt} = K_2 \varphi(\xi_1, \xi_2, t) - D\xi_2 + F_2 - Q_2 \quad (5.5)$$

Adicionalmente a condição de o número de variáveis medidas, p , igual ao número de reacções, m , leva a que K_1 seja uma matriz quadrada completa.

Introduzindo a transformação de estado, correspondente a uma mudança linear de coordenadas:

$$Z \equiv A\xi_1 + \xi_2 \quad (5.6)$$

em que a matriz $A \in \mathbf{R}^{(n-r) \times r}$ constitui a solução da seguinte equação matricial

$$AK_1 + K_2 = 0 \quad (5.7)$$

isto é,

$$A = -K_2 K_1^{-1} \quad (5.8)$$

elimina-se o termo ξ_2 , obtendo-se a seguinte forma para o modelo inicial:

$$\frac{dZ}{dt} = -DZ + A(F_1 - Q_1) + (F_2 - Q_2) \quad (5.9)$$

Note-se nesta última equação a ausência explícita do termo relativo às taxas de reacção.

A análise de erro ($\tilde{\xi} = \xi_2 - \hat{\xi}_2$) deste observador conduz a um ponto de equilíbrio ($\tilde{\xi}_2 = 0$) de estabilidade assintótica. A convergência deste algoritmo foi apresentada por Bastin e Dochain (1986) e Ferreira (1995), sendo determinada pelas condições experimentais, nomeadamente pela taxa de diluição.

5.3 Algoritmos para estimativa das cinéticas

Nesta secção apresenta-se o estudo da estimação das cinéticas, para a classe de problemas em que as taxas de reacção são definidas como:

$$\varphi(\xi) \equiv H(\xi)\rho(\xi) \quad (5.10)$$

sendo $H(\xi)$ uma matriz de dimensão $m \times r$ de funções de estado conhecidas e $\rho(\xi)$ um vector

de r funções de estado desconhecidas. É uma situação de aplicabilidade elevada, no qual se inclui o caso específico do fermento de padeiro.

O problema da estimação das taxas de reacção consistirá no projecto de um algoritmo para cálculo de $\rho(\xi, t)$, dados:

- vector de variáveis de estado ξ conhecido ou por medição em linha ou por aplicação de um observador;
- D , F e Q medidos em linha;
- coeficientes de rendimento conhecidos (matriz K);
- matriz $H(\xi)$ de funções conhecidas.

Para resolver este problema, é proposta uma classe de estimadores gerais, baseados no modelo dinâmico geral com observação do estado. A utilização do observador do estado tem o objectivo de fornecer informação para actualização do estimador de $\rho(\xi)$:

Estimador geral para a cinética

$$\frac{d\hat{\xi}}{dt} = KH(\xi)\hat{\rho}(t) - D\xi + F - Q - \Omega_1(\xi - \hat{\xi}) \quad (5.11)$$

$$\frac{d\hat{\rho}}{dt} = \Omega_2(\xi - \hat{\xi}) \quad (5.12)$$

em que $\hat{\rho}$ representa a estimativa em linha de $\rho(\xi)$.

Esta classe de algoritmos é explicada do seguinte modo. A lei de actualização do parâmetro ρ , equação (5.12), é excitada pelo erro $(\xi - \hat{\xi})$ que é suposto reflectir a diferença entre ρ e a sua estimativa $\hat{\rho}$. Esta lei de adaptação pode ser vista como uma variação ao método do gradiente. Assegura-se, assim, que a correcção dos valores estimados se efectue em direcção à maior inclinação do erro de estimação. Referem-se algumas características do algoritmo:

- as matrizes Ω_1 e Ω_2 podem ser dependentes de ξ , mas devem ser estáveis para qualquer $\xi(t)$;
- o valor actual de ξ é utilizado no lado direito da equação (termos $H(\xi)$ e $D\xi$);

iii. o valor desconhecido actual de $\rho(\xi)$ é substituído pela sua estimativa $\hat{\rho}$, actualizada pela equação (5.12).

O projecto do estimador fica completo com a escolha das matrizes de ganhos Ω_1 e Ω_2 que garantam as propriedades desejáveis de estabilidade e convergência do algoritmo.

Referem-se, de seguida, três soluções para a selecção dos ganhos do estimador.

5.3.1 Estimadores *Bastin e Dochain*

Uma solução para a escolha das matrizes de ganhos é dada por Bastin e Dochain (1990) que propõem um estimador baseado num observador (EBO) constituído pelas seguintes equações:

Estimador baseado num observador (Bastin e Dochain, 1990)

$$\frac{d\hat{\xi}}{dt} = KH(\xi)\hat{\rho}(t) - D\xi + F - Q - \Omega(\xi)(\xi - \hat{\xi}) \quad (5.13)$$

$$\frac{d\hat{\rho}}{dt} = [KH(\xi)]^T \Gamma(\xi)(\xi - \hat{\xi}) \quad (5.14)$$

Com referência ao estimador geral (equações (5.11) e (5.12)), nota-se que:

- $\Omega_1 \equiv \Omega$. É uma matriz quadrada ($n \times n$) que depende de ξ e deve ser estável.
- $\Omega_2 \equiv [KH(\xi)]^T \Gamma$. O ganho Γ da equação (5.14) deve ser escolhido tal que a matriz $\Omega^T \Gamma + \Gamma \Omega$ seja definida positivamente.

Normalmente, as matrizes Ω e Γ tomam a seguinte forma, que verifica a última condição (Dochain, 1986):

$$\Omega \equiv \text{diag}\{-\omega_i\}, \quad \Gamma \equiv \text{diag}\{\gamma_j\} \quad \omega_i, \gamma_j \in \mathbb{R}^+ \quad \text{com } i=1,\dots,n \text{ e } j=1,\dots,r \quad (5.15)$$

A sintonização do estimador reduz-se à calibração, por tentativa e erro, dos escalares ω_i e γ_j .

Esta escolha particular é devida a razões de estabilidade do sistema de erros que apresenta uma estrutura linear variante no tempo (LVT). Aqueles autores demonstram a estabilidade do estimador, baseando-se na teoria da estabilidade para sistemas LVT e na teoria da persistência da excitação (Narendra e Annaswamy, 1989; Goodwin e Sin, 1984).

5.3.2 Estimador Pomerleau e Perrier

O estimador da cinética baseia-se num subconjunto de r equações do modelo completo de espaço de estados com a condição de incluir todos os r parâmetros que necessitam ser estimados (este subconjunto é referenciado pelo índice s). Nesta situação as matrizes de ganhos são quadradas com dimensão r .

Adopta-se uma reformulação do modelo dinâmico considerando a seguinte transformação

$$\psi \equiv K_s^{-1} \xi_s \quad (5.16)$$

em que a matriz K_s tem dimensão $r \times m$.

Esta transformação é introduzida para desacoplamento do modelo dinâmico (5.1) relativamente às taxas de reacção (Pomerleau e Perrier, 1990). Assim, o modelo dinâmico geral transforma-se na seguinte equação:

$$\frac{d\psi}{dt} = H(\xi)\rho(\xi) - D\psi + K_s^{-1}(F_s - Q_s) \quad (5.17)$$

O estimador é reescrito da seguinte maneira:

Estimador baseado num observador (Pomerleau e Perrier, 1990)

$$\frac{d\hat{\psi}}{dt} = H\hat{\rho} - D\psi + K_s^{-1}(F_s - Q_s) - \Omega_1(\psi - \hat{\psi}) \quad (5.18)$$

$$\frac{d\hat{\rho}}{dt} = \Omega_2(\psi - \hat{\psi}) \quad (5.19)$$

A escolha das matrizes dos ganhos poderá conduzir a diferentes aproximações ao problema da sintonização do estimador. Para a estimação de taxas específicas de crescimento, Pomerleau e Perrier (1990) propõem a seguinte configuração para as matrizes dos ganhos:

- $\Omega_1 \equiv \text{diag}\{-\omega_{1,i}X\}$
- $\Omega_2 \equiv \text{diag}\{\omega_{2,i}X\}$

em que $\omega_{1,i}, \omega_{2,i} \in \mathbb{R}^+$ com $i=1, \dots, r$.

Para a situação mais geral, pode propor-se a seguinte configuração:

- $\Omega_1 \equiv \text{diag}\{-\omega_{1,i}h_i\}$
- $\Omega_2 \equiv \text{diag}\{\omega_{2,i}h_i\}$

em que h_i representa o elemento i da matriz diagonal H .

Estes autores, baseando-se na dinâmica do sistema de erros de convergência destas equações às diferenças, propõem uma sintonização dos ganhos por colocação de pólos:

$$\omega_{1,k} = 2(1-p)H^1(\xi_k)/T \quad \text{e} \quad \omega_{2,k} = 0.25\omega_{1,k}^2 \quad (5.20), (5.21)$$

em que p é vector com posições de pólos no plano Z (0 a 1).

5.3.3 Estimadores de dinâmica de segunda ordem

Tendo como base o estimador baseado num observador de *Bastin e Dochain* (equações (5.13) e (5.14)) e aplicando a transformação (5.16), obtém-se o estimador de dinâmica de 2ª ordem (EDSO):

Estimador de dinâmica de resposta de 2ª ordem

$$\frac{d\hat{\psi}}{dt} = H\hat{\rho} - D\psi + K_s^{-1}(F_s - Q_s) - \Omega_s(\psi - \hat{\psi}) \quad (5.22)$$

$$\frac{d\hat{\rho}}{dt} = H^T(\xi)\Gamma_s(\psi - \hat{\psi}) \quad (5.23)$$

Subtraindo a equação (5.17) pela equação (5.22), obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{d(\psi - \hat{\psi})}{dt} = H(\rho - \hat{\rho}) + \Omega_s(\psi - \hat{\psi}) \quad (5.24)$$

Assumindo que a matriz Γ_s é tal que $(H(\xi))^T\Gamma_s$ seja uma matriz constante, então, diferenciando a equação (5.23) obtém-se:

$$\frac{d^2\hat{\rho}}{dt^2} = H^T\Gamma_s \frac{d(\psi - \hat{\psi})}{dt} \quad (5.25)$$

Se $H(\xi)$ for uma matriz diagonal, então, combinando (5.23) com estas duas últimas equações e para a seguinte configuração para as matrizes dos ganhos :

- $\Omega_s \equiv \text{diag}\{-\omega_i\}$
- $\Gamma_s \equiv H^{-1}(\xi) \cdot \text{diag}\{\gamma_i\}$

com $\omega_i, \gamma_i \in \mathbb{R}^+$ com $i=1, \dots, r$, obtém-se o seguinte resultado :

$$\tau_i^2 \frac{d^2 \hat{\rho}_i}{dt^2} + 2\zeta_i \tau_i \frac{d\hat{\rho}_i}{dt} + \hat{\rho}_i = \rho_i \quad i=1, \dots, r \quad (5.26)$$

com

$$\tau_i = (\gamma_i h_i)^{-0.5} \quad \text{e} \quad \zeta_i = 0.5 \omega_i (\gamma_i h_i)^{-0.5} \quad (5.27), (5.28)$$

em que h_i se refere aos elementos diagonais da matriz $H(\xi)$.

As três equações anteriores mostram que a estimativa de cada parâmetro segue uma dinâmica de resposta de segunda ordem a alterações nos verdadeiros parâmetros, com um período natural de oscilação τ_i e um coeficiente de amortecimento ζ_i que são funções do estado do sistema, e portanto, variáveis no tempo.

Como restrições, observe-se H dever ser uma matriz diagonal invertível, condições essas verificadas num número muito significativo de processos de fermentação.

A análise da estabilidade, da dinâmica de convergência e da sintonização deste estimador é apresentada por Oliveira *et al.* (1996).

5.4 Aplicação ao fermento de padeiro

Conforme referido anteriormente (capítulo 4), verifica-se em fermentações semi-contínuas de produção de fermento de padeiro, a ocorrência de dois regimes metabólicos distintos: respiração e fermentação da glucose com produção de etanol, referida como regime respiro-fermentativo (RF) e respiração conjunta de glucose e etanol - regime respirativo (R). Isto significa que a levedura só pode crescer por duas vias simultaneamente. Assim, o modelo dinâmico para a produção de fermento de padeiro pode ser dividido em dois modelos parciais como se segue:

Modelo parcial Respiro-fermentativo do processo

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ E \\ O \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ 0 & k_3 \\ -k_5 & 0 \\ k_7 & k_8 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_s^o \\ \mu_s^r \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ E \\ O \\ C \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ DS_e \\ 0 \\ OTR \\ 0 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ CTR \end{bmatrix} \quad (5.29)$$

e

Modelo parcial Respirativo do processo

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ E \\ O \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & 0 \\ 0 & -k_4 \\ -k_5 & -k_6 \\ k_7 & k_9 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_s^o \\ \mu_e^o \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ E \\ O \\ C \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ DS_e \\ 0 \\ OTR \\ 0 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ CTR \end{bmatrix} \quad (5.30)$$

De salientar que através da divisão do modelo reduziu-se a duas ($m = 2$) o número de reacções.

A filosofia de modelos parciais estará na base da dedução dos algoritmos de estimativa do estado e das cinéticas apresentados a seguir.

Os observadores propostos deverão contemplar a alternância entre os dois regimes metabólicos da *Saccharomyces cerevisiae*. O critério de transição de regime é o seguinte: de regime respiro-fermentativo para o regime respirativo quando a taxa específica de crescimento da via fermentativa de glucose se anula ($\mu_s^r \leq 0$); de regime respirativo para o regime respiro-fermentativo quando a taxa específica de crescimento da via respiratória de etanol se anula ($\mu_e^o \leq 0$).

Convém, neste momento, referir e justificar o procedimento adoptado neste trabalho.

A autora realizou vários estudos em simulação, utilizando os estimadores *Bastin e Dochain, Pomerleau e Perrier* e o de *Segunda Ordem*.

Os valores dos ganhos dos algoritmos de estimação das cinéticas, sintonizados por tentativa-erro, utilizados neste trabalho, foram:

- algoritmo *Bastin e Dochain*, ω_i e γ_i ($i=1$ até 3):

$$\omega_i = 10, 10, 10 \text{ e } \gamma_i = 1000, 1000, 1000$$

- algoritmo *Pomerleau e Perrier*, colocação de pólos p :
0.01, 0.01, 0.01, 0.01, 0.01, 0.01
- algoritmo 2ª ordem, ξ_i e τ_i ($i=1$ até 3)
 $\xi_i = 1, 1, 1$ e $\tau_i = 0.01, 0.01, 0.01$

No seguimento, apresentam-se as equações para a estimação das cinéticas de crescimento do fermento de padeiro, apenas para o estimador de segunda ordem, e para as três combinações possíveis de pares de medidas disponíveis em linha nas corridas experimentais: O-C, E-O e E-C.

A selecção do estimador de segunda ordem deveu-se a dois factores:

- desempenho deste estimador é ligeiramente superior aos restantes;
- a sua sintonização é feita através dos bem conhecidos parâmetros característicos dos sistemas de 2ª ordem, constante de tempo, τ , e factor de amortecimento, ξ .

5.4.1 Caso 1 -Variáveis de estado medidas: par O-C

A Figura 5.1 apresenta um esquema do observador de estado tendo como medidas o par O, C.

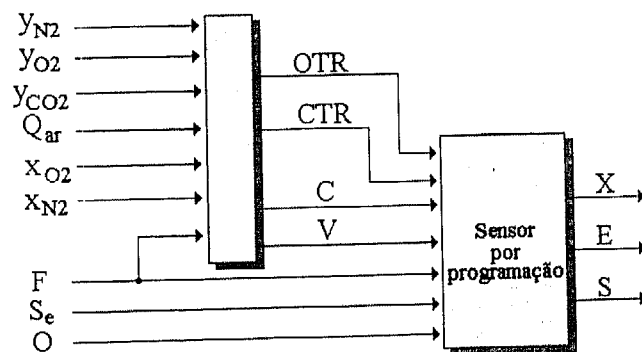


Figura 5.1 Observador de estado: medidas par O-C

5.4.1.1 Observador de estado

Introduzindo a partição de estado $\xi_1^T = [O \ C]$ e $\xi_2^T = [X \ S \ E]$ com as correspondentes partições de F e Q dadas por $(F_1 - Q_1)^T = [OTR \ -CTR]$, $(F_2 - Q_2)^T = [0 \ DS_e \ 0]$ para ambos os modelos. As partições induzidas em K são apresentadas na Tabela 5.1.

A transformação de estado definida pela variável Z (eq. (5.9) cuja dinâmica, para cada regime metabólico, é dada por

Modelo Respiro-fermentativo:

$$\frac{d\hat{Z}_{RF}}{dt} = -D\hat{Z}_{RF} + A_{RF}U_1 + U_2 \quad (5.31)$$

$$\hat{\xi}_{2,RF} = \hat{Z}_{RF} - A_{RF}\xi_1 \quad (5.32)$$

e

Modelo Fermentativo:

$$\frac{d\hat{Z}_R}{dt} = -D\hat{Z}_R + A_R U_1 + U_2 \quad (5.33)$$

$$\hat{\xi}_{2,R} = \hat{Z}_R - A_R \xi_1 \quad (5.34)$$

em que $U_1 = (F_1 - Q_1)$, $U_2 = (F_2 - Q_2)$, $A_{RF} = -K_{2,RF}K_{1,RF}^{-1}$ e $A_R = -K_{2,R}K_{1,R}^{-1}$, com as matrizes A apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Partições induzidas de K e correspondente matriz A

Modelo parcial	K_1	K_2	$A = -K_2 K_1^{-1}$
RF	$\begin{bmatrix} -k_5 & 0 \\ k_7 & k_8 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ 0 & k_3 \end{bmatrix}$	$\frac{1}{k_5 k_8} \begin{bmatrix} (k_8 - k_7) & -k_5 \\ (k_2 k_7 - k_1 k_8) & k_2 k_5 \\ -k_3 k_7 & -k_3 k_5 \end{bmatrix}$
R	$\begin{bmatrix} -k_5 & -k_6 \\ k_7 & k_9 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & 0 \\ 0 & -k_4 \end{bmatrix}$	$\frac{1}{(k_5 k_9 - k_6 k_7)} \begin{bmatrix} (k_9 - k_7) & (k_6 - k_5) \\ -k_1 k_9 & -k_1 k_6 \\ k_4 k_7 & k_4 k_5 \end{bmatrix}$

A utilização em alternância dos dois conjuntos de algoritmos é feita através de um mecanismo de detecção do modelo a usar baseado na estimação das taxas específicas de crescimento. Os valores estimados de μ_s^r e μ_e^o constituirão o critério para determinar o regime do processo: respiro-fermentativo se μ_s^r for positivo ou respirativo se μ_e^o for positivo. A mudança de valor estimado da taxa específica de crescimento de positivo para negativo indica uma transição de regime. Quando se detecta essa mudança, a variável

transformada (\hat{Z}) e o estado estimado ($\hat{\xi}_2$), calculados pelo algoritmo do modelo parcial anterior, são usados para fornecer um valor de \hat{Z} para o novo modelo parcial, passando a empregar-se o algoritmo correspondente, conforme se ilustra de seguida:

Mudança de RF \rightarrow R:

$$\hat{\xi}_{2,RF} = \hat{Z}_{RF} - A_{RF}\xi_{1,RF} \quad (5.35)$$

$$\hat{Z}_R = \hat{\xi}_{2,RF} + A_R\xi_{1,R} \quad (5.36)$$

$$\text{com } \mu_{s,R}^0 = \mu_{s,RF}^0 \text{ e } \mu_{s,R}^r = 0$$

Mudança de R \rightarrow RF:

$$\hat{\xi}_{2,R} = \hat{Z}_R - A_R\xi_{1,R} \quad (5.37)$$

$$\hat{Z}_{RF} = \hat{\xi}_{2,R} + A_{RF}\xi_{1,RF} \quad (5.38)$$

$$\text{com } \mu_{s,RF}^0 = \mu_{s,R}^0 \text{ e } \mu_{e,RF}^0 = 0.$$

O observador assintótico será constituído pelas seguintes equações:

Observador assintótico para estimação de X, S e E

Regime respiro-fermentativo

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\hat{Z}_1 + ((k_8 - k_7)OTR + k_5CTR) \frac{1}{K_{RF}} \quad (5.39)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\hat{Z}_2 + ((k_2k_7 - k_1k_8)OTR - k_2k_5CTR) \frac{1}{K_{RF}} + DS_e \quad (5.40)$$

$$\frac{d\hat{Z}_3}{dt} = -D\hat{Z}_3 + (-k_3k_7OTR + k_3k_5CTR) \frac{1}{K_{RF}} \quad (5.41)$$

$$\hat{X} = \hat{Z}_{1RF} - [(k_8 - k_7)O - k_5C]/K_{RF} \quad (5.42)$$

$$\hat{S} = \hat{Z}_{2RF} - [(k_2k_7 - k_1k_8)O + k_2k_5C]/K_{RF} \quad (5.43)$$

$$\hat{E} = \hat{Z}_{3RF} - (-k_3k_7O - k_3k_5C)/K_{RF} \quad (5.44)$$

$$\text{com } K_{RF} \equiv k_5k_8.$$

Observador assintótico para estimação de X, S e E

Regime respirativo

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\hat{Z}_1 + ((k_9 - k_7)OTR - (k_6 - k_5)CTR) \frac{1}{K_R} \quad (5.45)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\hat{Z}_2 + (-k_1k_9OTR + k_1k_6CTR) \frac{1}{K_R} + DS_e \quad (5.46)$$

$$\frac{d\hat{Z}_3}{dt} = -D\hat{Z}_3 + (k_4k_7OTR - k_4k_5CTR) \frac{1}{K_R} \quad (5.47)$$

$$\hat{X} = \hat{Z}_{1R} - [(k_9 - k_7)O + (k_6 - k_5)C]/K_R \quad (5.48)$$

$$\hat{S} = \hat{Z}_{2R} - (-k_1k_9O - k_1k_6C)/K_R \quad (5.49)$$

$$\hat{E} = \hat{Z}_{3R} - (k_4k_7O + k_4k_5C)/K_R \quad (5.50)$$

com $K_R \equiv k_5k_9 - k_6k_7$.

5.4.1.2 Estimador das cinéticas

Introduzindo a transformação $\psi \equiv K_s^{-1}\xi_s$ e fazendo $\xi_s^T = \xi_1^T = [O \ C]$ obtém-se para cada regime metabólico respiro-fermentativo e respirativo, respectivamente:

$$\psi_{RF} \equiv \begin{bmatrix} \psi_{1,RF} \\ \psi_{2,RF} \end{bmatrix} \equiv \begin{bmatrix} k_8 & 0 \\ -k_7 & -k_5 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} O \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} k_8O \\ (-k_7O - k_5C) \end{bmatrix} \quad (5.51)$$

$$\psi_R \equiv \begin{bmatrix} \psi_{1,R} \\ \psi_{2,R} \end{bmatrix} \equiv \begin{bmatrix} k_9 & k_6 \\ -k_7 & -k_5 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} O \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (k_9O + k_6C) \\ (-k_7O - k_5C) \end{bmatrix} \quad (5.52)$$

Com estas transformações e usando as equações (5.18) e (5.19) é possível escrever as seguintes equações de estimação para as cinéticas de crescimento:

Regime respiro-fermentativo

$$\frac{d\hat{\psi}_{1,RF}}{dt} = \hat{\mu}_{s,RF}^o \hat{X} - D\psi_{1,RF} + k_8OTR + \omega_{11}(\psi_{1,RF} - \hat{\psi}_{1,RF}) \quad (5.53)$$

$$\frac{d\hat{\psi}_{2,RF}}{dt} = \hat{\mu}_{s,RF}' \hat{X} - D\psi_{2,RF} - k_7OTR + k_5CTR + \omega_{12}(\psi_{2,RF} - \hat{\psi}_{2,RF}) \quad (5.54)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,RF}^o}{dt} = \omega_{21}(\psi_{1,RF} - \hat{\psi}_{1,RF}) \quad (5.55)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,RF}^r}{dt} = \omega_{22}(\psi_{2,RF} - \hat{\psi}_{2,RF}) \quad (5.56)$$

Regime respirativo

$$\frac{d\hat{\psi}_{1,R}}{dt} = \hat{\mu}_{s,R}^o \hat{X} - D\psi_{1,R} + k_9 OTR - k_6 CTR + \omega_{11}(\psi_{1,R} - \hat{\psi}_{1,R}) \quad (5.57)$$

$$\frac{d\hat{\psi}_{2,R}}{dt} = \hat{\mu}_{e,R}^o \hat{X} - D\psi_{2,R} - k_7 OTR + k_5 CTR + \omega_{13}(\psi_{2,R} - \hat{\psi}_{2,R}) \quad (5.58)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,R}^o}{dt} = \omega_{21}(\psi_{1,R} - \hat{\psi}_{1,R}) \quad (5.59)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{e,R}^o}{dt} = \omega_{23}(\psi_{2,R} - \hat{\psi}_{2,R}) \quad (5.60)$$

Dado que as equações do estimador dependem da concentração de biomassa haverá necessidade de estimar esse valor em linha. As estimativas são conseguidas através do observador assintótico anteriormente apresentado.

A sintonização dos ganhos das equações de estimação é efectuada de forma a conduzir a uma dinâmica de resposta de 2ª ordem com coeficientes constantes (ou quase constantes). Assim, tem-se:

$$\omega_{11,k} = 2\zeta_1/\tau_1 \quad (5.61)$$

$$\omega_{12,k} = 2\zeta_2/\tau_2 \quad (5.62)$$

$$\omega_{13,k} = 2\zeta_3/\tau_3 \quad (5.63)$$

$$\omega_{21,k} = (X_k \tau_1)^{-2} \quad (5.64)$$

$$\omega_{22,k} = (X_k \tau_2)^{-2} \quad (5.65)$$

$$\omega_{23,k} = (X_k \tau_3)^{-2} \quad (5.66)$$

5.4.2 Caso 2 -Variáveis de estado medidas: par E-O

De modo análogo ao anteriormente apresentado, deduzem-se as equações do estimador do estado e das cinéticas tendo como medidas o par E-O (Figura 5.2).

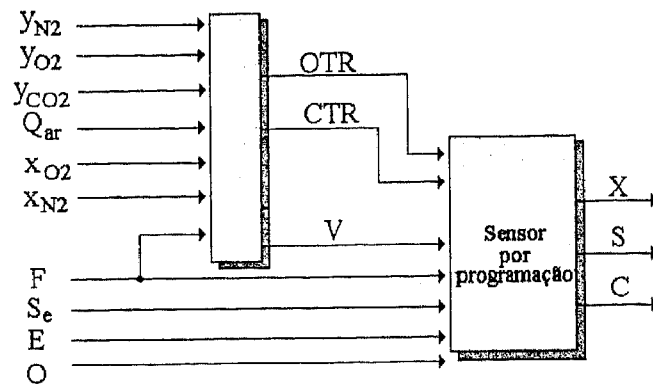


Figura 5.2 Observador do estado: medidas par E-O

5.4.2.1 Observador de estado

Introduzindo a partição de estado $\xi_1^T = [E \ O]$ e $\xi_2^T = [X \ S \ C]$ com as correspondentes partições de F e Q dadas por $(F_1 - Q_1)^T = [0 \ OTR]$, $(F_2 - Q_2)^T = [0 \ DS_e \ -CTR]$ para ambos os modelos. As partições induzidas em K são apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Partições induzidas de K e correspondente matriz A

Modelo parcial	K_1	K_2	$A = -K_2 K_1^{-1}$
$[RF]$	$\begin{bmatrix} 0 & k_3 \\ -k_5 & 0 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ k_7 & k_8 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} -1/k_3 & 1/k_5 \\ k_2/k_3 & -k_1/k_5 \\ -k_8/k_3 & k_7/k_5 \end{bmatrix}$
$[R]$	$\begin{bmatrix} 0 & -k_4 \\ -k_5 & -k_6 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & 0 \\ k_7 & k_9 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} -\frac{k_6 - k_5}{k_4 k_5} & \frac{1}{k_5} \\ \frac{k_1 k_6}{k_4 k_5} & -\frac{k_1}{k_5} \\ -\frac{k_6 k_7 - k_5 k_9}{k_4 k_5} & \frac{k_7}{k_5} \end{bmatrix}$

O observador assintótico será constituído, neste caso, pelas seguintes equações:

Observador assintótico para estimação de X, S e C

Regime respiro-fermentativo

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\hat{Z}_1 + \frac{1}{k_5} OTR \quad (5.67)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\hat{Z}_2 - \frac{k_1}{k_5} OTR + DS_e \quad (5.68)$$

$$\frac{d\hat{Z}_3}{dt} = -D\hat{Z}_3 + \frac{k_7}{k_5} OTR - CTR \quad (5.69)$$

$$\hat{X} = \hat{Z}_{1RF} + 1/k_3 E - 1/k_5 O \quad (5.70)$$

$$\hat{S} = \hat{Z}_{2RF} - k_2/k_3 E + k_1/k_5 O \quad (5.71)$$

$$\hat{C} = \hat{Z}_{3RF} + k_8/k_3 E - k_7/k_5 O \quad (5.72)$$

Observador assintótico para estimação de X, S e C

Regime respirativo

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\hat{Z}_1 + \frac{1}{k_5} OTR \quad (5.73)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\hat{Z}_2 - \frac{k_1}{k_5} OTR + DS_e \quad (5.74)$$

$$\frac{d\hat{Z}_3}{dt} = -D\hat{Z}_3 + \frac{k_7}{k_5} OTR - CTR \quad (5.75)$$

$$\hat{X} = \hat{Z}_{1R} + (k_6 - k_5)/(k_4 k_5) E - 1/k_5 O \quad (5.76)$$

$$\hat{S} = \hat{Z}_{2R} - (k_1 k_6)/(k_4 k_5) E + k_1/k_5 O \quad (5.77)$$

$$\hat{C} = \hat{Z}_{3RF} + (k_6 k_7 - k_5 k_9)/(k_4 k_5) E - k_7/k_5 O \quad (5.78)$$

5.4.2.2 Estimador das cinéticas

Pela transformação $\psi \equiv K_s^{-1} \xi_s$ e fazendo $\xi_s^T = \xi_1^T = [E \ O]$ obtém-se para cada regime metabólico:

$$\Psi_{RF} \equiv \begin{bmatrix} \Psi_{1,RF} \\ \Psi_{2,RF} \end{bmatrix} \equiv \frac{1}{K_{RF}} \begin{bmatrix} -k_3 O \\ k_5 E \end{bmatrix} \quad (5.79)$$

$$\Psi_R \equiv \begin{bmatrix} \Psi_{1,R} \\ \Psi_{2,R} \end{bmatrix} \equiv -\frac{1}{K_R} \begin{bmatrix} -k_6 E + k_4 O \\ k_5 E \end{bmatrix} \quad (5.80)$$

em que $K_{RF} = k_3 k_5$ e $K_R = k_4 k_5$.

Com estas transformações e usando as equações (5.18) e (5.19) é possível escrever as seguintes equações de estimação para as cinéticas de crescimento:

Regime respiro-fermentativo

$$\frac{d\hat{\psi}_{1,RF}}{dt} = \hat{\mu}_{s,RF}^o \hat{X} - D\psi_{1,RF} - \frac{k_3}{K_{RF}} OTR + \omega_{11} (\psi_{1,RF} - \hat{\psi}_{1,RF}) \quad (5.81)$$

$$\frac{d\hat{\psi}_{2,RF}}{dt} = \hat{\mu}_{s,RF}^r \hat{X} - D\psi_{2,RF} + \omega_{12} (\psi_{2,RF} - \hat{\psi}_{2,RF}) \quad (5.82)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,RF}^o}{dt} = \omega_{21} (\psi_{1,RF} - \hat{\psi}_{1,RF}) \quad (5.83)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,RF}^r}{dt} = \omega_{22} (\psi_{2,RF} - \hat{\psi}_{2,RF}) \quad (5.84)$$

Regime respirativo

$$\frac{d\hat{\psi}_{1,R}}{dt} = \hat{\mu}_{s,R}^o \hat{X} - D\psi_{1,R} - \frac{k_4}{K_R} OTR + \omega_{11} (\psi_{1,R} - \hat{\psi}_{1,R}) \quad (5.85)$$

$$\frac{d\hat{\psi}_{2,R}}{dt} = \hat{\mu}_{e,R}^o \hat{X} - D\psi_{2,R} + \omega_{13} (\psi_{2,R} - \hat{\psi}_{2,R}) \quad (5.86)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,R}^o}{dt} = \omega_{21} (\psi_{1,R} - \hat{\psi}_{1,R}) \quad (5.87)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{e,R}^o}{dt} = \omega_{23} (\psi_{2,R} - \hat{\psi}_{2,R}) \quad (5.88)$$

A sintonização dos ganhos das equações de estimação é análoga à apresentada para o par O-C (equações (5.61) a (5.66)).

5.4.3 Caso 3 -Variáveis de estado medidas: par E-C

De modo análogo aos anteriormente apresentados, deduzem-se as equações do estimador do estado e das cinéticas tendo como medidas o par E-C (Figura 5.3).

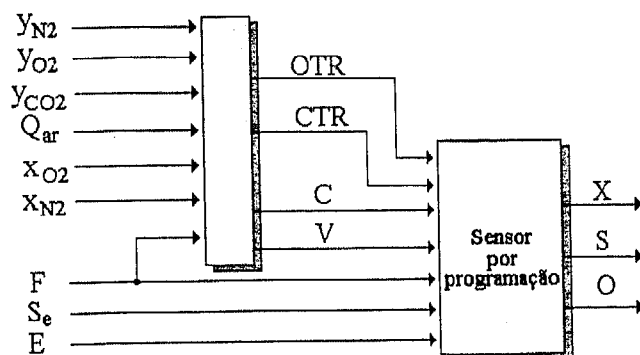


Figura 5.3 Observador do estado: medidas par E-C

5.4.3.1 Observador de estado

Introduzindo a partição de estado $\xi_1^T = [E \ C]$ e $\xi_2^T = [X \ S \ O]$ com as correspondentes partições de F e Q dadas por $(F_1 - Q_1)^T = [0 \ -CTR]$, $(F_2 - Q_2)^T = [0 \ DS_e \ OTR]$ para ambos os modelos. As partições induzidas em K são apresentadas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Partições induzidas de K e correspondente matriz A

Modelo parcial	K_1	K_2	$A = -K_2 K_1^{-1}$
\boxed{RF}	$\begin{bmatrix} 0 & k_3 \\ k_7 & k_8 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ -k_5 & 0 \end{bmatrix}$	$\frac{1}{k_3 k_7} \begin{bmatrix} k_8 - k_7 & -k_3 \\ -k_1 k_8 + k_2 k_7 & k_1 k_3 \\ -k_5 k_8 & k_3 k_5 \end{bmatrix}$
\boxed{R}	$\begin{bmatrix} 0 & -k_4 \\ k_7 & k_9 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & 0 \\ -k_5 & -k_6 \end{bmatrix}$	$-\frac{1}{k_4 k_7} \begin{bmatrix} k_9 - k_7 & k_4 \\ -k_1 k_9 & -k_1 k_4 \\ -k_5 k_9 + k_6 k_7 & -k_4 k_5 \end{bmatrix}$

O observador assintótico será constituído, neste caso, pelas seguintes equações:

Observador assintótico para estimação de X, S e O

Regime respiro-fermentativo

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\hat{Z}_1 + \frac{k_3}{K_{RF}} CTR \quad (5.89)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\hat{Z}_2 + \frac{-k_1k_3}{K_{RF}} CTR + DS_e \quad (5.90)$$

$$\frac{d\hat{Z}_3}{dt} = -D\hat{Z}_3 + \frac{-k_3k_5}{K_{RF}} CTR + OTR \quad (5.91)$$

$$\hat{X} = \hat{Z}_{1RF} - ((k_8 - k_7) E - k_3 C)/K_{RF} \quad (5.92)$$

$$\hat{S} = \hat{Z}_{2RF} - ((k_2k_7 - k_1k_8) E + k_1k_3 C)/K_{RF} \quad (5.93)$$

$$\hat{O} = \hat{Z}_{3RF} - (-k_5k_8) E + k_3k_5 C)/K_{RF} \quad (5.94)$$

com $K_{RF} = k_3k_7$

Observador assintótico para estimação de X, S e O

Regime respirativo

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\hat{Z}_1 + \frac{k_4}{K_R} CTR \quad (5.95)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\hat{Z}_2 - \frac{k_1k_4}{K_R} CTR - DS_e \quad (5.96)$$

$$\frac{d\hat{Z}_3}{dt} = -D\hat{Z}_3 - \frac{k_4k_5}{K_R} CTR - OTR \quad (5.97)$$

$$\hat{X} = \hat{Z}_{1RF} + ((k_9 - k_7) E + k_4 C)/K_R \quad (5.98)$$

$$\hat{S} = \hat{Z}_{2RF} + (-k_1k_9) E - k_1k_4 C)/K_R \quad (5.99)$$

$$\hat{O} = \hat{Z}_{3RF} + (k_6k_7 - k_5k_9) E - k_4k_5 C)/K_R \quad (5.100)$$

com $K_R = k_4k_7$

5.4.3.2 Estimador das cinéticas

Pela transformação $\psi \equiv K_s^{-1}\xi_s$ e fazendo $\xi_s^T = \xi_1^T = [E \ C]$ obtém-se para cada regime metabólico:

$$\Psi_{RF} \equiv \begin{bmatrix} \Psi_{1,RF} \\ \Psi_{2,RF} \end{bmatrix} \equiv -\frac{I}{K_{RF}} \begin{bmatrix} k_8 E - k_3 C \\ -k_7 E \end{bmatrix} \quad (5.101)$$

$$\Psi_R \equiv \begin{bmatrix} \Psi_{1,R} \\ \Psi_{2,R} \end{bmatrix} \equiv \frac{I}{K_R} \begin{bmatrix} k_9 E + k_4 C \\ -k_7 E \end{bmatrix} \quad (5.102)$$

em que $K_{RF} = k_3 k_7$ e $K_R = k_4 k_7$.

Com estas transformações e usando as equações (5.18) e (5.19) é possível escrever as seguintes equações de estimação para as cinéticas de crescimento:

Regime respiro-fermentativo

$$\frac{d\hat{\psi}_{1,RF}}{dt} = \hat{\mu}_{s,RF}^o \hat{X} - D\psi_{1,RF} + \frac{k_3}{K_{RF}} CTR + \omega_{11}(\psi_{1,RF} - \hat{\psi}_{1,RF}) \quad (5.103)$$

$$\frac{d\hat{\psi}_{2,RF}}{dt} = \hat{\mu}_{s,RF}^r \hat{X} - D\psi_{2,RF} + \omega_{12}(\psi_{2,RF} - \hat{\psi}_{2,RF}) \quad (5.104)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,RF}^o}{dt} = \omega_{21}(\psi_{1,RF} - \hat{\psi}_{1,RF}) \quad (5.105)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,RF}^r}{dt} = \omega_{22}(\psi_{2,RF} - \hat{\psi}_{2,RF}) \quad (5.106)$$

Regime respirativo

$$\frac{d\hat{\psi}_{1,R}}{dt} = \hat{\mu}_{s,R}^o \hat{X} - D\psi_{1,R} - \frac{k_4}{K_R} CTR + \omega_{11}(\psi_{1,R} - \hat{\psi}_{1,R}) \quad (5.107)$$

$$\frac{d\hat{\psi}_{2,R}}{dt} = \hat{\mu}_{e,R}^o \hat{X} - D\psi_{2,R} + \omega_{13}(\psi_{2,R} - \hat{\psi}_{2,R}) \quad (5.108)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{s,R}^o}{dt} = \omega_{21}(\psi_{1,R} - \hat{\psi}_{1,R}) \quad (5.109)$$

$$\frac{d\hat{\mu}_{e,R}^o}{dt} = \omega_{23}(\psi_{2,R} - \hat{\psi}_{2,R}) \quad (5.110)$$

A sintonização dos ganhos das equações de estimação é análoga à apresentada para o par O-C (equações (5.61) a (5.66)).

5.5 Resultados por simulação

Pretende-se com o estudo efectuado neste parágrafo avaliar a robustez do método de estimação do estado e das cinéticas, utilizando dois programas de simulação em *Fortran 77* desenvolvidos pela autora.

5.5.1 Apresentação do programa desenvolvido

Os programas desenvolvidos, *Sim* e *SimExp*, são apresentados em detalhe no Apêndice A.6.

O programa *Sim* engloba três rotinas principais - simulação do processo, estimativa do estado e das cinéticas e rotina de controlo, em que as medidas necessárias aos algoritmos de estimação são consideradas iguais aos valores de simulação. O programa inclui a introdução de ruídos nas variáveis de estado e, opcionalmente, a aplicação de filtros de média deslizante. Os filtros podem ser incluídos nas variáveis medidas e/ou na taxa de diluição.

O programa *SimExp* é análogo ao anterior mas toma como valores medidos os valores experimentais lidos de ficheiro.

A observação do estado e das cinéticas, tal como a simulação do processo, são efectuadas por integração das equações diferenciais e algébricas correspondentes ao par em estudo.

Nos programas é necessário fornecer por ficheiro os valores iniciais das variáveis de estado e os parâmetros necessários à rotina de integração e de estimativa de estado e de cinéticas.

Os resultados, em termos de variáveis de estado, acções de controlo, cinéticas e variáveis auxiliares, obtidos são gravados em ficheiro. Este pode ser importado para um computador e tratado numa folha de cálculo para traçado gráfico.

5.5.2 Casos de estudo

Apresentam-se de seguida as simulações efectuadas para teste dos algoritmos apresentados para os três casos de pares de medidas possíveis.

Em todos os casos comparam-se as estimativas obtidas através dos algoritmos apresentados nos parágrafos anteriores com os modelos teóricos de determinação das

cinéticas. A validação das estimativas das cinéticas foi, também, efectuada com o auxílio do cálculo do quociente respiratório, RQ . Para tal utilizaram-se as equações (4.59) e (4.60) (apresentadas no capítulo 4) em que os valores das taxas cinéticas foram substituídos pelas correspondentes estimativas.

As corridas de simulação efectuadas têm por base os perfis de alimentação das fermentações laboratoriais e os valores iniciais das variáveis de estado; as outras medidas necessárias ao estimador são tomadas iguais às medidas teóricas. Deu-se a mesma identificação que às corridas experimentais, excepto nas três letras iniciais, que se utilizou SIM, de corridas de simulação, em vez do EXP. Sugere-se a consulta da Tabela 3.12 para detalhes característicos de cada partida.

Realizaram-se diversos testes para cada par de medidas seleccionado. A Tabela 5.4 resume os estudos efectuados, referindo a secção em que são apresentados.

Tabela 5.4 Estudos efectuados em simulação

<i>Par</i>	<i>Estudo</i>	<i>Secção</i>
O-C	Desempenho de base	5.5.2.1
O-E	Desempenho de base	5.5.2.2
E-C	Desempenho de base	5.5.2.3
O-C	Introdução de ruídos	5.5.3.1
O-C	Introdução de desvios nos valores medidos: O, C, OTR, CTR e F	5.5.3.2
O-C	Introdução de erro nos valores iniciais das variáveis de estado	5.5.3.3

Para não se tornar extensa e fastidiosa a apresentação remete-se para o apêndice A.7 algumas simulações para cada um dos pares estudados.

Como nota, refere-se que nos gráficos que se seguem as taxas cinéticas de crescimento são representadas pelas letras *Niu*; as letras *os*, *rs* e *oe* referem-se, respectivamente, às fases de crescimento oxidativo em glucose, de crescimento reductivo em glucose e crescimento oxidativo em etanol; o índice *est* diz respeito a valores estimados.

5.5.2.1 Caso 1 - Variáveis de estado medidas: par O-C

Neste estudo utilizaram-se os perfis de alimentação experimentais da corrida EXPA04 para fermentação com um só substrato e o da corrida EXPE02 para experiências com melaços (caudal constante igual a 0.15 l/h). Os valores das restantes variáveis necessárias aos algoritmos de estimação, O, C, OTR e CTR são os correspondentes valores teóricos de simulação.

Para a corrida EXPA04, apresentam-se, na Figura 5.4, os perfis (coincidentes) do quociente respiratório real e estimado calculados, respectivamente pelas equações (4.59) e (4.60).

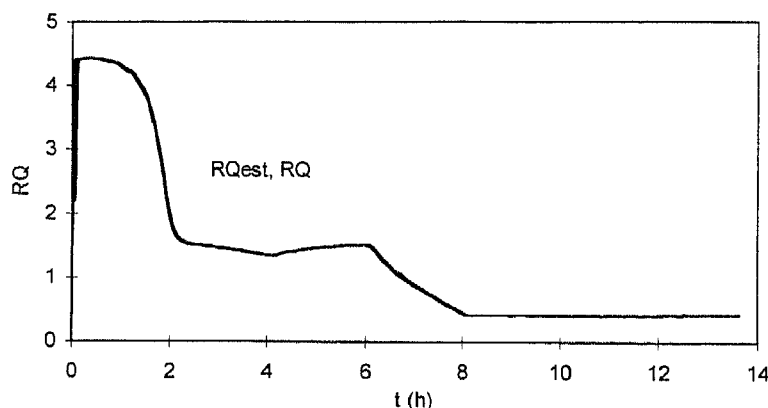


Figura 5.4 Validação das estimativas das cinéticas através do quociente respiratório (SIMA04)

Ainda para esta experiência, apresentam-se, na Figura 5.5, os perfis das variáveis de estado biomassa, glucose e etanol, obtidos por aplicação do algoritmo de observação do estado e pelo modelo teórico. Apresentam-se, também na mesma figura, os perfis das taxas cinéticas de crescimento estimados e calculados pelo modelo teórico. Em todos existe uma sobreposição dos valores estimados com os do modelo teórico.

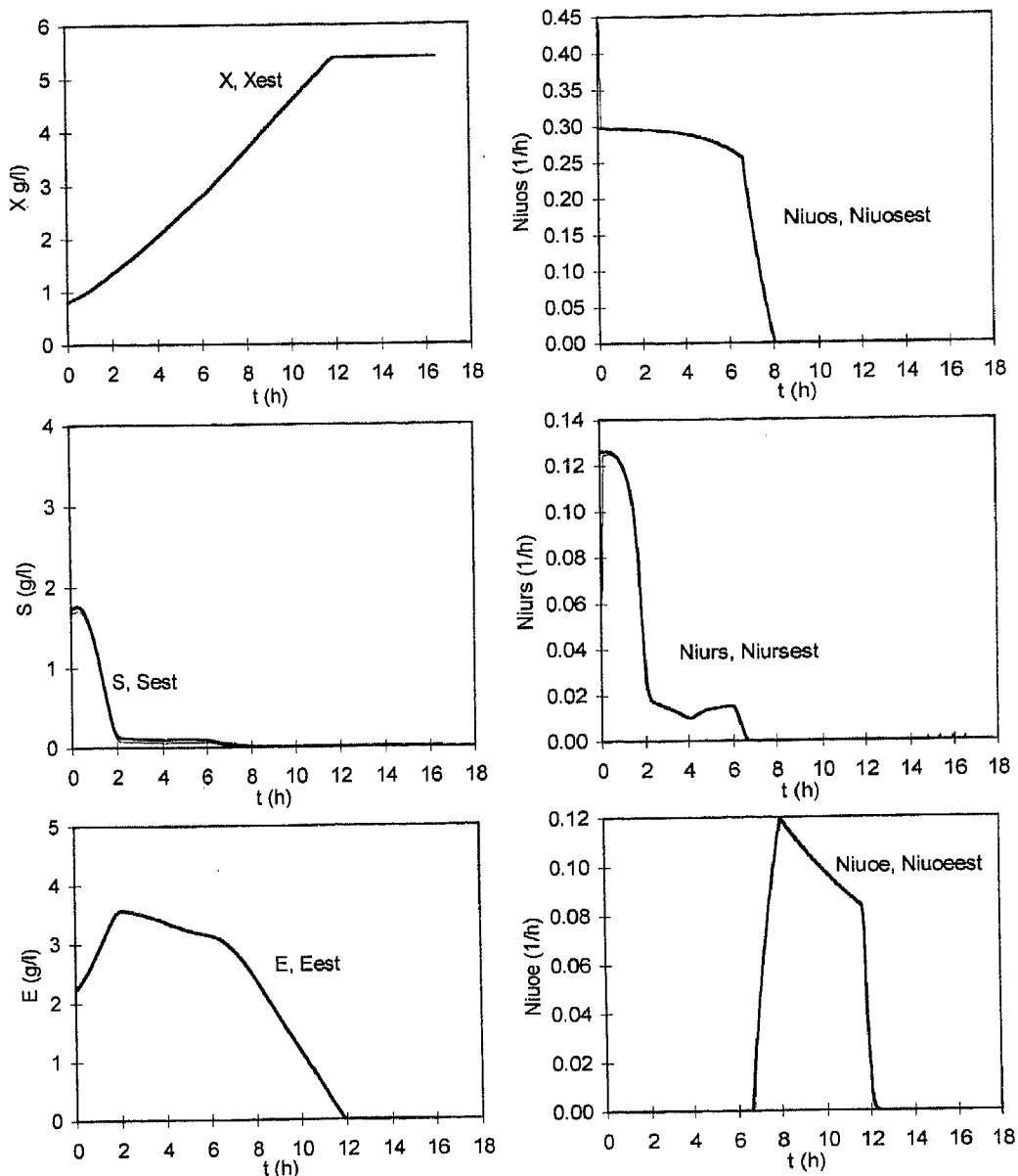


Figura 5.5 SIMA04 - modelo teórico e estimativa do estado e das cinéticas

□

Para a corrida com melaços, apresentam-se os perfis do quociente respiratório real e estimado obtidos na validação das estimativas das cinéticas de crescimento (Figura 5.6), assim como as estimativas do estado e das taxas de reacção (Figura 5.7).

O desempenho do estimador foi igualmente bom, excepto na observação do substrato, em que as diferenças verificadas entre modelo teórico e estimativas, dizem respeito a níveis baixos de concentração de açúcar onde poderão existir erros de integração numérica.

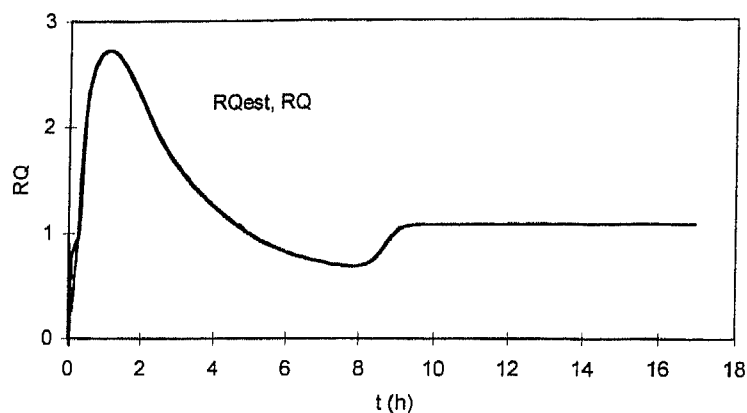


Figura 5.6 Validação da estimativa das cinéticas através do quociente respiratório (SIME02)

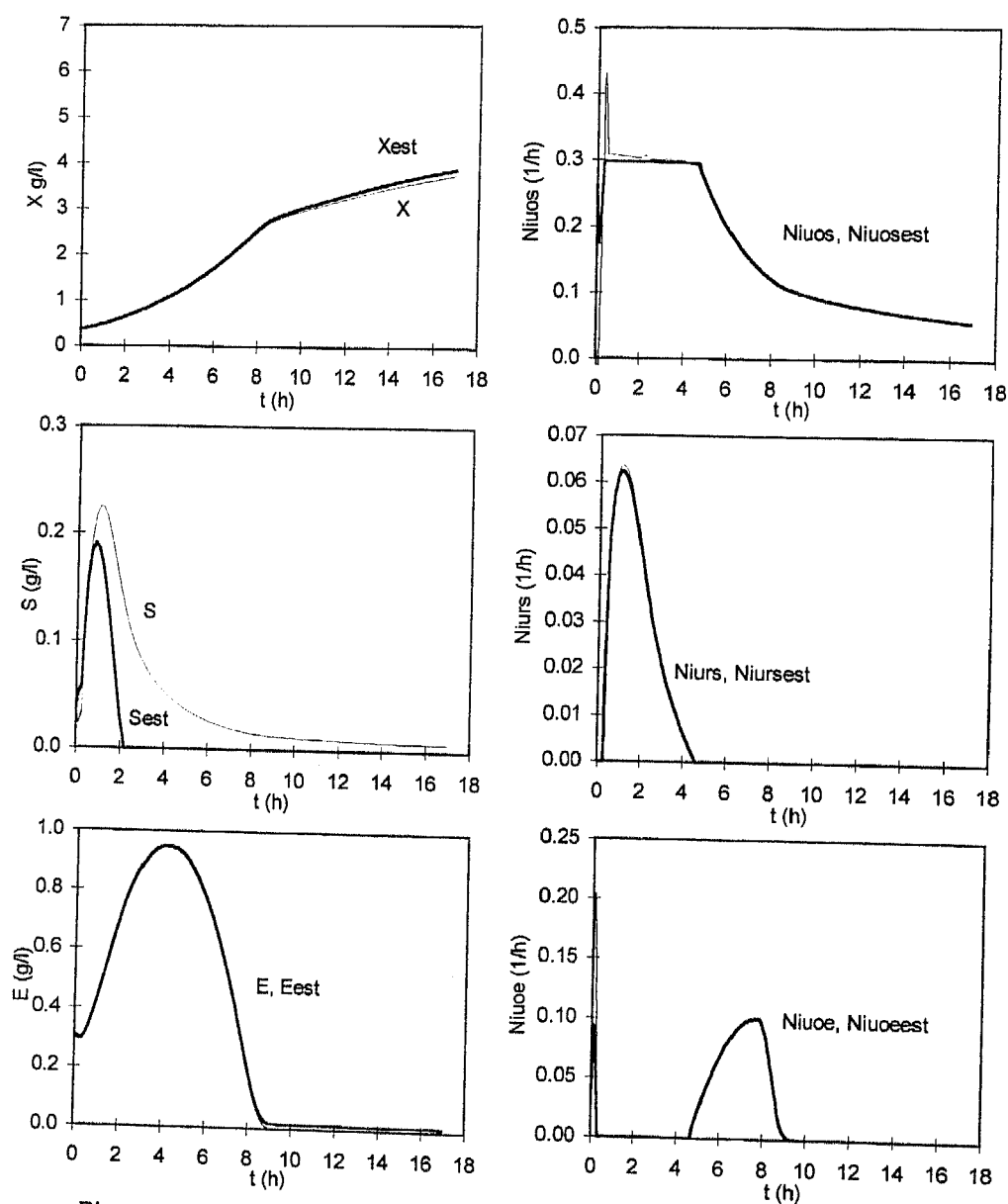


Figura 5.7 SIME02- modelo teórico e estimativa do estado e das cinéticas

5.5.2.2 Caso 2 - Variáveis de estado medidas: par O-E

Neste estudo utilizou-se o perfil de alimentação experimental da corrida EXPE03. Esta corrida diz respeito a fermentação em regime de alimentação com melaços. Os valores das restantes variáveis necessárias aos algoritmos de estimação, O, E, OTR e CTR são os correspondentes valores teóricos de simulação. A Figura 5.8 apresenta os perfis de estado e de cinéticas para a corrida efectuada.

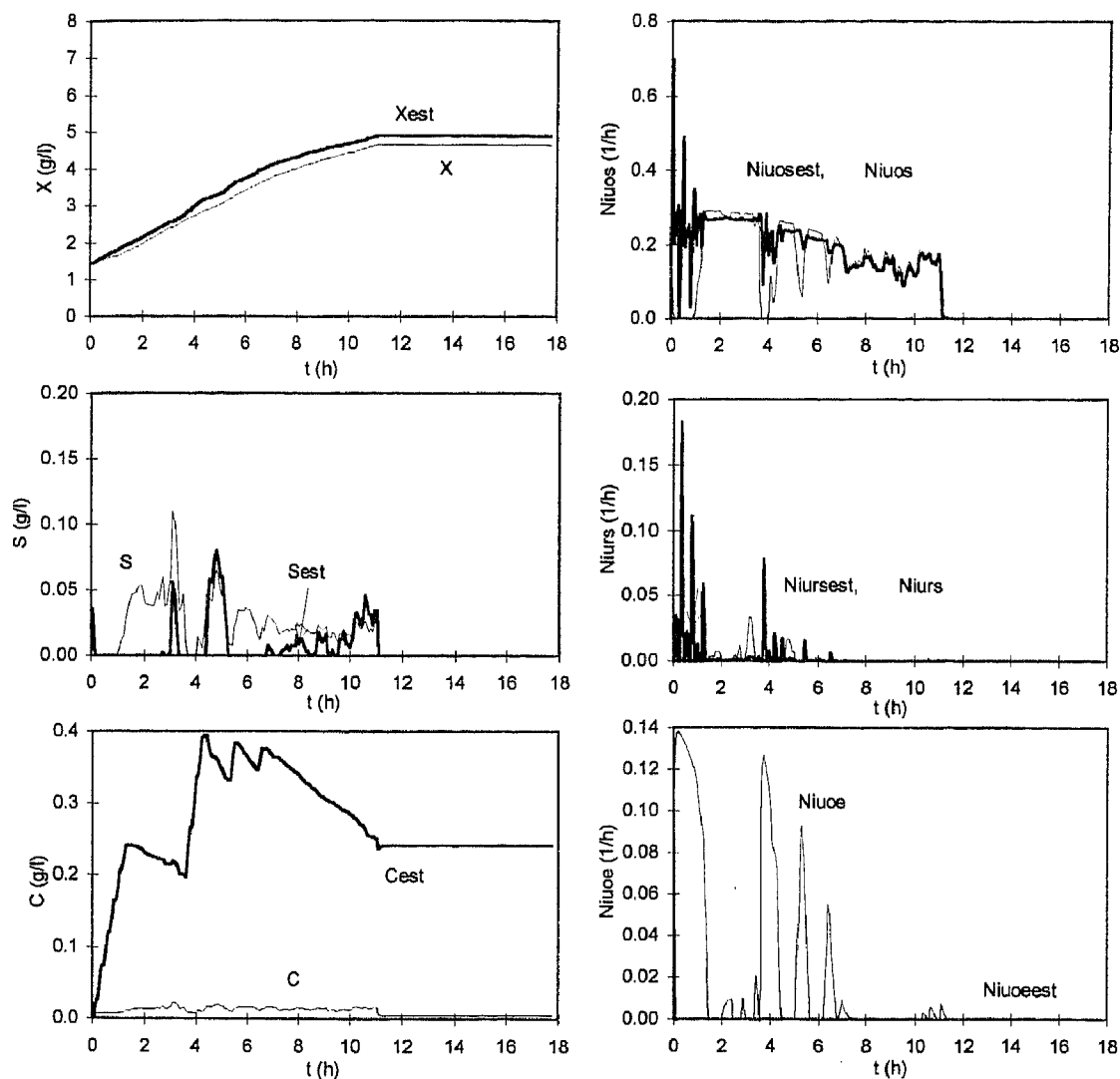


Figura 5.8 SIME03 - Perfis de estado e cinéticas para o par O-E

As estimativas de biomassa e glucose são razoáveis, mas a estimativa da concentração de dióxido de carbono é francamente má. Pensa-se que seria de estudar a hipótese de desprezar a dinâmica do CO_2 , estimando nesse caso a taxa de produção de dióxido de carbono.

De salientar que esta experiência, em regime de alimentação de melaços, teve um comportamento análogo às fermentações apenas com glucose.

No Apêndice A.7 encontram-se os estudos efectuados para as corridas SIMA08, SIMA10.

5.5.2.3 Caso 3 - Variáveis de estado medidas: par E-C

Neste estudo utilizou-se o perfil de alimentação experimental da corrida EXPA08. Os valores das restantes variáveis necessárias aos algoritmos de estimação, E, C, OTR e CTR são os correspondentes valores teóricos de simulação. Na Figura 5.9 apresentam-se os perfis de estado e de cinéticas para cada corrida efectuada.

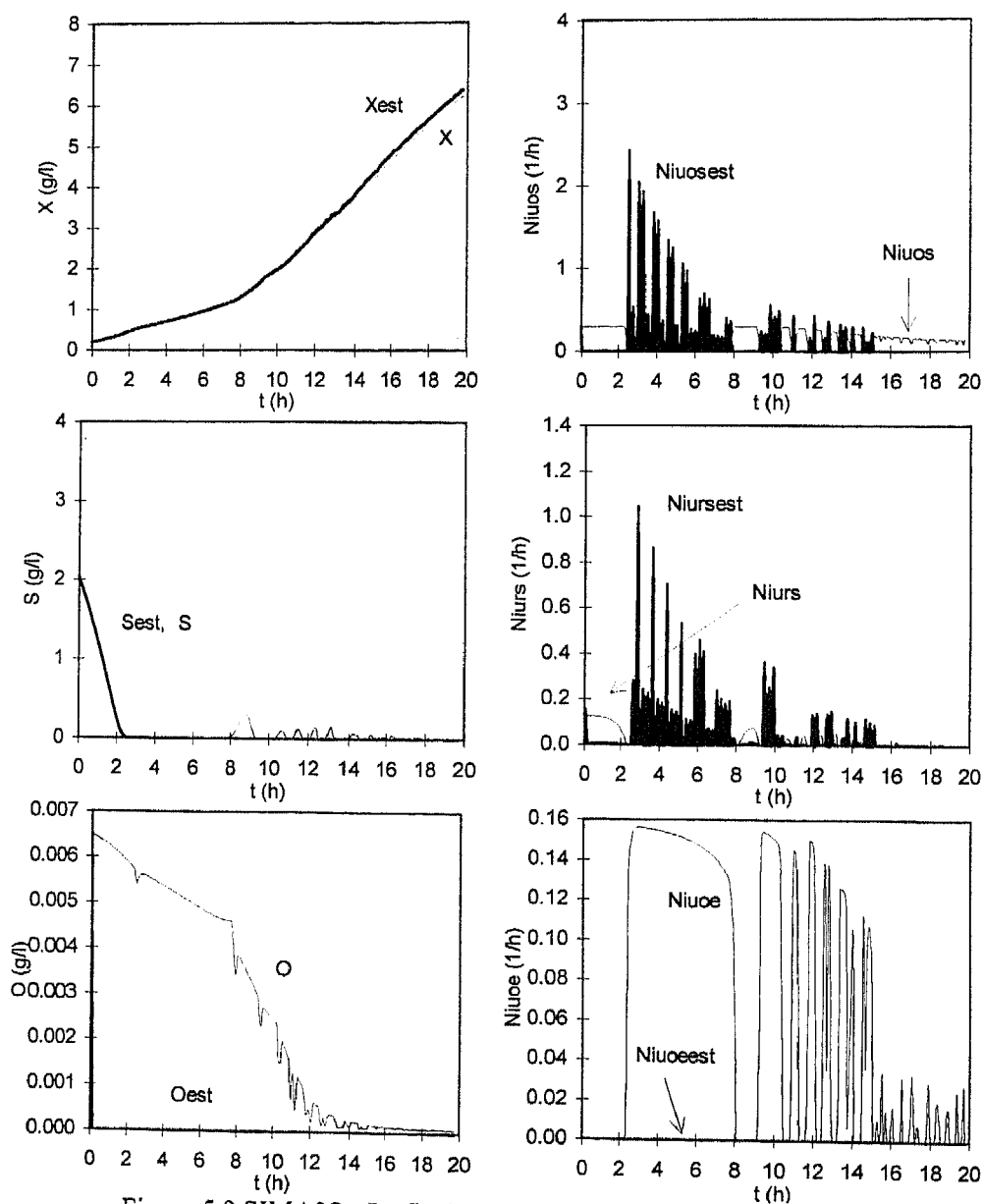


Figura 5.9 SIMA08 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C

As estimativas de biomassa e de glucose são boas, mas a estimativa da concentração de

oxigénio é bastante má. Este fraco desempenho do observador poderá estar relacionado com problemas de integração numérica, uma vez que se está a trabalhar com níveis muito baixos de concentração.

No Apêndice A.7 apresentam-se estudos adicionais efectuados para as corridas SIMA10, SIME02 e SIME03.

5.5.2.4 *Apreciação global*

Pela análise comparativa dos resultados obtidos em simulação, o par que apresenta melhores desempenhos é o par O-C. Resta verificar se o seu desempenho se mantém face a perturbações e/ou erros, introduzidos nas variáveis medidas.

5.5.3 *Análise da influência da precisão das medidas nas estimativas (par O-C)*

Para o par O-C procedeu-se a um estudo por simulação com o objectivo de avaliar quão robustos são os observadores e estimadores apresentados neste capítulo. Dispensou-se a análise para os outros pares por se achar desnecessária e repetitiva. As alterações introduzidas nas medidas traduzem-se em ruídos e desvios constantes em relação ao valor de simulação.

Na análise referente à introdução de desvios e erros nos valores iniciais nas variáveis medidas utilizou-se o perfil de alimentação da experiência EXPA04 mas com as medições teóricas, de simulação, de O, C, OTR e CTR.

5.5.3.1 *Introdução de ruídos*

A influência da introdução de ruídos nas variáveis de estado no desempenho do estimador foi testada em corridas de simulação a caudal constante ou variável para o par O-C. Apresenta-se uma corrida para exemplo - SIMR01. Tratou-se de uma simulação a caudal variável (Figura 5.10), em que se pretendeu manter constante a concentração de etanol. O modo de o conseguir está fora dos objectivos deste capítulo (no capítulo 6 apresenta-se, em detalhe, este assunto).

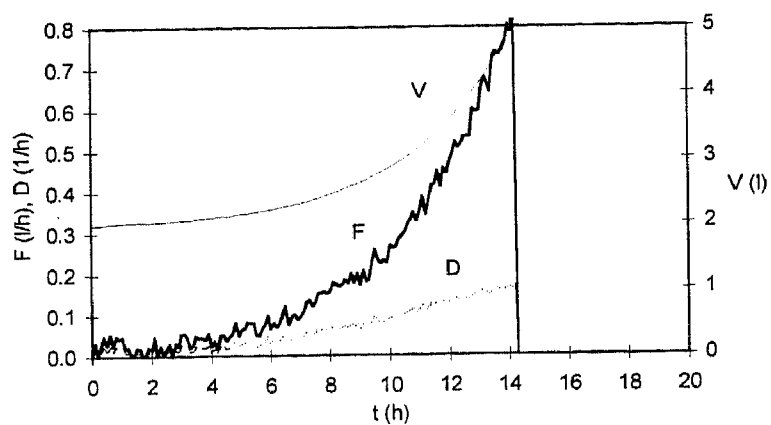
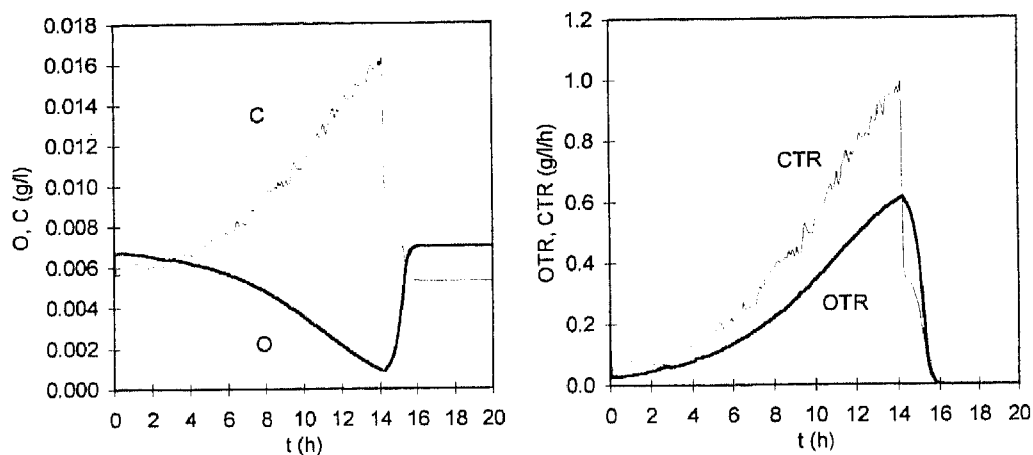


Figura 5.10 SIMR01 - Perfil de alimentação

A Figura 5.11 apresenta os perfis dos valores de O , C , OTR e CTR de simulação utilizados como sendo as medições experimentais.

Figura 5.11 SIMR01 - Perfil das medidas O , C , OTR e CTR

A Figura 5.12 apresenta os perfis das variáveis de estado estimadas e das três cinéticas de crescimento.

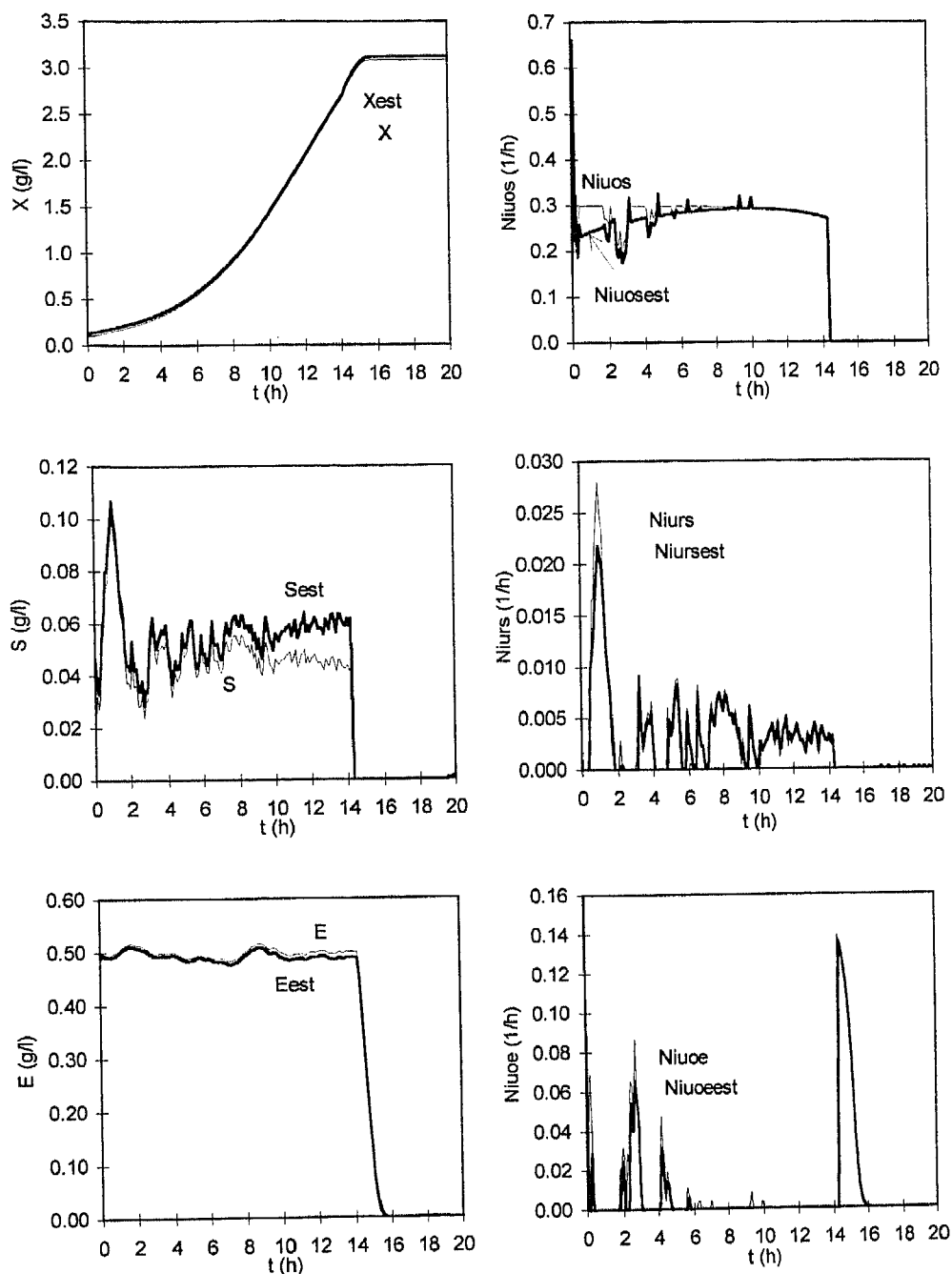


Figura 5.12 SIMR01 - Observação do estado e estimativa das cinéticas

O estimador mostrou-se robusto aos ruídos introduzidos nas variáveis medidas.

5.5.3.2 Introdução de desvios nos valores medidos

Neste estudo tomou-se como base a corrida apresentada na Figura 5.5

Os desvios introduzidos nas medidas consistiram em multiplicar por 1.1 e por 0.9 (desvios de $\pm 10\%$) os valores medidos de O, C, OTR, CTR e F antes de passar o respectivo valor para a rotina de estimação. As alterações foram efectuadas uma por corrida,

mantendo, em todas elas, inalterados os valores da rotina de simulação. Para o OTR e o CTR introduziram-se também variações positivas e negativas de 30%. A escolha do caudal de alimentação neste estudo deveu-se ao facto de F entrar na fórmula de cálculo experimental das taxas de transferência gasosa, e poder, eventualmente estar sujeito a imprecisões na sua determinação.

A Figura 5.13 resume as variações efectuadas nas cinco variáveis.

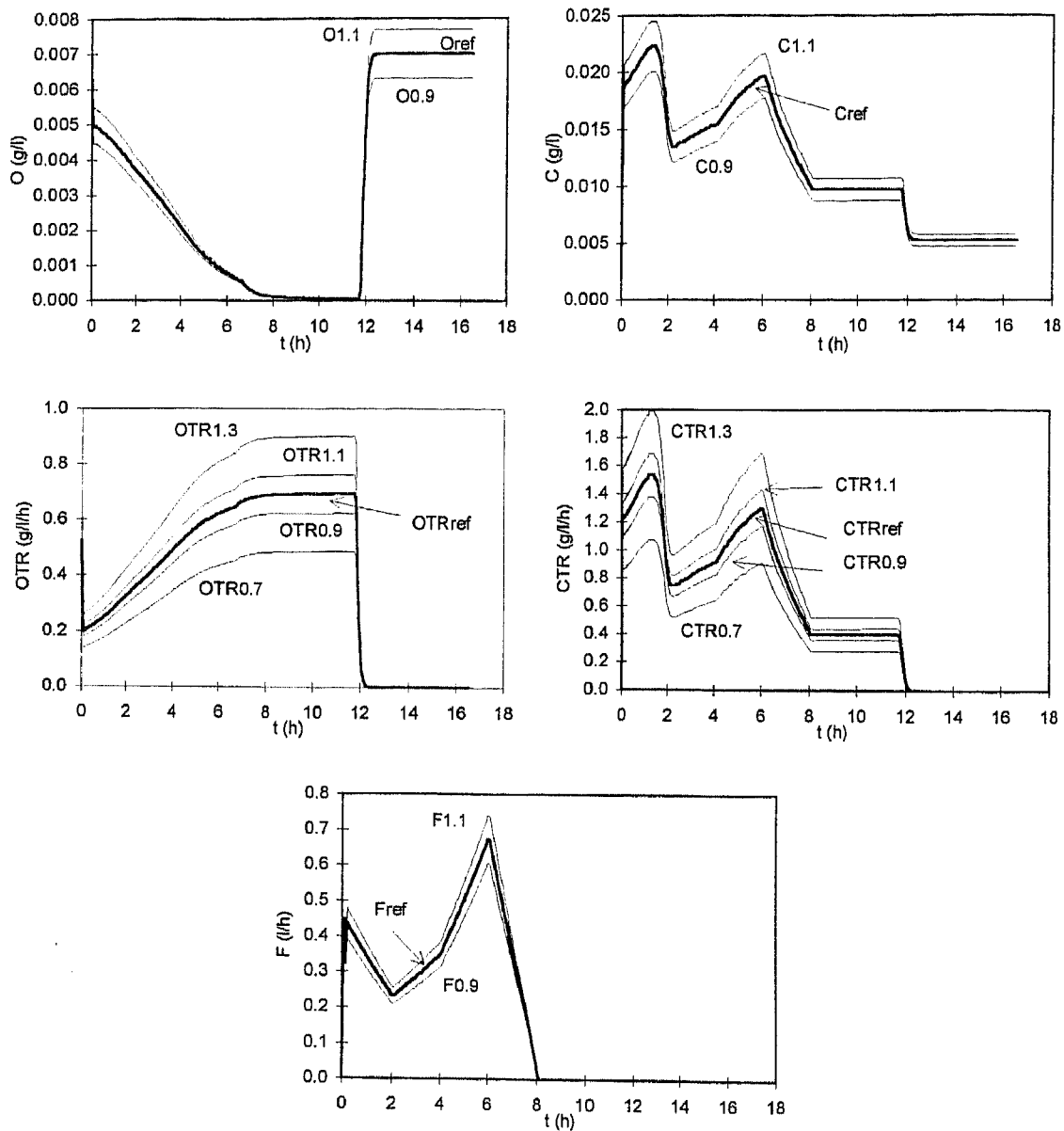


Figura 5.13 Variações introduzidas em F , O , C , OTR e CTR

Os desvios introduzidos nas medidas O , C e F não afectam as estimativas do estado e das cinéticas, pelo que se dispensa o seu traçado gráfico. As variações de 10 e 30 % em OTR e CTR afectam as estimativas. Da Figura 5.14 à Figura 5.17 apresentam-se os perfis das

variáveis de estado e das cinéticas estimadas para o caso de erros persistentes de 10 e 30 % em OTR e CTR.

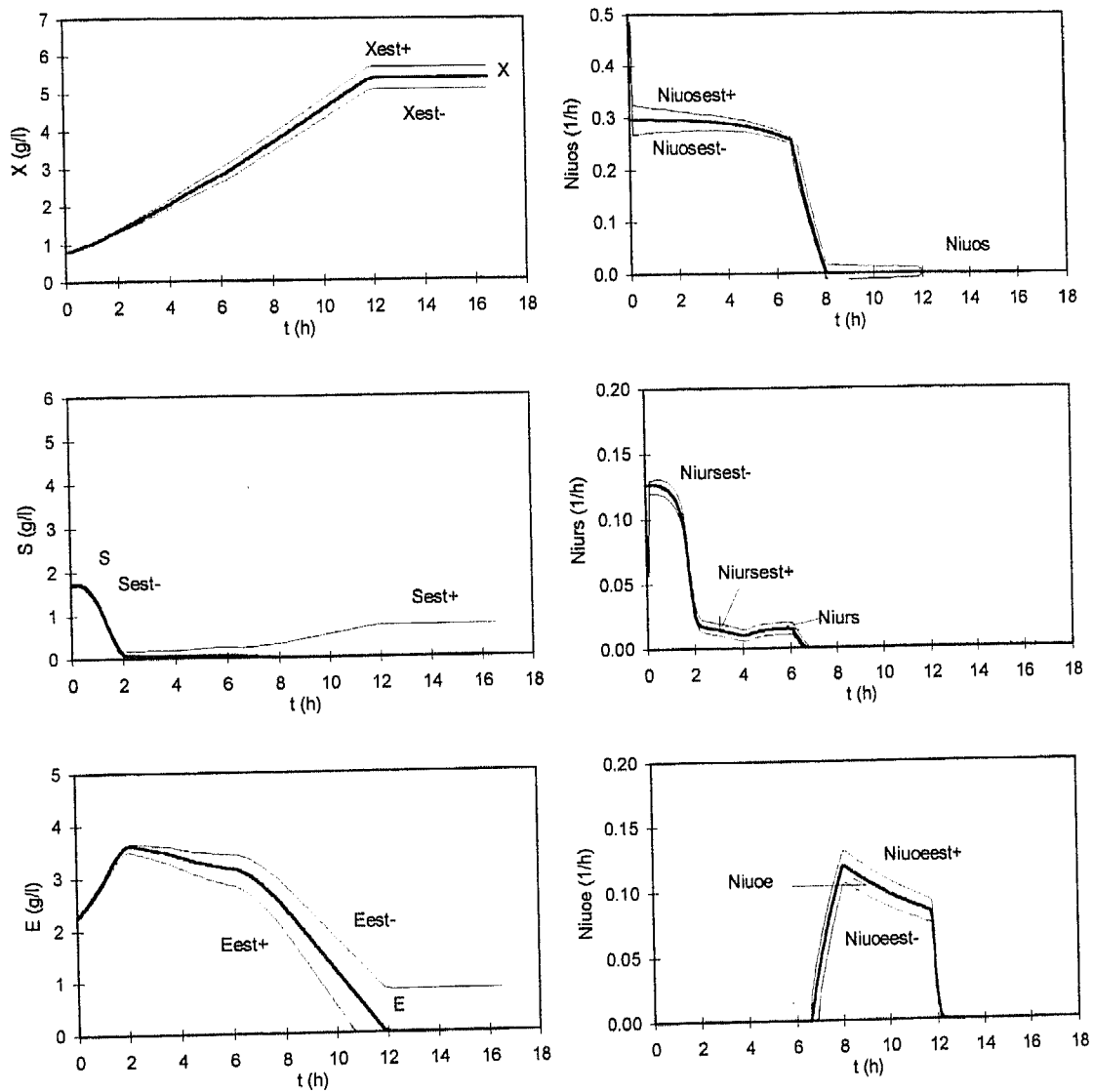


Figura 5.14 Estudo da influência de desvios de $\pm 10\%$ em OTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino)

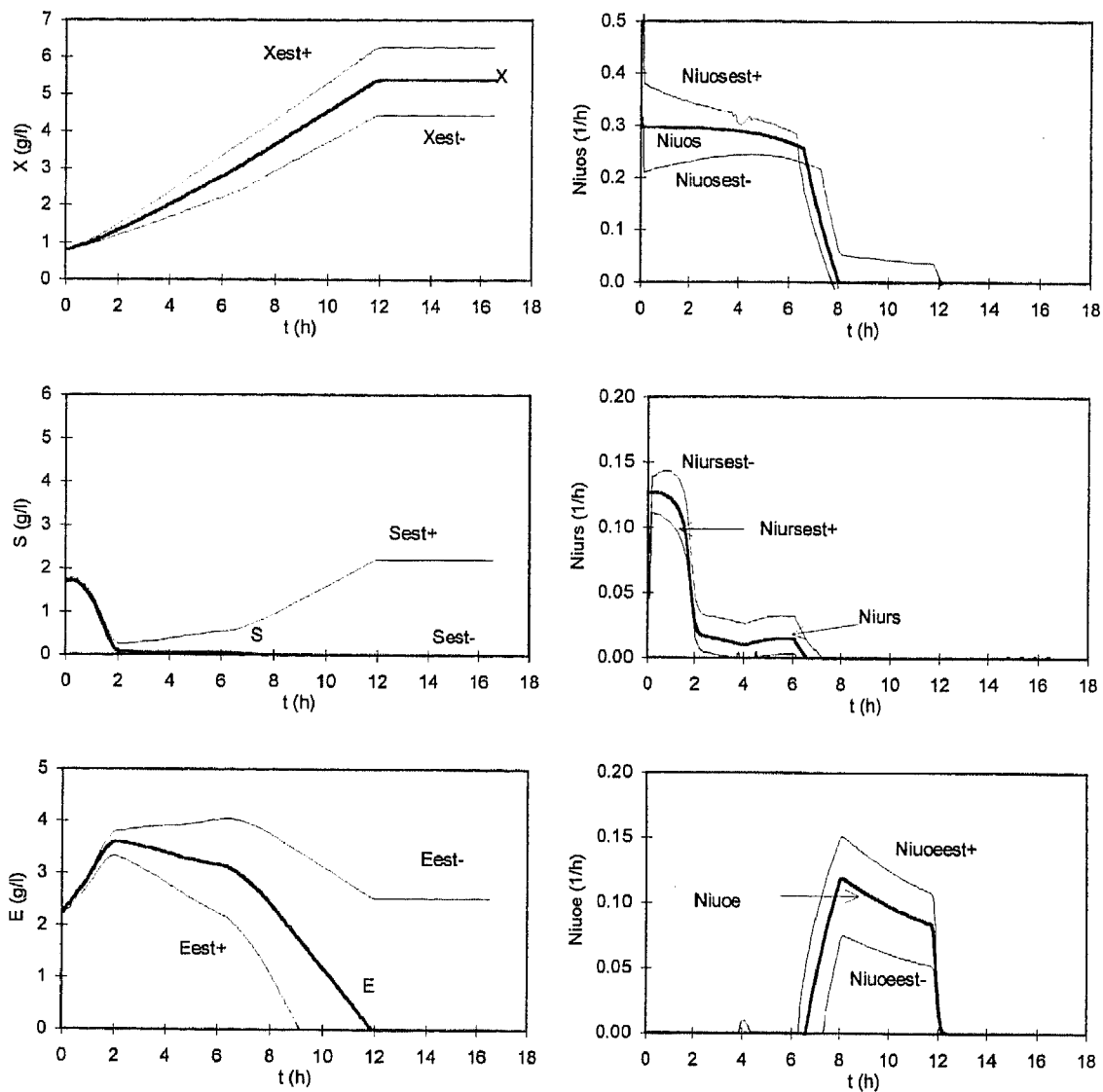


Figura 5.15 Estudo da influência de desvios de $\pm 30\%$ em OTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino)

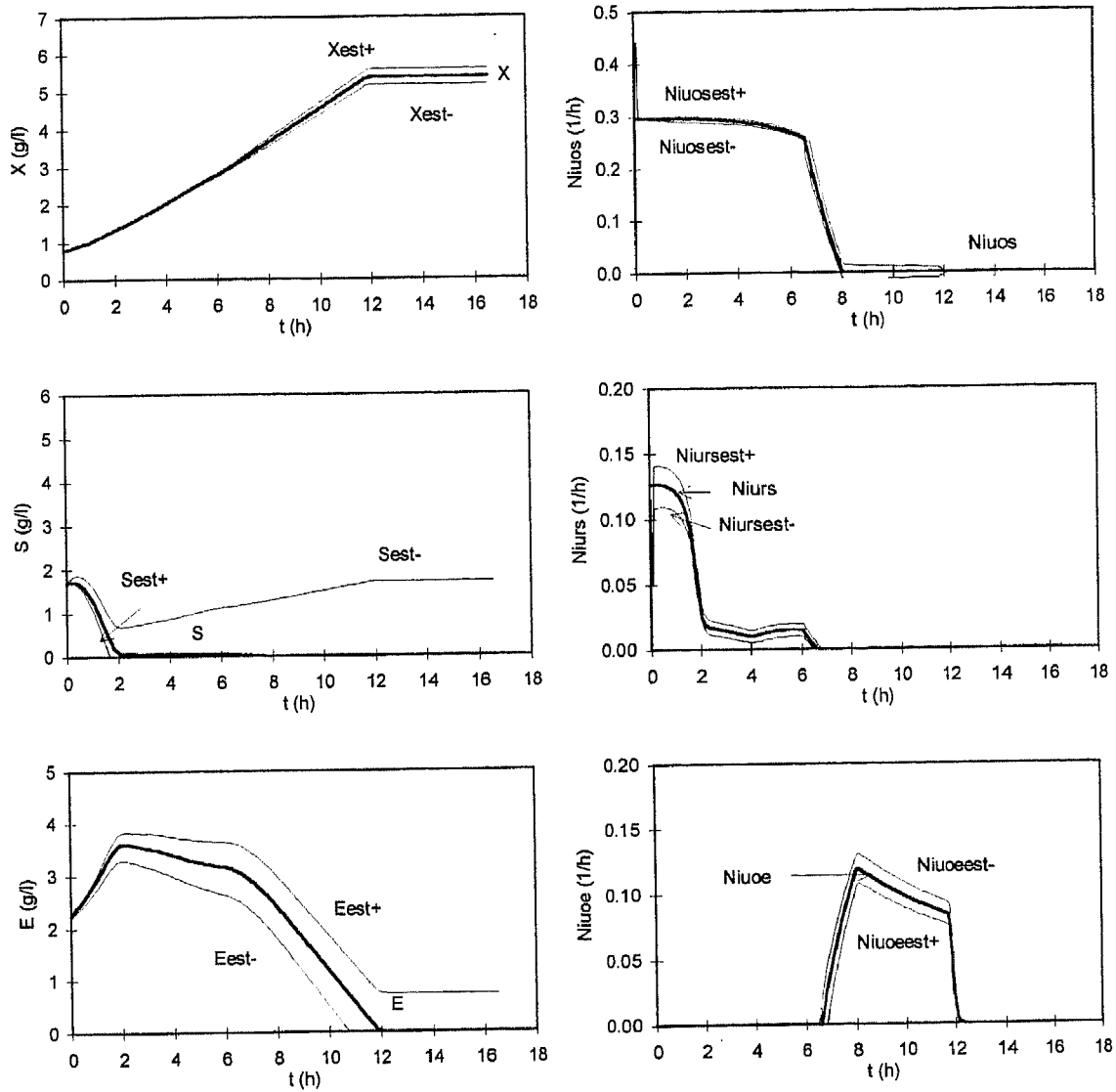


Figura 5.16 Estudo da influência de desvios de $\pm 10\%$ em CTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino)

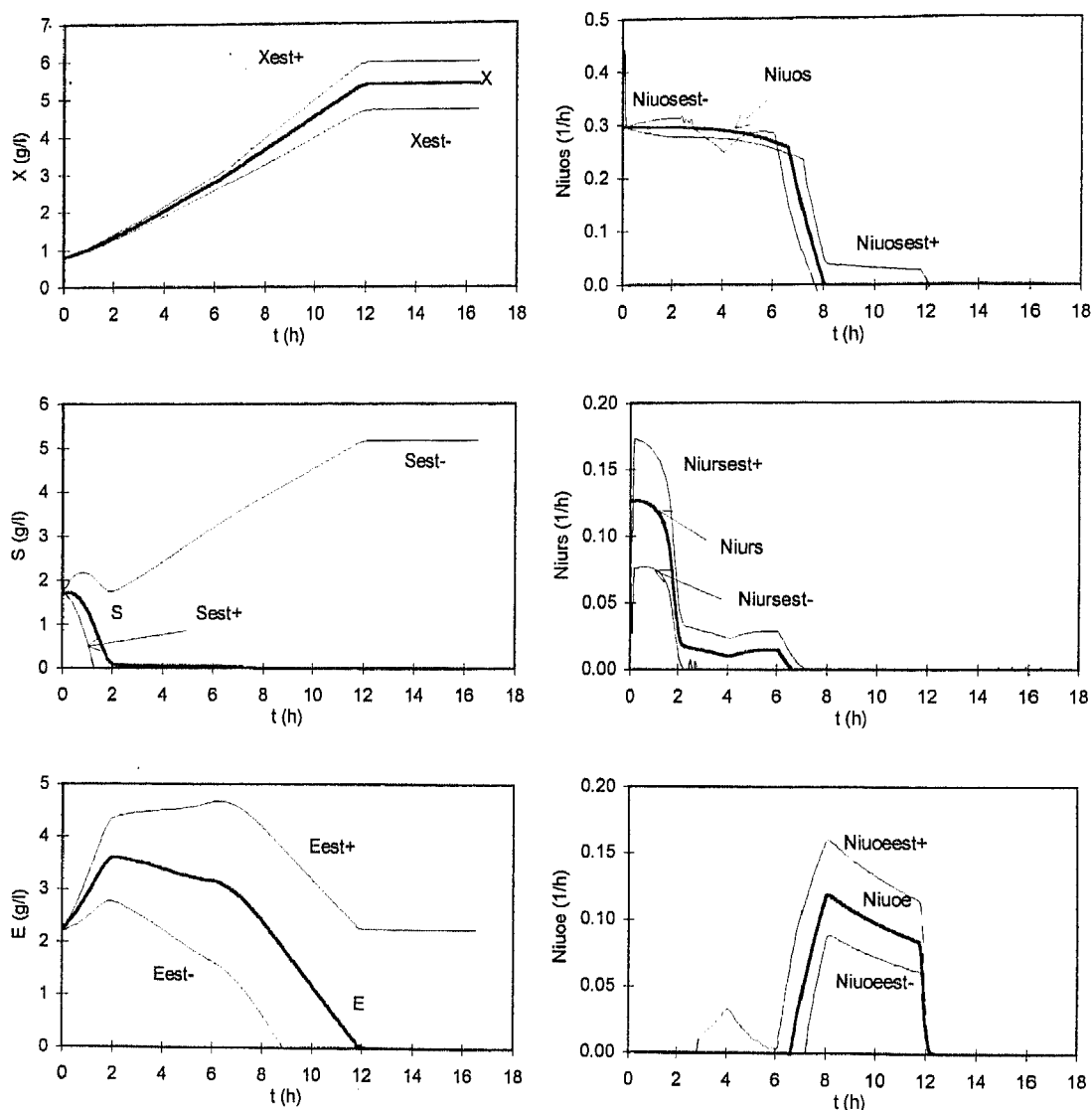


Figura 5.17 Estudo da influência de desvios de $\pm 30\%$ em CTR na estimativa do estado e das cinéticas: modelo base (traço grosso), desvio positivo (traço médio) e desvio negativo (traço fino)

O estudo efectuado permitiu concluir a importância das medidas no processo de estimação. O estimador é bastante sensível a erros persistentes na medição experimental.

5.5.3.3 Introdução de erro nos valores iniciais das variáveis de estado

De modo a avaliar a influência dos valores iniciais das variáveis a estimar - X, S e E, realizaram-se três simulações em que o valor inicial passado à rotina de estimação foi 1.5 vezes o valor inicial da simulação.

Da Figura 5.18 à Figura 5.20 apresentam-se os resultados obtidos para uma variação na concentração inicial de biomassa, glucose e etanol, respectivamente.

Pela análise das figuras conclui-se que um erro no valor inicial da variável a estimar influencia o desempenho do observador nessa variável. Excepto, no caso da biomassa, esse erro inicial influencia também o estimador de cinéticas. Torna-se, então, claro a importância do rigor das estimativas iniciais das variáveis a observar.

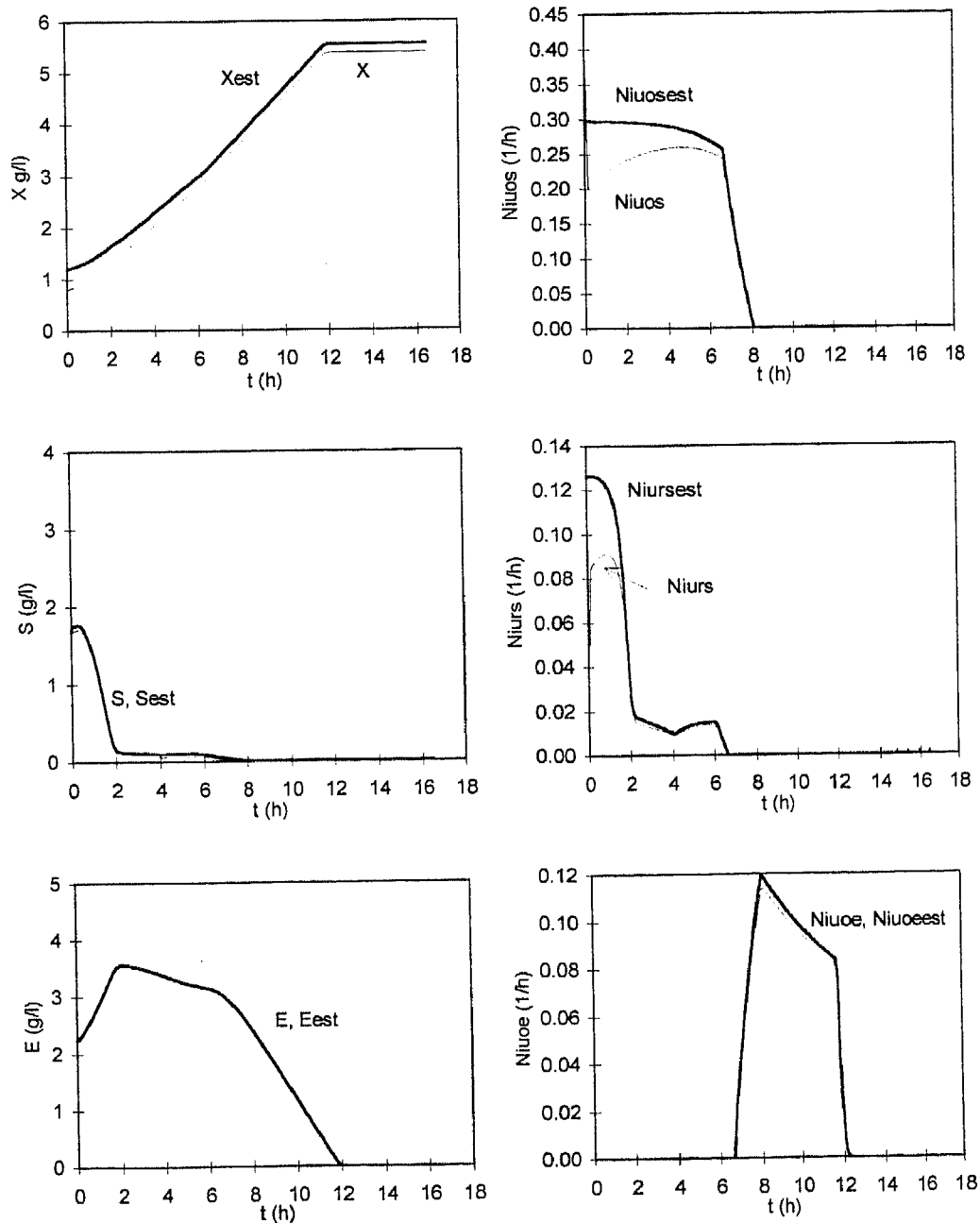


Figura 5.18 Perfis das variáveis estimadas e das cinéticas - erro no valor $X(0)$

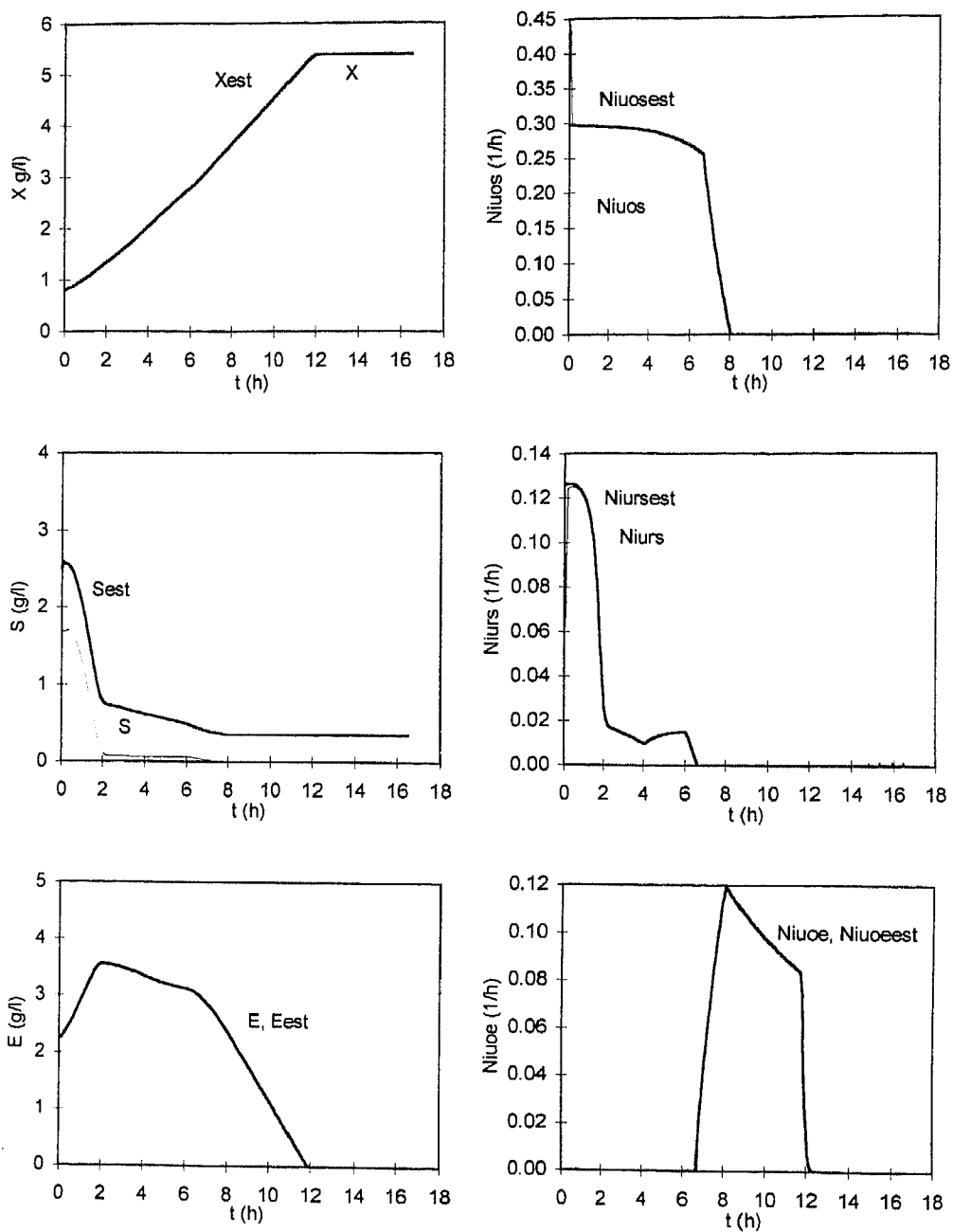


Figura 5.19 Perfis das variáveis estimadas e das cinéticas - erro no valor $S(0)$

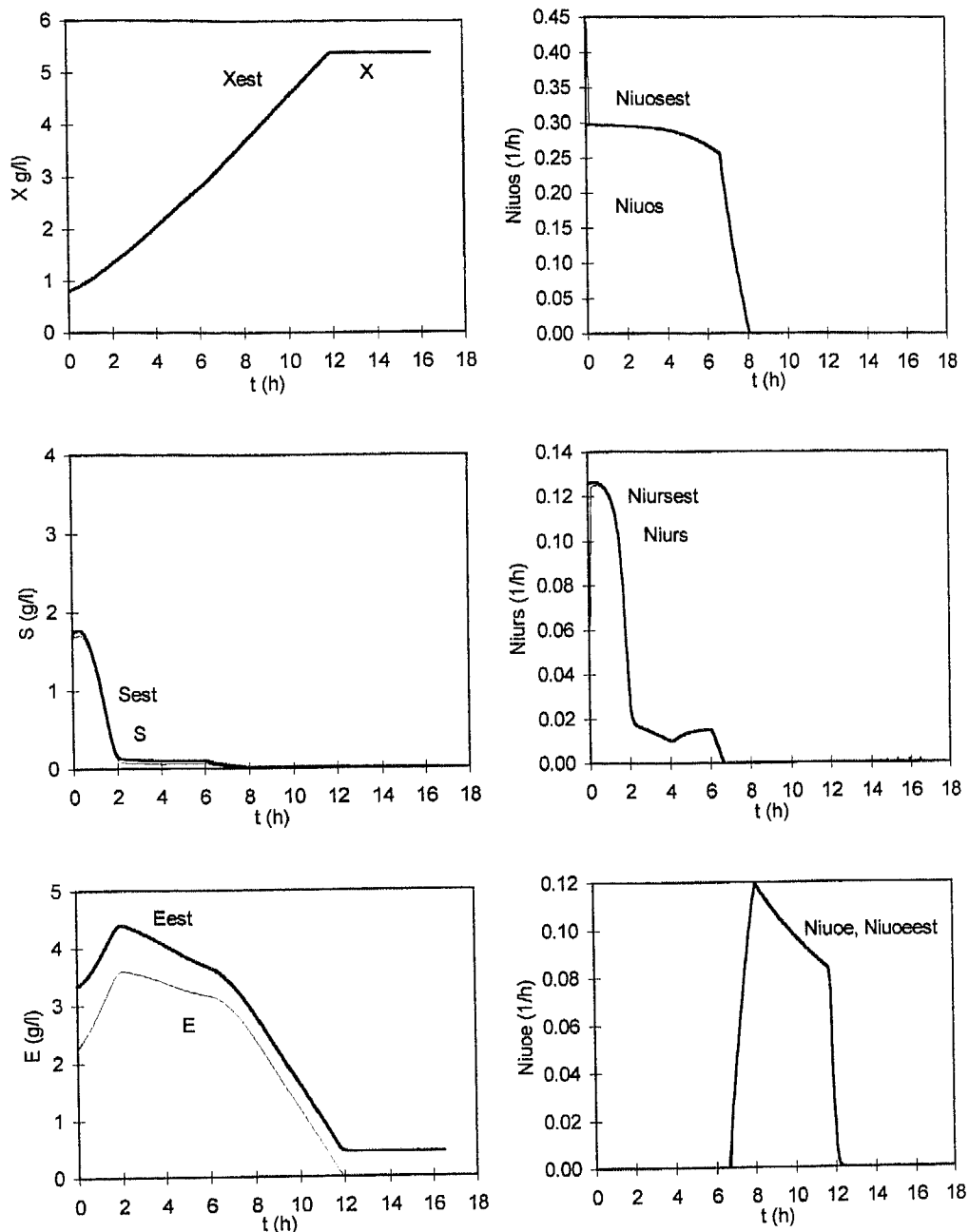


Figura 5.20 Perfis das variáveis estimadas e das cinéticas - erro no valor $E(0)$

5.5.3.4 Apreciação global

Os estudos adicionais efectuados para o par O-C consistiram na análise do desempenho do estimador face à introdução de ruídos nas variáveis medidas, face a erros persistentes nas medições e a erros nos valores iniciais das variáveis de estado.

Tornou-se clara a sensibilidade do estimador perante erros nas medições, em particular a erros persistentes de $\pm 30\%$ no valor de OTR e CTR. Estes desvios levam a comportamentos irrealistas do estimador, nomeadamente, na concentração de glucose em

que é previsto um perfil crescente quando o modelo teórico aponta para uma diminuição até concentrações próximas de zero.

O estimador provou ser sensível a erros nos valores iniciais das variáveis a estimar, não conseguindo eliminar o desvio verificado entre o perfil obtido pelo modelo teórico e o estimado. No caso de erros iniciais na concentração de biomassa, verifica-se, também, um desempenho deficiente nas estimativas das cinéticas, em especial, nas taxas de crescimento em glucose (oxidativo e fermentativo).

A influência da introdução de ruídos nas medições foi a alteração que menos afectou o desempenho do estimador.

Os erros simulados para as variáveis medidas são uma realidade experimental. De modo que, este estudo aponta para uma eventual dificuldade no desempenho do estimador quando aplicado em-linha e em tempo real.

5.6 Resultados experimentais

Neste ponto faz-se a validação experimental das técnicas de estimação atrás apresentadas. Para esta análise seleccionaram-se as experiências EXPC03, EXPA04, EXPA08 e EXPA10, em regime de alimentação de glucose e as experiências EXPE02 a EXPE04, em regime de alimentação de melaços. Tratam-se de experiências semi-contínuas a caudal constante ou a caudal programado.

As corridas com alimentação de melaços foram tratadas, tal como em capítulos anteriores, considerando a soma dos açúcares presentes em solução como sendo um só substrato.

A caracterização de cada experiência, em termos de perfis e concentração de substrato na corrente de alimentação, valores iniciais e finais das variáveis de estado, produtividades e rendimentos, encontra-se resumida na Tabela 3.12.

Para não se tornar fastidioso ao leitor a apresentação sucessiva de gráficos das várias corridas e para os três pares de medidas considerados, optou-se por apresentar alguns resultados neste parágrafo, remetendo-se os restantes para o Apêndice 7.

5.6.1 Aspectos práticos de implementação - Programa *Monitor*

O programa *Monitor* implementa em linha os algoritmos de observação do estado e estimativa das cinéticas correspondentes ao par O-C (parágrafo 5.4.1). Convém detalhar, neste momento, o método de cálculo experimental das variáveis necessárias ao estimador.

Determinação de OTR e CTR

As rotinas de estimação necessitam das medidas de oxigénio e dióxido de carbono dissolvidos e das respectivas taxas de transferência gasosa. Estas últimas são obtidas por balanço à fase gasosa, segundo equações apresentadas no ponto 4.4.3.2 e que se transcrevem de seguida.

$$OTR = \frac{G_e y_{e,N_2} M_{O_2}}{V} \left(\frac{y_{e,O_2}}{y_{e,N_2}} - \frac{y_{s,O_2}}{y_{s,N_2}} \right) \quad (5.111)$$

$$CTR = \frac{G_e y_{e,N_2} M_{CO_2}}{V} \left(\frac{y_{s,CO_2}}{y_{s,N_2}} - \frac{y_{e,CO_2}}{y_{e,N_2}} \right) \quad (5.112)$$

A composição da corrente gasosa, à entrada e à saída do reactor é dada pelo espectrómetro de massa, após calibração prévia e segundo procedimento apresentado no ponto 3.7.3. O caudal molar de gás à entrada do fermentador, G_e , é determinado segundo equação (já mencionada no ponto 4.4.3.2):

$$G_e = \frac{Q_e P}{RT} \quad (5.113)$$

em que:

- Q_e caudal volúmico de ar disponibilizado pelo DCU;
- P, T pressão e temperatura nas condições normais;
- R constante dos gases perfeitos.

Determinação do volume de fase líquida

O volume do reactor, V , é contabilizado pelo programa *Monitor* através da aproximação:

$$V = V_o + V_{ac} + V_b + V_{adic} \quad (5.114)$$

com: V_o , volume inicial do reactor introduzido pelo utilizador no ficheiro de configuração

de variáveis, confl.var; V_{ac} e V_b , respectivamente, volume de ácido e base adicionados, valores esses disponibilizados pelo DCU; V_{adic} é o volume de meio de alimentação adicionado (contabilizado pela diferença de massa registada pela balança - onde se encontra o recipiente com a alimentação - e, considerando, a densidade do meio de cultura aproximadamente igual a 1 kg/l).

Chamou-se aproximação à equação anterior, uma vez que não foi contabilizado o volume de amostra retirado. O facto deveu-se a não se pensar ser relevante o volume total de amostras face aos 5 l de volume final do reactor.

Determinação de oxigénio dissolvido

A concentração de oxigénio dissolvido é dada pela sonda de oxigénio, multiplicando respectivo valor em percentagem pela solubilidade do oxigénio (valor utilizado: 7 mg/l).

Determinação de dióxido de carbono dissolvido

Em relação à medida de dióxido de carbono dissolvido, o processo não é tão simples em virtude de não se dispor de uma sonda para determinação da composição na fase líquida. O procedimento efectuado foi o seguinte. Pela aplicação da lei de Henry e dispondo da composição da corrente gasosa, determina-se a concentração de saturação de dióxido de carbono na fase líquida, C^* , a saber:

$$p_{CO_2} = y_{CO_2} P = C^* H_{CO_2} \quad (5.115)$$

com: p_{CO_2} , pressão parcial do CO_2 ; y_{CO_2} , fracção molar de CO_2 na corrente gasosa; P , pressão total; H_{CO_2} , constante de Henry.

Sabido o valor da taxa de transferência de massa de dióxido de carbono, e considerando o valor para o respectivo coeficiente de transferência de massa como igual a 90% do coeficiente do oxigénio, determina-se a concentração de dióxido de carbono dissolvido pela equação:

$$C = C^* + \frac{CTR}{K_l^{CO_2} a} \quad (5.116)$$

Para mais detalhes aconselha-se a consulta do parágrafo 4.4.3.1.

Determinação de etanol dissolvido

A medida de etanol dissolvido é obtida pelo sensor de etanol, por calibração prévia em soluções padrão, convertendo o sinal de tensão em concentração.

5.6.2 Casos de estudo

Programa *SimExp*

O programa *Monitor* grava em ficheiro todas as variáveis relevantes no decorrer da fermentação. Deste modo é possível tratar os valores experimentais em diferido sem perda de rigor do conceito de estimativa em linha. Assim, desenvolveu-se o programa *SimExp*, que lê de ficheiro os valores experimentais de tempo, caudal de alimentação, OTR, CTR, e os pares O-C, O-E e E-C, e implementa os algoritmos de estimação acima referidos. O *SimExp* inclui, além das rotinas de observação e estimativa das cinéticas, inclui, também, a rotina de simulação do processo. O passo de integração é imposto pelo tempo experimental. No final da corrida os dados são gravados em ficheiro, passíveis de serem importados por um programa de traçado gráfico para análise comparativa de resultados.

Com o *SimExp* e para as experiências seleccionadas para estudo procedeu-se a um estudo comparativo das várias opções de medida.

De referir que, para o caso 1, os valores obtidos com o programa *SimExp*, em diferido, são idênticos aos obtidos em linha pelo programa *Monitor*.

O par O-C foi o mais extensivamente analisado. A razão para esta selecção como ponto de partida do par a estudar, reside numa análise efectuada por Pomerleau e Perrier (1990), complementada com os estudos de simulação efectuados, em que estes autores apontam o par O-C como o que apresenta melhores estimativas de biomassa. No entanto, e como confirmam os resultados a seguir apresentados, os algoritmos são bastante sensíveis à precisão das medidas efectuadas bem como aos respectivos valores iniciais. Aliás, este facto já tinha sido apontado pelos estudos de simulação apresentados no ponto 5.5.3. Uma vez demonstrada a sensibilidade dos algoritmos de estimação para o caso 1, dispensou-se apresentar estudos análogos para os outros casos. Para estes, são apresentados apenas os resultados obtidos com as medidas experimentais.

5.6.2.1 Caso 1 - Variáveis de estado medidas: par O-C

Este par foi extensivamente estudado neste ponto, em virtude de os resultados obtidos experimentalmente na estimação do estado e das cinéticas serem significativamente inferiores aos obtidos em simulação. Este estudo levou à identificação da medida de OTR como a principal responsável pela introdução de erros e à definição de um parâmetro correctivo α na equação de determinação de OTR por balanço à fase gasosa. A Tabela 5.5 resume os estudos efectuados em cada experiência.

Tabela 5.5 Estudos efectuados no tratamento de resultados experimentais

<i>Experiência</i>	<i>Estudo</i>
EXPC03	Teste base com as medidas experimentais
EXPA04	Teste base com as medidas experimentais
EXPA04	OTR simulação como medida experimental
EXPA04	OTR e O simulação como medida experimental
EXPA04	OTR, O e C simulação como medida experimental
EXPA04	OTR e CTR simulação como medida experimental
EXPA04	Apreciação do estudo
EXPA08	Diferentes valores de $S(0)$
EXPA08	Apreciação do estudo
EXPA08	OTR simulação como medida experimental
EXPA08	Introdução do parâmetro α no cálculo de OTR
EXPA08	Apreciação do estudo

Experiência EXPC03

A Figura 5.21 apresenta os valores experimentais, do modelo teórico e o observado para as variáveis biomassa, glucose e etanol. A fermentação decorreu a caudal constante e igual a 0.15 l/h.

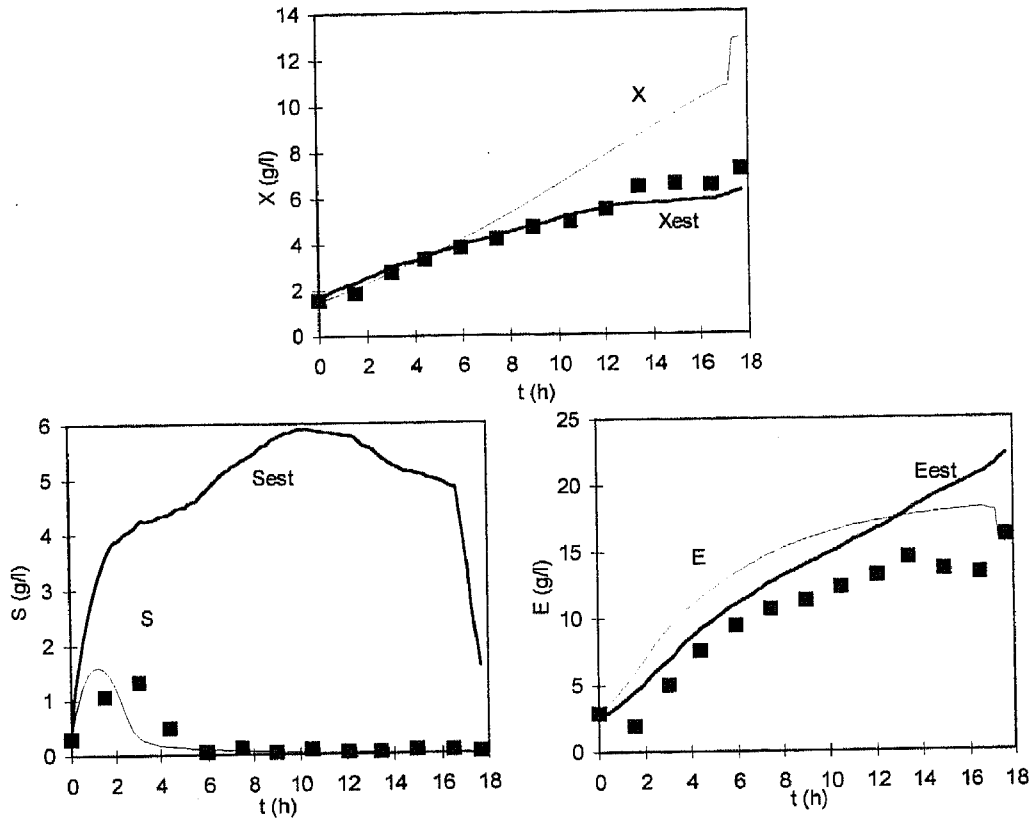


Figura 5.21 EXPC03 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso).

Os valores estimados para a biomassa são praticamente coincidentes com os valores experimentais, não se podendo dizer o mesmo da observação da glucose, cuja evolução é contrária à real, ou seja, o substrato devia ser consumido e não aumentar/manter o seu valor durante cerca de 12 horas. Em relação ao etanol, a estimativa não é tão má como no caso da glucose, mas apresenta um desvio persistente em relação ao valor experimental.

Experiência EXPA04

O perfil de alimentação implementado nesta corrida encontra-se na Figura 5.22.

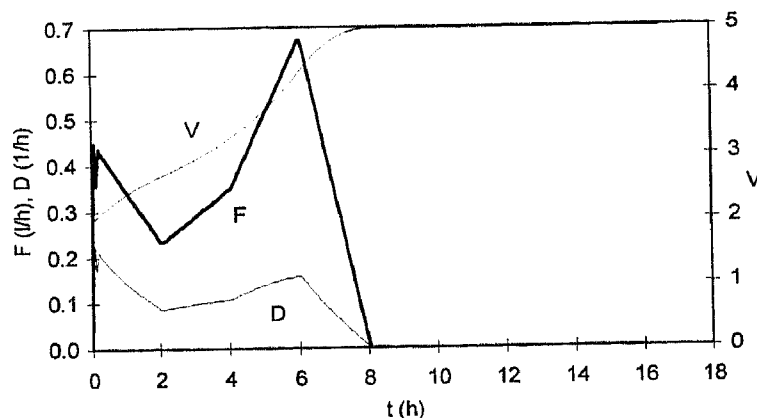


Figura 5.22 EXPA04 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reactor

Medidas experimentais

A Figura 5.23 apresenta os perfis das variáveis medidas, O e C, e das taxas de transferência gasosa, OTR e CTR.

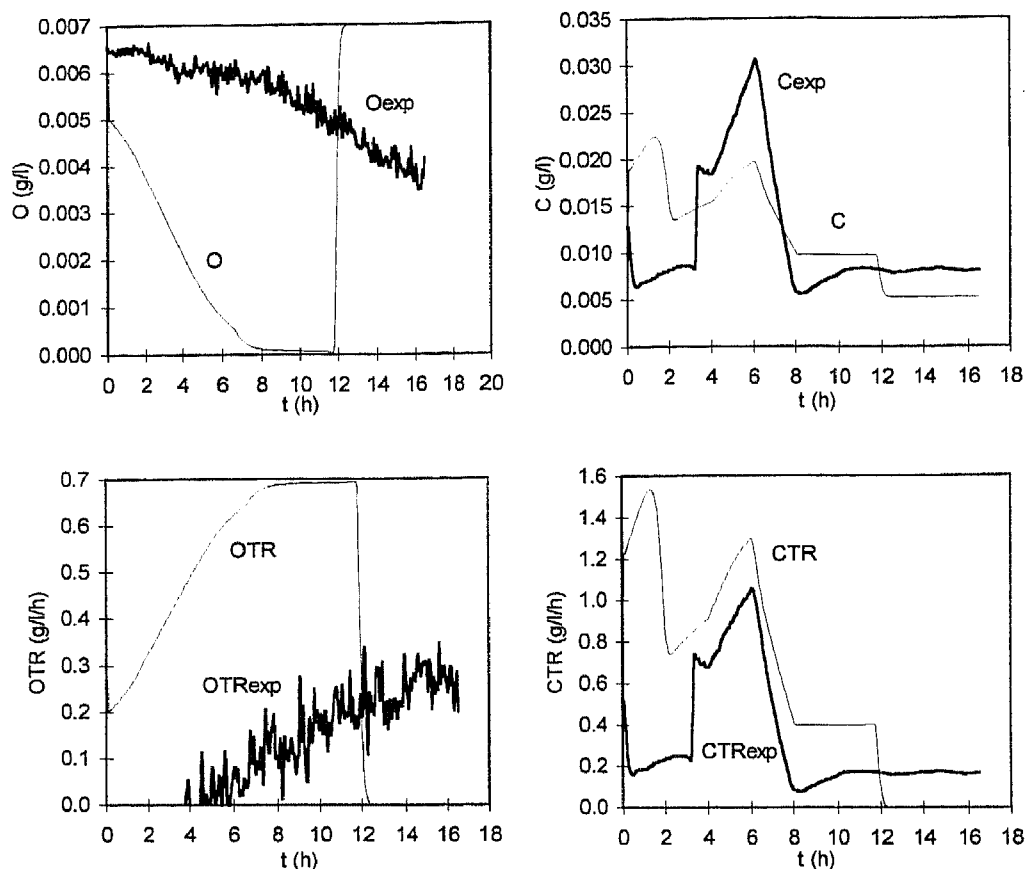


Figura 5.23 EXPA04 - Valores de O, C, OTR e CTR experimentais (traço fino) e do modelo teórico (traço grosso)

A Figura 5.24 apresenta os valores experimentais, do modelo teórico e o observado para as variáveis biomassa, glucose e etanol e mostra também os valores estimados e obtidos pelo modelo de simulação para as taxas cinéticas de crescimento.

Os resultados obtidos na observação do estado e na estimativa das cinéticas são bastante maus. De forma a tentar encontrar uma justificação para o facto, e dado que em simulação o algoritmo se comportou de um modo eficiente, analisou-se os perfis das variáveis medidas, comparando-os com os valores de simulação. A Figura 5.23 aponta a existência de um desvio considerável entre os valores experimentais e do modelo, principalmente nas medidas de O e OTR.

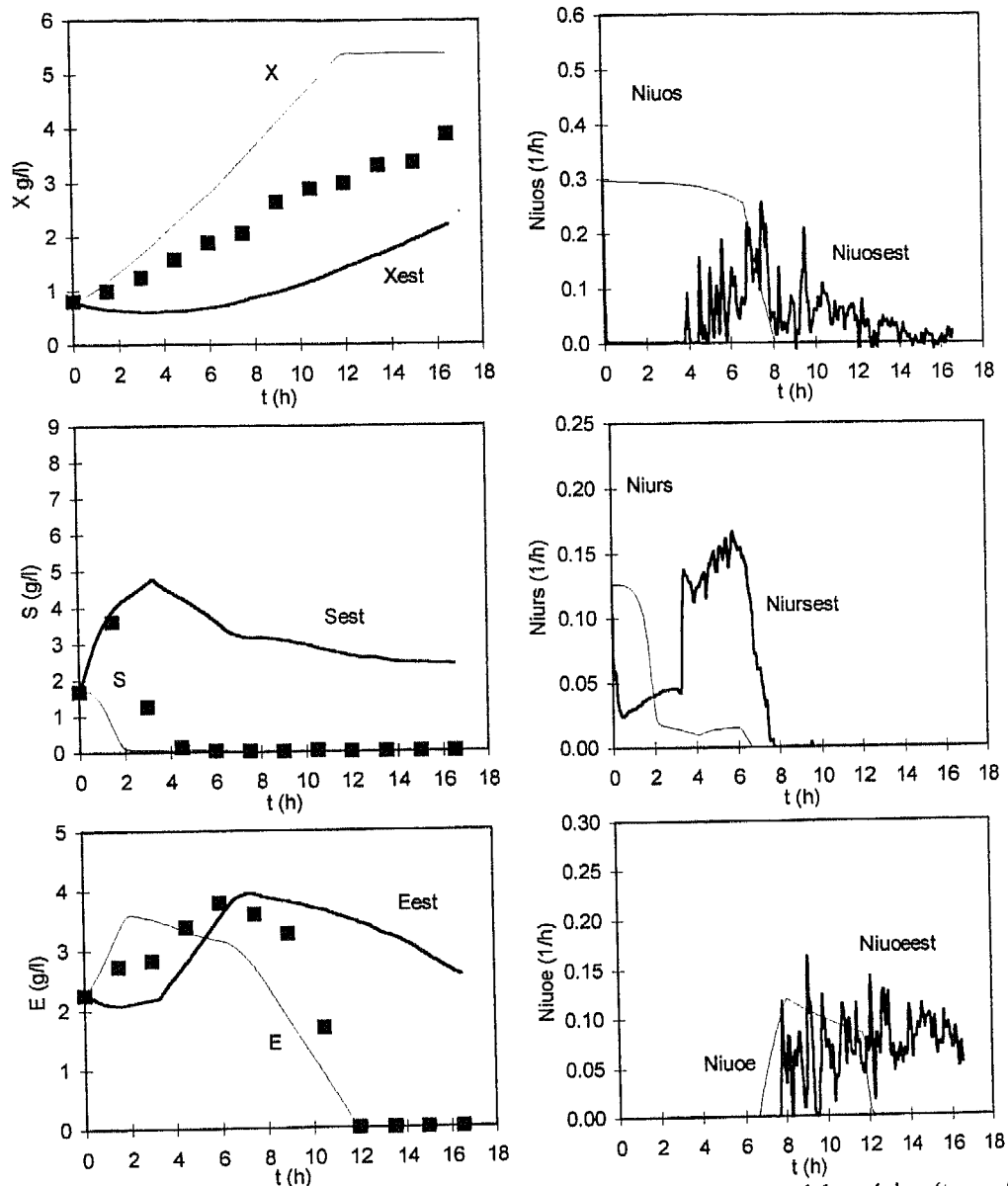


Figura 5.24 EXPA04 - Valores de X , S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso) e taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

OTR de simulação como medida experimental

Numa procura de encontrar justificação para os maus resultados obtidos procedeu-se à realização de várias simulações em que se assumiu como valores experimentais os obtidos em simulação, para cada uma das medidas utilizadas.

A Figura 5.25 apresenta as estimativas do estado e das cinéticas obtidas considerando a medida de OTR experimental igual ao valor obtido por simulação. Este facto afecta todas as estimativas, sendo o resultado obtido para a biomassa mais favorável.

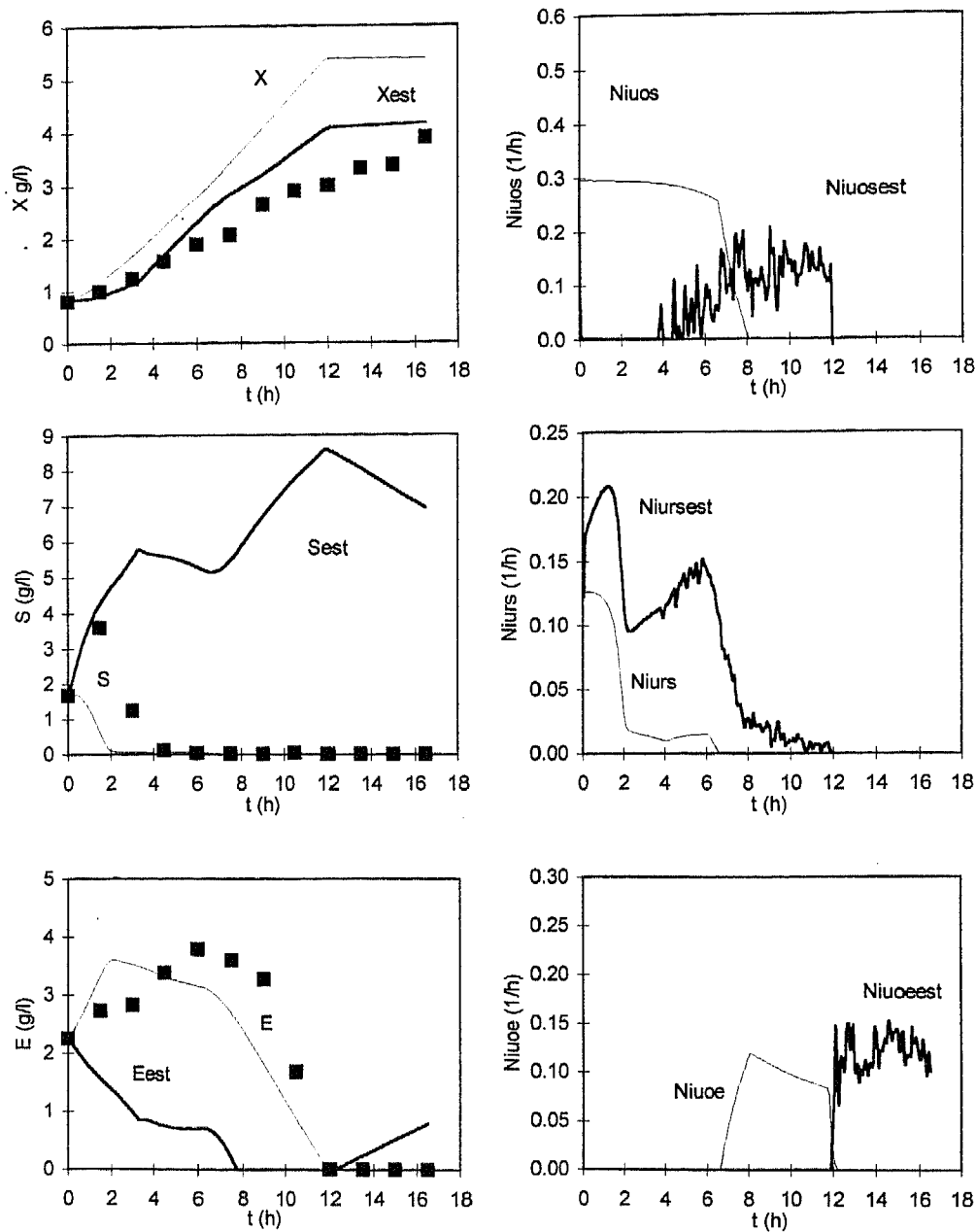


Figura 5.25 EXPA04 - Valores de X , S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR experimental igual ao de simulação

OTR e O de simulação como medidas experimentais

Continuando com o procedimento de estudo, a Figura 5.26 apresenta as estimativas do estado e das cinéticas obtidas considerando agora as medidas de OTR e O experimentais iguais aos valores obtidos por simulação. A introdução da medida de simulação para o oxigénio dissolvido não afecta em nada a observação do estado; apenas afecta as cinéticas.

OTR e CTR de simulação como medidas experimentais

Resta analisar a influência da medição da taxa de transferência de dióxido de carbono. Como as medidas de O e C em nada afectaram as estimativas, consideraram-se, neste caso, apenas as medidas de OTR e CTR iguais às de simulação. A Figura 5.27 apresenta os resultados obtidos para as estimativas de estado e das cinéticas.

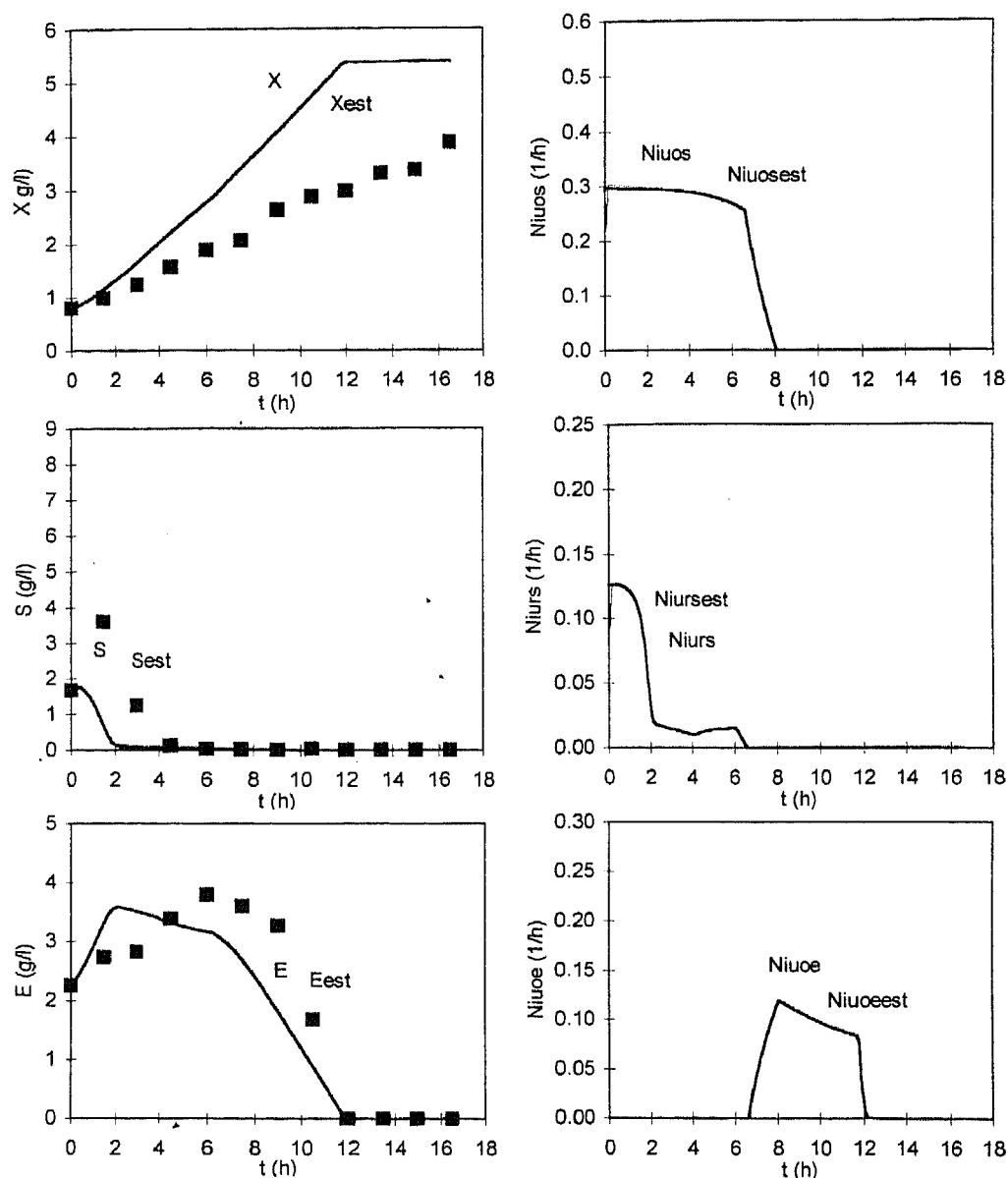


Figura 5.27 EXPA04 - Valores de X , S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR e CTR experimentais iguais aos de simulação

As estimativas obtidas em ambos os casos são agora coincidentes com os valores obtidos pelo modelo, embora não muito concordantes com os valores experimentais.

Apreciação do estudo efectuado

Esta análise confirma as suspeitas apontadas pelos estudos de simulação anteriormente apresentados, de que a precisão das medidas seleccionadas é um dos pontos fundamentais para a eficiência destes algoritmos.

Experiência EXPA08

O perfil de alimentação desta experiência encontra-se na Figura 5.28.

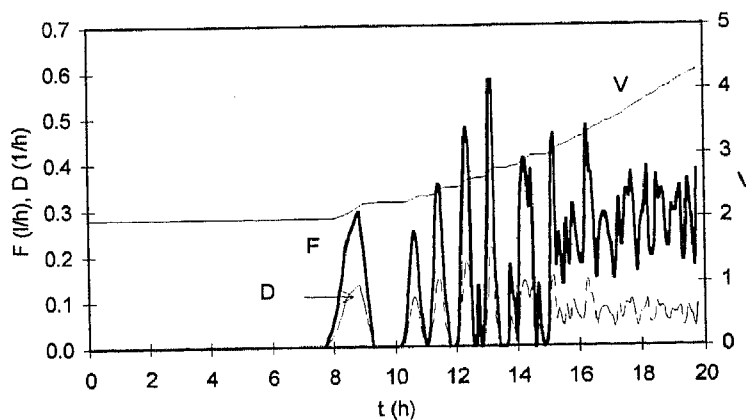


Figura 5.28 EXPA08 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reactor

Nesta experiência analisou-se a influência dos valores iniciais das variáveis de estado necessários à rotina de observação. Assim, considerou-se o valor inicial de glucose como sendo a) 0.3 g/l, b) 2.0 g/l. Este último é o valor correcto experimental. A Figura 5.29 apresenta as estimativas de estado e cinéticas obtidas para o caso a). Os correspondentes resultados para o caso b) encontram-se na Figura 5.30.

$$S(0) = 0.3 \text{ g/l}$$

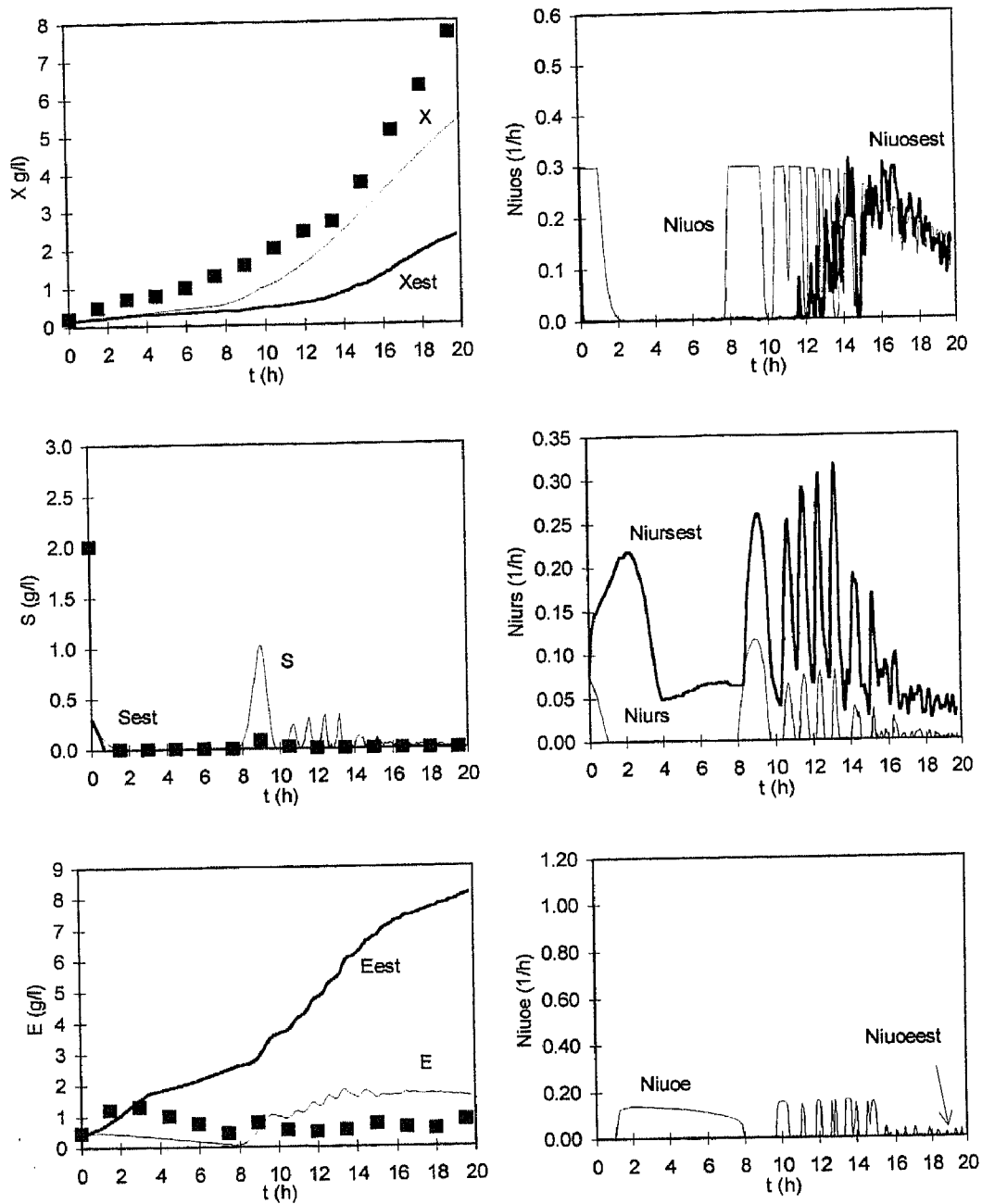


Figura 5.29 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando $S(0)=0.3 \text{ g/l}$

$S(0) = 2 \text{ g/l}$ (valor correcto)

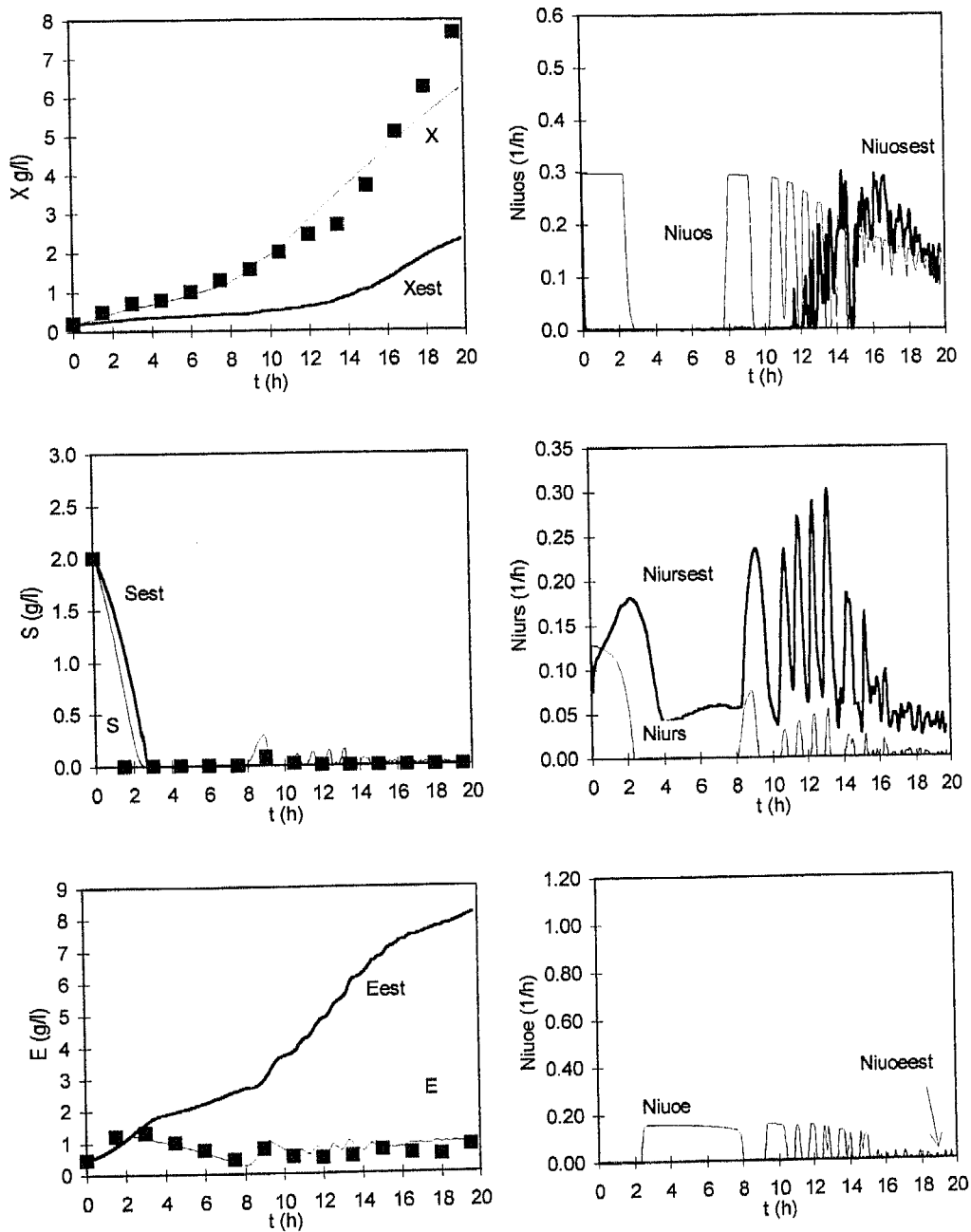


Figura 5.30 EXPA08 - Valores de X , S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando $S(0)=2.0 \text{ g/l}$

Apreciação do estudo efectuado

Tal como nos estudos de simulação, na realidade experimental o observador do estado é sensível a eventuais erros nos valores iniciais da concentração das variáveis a estimar. Nesta análise foi apresentada como exemplo a influência dessa inicialização na estimativa de glucose.

OTR de simulação como medida experimental

A análise efectuada anteriormente com a EXPA04 apontou para a importância das medições das taxas de transferência gasosa. A Figura 5.31 apresenta os perfis experimentais e de simulação para estas últimas. Uma vez que para o dióxido de carbono não se verifica diferenças acentuadas, procedeu-se à análise da influência do OTR nesta experiência.

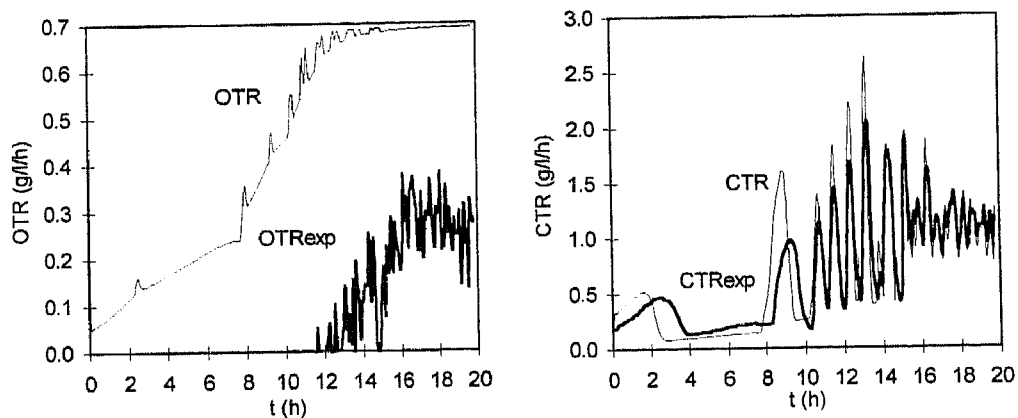


Figura 5.31 EXPA08 - Valores de OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

Assim, considerou-se a medida de OTR experimental igual à de simulação e correu-se o programa *SimExp*. A Figura 5.32 mostra os resultados obtidos. Esta mudança levou a melhorias consideráveis na estimativa de biomassa e de etanol, bem como na estimativa das cinéticas; o observador da glucose não teve um desempenho tão eficiente.

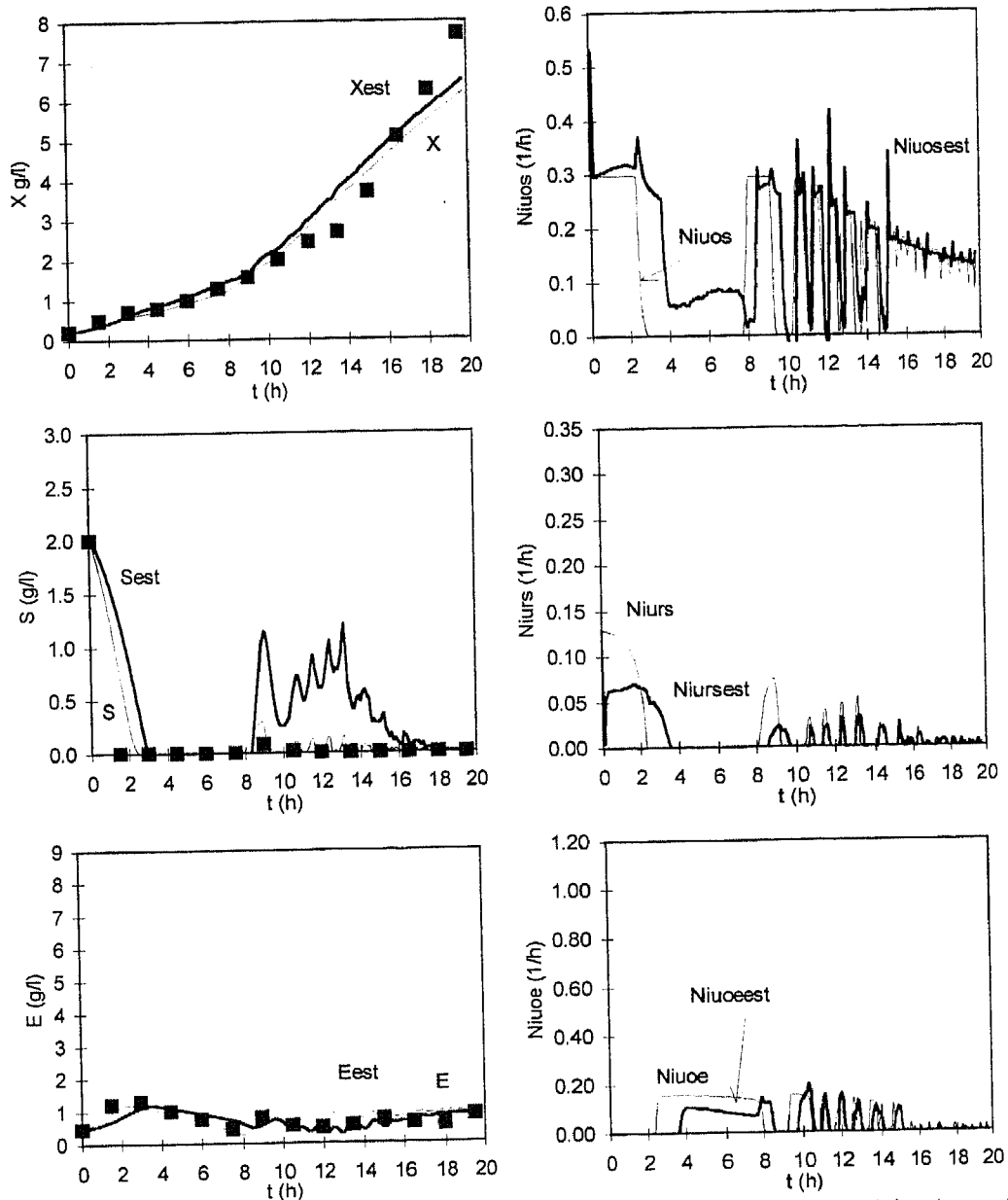


Figura 5.32 EXPA08 - Valores de X , S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando OTR experimental igual ao de simulação

Para avaliar a influência da medida de OTR também nos valores do quociente respiratório (utilizado para validação das estimativas das cinéticas), calcularam-se os perfis de RQ de dois modos: pela razão dos valores experimentais de CTR e OTR e, paralelamente, pela aplicação da equação (4.60), utilizando os valores estimados para as cinéticas de crescimento.

Assim, a Figura 5.33 apresenta os perfis de RQ, considerando o valor de OTR igual ao de simulação. É notória a disparidade de valores obtidos nestas duas situações. Da situação de coincidência de perfis (no caso da utilização de OTR de simulação), passa-se para

valores do quociente respiratório da ordem dos E+04, no caso real, pelo que se optou por não apresentar o traçado gráfico correspondente.

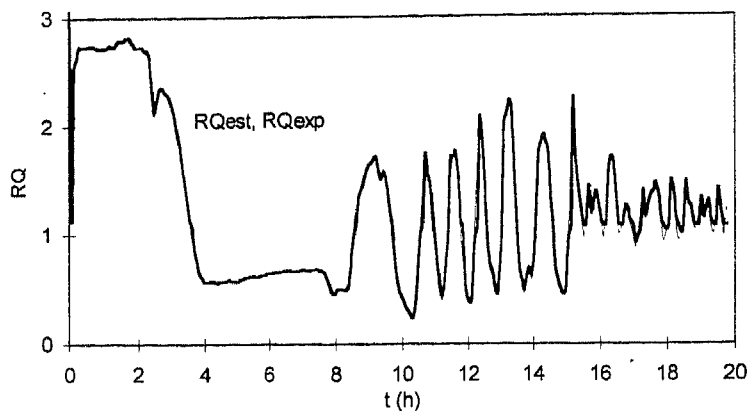


Figura 5.33 EXPA08 - Quociente respiratório considerando OTR experimental igual ao de simulação

A medida de OTR é de facto um ponto importante. Não só o observador necessita de uma medida precisa, mas também, e principalmente, a sua determinação experimental é bastante sujeita a erros. Analisando em conjunto a expressão para o cálculo experimental de OTR, equação (5.111), e a Figura 5.31, para a taxa de transferência de oxigénio, conclui-se que a diferença de composição gasosa entre a entrada e a saída leva a que nas primeiras 12 horas de fermentação o valor de OTR seja nulo (negativo). Ou seja, este método de cálculo poderá ser uma eventual fonte de erros.

Introdução de um parâmetro α no cálculo de OTR por balanço à fase gasosa

Na análise dos resultados obtidos nas várias experiências, constatou-se que, por vezes, o valor de OTR tomava valores negativos, limitados a zero pelo programa *Monitor*. Isto é devido à subtração de parcelas de valores muito próximos, potencial fonte de erro no cálculo da taxa de transferência de massa para o oxigénio.

De forma a evitar essa fonte de erro no cálculo experimental de OTR, adicionou-se um factor, α , à equação, obtendo-se:

$$OTR = \frac{G_e M_{O_2}}{V} \left(y_{e, O_2} - \alpha \frac{y_{e, N_2} y_{s, O_2}}{y_{s, N_2}} \right) \quad (5.117)$$

$$\alpha = 0.97$$

Fazendo $\alpha = 0.97$, obtém-se o perfil de OTR da Figura 5.34. A correspondente observação do estado encontra-se na Figura 5.35.

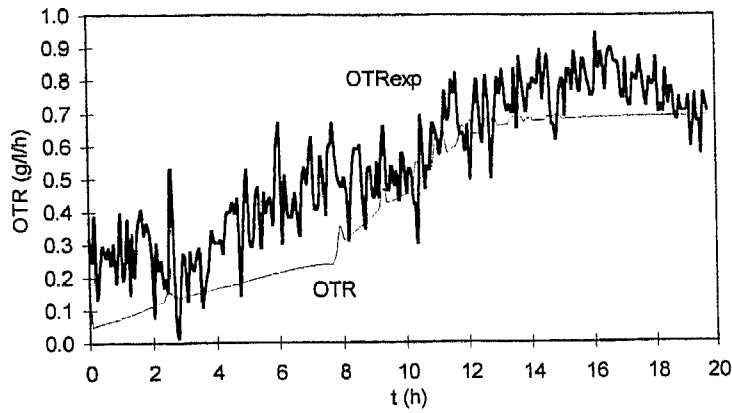


Figura 5.34 EXPA08 - Valores de OTR experimental com $\alpha=0.97$ (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

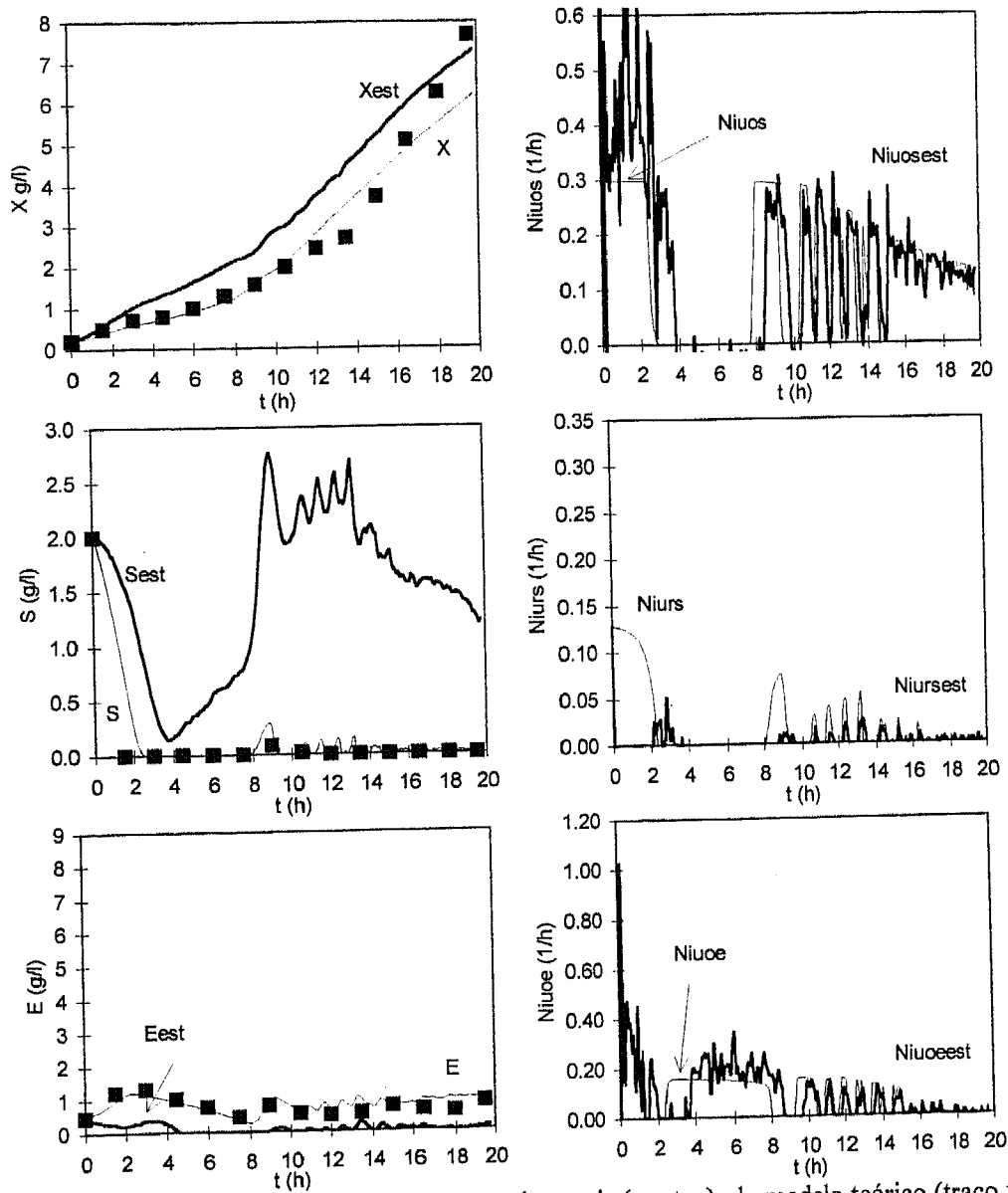


Figura 5.35 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e observado (traço grosso), considerando $\alpha=0.97$ no cálculo de OTR experimental

A Figura 5.36 apresenta os valores do quociente respiratório calculados pela razão experimental CTR/OTR (OTR corrigido com parâmetro α) e pela aplicação da equação (4.60), utilizando os valores estimados para as cinéticas de crescimento.

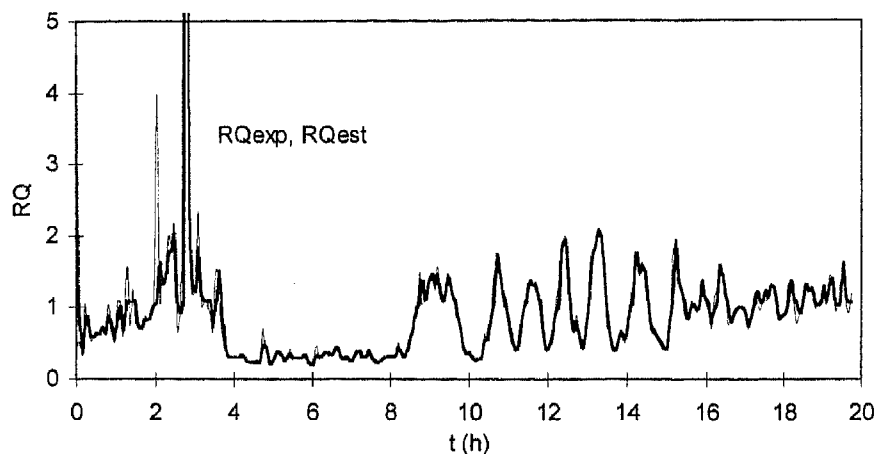


Figura 5.36 EXPA08 - Valores de RQ experimentais (traço fino) e o observado (traço grosso), considerando $\alpha=0.97$ no cálculo de OTR experimental

$\alpha=0.975$

Se se alterar o valor de α para 0.975 os respectivos resultados apresentam-se na Figura 5.37 e na Figura 5.38.

A pequena variação introduzida no parâmetro α levou a uma melhoria nos perfis estimados das variáveis de estado, em especial, o da concentração de açúcares.

Comparando as duas situações com $\alpha=0.97$ e $\alpha=0.975$, a primeira origina melhores estimativas das cinéticas, em prejuízo da observação do estado. Para $\alpha=0.975$ a situação inverte-se. No entanto, para ambas os resultados são superiores aos obtidos com a utilização directa da medida experimental de OTR, sem correcção ($\alpha=1$ na equação (5.117)).

Apreciação global

Pretendeu-se com este estudo provar a importância do valor inicial das variáveis de estado para a rotina de observação, assim como, a precisão das medidas experimentais. Em especial, a medida de OTR é fundamental para um bom desempenho do estimador. Pensa-se que a introdução do parâmetro correctivo α na equação (5.117), para o cálculo de OTR por balanço à fase gasosa, poderá corrigir eventuais erros inerentes ao processo de determinação experimental por espectrometria de massa.

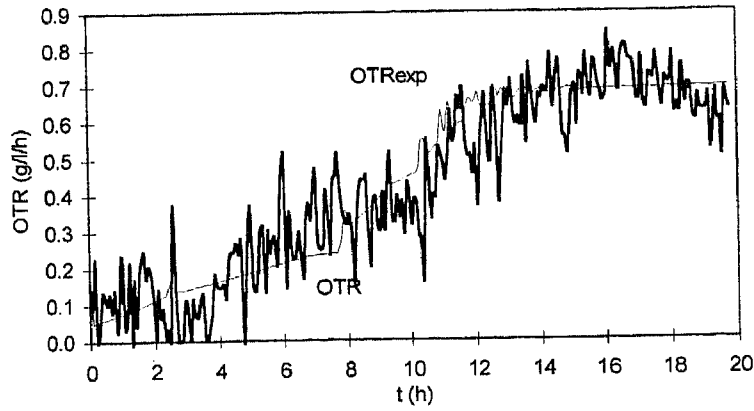


Figura 5.37 EXPA08 - Valores de OTR experimental $\alpha=0.975$ (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

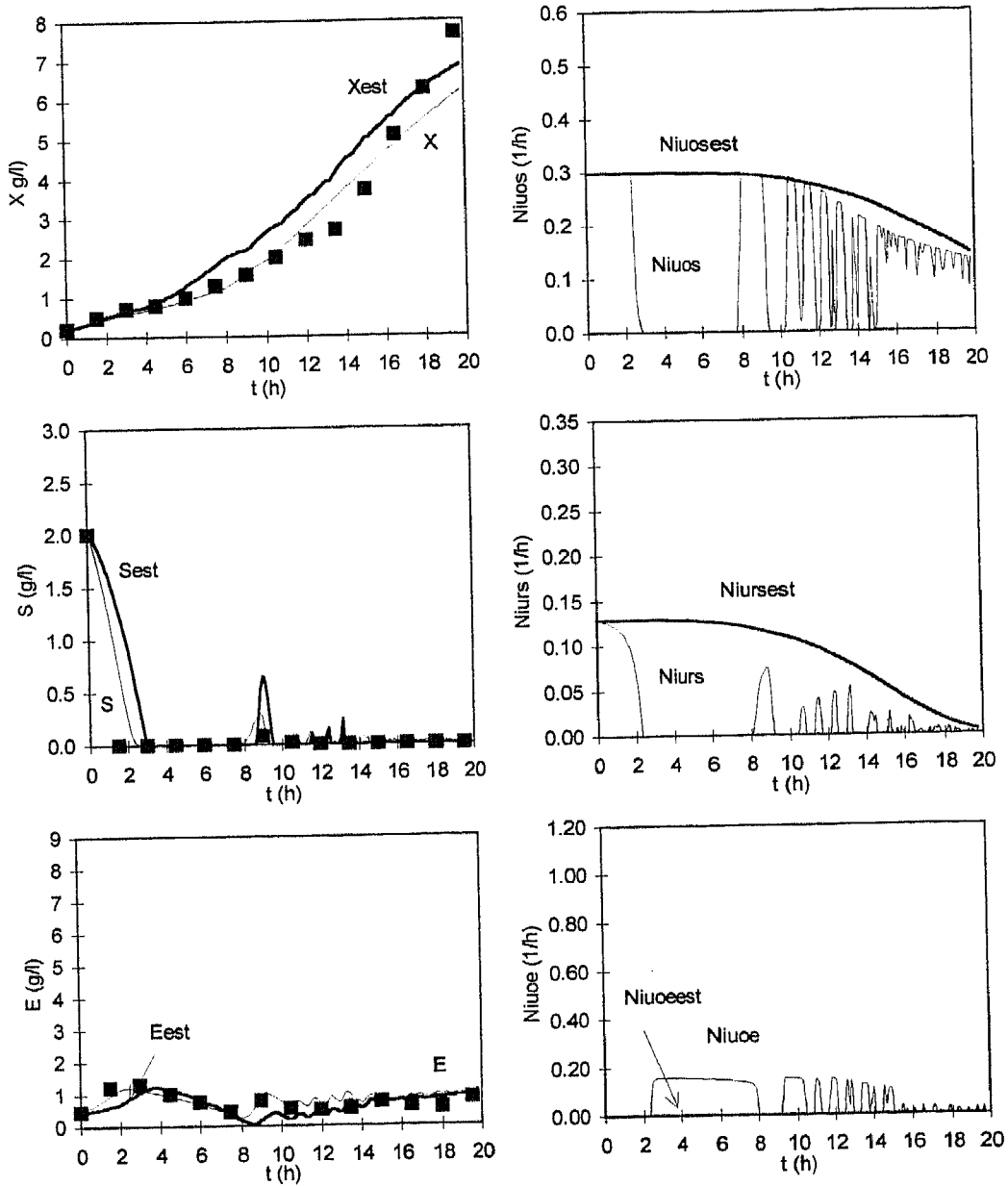
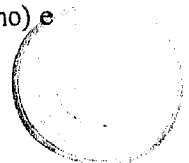


Figura 5.38 EXPA08 - Valores de X, S e E experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e observado (traço grosso), considerando $\alpha=0.975$ no cálculo de OTR experimental



5.6.2.2 Caso 2 - Variáveis de estado medidas: par O-E

As corridas em simulação apresentaram um desempenho inferior destes algoritmos particularmente no perfil de glucose e, em especial, no perfil de dióxido de carbono. Como se verá de seguida, o mesmo se passa em termos experimentais.

Também desta situação, e como se verá de seguida, se pode concluir da influência das medições no desempenho dos estimadores, em especial, da medição da taxa de transferência de oxigénio por balanço à fase gasosa. O parâmetro correctivo α , devidamente calibrado, funciona, também neste caso, como solução para o problema.

Experiência EXPA08

A Figura 5.39 apresenta os perfis experimentais e teóricos das medidas utilizadas (os perfis de O, OTR e CTR foram já apresentados anteriormente).

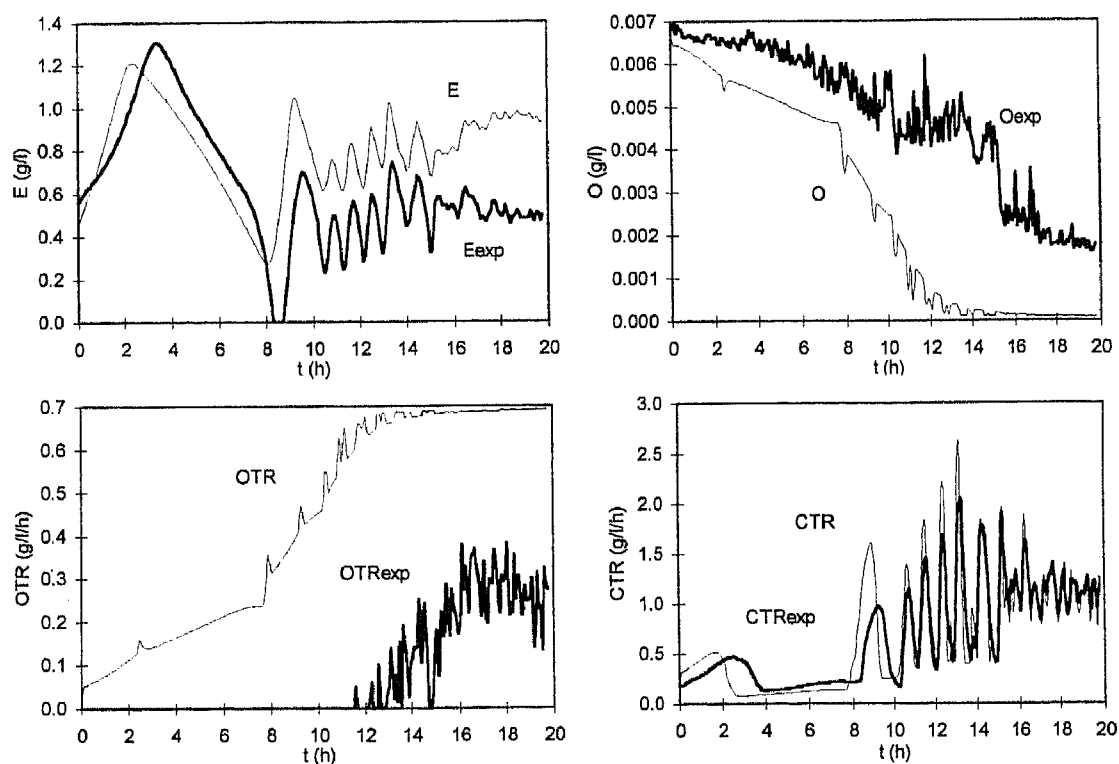


Figura 5.39 EXPA08 - Valores de O, E, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

A Figura 5.40 apresenta as estimativas do estado - variáveis de estado X, S e C - e das cinéticas obtidas. Os resultados são bastante inferiores aos apresentados para o par O-C.

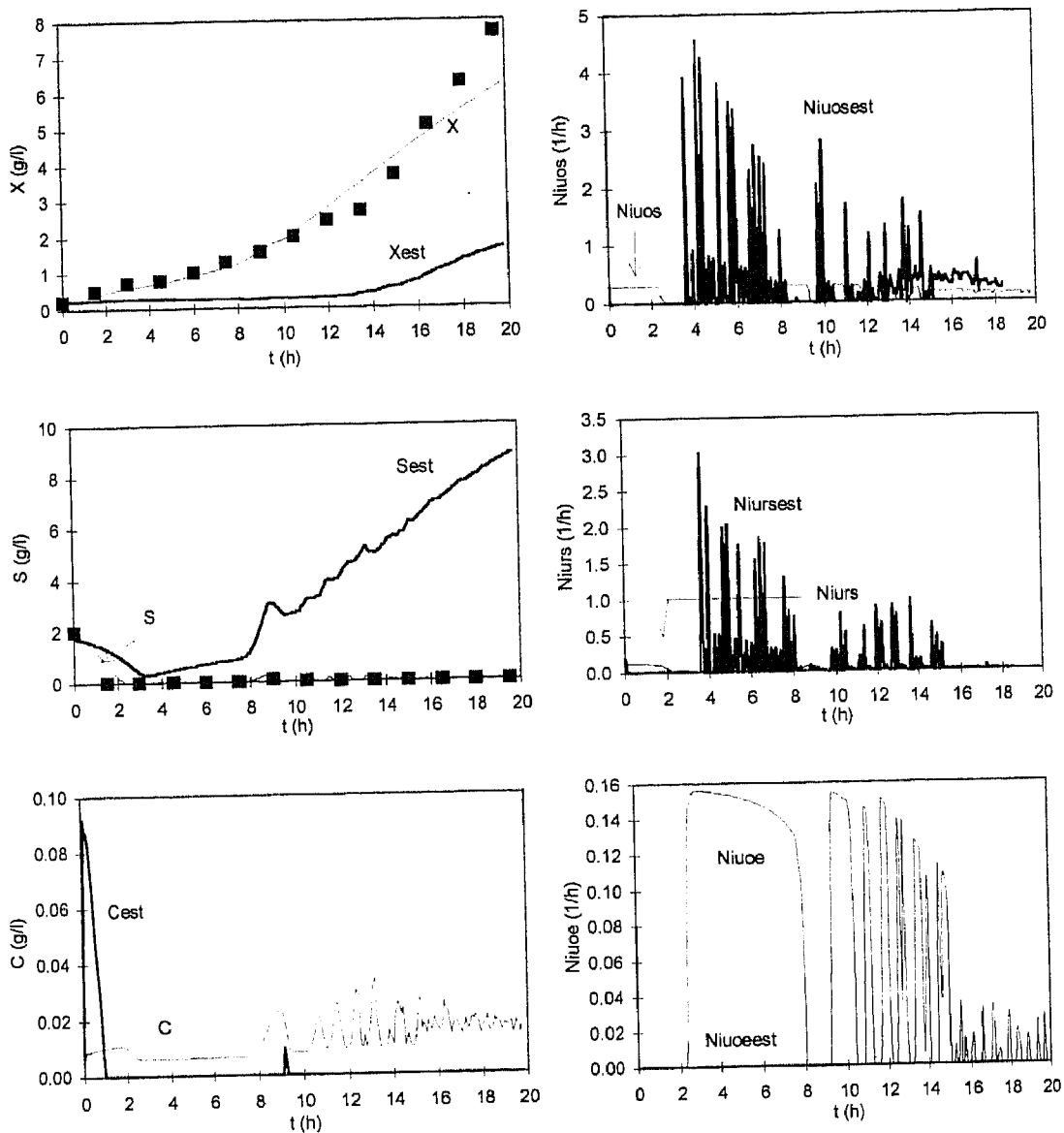


Figura 5.40 EXPA08 - Valores de X , S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

Introdução de um parâmetro correctivo α

Os estudos anteriormente efectuados para o par O-C revelaram a extrema sensibilidade do método às medições de OTR por balanço à fase gasosa. Assim, repetiu-se a corrida anterior, mas utilizou-se um valor de OTR corrigido: $\alpha=0.975$ na equação (5.117). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.41.

Constata-se a melhoria das estimativas das principais variáveis de estado, biomassa e glucose, mantendo-se deficiente a estimativa de dióxido de carbono. Uma vez mais se

salienta a importância da medição do valor de OTR. Na impossibilidade de melhoria das determinações experimentais, a introdução do parâmetro correctivo α na equação (5.117) poderá ser um possível ajuste dos erros cometidos.

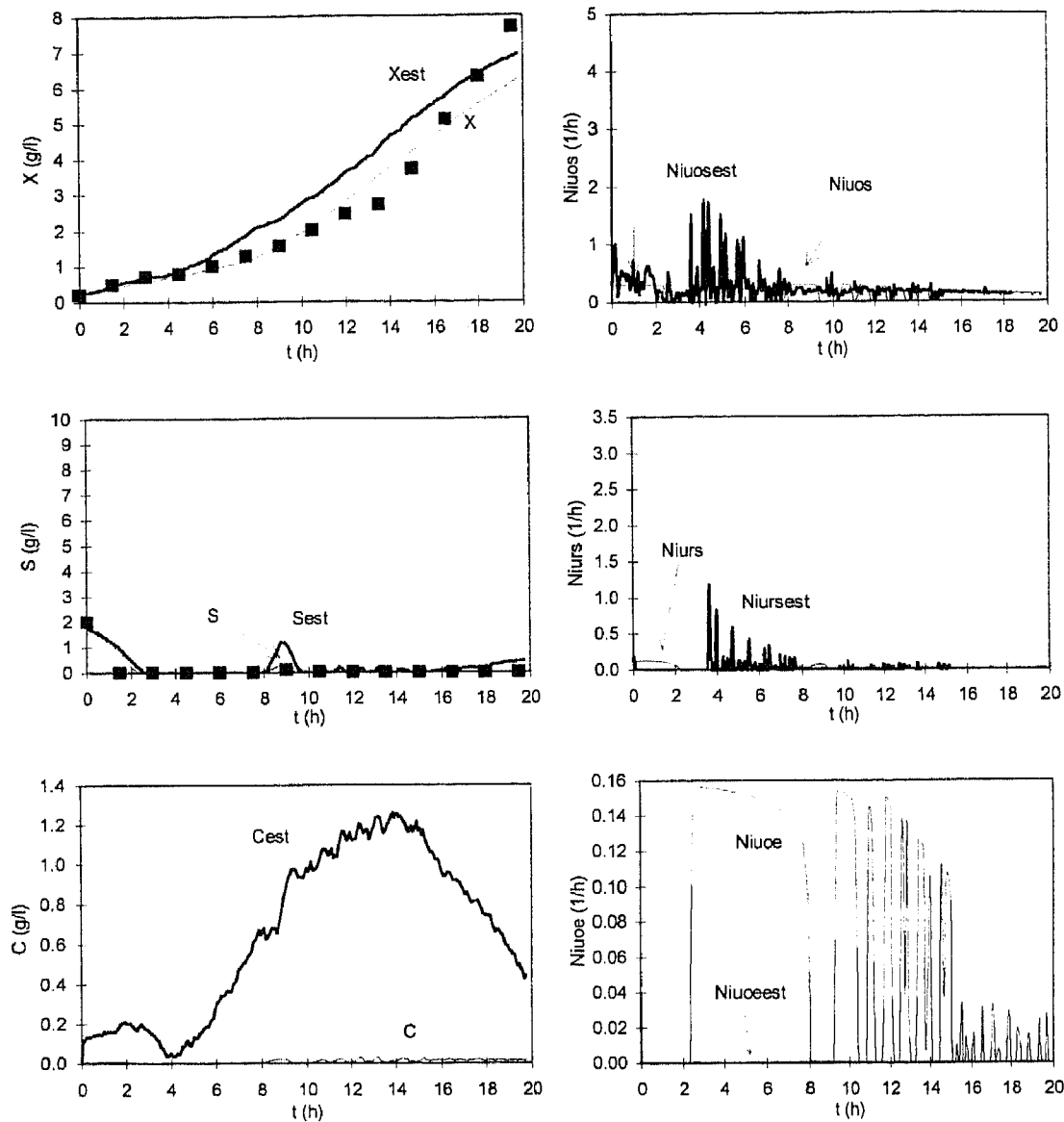


Figura 5.41 EXPA08 - Valores de X , S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso), considerando $\alpha=0.975$ no cálculo de OTR experimental

5.6.2.3 Caso 3 - Variáveis de estado medidas: par E-C

Experiência EXPA08

A Figura 5.42 apresenta as estimativas do estado - variáveis de estado X, S e O - e das cinéticas obtidas.

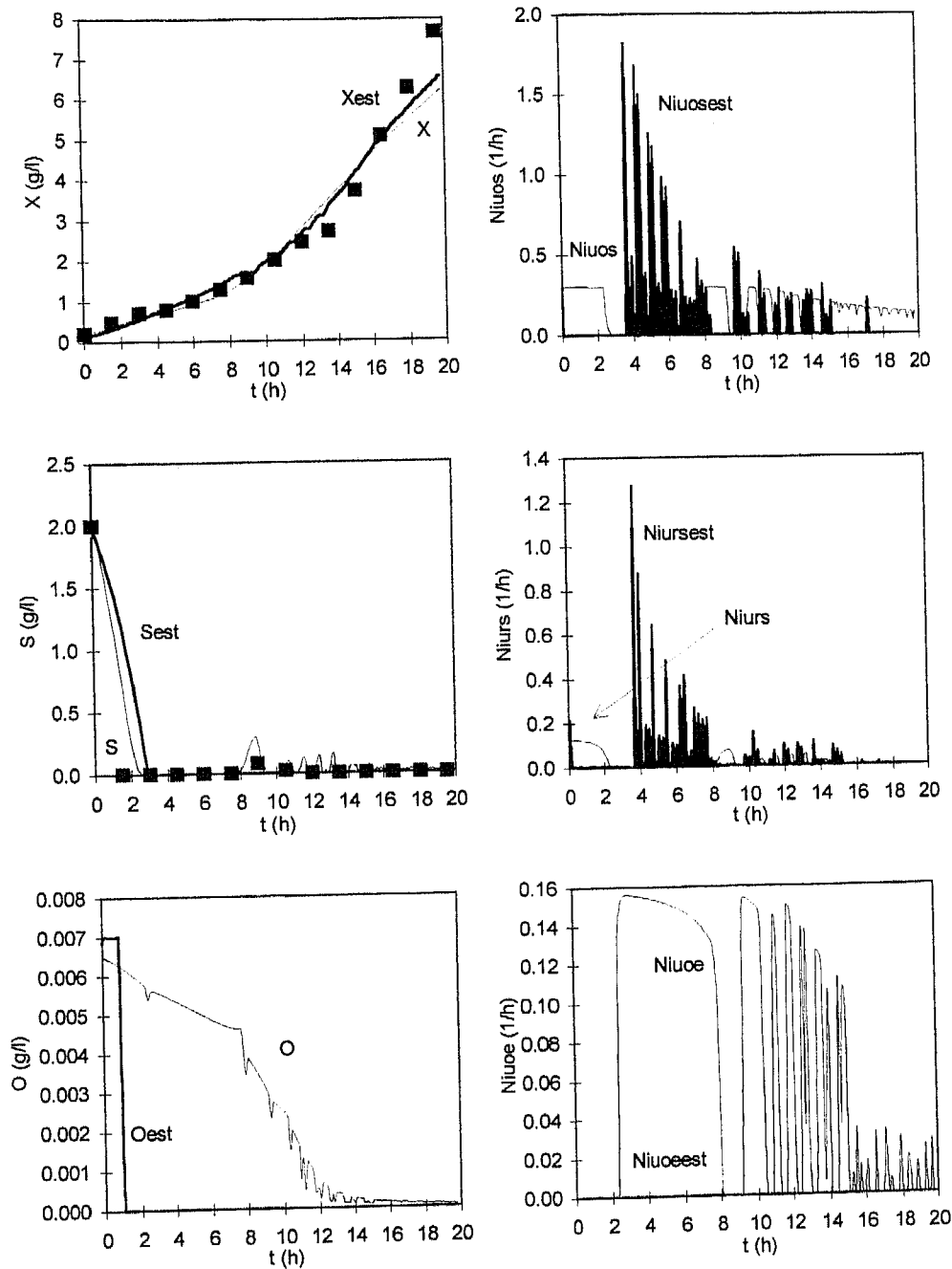


Figura 5.42 EXPA08 - Valores de X, S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

As estimativas das variáveis biomassa e glucose apresentam um desempenho bastante superior ao verificado com o par O-C. Em relação ao perfil de oxigénio estimado os resultados são maus; pensa-se que poderá haver, neste caso, problemas de integração numérica, uma vez que se está a trabalhar com concentrações de oxigénio da ordem das milésimas.

5.6.2.4 Apreciação global

Em forma de resumo conclusivo do estudo efectuado convém referir que o par O-E é o que apresenta piores resultados. As estimativas de biomassa obtida com o par E-C são genericamente boas. Em todos eles as estimativas das cinéticas são genericamente fracas. O par O-C apresenta um comportamento incerto: tanto aponta para estimativas excelentes, caso EXPC03 e EXPE04 como origina resultados muito maus, como é o caso da EXPA08.

Como comprovado com o par O-C, este método é bastante sensível à precisão das medidas experimentais e aos valores iniciais das variáveis a estimar. No caso particular da medição da taxa de transferência de oxigénio, os estudos efectuados (também para o par O-E), levaram à introdução de um parâmetro correctivo α na equação de determinação de OTR por balanço à fase gasosa (eq. (5.117)). Na ausência de alternativas experimentais à medição de OTR, este parâmetro poderá funcionar como corrector dos erros cometidos.

5.7 Conclusões

Apresentaram-se, neste capítulo, algoritmos para observação do estado e estimativa das cinéticas com aplicação ao caso particular do processo de produção de fermento de padeiro. Foram analisadas diferentes combinações de pares de medidas, estudando-se em particular a sensibilidade do método aos problemas de ruídos, desvios nas medições efectuadas e valores iniciais das variáveis.

Os estudos foram efectuados em simulação através de programas desenvolvidos em *Fortran77* e posteriormente validados experimentalmente. Esta validação foi efectuada em-linha, através de um programa desenvolvido em Visual Basic, que contém as funções de monitorização, aquisição e tratamento de dados, e, em diferido, com um programa escrito em *Fortran77*, que lê de ficheiro os dados experimentais das variáveis relevantes para os estimadores.

Os estimadores estudados mostraram ser bastante sensíveis e pouco robustos a erros introduzidos nas medições das variáveis de estado, o que leva a concluir que esta técnica exige bastante rigor na montagem e avaliação experimental.

5.8 Bibliografia

- Agarwal, M., Bonvin, D. Improved State Estimator in the Face of Unreliable Parameters. *J. Proc. Cont.*, 1, 251-257, 1991.
- Bastin, G., Dochain, D. *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.
- Bastin, G., Gevers, M. Stable Adaptive Observers for Nonlinear Time-Varying Systems. *IEEE Trans. Aut. Control*, 33:7, 650-658, 1988.
- Bellgardt, K.-H., Kuhlmann, W., Meyer, H.-D., Schügerl, K., Thoma, M. Application of an Extended Kalman Filter for State Estimation of a Yeast Fermentation. *IEE Proc., Pt. D (Control in Bioprocessing)*, 133:5, 226-234, 1986.
- Beluhan, D., Gosak, D., Pavlovic, N., Vampola, M. Biomass Estimation and Optimal Control of the Baker's Yeast Fermentation Process. *Computers Chem. Engng.*, 19, S387-S392, 1995.
- Cazzador, L., Ljubenova, V., Nonlinear Estimation of Specific Growth Rate for Aerobic Fermentation Processes *Biotechnology Bioengineering*, 47, 626-632, 1995.
- Dekkers, R.M. State Estimation of a Fed-Batch Baker's Yeast Fermentation. *Modelling and Control of Biotechnical Processes* (Proc. 1st IFAC Workshop, Helsinki, Finland, 1982, A. Halme, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 201-212, 1983.
- Di Massimo, C., Lant, P.A., Saunders, A., Montague, G.A., Tham, M.T., Morris, A.J. Bioprocess Applications of Model-Based Estimation Techniques. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 53, 265-277, 1993.
- Dochain, D., Bastin, G. Adaptive Identification and Control Algorithms for Nonlinear Bacterial Growth Systems. *Automatica*, 20, 5, 621-634, 1984.
- Dochain, D., Bastin, G. Stable Adaptive Algorithms for Estimation and Control of Fermentation Processes. *Modelling and Control of Biotechnological Processes* (Proc. 1st IFAC Symp., Noordwijkerhout, The Netherlands 1985, A. Johnson, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 37-42, 1986.
- Estler, M. Recursive On-line Estimation of the Specific Growth Rate from Off-gas Analysis for the Adaptive Control of Fed-batch Processes. *Bioprocess Engineering*, 12, 205-207, 1995.
- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Feyo de Azevedo, S., Dahm, B., Oliveira, F., Hybrid Modelling of Biochemical Processes: A Comparison with the Conventional Approach, *Computers and Chem. Engng*, 21 suppl., S751-S756, 1997.
- Flaus, J.M., Cheruy, A., Pons, M.-N., Engasser, J.-M. Estimation de l'État Physiologique des Microorganismes dans un Bioprocédé. *R.A.I.R.O.*, 23, 211-220, 1989.
- Fu, P., Barford, J. Hybrid Modelling Combining a Detailed Metabolic Simulation and Neural Network Approaches to Complex Biochemical Processes. *Proc. 5th Int. Symp. on Process Systems Engineering PSE'94*, Kyongju, Korea, (E.S. Yoon, Ed.), Korean Institute of Chemical Engineers, 571-574, 1994.

- Gee, D., Ramirez, W. On-line State Estimation and Parameter Identification for Batch Fermentation. *Biotechnol. Prog.*, 12, 132-140, 1996.
- Goodwin, G.C., Sin, K.S. *Adaptive Filtering, Prediction and Control*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1984.
- Halme, A.. Measurement and Estimation in Bioreactors. *Proc. One Day International Workshop, Control of Biotechnical Processes*, University of Newcastle, England, 1987.
- Karim, M.N., Rivera, S.L. Artificial Neural Networks in Bioprocess State Estimation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol. 46: Modern Biochemical Engineering*, (A. Fiechter, Ed.) Springer-Verlag, Berlin, 1-34, 1992.
- Lee, K.-S. *Feedback Optimization of Fed-batch Baker's Yeast Fermentation*. Dissertação de Doutorado, Purdue University, 1990.
- Linko, P., Zhu, Y. Neural Network Programming in Bioprocess Variable Estimation and State Prediction. *J. Biotechnol.*, 21, 253-270, 1991.
- Ljubenova, V., Ignatova, M. An Approach for Parameter Estimation of Biotechnological Processes. *Bioprocess Eng.*, 11:4, 107-113, 1994.
- Ljung, L. *System Identification, Theory for the User*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1987.
- Lübbert, A., Simutis, R. Using Measurement Data in Bioprocess Measurement and Control. *TIBTECH.*, 12, 304-311, 1994.
- Maher, M., Roux, G., Dahhou, B. A Method for Estimating the State Variables and Parameters of Fermentation Systems. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 3, 153-159, 1995.
- Montague, G., Morris, J. Neural-Network Contributions in Biotechnology. *Trends in Biotechnology.*, 12, 312-323, 1994.
- Narendra, K.S., Annaswamy, A.M. *Stable Adaptive Systems*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs NJ, 1989.
- Oliveira, R., Ferreira, E., Feye de Azevedo, S. Model-Based Estimation of Reaction Rates in Stirred Tank Bioreactors. *6th Int. Conf. in Computer Applications in Biotechnology - CAB 6*, Garmisch-Partenkirchen, Germany, May 14-17, 272-277, 1995.
- Oliveira, R., Ferreira, E., Oliveira, F., Feye de Azevedo, S. A Study on the Convergence of Observer-Based Kinetics Estimators in Stirred Tank Bioreactors. *J. Proc. Control*, 6:6, 367-371, 1996.
- Petkov, S., Davis, R. On-line Biomass Estimation using a Modified Oxygen Utilization Rate. *Bioprocess Engineering*, 15, 43-45, 1996.
- Pomerleau, Y., Perrier, M. Estimation of Multiple Specific Growth Rates in Bioprocesses. *AIChE J.*, 36, 2, 207-215, 1990.
- Pomerleau, Y., Perrier, M. Estimation of Multiple Specific Growth Rates: Experimental Validation. *AIChE J.*, 38, 11, 1751-1760, 1992.
- Pons, M.-N., Engasser, J.-M. Comparison Between Adaptive and Model-based Extended Kalman Filters. *American Control Conference*, Pittsburgh, 1989-1993, 1989.
- Saxén, B., Saxén, H. A Neural-Network Based Model of Bioreaction Kinetics. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 74, 124-131, 1996.
- Simutis, R., Havlik, I., Lübbert, A. Process State Estimation and Prediction in a Production-Scale Beer Fermentation using Fuzzy Aided Extended Kalman Filter and Neural Networks. *Modeling and Control of Biotechnical Processes 1992* (2nd IFAC Symp. and 5th Int. Conf. Computer Applications in Fermentation Technology, Keystone USA, M. Nazmul Karim, G. Stephanopoulos, Eds.), Pergamon Press, Oxford, 95-100, 1992a.

- Simutis, R., Havlik, I., Lübbert, A. A Fuzzy-Supported Extended Kalman Filter: A New Approach to State Estimation and Prediction Exemplified by Alcohol Formation in Beer Brewing. *J. Biotechnol.* (Special Issue High-Tech Analyses in Modern Biotechnology), 24, 211-234, 1992b.
- Simutis, R., Havlik, I., Lübbert, A. Fuzzy-Aided Neural Network for Real-Time State Estimation and Process Prediction in the Alcohol Formation Step of Production-Scale Beer Brewing. *J. Biotechnol.*, 27, 203-215, 1993.
- Stephanopoulos, G., San, K.-Y. Studies on On-line Bioreactor Identification. I. Theory. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1176-1188, 1984.
- Stephanopoulos, G., Park, S. Bioreactor State Estimation. *Biotechnology A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2^a ed., (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Eds.), vol. 4: Measuring, Modelling and Control (K. Schügerl, Ed. vol.), VCH, Weinheim, cap. 7, 225-249, 1991.
- Teissier, P., Perret, B., Latrille, E., Barillere, J., Corrieu, G. Yeast Concentration Estimation and Prediction with Static and Dynamic Neural Network Models in Batch Cultures. *Bioprocess Eng.*, 14, 231-235, 1996.
- Tham, M.T., Montague, G.A., Morris, A.J., Lant, P.A. Soft-sensors for Process Estimation and Inferential Control. *J. Proc. Cont.*, 1:1, 3-14, 1991.
- Thibault, J., Van Breusegem, V., Cheruy, A. On-Line Prediction of Fermentation Variables Using Neural Networks. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1041-1048, 1990.
- Zhu, Y.-H., Nagamune, T., Endo, I., Linko, P. Neural Networks in State Variable Prediction During Start-up of Chemostat Culture for Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. *Trans. Inst. Chem. Eng., Part C*, 72, 135-142, 1994.

6. Controlo clássico e controlo adaptativo

Sumário

Neste capítulo estudam-se estratégias de controlo clássico e de controlo não-linear adaptativo: o controlador PID e o algoritmo não-linear de controlo adaptativo linearizante com e sem antecipação.

Realizaram-se estudos em simulação e experimentalmente, utilizando como critérios de comparação de desempenho o integral pesado do erro, ITAE, a produtividade e o rendimento global. Em simulação, a análise efectuada englobou a introdução de perturbações e a alteração do ponto estabelecido com diferentes amplitudes e em tempos distintos, a introdução de ruído nas variáveis medidas, a utilização de novas condições iniciais, entre outras. A nível do laboratório, implementaram-se e testaram-se os desempenhos de algoritmos de controlo PID (versão discreta de velocidade) e adaptativo linearizante, com base em modelos reduzidos.

- 6.1 Introdução
 - 6.2 O controlo clássico
 - 6.3 O controlo adaptativo linearizante
 - 6.4 Aplicação ao fermento de padeiro
 - 6.5 Resultados obtidos por simulação
 - 6.6 Resultados experimentais
 - 6.7 Conclusões
 - 6.8 Bibliografia
-

Com o advento do controlo multi-variável e a sua integração com técnicas de estimação de parâmetros, foram criadas oportunidades para o emprego de sistemas de controlo adaptativo em-linha, utilizando computadores digitais (Waterworth e Swanick, 1981).

O progresso da teoria do controlo adaptativo e a disponibilidade de computadores, levaram a um vasto número de aplicações com sucesso desde o fim dos anos 70.

Intuitivamente, um controlador adaptativo altera o seu comportamento em resposta a perturbações ou alterações da dinâmica do processo. Mas, este era já o objectivo dos sistemas clássicos de realimentação negativa. No entanto, existe um consenso, em que um sistema de realimentação negativa de ganho constante não é um sistema adaptativo (Aström, 1983). O controlo adaptativo pode, então, ser visto como um sistema não-linear de realimentação negativa.

A investigação na área do controlo adaptativo levou a importantes desenvolvimentos. Existem vários livros descrevendo importantes aspectos deste tipo de controlo, entre outros referem-se, Landau (1979), Goodwin e Sin (1984), Anderson *et al.* (1986), Aström e Wittenmark (1989), Narendra e Anaswamy (1989), Sastry e Bodson (1989), Bitmead *et al.* (1990).

Os sistemas de controlo deverão, necessariamente, incluir uma ressintonização dos parâmetros do controlador, de modo a facilitar a operação do processo numa vasta gama de condições. Normalmente, os parâmetros do controlador são determinados no local, utilizando técnicas de tentativa e erro. Se as condições de operação mudam significativamente, o controlador deverá ser ressintonizado para obter um controlo satisfatório (Seborg *et al.*, 1986).

Nos últimos anos, tem-se verificado um interesse em sistemas de controlo adaptativo, os quais ajustam automaticamente o parâmetros do controlador de modo a compensar eventuais alterações do processo devido à ocorrência de perturbações. Os controladores adaptativos permitem uma abordagem sistemática e flexível para lidar com incertezas, não-linearidades e parâmetros do processo variantes no tempo. Consequentemente, estes sistemas de controlo oferecem benefícios significativos para problemas de controlo onde o processo é mal conhecido e/ou esteja sujeito a cargas imprevisíveis.

Os esforços extensivos na investigação na área do controlo adaptativo devem-se a:

6.1 Introdução

A possibilidade de controlar os processos de fermentação, para obtenção de microorganismos, de um modo eficiente e automaticamente, é de considerável interesse industrial. Deste modo, as indústrias poderão reduzir os custos de produção, manter a qualidade e uniformidade do processo, e atingir a tão desejada reprodutibilidade de partidas.

Com as potencialidades dos equipamentos disponíveis, sejam eles sensores convencionais ou 'inteligentes', controladores lógicos programáveis, computadores de controlo e sistemas de comunicação mais eficientes, a automatização alargou-se a três tipos de acção - monitorização, identificação e interpretação de processos via modelos matemáticos e, finalmente, controlo (e optimização) propriamente dito. Estas acções são aplicadas no 'controlo adaptativo', em que a contínua monitorização e interpretação do processo leva a uma adaptação sistemática do modelo e a uma posterior sintonização dos parâmetros do controlo.

No controlo global da fábrica implementa-se cada vez mais uma filosofia de controlo hierárquico distribuído com níveis de acção que vão desde o sistema central ao sistema local praticamente autónomo, utilizando-se aí controladores convencionais ou controladores lógicos programáveis (Oliveira, 1991).

No controlo clássico destacam-se as técnicas de controlo por realimentação negativa e por antecipação (Luyben, 1990; Seborg *et al.*, 1989). Em qualquer uma delas estão presentes dois objectivos principais de acção, normalmente classificados como-

- a) acção reguladora, em que se pretende manter o valor das variáveis de saída em níveis pré-estabelecidos;
- b) acção servo, em que se pretende que as variáveis de saída sigam trajectórias impostas pelos 'pontos estabelecidos'.

O controlo de processos por realimentação negativa (o mais empregue) envolve duas acções-

- comparação do valor da variável medida com o valor de referência;
- estabelecimento da acção de controlo propriamente dita, segundo algoritmos pré-definidos.

- progressos significativos na teoria do controlo e desenvolvimento de algoritmos de controlo adaptativo com aplicação prática;
- desenvolvimento da microelectrónica que permitiu implementar os esquemas adaptativos de um modo simples e económico.

Como já referido anteriormente, existe uma falha de instrumentação de medida fiável e robusta para avaliar as variáveis do processo importantes para o ciclo de controlo. Assim, muitas vezes, os esquemas adaptativos baseiam-se na identificação de um processo em linha, de modo que estão muitas vezes ligados a técnicas recursivas de estimação de parâmetros e a métodos de observação estado.

Nos últimos anos, tem sido dada atenção às técnicas de controlo baseadas no conhecimento (Konstantinov e Yoshida, 1992). O controlo em lógica difusa tem sido aplicado em processos biotecnológicos, em particular, na produção de fermento de padeiro, dado que esta metodologia dispensa a utilização de modelos matemáticos precisos do processo em estudo (Park *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Besli *et al.*, 1995; Srinivas e Chidambaram, 1995). No entanto, o controlo necessita de um conhecimento exaustivo do processo, para estabelecer as funções e tabelas de regras.

Uma área também com interesse é a da aplicação de redes neuronais artificiais na identificação e no controlo de sistemas dinâmicos complexos (Narendra e Parthasarathy, 1990, 1991; Hunt *et al.*, 1992; Chtourou *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1994; Muralikrishan e Chidambaram 1995; van Can *et al.*, 1995; Boskovic e Narendra, 1995). Dada a sua estrutura, como máquinas de processamento paralelo, as redes neuronais são particularmente adequadas para lidar com não-linearidades e incertezas. As redes necessitam de uma fase inicial de treino em que absorvem toda a informação disponível, e de uma actualização periódica de modo a manter a eficiência da rede. Miller *et al.* (1991) apresentam um livro de compilação no campo de aplicação de redes neuronais artificiais a controlo.

Existem vários artigos e publicações em que é apresentada uma revisão das técnicas de controlo empregues em processos biotecnológicos, em especial ao caso da produção de fermento de padeiro, nomeadamente, Keulers (1993), Ferreira (1995) e Chen *et al.* (1995).

6.2 O controlo clássico

A actuação de um sistema por realimentação negativa passa pelas fases seguintes-

- medição da variável de saída, y_m ;
- comparação do valor medido com o valor desejado (seja o erro $Err = y_{ref} - y_m$) e decisão da acção de controlo, C , segundo um algoritmo pré-estabelecido;
- actuação sobre a variável manipulada.

Os controladores analógicos processam sinais eléctricos ou pneumáticos contínuos, actuando sobre os elementos finais de controlo, normalmente válvulas, as quais variam continuamente a sua acção.

Em contrapartida, os controladores digitais operam descontinuamente, em ciclos, a uma dada cadência (Figura 6.1). Nesta figura o símbolo asterisco (*) indica as variáveis amostradas, G_{ho} é o retentor de sinal de ordem zero, D é o controlador digital e R_n é o ruído normalmente distribuído. Os sinais analógicos dos transmissores são convertidos em sinais digitais, por conversores A/D, antes de serem processados no controlador. Após o cálculo da acção, o sinal digital resultante é convertido num sinal analógico, por um conversor D/A, e enviado para a válvula. Este sinal de controlo é mantido constante até a amostragem seguinte, feita em instantes de tempo kT (T , período de amostragem), isto é, inclui-se um retentor de sinal de ordem zero.

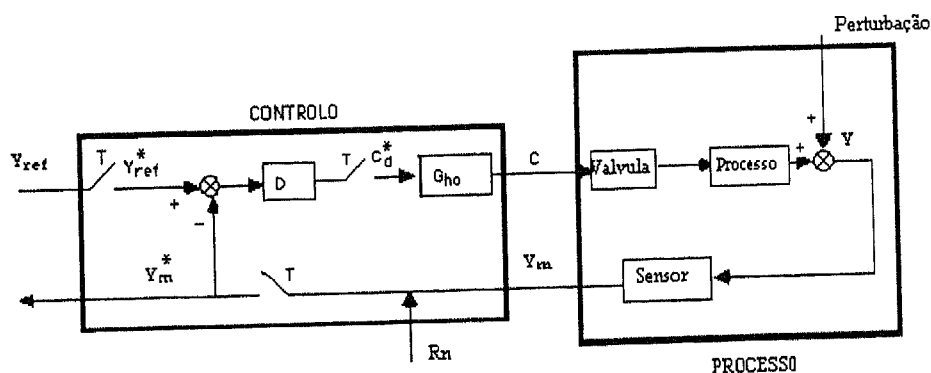


Figura 6.1 Ciclo fechado de controlo com um controlador digital

No Apêndice A.8 apresentam-se os algoritmos de controlo geralmente implementados por estes dois tipos de controladores (Oliveira, 1991).

6.3 O controlo adaptativo linearizante

6.3.1 Aspectos gerais

A lei de controlo não-linear estudada neste trabalho segue a linha de investigação de Bastin e Dochain (1990) e é designada por controlo adaptativo linearizante (*Exact Linearizing Control*). A diferença entre esta técnica e o controlo convencional consiste no modo como a linearização é introduzida.

Na abordagem clássica, lineariza-se o modelo e projecta-se um controlador linear para o modelo aproximado. O ciclo fechado de controlo permanece não-linear, cuja estabilidade está garantida apenas no ponto de funcionamento, em torno do qual se fez a linearização do modelo. No controlo linearizante implementa-se um controlador não linear num modelo do processo também não-linear, de modo a que o ciclo fechado seja linear e estável em qualquer ponto de operação (Figura 6.2).

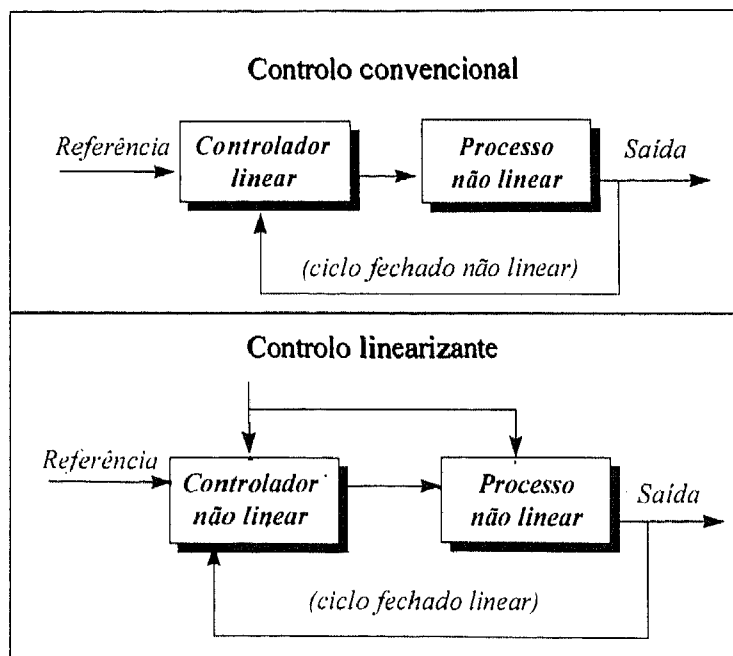


Figura 6.2 Controlo convencional e controlo linearizante

Considere-se, em termos gerais, que se pretende encontrar uma lei de controlo $u(y, y_{ref}, t)$, função não-linear multi-variável do estado y , da referência y_{ref} e do tempo t , em que se deseja que o erro $(y_{ref}-y)$ seja governado por uma equação linear pré-definida, dita modelo de referência.

O projecto da lei de controlo linearizante engloba as seguintes etapas (Bastin e Dochain, 1990):

a) Derivar um modelo de entrada/saída

Considere-se o modelo genérico

$$\frac{dy}{dt} = f(y_{ref}, y, u, t) \quad (6.1)$$

Aplicar sucessivas diferenciações do modelo genérico de forma a que a variável manipulada apareça no resultado, tal que o modelo de entrada/saída seja linear relativamente a $u(t)$:

$$\frac{d^\delta y}{dt^\delta} = f_0(t) + u(t)f_1(t) \quad (6.2)$$

em que δ é a ordem da equação diferencial chamada grau relativo. Dependendo da aplicação, $f_0(t)$ e $f_1(t)$ podem ser funções complexas de y e das sucessivas derivadas.

b) Seleccionar um modelo de referência linear estável para o erro de convergência

Este modelo de referência representa o modo como se pretende que o erro de convergência diminua e é independente do ponto de operação do processo (Figura 6.3).

Aplicar, então, o seguinte modelo:

$$\sum_{j=0}^{\delta} \lambda_{\delta-j} \frac{d^j}{dt^j} [y_{ref}(t) - y(t)] = 0 \quad \lambda_0 = 1 \quad (6.3)$$

Os coeficientes $\lambda_{\delta-j}$ são escolhidos tal que a equação diferencial seja estável.

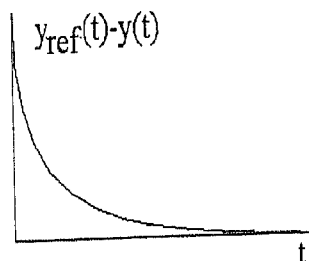


Figura 6.3 Modelo de referência para o erro de convergência

c) Projecto da lei de controlo

Calcular a acção de controlo $u(t)$ de forma a que o modelo de entrada/saída (eq. 6.2) coincida com o modelo de referência (eq. 6.3). Isto é conseguido por eliminação de $d^\delta y/dt^\delta$ em ambas as equações:

$$u(t) = \frac{1}{f_1(t)} \left[-f_0(t) + \sum_{j=0}^{\delta-1} \lambda_{\delta-j} \frac{d^j}{dt^j} [y_{ref}(t) - y(t)] + \frac{d^\delta y_{ref}}{dt^\delta} \right] \quad (6.4)$$

6.3.2 Controlo adaptativo linearizante de fermentadores - solução geral

As leis de controlo mono-variável desenvolvidas no presente trabalho são baseadas no *modelo dinâmico geral de reactores biológicos* (apresentado no Capítulo 4):

$$\frac{d\xi}{dt} = K\varphi(\xi, t) - D\xi + F - Q \quad (6.5)$$

com $\xi \in \mathbb{R}^n$ (n componentes de estado) e $\varphi \in \mathbb{R}^m$ (m reacções).

O objectivo é controlar uma variável de saída escalar que pode ser uma combinação linear de variáveis de estado:

$$y = \sum_{i=1}^n L_i \xi_i = L^T \xi \quad (6.6)$$

em que $L^T = [L_1, L_2, \dots, L_n]$ é um vector de constantes conhecidas.

A dinâmica de y é dada por:

$$\frac{dy}{dt} = K_y \varphi - Dy + F_y - Q_y \quad (6.7)$$

em que:

$$K_y = L^T K \quad (6.8)$$

$$F_y = L^T F \quad (6.9)$$

$$Q_y = L^T Q \quad (6.10)$$

Definindo a entrada de controlo u como sendo a taxa de diluição D , a equação (6.7) pode ser reescrita, na sua forma mais geral, como:

$$\frac{dy}{dt} = f(F_y, Q_y, K_y, \phi) + g(F_y, y)D \quad (6.11)$$

Considerando o problema do controlo linearizante e sendo o modelo representado por uma equação de 1ª ordem, o objectivo de controlo consistirá na imposição de um ciclo fechado de dinâmica linear estável de 1ª ordem:

$$\frac{d}{dt}(y_{ref} - y) + \lambda_1(y_{ref} - y) = 0 \quad \lambda_1 > 0 \quad (6.12)$$

Substituindo a equação (6.11) na equação (6.12), rearranjando e explicitando o termo correspondente à acção de controlo, D , obtém-se:

$$D = g^{-1}(F_y, y) \left[\frac{dy_{ref}}{dt} + \lambda_1(y_{ref} - y) - f(F_y, Q_y, K_y, \phi) \right] \quad (6.13)$$

De notar que $(\lambda_1)^{-1}$ pode ser visto como a constante de tempo do sistema de erros.

Alimentação de um só substrato na corrente líquida

Seja o caso prático de a entrada de controlo D estar associada a uma alimentação de um substrato na corrente líquida, com concentração S_e , correspondente à variável de estado i . Pode escrever-se:

$$F = bD + f \quad (6.14)$$

com:

$$b^T = [b_1, b_2, \dots, b_N] \quad b_i = S_e, \quad b_j = 0 \quad \forall j \neq i \quad (6.15)$$

$$f^T = [f_1, f_2, \dots, f_N] \quad f_i = 0, \quad f_j = F_j \quad \forall j \neq i \quad (6.16)$$

Com estas definições e aplicando a lei de controlo linearizante obtém-se:

$$D = \frac{\frac{dy_{ref}}{dt} + \lambda_1(y_{ref} - y) - L^T K\phi + L^T Q - L^T f}{L^T b - y} \quad (6.17)$$

A solução deste problema envolve o conhecimento de valores de parâmetros cinéticos e de coeficientes de rendimento, bem como o conhecimento do estado do processo. Na generalidade dos casos, a resolução efectiva do problema passa, por um lado, pela implementação de observadores de estado, de forma a dispor-se de informação sobre o processo, e passa, também, pela utilização de métodos de redução de modelos, juntamente com técnicas de adaptação de parâmetros de modelos reduzidos, de forma a ultrapassar incertezas no conhecimento dos parâmetros do modelo.

6.3.3 Algoritmo adaptativo linearizante com base em modelos reduzidos

O método de redução de modelos em aplicações de controlo de fermentadores assenta no reconhecimento da existência de diferenças de comportamento dinâmico entre as variáveis de estado, com a consequente exequibilidade de aplicação de hipótese de estado pseudo-estacionário para as variáveis de dinâmica rápida.

Assuma-se que:

- existe uma partição ξ_r^T e ξ_l^T correspondendo, respectivamente, ao vector das variáveis de estado de dinâmica rápida (dimensão n_1) e ao vector com as restantes variáveis de dinâmica lenta (dimensão n_2); o vector de estado será, então, $\xi^T = [\xi_r^T \quad \xi_l^T]$;
- a variável de estado a ser regulada (y) não está incluída no vector de dinâmica rápida;
- a matriz dos coeficientes de rendimentos correspondente às variáveis de dinâmica rápida, K_r , é uma matriz invertível.

Nesta situação o modelo dinâmico geral (equação (6.5) com $F=bD+f$) é, então, reduzido a um conjunto de n_1 equações algébricas e n_2 equações diferenciais ordinárias como se segue:

$$K_r \varphi + b_r D + f_r - Q_r = 0 \quad (6.18)$$

$$\frac{d\xi_l}{dt} = K_l \varphi - D\xi_l + b_l D + f_l - Q_l \quad (6.19)$$

O vector $\varphi(\xi)$ de taxas de crescimento pode ser explicitado da equação (6.18) como:

$$\varphi(\xi) = K_r^{-1} (Q_r - b_r D - f_r) \quad (6.20)$$

Substituindo a equação anterior em (6.19) obtém-se

$$\frac{d\xi_l}{dt} = -K_l K_r^{-1} (b_r D + f_r - Q_r) - D\xi_l + (b_l D + f_l - Q_l) \quad (6.21)$$

A dinâmica de y , variável controlada, é reescrita como:

$$\frac{dy}{dt} = -L_l^T K_l K_r^{-1} (b_r D + f_r - Q_r) - Dy + L_l^T (b_l D + f_l - Q_l) \quad (6.22)$$

que pode corresponder, rearranjando, ao seguinte modelo reduzido de entrada/saída:

$$\frac{dy}{dt} = -Dy + \theta^T \phi \quad (6.23)$$

em que θ se refere aos parâmetros associados às matrizes de coeficientes de rendimento e ϕ , adiante chamado vector regressor, se refere às diferenças entre os vectores de entrada e de saída do reactor, variáveis conhecidas.

A solução geral do controlo adaptativo linearizante, para a presente situação, é obtida pela conjugação das equações (6.23) e (6.12), dando:

$$D = \frac{1}{-y} \left[\frac{dy_{ref}}{dt} + \lambda_1 (y_{ref} - y) - \theta^T \phi \right] \quad (6.24)$$

No caso de os coeficientes de rendimento presentes em θ serem mal conhecidos ou variáveis no tempo deve implementar-se uma versão adaptativa do controlador, englobando a estimação em linha dos parâmetros θ .

6.3.4 Leis de adaptação

Para a situação em que se assumem θ_i desconhecidos, são normalmente referenciadas duas aproximações diferentes para os algoritmos de estimação dos parâmetros: uma baseada no erro do controlador ($y_{ref} - y$), a outra no erro de estimação através de um estimador do tipo observador ($y - \hat{y}$) (Bastin e Dochain, 1990). Aplicou-se, no presente trabalho, a técnica de estimação baseada na teoria de estabilidade de Lyapunov, baseada no erro do controlador ($y_{ref} - y$).

A técnica ou projecto de Lyapunov conduz à seguinte lei de adaptação:

$$\frac{d\hat{\theta}}{dt} = -\Gamma\phi(F, Q)(y_{ref} - y) \quad (6.25)$$

em que $\phi(F, Q)$ é o vector regressor, função de F e Q , e Γ é a matriz de ganhos do estimador, definida positivamente.

No Apêndice A.9 apresenta-se a dedução completa do estimador de dinâmica de segunda ordem (Ferreira, 1995), lei de adaptação implementada neste trabalho.

Esta lei impõe uma dinâmica de segunda ordem para a convergência do erro de estimação de θ_i , caracterizada pelos bem conhecidos parâmetros: período natural de oscilação, τ , e coeficiente de amortecimento, ζ (equação (6.26)).

$$\tau^2 \frac{d^2\hat{\theta}_i}{dt^2} + 2\zeta\tau \frac{d\hat{\theta}_i}{dt} + \hat{\theta}_i = \theta_i \quad (6.26)$$

A lei de adaptação é descrita por (ver Apêndice A.9):

$$\frac{d\hat{\theta}_i}{dt} = -\tau_i^{-2} \phi_i^{-1} (y_{ref} - y) \quad (6.27)$$

e o ganho do controlador definido pela equação:

$$\lambda_i \equiv \frac{2\zeta}{\tau} - \frac{1}{\phi_i} \frac{d\phi_i}{dt} \quad (6.28)$$

A formulação baseada na dinâmica de convergência de 2ª ordem apresenta como vantagens a ligação da sintonização do controlador à sintonização do estimador através de dois parâmetros com algum significado físico - constante de tempo e coeficiente de amortecimento característicos dos sistemas de 2ª ordem. O parâmetro do controlador é, então, função do regressor $\phi(t)$, sendo portanto variável no tempo.

6.4 Aplicação ao fermento de padeiro

Na produção de fermento de padeiro o objectivo pode ser endereçado em termos de prevenção da acumulação de etanol no reactor semi-contínuo. Essa acumulação pode constituir uma fonte para a diminuição do rendimento e afectar a produtividade. É contudo, desejável uma ligeira produção de etanol de forma a induzir o sistema enzimático da via

catabólica fermentativa e evitar assim um longo período de adaptação aquando da utilização do fermento (Pomerleau, 1990).

Assim sendo, os algoritmos apresentados de seguida para a produção de fermento de padeiro, referem-se ao controlo mono-variável, da concentração de etanol dissolvido.

6.4.1 Controlo PID

No presente trabalho implementou-se a versão digital do controlador PID na forma de velocidade modificada. A acção de controlo, neste caso, é o caudal de alimentação de substrato, F , e a variável controlada é a concentração de etanol no meio, E . Deste modo, a equação do controlador é reescrita como:

$$F_n = F_{n-1} + K_c \left((E_{n-1} - E_n) + \frac{T}{\tau_i} Err_n + \frac{\tau_d}{T} (-E_n + 2E_{n-1} - E_{n-2}) \right) \quad (6.29)$$

6.4.2 Controlo adaptativo linearizante

O problema que se coloca em termos de controlo será o da regulação da concentração de etanol. A taxa de alimentação de glucose é escolhida como a acção de controlo. A aplicação da metodologia apresentada anteriormente ao caso da produção de fermento de padeiro, origina

$$y = E = L^T \xi \quad \text{com} \quad L^T = [0 \ 0 \ 1 \ 0 \ 0] \quad (6.30)$$

$$u = D, \quad b^T = [0 \ S_c \ 0 \ 0 \ 0], \quad f^T = [0 \ 0 \ 0 \ OTR \ 0] \quad \text{e} \quad Q^T = [0 \ 0 \ 0 \ 0 \ CTR] \quad (6.31)$$

A dedução do controlador vai ser apresentada de seguida usando duas aproximações, uma recorrendo ao modelo global do processo com três taxas de crescimento e a segunda utilizando modelos parciais com duas taxas cada, tendo em atenção os dois regimes metabólicos (Ferreira, 1995).

6.4.2.1 Modelo global a 3 reacções

O modelo de estado para a produção de fermento de padeiro é reescrito usando a notação $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$ para designar as taxas de crescimento $\mu_s^o X, \mu_s^r X$ e $\mu_e^o X$, respectivamente:

$$\dot{X} = -DX + \varphi_1 + \varphi_2 + \varphi_3 \quad (6.32)$$

$$\dot{S} = -DS - k_1\varphi_1 - k_2\varphi_2 + DS_e \quad (6.33)$$

$$\dot{E} = -DE + k_3\varphi_2 - k_4\varphi_3 \quad (6.34)$$

$$\dot{O} = -DO - k_5\varphi_1 - k_6\varphi_3 + OTR \quad (6.35)$$

$$\dot{C} = -DC + k_7\varphi_1 + k_8\varphi_2 + k_9\varphi_3 - CTR \quad (6.36)$$

Considera-se estado pseudo-estacionário para o seguinte conjunto de variáveis de estado que apresentam uma dinâmica mais rápida:

$$\xi_r^T = [S \ O \ C] \quad (6.37)$$

As restantes variáveis de estado de dinâmica lenta são:

$$\xi_l^T = [X \ E] \quad (6.38)$$

Para a variável de estado a ser regulada (E) pode escrever-se:

$$E = L_1^T \xi_l \text{ com } L_1^T = [0 \ 1] \quad (6.39)$$

O modelo dinâmico geral é então reduzido a um conjunto de 3 equações algébricas e 2 equações diferenciais ordinárias (equações 6.19 e 6.18) com:

$$K_l = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & k_3 & -k_4 \end{bmatrix}, \quad b_l^T = [0 \ 0], \quad f_l^T = [0 \ 0], \quad Q_l^T = [0 \ 0] \quad (6.40)$$

$$K_r = \begin{bmatrix} -k_1 & -k_2 & 0 \\ -k_5 & 0 & -k_6 \\ k_7 & k_8 & k_9 \end{bmatrix}, \quad b_r^T = [S_e \ 0 \ 0], \quad f_r^T = [0 \ OTR \ 0], \quad Q_r^T = [0 \ 0 \ CTR] \quad (6.41)$$

O vector $\varphi(\xi)$ de taxas de crescimento é, então, escrito como:

$$\begin{bmatrix} \varphi_1 \\ \varphi_2 \\ \varphi_3 \end{bmatrix} = K_r^{-1} \begin{bmatrix} -DS_e \\ -OTR \\ CTR \end{bmatrix} \quad (6.42)$$

com a inversa de K_r calculada como:

$$K_r^{-1} = \frac{1}{\tilde{k}} \begin{bmatrix} k_6 k_8 & k_2 k_9 & k_2 k_6 \\ (k_5 k_9 - k_6 k_7) & -k_1 k_9 & -k_1 k_6 \\ -k_5 k_8 & (k_1 k_8 - k_2 k_7) & -k_2 k_5 \end{bmatrix} \quad (6.43)$$

em que $\tilde{k} \equiv k_2 k_6 k_7 - k_1 k_6 k_8 - k_2 k_5 k_9$.

A dinâmica de E , variável controlada (eq. (6.39)), é reescrita como:

$$\frac{dE}{dt} = -L_1^T K_1 K_r^{-1} (b_r u + f_r - Q_r) - DE + L_1^T (b_1 u + f_1 - Q_1) \quad (6.44)$$

Substituindo os correspondentes vectores (equações (6.40 e 6.41)), e definindo a variável de controlo u como a taxa de alimentação de substrato D , obtém-se o seguinte modelo reduzido de entrada/saída:

$$\frac{dE}{dt} = -DE - \theta_1 CTR - \theta_2 OTR + \theta_3 DS_e \quad (6.45)$$

com

$$\theta_1 \equiv (k_1 k_3 k_6 - k_2 k_4 k_5) / \tilde{k} \quad (6.46)$$

$$\theta_2 \equiv (k_2 k_4 k_7 - k_1 k_3 k_9 - k_1 k_4 k_8) / \tilde{k} \quad (6.47)$$

$$\theta_3 \equiv (k_3 k_6 k_7 - k_3 k_5 k_9 - k_4 k_5 k_8) / \tilde{k} \quad (6.48)$$

É de salientar que o modelo de saída anterior é independente das cinéticas de crescimento da levedura.

Seleccionando um modelo de referência de 1ª ordem para o erro de convergência:

$$\frac{d}{dt} (E_{ref} - E) + \lambda_1 (E_{ref} - E) = 0 \quad (6.49)$$

a lei de controlo linearizante é prontamente obtida por substituição de (6.45) em (6.49), e para o problema de controlo de regulação ($dE_{ref}/dt=0$), obtendo-se

$$D = \frac{\lambda_1 (E_{ref} - E) + \theta_1 CTR + \theta_2 OTR}{\theta_3 S_e - E} \quad (6.50)$$

Nesta lei de controlo deve notar-se o seguinte:

- só é necessário a medição em linha da variável de estado que se pretende regular (E);
- não é necessário conhecer a cinética de crescimento dos microorganismos;
- utiliza medidas de taxas de transferência gasosas que são acessíveis em linha;
- há uma compensação de antecipação relativamente à concentração da alimentação S_e ;
- o termo $\lambda_1(E_{ref} - E)/(\theta_3 S_e - E)$ pode ser visto como uma acção proporcional de ganho variável função do etanol (se $E \ll \theta_3 S_e$ o ganho será constante); o termo $(\theta_1 CTR + \theta_2 OTR)/(\theta_3 S_e - E)$ representa uma medida da actividade das leveduras presumindo-se proporcional à concentração de biomassa e fornecendo o perfil de alimentação exponencial necessário para manter o etanol constante (Pomerleau, 1990).

6.4.2.2 Modelo parcial

Na Tabela 6.1 encontram-se listadas as equações de estado para os modelos parciais para os regimes respiro-fermentativo e respirativo, respectivamente.

Tabela 6.1 Equações de estado para os modelos parciais

<i>Regime Respiro-fermentativo RF</i>	<i>Regime Respirativo R</i>
$\dot{X} = -DX + \varphi_1 + \varphi_2$	$\dot{X} = -DX + \varphi_1 + \varphi_3$
$\dot{S} = -DS - k_1\varphi_1 - k_2\varphi_2 + DS_e$	$\dot{S} = -DS - k_1\varphi_1 + DS_e$
$\dot{E} = -DE + k_3\varphi_2$	$\dot{E} = -DE - k_4\varphi_3$
$\dot{O} = -DO - k_5\varphi_1 + OTR$	$\dot{O} = -DO - k_5\varphi_1 - k_6\varphi_3 + OTR$
$\dot{C} = -DC + k_7\varphi_1 + k_8\varphi_2 - CTR$	$\dot{C} = -DC + k_7\varphi_1 + k_9\varphi_3 - CTR$

Em cada um dos modelos parciais existem duas taxas de crescimento em vez das três taxas do modelo global. Assim, bastará utilizar duas equações de estado para se efectuar a redução de ordem do modelo. Uma das equações a usar será a correspondente à dinâmica do substrato (pelo facto de incluir o termo DS_e). A segunda deverá ser escolhida entre as equações correspondentes ao oxigénio e ao dióxido de carbono.

Considerando estado pseudo estacionário para o par glucose e dióxido de carbono, têm-se para o regime respiro-fermentativo:

$$DS_e = k_1\varphi_1 + k_2\varphi_2 \quad (6.51)$$

$$CTR = k_7\varphi_1 + k_8\varphi_2 \quad (6.52)$$

e para o regime respirativo

$$DS_e = k_1\varphi_1 \quad (6.53)$$

$$CTR = k_7\varphi_1 + k_9\varphi_3 \quad (6.54)$$

Neste momento, torna possível explicitar-se as taxas de crescimento (φ_1 e φ_2 para o regime RF; φ_1 e φ_3 para o regime R) em função da taxa de adição de açúcar e da taxa de transferência de dióxido de carbono:

$$\begin{bmatrix} \varphi_1 \\ \varphi_2 \end{bmatrix} = \frac{1}{\tilde{k}_{RF}} \begin{bmatrix} -k_8 & k_2 \\ k_7 & -k_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} DS_e \\ CTR \end{bmatrix} \quad (6.55)$$

$$\begin{bmatrix} \varphi_1 \\ \varphi_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{\tilde{k}_R} \begin{bmatrix} -k_9 & 0 \\ -k_7 & k_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} DS_e \\ CTR \end{bmatrix} \quad (6.56)$$

em que $\tilde{k}_{RF} \equiv k_2k_7 - k_1k_8$ e $\tilde{k}_R \equiv k_1k_9$.

As equações de saída correspondentes são escritas como se segue:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_3k_7}{\tilde{k}_{RF}} DS_e - \frac{k_1k_3}{\tilde{k}_{RF}} CTR - DE \quad (6.57)$$

para o regime respiro-fermentativo, e

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_4k_7}{\tilde{k}_R} DS_e - \frac{k_1k_4}{\tilde{k}_R} CTR - DE \quad (6.58)$$

para o regime respirativo.

A segunda alternativa considera estado *pseudo* estacionário para o par glucose e oxigénio, obtendo-se, no caso do oxigénio, as seguintes equações para a taxa de transferência de oxigénio no regime respiro-fermentativo:

$$OTR = k_5\varphi_1 \quad (6.59)$$

e, para o regime respirativo

$$OTR = k_5\varphi_1 + k_6\varphi_3 \quad (6.60)$$

As equações para DS_e serão as anteriormente obtidas para a escolha do par glucose-dióxido de carbono.

A explicitação das taxas de crescimento (φ_1 e φ_2 para o regime RF; φ_1 e φ_3 para o regime R) em função da taxa de adição de açúcar e da taxa de transferência de oxigénio é, neste caso, escrita como:

$$\begin{bmatrix} \varphi_1 \\ \varphi_2 \end{bmatrix} = \frac{1}{\tilde{k}_{RF}} \begin{bmatrix} 0 & k_2 \\ k_5 & -k_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} DS_c \\ OTR \end{bmatrix} \quad (6.61)$$

$$\begin{bmatrix} \varphi_1 \\ \varphi_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{\tilde{k}_R} \begin{bmatrix} k_6 & 0 \\ -k_5 & k_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} DS_c \\ OTR \end{bmatrix} \quad (6.62)$$

em que $\tilde{k}_{RF} \equiv k_2k_5$ e $\tilde{k}_R \equiv k_1k_6$.

As equações de saída correspondentes são escritas como se segue:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_3k_5}{\tilde{k}_{RF}} DS_c - \frac{k_1k_3}{\tilde{k}_{RF}} OTR - DE \quad (6.63)$$

para o regime respiro-fermentativo, e

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_3k_5}{\tilde{k}_R} DS_c - \frac{k_1k_3}{\tilde{k}_R} OTR - DE \quad (6.64)$$

para o regime respirativo.

As equações de saída para as duas escolhas redução de modelo e para cada um dos regimes metabólicos, podem ser escritas genericamente na seguinte forma:

$$\dot{E} = -DE - \theta_1 CTR - \theta_2 OTR + \theta_3 DS_c \quad (6.45)=(6.65)$$

com a correspondência de variáveis apresentada na Tabela 6.2.

Esta equação do modelo de entrada/saída é idêntica à obtida para a situação de utilização do modelo a três reacções (6.45). De igual modo a lei de controlo, para um modelo de referência de 1ª ordem, será dada pela equação (6.50).

Tabela 6.2 Quadro resumo do modelo de entrada/saída

Par escolhido	Regime	θ_1	θ_2	θ_3	\tilde{k}_R ou \tilde{k}_{RF}
S e C	RF	$k_1 k_3 / \tilde{k}_{RF}$	0	$k_3 k_7 / \tilde{k}_{RF}$	$k_2 k_7 - k_1 k_8$
	R	$k_1 k_4 / \tilde{k}_R$	0	$k_4 k_7 / \tilde{k}_R$	$k_1 k_9$
S e O	RF	0	$k_1 k_3 / \tilde{k}_{RF}$	$k_3 k_5 / \tilde{k}_{RF}$	$k_2 k_5$
	R	0	$k_1 k_4 / \tilde{k}_R$	$k_4 k_5 / \tilde{k}_R$	$k_1 k_6$

Lei de adaptação

No caso geral é necessária a aplicação de uma versão adaptativa da lei de controlo de modo a lidar com incertezas no modelo devido à simplificação feita de se desprezar certas dinâmicas na redução de ordem do modelo. A lei adaptativa será baseada na estimação em linha dos parâmetros desconhecidos de equação genérica,

$$D = \frac{\lambda_1 (E_{ref} - E) + \hat{\theta}_1 CTR + \hat{\theta}_2 OTR}{\hat{\theta}_3 S_e - E} \quad (6.66)$$

Os parâmetros a estimar serão θ_1 e θ_3 no caso de se usar uma redução do modelo baseada na glucose e dióxido de carbono, ou θ_2 e θ_3 para o par glucose e oxigénio.

No caso de se utilizar a simplificação das dinâmicas de glucose e oxigénio, a versão adaptativa da lei de controlo necessita da estimação em linha dos parâmetros θ_2 e θ_3 utilizando como regressores $-OTR$ e DS_e , respectivamente.

A adaptação dos parâmetros θ_2 e θ_3 é feita, então, pelo estimador de dinâmica de 2ª ordem (EDSO), na versão discretizada (em que T é o período de amostragem), a saber:

$$\hat{\theta}_{2,k+1} = \hat{\theta}_{2,k} + T(E^* - E_k)/(OTR_k \tau^2) \quad (6.67)$$

$$\hat{\theta}_{3,k+1} = \hat{\theta}_{3,k} - T(E^* - E_k)/(D_k S_e \tau^2) \quad (6.68)$$

sendo o ganho do controlador calculado por:

$$\lambda_1 = 2\zeta/\tau - (OTR_k - OTR_{k-1})/(TOTR_k) \quad (6.69)$$

6.5 Resultados obtidos por simulação

Realizaram-se diversos estudos de simulação para teste do desempenho dos controladores clássico e não-linear. Deste último, testaram-se em simulação os algoritmos de controlo baseados em:

- modelo reduzido a três reacções com k conhecidos;
- modelo reduzido, parcial, para o par S-C, com k conhecidos;
- modelo reduzido, parcial, para o par S-O, com k conhecidos;
- modelo reduzido, parcial (par S-O) com lei de adaptação, segundo dinâmica de 2ª ordem (controlador EDSO).

O algoritmo baseado em técnicas adaptativas foi o que apresentou melhores resultados, pelo que se dispensa a apresentação gráfica dos resultados obtidos com os restantes controladores.

Os estudos realizados, e que se apresentam de seguida, consistiram na análise comparativa de desempenhos do controlador clássico PID e do controlador adaptativo EDSO. Esses estudos resumem-se a: variações da concentração de substrato na corrente de alimentação, variação do coeficiente global de transferência de massa e do valor de referência da variável controlada, etanol dissolvido. Estas variações ocorreram às 5, 10 e 15 horas. Este estudo, sem a variação da referência, foi efectuado no capítulo 4 com o sistema em ciclo aberto. Para o controlador EDSO, realizaram-se experiências com e sem antecipação. Explicando melhor, sem antecipação, significa não fazer passar para a rotina de controlo o valor da concentração de substrato na corrente de alimentação, de modo a que o algoritmo não seja afectado pela eventual alteração do seu valor. Foi testado, também, o desempenho dos controladores face a diferentes valores do ponto de referência, mas constantes durante toda a experiência e face à introdução de ruídos nas medições. Foi analisada, ainda, a influência das condições iniciais no desempenho dos controladores. Para

o controlador PID foi efectuado, adicionalmente, um estudo relativo à variação dos parâmetros característicos.

A comparação de resultados é feita em termos do critério ITAE - integral pesado do valor absoluto do erro:

$$ITAE = \int_0^{\infty} t |Err(t)| dt \quad (6.70)$$

bem como através dos registos de produtividades e rendimento global. Em forma de comparação da eficiência do sistema em ciclo fechado com a correspondente malha aberta é feito um traçado gráfico com os valores obtidos em ambos os casos.

6.5.1 Apresentação do programa

O programa utilizado foi o *Sim*, apresentado em detalhe no Apêndice A.6. O programa implementa as funções de simulação do modelo, estimativa de estado e de cinéticas e controlo do processo. Neste último ponto, estão programados os algoritmos acima referidos: controlo PID e os quatro algoritmos de controlo adaptativo (com e sem adaptação dos *tetas*).

O programa permite variações em degrau de amplitude e tempo de ocorrência definidos pelo utilizador quer para a variável de referência, etanol, quer para as perturbações, coeficiente de transferência de massa (o que se reflecte, em termos experimentais, numa variação da velocidade de agitação e/ou caudal de arejamento) e concentração de glucose na corrente de alimentação (o que corresponde, em termos industriais, a uma mudança no lote de melações).

6.5.2 Simulações com controlo PID

Sintonização do controlador

Realizaram-se diversas simulações para sintonizar, por tentativa e erro, o controlador PI. Foi escolhido este tipo, em oposição à versão completa do controlador clássico, pela razão de que na realidade experimental, efectuada num laboratório onde há diversos equipamentos eléctricos, existe necessariamente ruído, e é bem conhecida a grande sensibilidade da acção derivativa ao ruído do sinal, particularmente em algoritmos discretos. Aliás, adiante se

poderá constatar esta situação pela análise da introdução de ruído nas variáveis medidas. Os parâmetros seleccionados foram: $K_c = 1 \text{ lh}^{-1}/\text{g l}^{-1}$ e $\tau_i = 0.5 \text{ h}^{-1}$.

Simulações efectuadas para o controlador PID

Globalmente, realizaram-se três tipos de estudos:

- estudos a níveis elevados de concentração inicial de glucose e etanol (secção 6.5.2.1);
- estudos a níveis baixos de concentração inicial de glucose e etanol (secção 6.5.3.2);
- estudos complementares, englobando a influência da introdução de ruído nas medidas e a utilização de diferentes ganhos do controlador (secção 6.5.2.3).

A utilização de diferentes condições iniciais justifica-se pelo importante papel que as variáveis glucose e etanol detêm no processo de crescimento de levedura e que condiciona, portanto, o desempenho do controlador. Nomeadamente, se existir no meio glucose e/ou etanol em excesso, o controlador limita-se a deixar correr o processo normal de consumo de ambos os substratos, mantendo, naturalmente, a zero o caudal de alimentação.

6.5.2.1 Estudos a níveis elevados de concentração inicial de glucose e etanol

Condições da simulação

Os valores de base utilizados na simulação para o coeficiente global de transferência de massa e para a concentração de substrato na alimentação foram, respectivamente, de 100 h^{-1} e de 30 g/l . O tempo de simulação da fermentação foi de 20 horas, valor esse a que se referem os critérios de desempenho do controlador. As condições iniciais das variáveis de estado encontram-se na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 Condições iniciais de base das corridas de simulação

$X \text{ (g/l)}$	$S \text{ (g/l)}$	$E \text{ (g/l)}$	$O \text{ (g/l)}$	$C \text{ (g/l)}$	$V \text{ (l)}$
0.3	1.3	0.8	0.0066	0.002	2

Realizou-se um estudo prévio referente ao estabelecimento do ponto de referência da concentração de etanol no meio. A análise foi efectuada em termos de critério ITAE,

produtividades e rendimentos, utilizando como nível base de etanol os valores 0.25, 0.5, 0.75 e 1 g/l.

A Tabela 6.4 resume o resultado obtido para as quatro situações de referência, em termos desses critérios.

Tabela 6.4 ITAE, produtividade e rendimento para os quatro níveis de E_{ref} .

<i>Corrida</i>	<i>ITAE</i>	<i>Produtividade (g/l/h)</i>	<i>Rendimento (gX/gS)</i>
$E_{ref}=0.25$ g/l	13.4	0.77	0.49
$E_{ref}=0.5$ g/l	7.9	0.75	0.48
$E_{ref}=0.75$ g/l	4.2	0.73	0.47
$E_{ref}=1$ g/l	2.2	0.71	0.45

Para as referências mais elevadas verificam-se por um lado, menores valores de ITAE (partindo de uma concentração inicial de etanol de 0.8 g/l, implica, necessariamente menores erros para níveis de referência mais altos) mas também mais baixo rendimento e produtividade. Daí que o valor de 0.5 g/l seja um compromisso entre critério do erro e valores de produtividade/rendimento.

A obtenção de produtividade e rendimento inferiores à situação 0.25 g/l é justificada pelo seguinte:

De forma a obter um nível de referência superior, há necessidade de fornecer maior quantidade de substrato, de modo a privilegiar a via fermentativa. Isto é conseguido por aumento do caudal de alimentação. Então, a maior quantidade de substrato fornecida é utilizada não só na produção de biomassa como na de etanol, implicando uma diminuição do rendimento global. A utilização de caudais superiores leva a atingirem-se, no final de simulação, um volume de cultura também superior ao da situação de 0.25 g/l. A produtividade, calculada como a razão de concentração de biomassa obtida por volume de cultura, será necessariamente inferior, para uma concentração final de biomassa análoga.

□

De referir que, em todos os gráficos traçados nos estudos efectuados apresentam-se, também, para comparação, os perfis de etanol e da acção de controlo, caudal de

alimentação, para a simulação base em que não se introduziram perturbações, nem alteração do ponto de referência.

Simulações efectuadas a níveis elevados

As simulações efectuadas para o controlador PID resumem-se na Tabela 6.5. É indicado o código de referência para cada simulação.

Tabela 6.5 Quadro resumo das simulações efectuadas

<i>Simulação</i>	<i>Alteração</i>	<i>Tipo</i>	<i>Ocorrência</i>	<i>Referência</i>
0	-	-	-	PI1
1	Se	+ 50 %	5 h	PI1S5+
2	Se	+ 50 %	10 h	PI1S10+
3	Se	+ 50 %	15 h	PI1S15+
4	Se	- 50 %	5 h	PI1S5-
5	Se	- 50 %	10 h	PI1S10-
6	Se	- 50 %	15 h	PI1S15-
7	$K_L a$	+ 50 %	5 h	PI1K5+
8	$K_L a$	+ 50 %	10 h	PI1K10+
9	$K_L a$	+ 50 %	15 h	PI1K15+
10	$K_L a$	- 50 %	5 h	PI1K5-
11	$K_L a$	- 50 %	10 h	PI1K10-
12	$K_L a$	- 50 %	15 h	PI1K15-
13	E	+ 50 %	5 h	PI1E5+
14	E	+ 50 %	10 h	PI1E10+
15	E	+ 50 %	15 h	PI1E15+
16	E	- 50 %	5 h	PI1E5-
17	E	- 50 %	10 h	PI1E10-
18	E	- 50 %	15 h	PI1E15-

Variação positiva em Se

A Figura 6.4 analisa a influência da variação de mais 50% da concentração de substrato na corrente de alimentação no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação. As alterações ocorrem às 5, 10 e 15 horas. As variações correspondem, na prática industrial, a uma alteração dos lotes de melaços, como foi anteriormente referido.

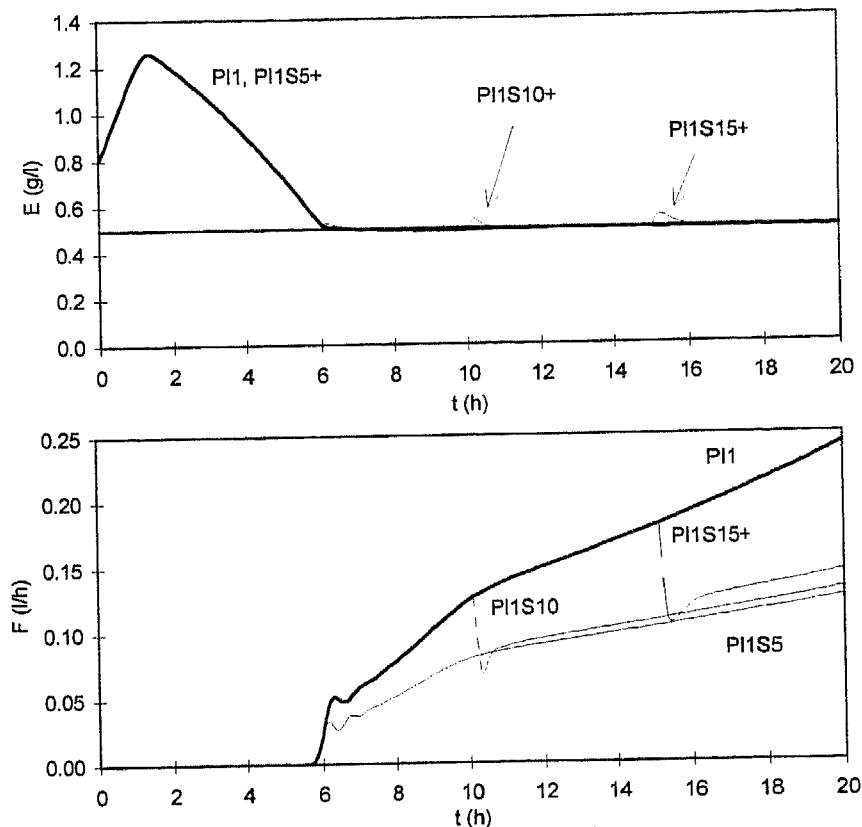


Figura 6.4 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de +50% às 5 (PI1S5+), 10 (PI1S10+) e 15 horas (PI1S15+): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Pode observar-se que a perturbação introduzida às 5 horas não é sentida pelo sistema, sendo as das 10 e 15 horas eliminadas pelo controlador. Um aumento na concentração de substrato é compensada por uma diminuição do caudal de alimentação de modo a que a quantidade total de açúcar adicionada seja necessária para manter a concentração de etanol constante.

Varição negativa em Se

A Figura 6.5 analisa a influência de uma diminuição de 50% na concentração de substrato na corrente de alimentação no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação. As alterações ocorrem, também, às 5, 10 e 15 horas.

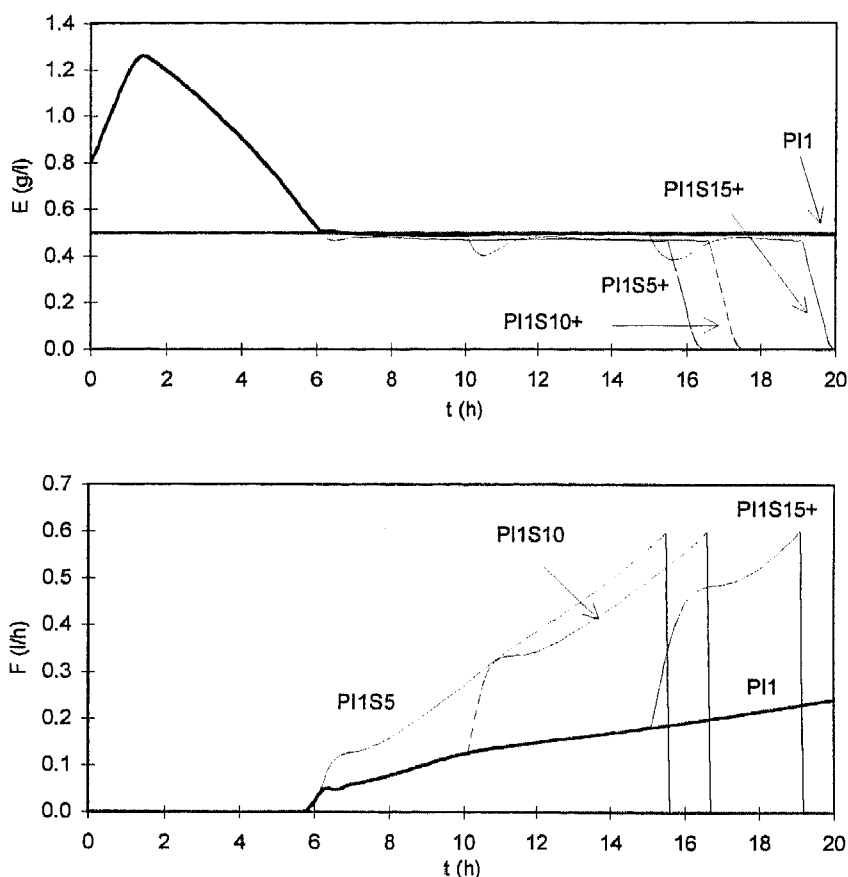


Figura 6.5 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de -50% às: 5 (PI1S5-), 10 (PI1S10-) e 15 horas (PI1S15-): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nas três corridas efectuadas com introdução da perturbação atingiu-se o volume máximo antes das 20 horas, pelo que o caudal de alimentação foi a zero. Isto levou a um consumo de etanol, descendo a zero a sua concentração. Este aumento do caudal adicionado teve como objectivo compensar a diminuição da concentração de açúcar na corrente de alimentação. É um caso contrário ao anterior.

Varição positiva em K_La

A Figura 6.6 estuda a influência da variação de mais 50% no coeficiente global de transferência de massa no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação. As alterações ocorrem às 5, 10 e 15 horas. As variações correspondem, na prática experimental e industrial, a uma alteração do caudal de arejamento e/ou da velocidade de agitação.

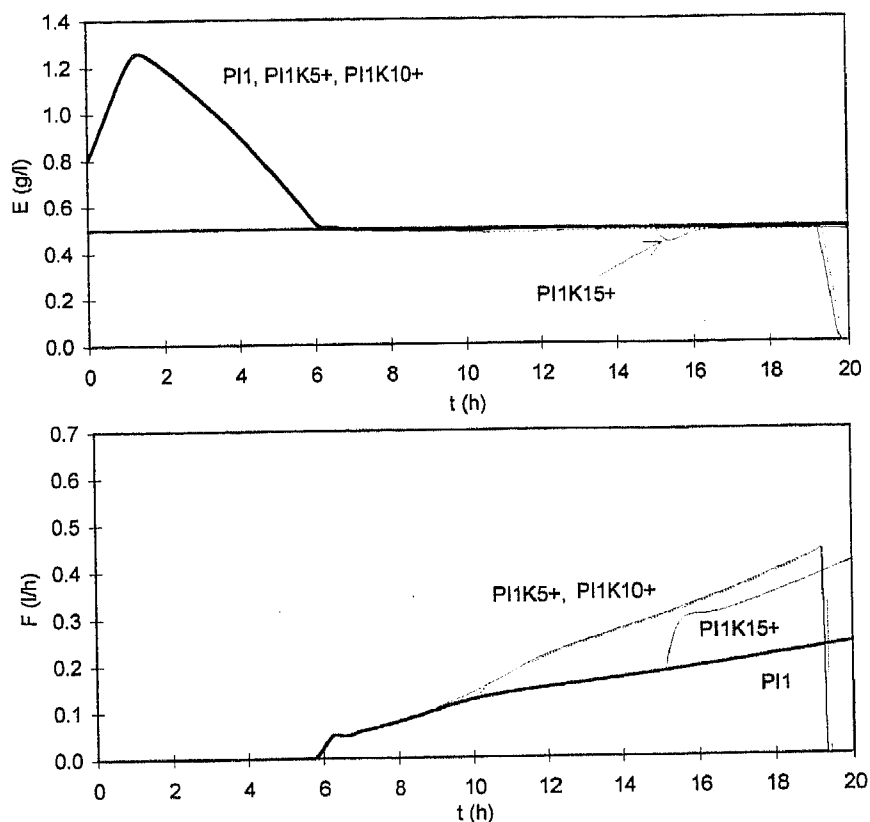


Figura 6.6 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de +50% às 5 (PI1K5+), 10 (PI1K10+) e 15 horas (PI1K15+): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Tal como na perturbação positiva da concentração de substrato na corrente de alimentação, o controlador teve um bom desempenho face ao aumento de 50% no valor do coeficiente global de transferência de massa. De salientar que, a perturbação ocorrente às 15 horas levou a uma diminuição temporária de etanol e a um correspondente aumento do caudal de alimentação. Isto justifica-se pelo facto de um aumento no coeficiente global de transferência de massa levar a uma maior disponibilidade de oxigénio no meio, privilegiando o regime respiro-fermentativo: maior consumo de glucose e de etanol. A persistência do aumento de caudal é devida à necessidade de fornecer maior quantidade de substrato de forma a manter o valor de referência. Para as perturbações às 5 e 10 horas atingiu-se o volume máximo antes das 20 horas de simulação.

Varição negativa em K_{La}

A Figura 6.7 analisa a influência da variação de menos 50% no coeficiente de transferência de massa no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação. As alterações ocorrem às 5, 10 e 15 horas.

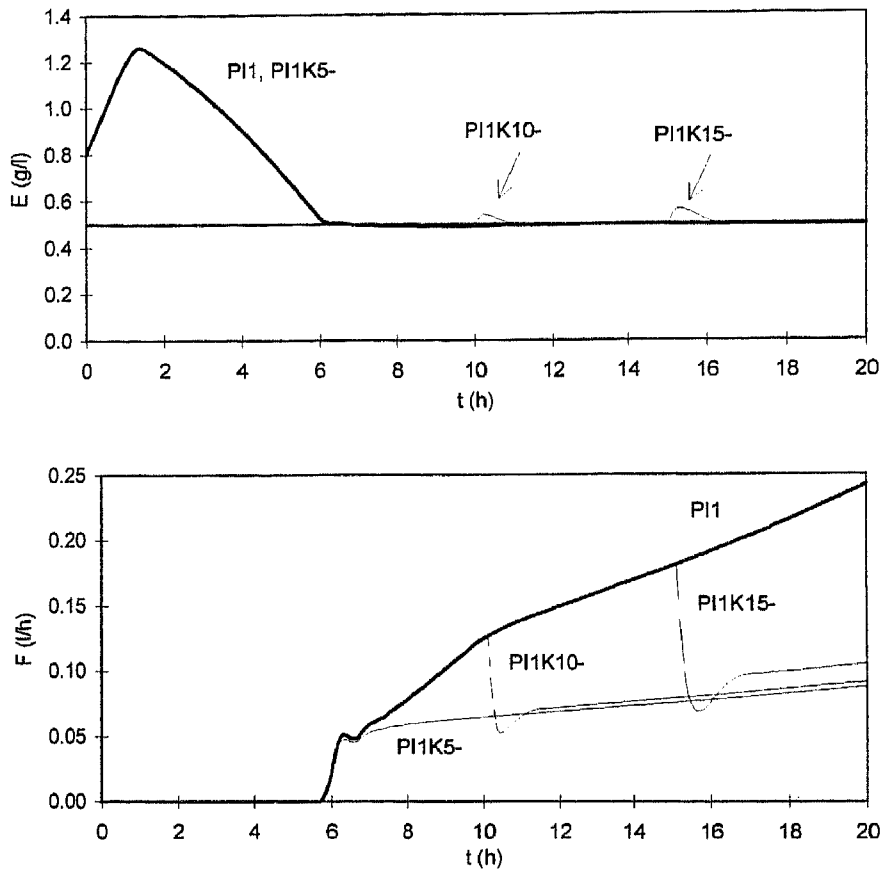


Figura 6.7 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de -50% às 5 (PI1K5-), 10 (PI1K10-) e 15 horas (PI1K15-): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nesta situação, o raciocínio é inverso do caso anterior. Aqui, existe uma menor disponibilidade de oxigénio no meio, o que prejudica o regime respiro-fermentativo: é consumida menor quantidade de substrato e etanol por falha de oxigénio disponível no meio, levando a um aumento temporário da concentração de etanol. Este aumento é anulado pelo controlador, fazendo baixar o caudal de alimentação.

Varição positiva em E_{ref}

Na Figura 6.8 representam-se quatro perfis da variável controlada: o PI1 em que a referência se manteve constante e igual a 0.5 g/l; o PI1E5+, em que às 5 h se fez variar a referência para 0.75 g/l; no PI1E10+, a variação no valor de referência de etanol ocorreu às 10 horas; e, finalmente, o PI1E15+ em que essa variação teve lugar às 15 horas. O controlador conseguiu em todos os casos manter a nova posição de referência, sempre à custa de um aumento no caudal de alimentação (Figura 6.9).

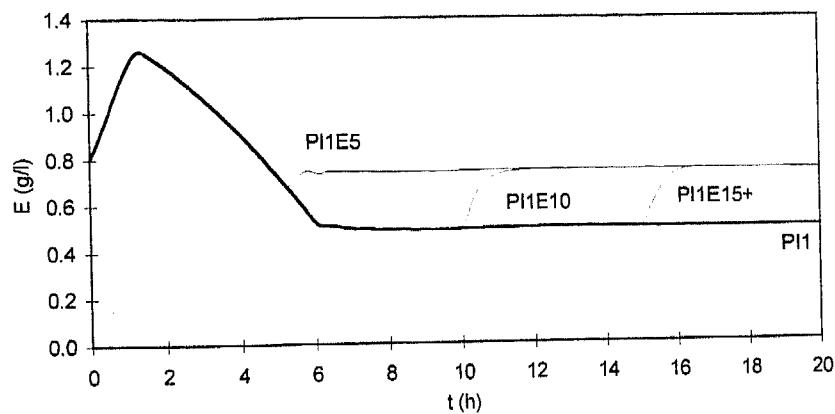


Figura 6.8 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (PI1E5+), 10 (PI1E10+) e 15 horas (PI1E15+): perfis de etanol.

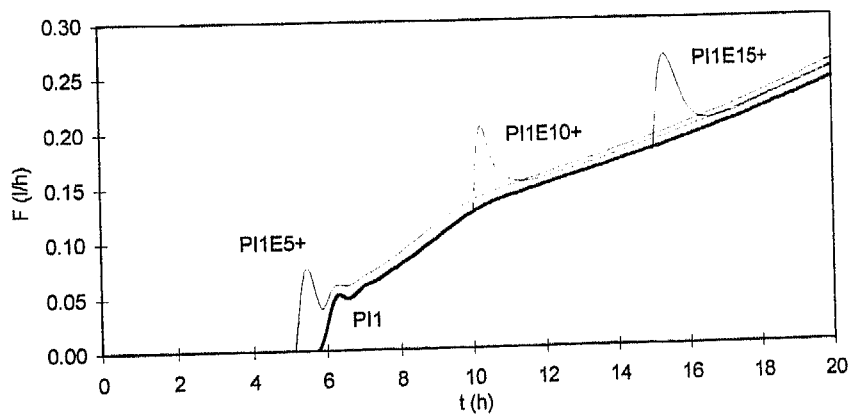


Figura 6.9 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (PI1E5+), 10 (PI1E10+) e 15 horas (PI1E15+): perfis de caudal de alimentação.

Varição negativa em E_{ref}

Por analogia com o caso anterior, a Figura 6.10 estuda, agora, a influência de uma diminuição de 50% no valor de referência de etanol no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação. As alterações ocorrem às 5, 10 e 15 horas.

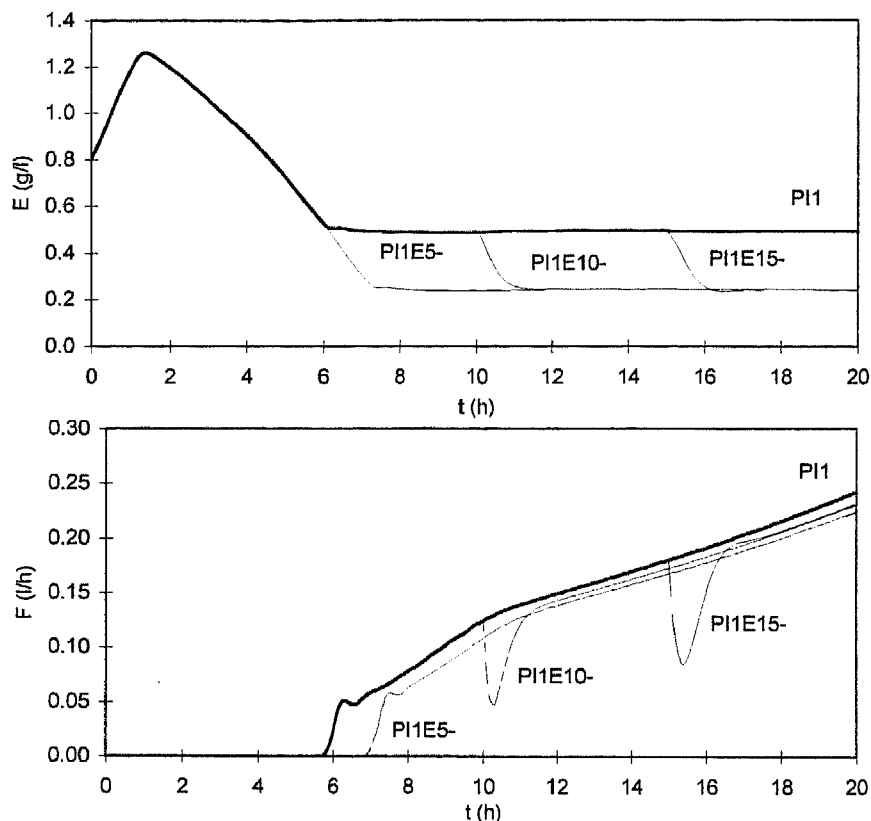


Figura 6.10 Alteração do valor de referência de -50% às 5 (PI1E5-), 10 (PI1E10-) e 15 horas (PI1E15-): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Apreciação global

A Tabela 6.6 resume os estudos até aqui efectuados (introdução de perturbações e alteração da referência) em termos do critério ITAE, produtividades e rendimentos.

Pela análise da tabela pode constatar-se o seguinte:

- As simulações que apresentam valores de ITAE superiores, correspondem à situação de volume máximo atingido antes das 20 horas de simulação;
- Não se verificam diferenças significativas em relação ao caso base nas situações de alteração do K_{La} e da referência;
- As variações introduzidas na concentração de glucose na alimentação afectam inversamente a produtividade e o rendimento global. Constatação essa, aliás, já efectuada no Capítulo 4. Assim, uma diminuição da concentração de glucose leva a

produtividades inferiores (menor quantidade de substrato presente no meio implica menor produção de biomassa) mas aumenta o rendimento obtido (o açúcar presente é utilizado na produção de biomassa e não de etanol).

Tabela 6.6 Análise das simulações com alteração da referência e introdução de perturbações

Corrida	ITAE	Prod (g/l/h)	Rend (gX/gS)	Observações
PI1	7.9	0.75	0.48	
PI1S5+	7.3	1.14	0.48	
PI1S10+	7.5	1.05	0.48	
PI1S15+	7.9	0.89	0.48	
PI1S5-	46.5	0.40	0.51	Vmax 15.5h
PI1S10-	37.9	0.44	0.50	Vmax 17h
PI1S15-	15.9	0.53	0.50	Vmax 19h
PI1K5+	14.5	0.77	0.50	Vmax 19h
PI1K10+	13.6	0.77	0.50	Vmax=19.5 h
PI1K15+	9.3	0.74	0.48	
PI1K5-	7.0	0.79	0.48	
PI1K10-	7.4	0.78	0.48	
PI1K15-	8.2	0.76	0.48	
PI1E5+	7.6	0.73	0.47	
PI1E10+	10.0	0.73	0.46	
E15+	9.9	0.73	0.46	
PI1E5-	10.2	0.77	0.49	
PI1E10-	8.9	0.77	0.49	
PI1E15-	9.8	0.77	0.49	

6.5.2.2 Estudos a níveis baixos de concentração inicial de glucose e etanol

Condições da simulação

Testou-se neste ponto a influência das condições iniciais das variáveis de estado no desempenho do controlador. As novas condições iniciais das corridas encontram-se na Tabela 6.7. Os únicos valores diferentes são a concentração de substrato, quase nula neste caso, e a de etanol, que parte do valor da referência. Neste caso de estudo existe, então, menos substrato, açúcar e etanol, presente no início da corrida.

Tabela 6.7 Novas condições iniciais das corridas de simulação

X (g/l)	S (g/l)	E (g/l)	O (g/l)	C (g/l)	V (l)
0.3	0.02	0.5	0.0066	0.002	2

Simulações efectuadas a níveis baixos

Realizaram-se simulações com a introdução de perturbações e com a alteração do ponto de referência. As alterações foram efectuadas às 10 horas, com variações positivas e negativas de 50% nas perturbações S_e e K_{La} e no nível estabelecido de etanol. Com referência à Tabela 6.5 repetiram-se, para este caso, as corridas 0, 2, 5, 8, 11 e 13. A nomenclatura utilizada para as simulações é idêntica à utilizada no parágrafo anterior, alterando-se apenas o terceiro dígito para '2', de forma a designar um segundo grupo de condições iniciais de simulação.

Caso base

A Figura 6.11 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso base deste novo estudo. Mantiveram-se os parâmetros do controlador obtidos na sintonização para as condições iniciais a níveis elevados de glucose e etanol. Embora parta do valor de referência, o controlador não consegue manter a variável de saída no valor pretendido, mantendo um desvio final pequeno.

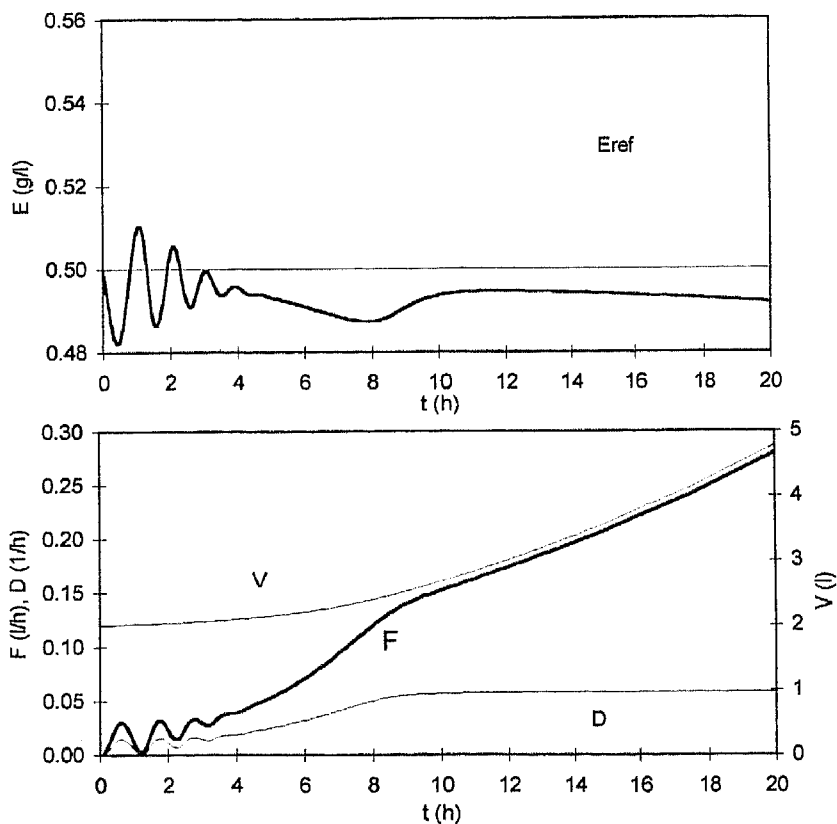


Figura 6.11 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2.

Este ponto é importante para a comparação com o controlador EDSO que se apresentará

na secção 6.5.3. Numa breve antecipação de resultados, pode indicar-se que o controlador EDSO adaptativo apresenta um desempenho uniforme, para condições diferentes de operação, sem necessidade de qualquer ressintonização.

Variações em S_e

Foi analisada a introdução de perturbações positivas e negativas às 10 horas. A Figura 6.12 regista a influência de um aumento de 50% na concentração de substrato na corrente de alimentação nos perfis de etanol e caudal e a Figura 6.13 regista os correspondentes perfis para uma diminuição de 50% em S_e .

Em ambos os casos, a variável controlada é afectada pela perturbação, não conseguindo o controlador eliminar o desvio final existente. A variação negativa em S_e , levou a um aumento no caudal de alimentação, de modo a tentar manter constante o nível de etanol pretendido, o que originou que se atingisse o volume máximo do reactor.

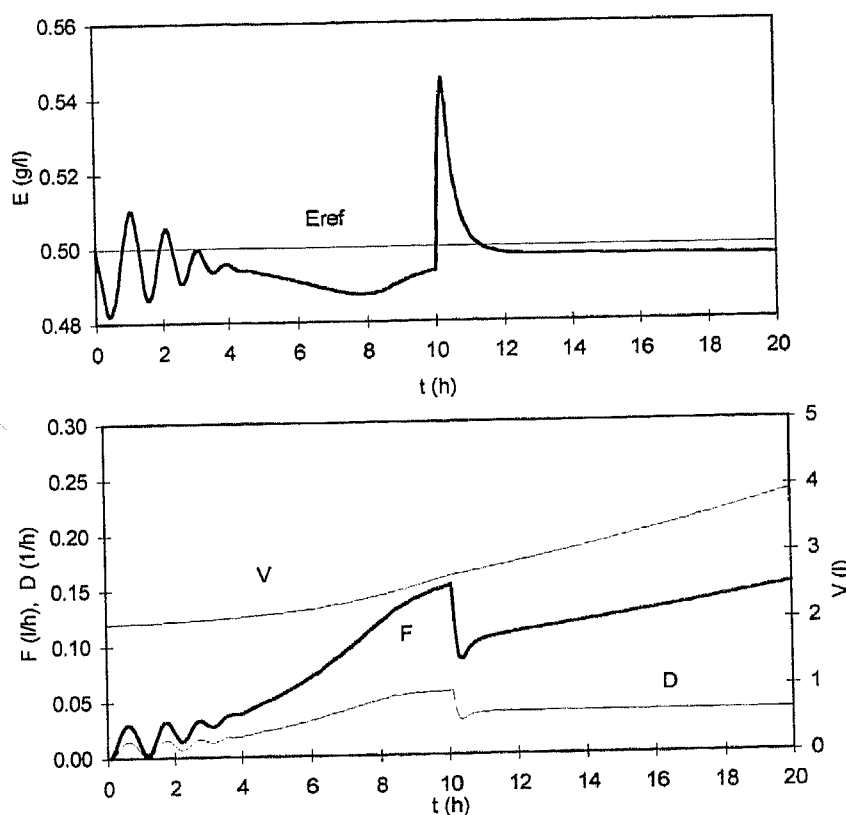


Figura 6.12 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2S10+.

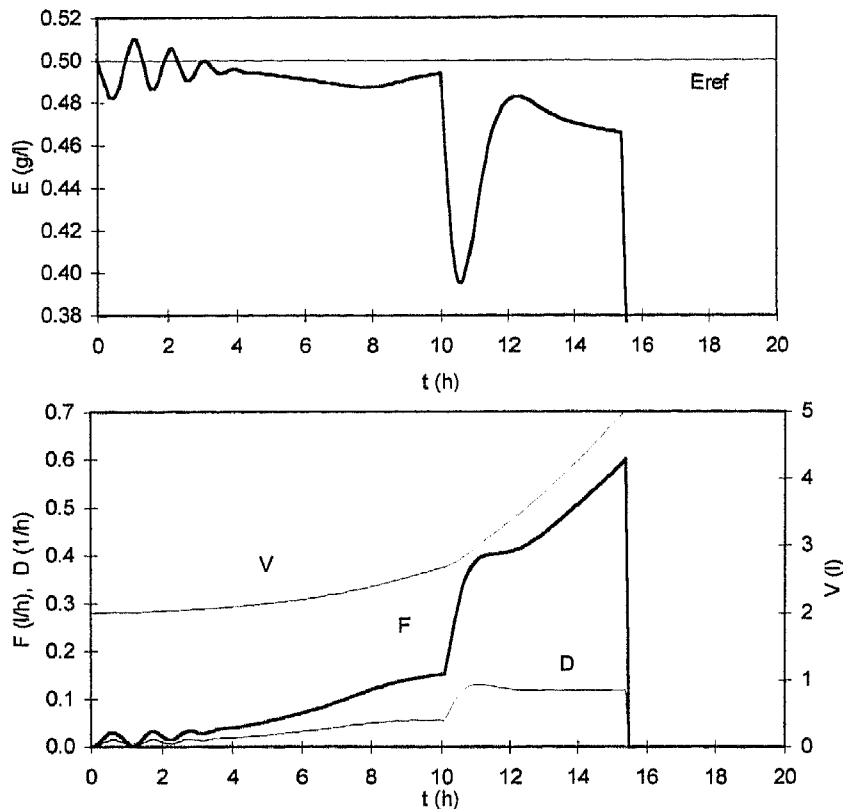


Figura 6.13 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2S10-.

Variações no K_{La}

De igual modo, testou-se a influência da variação positiva e negativa do coeficiente global de transferência de massa (Figura 6.14 e Figura 6.15). A variação positiva levou a uma diminuição temporária do valor de etanol com persistência de desvio final e a um aumento do caudal de alimentação (atingido o volume máximo cerca das 17 horas de simulação). Como referido anteriormente o aumento do K_{La} privilegia o regime respiro-fermentativo, de modo que o consumo de substratos, açúcar e etanol, é superior. O contrário se verifica na perturbação negativa, em que há menor disponibilidade de oxigénio no meio, menor consumo de substratos e, portanto, taxa de alimentação inferior.

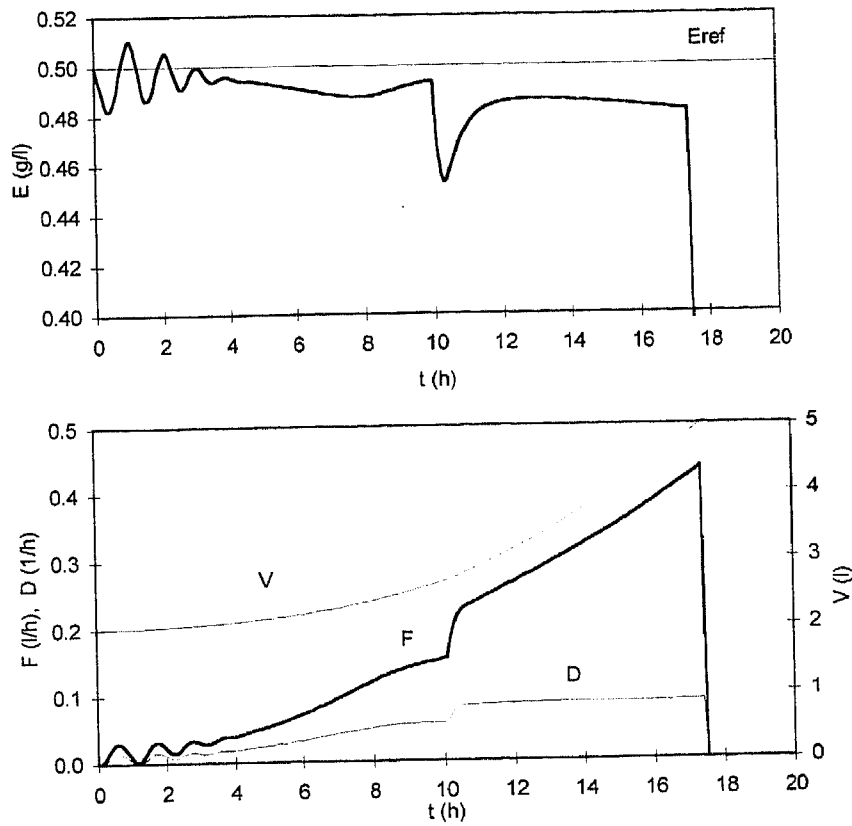


Figura 6.14 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2K10+.

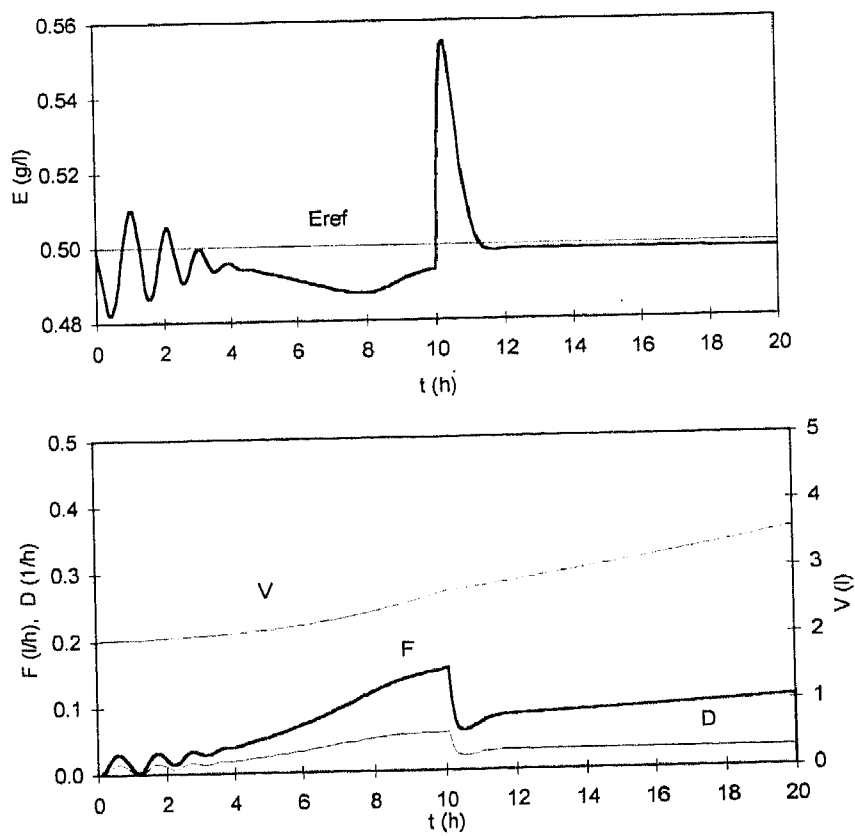


Figura 6.15 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2K10-.

Varição em E_{ref}

Analisou-se o desempenho do controlador face a uma alteração da referência às 10 horas, para 0.75 g/l (Figura 6.16). O controlador PI conseguiu manter o novo ponto estabelecido.

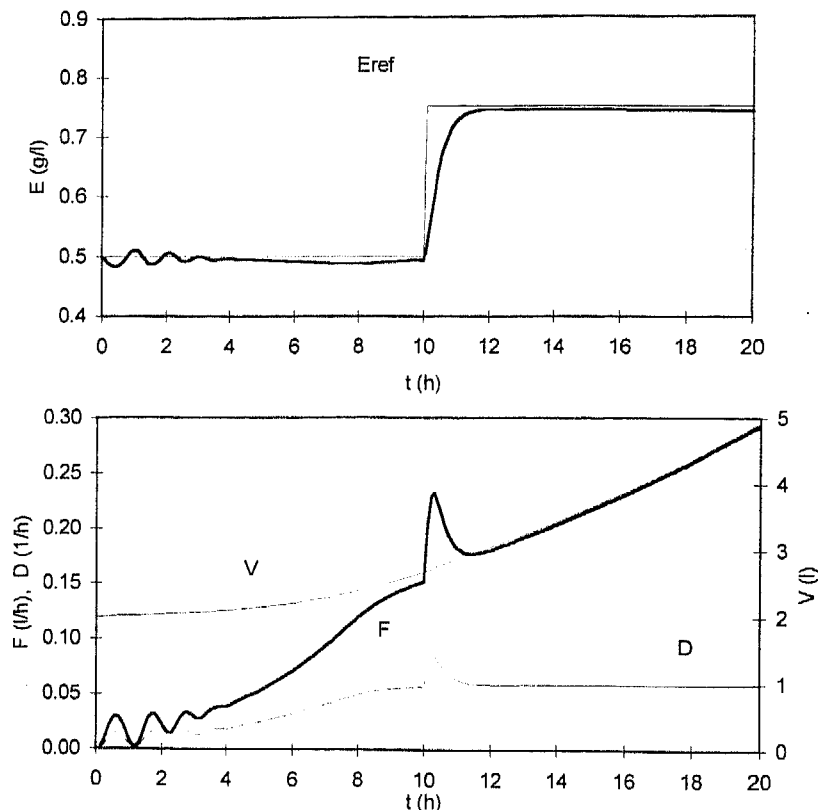


Figura 6.16 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida PI2E10+.

Apreciação global

A Tabela 6.8 resume o estudo efectuado para as novas condições iniciais (níveis baixos) em termos de critério ITAE, produtividades e rendimentos obtidos.

Tabela 6.8 ITAE, produtividades e rendimentos para o estudo de novas condições iniciais.

Corrida	ITAE	Produtividade (g/l/h)	Rendimento (gX/gS)
PI2	1.4	0.71	0.47
PI2S10+	1.0	0.95	0.47
PI2S10-	40.8*	0.46	0.50
PI2K10+	24.3*	0.74	0.49
PI2K10-	1.0	0.71	0.47
PI2E10+	2.8	0.69	0.46

* Atingido o volume máximo antes das 20 horas de simulação.

Pela análise da tabela, e comparando com os valores obtidos nos casos de condições iniciais elevadas de substrato (Tabela 6.6) pode constatar-se o seguinte:

- As simulações que apresentam valores de ITAE superiores, correspondem à situação de volume máximo atingido antes das 20 horas de simulação;
- Também nos estudos a níveis baixos, as variações introduzidas na concentração de glucose na alimentação afectam inversamente a produtividade e o rendimento global;
- Os valores do critério do erro são inferiores relativamente aos casos com condições iniciais elevadas, pois a concentração de etanol parte do ponto de referência;
- O rendimento global obtido nas duas situações de condições iniciais estudadas é análogo. Os valores de produtividade, obtidos nos casos a níveis baixos, são inferiores, o que se justifica pela menor disponibilidade inicial de substrato no meio (glucose e etanol).

6.5.2.3 Estudos complementares

Os estudos complementares efectuados englobam a análise do desempenho do controlador face à introdução de ruído nas variáveis medidas e estudos adicionais de selecção de parâmetros do controlador.

Introdução de ruído

Neste estudo fixou-se a referência da concentração de etanol em 1 g/l, e testaram-se os controladores clássicos apresentados na Tabela 6.9.

Tabela 6.9 Parâmetros do controlador PID para análise de introdução de ruído

Controlador	K_c (lh^{-1}/gl^{-1})	τ_i (h)	τ_d (h)
PIE1r	1	0.5	0
PID1E1r	1	0.5	0.05
PID2E1r	2.5	0.5	0.05

Da Figura 6.17 à Figura 6.19 apresentam-se os perfis de etanol e caudal de alimentação obtidos neste estudo. O controlador PI suporta a introdução de ruído nas medidas mas é notório o esforço excessivo oferecido à válvula para o caso do algoritmo PID, pelo que será de dispensar a acção derivativa.

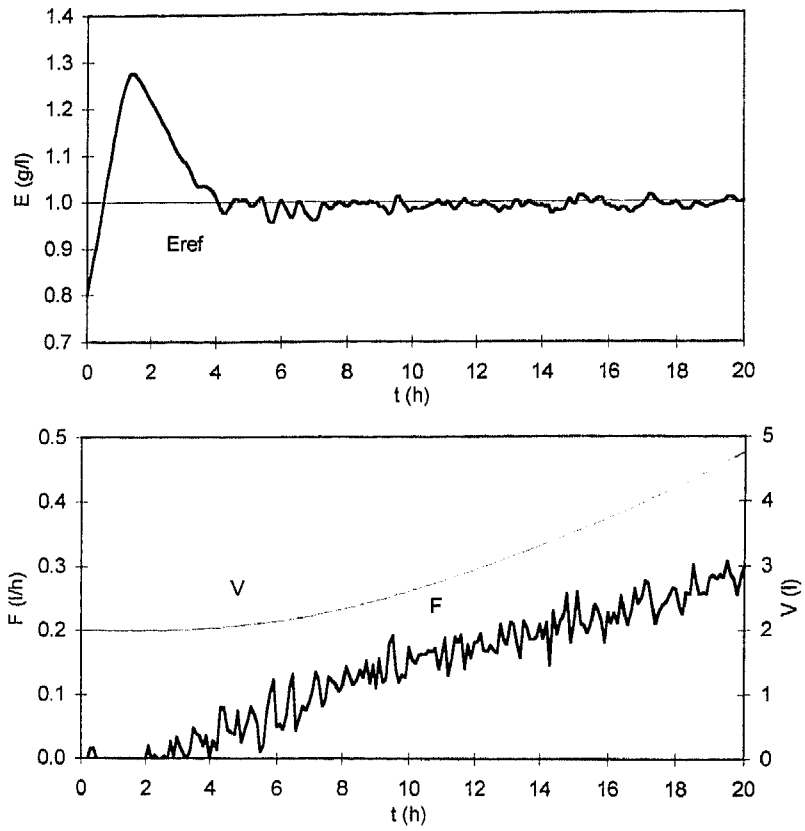


Figura 6.17 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso PI1E1r.

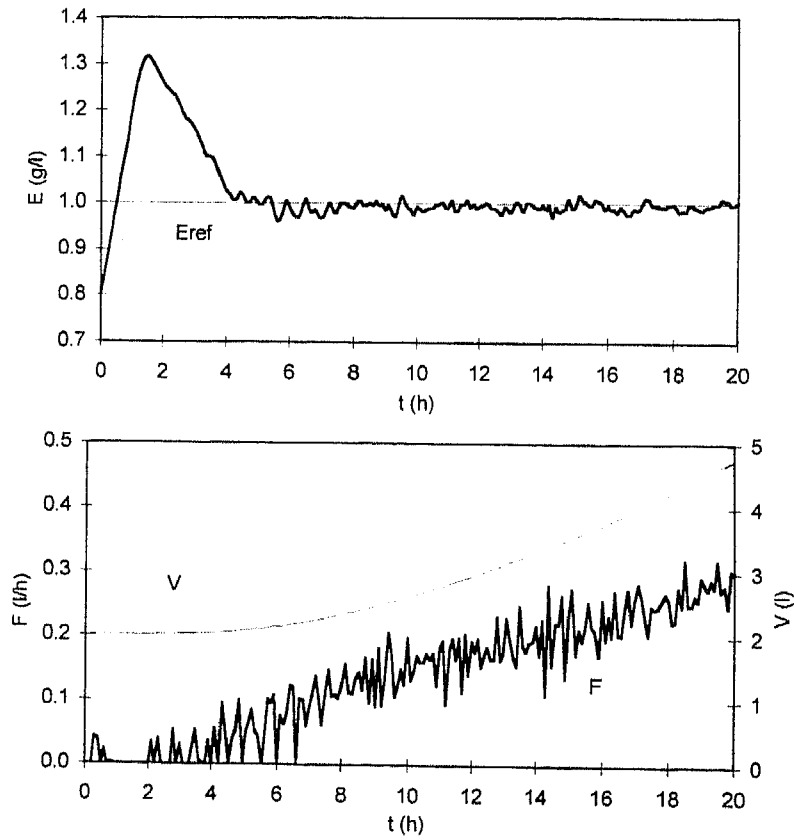


Figura 6.18 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso PID1E1r.

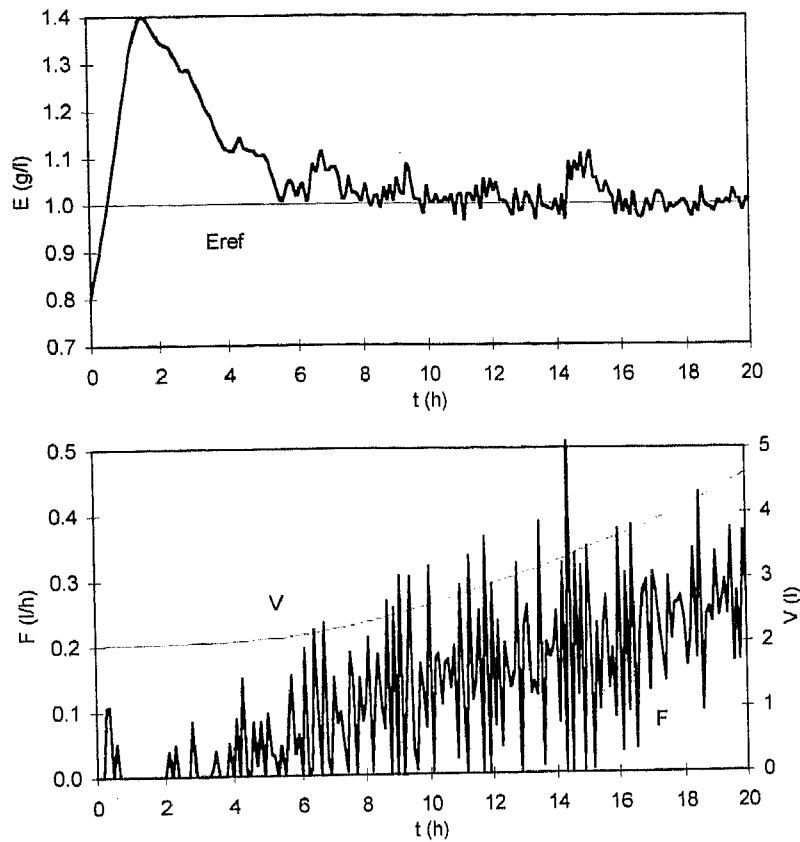


Figura 6.19 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso PID2E1r.

Estudos adicionais do controlador P/PI

Pretendeu-se com o estudo seguinte comparar o desempenho do controlador P e vários tipos de PI. As condições iniciais utilizadas figuram na Tabela 6.10. A Tabela 6.11 resume os parâmetros utilizados neste estudo.

Tabela 6.10 Condições iniciais para estudos do controlador P/PI

X (g/l)	S (g/l)	E (g/l)	O (g/l)	C (g/l)	V (l)
0.3	0.02	0.7	0.0066	0.002	2

Tabela 6.11 Parâmetros do controlador P e PI.

Controlador	K_c ($lh^{-1}/g l^{-1}$)	τ_i (h)
P1	1	10^8 ⁽¹⁾
PI110	1	10
PI15	1	5
PI105	1	0.5

⁽¹⁾ Corresponde a desligar a acção integral.

A Figura 6.20 resume os perfis de etanol e caudal de alimentação obtidos.

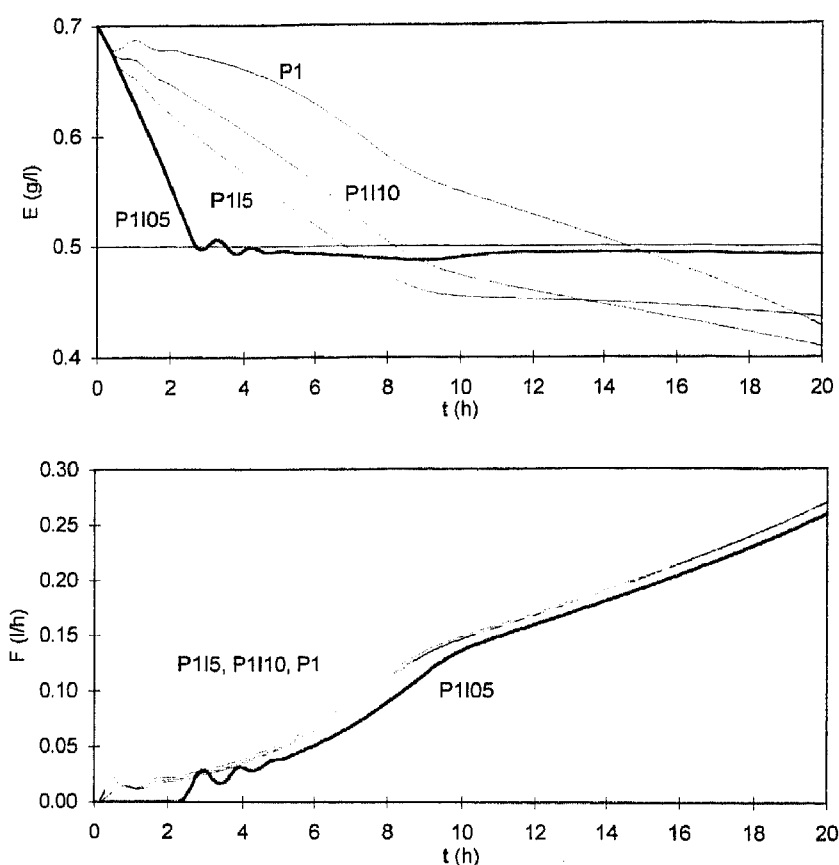


Figura 6.20 Perfis de etanol e caudal de alimentação obtidos nos estudos do controlador P/Pi

Pela análise da figura é de notar uma falha do controlador PID: a válvula abre mesmo que a variável controlada esteja acima do valor de referência. E o mesmo acontece com a introdução da acção integral com o valor de 0.5 h. Uma diminuição desta acção poderia eliminar esta ocorrência. Contudo, uma acção integral muito forte pode levar à instabilidade do sistema. Uma possível solução seria inibir o controlador enquanto a variável controlada estivesse acima da referência. Como os controladores industriais não têm esta possibilidade de programação extra, optou-se, neste trabalho, por não introduzir esta restrição no algoritmo, de modo a simular a realidade industrial. Como adiante se verá, também nas corridas experimentais com controlo PID, a válvula abre apesar da concentração de etanol estar acima do valor de referência.

6.5.3 Simulações com controlo EDSO

Sintonização do controlador

Por tentativa e erro, e para várias condições iniciais, sintonizou-se o controlador EDSO. Os parâmetros que globalmente originavam melhores desempenhos, e empregues neste trabalho, foram: $\tau_i = 1$ e $\xi_i = 1$.

Simulações efectuadas para o controlador EDSO

Tal como efectuado para o controlador clássico, e de modo a se efectuar posteriormente uma análise comparativa de desempenhos, realizaram-se três tipos de estudos:

- estudos a níveis elevados de concentração inicial de glucose e etanol (secção 6.5.3.1);
- estudos a níveis baixos de concentração inicial de glucose e etanol (secção 6.5.3.2);
- estudos complementares, englobando a introdução de ruído nas medidas e a ausência de antecipação referente à concentração de glucose na alimentação (secção 6.5.3.3).

6.5.3.1 Estudos a níveis elevados de concentração inicial de glucose e etanol

Condições da simulação

Para efeitos comparativos com o desempenho do controlador PID, utilizaram-se as mesmas condições de simulação anteriormente empregues. Assim, o valor de referência de base para o etanol foi de 0.5 g/l, o do coeficiente global de transferência de massa foi de 100 h^{-1} e a concentração de substrato na alimentação de 30 g/l. O tempo de simulação da fermentação foi de 20 horas (valor esse a que se referem os critérios de desempenho do controlador).

As condições iniciais de base das corridas encontram-se na Tabela 6.3.

Em todos os gráficos traçados nos estudos efectuados apresentam-se, também, para comparação, os perfis de etanol e da acção de controlo, caudal de alimentação, para a

simulação base em que não se introduziram perturbações, nem alteração do ponto de referência.

Simulações efectuadas

As simulações efectuadas para o controlador EDSO resumem-se na Tabela 6.12.

De referir que os estudos são efectuados com antecipação do valor da concentração de glucose na corrente de alimentação, salvo se aponte o contrário.

Tabela 6.12 Quadro resumo das simulações efectuadas

<i>Simulação</i>	<i>Alteração</i>	<i>Tipo</i>	<i>Ocorrência</i>	<i>Referência</i>
0	-	-	-	E1
1	Se	+ 50 %	5 h	E1S5+
2	Se	+ 50 %	10 h	E1S10+
3	Se	+ 50 %	15 h	E1S15+
4	Se	- 50 %	5 h	E1S5-
5	Se	- 50 %	10 h	E1S10-
6	Se	- 50 %	15 h	E1S15-
7	$K_{1,a}$	+ 50 %	5 h	E1K5+
8	$K_{1,a}$	+ 50 %	10 h	E1K10+
9	$K_{1,a}$	+ 50 %	15 h	E1K15+
10	$K_{1,a}$	- 50 %	5 h	E1K5-
11	$K_{1,a}$	- 50 %	10 h	E1K10-
12	$K_{1,a}$	- 50 %	15 h	E1K15-
13	E	+ 50 %	5 h	E1E5+
14	E	+ 50 %	10 h	E1E10+
15	E	+ 50 %	15 h	E1E15+
16	E	- 50 %	5 h	E1E5-
17	E	- 50 %	10 h	E1E10-
18	E	- 50 %	15 h	E1E15-

Varição positiva em Se

A Figura 6.21 analisa a influência da variação de mais 50% da concentração de substrato na corrente de alimentação no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação. As alterações ocorrem às 5, 10 e 15 horas.

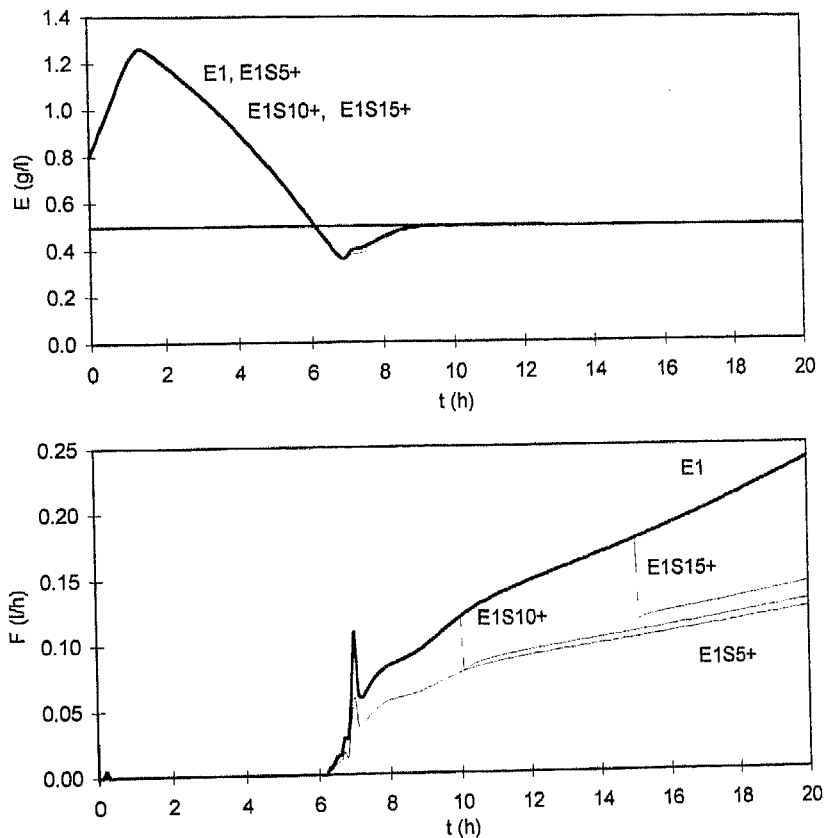


Figura 6.21 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de +50% às 5 (E1S5+), 10 (E1S10+) e 15 horas (E1S15+): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Pode observar-se que a perturbação introduzida é eliminada pelo controlador, não afectando sequer o perfil da variável controlada. A utilização de antecipação no algoritmo de controlo leva a que o controlador actue previamente. Também neste caso, um aumento na concentração de substrato é compensada por uma diminuição do caudal de alimentação de modo a que a quantidade total de açúcar adicionada seja a necessária para manter a concentração de etanol constante.

Varição negativa em Se

A Figura 6.22 analisa a influência de uma diminuição de 50% na concentração de substrato na corrente de alimentação no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação.

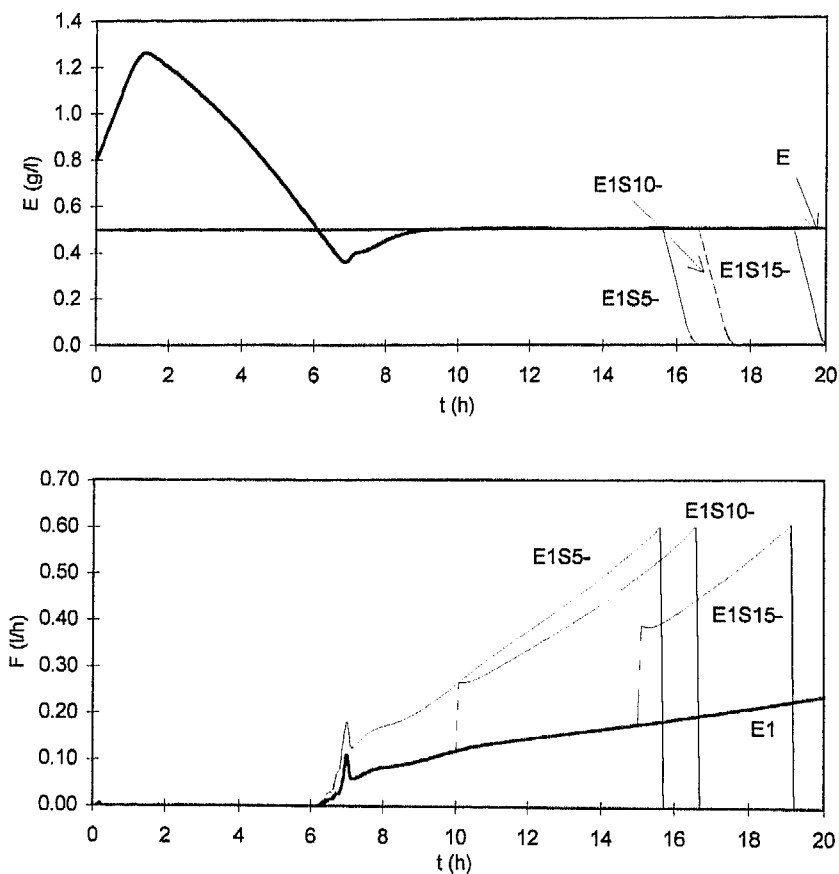


Figura 6.22 Alteração da concentração de substrato na corrente de alimentação de -50% às : 5 (E1S5-), 10 (E1S10-) e 15 horas (E1S15-): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Tal como na variação positiva da perturbação, também neste caso, o controlador consegue que a variável controlada não sinta o efeito da carga. Nesta situação é atingido o volume máximo nos três casos de estudo.

Variação positiva em E_{ref}

Na Figura 6.25 representam-se quatro perfis da variável controlada: o E1 em que a referência se manteve constante e igual a 0.5 g/l; o E1K5+, em que às 5 h se fez variar a referência para 0.75 g/l; no E1K10+, a variação no valor de referência de etanol ocorreu às 10 horas; e, finalmente, o E1K15+ em que essa variação teve lugar às 15 horas. O controlador conseguiu em todos os casos manter a nova posição de referência, sempre à custa de um aumento no caudal de alimentação (Figura 6.26).

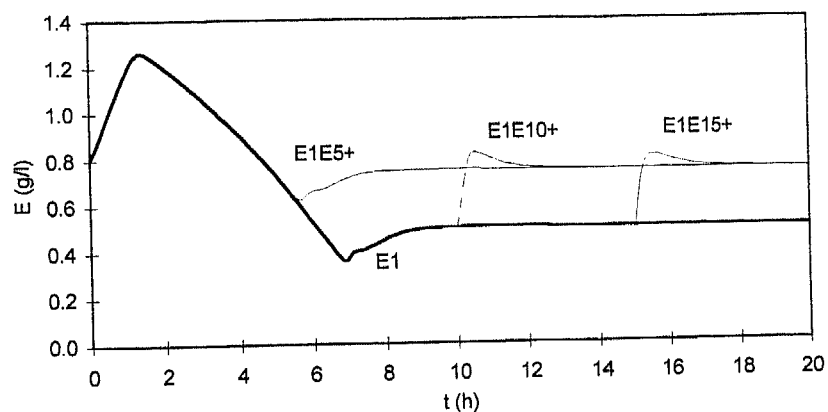


Figura 6.25 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (E1E5+), 10 (E1E10+) e 15 horas (E1E15+); perfis de etanol.

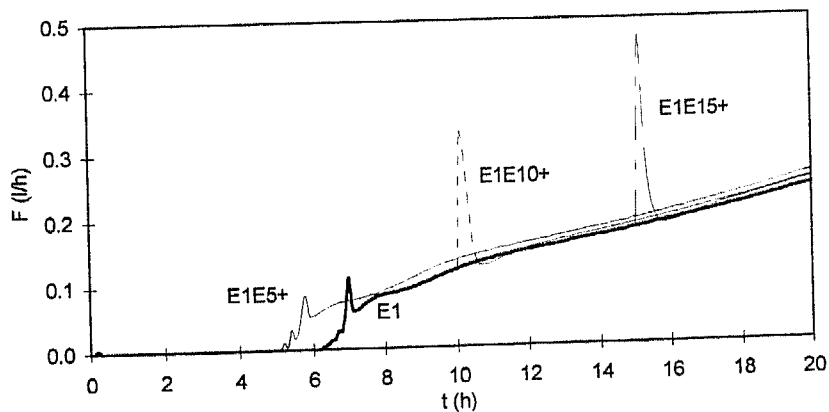


Figura 6.26 Alteração do valor de referência de +50% às 5 (E1E5+), 10 (E1E10+) e 15 horas (E1E15+); perfis de caudal de alimentação.

Varição negativa em $K_L a$

A Figura 6.24 analisa a influência da variação de menos 50% no coeficiente de transferência de massa no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação.

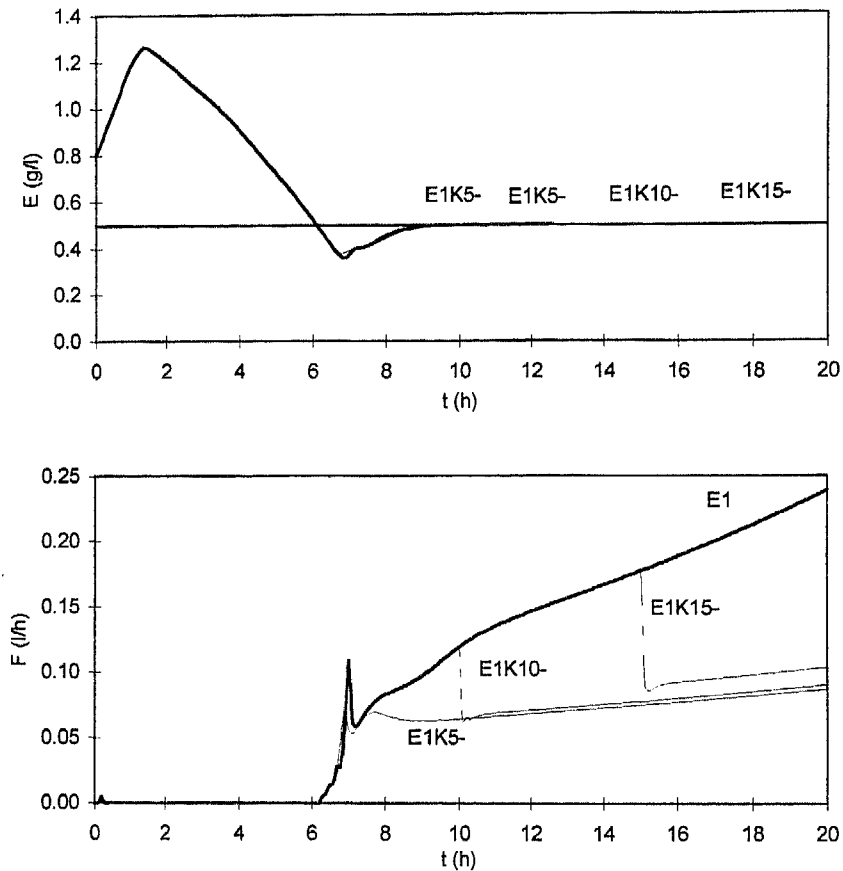


Figura 6.24 Alteração do coeficiente global de transferência de massa de -50% às 5 (E1K5-), 10 (E1K10-) e 15 horas (E1K15-): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Mais uma vez, a perturbação introduzida não afectou o perfil da concentração de etanol.

Varição negativa em E_{ref}

Por analogia com o caso anterior, a Figura 6.27 estuda, agora, a influência de uma diminuição de 50% no valor de referência de etanol no desempenho do controlador, em termos de perfis de etanol e caudal de alimentação.

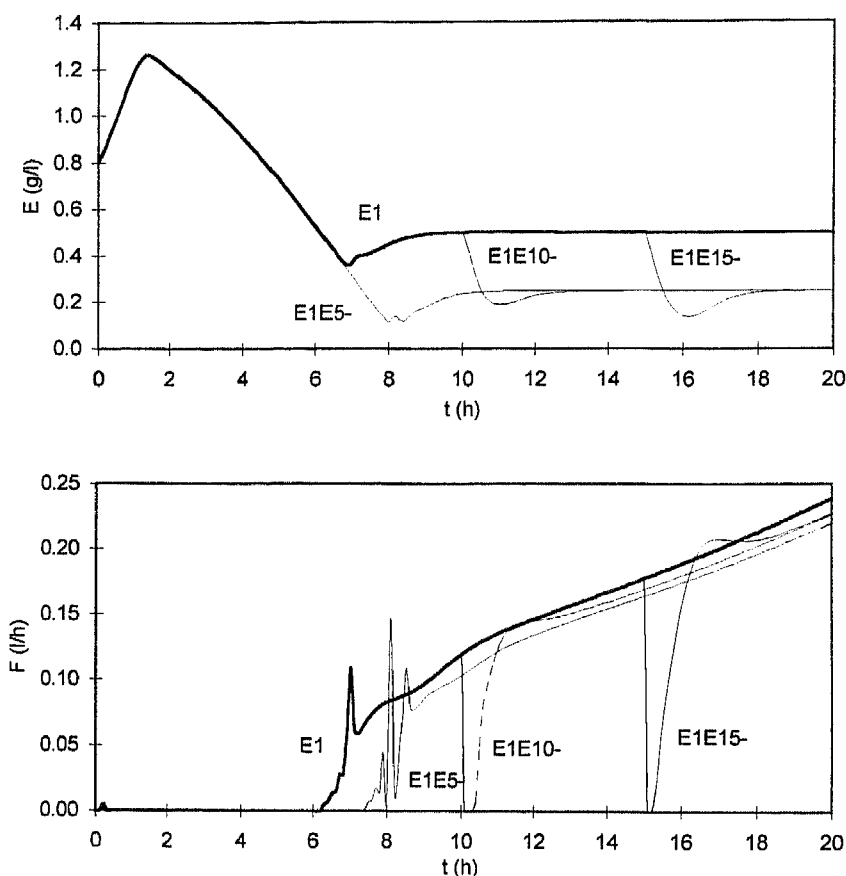


Figura 6.27 Alteração do valor de referência de -50% às 5 (E1E5-), 10 (E1E10-) e 15 horas (E1E15-): perfis de etanol e caudal de alimentação.

Apreciação global

A Tabela 6.13 resume os estudos até aqui efectuados (introdução de perturbações e alteração da referência) em termos do critério ITAE, produtividades e rendimentos.

A análise efectuada nos correspondentes estudos do controlador clássico aplica-se também neste caso. Assim, pela análise da tabela pode constatar-se:

- As simulações que apresentam valores de ITAE superiores, correspondem à situação de volume máximo atingido antes das 20 horas de simulação;

- As variações introduzidas na concentração de glucose na alimentação afectam inversamente a produtividade e o rendimento global.
- Um aumento da concentração de etanol de referência implica uma pequena diminuição nos índices de produtividade e rendimento global;
- Genericamente, as alterações no coeficiente global de transferência de massa não afectam de um modo significativo os índices de desempenho.

Tabela 6.13 Análise comparativa nas simulações com alteração da referência e introdução de perturbações - controlo EDSO

Corrida	ITAE EDSO	Prod EDSO	Rend EDSO	Observações
E1	8.1	0.75	0.48	
E1S5+	8.4	1.14	0.48	
E1S10+	8.1	1.06	0.48	
E1S15+	8.2	0.90	0.48	
E1S5-	43.8	0.40	0.51	Vmax 15.5h
E1S10-	35.7	0.44	0.50	Vmax 17h
E1S15-	13.0	0.53	0.50	Vmax 19h
E1K5+	11.4	0.77	0.50	Vmax 19.5h
E1K10+	10.5	0.77	0.50	V max 19.5h
E1K15+	8.2	0.74	0.48	
E1K5-	8.0	0.79	0.48	
E1K10-	8.2	0.78	0.48	
E1K15-	8.2	0.76	0.48	
E1E5+	7.2	0.73	0.47	
E1E10+	9.4	0.73	0.46	
E1E15+	9.7	0.73	0.46	
E1E5-	10.9	0.77	0.49	
E1E10-	9.8	0.77	0.49	
E1E15-	11.7	0.77	0.49	

6.5.3.2 Estudos a níveis baixos de concentração de glucose e etanol

Condições da simulação

As novas condições iniciais das corridas encontram-se na Tabela 6.7. Os únicos valores diferentes são a concentração de substrato, quase nula neste caso, e a de etanol, que parte do valor de base da referência. Neste caso de estudo existe, então, menos substrato, açúcar e etanol, presente no início da corrida.

Simulações efectuadas a níveis baixos

Realizaram-se simulações com a introdução de perturbações e com a alteração do ponto de referência. As alterações foram efectuadas às 10 horas, com variações positivas e negativas de 50% nas perturbações S_e e K_{La} e no nível estabelecido de etanol. Com referência à Tabela 6.5 repetiram-se, para este caso, as corridas 0, 2, 5, 8, 11 e 13. A nomenclatura utilizada para as simulações é idêntica à utilizada no parágrafo anterior, alterando-se apenas o terceiro dígito para '2', de forma a designar um segundo grupo de condições iniciais de simulação.

Caso base

A Figura 6.28 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso base deste estudo: referência constante e igual a 0.5 g/l e sem perturbações, durante as 20 horas de simulação. O controlador provoca, no início uma oscilação na variável controlada mas mantém-na na referência até ao final da simulação.

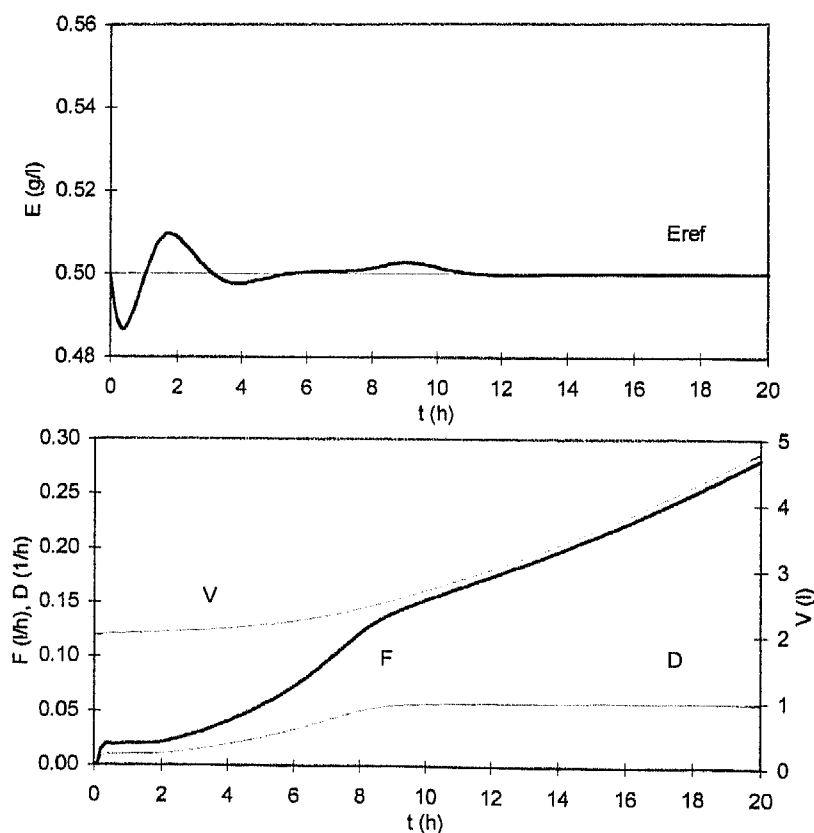


Figura 6.28 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2.

Variações em S_e

Foi analisada, também, a introdução de perturbações positivas e negativas às 10 horas. A Figura 6.29 regista a influência de um aumento de 50% na concentração de substrato na corrente de alimentação nos perfis de etanol e caudal e a Figura 6.30 regista os correspondentes perfis para uma diminuição de 50% em S_e .

Em ambos os casos, a variável controlada não é afectada pela perturbação. A variação negativa de S_e , levou a um aumento no caudal de alimentação, de modo a tentar manter constante o nível de etanol pretendido, o que originou que se atingisse o volume máximo do reactor.

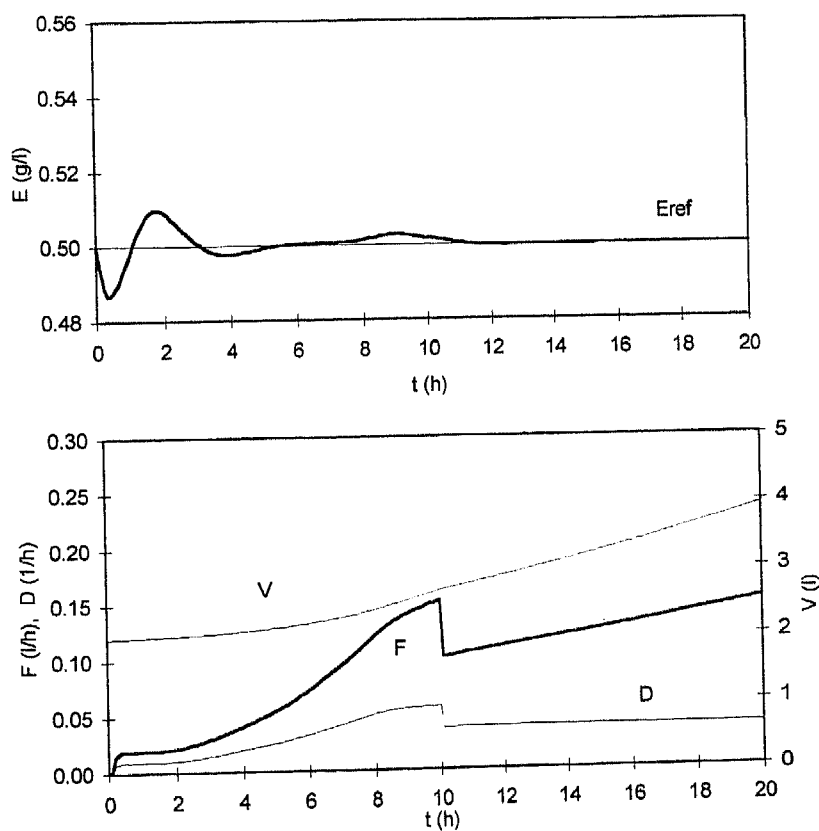


Figura 6.29 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2S10+.

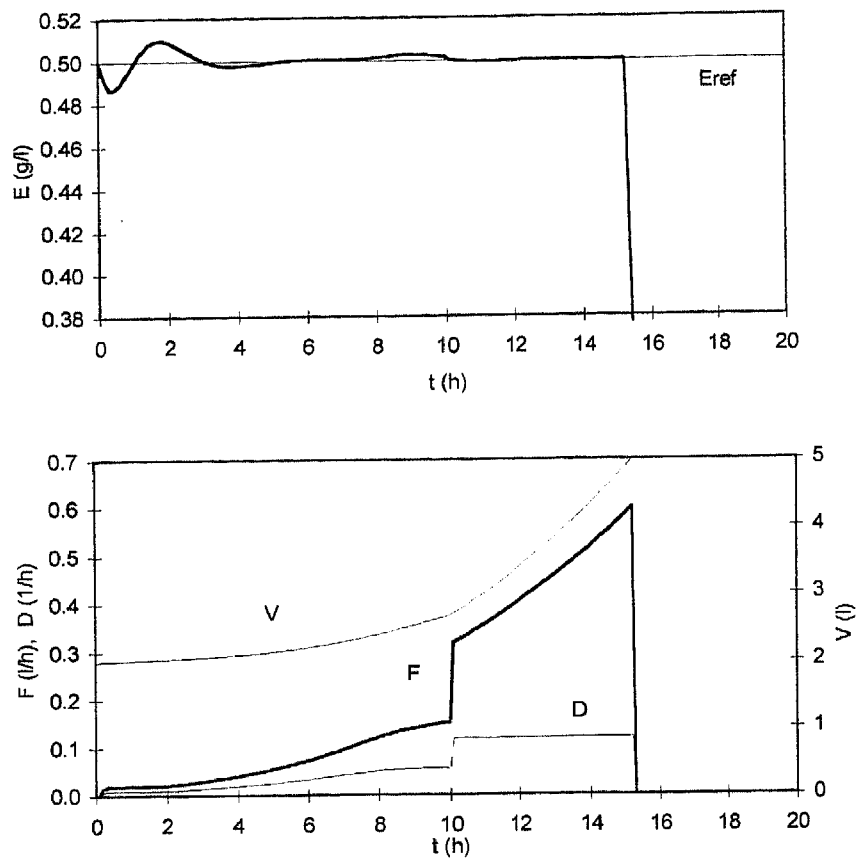


Figura 6.30 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2S10-.

Variações no K_La

De igual modo se testou a influência da variação positiva e negativa do coeficiente global de transferência de massa (Figura 6.31 e Figura 6.32).

Em ambas, houve um pequeno aumento da concentração de etanol aquando da carga, mas o controlador manteve, depois, o valor de referência. A variação positiva levou a um aumento do caudal de alimentação (atingido o volume máximo cerca das 17.5 horas de simulação). Como referido anteriormente, e verificado, também, para o controlo PI, o aumento do K_La privilegia o regime respiro-fermentativo, de modo que o consumo de substratos, açúcar e etanol, é superior. O contrário se verifica na perturbação negativa, em que há menor disponibilidade de oxigénio no meio, menor consumo de substratos e, portanto, taxa de alimentação inferior.

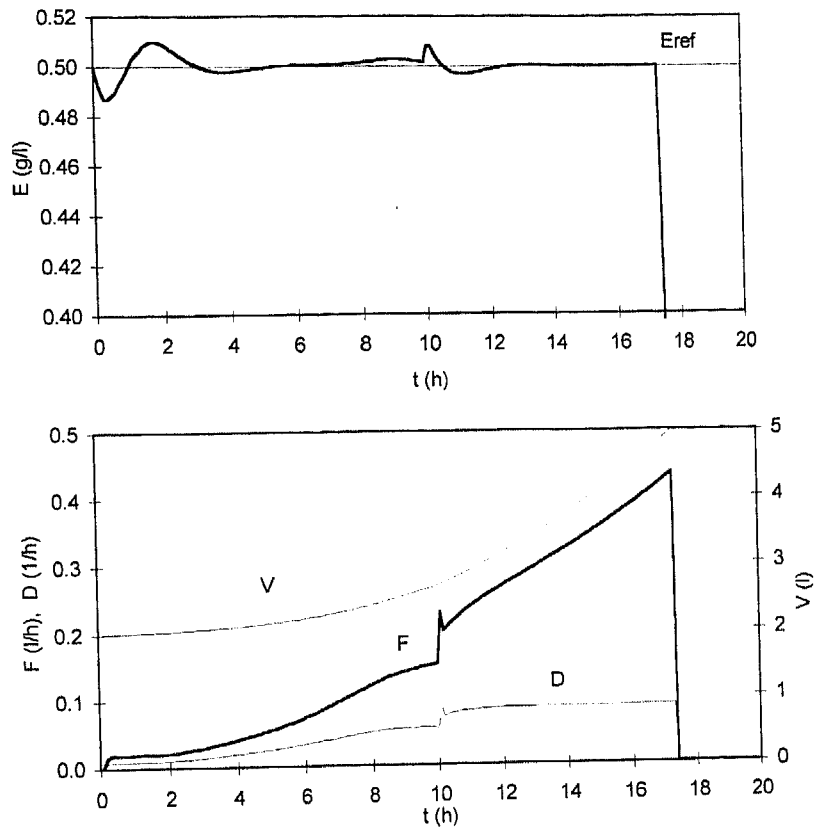


Figura 6.31 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2K10+.

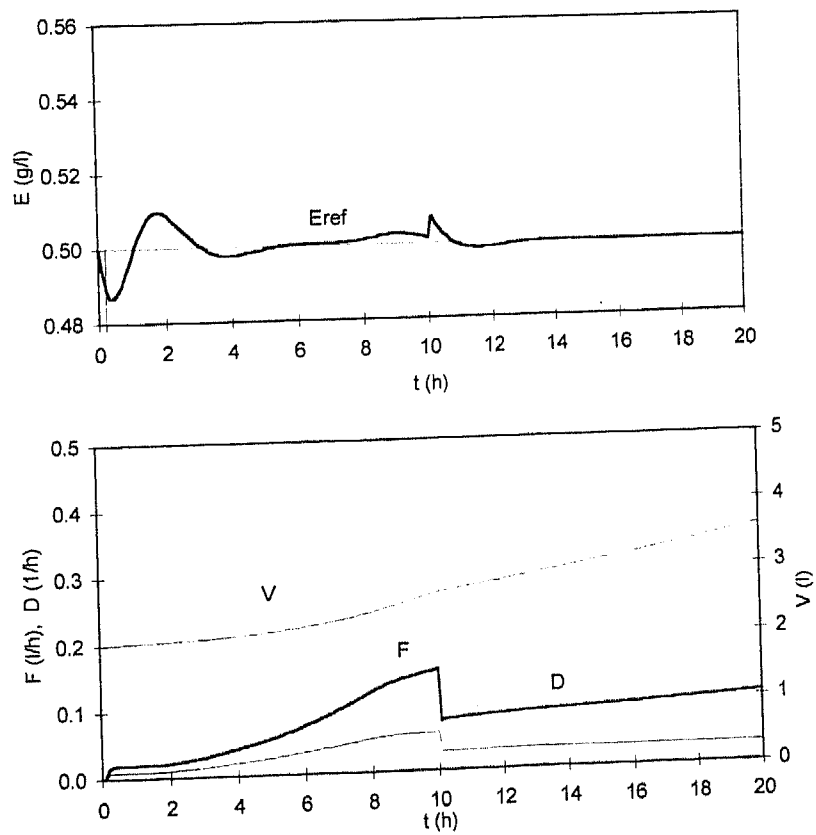


Figura 6.32 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2K10-.

Varição em E_{ref}

De seguida analisou-se o desempenho do controlador face a uma alteração da referência às 10 horas, para 0.75 g/l (Figura 6.33). O controlador consegue manter o novo nível de referência apesar de apresentar uma sobreelongação inicial.

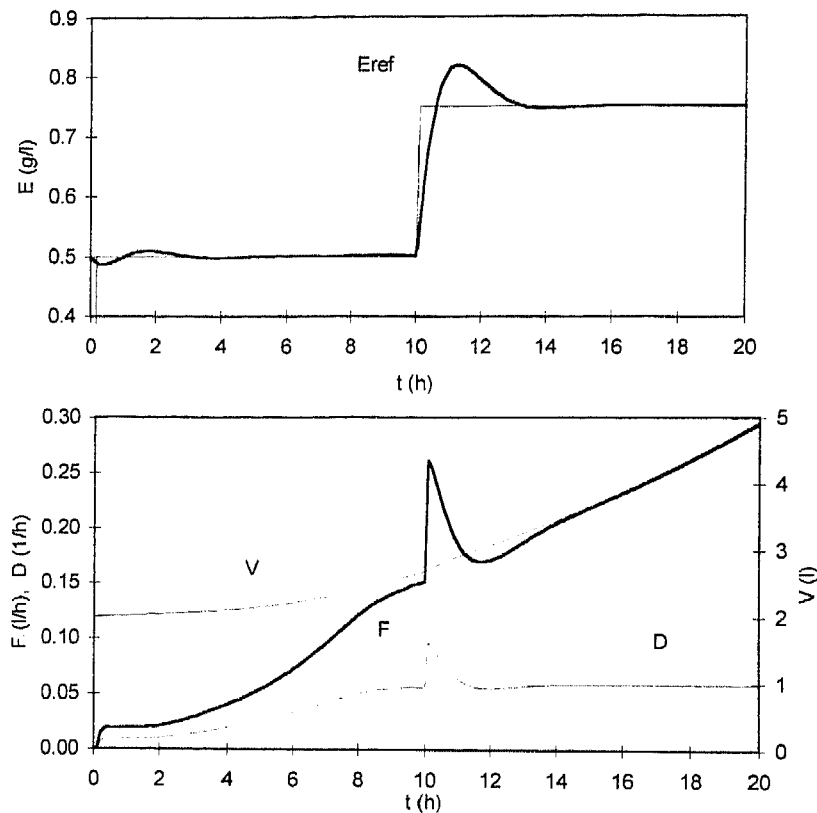


Figura 6.33 Perfis de etanol e caudal de alimentação para a corrida E2E10+.

Apreciação global

A Tabela 6.14 apresenta os valores do critério ITAE, de produtividades e de rendimentos obtidos neste estudo. Pela análise da tabela, e comparando com os valores obtidos nos casos de condições iniciais elevadas de substrato (Tabela 6.13), constata-se:

- As simulações que apresentam valores de ITAE superiores, correspondem à situação de volume máximo atingido antes das 20 horas de simulação;
- Também na situação de condições iniciais baixas, as variações introduzidas na concentração de glucose na alimentação afectam inversamente a produtividade e o rendimento global;
- Os valores do critério do erro são inferiores nos casos a níveis baixos, pois a concentração de etanol parte do ponto de referência. O rendimento global obtido nas duas situações de condições iniciais estudadas é análogo. Os valores de produtividade, obtidos a níveis baixos de concentração de glucose e etanol, são

inferiores, o que se justifica pela menor disponibilidade inicial de substratos no meio.

Tabela 6.14 ITAE, produtividades e rendimentos para o estudo de novas condições iniciais - EDSO.

<i>Corrida</i>	<i>ITAE</i>	<i>Produtividade (g/l/h)</i>	<i>Rendimento (gX/gS)</i>
E2	0.1	0.71	0.47
E2S10+	0.1	0.95	0.48
E2S10-	39.0*	0.46	0.50
E2K10+	22.9*	0.74	0.49
E2K10-	0.1	0.71	0.47
E2E10+	2.1	0.69	0.46

* Atingido o volume máximo antes das 20 horas de simulação.

6.5.3.3 Estudos complementares

Introdução de ruído

Neste estudo fixou-se a referência da concentração de etanol em 1 g/l, e comprovou-se a robustez do controlador face à introdução de ruído nas variáveis medidas (Figura 6.34).

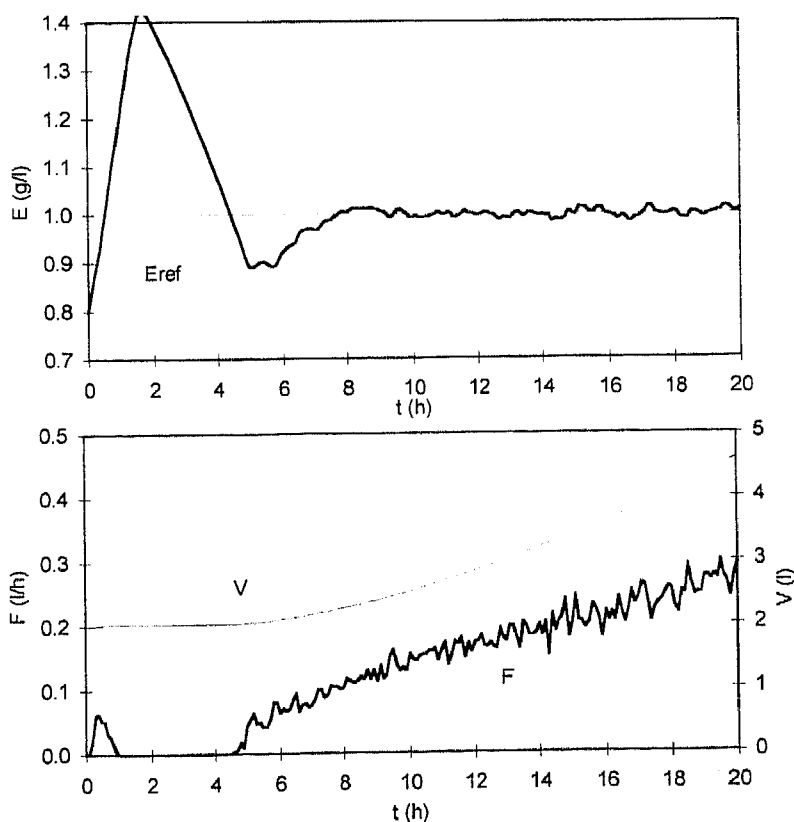


Figura 6.34 Perfis de etanol e caudal de alimentação para o caso E1E1r.

Controlador sem antecipação

O algoritmo de controlo EDSO empregue contém uma parcela referente à concentração de substrato na alimentação. Nas corridas efectuadas até aqui, a rotina de controlo dispunha do valor actualizado de S_e . Estudou-se nesta secção, a influência no desempenho do controlador se esse valor não for passado à rotina: controlo adaptativo sem antecipação.

Correram-se duas simulações, com as condições iniciais da Tabela 6.3, provocando às 10 horas, uma variação de mais e outra de menos 50% no valor de base de S_e (30 g/l) (Figura 6.35 e Figura 6.36).

Contrariamente ao controlo com antecipação, no qual a carga era eficazmente eliminada pelo controlador, não chegando sequer a afectar a variável controlada, neste caso, o controlador não consegue anular a alteração temporária no perfil de etanol.

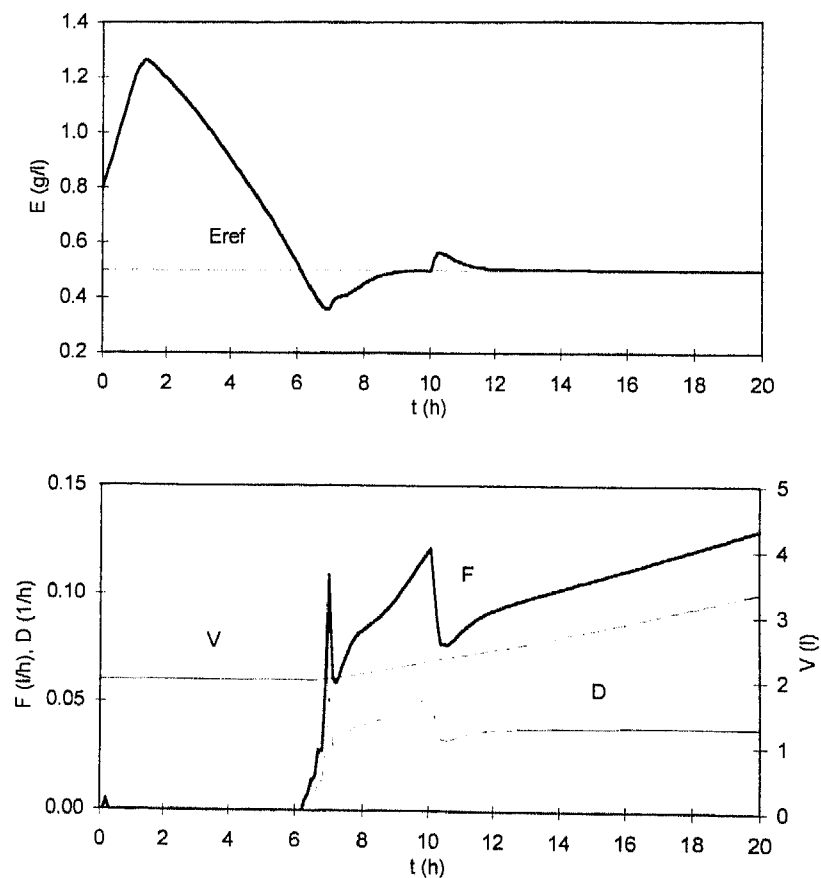


Figura 6.35 Controlo EDSO sem antecipação - variação de +50% em S_e .

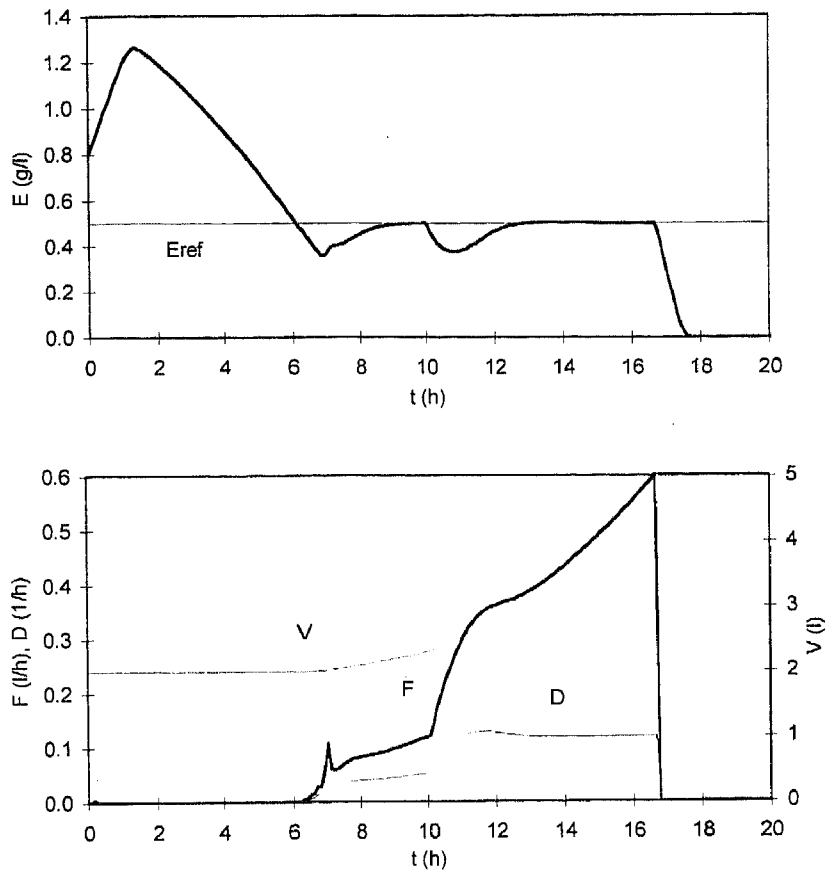


Figura 6.36 Controle EDSO sem antecipação - variação de -50% em S_e .

6.5.4 Comparação de desempenho de controladores

Apresentados os estudos equivalentes para o controlador PID e para o controlador EDSO com antecipação, é conveniente comparar desempenhos. A comparação é feita em termos do traçado gráfico para o critério ITAE, para os valores de produtividades e de rendimentos.

Introdução de cargas e referência variável

Pretende-se, neste ponto, comparar desempenhos dos dois algoritmos e comparar, também, com os valores obtidos em ciclo aberto (resultados já apresentados no capítulo 4). Este resumo diz respeito à introdução de variações positivas e negativas da concentração de substrato na alimentação (referenciado nos gráficos como S [tempo de ocorrência da perturbação][+ ou -]) e do coeficiente global de transferência de massa (referenciado nos gráficos como K [tempo de ocorrência da perturbação][+ ou -]), às 5, 10 e 15 horas. Para o sistema em ciclo fechado, apresentam-se ainda, os estudos da variação de mais e menos

50% na referência da variável controlada (referenciado nos gráficos como $E[\text{tempo de ocorrência da perturbação}][+ \text{ ou } -]$), ocorrida às 5, 10 e 15 horas. A Figura 6.37 e Figura 6.38 apresentam os valores de produtividade e rendimento global obtidos para o ciclo aberto e para o ciclo fechado (com os dois algoritmos testados). As condições iniciais das variáveis de estado são as da Tabela 6.3.

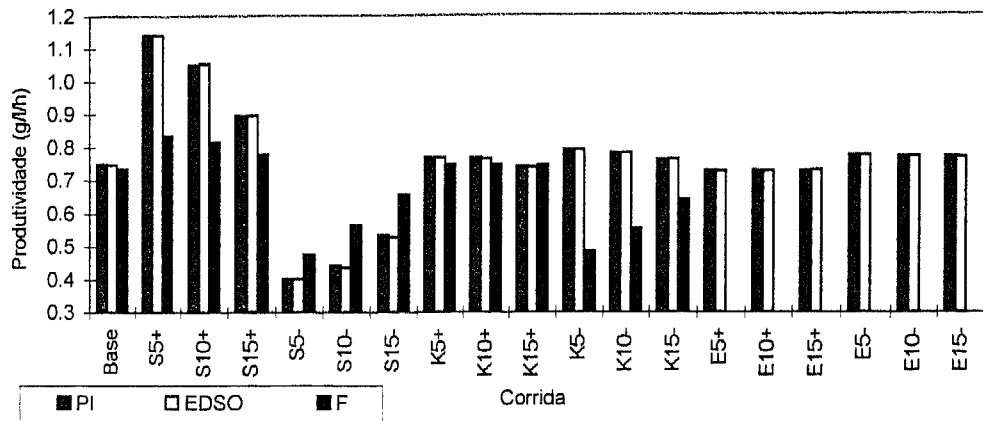


Figura 6.37 Produtividade em ciclo aberto (F) e em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de cargas e referência variável.

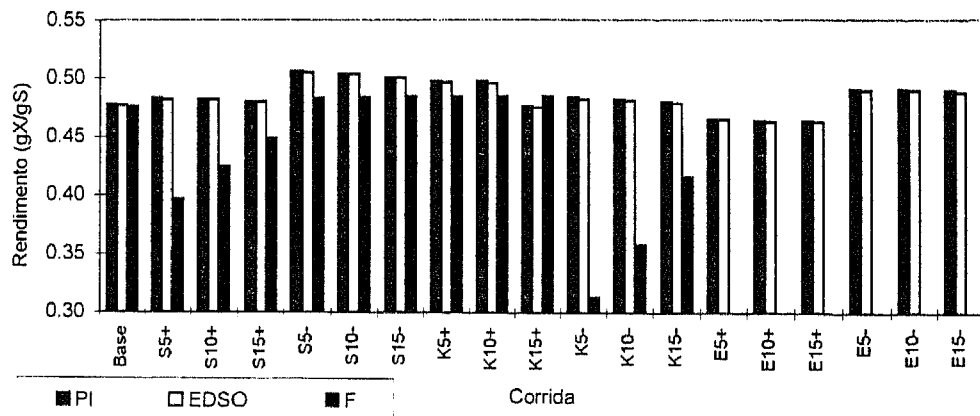


Figura 6.38 Rendimento global em ciclo aberto (F) e em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de cargas e referência variável.

Em termos de desempenho dos dois algoritmos de controlo, as diferenças não são significativas. Comparando com os valores obtidos em ciclo aberto, a malha fechada consegue melhores rendimentos e produtividades, como seria, aliás, de esperar. É de referir, para não haver interpretações erradas, na situação de diminuição da concentração de substrato na alimentação em ciclo fechado foi cortado o caudal de alimentação por se ter atingido o volume máximo do reactor antes das 20 horas de simulação. Deste modo, os

valores de produtividades são necessariamente inferiores aos obtidos em ciclo aberto, em que houve alimentação de substrato até ao final da simulação.

Em relação ao critério ITAE, optou-se por se traçar dois gráficos: um comparando a situação de ciclo aberto, em que a concentração de etanol evolui livremente, com a implementação de malha fechada (Figura 6.39). Na Figura 6.40 compara-se apenas o desempenho dos dois algoritmos em ciclo fechado. Os valores de ITAE para o controlador EDSO são nalgumas situações inferiores aos do PID, mas genericamente, a sua variação não é significativa.

No entanto, convém ter presente os perfis de etanol obtidos em cada um dos casos. Contrariamente ao PID, o controlador EDSO consegue eliminar todas as perturbações, fazendo com que o perfil da variável controlada mantenha o valor de referência durante a simulação.

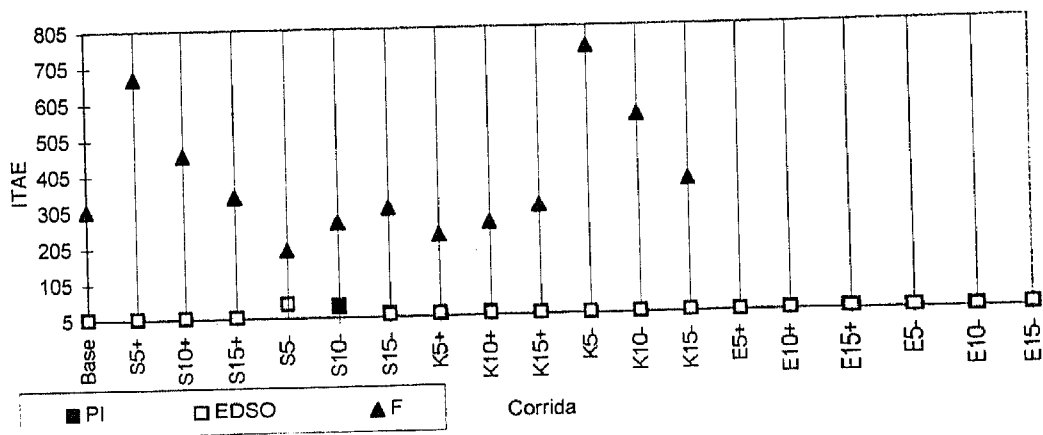


Figura 6.39 Valores de ITAE obtidos em ciclo aberto (F) e em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de cargas e referência variável.

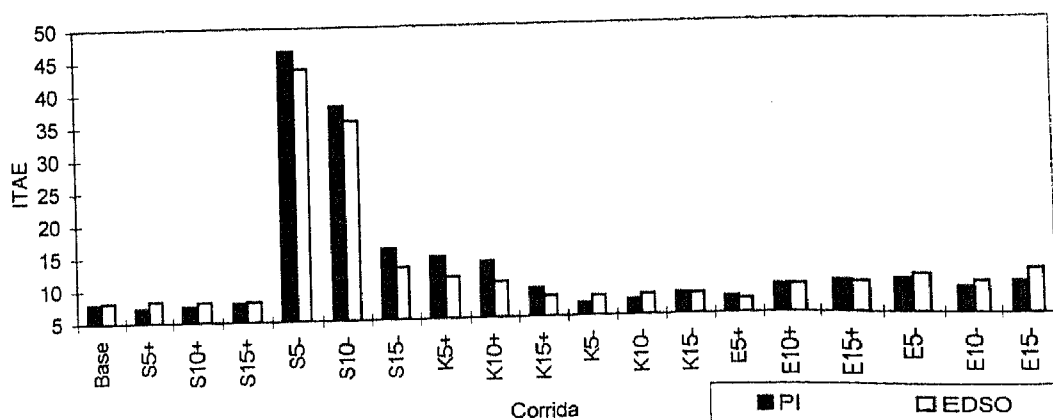


Figura 6.40 Valores de ITAE obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de cargas e referência variável.

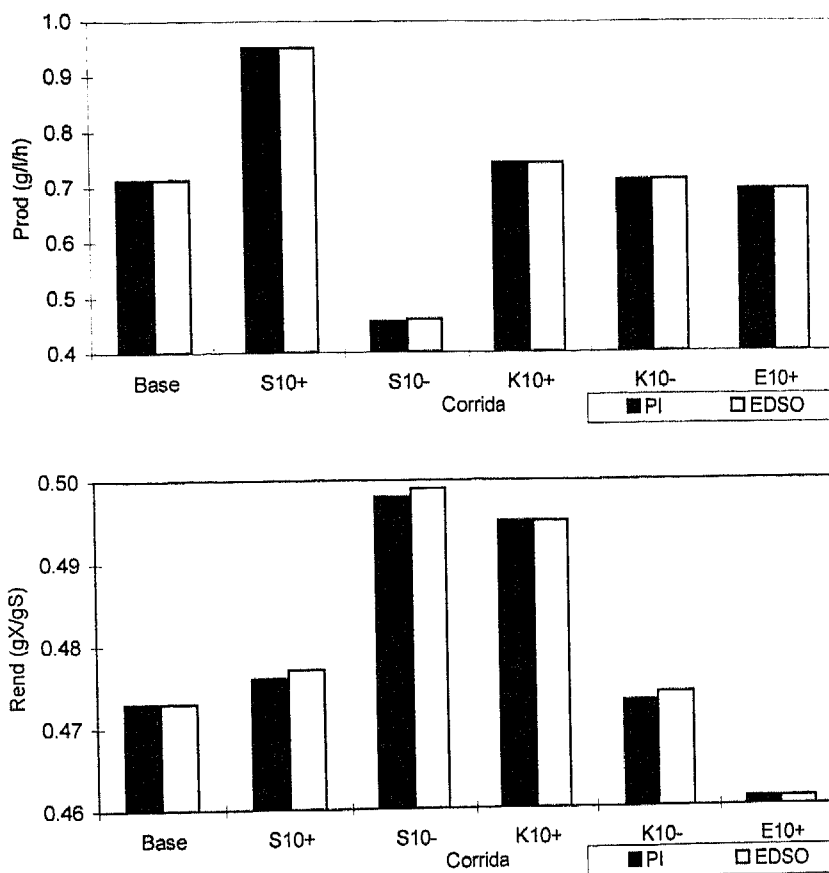


Figura 6.42 Valores de produtividade e rendimento obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com diferentes condições iniciais.

Para o registo do critério ITAE (Figura 6.43), e para uma comparação mais 'honestá' dos dois controladores, não se representaram os resultados obtidos para as situações em que se atingiu o volume máximo do fermentador antes das 20 horas de simulação (corridas com diminuição de S_e e aumento do K_{La}). Nesta situação é significativa a superioridade de desempenho do controlador EDSO face ao controlador clássico PI.

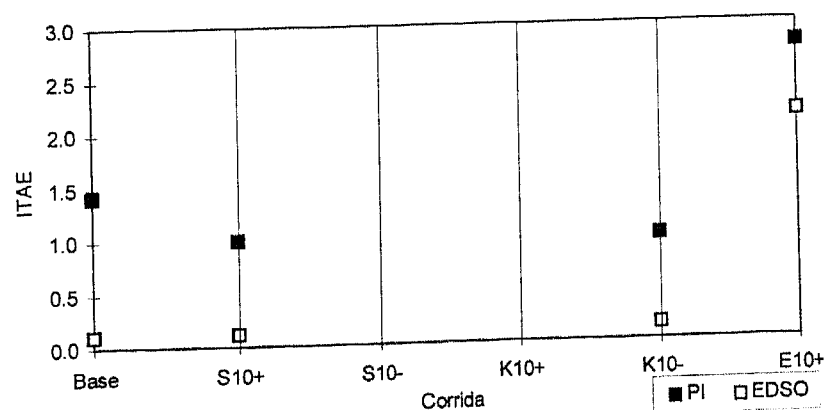


Figura 6.43 Valores de do critério ITAE obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com diferentes condições iniciais.

Introdução de ruído

A Figura 6.41 apresenta os valores do critério ITAE, produtividade e rendimento global obtidos nas corridas em ciclo fechado com introdução de ruído.

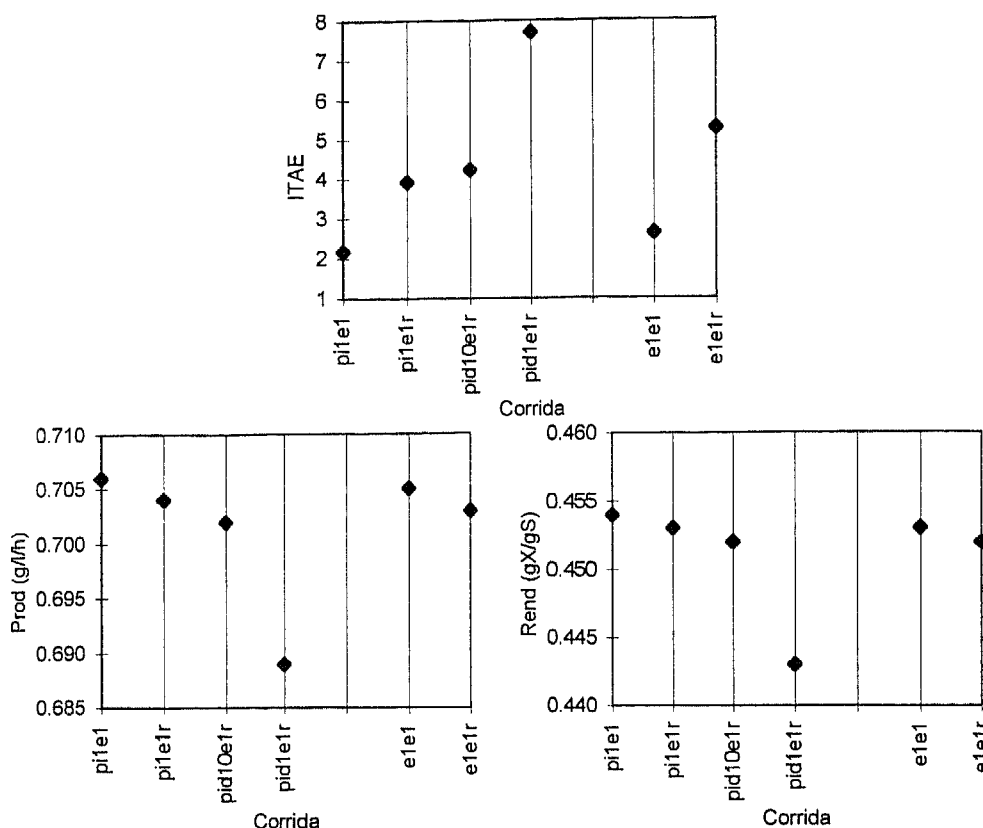


Figura 6.41 Valores de ITAE, produtividade e rendimento obtidos em ciclo fechado (PI e EDSO) para as corridas com introdução de ruído.

Compararam-se desempenhos do controlador clássico PI e dois tipos de PID (sintonização apresentada na Tabela 6.9) e do controlador EDSO.

É notório o fraco desempenho do controlador PID face ao obtido pelos dois outros algoritmos. Justifica-se, assim, a exclusão da acção derivativa no controlador clássico utilizado.

Utilização de diferentes condições iniciais

A Figura 6.42 apresenta os valores do critério produtividade e rendimento global para os resultados obtidos nas corridas com os valores iniciais da Tabela 6.7. Traçam-se os valores obtidos na corrida de base e nas corridas com introdução de perturbações positivas e negativas e alteração do valor de referência para 0.75 g/l; todas as alterações ocorrendo às 10 horas. Os resultados obtidos em termos de produtividades e rendimentos são análogos para os dois controladores.

Conclusão

Finalmente, e em forma de conclusão, é de reter os seguintes pontos:

- o controlador EDSO elimina completamente a perturbação de modo a manter inalterado o perfil da variável controlada;
- o controlador EDSO apresenta globalmente, para as várias situações estudadas um melhor desempenho. Isto é, e referindo a análise para a utilização de diferentes condições iniciais, o controlador PID obrigaria a uma nova sintonização para melhorar os resultados obtidos;
- o controlador PID poderá apresentar um comportamento deficiente, isto é, poderá ocorrer que a válvula abra mesmo que a variável controlada esteja ainda acima do valor de referência.

6.6 Resultados experimentais

Apresentam-se, neste ponto, os resultados experimentais obtidos nas corridas em ciclo fechado. Testaram-se os algoritmos PI e EDSO, sintonizados por simulação. O objectivo de controlo foi, também neste caso, manter a concentração de etanol dissolvido em 0.5 g/l. Testou-se o desempenho dos controladores face à introdução de perturbações (alteração da velocidade de agitação) e variação do ponto de referência.

As experiências EXPA07 e EXPA08 dizem respeito ao teste do algoritmo adaptativo EDSO. As fermentações EXPA11 e EXPA12 referem-se ao mesmo controlador mas com alterações, respectivamente, no valor de referência da variável controlada, etanol, e na velocidade de agitação. O controlo PID foi testado nas corridas EXPA10, EXPA14 a EXPA16. Nestas três últimas partidas introduziram-se variações na referência e na velocidade de agitação. Em todas as fermentações foi utilizada glucose pura.

O controlo adaptativo EDSO foi, também, testado em fermentações em regime de alimentação de melaços (EXPE01, EXPE03 e EXPE04).

Para detalhes referentes a cada experiência sugere-se a consulta da Tabela 3.12.

Para não se tornar fastidioso para o leitor, seleccionaram-se algumas fermentações para traçado gráfico, apresentando-se as restantes apenas em termos de critérios de avaliação.

6.6.1 Aspectos práticos de implementação

Em termos de medições necessárias ao algoritmo de controlo, o controlador PID necessita apenas da medida de etanol dissolvido. Esta é determinada pelo sensor de etanol, após calibração prévia no início de cada fermentação.

Os algoritmos de controlo adaptativo necessitam, além da medida de etanol, das taxas de transferência gasosa de oxigénio e dióxido de carbono e da concentração de substrato na corrente de alimentação. Esta última é introduzida pelo utilizador no ficheiro de configuração de variáveis, *confl.var*; as taxas de transferência gasosa são obtidas pela análise dos gases de saída e segundo equações apresentadas na capítulo 5, no parágrafo 5.6.1. De salientar que, estes algoritmos são escritos em função da taxa de diluição. O actuador, a bomba peristáltica, actua em caudais volúmicos. É necessário, então, converter a taxa de diluição em caudal de alimentação, multiplicando a primeira pelo volume do reactor. Este é obtido segundo equação apresentada, também, no parágrafo 5.6.1.

Para ambos os controladores, os valores iniciais das variáveis, valores de referência, bem como os respectivos parâmetros característicos são fornecidos pelo utilizador.

A actuação no elemento final de controlo, a bomba peristáltica, é efectuado do seguinte modo. O valor do caudal, obtido por imposição do perfil ou pelos algoritmos de controlo, é convertido num valor em tensão eléctrica, por calibração prévia da bomba para a tubagem utilizada. O sinal em Volt é posteriormente convertido em bits (0-4095), também por calibração prévia da interface AD/DA. Este valor em bit é enviado, através da rotina de comunicações, para a interface. Esta opção de realizar duas curvas de calibração, em vez de realizar apenas uma calibração directa caudal-bits, teve como finalidade isolar o protocolo de comunicação com a placa analógica. Se houver necessidade de mudar a placa ou a bomba, realiza-se apenas uma das calibrações.

6.6.2 Experiências com controlo PID

Realizaram-se experiências com o controlador PID. Como previsto, os resultados obtidos foram francamente maus, pelo que se dispensa o seu traçado gráfico. Apresentam-se os perfis obtidos nas fermentações com o algoritmo de controlo PI.

Fermentação EXPA14

A Figura 6.44 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA14. Os parâmetros do controlador utilizados foram: $K_c = 1 \text{ lh}^{-1}/\text{gl}^{-1}$ e $\tau_i = 0.5 \text{ h}$.

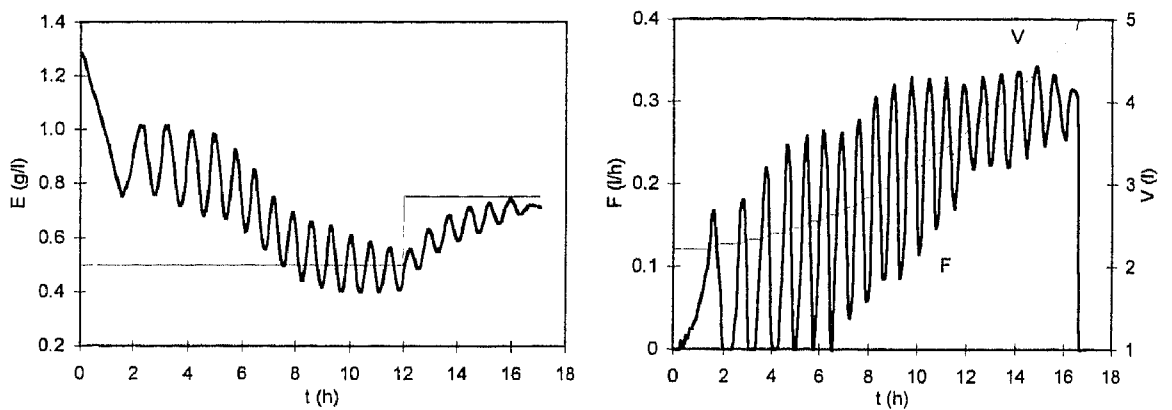


Figura 6.44 EXPA14 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nesta experiência testou-se o desempenho do controlador face à introdução de uma alteração do ponto de referência para 0.75 g/l, às 12 horas. A variável controlada demonstrou acompanhar essa alteração, mas apresentando em toda a corrida uma evolução oscilatória. De facto, e como já testado em simulação, a válvula de controlo abre, mesmo que a variável controlada esteja a níveis superiores ao de referência. A sintonização do controlador, que em simulação apresentou um bom desempenho, aparenta ser deficiente nas corridas experimentais, havendo um excesso de acção integral.

Fermentação EXPA15

A Figura 6.45 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA15. Mantiveram-se os parâmetros de controlo da fermentação anterior.

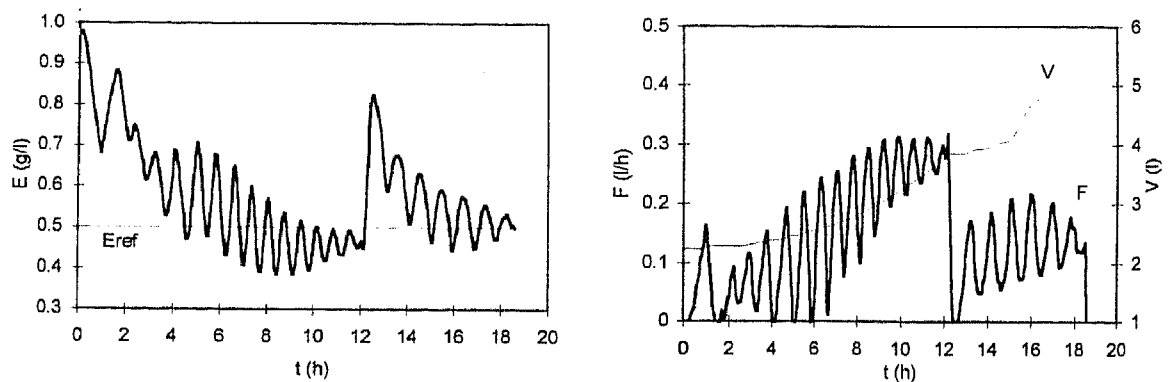


Figura 6.45 EXPA15 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nesta experiência testou-se o desempenho do controlador face à introdução de uma perturbação. Às 12 horas, foi reduzida a metade, a velocidade de agitação do fermentador. O controlador sentiu essa alteração mas conseguiu forçar a variável controlada para o ponto estabelecido, mas mantendo sempre, em toda a corrida, um perfil oscilatório.

Fermentação EXPA16

A Figura 6.46 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA16. Como nas experiências anteriores foi apontado uma acção integral forte utilizou-se, neste caso, os parâmetros $K_c = 1 \text{ lh}^{-1}/\text{g l}^{-1}$ e $\tau_i = 2.5 \text{ h}$. Não se aumentou ainda mais este último valor de modo a não se verificar a existência de desvio final em relação à referência.

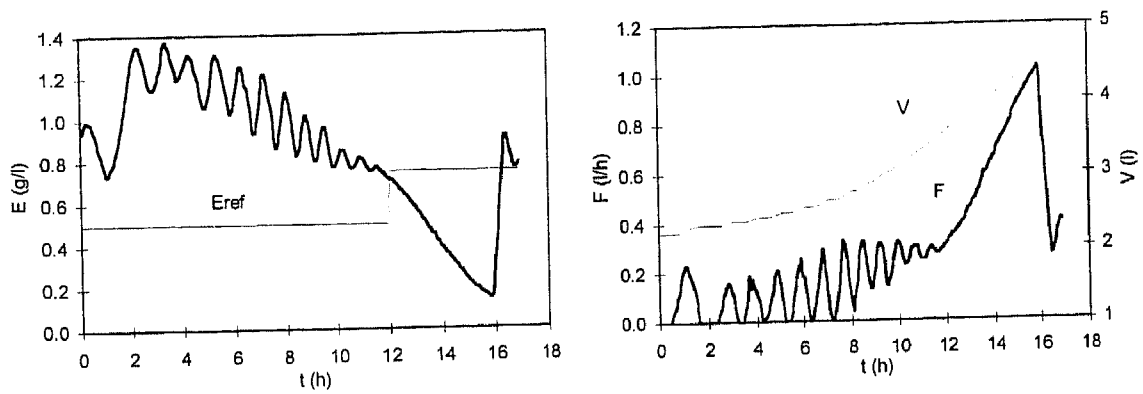


Figura 6.46 EXPA16 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nesta experiência testou-se o desempenho do controlador face à introdução de uma alteração do ponto de referência para 0.75 g/l, às 12 horas. O controlador não conseguiu acompanhar esta alteração, e mantendo ainda, em toda a corrida, uma evolução oscilatória.

6.6.3 Experiências com controlo EDSO

Os parâmetros do controlador EDSO implementado foram os utilizados nas corridas de simulação.

Fermentação EXPA07

A Figura 6.47 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA07.

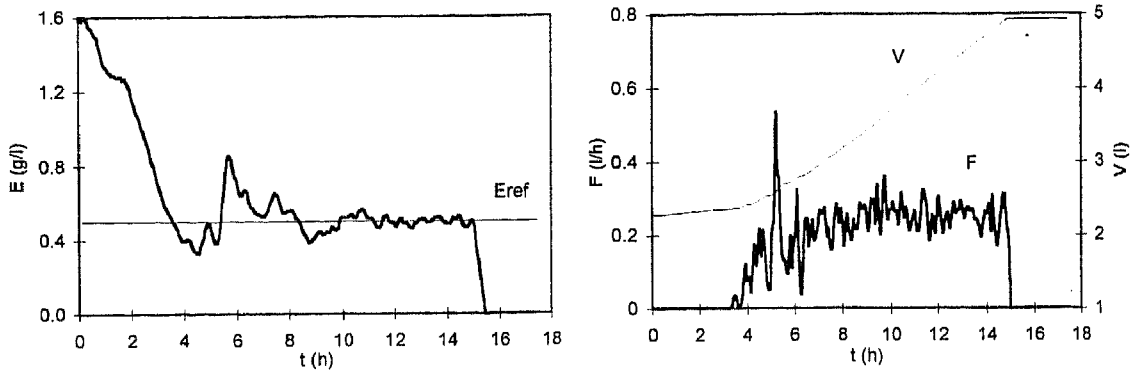


Figura 6.47 EXPA07 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nas primeiras três horas, o controlador esteve desligado, uma vez que a concentração de etanol estava acima do valor de referência. Após esta fase, o controlador mantém eficazmente o ponto de referência. Cerca das 15 horas foi atingido o volume máximo do fermentador, desligando-se a bomba peristáltica. Não havendo alimentação, o etanol é consumido.

Fermentação EXPA08

A Figura 6.48 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA08.

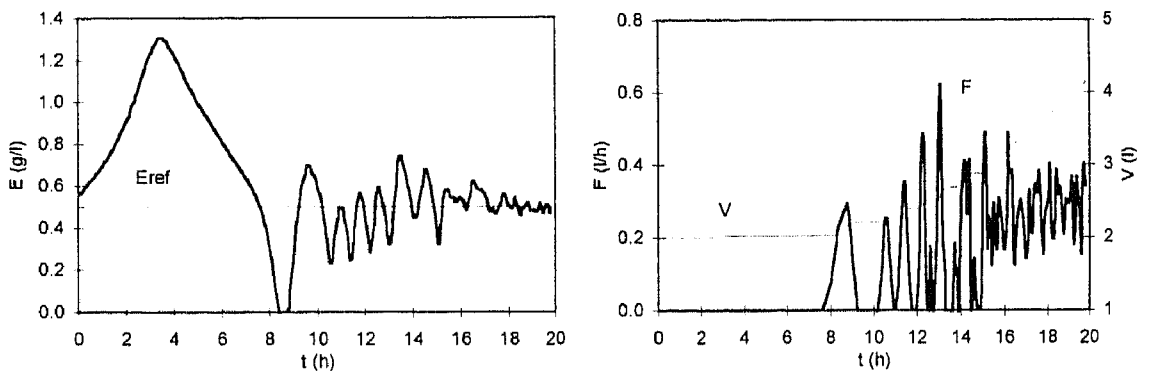


Figura 6.48 EXPA08 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

O desempenho do controlador foi inferior ao da experiência anterior apresentando um comportamento oscilante. O facto de nas primeiras 4 horas a concentração de etanol aumentar é devido a existir, no início da experiência, uma concentração elevada de glucose (2.3 g/l).

Fermentação EXPA11

A Figura 6.49 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA11.

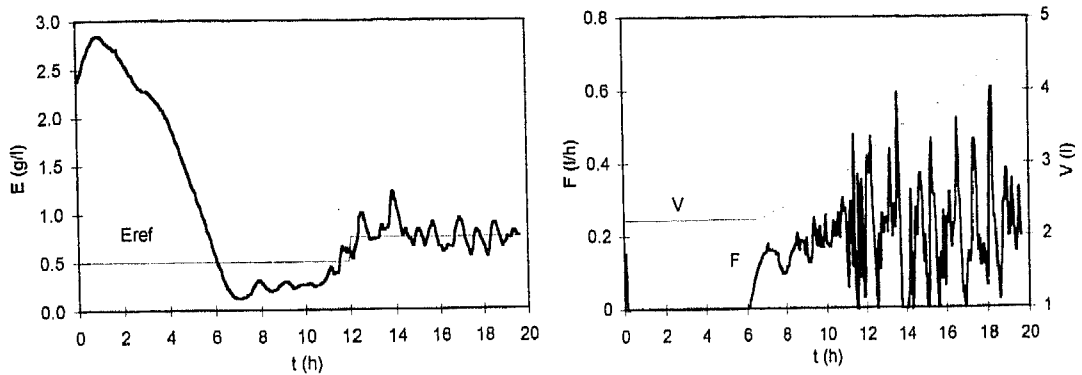


Figura 6.49 EXPA11 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Trata-se de uma fermentação em que houve alteração do ponto de referência para 0.75 g/l às 12 horas. O controlador acompanhou este aumento da referência.

Fermentação EXPA12

A Figura 6.50 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPA12.

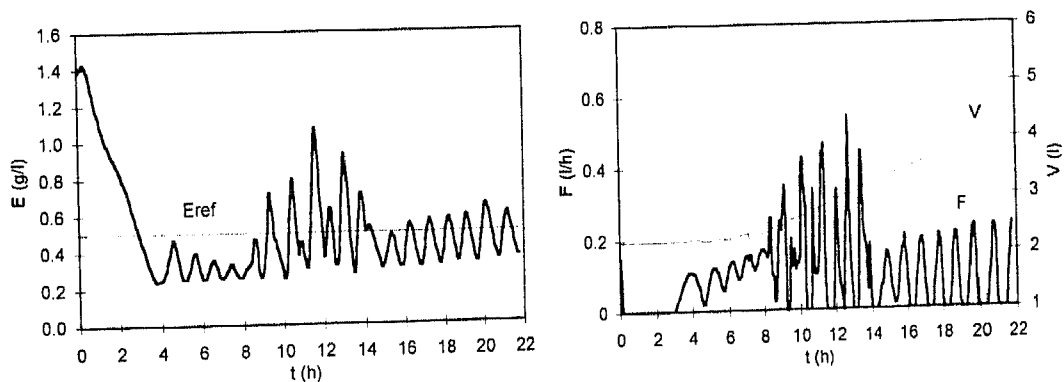


Figura 6.50 EXPA12 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Trata-se de uma experiência em que se introduziu uma perturbação às 14 horas: reduziu-se a velocidade de agitação para metade - 250 rpm. Nesta experiência, o desempenho do controlador foi menos eficiente por razões que se desconhecem.

6.6.3.1 Fermentações em regime de alimentação de melaços

As experiências apresentadas de seguida decorreram em regime de alimentação de melaços. Pretendeu-se testar nestas fermentações o desempenho do controlador EDSO sem

antecipação. Assim, a concentração de substrato na corrente de alimentação passada à rotina de controlo foi de 25 g/l, enquanto que a concentração real era de 13 g/l. Testou-se, também, a influência da introdução de perturbações e a alteração do ponto estabelecido.

Fermentação EXPE01

A Figura 6.50 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPE01.

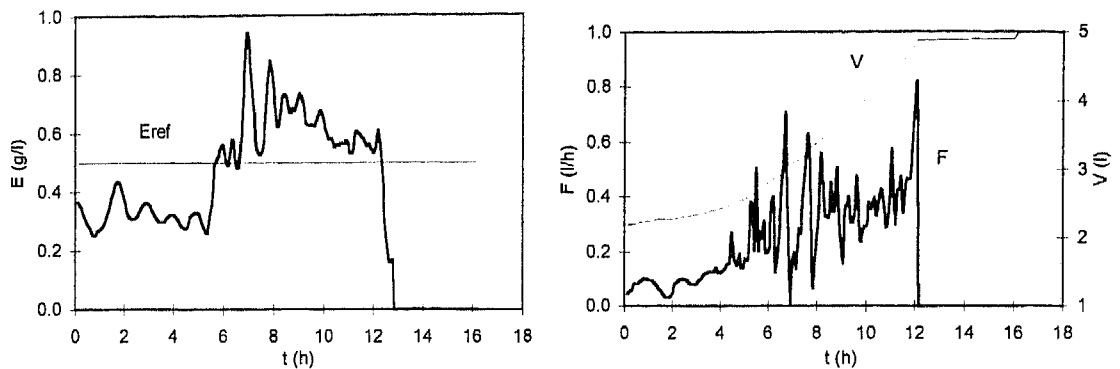


Figura 6.51 EXPE01 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

O controlador teve dificuldade em manter a variável controlada no ponto estabelecido, apresentando durante toda a corrida um comportamento oscilatório.

Fermentação EXPE04

A Figura 6.52 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPE04. Tratou-se de uma fermentação com introdução de uma carga: às 12 horas foi reduzida a metade a velocidade de agitação do fermentador.

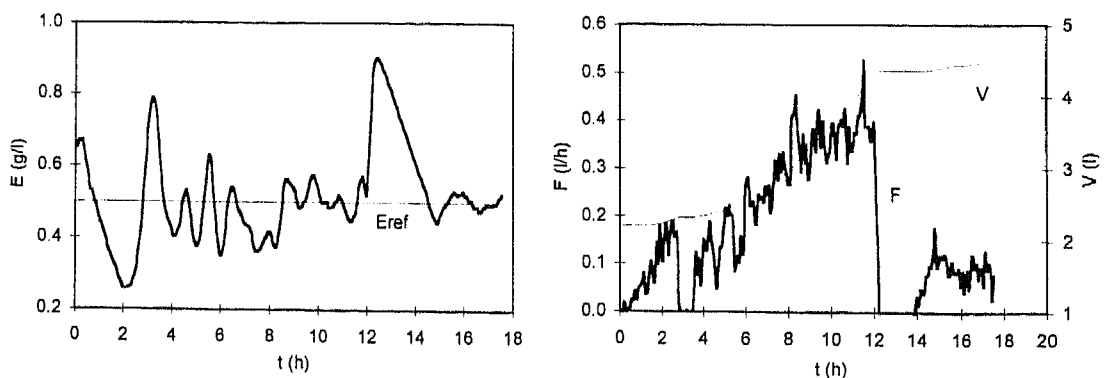


Figura 6.52 EXPE04 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

O controlador apresentou um comportamento oscilatório, foi sensível à introdução da perturbação, mas conseguiu eliminá-la.

Fermentação EXPE03

A Figura 6.53 apresenta os perfis de etanol e caudal de alimentação para a EXPE03. Introduziu-se uma alteração da referência para 0.75 g/l, às 10 horas.

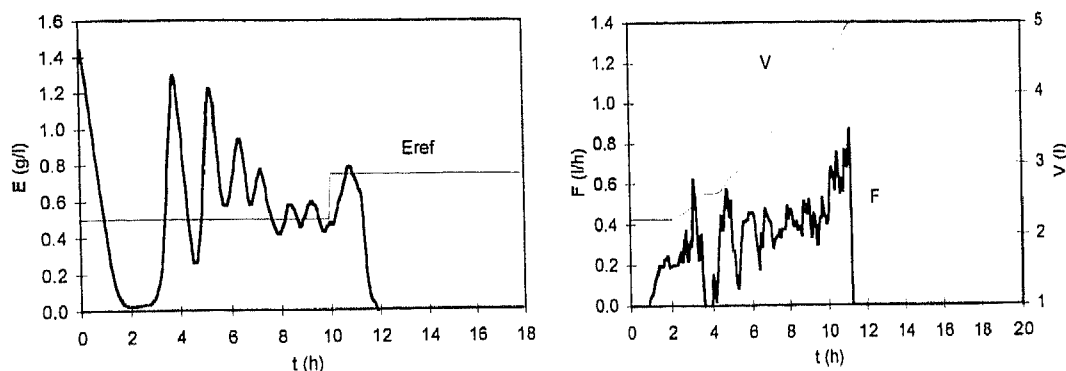


Figura 6.53 EXPE03 - perfis de etanol e caudal de alimentação.

Nesta fermentação, desligou-se o cabo de comunicação da bomba para accionar a entrada de alimentação, durante as primeiras 2 horas. A finalidade foi testar o modo como o controlador reagia a este tipo adicional de perturbação. O caudal de alimentação continuou a ser calculado pela rotina de controlo só que não era passado nenhum sinal à bomba. O controlador provocou oscilações iniciais na variável controlada, conseguiu manter-se no nível pretendido, 0.5 g/l, e aquando da mudança do ponto estabelecido houve uma evolução para esta nova situação, só que se atingiu o volume máximo do fermentador e parou-se a alimentação.

6.6.4 Comparação de desempenho de controladores

Tal como efectuado nos estudos de simulação faz-se uma análise comparativa do desempenho dos controladores testados experimentalmente. Também aqui, a comparação é feita em termos do critério do integral do erro, ITAE, e dos valores de produtividade e rendimento global obtidos nas diversas corridas.

A Tabela 6.15 apresenta os valores destes critérios obtidos não só nas corridas efectuadas em ciclo fechado, mas também, noutras corridas efectuadas em malha aberta, segundo alimentação pré-definida. Estas experiências foram incluídas para comparar resultados obtidos experimentalmente nas duas configurações. De salientar que, os resultados obtidos nalgumas experiências que figuram na tabela não foram apresentados no

decorrer do texto. O objectivo é utilizá-las como termo de comparação de desempenho no âmbito destes critérios.

Tabela 6.15 Caracterização de experiências

Experiência	F (l/h)	Prod (g/l/h)	Rend (gX/gS)	ITAE	Observações
EXPA01	Pgm	0.56	0.43		Ciclo Aberto
EXPA02	Pgm	0.56	0.45		Ciclo Aberto
EXPA04	Pgm	0.38	0.37		Ciclo Aberto
EXPA09	Pgm	0.27	0.27		Ciclo Aberto
EXPA03	0.15	0.77	0.49		Ciclo Aberto
EXPA07	EDSO	0.87	0.61	25.9	
EXPA08	EDSO	0.81	0.44	24.4	
EXPA11	EDSO	0.81	0.47	41.4	Eref a +50%
EXPA12	EDSO	0.89	0.49	20.8	rpm a -50%
EXPA10	PID	0.55	0.32	281.0	
EXPA14	PI	0.83	0.47	18.3	Eref a +50%
EXPA15	PI	0.76	0.56	11.9	rpm a -50%
EXPA16	PI	0.83	0.30	55.4	Eref a +50%
EXPE01*	EDSO	0.63	0.72	35.6	
EXPE03*	EDSO	0.73	0.71	64.3	Eref a +50%
EXPE04*	EDSO	0.64	0.77	12.4	rpm a -50%

* Experiências em regime de alimentação de substratos mistos.

A Figura 6.54 e Figura 6.55 apresentam graficamente os valores de produtividades e rendimentos da Tabela 6.15.

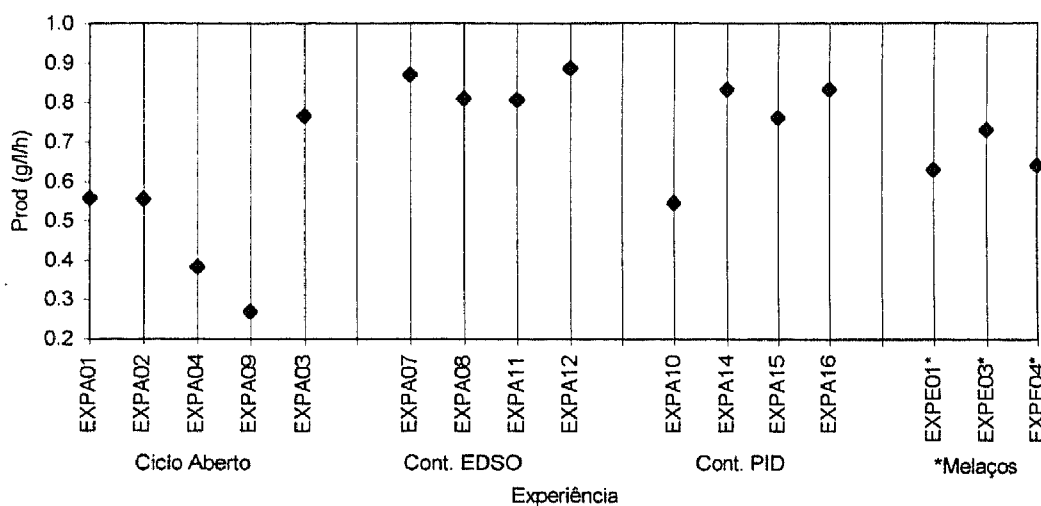


Figura 6.54 Produtividades das experiências EXPA e EXPE

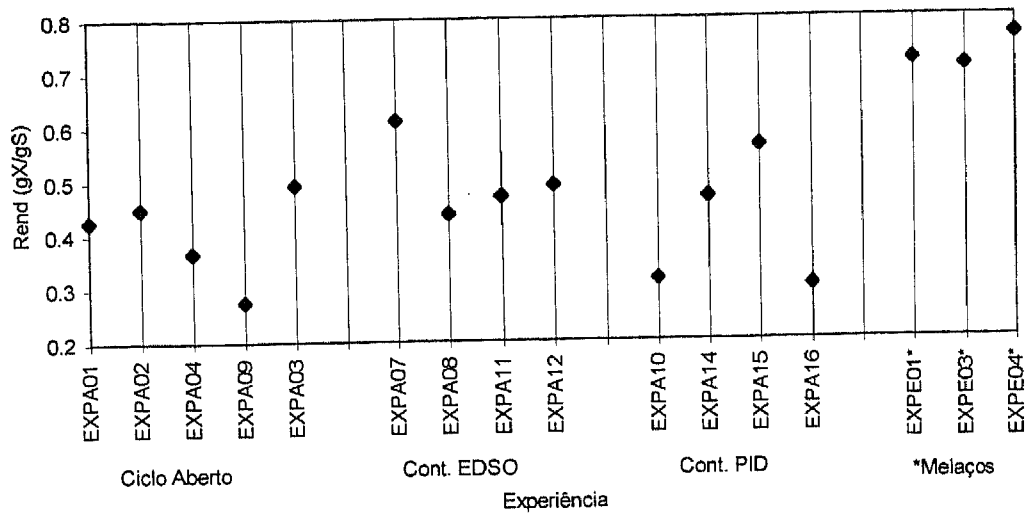


Figura 6.55 Rendimentos das experiências EXPA e EXPE

Pela análise das figuras várias conclusões poderão ser tiradas:

Ciclo aberto/ciclo fechado

Como já foi discutido anteriormente, a produtividade obtida em malha fechada é superior ao correspondente esquema sem algoritmo de controlo automático. Em relação aos valores do rendimento global, pode ocorrer, como é o caso, experiências em que os resultados em malha aberta sejam superiores aos do sistema controlado. Como também já visto em simulação, tudo depende da quantidade total de substrato adicionada à fermentação. De modo a manter os níveis estabelecidos, poderá haver necessidade de fornecer maior quantidade de substrato e portanto, parte dele ser redireccionado na produção de etanol, baixando, como consequência, o rendimento.

Controladores PID/EDSO

O desempenho do controlador PID é nitidamente inferior ao do controlador EDSO. Na globalidade de experiências, o controlador EDSO apresentou resultados mais favoráveis que o PI, em termos destes dois critérios.

Em termos de perfis da variável controlada, o controlador EDSO conseguiu comportamentos menos oscilantes e mais robustos à introdução de perturbações e variação da referência.

Controlo EDSO sem antecipação

O desempenho do controlador EDSO sem antecipação (correspondente às experiências EXPE em regime de alimentação de melaços) é inferior ao emprego do algoritmo com antecipação. Em todas as corridas efectuadas, embora a variável controlada tenha conseguido seguir o ponto estabelecido, apresentou um comportamento oscilante durante a partida.

Em termos de produtividades os valores são inferiores aos das experiências EXPA. Isto é devido a haver uma adição de substrato inferior ao verificado nas outras experiências, dado que a concentração na corrente de alimentação é, neste caso, cerca de metade. Em relação ao rendimento global, foi superior às restantes fermentações. A razão é que nesta corrida como se adicionou menor quantidade de açúcares, eles foram utilizados na produção de biomassa e não na de etanol.

A Figura 6.56 apresenta os valores do critério ITAE obtidos nas corridas experimentais.

Optou-se por comentar os resultados obtidos em termos deste critério de avaliação de desempenho em separado, em virtude de ele apresentar uma particularidade. Contrariamente ao que acontecia nas partidas de simulação, as condições iniciais das variáveis não são as mesmas para todos os controladores. Na situação experimental, as condições iniciais são bastante diferentes de fermentação para fermentação. Em especial, as concentrações iniciais de açúcares e etanol são decisivas nesta avaliação. Senão vejamos. Se existe, inicialmente, bastante quantidade de açúcares no meio, mesmo que o controlo esteja fechado, a concentração de etanol aumenta. Este é o caso de algumas experiência com controlo EDSO. Tentar iniciar o controlo nas mesmas condições de estado é tarefa árdua e difícil de atingir, pelo que este critério deverá ser utilizado com cuidado na avaliação de desempenho dos controladores. Neste caso, optou-se por apresentar os valores obtidos para este critério nas várias fermentações, mas como elas se referem a condições iniciais diferentes, não é possível usá-lo numa análise comparativa conclusiva do desempenho dos controladores.

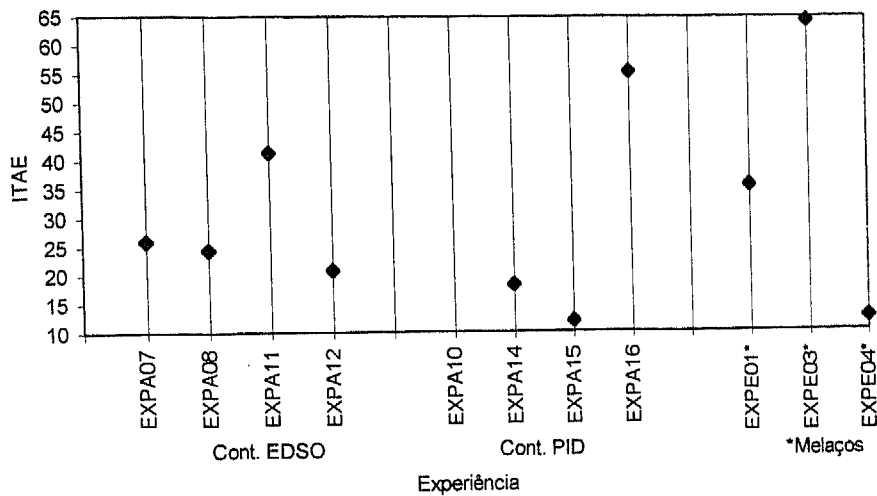


Figura 6.56 Critério ITAE para as fermentações em ciclo fechado.

6.7 Conclusões

Neste capítulo apresentaram-se os algoritmos de controlo estudados neste trabalho: o controlador clássico PID e o controlo adaptativo linearizante com e sem antecipação.

Foram realizados, primeiramente, diversos estudos por simulação, testando a robustez dos algoritmos à introdução de perturbações, à alteração do ponto estabelecido, à introdução de ruídos e à influência da mudança das condições iniciais. Os critérios utilizados foram o ITAE, produtividades e rendimento global.

Os resultados foram também validados experimentalmente, em fermentações em regime de alimentação de glucose e em fermentações em regime de alimentação de melaços.

Em termos gerais, e como conclusão, refere-se que o controlador adaptativo linearizante apresenta um desempenho superior ao oferecido pelo controlador clássico PID.

6.8 Bibliografia

- Anderson, B.D.O., Bitmead, R.R., Johnson, C.R., Kokotovic, P.V., Kosut, R.L., Mareels, I.M.Y., Praly, L., Riedle, B.D. *Stability of Adaptive Systems, Passivity and Averaging Analysis*. MIT Press, Cambridge MA, 1986.
- Åström, K.J. Theory and Applications of Adaptive Control - a Survey. *Automatica*, 19:5, 471-486, 1983.
- Åström, K.J., Wittenmark, B. *Adaptive Control*. Addison-Wesley, Reading, 1989.

- Bastin, G., Dochain, D. *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990.
- Besli, N., Türker, M., Gul, E. Design and Simulation of a Fuzzy Controller for Fed-batch Yeast Fermentation. *Bioprocess Engineering*, 13, 141-148, 1995.
- Bitmead, R., Gevers, M., Wertz, V. *Adaptive Optimal Control: The Thinking Man's GPC*. Prentice-Hall, New York, 1990.
- Boskovic, J., Narendra, K. Comparison of Linear, Non-linear and Neural-network-based Adaptive Controllers for a Class of Fed-batch Fermentation Processes. *Automatica*, 31:6, 817-840, 1995.
- Chen, L., Bastin, G., van Breusegem, V. A Case Study of Adaptive Nonlinear Regulation of Fed-Batch Biological Reactors. *Automatica*, 31:1, 55-65, 1995.
- Chtourou, M., Najim, K., Roux, G., Dahhou, B. Control of a Bioreactor using a Neural Network. *Bioprocess Engineering*, 8, 251-254, 1993.
- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Ferreira, E.C., Oliveira, F., Pimenta, P., Feye de Azevedo, S. Model-Based Identification and Control on Baker's Yeast Fed-Batch Fermentation. *6th European Congress on Biotechnology*, Florença, 1993.
- Goodwin, G.C., Sin, K.S. *Adaptive Filtering, Prediction and Control*, Prentice-Hall, 1984.
- Hunt, K., Sbarbaro, D., Zbikowski, R., Gawthrop, P. Neural Networks for Control Systems - A Survey. *Automatica*, 28:6, 1083-1112, 1992.
- Keulers, M. *Identification and Control of a Fed-Batch Process; Application to Culture of Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Doutoramento, Technische Universiteit Eindhoven, 1993.
- Konstantinov, K., Yoshida, T. Knowledge-based Control of Fermentation Process. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 479-486, 1992.
- Landau, I.D. *Adaptive Control - The Model Reference Approach*, Dekker, NY, 1979.
- Luyben, W.L., *Process Modeling, Simulation and Control for Chemical Engineers*, Mc Graw Hill, 1990
- Miller, W., Sutton, R., Werbos, P., *Neural Networks for Control*, The MIT-Press, Cambridge, MA, 1990.
- Muralikrishnan, G., Chidambaram, M. Control of Bioreactors using a Neural Network Model. *Bioprocess Engineering*, 12, 35-39, 1995.
- Narendra, K.S., Annaswamy, A.M. *Stable Adaptive Systems*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs NJ, 1989.
- Narendra, K.S., Parthasarathy, K. Identification and Control of Dynamic Systems using Neural Networks, *IEEE Trans. Neural Networks.*, 1, 4-27, 1990.
- Narendra, K.S., Parthasarathy, K. Gradient Methods for the Optimization of Dynamical Systems Containing Neural Networks, *IEEE Trans. Neural Networks.*, 2, 252-262, 1991.
- Oliveira, F. *Estudo Assistido por Computador da Dinâmica e do Controlo de Processos*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal, 1991.
- Park, Y.S., Shi, Z.P., Shiba, S., Chantal, C., Iijima, S., Kobayashi, T. Application of Fuzzy Reasoning to Control of Glucose and Ethanol Concentrations in Baker's Yeast Culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 649-655, 1993.
- Pomerleau, Y. *Modélisation et Contrôle d'un Procédé Fed-Batch de Culture des Levures à Pain (Saccharomyces cerevisiae)*. Dissertação de Doutoramento, Université de Montreal, 1990.

- Sastry, S., Bodson, M. *Adaptive Control. Stability, Convergence, and Robustness*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs NJ, 1989.
- Seborg, D.E., Edgar, T.F., Shah, S.L., Adaptive Control Strategies for Process Control: A Survey, *AIChE J.*, 32:6, 881-913, 1986.
- Seborg, D.E., Edgar, T.F., Mellichamp, D.A., *Process Dynamics and Control*. John Wiley, New York, 1989.
- Srinivas, M., Chidambaram, M. Fuzzy Logic Control of an Unstable Bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 12, 135-139, 1995.
- van Can, H., Braake, H., Hellings, C., Krijgsman, A., Verbruggen, H., Luyben, K., Heijnen, J.. Design and Real Time Testing of a Neural Model Predictive Controller for a Nonlinear System. *Chemical Engineering Science*, 50:15, 2419-2430, 1995.
- Waterworth, G., Swanick, B. Investigation into the Adaptive Control of a Fermentation Process. *Trans. Inst. MC*, 3:1, 39-56, 1981.
- Ye, K., Fujioka, K., Shimizu, K. Efficient Control of Fed-batch Yeast Cultivation based on Neural Network. *Process Control and Quality*, 5, 245-250, 1994.
- Zhang, X.-C., Visala, A., Halme, A., Linko, P. Functional State Modeling and Fuzzy Control of Fed-batch Aerobic Baker's Yeast Process. *J. Biotechnol.*, 37, 1-10, 1994.

7. Conclusões e perspectivas futuras

No presente trabalho apresenta-se um estudo teórico e experimental sobre métodos com base em modelos para a análise e operação de bioreactores. O estudo engloba modelização e análise dinâmicas, métodos de monitorização e de estimativa de parâmetros e projecto de controlo. Utilizou-se o processo de produção de fermento de padeiro como veículo para os estudos experimentais, os quais incluem a utilização de meios (alimentação) semi-sintéticos e de meios industriais.

A instalação experimental, apresentada detalhadamente no capítulo 3, encontra-se no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Engloba um fermentador de cinco litros, equipado com sensores para medição em linha das variáveis ambientais, nomeadamente, a temperatura e o pH, e das variáveis de estado, concentração de oxigénio e etanol dissolvidos. Através da unidade de controlo digital directo é feito o controlo local das variáveis velocidade de agitação, arejamento, temperatura e pH. A esta unidade está ligado, via porta série, um computador de monitorização e controlo. A instalação dispõe, também, de um espectrómetro de massa para análise dos gases de saída do fermentador. O estabelecimento da acção de controlo das variáveis de saída é efectuado através de bombas peristálticas. Para a recolha de amostras do fermentador está disponível um colector automático, programado para a recolha de amostras com volumes e a tempos pré-definidos.

Desenvolveu-se e validou-se experimentalmente, um modelo teórico para estudo do processo de produção do fermento de padeiro, em meios semi-sintéticos e industriais. Este passo envolveu uma análise de sensibilidade, que apontou como sensíveis os parâmetros cinéticos de consumo máximo de glucose e de oxigénio, e a consequente aplicação de técnicas clássicas de estimativa de parâmetros por regressão não-linear. Nos estudos com melaços assumiu-se nos modelos teóricos um modelo dito de 'substrato concentrado'. Considerou-se como composição de substrato, a soma dos açúcares presentes em solução,

não se distinguindo consumos parciais de cada um dos açúcares. Esta hipótese foi verificada e considerada válida.

A análise efectuada do problema da modelização de processos de fermentação leva a concluir que este problema deva ser encarado de forma diversa relativamente à abordagem mecanística clássica. A inerente variabilidade do comportamento dos microorganismos leva à necessidade de captura de conhecimento do processo, o qual pode ser encarado como 'conhecimento escondido'. A utilização crescente de métodos que combinam a aproximação mecanística com métodos da área da Inteligência Artificial, é apontada como a solução destes problemas.

Problemas chave na análise de processos de fermentação são a dificuldade de medições fiáveis em-linha das variáveis relevantes no processo e a bem conhecida incerteza nos modelos cinéticos de crescimento dos microorganismos.

No presente trabalho exploraram-se, teórica e experimentalmente, métodos de estimação do estado baseados nos algoritmos propostos por Bastin e Dochain (1990). Assume-se uma redução do modelo, com base na ocorrência em simultâneo de apenas duas cinéticas de crescimento: o modelo respirativo, em que há consumo de açúcar e etanol para produzir biomassa e o modelo respiro-fermentativo, em que há consumo de açúcar para produção de biomassa e de etanol. No primeiro caso a taxa de crescimento reductivo em substrato é nula e no segundo, é nula a taxa de crescimento oxidativo em etanol. O algoritmo necessita da medição em-linha de duas variáveis de estado e do valor das taxas de transferência gasosa de oxigénio e de dióxido de carbono. As medidas disponíveis em-linha na fase líquida são o oxigénio, o dióxido de carbono (por cálculo através da análise da fase gasosa) e o etanol. Estudaram-se em simulação e em laboratório as três combinações possíveis: o par oxigénio/dióxido de carbono, o par etanol/oxigénio e o par etanol/dióxido de carbono. Com estas medidas é possível observar todo o estado assim com as cinéticas de crescimento. Em simulação, os resultados apontam para um bom desempenho dos estimadores. Na validação experimental, a situação é um pouco diferente. Provou-se a extrema sensibilidade do método face a erros nas medições, em especial no cálculo das taxas de transferência gasosa, e a erros nos valores iniciais a serem fornecidos ao estimador. Propõe-se a introdução de um factor correctivo α na expressão de cálculo da taxa de transferência gasosa de oxigénio por balanço à fase gasosa. O parâmetro foi sintonizado por tentativa e erro para as

experiências analisadas e provou-se o superior desempenho dos estimadores nas partidas em que a expressão de cálculo à fase gasosa, para o oxigênio, incluía este parâmetro.

Em relação ao controlo, estudaram-se, teórica e experimentalmente, algoritmos não-lineares com base em modelos (algoritmos adaptativos linearizantes), em oposição e comparação com o controlador clássico PID. As configurações de controlo foram primeiro testadas em simulação, comparando-se o desempenho em diversas situações de condições iniciais, de alteração da referência, de introdução de cargas ou de ruídos, e foram posteriormente validadas em laboratório. O controlador PID implementado foi a versão digital de velocidade modificada. O controlador não-linear baseou-se no algoritmo com base em modelos reduzidos de Bastin e Dochain, com adaptação de parâmetros seguindo uma dinâmica de segunda ordem. Os resultados apontam para uma maior robustez e desempenho mais favorável do algoritmo adaptativo. Os critérios utilizados na avaliação de desempenhos foram o critério do integral pesado do erro absoluto e os valores de produtividade e rendimento global. Os valores obtidos nestes dois últimos critérios para as duas estratégias não apresentaram diferenças significativas. Aquando da introdução de cargas, como por exemplo alteração do coeficiente global de transferência de massa (que se manifesta em termos experimentais por uma alteração da velocidade de agitação e/ou do arejamento), o controlador adaptativo reage de modo a que a variável controlada nem sofra o efeito dessa mudança; o controlador PID, embora consiga ao fim de um certo tempo anular o efeito da carga, não deixa que a variável de saída seja alterada momentaneamente. O efeito da adaptação de parâmetros do controlador adaptativo torna-o mais eficiente, mesmo em situações diversas das utilizadas na sintonização.

Como particularidade, é de referir a não aplicabilidade do critério ITAE nas corridas experimentais. Isto porque ele deverá ser aplicado a corridas em condições iniciais idênticas. Ora em laboratório é difícil, para não dizer impossível, repetir uma fermentação nas mesmas condições iniciais.

Como ferramentas de base ao estudo efectuado desenvolveram-se programas para monitorização e controlo em-linha do processo e programas para simulação em tempo diferido.

Assim, o programa *Monitor*, desenvolvido em *Visual Basic 3.0*, correndo em ambiente *Windows*, é responsável pelas funções de aquisição e tratamento de dados, via porta RS232, interface AD/DA e protocolo de comunicações entre programas em ambiente *Windows*, e,

também, detém as funções de implementação em-linha de técnicas de estimativa de estado e de cinéticas e de diferentes algoritmos de controlo.

Para estudos de simulação, desenvolveram-se três programas em *Fortran 77*, num computador *Vax 6520/2VP*, com sistema operativo *Ultrix V4.2.*, com os objectivos a seguir apresentados. O programa *Opt* foi desenvolvido para estudos em simulação do processo de crescimento da levedura e validação do modelo teórico com dados experimentais, empregando uma rotina de optimização de parâmetros. O programa *Sim* foi desenvolvido para estudos de simulação e teste dos algoritmos de estimativa do estado e de parâmetros e de técnicas de controlo clássicas e adaptativas. O programa *SimExp* tem as mesmas funções do *Sim*, mas utiliza as medidas experimentais. É utilizado para validação de algoritmos e técnicas diferentes das utilizadas em-linha, sem perda de rigor e de conceito de validação experimental. Estes três programas, em conjunto, constituem um pacote para análise detalhada da fermentação em estudo.

□

Em relação a trabalho futuro é de apontar:

- a exploração de métodos com base em modelos híbridos, para a análise dos processos e para a sua operação;
- a afinação da técnica de determinação da fase gasosa, nomeadamente o cálculo das taxas de transferência para o oxigénio e o dióxido de carbono, de modo a se obter um desempenho superior do estimador;
- a realização de experiências utilizando um sensor de etanol de membrana mais fina, de modo a diminuir o seu tempo de resposta;
- nas experiências com melaços, desenvolver um modelo tendo em linha de conta os diversos açúcares presentes em solução e comparar com a hipótese considerada neste trabalho;
- melhorar a plataforma experimental, nomeadamente projectando um computador de supervisão.

Apêndices

- A.1. Técnica de manipulação da estirpe
 - A.2. Operação da unidade de fermentação
 - A.3. Métodos e técnicas de análise em-linha
 - A.4. Métodos e técnicas de análise em diferido
 - A.5. O programa *Monitor*
 - A.6. Programas para estudos em tempo diferido
 - A.7. Estudos adicionais da estimativa de estado e de parâmetros
 - A.8. Controlo adaptativo - estimador de dinâmica de segunda ordem
-

A.1. Técnica de manipulação da estirpe

A.1.1 Protocolo de activação da estirpe

O procedimento adoptado para activação da estirpe liofilizada foi o seguinte:

- Lavar a ampola com álcool;
- Com uma serra cortar a ampola na zona da marca;
- Tirar a parte superior da ampola para posterior esterilização;
- Com uma pipeta Pasteur adicionar 0.5 ml de YEPD (Difco) ao material seco;
- Com cuidado, ressuspender a cultura e transferir para um recipiente com o mesmo meio;
- Incubar a 30 °C durante, pelo menos, 5 dias;
- Plaqueamento em YEPD Agar (caixas de Petri) a 30 °C, durante 48 h;
- Semear em YEPD Agar, em caixas de Petri, uma colónia característica e representativa da cultura;
- A partir desta última placa semear vários tubos com agar inclinado (YEPD), os quais foram, posteriormente, utilizados para iniciar as culturas.

A.1.2 Preservação da estirpe

Neste momento, a estirpe é conservada de três modos diferentes: congelada em arca frigorífica a -80 °C (com o objectivo de preservação a longo prazo), no frigorífico em tubos inclinados rolhados (para preservação a médio prazo) e, também no frigorífico, em tubos inclinados, ditos de trabalho (para utilização diária).

A.1.2.1 Congelação a -80 °C

O material e reagentes necessários no processo de congelação a -80 °C são:

- 10 tubos de ensaio rolhados pequenos;

- uma pipeta automática de 1 ml;
- 12 pontas de 1 ml esterilizadas;
- 1 pipeta volumétrica de 1 ml;
- glicerol;
- meio de cultura inoculado após uma noite’.

Entende-se por ‘meio de cultura inoculado após uma noite’ o produto final de uma fermentação em matraz que decorreu durante cerca de 18 horas usando o meio de cultura referido no capítulo 3 (concentração de glucose 30-40 g/l).

Em dez tubos de ensaio rolhados coloca-se 1 ml de glicerol (deve pipetar-se com a pipeta volumétrica ao contrário, pois o glicerol é muito viscoso); fecham-se e levam-se à estufa a 160 °C durante uma hora para esterilizar. Pipeta-se 1 ml do matraz de fermentação e introduz-se nos frascos. Esta operação é efectuada à chama. Fecham-se e colocam-se na arca congeladora a -80 °C.

A.1.2.2 Conservação em frigorífico

Em relação à conservação da estirpe no frigorífico, o método de operação é igual nos dois casos, a qualidade dos tubos é que difere. Assim, os tubos inclinados rolhados e apertados com *parafilm* permitem conservar a estirpe durante mais tempo, por exemplo, repicagens anuais. Como estão fortemente rolhados a desidratação é menor, assim como diminui o perigo de contaminação. Os tubos de trabalho são tubos de ensaio tapados com rolha de algodão e gaze. Passa-se a descrever o processo de preservação da estirpe no frigorífico.

Preparam-se x ml de YM Agar (Difco Laboratories, EUA) num frasco rolhado com uma concentração de 41 g/l - por cada tubo de ensaio são necessários 5 ml de agar. Para fundir o agar, leva-se ao microondas, fechando-se mal o frasco. Agita-se e leva-se novamente ao microondas até dissolução completa. Pipetam-se 5 ml para cada tubo de ensaio, os quais são rolhados e colocados num gobelé. Este último é coberto com papel de embrulho e com papel de alumínio e leva-se a autoclave à 121 °C durante 20 minutos para esterilizar.

Depois de esterilizados, inclinam-se os tubos na bancada de trabalho para permitir a solidificação do agar. Quando o agar solidificar, riscar à chama, com uma ansa, com a estirpe a preservar (usar um tubo já preparado). Coloca-se na estufa a 30 °C de um dia para

o outro. Guarda-se, depois, no frigorífico, devidamente identificado com o nome da estirpe e do autor, o meio de cultura utilizado e a data.

A.2. Operação da unidade de fermentação

Para clareza na enumeração de procedimentos a efectuar opta-se por uma apresentação tipo 'receita' de passos a seguir.

A.2.1 Material e reagentes

<i>Materiais</i>	<i>Reagentes</i>
1 matraz de 3 l	KH_2PO_4
1 matraz de 500 ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1 espátula	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Papel de embrulho	Glucose/Melaços
Rolhas de algodão e gaze	Extracto de levedura
Pinças	NH_3
1 pipeta automática	H_3PO_4
1 matraz de 2 l	Água destilada
Gobelés 50 e 100 ml	<i>Slants</i> com aestirpe a utilizar
Papel de alumínio	
Elásticos	
10 pontas de 1 ml	
Tubos de silicone	

A.2.2 Preparação da fermentação

- No matraz de 3 l, preparar 3.0 l de meio de cultura para a alimentação de substrato com a composição referida no capítulo 3;
- No matraz de 500 ml, preparar 200 ml de meio de cultura para o inóculo (10% do volume inicial do fermentador) com a composição referida no capítulo 3;
- No matraz de 2 l, preparar 2.0 l de meio de cultura para o meio inicial do fermentador com a composição referida no capítulo 3;
- Ajustar o pH a 4.0 ± 0.1 com H_3PO_4 (umas gotas);

- e) Tapar o matraz do inóculo com rolha de algodão e gaze; colocar por cima da rolha papel de embrulho e papel de alumínio presos com um elástico;
- f) Rolhar o matraz da alimentação de substrato, introduzindo previamente o tubo para bombear o substrato no fermentador. Apertar o tubo com duas pinças, uma em cada extremidade; colocar uma ponta na extremidade exterior e tapá-la com algodão e papel de alumínio. Tapar a rolha com papel de embrulho e papel de alumínio;
- g) Calibrar os eléctrodos de pH, pO₂, e etanol (ver A.3.1 A.3.2);
- h) Colocar os 2 l de meio no fermentador. Adicionar umas gotas de anti-espuma ao meio de cultura antes de esterilizar. Introduzir os eléctrodos (excepto o sensor de etanol) e colocar o condensador. Fechar (apertar as roscas em cruz);
- i) Preparar a porta para a recolha de amostras: porta especial com o frasco de origem para a recolha manual;
- j) Preparar duas portas para ligação ao aparelho de recolha automática de amostras: uma para retirar meio do fermentador e outra para recircular o meio que vem do amostrador. Colocar, para tal, dois tubos de silicone;
- k) Preparar a porta especial para a adição de substrato, ácido, base. Colocar tubos de silicone nas quatro portas (uma está livre);
- l) Colocar um tubo de silicone na extremidade do condensador;
- m) Preparar a porta do arejamento introduzindo um tubo de silicone com um filtro de vidro cheio de algodão na outra extremidade; colocar uma pinça em cada ponta;
- n) Apertar todos os tubos de silicone com pinças (a do condensador não convém apertar demasiado) e tapar as respectivas extremidades com algodão e papel de alumínio;
- o) Colocar papel de alumínio nas pontas dos eléctrodos bem como no agitador;
- p) Verificar se está tudo bem fechado e apertado;
- q) Preparar um gobelé com 10 pontas azuis, fechado com papel de embrulho e alumínio presos com elástico (pontas utilizados na inoculação do matraz);
- r) Montar a cabeça do amostrador automático com os respectivos frascos e os tubos de silicone para a circulação de meio. Colocar pontas nas extremidades do tubos, tapá-las com algodão e papel de alumínio e apertar com pinças;
- s) Levar à autoclave para esterilizar durante 30 min a 121 °C o matraz para inoculação, o fermentador, o matraz com a solução de alimentação de substrato, a cabeça do amostrador com os respectivos frascos e o gobelé com pontas;
- t) Preparar o ácido (fosfórico) e a base (amoníaco). Quer o ácido quer a base são diluídos 3 vezes (150 ml de ácido/base e 300 ml de água destilada) em frascos rolhados, introduzindo os respectivos tubos de silicone para a bomba incorporada no DCU. Apertar as extremidades dos tubos com pinças. Não necessitam esterilização;
- u) Ligar o espectrómetro de massa com o filamento ligado e as válvulas fechadas para estabilizar durante a noite. Ligar, também, o caudalímetro mássico.

A.2.3 Arranque da fermentação

- a) Ligar a linha de frio;
- b) Retirar da autoclave o fermentador, a solução de alimentação de substrato, o matraz para o inóculo e o gobelé;
- c) Inocular o matraz: trabalhar junto à chama; usar 2 a 4 *slants* na inoculação consoante se pretenda um inóculo mais ou menos forte. Com a pipeta automática retirar uma ponta esterilizada do gobelé e pipetar do matraz 1 a 2 ml de meio de cultura; introduzir no *slant*, tapar e agitar. Verter o conteúdo do *slant* no matraz. Repetir o processo para os outros tubos de ensaio. Nunca pousar as rolhas na bancada durante a inoculação; prendê-las na mão. Em vez de se utilizar uma pipeta automática podem usar-se pipetas volumétricas esterilizadas de 2 ou 5 ml e uma *pompette* (embrulhar as pipetas em papel e levar à estufa a 160 °C durante 2 horas). **Nota:** para todas as fermentações partirem de *slants* com a mesma idade é necessário preparar novos *slants* sempre que se prepare uma fermentação (para preparação de tubos inclinados ver A.1.3);
- d) Agitar o matraz tendo o cuidado de não molhar a rolha;
- e) Deixar na incubadora orbital a 30°C e a 150 rpm durante 6 ou 16 h consoante objectivos propostos (ver capítulo 3);
- f) Preparar o fermentador:
 - ◇ ligar os eléctrodos (pH, pO₂) e o sensor de temperatura ao DCU,
 - ◇ ligar o condensador à linha de tratamento do gás de saída;
 - ◇ colocar os tubos de ácido e base nas respectivas bombas;
 - ◇ ligar o tubo de arejamento à unidade de controlo;
 - ◇ ligar os tubos de refrigeração quer do fermentador quer do condensador;
 - ◇ colocar os tubos do matraz da solução de alimentação de substrato na bomba doseadora e o matraz na balança;
 - ◇ à chama ligar os tubos de ácido, base, o tubo da solução de alimentação e os da circulação do colector de amostras às respectivas portas;
 - ◇ colocar o motor de agitação;
- g) Ligar o DCU. Ligar a agitação a 500 rpm. Accionar o controlo de temperatura a 30°C e ligar o arejamento a cerca de 3.5 slpm. Ligar a água para refrigeração. Deixar estabilizar;
- h) Enquanto o fermentador estabiliza calibrar o espectrómetro de massa (Apêndice A.3.4);
- i) Lavar o sensor de etanol com álcool e colocar um pouco de álcool numa das portas do fermentador. Introduzir rapidamente o sensor no fermentador. A estabilização do sinal do sensor de etanol ocorre durante 4-6 horas (durante o estágio da fermentação em matraz). **Nota:** apesar do sensor ser autoclavável, optou-se por esta solução por se pensar ser menos agressiva para a membrana;

- j) Ligar o computador central, a bomba doseadora e a balança;
- k) Após 4-6 horas inocular o fermentador à chama abrindo uma porta do fermentador e introduzir rapidamente o meio de cultura do matraz de inoculação;
- l) Deixar a fermentação decorrer em descontínuo durante cerca de 4-6 horas;
- m) Como a experiência demora cerca de 18 h, para que continue a decorrer durante a noite sem intervenção de um operador, programar o colector de amostras para a recolha de 1.5 a 1.5 horas (considera-se inoportuna a descrição do processo de programação dos tempos de recolha automática de amostras pelo que se dispensa a sua apresentação).

A.2.4 Arranque do programa *Monitor*

O programa *Monitor* (ver Capítulo 3 e Apêndice A.5) é inicializado aquando a fermentação semi-contínua, normalmente 4-6 horas após a inoculação do reactor.

Depois de iniciado o programa, deve abrir-se um novo ficheiro de trabalho, fornecendo o nome e preencher um cartão identificador da experiência (opção *File-New*).

De seguida, é necessária a leitura dos ficheiros de configuração do sistema - opção *Setup-Hardware*, *Variables*, *Instruments* ou *Setup-Defaults*, consoante o directório de trabalho.

Se se pretender, durante a experiência, observar o estado e estimar as cinéticas, seleccionar opção *Identification* e o algoritmo seleccionado para estudo.

Se se tratar de uma experiência de controlo, activar a opção *Control*, seguida do algoritmo a testar.

Para correr o programa, opção *Run*, activando ou não o bloco *Identification* e/ou *Control*.

A.2.5 Fim da fermentação

A.2.5.1 Desligar fermentador

O processo de desligar o fermentador consiste em:

- Desligar todos os ciclos de controlo digital directo - temperatura, arejamento, agitação e pH;
- Fechar a torneira de fornecimento de água da companhia para refrigeração do fermentador;
- Retirar os cabos dos eléctrodos e retirar todos os tubos de silicone;
- Desligar todos os equipamentos - DCU, bomba, balança, caudalímetro e espectrómetro de massa;
- Lavar eléctrodos e fermentador com cuidado e arrumar a bancada para uma nova experiência.

A.2.5.2 Desligar o programa *Monitor*

Para desligar o programa activar as opções *Run-End*, *File-Close* e *File-End*.

O programa produz um ficheiro de resultados ([nome].res), onde figuram as variáveis de interesse, pode ser facilmente importado no *Excel* para o traçado e análise do gráfico, ou para um programa de simulação.

A.2.5.3 Realização de análises em diferido

As amostras retiradas durante a noite são, então, analisadas.

Mede-se, inicialmente, a biomassa por espectrofotometria, a 620 nm (normalmente é necessário diluir a amostra). Centrifuga-se o resto da amostra durante 10 minutos, filtra-se com filtros de porosidade 0.45 μm e congela-se para analisar posteriormente os açúcares e etanol por HPLC.

A.3. Métodos e técnicas de análise em-linha

A.3.1 Calibração do eléctrodo de pH

- a) Ligar o DCU;
- b) Seleccionar a opção de calibração-eléctrodo de pH;
- c) Calibrar o zero:
 - ◇ lavar o eléctrodo com água destilada e limpar;
 - ◇ colocar o eléctrodo na solução padrão pH=7;
 - ◇ deixar estabilizar o valor no DCU e ajustar;
- d) Calibrar o declive:
 - ◇ lavar o eléctrodo com água destilada e limpar;
 - ◇ colocar o eléctrodo na solução padrão pH=4;
 - ◇ deixar estabilizar o valor no DCU e ajustar;

A.3.2 Calibração da sonda de oxigénio

- a) Ligar o DCU;
- b) Seleccionar a opção de calibração-eléctrodo pO₂;
- c) Calibrar o 0%:
 - ◇ preparar uma solução de ditionito de sódio num matraz;
 - ◇ colocar o eléctrodo na solução preparada;
 - ◇ deixar estabilizar o valor no DCU e ajustar;
- d) Calibrar o 100%:
 - ◇ depois de o fermentador estar esterilizado, e já nas condições de trabalho de temperatura, agitação e arejamento, colocar o DCU no menu 'Calibração de eléctrodos, sensor pO₂';
 - ◇ deixar estabilizar o valor no DCU e ajustar.

Nota: Se o eléctrodo apresentar um comportamento anómalo, isto é, se o sinal oscilar bastante, é necessário adicionar electrólito ou mesmo mudar a membrana.

A.3.3 Calibração do sensor de etanol

Conforme referido no Capítulo 3, a calibração do sensor de etanol, MGS-5 (Bionova Instruments, Huddinge, Suécia), foi repetida no início de cada fermentação.

O processo de calibração do sensor de etanol inicialmente seguido consistia no seguinte:

- a) Encher um matraz de 0.5 L com 500 ml de água destilada e colocar num agitador com uma barra magnética a 100 r.p.m.;
- b) Colocar o eléctrodo no matraz (prendê-lo num suporte);
- c) Esperar até o sinal de saída do MGS-5 ser constante. Anotar o valor da tensão;
- d) Adicionar com uma pipeta 0.65 ml de etanol puro (equivalente a 0.1 g/l de etanol no matraz de calibração);
- e) Esperar até o sinal de saída do MGS-5 ser constante. Anotar o valor da tensão. Repetir o procedimento para se obterem mais pontos;
- f) Traçar uma recta pelos pontos.

Neste processo de calibração, as condições ambientais, em termos de temperatura e velocidade de agitação, são diferentes das verificadas no fermentador. Como o sensor de etanol é sensível a essas alterações, optou-se por realizar a calibração no próprio reactor nas condições de operação, a 30 °C e a 500 r.p.m..

Passa-se, então, a descrever o procedimento adoptado para a calibração do sensor de etanol:

- a) Encher o fermentador com 2 litros de água destilada;
- b) Introduzir o sensor, fechar todas as portas e colocar o fermentador nas condições de operação: 30 °C e a 500 r.p.m. (não ligar o arejamento pois pode ocorrer evaporação de etanol);
- c) Ligar um multímetro ao sinal analógico vindo do medidor de etanol;
- d) Depois de estabilizadas as condições ambientais, anotar a tensão correspondente a uma solução sem etanol;
- e) Com uma pipeta automática (previamente calibrada) adicionar volumes exactos de etanol. Esperar cerca de 20 minutos para o sinal estar estável;
- f) Repetir a operação anterior de modo a curva de calibração varrer 0 a 3 g/l;

- g) Proceder ao ajuste da curva Concentração=f(tensão), normalmente um polinómio do 3º grau.

A título de exemplo, apresenta-se na Figura A.3.1 a curva obtida para a EXPA14.

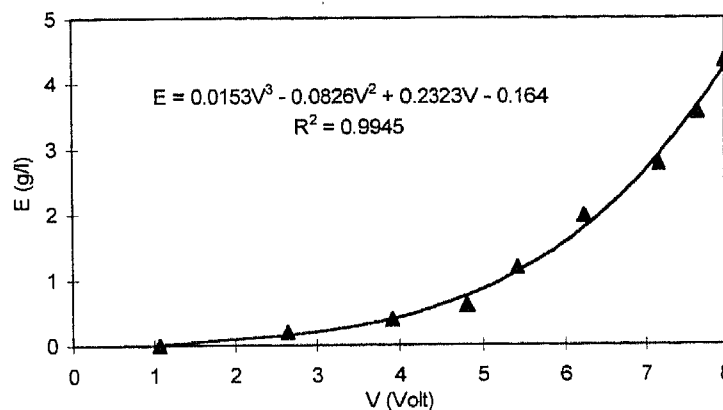


Figura A.3.1 Exemplo de uma curva de calibração do sensor de etanol

A.3.4 Operação do espectrómetro de massa

A.3.4.1 Princípio de funcionamento

O princípio de funcionamento de um sistema quadripolo é baseado na emissão de electrões por um filamento aquecido. Estes vão colidir com as moléculas do gás na região de ionização do analisador, com produção de fragmentos de iões. Através de campos eléctricos criados por um eléctrodo, os iões são direccionados para o filtro de massas, que rejeita a passagem de todos os iões com excepção daqueles que são proporcionais à razão massa-carga. As massas dos iões filtrados são convertidas numa corrente eléctrica que é proporcional à correspondente pressão parcial molecular da fonte. Isto é efectuado através dum detector tipo *taça Faraday*, em que os iões são direccionados para um elemento em forma de taça, sendo a medida a própria corrente iónica. O sistema está, ainda, equipado com um segundo detector do tipo multiplicador de electrões. Este detector permite amplificações muito rápidas mas tem a desvantagem de necessitar de um longo período de forma a garantir estabilidade na sensibilidade do aparelho.

O espectrómetro de massa gera espectros de massa que são indicativos dos componentes presentes na amostra e que permitem a sua quantificação. Cada componente, quando puro,

possui o seu espectro de massa característico, constituído por vários picos de massa, conforme o seu padrão de fragmentação resultante da passagem no analisador.

A suposição básica normalmente efectuada na análise quantitativa dos espectros é a seguinte: num espectro de massas de uma mistura de gases, cada pico é constituído por contribuições de iões moleculares e/ou fragmentos iónicos; as contribuições são adicionadas linearmente e a altura do pico é igual à soma das alturas dos picos individuais que seriam produzidos se cada espécie estivesse sozinha no sistema. Esta suposição é traduzida na seguinte equação:

$$S_i = \sum_j S_{ij} \quad (\text{A.3.1})$$

em que S_i é a intensidade (ou altura) total do pico ou sinal; S_{ij} é a contribuição do componente j para a intensidade do pico da massa i .

Assim, torna necessário corrigir-se as interferências entre os diversos componentes presentes numa mistura. Isso é efectuado através de um método referido como desacoplamento ou desconvolução. Os sinais desacoplados, específicos para cada componente, são determinados pela equação:

$$P = R^{-1}S \quad (\text{A.3.2})$$

em que P representa o vector dos sinais desacoplados, S é o vector dos sinais gerados pelo espectrómetro ($=[S_i]$) e R^{-1} é a matriz de desconvolução, obtida por inversão da chamada matriz de fragmentação, que se apresenta no seguimento.

Para fermentações aeróbias é suficiente a monitorização da composição da mistura gasosa nos componentes oxigénio, dióxido de carbono e azoto. Os sinais gerados para as massas 32, 44 e 28 (intensidades relativas de 100%) são usados para os quantificar, respectivamente. Estes picos são denominados de picos-base. A matriz de fragmentação, R , tem a forma que se segue, com as linhas a representar os picos-base (28, 32 e 44) e as colunas com as fragmentações de cada componente nesses picos-base:

$$R \equiv \begin{bmatrix} r_{28}^{N_2} & r_{28}^{O_2} & r_{28}^{CO_2} \\ r_{32}^{N_2} & r_{32}^{O_2} & r_{32}^{CO_2} \\ r_{44}^{N_2} & r_{44}^{O_2} & r_{44}^{CO_2} \end{bmatrix} = \frac{1}{100} \begin{bmatrix} 100 & 0 & 8 \\ 0 & 100 & 0 \\ 0 & 0 & 100 \end{bmatrix} \quad (\text{A.3.3})$$

A matriz de desconvolução é, deste modo, igual a

$$R^{-1} \equiv \begin{bmatrix} 1 & 0 & -0.08 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A.3.4})$$

Neste caso, a presença de vários elementos nulos na matriz de desconvolução permite determinar facilmente os sinais desacoplados, através das seguintes equações:

$$p_{N_2} = s_{28} - 0.08s_{44} \quad (\text{A.3.5})$$

$$p_{O_2} = s_{32} \quad (\text{A.3.6})$$

$$p_{CO_2} = s_{44} \quad (\text{A.3.7})$$

As fracções molares de cada componente, y_i são determinadas, finalmente, por divisão de cada elemento do vector P pela soma dos elementos desse vector e multiplicação pelo correspondente factor de calibração:

$$y = \frac{C \times P}{\sum_{i=1}^3 p_i} \quad (\text{A.3.8})$$

em que C é a matriz (diagonal) de calibração, determinada através do espectro de massas da mistura de gases de calibração.

A.3.4.2 Calibrações e medições

No espectrómetro de massa efectuou-se, no início de cada experiência, a medição da composição do ar à entrada do fermentador e a calibração da mistura a analisar com gases de calibração conhecida (azoto, oxigénio e dióxido de carbono). Assim, passa-se a descrever cada um dos passos.

Medição do ar

O procedimento adoptado foi:

- a) Iniciar o programa *RGA for Windows*;
- b) Abrir a válvula de admissão de ar do exterior;

- c) Iniciar a aquisição e gravação de dados em ficheiro durante 20 s, com período de amostragem de 1 s.

No final da aquisição é necessário tratar os dados. O RGA for Windows grava o sinal pretendido, neste caso para os gases azoto, oxigénio e dióxido de carbono, adquirida nos 20 segundos.

O cálculo das fracções molares da fase gasosa é dado por:

- Determinar a pressão parcial de cada componente em função do sinal obtido no espectrómetro (s) pela aplicação das equações (A.3.5) a (A.3.7);
- Para as 20 amostragens efectuadas, calcular a fracção molar de N₂, O₂ e CO₂ segundo a equação (A.3.8);
- Dado que a soma dos três componentes é superior à unidade, há necessidade de normalizar as fracções molares;
- Efectuar a média das composições de N₂, O₂ e CO₂ para as 20 amostragens efectuadas.

Calibração com gases de composição conhecida

A calibração do aparelho é efectuada através de uma mistura de gases de composição conhecida (em percentagem molar ou volúmica -70.04 de azoto, 19.95 de oxigénio e o restante, dióxido de carbono). O oxigénio e o dióxido de carbono dizem respeito aos gases que se pretendem analisar, comuns em fermentações. O azoto, gás inerte, é necessário para se inferir o caudal de gás à saída do fermentador.

A mistura está contida numa garrafa pressurizada de aço (Union Carbide, Espanha), equipada com um sistema manual de regulação da pressão de escoamento. A mistura é encaminhada para o espectrómetro por um tubo de aço *inox* de diâmetro igual a 1/4" e comprimento 1.5 m. O gás entra num dos 16 canais disponíveis no espectrómetro (canal 7).

O processo é análogo à medição do ar, mas analisando os gases provenientes da garrafa de composição conhecida. O processo de cálculo é o seguinte:

- Determinar a pressão parcial de cada componente em função do sinal obtido no espectrómetro (s), segundo equações (A.3.5) a (A.3.7);
- Fazer a média das pressões parciais de N₂, O₂ e CO₂ nas 20 amostragens;
- Calcular o coeficiente de calibração para cada componente por:

$$C = \frac{y \times \sum_{i=1}^3 p_i}{P} \quad (\text{A.3.9})$$

A.4. Métodos e técnicas de análise em diferido

A.4.1 Curva de calibração da biomassa

A curva de calibração para determinar a concentração de biomassa foi efectuada por leitura da densidade óptica (DO) num espectrofotómetro (modelo 7850, Jasco) e respectiva correlação com o peso seco. A leitura é efectuada a 620 nm contra um branco com água.

A.4.1.1 Material

- Papel de alumínio
- Filtros esterilizados de 0.45 mm
- Copo de filtração
- Pipetas de 50 ml
- Pipetas de 1 a 10 ml
- Balões volumétricos de 50 e 100 ml
- 500 ml do meio de cultura de uma fermentação

A.4.1.2 Procedimento

- a) Fazer 6 'caixinhas' em papel de alumínio e numerá-las com cortes na borda da caixa (a tinta da caneta pode sair na estufa);
- b) Colocar nas 'caixinhas' um filtro esterilizado de 0.45 mm;
- c) Deixar na estufa a 80 °C de um dia para o outro.

No dia seguinte ...

- a) Retirar da estufa e pôr no exsiccador;
- b) Depois de arrefecerem, pesá-las e anotar o peso da caixa+filtro;
- c) Voltar a colocar na estufa a 80 °C por mais um pouco;
- d) Repetir os pontos a) e b) (verificar se o peso se manteve estável);
- e) Pegar no matraz com os 500 ml do final de uma fermentação;

- f) Colocar o filtro nº 1 das 'caixinhas' de alumínio no copo de filtração e filtrar 50 ml da cultura final da fermentação;
- g) Repor o filtro com o filtrado na estufa de um dia para o outro;
- h) Repetir a operação f) e g) para os restantes filtros;
- i) Entretanto preparar soluções para obter vários pontos da curva de peso seco de 0.1 a 1.0. de densidade óptica;

Exemplo de cálculo:

Supor que o valor da densidade óptica (DO) lido no final da fermentação é de 9.38. Para se obter, por exemplo, uma DO de 1.0 numa solução de 50 ml (V_{Sol}); o volume de cultura a pipetar da cultura 'mãe', $V_{pipetar}$, é:

$$V_{pipetar} = \frac{50mlSol * 1.0DO}{9.38DO} \quad (A.4.1)$$

Preparar pontos de DO iguais a 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 e 1.0 (para valores baixos de DO preparar soluções de 100 ml).

- j) Ler a densidade óptica (a 620 nm) de cada solução e registar o valor.

No dia seguinte ...

- a) Pesar e anotar o peso da caixa+filtrado que ficaram na estufa;
- b) Fazer a média do peso de filtrado (biomassa) nas 6 'caixinhas';
- c) A concentração de biomassa na cultura, $C_{Xcultura}$ é, então, a média do peso de filtrado em 50 ml (volume filtrado);
- d) Calcular a concentração de biomassa em cada solução preparada, $C_{XSolPadrão}$, segundo a equação:

$$C_{XSolPadrão} = \frac{C_{Xcultura} * V_{pipetar}}{V_{sol}} \quad (A.4.2)$$

- e) Fazer o gráfico $C_{XSolPadrão} = f(DO)$;
- f) Ver a zona linear e ajustar uma recta aos pontos com ordenada na origem aproximadamente igual a zero.

Um exemplo da curva utilizada encontra-se na Figura A.4.1.

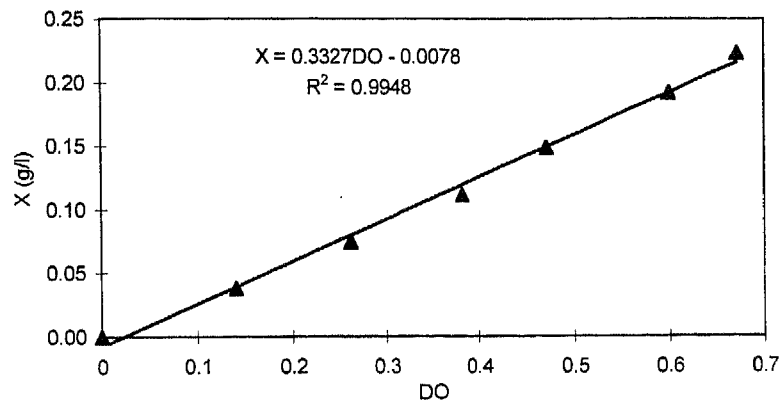


Figura A.4.1 Exemplo de uma curva de calibração para a Biomassa

A.4.2 Curva de calibração para etanol e açúcares no HPLC

A concentração de açúcares e etanol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), usando um detector de índice de refração (830-RI, Jasco), um forno e controlador de temperatura (Chrompack, Middelburg, Holanda) e uma bomba 880-PU (Jasco, Tóquio, Japão). Utilizou-se uma coluna Aminex® HPX-87N (Bio-Rad, Richmond, EUA).

O procedimento adoptado foi o seguinte:

- a) Preparar solução padrão 5 g/l de glucose (ou outros açúcares)+etanol:
 - ◇ colocar um balão de 100 ml com um pouco de água destilada na balança;
 - ◇ tarar a balança;
 - ◇ adicionar com uma pipeta 0.5 g de etanol, tapar o balão;
 - ◇ pesar num copo 0.5 g de glucose;
 - ◇ diluir com água destilada;
 - ◇ adicionar ao balão;
 - ◇ perfazer o volume com água destilada e agitar;
 - ◇ registar os pesos exactos de glucose e de etanol, bem como as respectivas concentrações;
 - ◇ identificar e guardar no frigorífico a solução padrão concentrada;
- b) Diluir 5 vezes a solução padrão:
 - ◇ pipetar 20 ml da solução concentrada;

- ◇ diluir num balão de 100 ml;
 - ◇ registar concentração da solução diluída;
 - ◇ partir desta solução para obter novos pontos da calibração;
- c) Pontos da curva de calibração:
- ◇ preparar soluções padrão diluídas (balões de 100 ml) de modo a obter aproximadamente os seguintes pontos - 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm e 1000 ppm;
 - ◇ injectar 2 a 3 vezes cada amostra e integrar as áreas;
 - ◇ efectuar o ajuste: $\text{Concentração} = f(\text{Área})$ para cada um dos compostos.

Nota: No final, não esquecer de lavar bem a seringa com álcool.

Apresentam-se, de seguida, um exemplo das curvas obtidas para cada um dos casos.

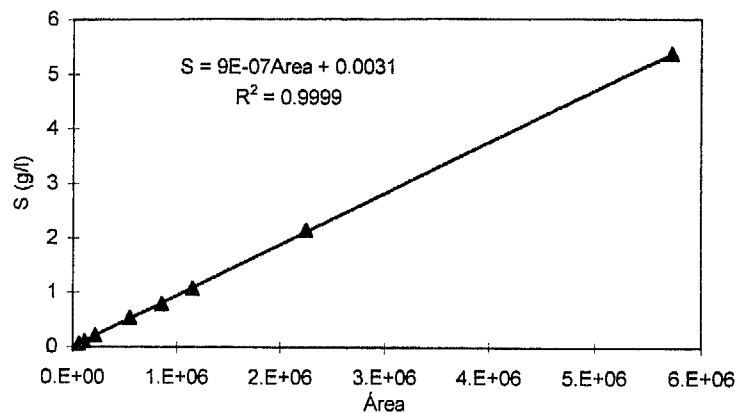


Figura A.4.2 Exemplo de uma curva de calibração para a Sacarose

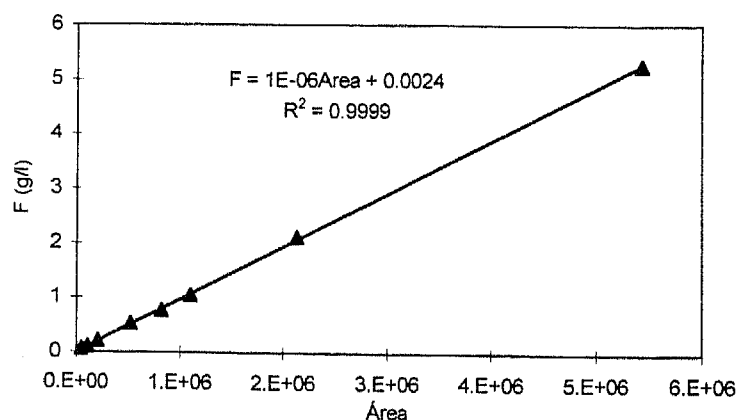


Figura A.4.3 Exemplo de uma curva de calibração para a Frutose

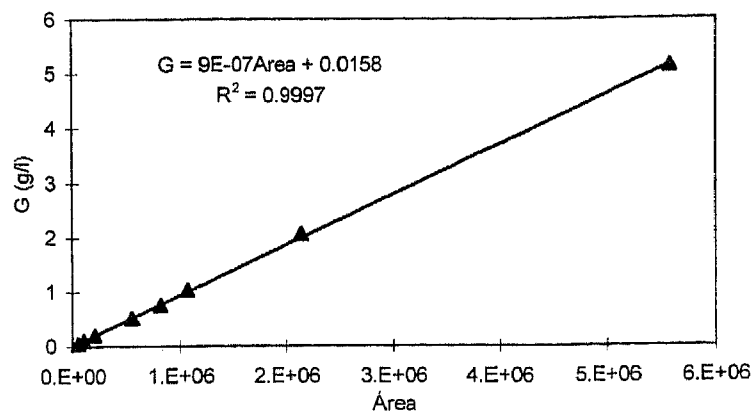


Figura A.4.4 Exemplo de uma curva de calibração para a Glucose

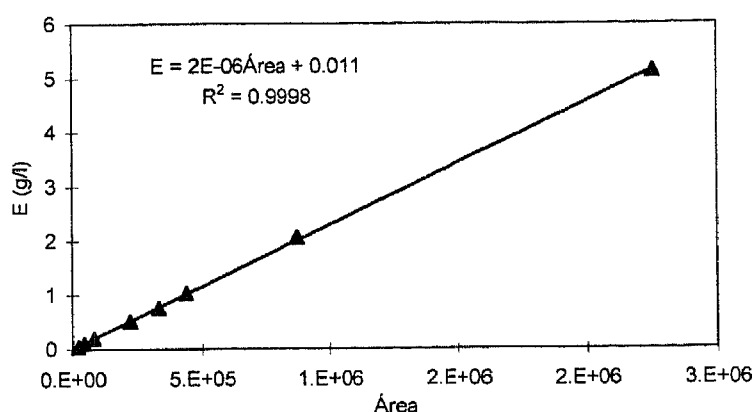


Figura A.4.5 Exemplo de uma curva de calibração para o Etanol

A.4.2.1 Procedimento de ligar/operar/desligar o HPLC

Uma vez que a coluna para determinação de açúcares por HPLC exige determinados cuidados na sua utilização, considerou-se importante referir os passos a seguir na operação de ligar, operar e desligar o HPLC.

- Ligar o forno;
- Ligar o detector RI (Índice de Refracção);
- Ligar a bomba: iniciar com um caudal baixo, 0.2 ml/min, deixar estabilizar a temperatura e só depois aumentar gradualmente o caudal até ao valor desejado;
- Deixar estabilizar o detector, o que demora 4 a 6 horas, e só depois verificar a linha de base;
- Parâmetros do detector RI: SUM = ± 2 V, DIFF = 0 ± 0.1 V, RIU = 0 V, RANGE = 0.5×10^{-5} ;

- f) Se estes parâmetros não estiverem nestes valores é necessário ajustar (em caso de dúvida consultar o manual):
- ◇ SUM - se menor em valor absoluto que 2 V é porque poderá haver ar no detector; com a ajuda de uma seringa tentar retirá-lo. Se não for suficiente, ligar directamente a bomba ao detector e fazer passar um caudal de 5 ml/min;
 - ◇ DIFF - ajustar o valor com uma chave em estrela no botão existente na parte da frente do detector;
 - ◇ RIU - fazer AUTOZERO;
 - ◇ RANGE - introduzir a sensibilidade pretendida;
- g) Os parâmetros da coluna Merck são: Temperatura = 85 °C; Caudal = 0.5 ml/min de água ultra pura filtrada e desgaseificada (por ultra-sons), Pressão = 42 kg/cm². Os parâmetros da coluna BioRad são: Temperatura = 85 °C; Caudal = 0.6 ml/min de uma solução 0.01 M de sulfato de sódio filtrada e desgaseificada (por ultra-sons), Pressão = 22 kg/cm²;
- h) Iniciar as análises, tendo o cuidado de lavar a seringa com a amostra antes de injectar;
- i) Volume da injeção: 40 µl;
- j) Os tempos de retenção são, para a coluna da Merck: Sacarose - 8.1 min, Glucose - 10.1 min, Frutose - 11.8 min, Etanol - 14.5 min. Os tempos de retenção são, para a coluna da BioRad: Sacarose - 8.9 min, Glucose - 11.2 min, Frutose - 12.1 min, Etanol - 15.5 min;
- k) Para mudar o frasco de eluente proceder do seguinte modo:
- ◇ descer gradualmente o caudal;
 - ◇ quando chegar a 0.01 ml/min e 0 kg/cm² desligar a bomba;
 - ◇ mudar o frasco;
 - ◇ ligar a bomba com um caudal 0.1 ml/min;
 - ◇ verificar se não há bolhas de ar;
 - ◇ caso haja, abrir a válvula do esgoto;
 - ◇ aspirar com a seringa o ar do esgoto;
 - ◇ aumentar um pouco o caudal;
 - ◇ se não houver bolhas de ar, fechar a válvula de esgoto;
 - ◇ aumentar gradualmente o caudal até ao valor desejado;
 - ◇ deixar estabilizar (demora um pouco);
 - ◇ ajustar o zero e deixar estabilizar;
- l) Para desligar o HPLC proceder do seguinte modo:
- ◇ descer gradualmente o caudal até 0.2 ml/min;
 - ◇ desligar o forno;

- ◇ deixar a bomba ligada durante 0.5 a 1 hora;
- ◇ descer gradualmente o caudal até zero e desligar a bomba e o detector.

A.5. O programa *Monitor*

O programa *Monitor* corre num computador PC486 compatível, em *Microsoft Visual Basic 3.0* -versão profissional- em ambiente *Microsoft Windows 3.1*.

O programa *Monitor* engloba as seguintes funções: aquisição e interpretação de dados e controlo do processo.

No referente à aquisição de dados, está ligado via porta série à unidade de controlo digital directo do fermentador, à balança e ao espectrómetro de massa. Comunica com o sensor de etanol e com a bomba peristáltica via interface AD/DA.

É de particularizar alguns detalhes da comunicação série, bem como, dos ficheiros utilizados para a configuração do equipamento e de variáveis.

A.5.1 Detalhes na comunicação DCU/Computador

O DCU é identificado por um endereço, na trama de comunicação. Antes de ser efectuado qualquer pedido de transferência de dados é necessário inicializar o canal de comunicação (comando SU), definindo quais as variáveis que se pretendem ler - variáveis do processo, alarmes, valores de referência, saídas do controlador, entre outras. Cada trama é inicializada pelo carácter '*', seguido do identificador do DCU (no caso presente, 1) e finalizada com a soma em ASCII dos vários comandos, seguida de '@'. O carácter de separação de comandos é ':'. O comando para pedido de informação é 'DR'. A gama de valores transmitidos foi definida de 0-100%, a que corresponde um sinal real de 0-1000.0, sendo, então, necessária uma calibração para cada uma das variáveis a ler do DCU. A trama resposta do DCU é análoga à do computador excepto no carácter inicial, que neste caso é '#'.

A.5.2 Detalhes na comunicação Balança/Computador

A comunicação com a balança engloba as seguintes operações: tarar (comando 'T'), selecção da unidade de trabalho, grama, (comando 'U g') e leitura (comando 'S'). Todos os comandos são seguidos dos caracteres 'CR+LF'.

A.5.3 Ficheiros de configuração de equipamento e de variáveis

A configuração global do sistema é constituída por dois blocos de informação -

- o relacionado com o equipamento (ficheiros *confl.hdw* e *confl.int*);
- o bloco contendo a identificação e caracterização das variáveis utilizadas (*confl.var*).

Os ficheiros *confl.hdw* e *confl.var* devem ser fornecidos pelo utilizador, através do sistema de gestão de bases de dados *Microsoft Access* para armazenar a informação em forma de tabelas. O *confl.int* é um ficheiro de texto.

No respeitante ao ficheiro *confl.hdw* (Tabela A.5.1) convém particularizar alguns pontos:

- No quadro *Hardware_Installed Cards* explicita-se o endereço da placa em causa, o número de bits utilizados, o sinal eléctrico mínimo e máximo, a unidade (em corrente, *A* no quadro, ou em tensão, *V* no quadro, ou não usado, *n*), o número de canais disponíveis e o número de canais utilizados.
- Nos quadros *PCL718 An_inp* e *PCL718 An_out* figuram a calibração de cada canal de entrada e de saída analógica, respectivamente. Em ambas é fornecido o tipo de sinal eléctrico (sinal em tensão, *V*, ou sinal em corrente, *A*) e os valores de mínimo e máximo de sinal eléctrico e bits para a calibração do canal.
- O quadro *PCL744* diz respeito à configuração da placa de comunicação série com oito portas.

O ficheiro de texto, *confl.int*, (Figura A.5.1) contém os comandos específicos do protocolo de comunicação do fermentador, da balança e do espectrómetro de massa. As linhas iniciadas pelo carácter ' correspondem a linhas de comentário; as restantes são linhas de comandos a serem executados pelo programa *Monitor*.

A configuração das variáveis utilizadas no programa (incluindo as medidas em linha e as medidas em tempo diferido) encontra-se no ficheiro *confl.var* (Tabela A.5.2). Neste

ficheiro é indicada a identificação da variável, em termos de número, abreviatura, nome e unidade, o seu tipo, o equipamento e canal de aquisição, a função que a define, a utilização de filtro, valores de mínimo, máximo e de referência, os níveis de alarme, o período de gravação e de amostragem, a identificação para traçado gráfico, os parâmetros de calibração das medidas em-linha e, finalmente, o seu valor inicial. Em relação ao tipo de variável definiu-se a seguinte correspondência:

- 1 - variável estimada;
- 2 - variável calculada por função definida pelo utilizador;
- 3 - variável de controlo;
- 4 - variável medida em-linha.

Para as variáveis do tipo 2, o utilizador deverá fornecer a função que a define. O programa descodifica internamente a função e utiliza-a nos seus cálculos.

Por *Device* entende-se a identificação do equipamento associado à variável medida em-linha. Assim, a correspondência definida é:

- 1 - sensor de etanol;
- 6 - fermentador;
- 7 - espectrómetro de massa;
- 8 - balança.

Por *Channel* entende-se o número do canal utilizado no equipamento de aquisição da variável.

```
'mensagem de inicialização e comunicação com fermentador
*1:SU:0:0:PV:1:2
*1:DR:0:0
'mensagem de inicialização com MS
c:\spectra\rga4win.exe
'mensagem de inicialização e comunicação com balança
T
S
'mensagens MS
RGA4WIN
RGA
DDEData
[CHANNELWRITEENABLED=1;1;1;1;0;0;0;0;0;0;0]
[CHANNELWRITEAUTORANGE=1;1;1;1;0;0;0;0;0;0;0]
[CHANNELWRITEMASS=Tot;28;32;44;0;0;0;0;0;0;0]
[MODE=MULTI TREND]
MULTI TREND
6
[DISKFILENAME=D:\bakers\ms\cf230596.wmt]
[DISKSCANS=500]
[DISKSTORETYPE=1]
[DISKINTERVAL=450]
[DISKSTOREATEND=1]
[DISKSTART]
```

Figura A.5.1 Configuração do ficheiro *confl.int*

Tabela A.5.1 Configuração do ficheiro de equipamento *confl.hdw*

<i>Card Types</i>	
TYPE ID	TYPE
1	Analog Input
2	Analog Output
3	Digital Input
4	Digital Output
5	RS_MultiPorts
6	RS232

<i>Hardware Installed Cards</i>								
TYPE	ADDRESS	BITS	VMIN	VMAX	UNITS	N_CHANNEL	N_CHANNEL USED	COMMENTS
1	768	12	0	10	V	8	3	PCL718 An_Inp
2	768	12	0	10	V	2	2	PCL718 An_Out
3	768	12	0	0	n	16	5	PCL718 Dig_Inp
4	768	12	0	0	n	16	5	PCL718 Dig_Out
5	0	0	0	0	n	8	3	PCL744
6	0	0	0	0	n	2	1	COM 1&2

<i>PCL718 An inp</i>						
CHANNEL	V/A	VMIN_REAL	BIT_MIN	VMAX_REAL	BIT_MAX	
0	V	0.102	35	10	4087	
1	V	0.102	35	10	4087	
2	V	0.102	35	10	4087	
3	n	0	0	5	4095	
4	n	0	0	5	4095	
5	n	0	0	5	4095	
6	n	0	0	5	4095	
7	n	0	0	5	4095	

<i>PCL718 An out</i>						
CHANNEL	V/A	VMIN_REAL	BIT_MIN	VMAX_REAL	BIT_MAX	
0	V	0.00024	0	5	4095	
1	V	0.138	100	5.01	4095	

<i>PCL744</i>						
PORT	BAUD	BITS	STOPBITS	PARITY	N_CHANNEL	COMMENT
0	9600	7	1	N	2	Fermenter
1	9600	8	1	N	3	Mass Spectromet
2	9600	7	1	E	1	Balance
3	9600	7	1	N	0	none
4	9600	7	1	N	0	none
5	9600	7	1	N	0	none
6	9600	7	1	N	0	none
7	9600	7	1	N	0	none

A.6. Programas para estudos em tempo diferido

Desenvolveram-se três programas independentes relacionados com os objectivos do estudo a realizar - programas *Opt*, *Sim*, *SimExp*. A Tabela A.6.1 refere os módulos empregues, os dados a fornecer pelo utilizador através de ficheiro bem como indica o capítulo onde foi utilizado cada programa.

Tabela A.6.1 Programas de simulação

<i>Programa</i>	<i>Módulos</i>	<i>Dados</i>	<i>Capítulo onde é utilizado</i>
<i>Opt</i>	Simulação	Perfil de alimentação	4
	Estimativa de parâmetros	Parâmetros da rotina de estimativa de parâmetros Medidas Exp.-X; S, E	
<i>Sim</i>	Simulação	Parâmetros da rotina de observação do estado	5, 6
	Observação do estado	Parâmetros da rotina de estimativa das cinéticas	
	Estimativa das cinéticas	Parâmetros da rotina de controlo	
	Controlo		
<i>SimExp</i>	Simulação	Medidas experimentais de OTR, CTR, O, C, E	5
	Observação do estado	Perfil de alimentação	
	Estimativa das cinéticas	Parâmetros da rotina de observação do estado	
		Parâmetros da rotina de estimativa das cinéticas	

A simulação é efectuada por integração das equações diferenciais e algébricas apresentadas no capítulo 4. Utiliza-se um algoritmo de passo variável, baseado no método de Sarafayan embebido às equações às diferenças, o qual envolve as fórmulas de Butcher de 4ª e 5ª ordem (Lapidus e Seinfeld, 1971), e forçando o erro de truncatura a ser inferior a um limite imposto pelo utilizador (Feyo de Azevedo, 1987).

Nos três programas é necessário fornecer por ficheiro os valores iniciais das variáveis de estado e os parâmetros necessários à rotina de integração.

Os resultados, em termos de variáveis de estado, taxas de transferência gasosa, acções de controlo, cinéticas e variáveis auxiliares, obtidos em cada programa são gravados em ficheiro. Este pode ser importado para um computador e tratado numa folha de cálculo para traçado gráfico.

A.6.1 O programa *Opt*

O programa *Opt*, permite, em alternativa, a simulação do processo e a estimativa de parâmetros. Ambas são efectuadas segundo perfil pré-definido de alimentação de substrato, isto é, corridas a caudal constante, a diluição constante ou combinação de evolução (de caudal ou de taxa de diluição) constante e exponencial e, finalmente, perfil de alimentação introduzido por ficheiro.

A rotina de estimativa de parâmetros tem por base a definição de uma função objectivo, que consiste em minimizar a soma do quadrado dos resíduos relativos entre os valores calculados e os experimentais, utilizando o método de Meyer e Roth (Meyer e Roth, 1972, Fejo de Azevedo, 1987). A função objectivo implementada calcula os resíduos associados às variáveis biomassa, glucose e etanol.

A.6.2 O programa *Sim*

O programa *Sim* engloba as funções de simulação do processo de produção de fermento de padeiro, de implementação das rotinas de observação do estado e de estimativa das cinéticas (capítulo 5) e da rotina de controlo, testando diferentes algoritmos (capítulo 6). O programa permite, também, operar em ciclo aberto, segundo perfil de alimentação definido: corridas a caudal constante, a diluição constante ou combinação de evolução (de caudal ou de taxa de diluição) constante e exponencial.

O programa inclui a introdução de ruídos nas variáveis de estado e, opcionalmente a aplicação de filtros de média deslizando (o número e peso dos termos a incluir são

fornecidos pelo utilizador). Os filtros podem ser incluídos nas variáveis medidas e/ou na taxa de diluição.

Na realidade experimental, os ruídos associados às medidas apresentam uma distribuição de valores que se aproxima da distribuição normal.

De forma a simular convenientemente a introdução de ruídos nas medidas, foi implementada a seguinte metodologia. Segundo o Teorema do Limite Central (Ruckdeschel, 1981) a soma de variáveis aleatórias independentes de uma mesma distribuição é também uma variável aleatória, cuja distribuição se aproxima da distribuição normal. Tendo como base este teorema pode gerar-se números aleatórios normalmente distribuídos pela soma de números aleatórios derivados de uma distribuição uniforme.

Neste trabalho, gerou-se um ruído normalmente distribuído, R_n , com variância Var e média Med , através da relação:

$$R_n = Var * \sum_{i=1}^k \frac{R_u - 0.5}{\sqrt{\frac{k}{12}}} + Med \quad (A.6.1)$$

em que R_u é a variável aleatória com uma distribuição pseudo-uniforme gerada por uma rotina desenvolvida por um elemento do grupo de investigação e k é o parâmetro responsável pela extensão do intervalo de números gerados. Para $k=12$ (valor utilizado neste trabalho) o valor máximo de R_n gerado é 6 (Oliveira, 1991).

Em relação à estimativa do estado e de parâmetros, o programa implementa, em alternativa, a utilização do par de medidas O-C, O-E e E-C. Para a estimativa das cinéticas estão programados os algoritmos de *Bastin e Dochain*, de *Pomerleau e Perrier* e o estimador com dinâmica de segunda ordem, com ou sem pólo duplo.

No referente ao controlo, podem ser testados o algoritmo PID e quatro versões do controlador. Deste último, testaram-se em simulação os algoritmos de controlo baseados em:

- modelo reduzido a três reacções com k conhecidos;
- modelo reduzido, parcial, para o par S-C, com k conhecidos;

- modelo reduzido, parcial, para o par S-O, com k conhecidos;
- modelo reduzido, parcial (par S-O) com lei de adaptação, segundo dinâmica de 2ª ordem (controlador EDSO).

No programa é necessário fornecer por ficheiro os valores necessários à rotina de estimativa de estado e de cinéticas e à rotina de controlo.

As equações diferenciais e algébricas apresentadas no capítulo 5 para a estimativa do estado e das cinéticas são integradas utilizando a mesma rotina empregue na simulação, tendo o cuidado de reinicializar os parâmetros convenientes.

O programa permite variações em degrau de amplitude e tempo de ocorrência definidos pelo utilizador quer para a variável de referência, etanol, quer para as perturbações, coeficiente de transferência de massa (o que se reflecte, em termos experimentais, numa variação da velocidade de agitação e/ou caudal de arejamento) e concentração de glucose na corrente de alimentação (o que corresponde, em termos industriais, a uma mudança no lote de melaços).

A.6.3 O programa *SimExp*

O programa *SimExp* simula, também, a produção de fermento de padeiro, mas em que as variáveis necessárias aos algoritmos de observação do estado e estimativa das cinéticas são medidas experimentais, fornecidas por ficheiro, a saber - OTR, CTR, concentrações de oxigénio, de dióxido de carbono e de etanol dissolvidos e caudal de alimentação de substrato.

Os algoritmos disponíveis para a observação do estado e estimativa das cinéticas são os apresentados para o programa *Sim*.

Uma vez que o caudal de alimentação corresponde a um perfil experimental, com ou sem controlo, o *SimExp* não contém a rotina de controlo.

A.6.4 Bibliografia

Feyo de Azevedo, S. Subrotinas em Fortran para Utilização no sistema WANG VS80 da FEUP.
Publicação interna DEQ, FEUP, 1987.

Lapidus, L., Seinfeld, J. H., *Numerical Solution of ODEs*, Academic Press, New York, 1971.

Meyer, R. R., Roth, P. M., Modified Damped Least Squares: An Algorithm for Non Linear Estimation, *J. Ins. Maths Applics.*, Vol. 9, pp. 218, 1972.

Oliveira, F. *Estudo Assistido por Computador da Dinâmica e do Controlo de Processos*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, 1991.

Ruckdeschel, F. *Basic Scientific Subroutines*, Mc Graw Hill, N.Y., 1981.

A.7. Estudos adicionais da estimativa de estado e de parâmetros

A.7.1 Resultados obtidos por simulação

Os perfis de alimentação utilizados nas simulações foram os perfis das correspondentes experiências, referenciadas pelos mesmos três últimos caracteres; por exemplo a simulação SIMA08 utiliza o caudal de alimentação da EXPA08. Os restantes valores das medidas necessárias ao estimador foram as consideradas iguais às do modelo teórico.

Apresentam-se de seguida alguns resultados adicionais obtidos com o par O-E e E-C.

A.7.1.1 Par O-E

Simulação SIMA08

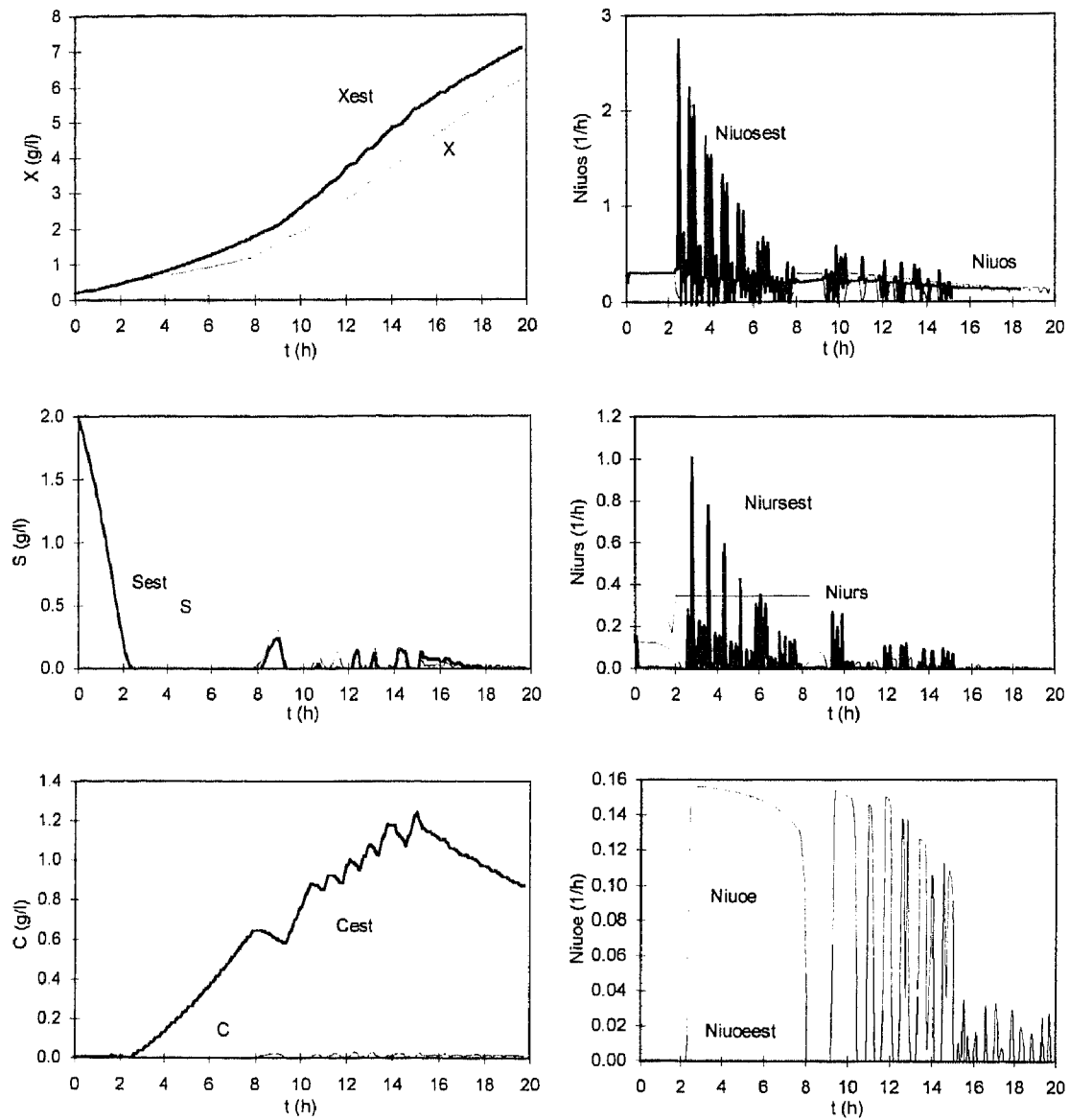


Figura A.7.1 SIMA08 - Perfis de estado e cinéticas para o par O-E

Simulação SIMA10

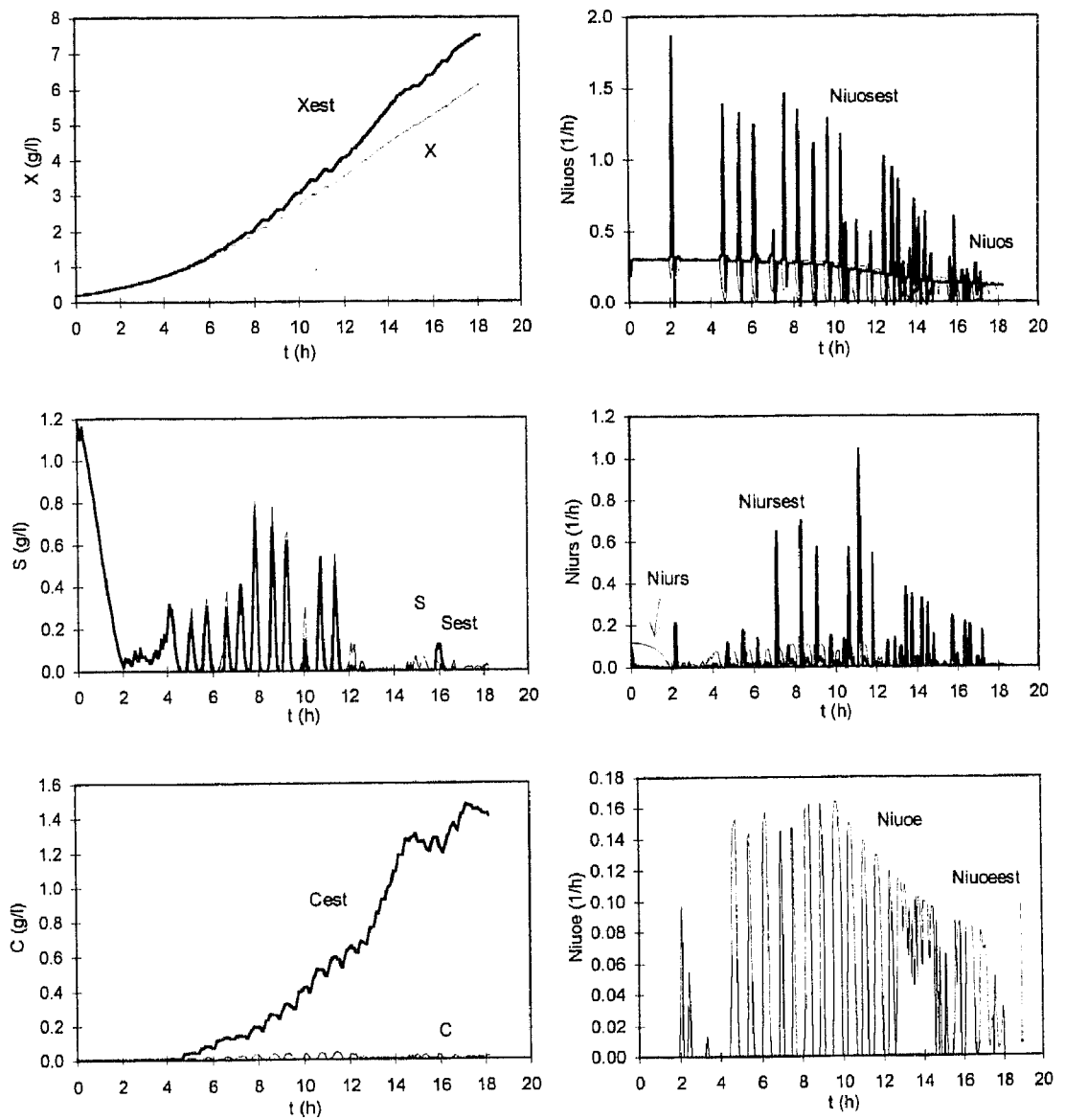


Figura A.7.2 SIMA10 - Perfis de estado e cinéticas para o par O-E

A.7.1.2 Par E-C

Simulação SIMA10

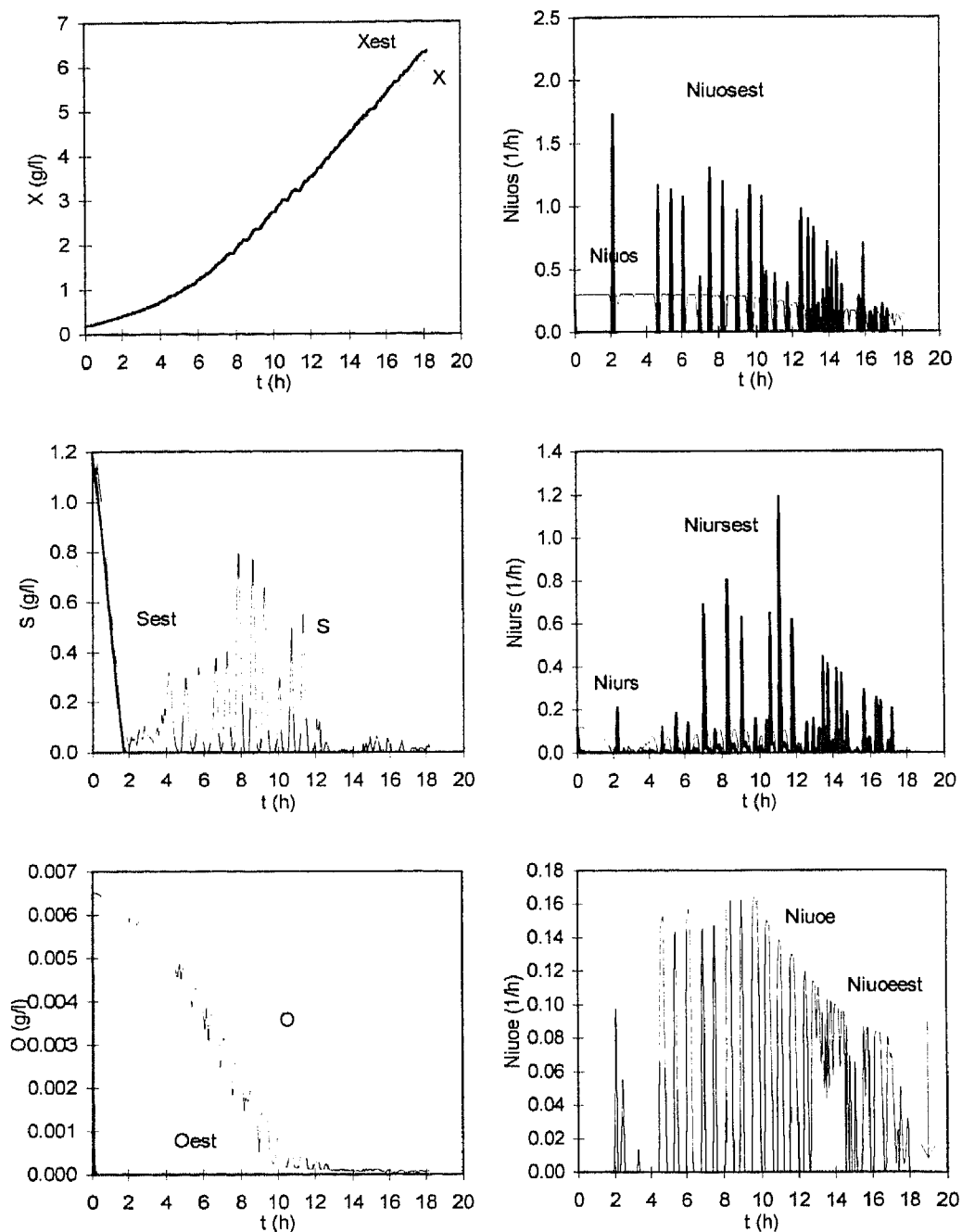


Figura A.7.3 SIMA10 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C

Simulação SIME02

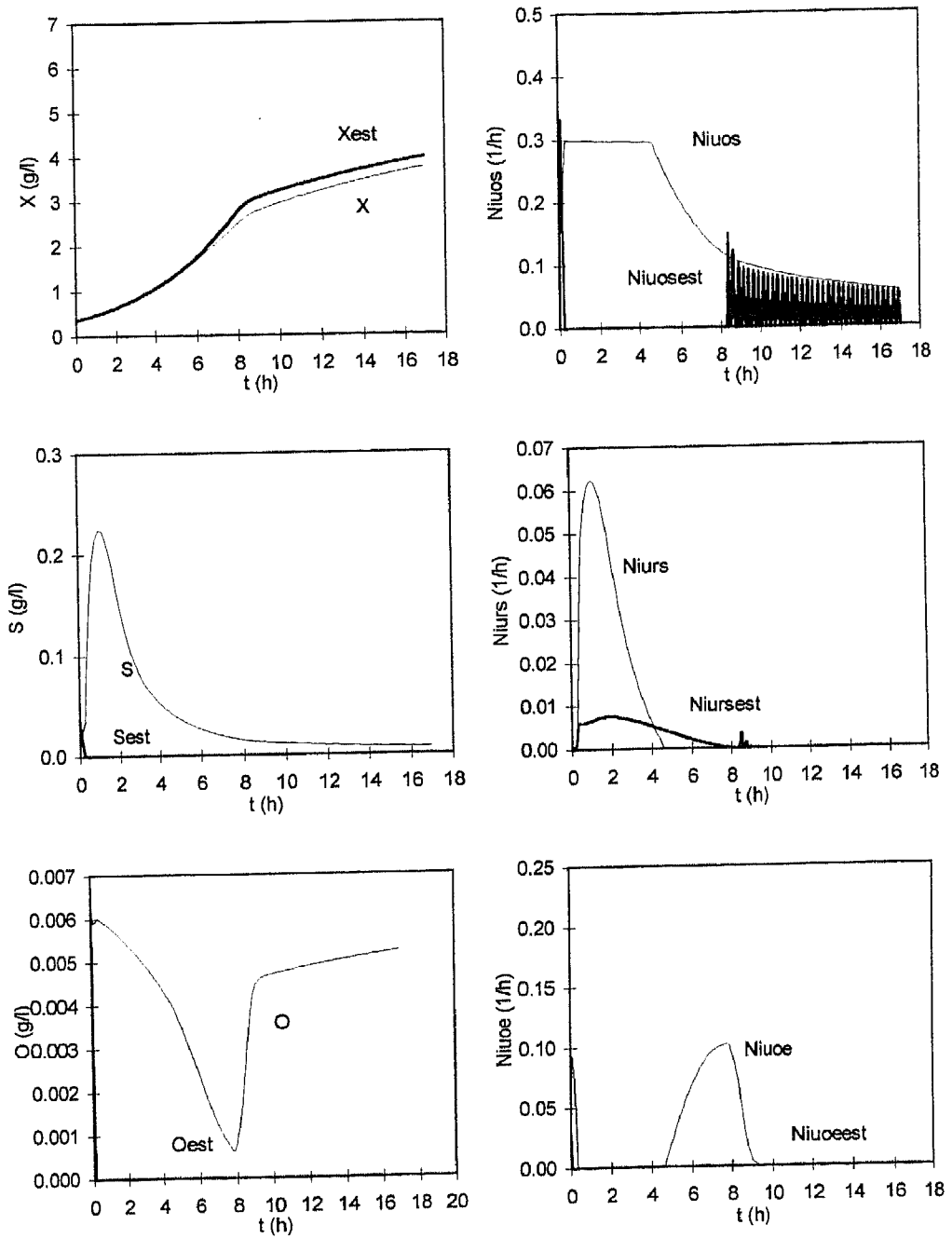


Figura A.7.4 SIME02 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C

Simulação SIME03

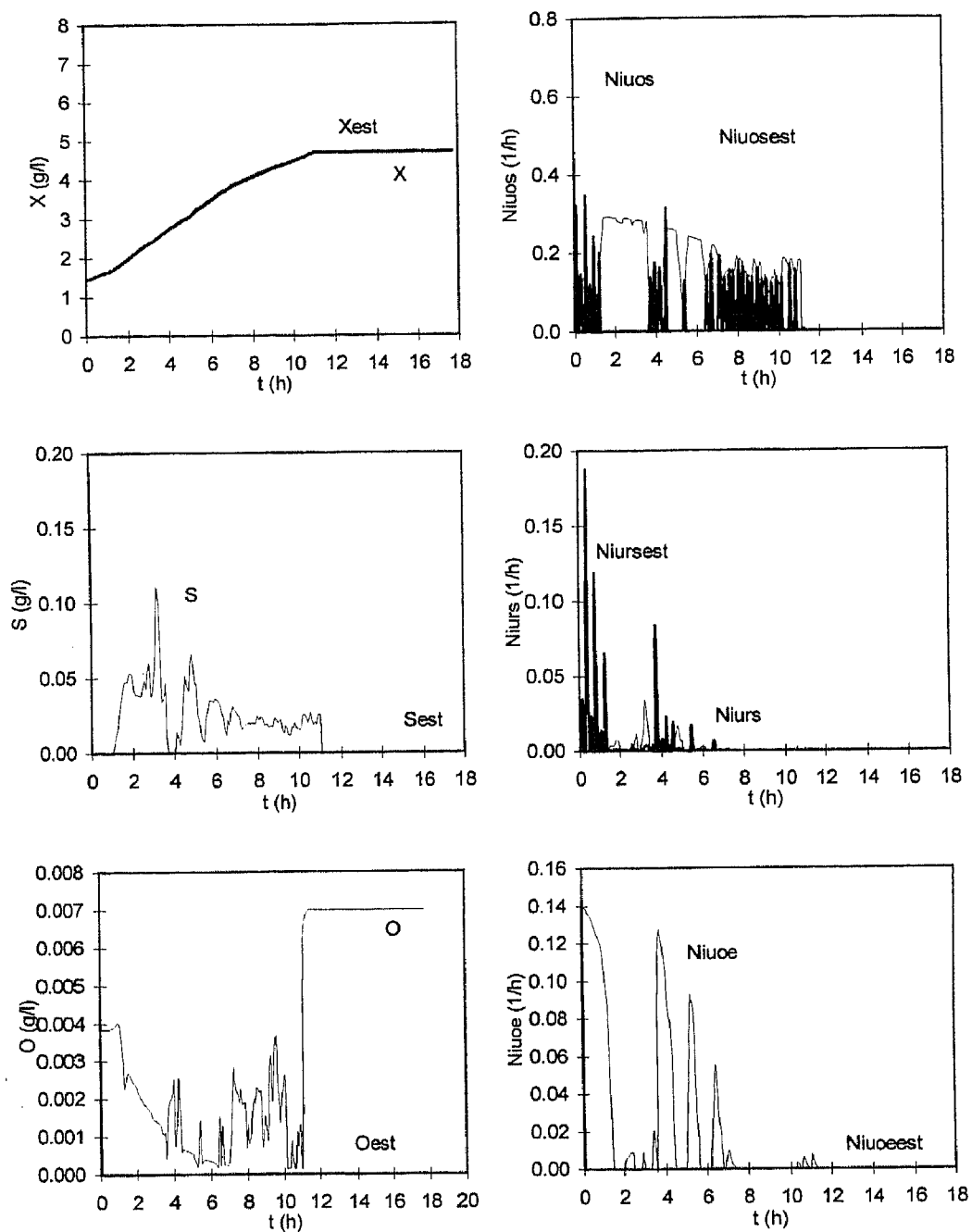


Figura A.7.5 SIME03 - Perfis de estado e cinéticas para o par E-C

A.7.2 Experiências adicionais

A.7.2.1 Par O-C

Experiência EXPE04

A Figura A.7.6 apresenta os perfis experimentais das medidas utilizadas. O perfil de alimentação encontra-se na Figura A.7.7.

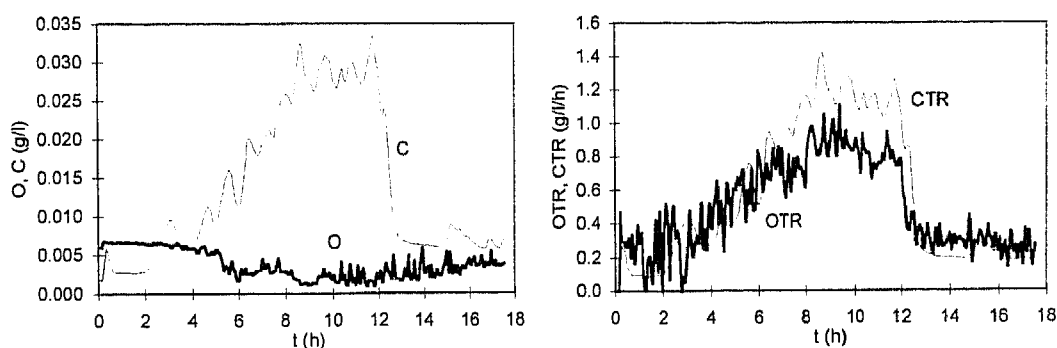


Figura A.7.6 EXPE04 - Valores de O, C, OTR e CTR experimentais

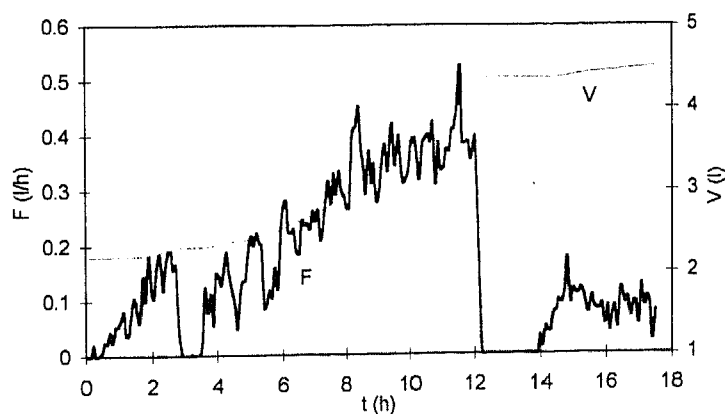


Figura A.7.7 EXPE04 - Perfil de alimentação

A Figura A.7.8 apresenta as estimativas do estado para as variáveis X, S e E obtidas.

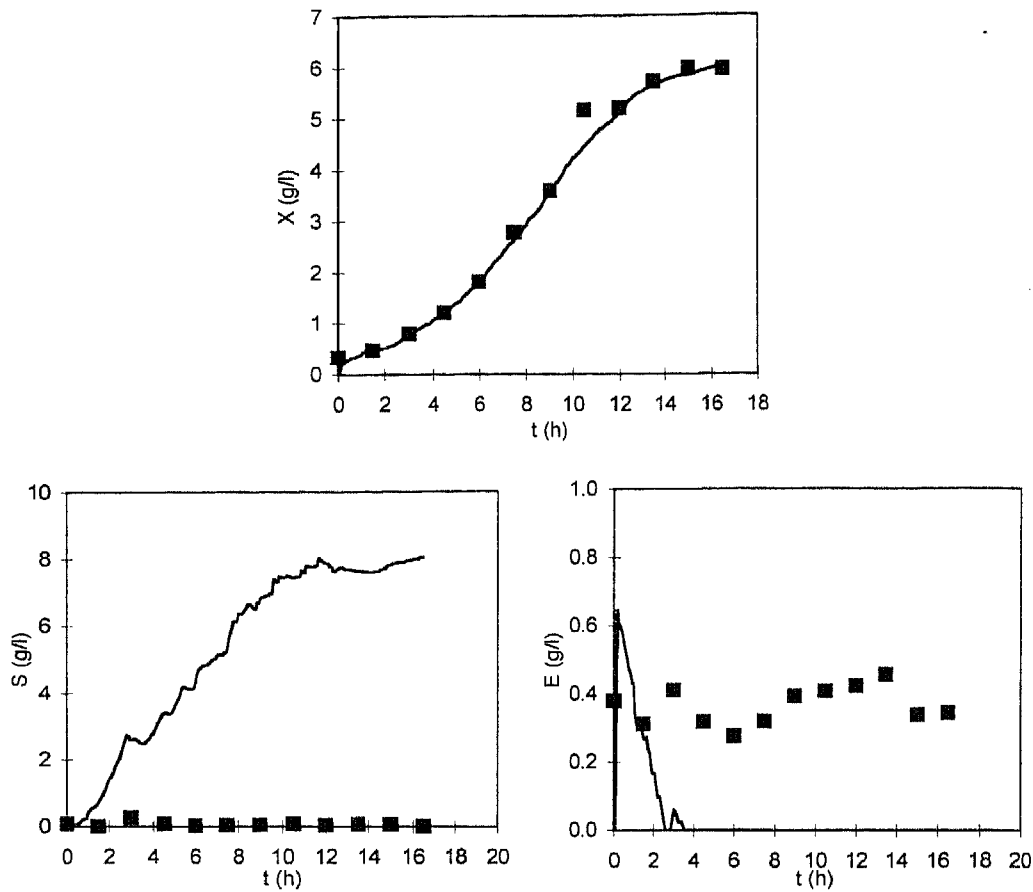


Figura A.7.8 EXPE04 - Valores de X , S e E experimentais (pontos) e o observado (traço fino)

Os resultados são excelentes para o perfil estimado de biomassa mas para os restantes são francamente maus, por razões apresentadas no Capítulo 5.

A.7.2.2 Par O-E

Experiência EXPA10

O perfil de alimentação desta experiência encontra-se na Figura A.7.9.

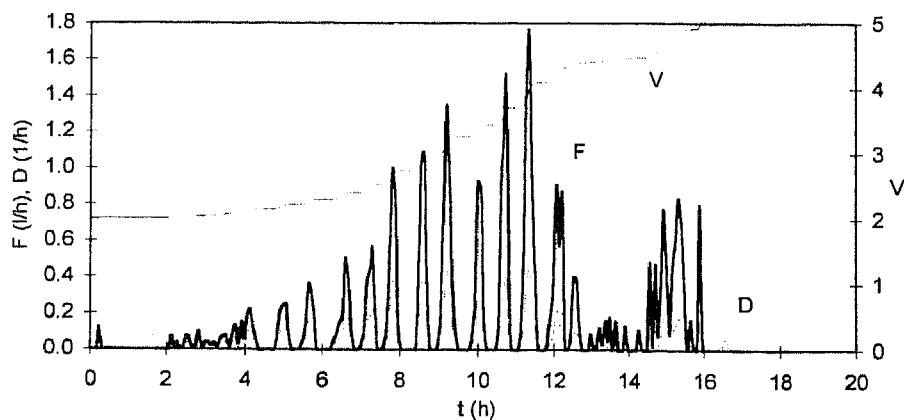


Figura A.7.9 EXPA10 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reactor

Como na experiência anterior, procedeu-se à análise da EXPA10. A Figura A.7.10 apresenta os perfis experimentais das medidas utilizadas, bem como os correspondentes perfis teóricos.

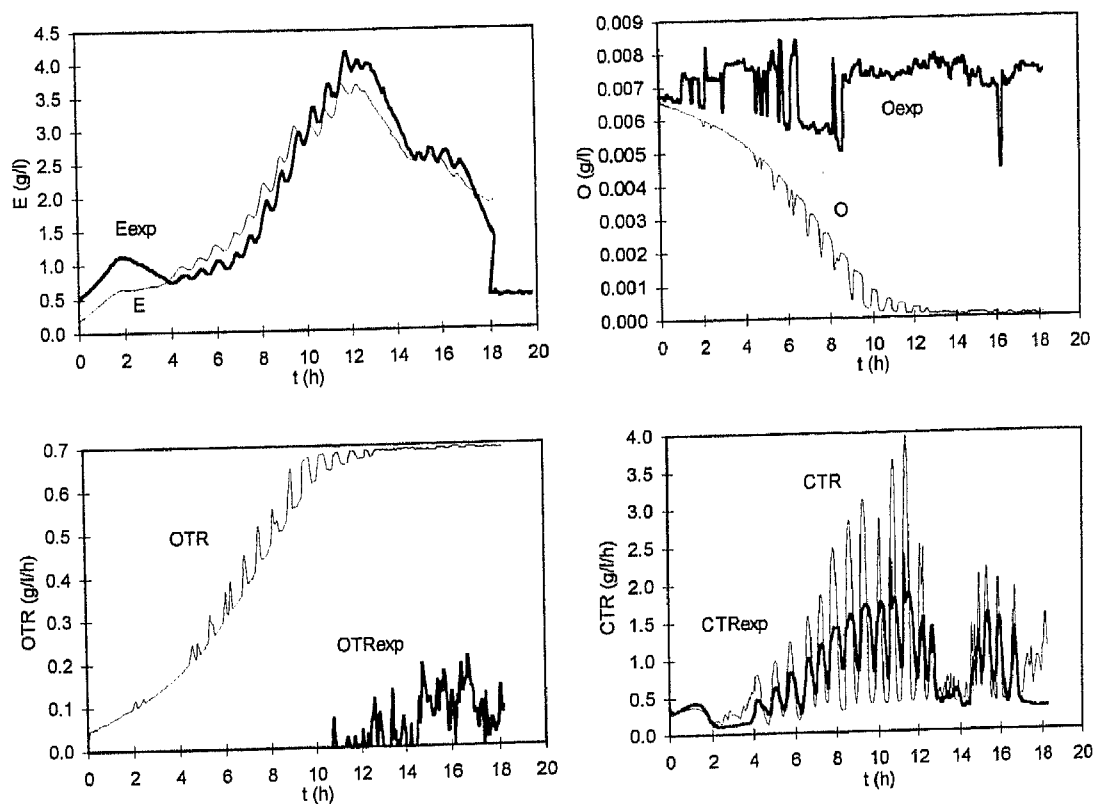


Figura A.7.10 EXPA10 - Valores de O, E, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

A Figura A.7.11 apresenta as estimativas do estado e das cinéticas obtidas.

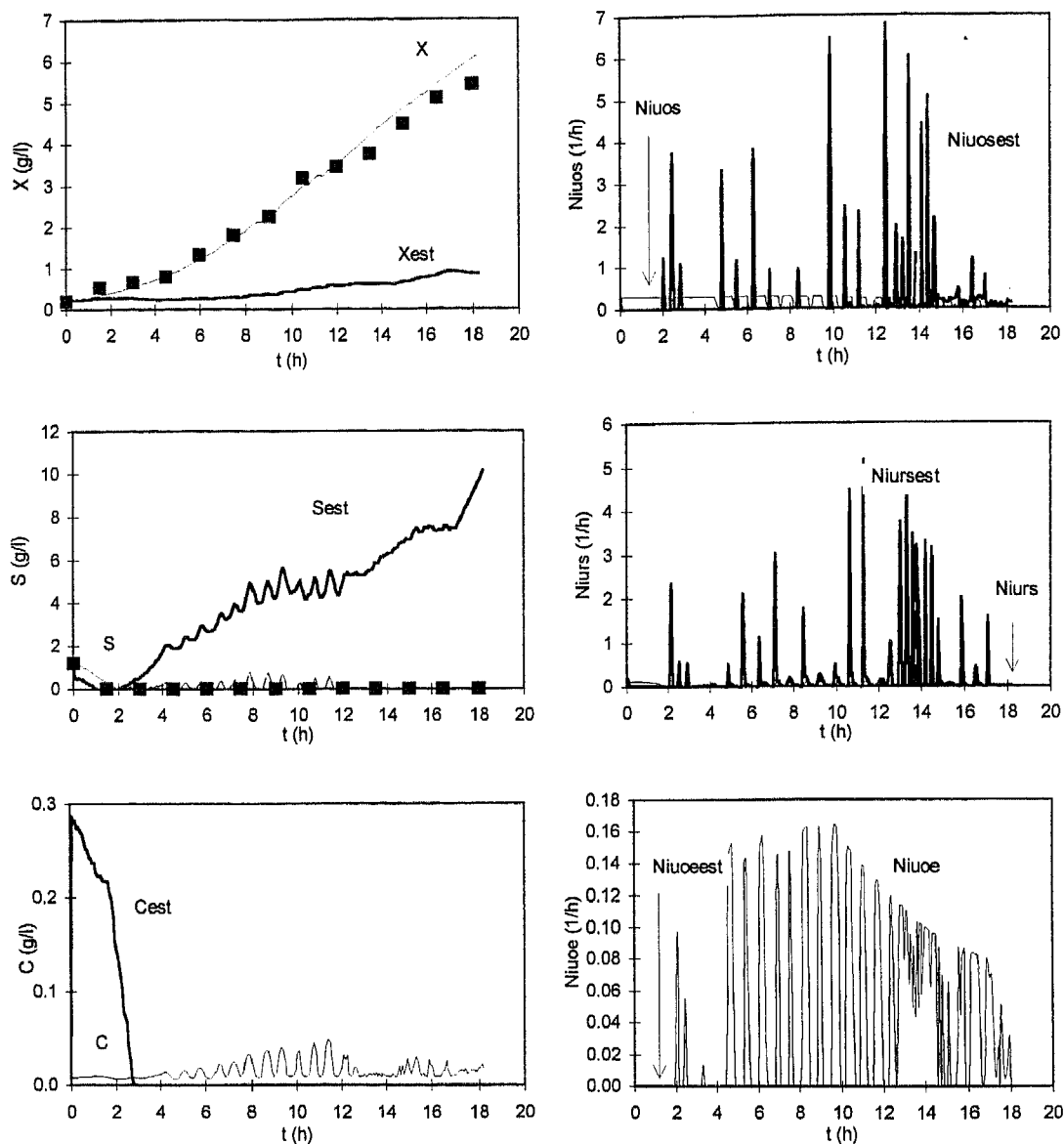


Figura A.7.11 EXPA10 - Valores de X , S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

Também para esta experiência as estimativas obtidas quer no estado quer nas cinéticas são más.

Experiência EXPE03

Esta experiência decorreu em regime de alimentação de melaços, segundo perfil de alimentação apresentado na Figura A.7.12.

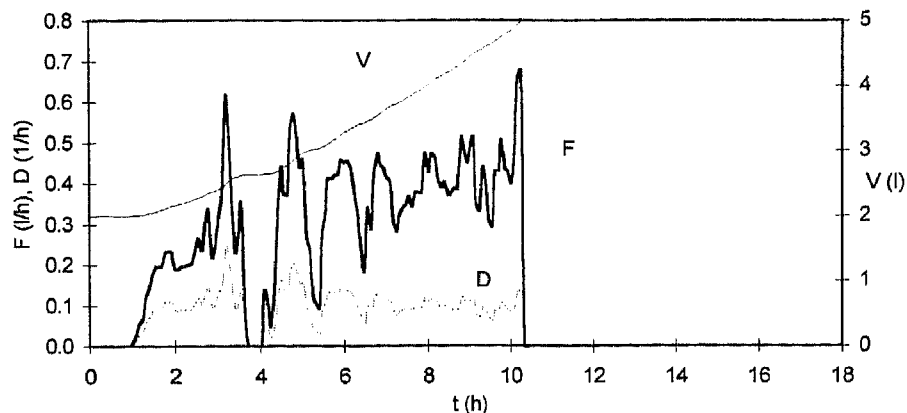


Figura A.7.12 EXPE03 - Perfil de alimentação, taxa de diluição e volume do reator

A Figura A.7.13 apresenta os perfis experimentais das medidas utilizadas, bem como os correspondentes perfis teóricos.

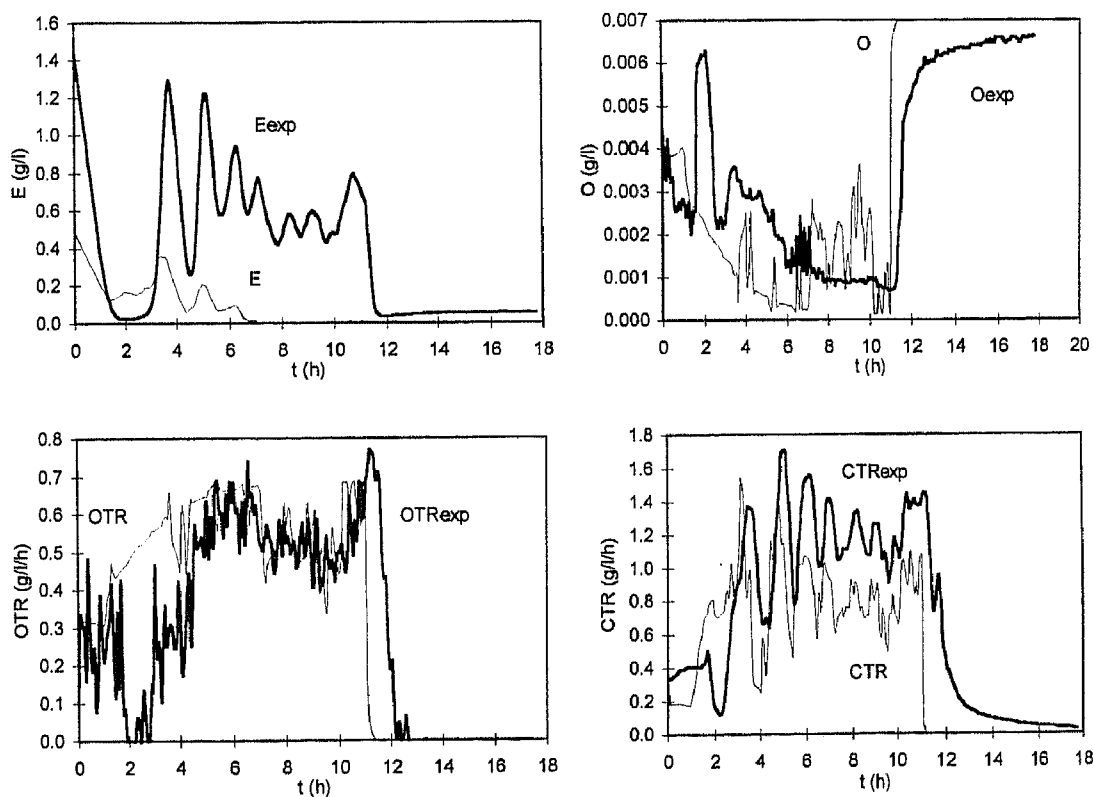


Figura A.7.13 EXPE03 - Valores de O, E, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

A Figura A.7.14 apresenta as estimativas do estado e das cinéticas obtidas.

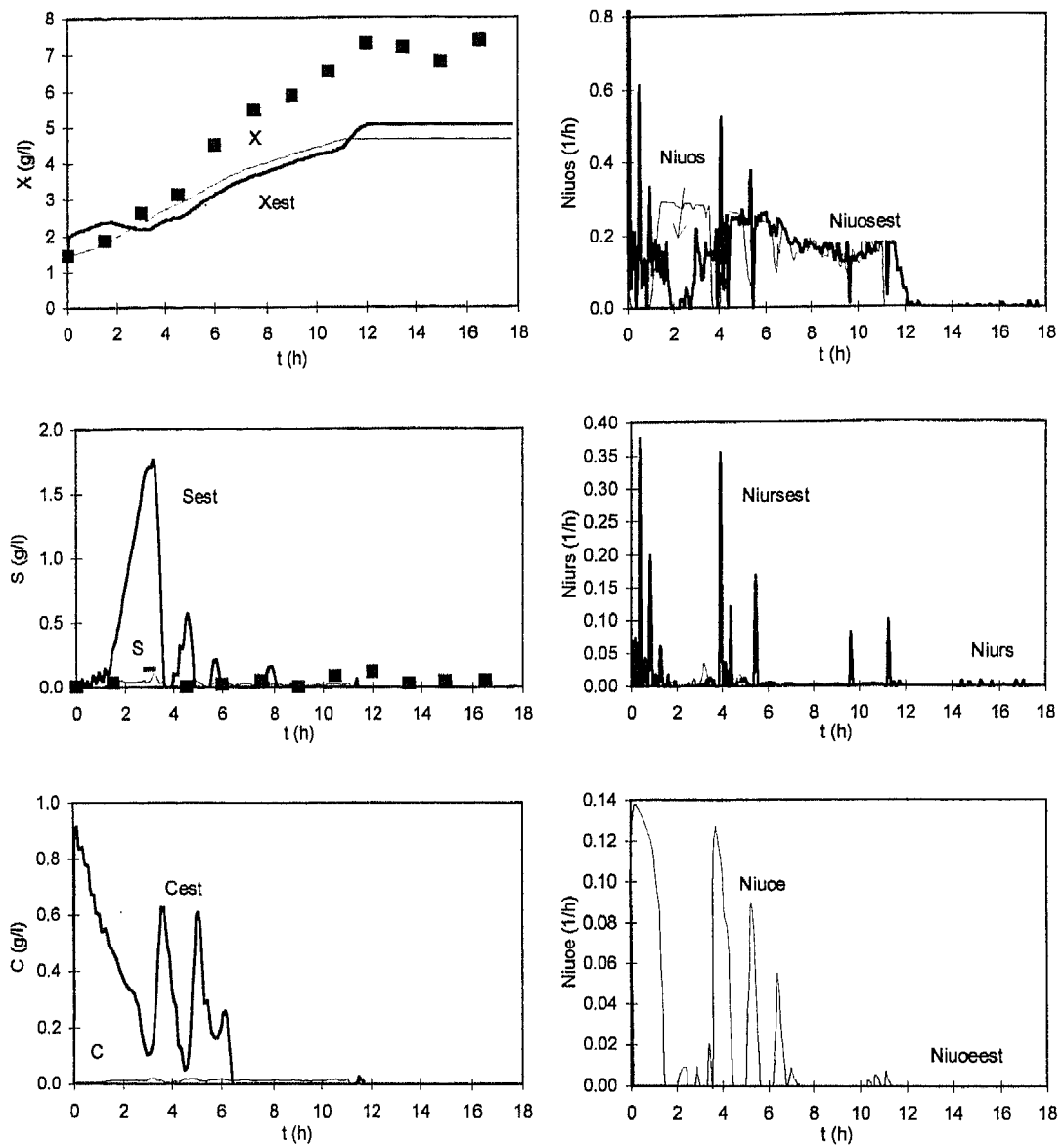


Figura A.7.14 EXPE03 - Valores de X , S e C experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

Também para esta experiência em regime de alimentação com melaços as estimativas obtidas quer no estado quer nas cinéticas são más.

A.7.2.3 Par E-C

Experiência EXPA10

A Figura A.7.15 apresenta as estimativas do estado e das cinéticas obtidas.

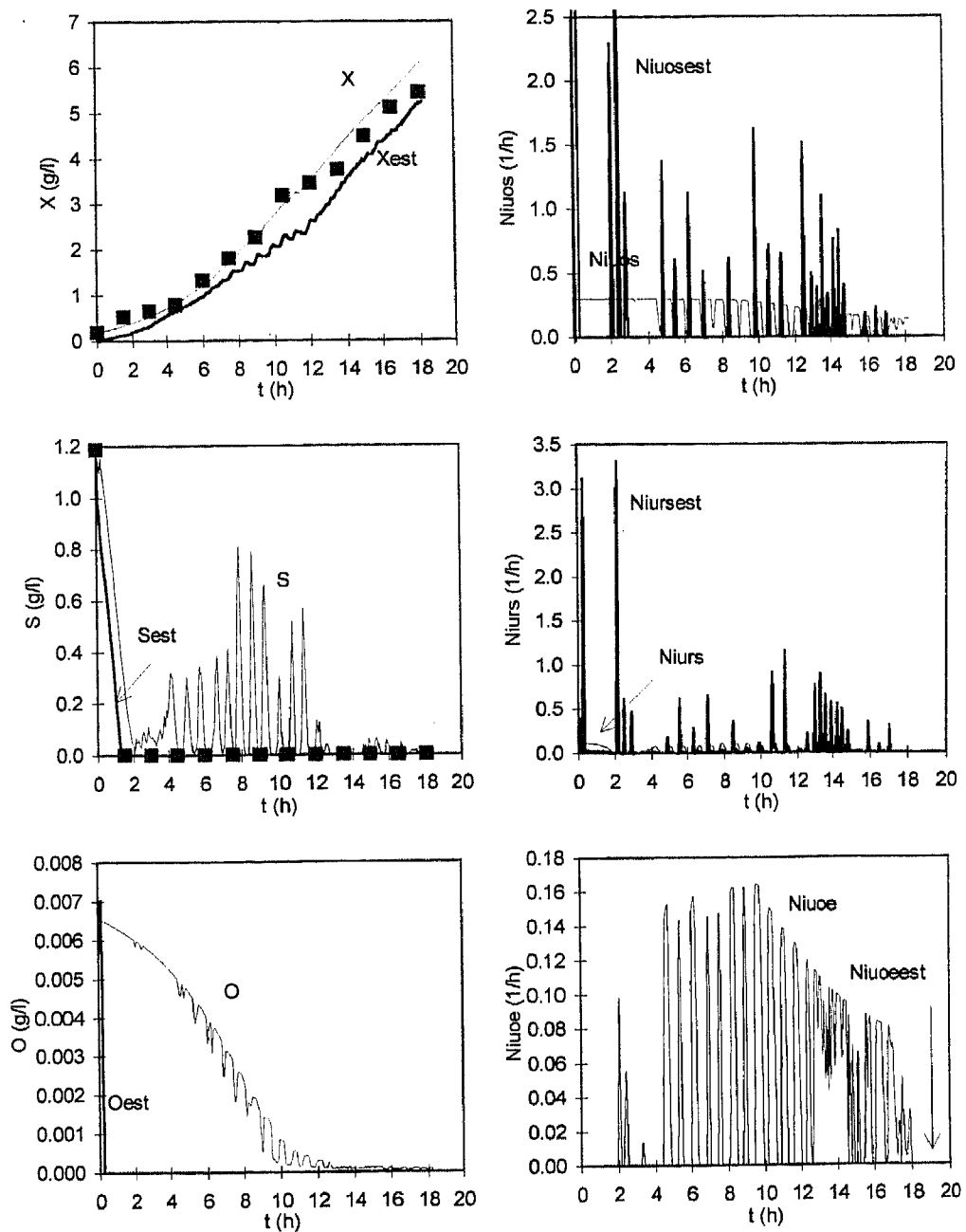


Figura A.7.15 EXPA10 - Valores de X , S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

Para esta experiência o desempenho do observador de biomassa é bom, sendo de qualidade sucessivamente inferior o observador da glucose e do oxigénio. No caso do oxigénio, poderá haver erros de integração numérica, dado que se está a trabalhar com concentrações da ordem das milésimas.

Experiência EXPE02

Esta experiência decorreu em regime de alimentação de melaços, segundo perfil de alimentação constante e igual a 0.15 l/h.

A Figura A.7.16 apresenta os perfis experimentais das medidas utilizadas, bem como os correspondentes perfis teóricos.

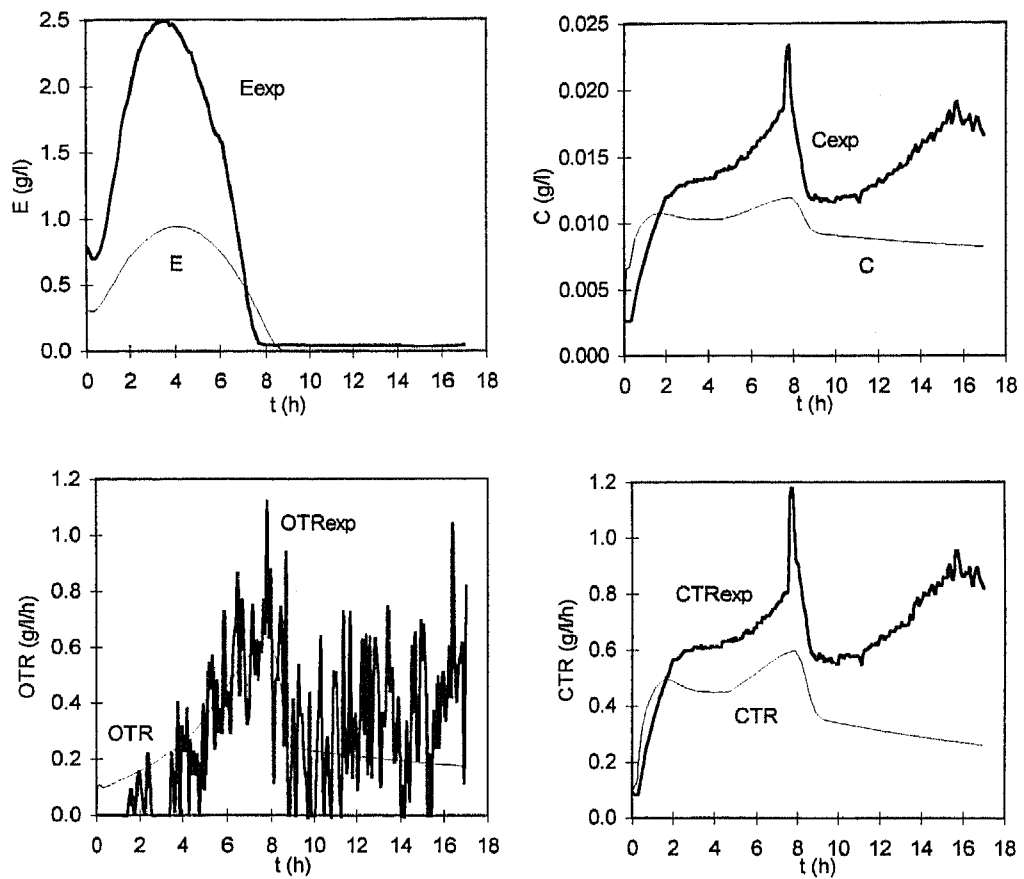


Figura A.7.16 EXPE03 - Valores de E, C, OTR e CTR experimentais (traço grosso) e do modelo teórico (traço fino)

A Figura A.7.17 apresenta as estimativas do estado e das cinéticas obtidas para este caso.

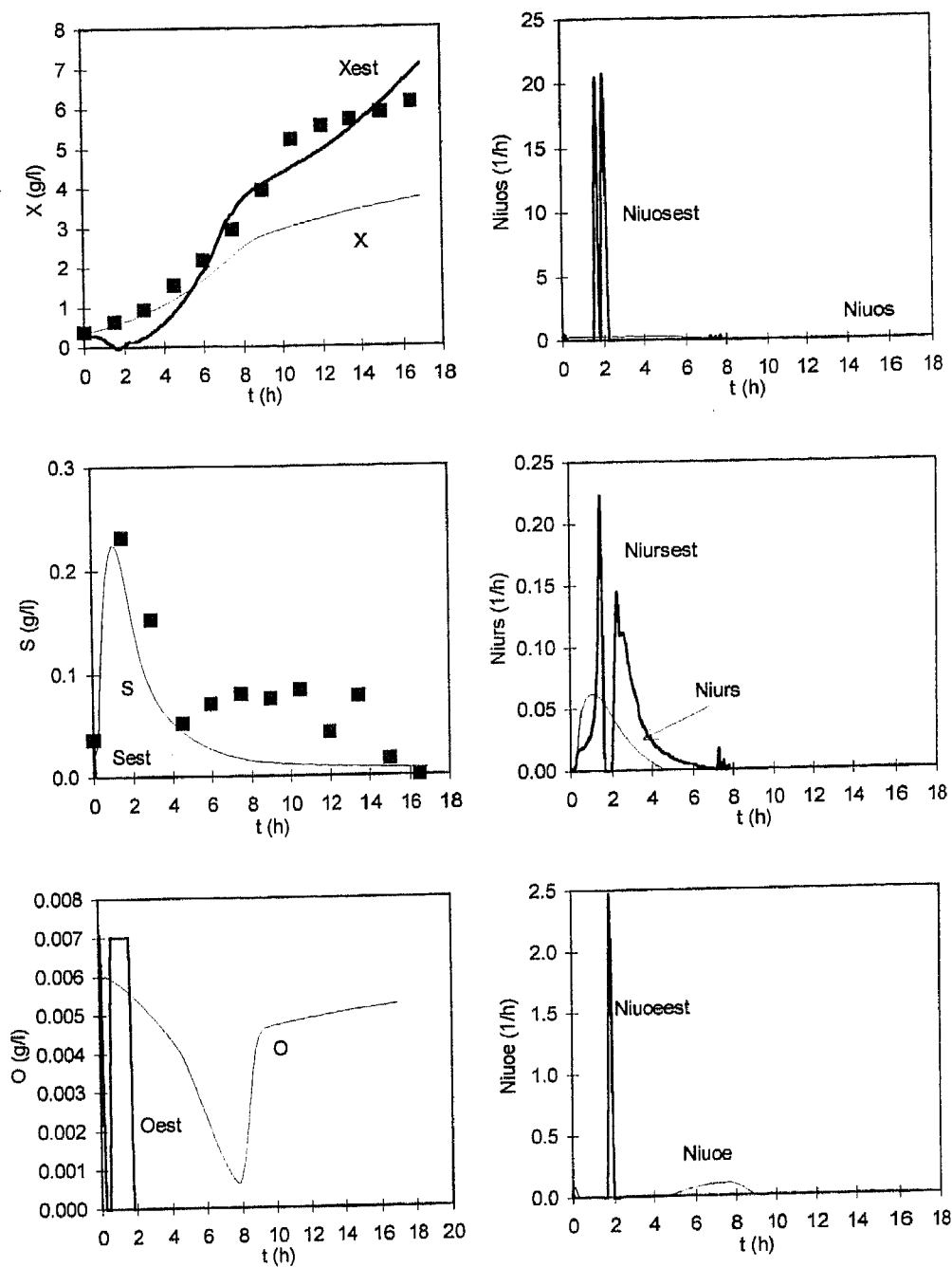


Figura A.7.17 EXPE02 - Valores de X , S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

Para esta experiência em regime de alimentação com melaços a estimativa obtida para o perfil de biomassa é bastante boa, o mesmo não se podendo afirmar dos outros observadores e estimadores.

Experiência EXPE03

A análise e conclusões efectuadas para a experiência anterior aplicam-se ainda a esta corrida (Figura A.7.18).

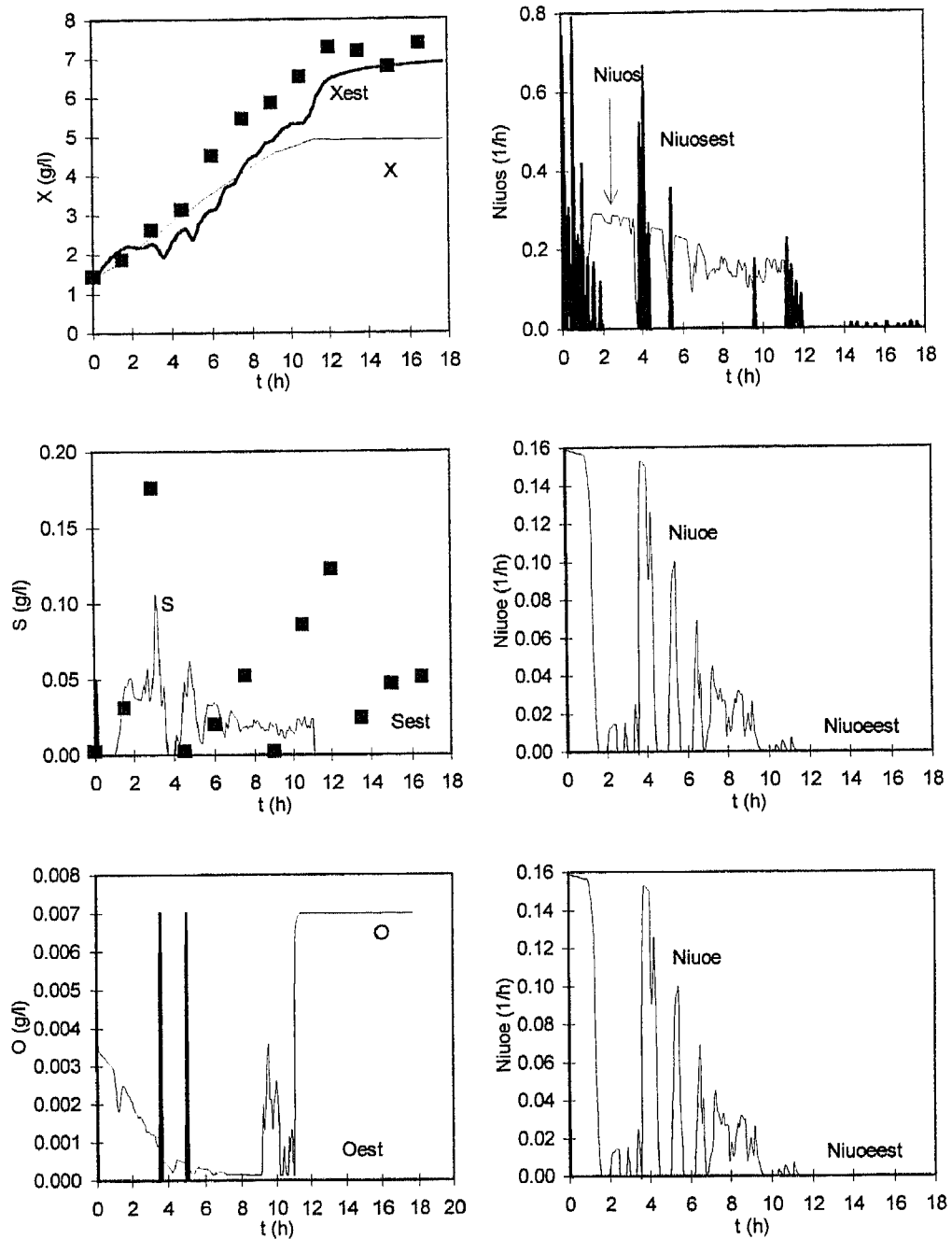


Figura A.7.18 EXPE03 - Valores de X , S e O experimentais (pontos), do modelo teórico (traço fino) e o observado (traço grosso); taxas cinéticas de crescimento de biomassa teóricas (traço fino) e observadas (traço grosso)

A.8. Controladores clássicos

Existe basicamente um tipo de controlador normalmente usado em ciclos de controlo por realimentação negativa. Apesar de cada fabricante apresentar detalhes de construção e de programação distintos, as suas funções básicas são inalteradas. Assim, fala-se em controladores PID, os quais implementam acções de controlo proporcional, integral e derivativa.

A equação matemática que os define é -

$$C(t) = C_{est} + K_c \left(Err(t) + \frac{1}{\tau_i} \int Err(t') dt' + \tau_d \frac{dErr}{dt} \right) \quad (\text{A.8.1})$$

em que:

- K_c ganho proporcional do controlador
- τ_i constante de tempo integral
- τ_d constante de tempo derivativo
- C_{est} acção de controlo em estado estacionário
- Err erro, calculado pela diferença entre o valor de referência e a medição da variável de saída,
 $Err = y_{ref} - y_m$
- C acção de controlo

A acção integral elimina o erro estacionário decorrente da acção proporcional isolada, mas poderá causar instabilidade na resposta do sistema ou mesmo saturação do controlador (fenómeno de saturação¹).

A acção derivativa tem um efeito antecipativo na resposta, dado que se baseia no cálculo da derivada do erro, atenuando normalmente o efeito oscilatório introduzido pela acção integral. Em grande parte, a acção derivativa melhora a resposta do sistema. Contudo, evita-se a sua aplicação em processos que apresentem muito ruído.

¹ Em inglês 'wind-up'.

A acção proporcional é sempre utilizada. As acções integral e derivativa complementam separadamente ou combinadas essa acção. Segundo Luyben (1990) provavelmente 60% dos controladores usados são do tipo PI (acção proporcional e integral), 20% são PID (acção proporcional, integral e derivativa) e 20 % são P (acção proporcional apenas).

A.8.1 Algoritmos de controlo discreto

A robustez dos algoritmos de controlo analógico e a crescente aplicação de sistemas digitais em controlo de processos levaram à criação da versão digital desses mesmos algoritmos.

Existem quatro versões de controladores PID, variantes da versão analógica: o algoritmo de posição, o de velocidade e respectivas modificações.

O algoritmo de posição

Um modo expedito de derivar a versão digital do controlador PID (eq. (A.8.1)) é substituir os termos integral e derivativo pelos seus equivalentes discretos. Assim, aproximando o integral por uma soma e a derivada pela diferença dividida de 1ª ordem vem-

$$C_n = C_{est} + K_c \left(Err_n + \frac{T}{\tau_i} \sum_{k=1}^n Err_k + \frac{\tau_d}{T} (Err_n - Err_{n-1}) \right) \quad (A.8.2)$$

em que C_n e Err_n são a acção de controlo e o erro, respectivamente, no instante n .

A equação anterior traduz o algoritmo de posição do controlo PID, dado que em cada instante é calculado o valor real (posição) do sinal de saída do controlador.

O algoritmo de velocidade

Este algoritmo calcula a variação do sinal de saída do controlador em relação ao instante imediatamente anterior.

$$\Delta C_n = C_n - C_{n-1} = K_c \left((Err_n - Err_{n-1}) + \frac{T}{\tau_i} Err_n + \frac{\tau_d}{T} (Err_n - 2Err_{n-1} + Err_{n-2}) \right) \quad (A.8.3)$$

ou explicitando C_n vem:

$$C_n = C_{n-1} + K_c \left((Err_n - Err_{n-1}) + \frac{T}{\tau_i} Err_n + \frac{\tau_d}{T} (Err_n - 2Err_{n-1} + Err_{n-2}) \right) \quad (A.8.4)$$

O algoritmo de velocidade tem certas vantagens sobre o algoritmo de posição, tais como-

- a) não necessita de inicialização, uma vez que não é necessário o valor da acção de controlo em estado estacionário, C_{est} ;
- b) protege contra eventual saturação do controlador ('wind-up'); no algoritmo de posição a parcela do somatório do erro no termo integral poderá provocar a saturação do controlador. No algoritmo de velocidade a acção de controlo está continuamente a ser alterada e, apesar de eventualmente atingir a saturação, bastará o erro mudar de sinal para a acção de controlo retornar para a gama de valores aceitáveis;
- c) protege contra falhas computacionais, dado que o sinal de saída é directamente enviado e retido pelo elemento final de controlo, evitando assim a perda total de controlo, caso haja uma falha computacional.

Um modo simples de eliminar o fenómeno de saturação no algoritmo de posição é definir uma gama de valores aceitáveis para o sinal de saída, fora do qual a acção de controlo no instante n será igual à do instante $n-1$, até deixar de existir saturação.

Um dos problemas até agora não referido é o chamado salto derivativo. Quando é feita uma variação no ponto estabelecido ambos os algoritmos de controlo apresentados produzirão uma mudança brusca no sinal de saída, devido ao termo derivativo. Existem diversos métodos para eliminar este salto derivativo, tal como refere Isermann (1981).

O método seguido neste trabalho traduz-se em aplicar a acção derivativa não ao erro mas à variável medida. Substituindo o erro pela diferença entre o ponto estabelecido e a variável medida-

$$Err = Y_{ref} - Y_m \quad (A.8.5)$$

nas equações dos dois algoritmos de controlo obtêm-se os dois algoritmos modificados referidos anteriormente-

O algoritmo de posição modificado

$$C_n = C_{est} + K_c \left(Err_n + \frac{T}{\tau_i} \sum_{k=1}^n Err_k + \frac{\tau_d}{T} (Y_{m_{n-1}} - Y_{m_n}) \right) \quad (A.8.6)$$

O algoritmo de velocidade modificado

$$C_n = C_{n-1} + K_c \left((Ym_{n-1} - Ym_n) + \frac{T}{\tau_i} Err_n + \frac{\tau_d}{T} (-Ym_n + 2Ym_{n-1} - Ym_{n-2}) \right) \quad (\text{A.8.7})$$

Todo este processo de implementação digital da acção de controlo traz subjacente operações de amostragem, discretização e quantificação. De salientar, a importância da escolha adequada do período de amostragem, afim de se evitar a perda de informação significativa. Uma amostragem demasiado lenta pode não só introduzir os chamados erros de 'aliasing' (Seborg *et al.*, 1989) como também pode limitar a capacidade da acção de controlo regulador. Por outro lado, uma frequência de amostragem excessivamente elevada pode corresponder a uma carga computacional desnecessária, impedindo o sistema de controlo de efectuar outras tarefas.

A.8.2 Bibliografia

Isermann, R., *Digital Control Systems*, Springer-Verlag, Berlin, 1981

Luyben, W.L., *Process Modeling, Simulation and Control for Chemical Engineers*, Mc Graw Hill, N.Y., 1990

Seborg, D.E., Edgar, T.F., Mellichamp, D.A., *Process Dynamics and Control*. John Wiley, New York, 1989.

A.9. Controlo adaptativo - estimador de dinâmica de segunda ordem

A dedução a seguir apresentada tem como base duas equações já apresentadas no capítulo 6, pelo que se optou pela sua transcrição.

A dinâmica de y , variável controlada, é escrita, genericamente, pelo seguinte modelo reduzido de entrada/saída:

$$\frac{dy}{dt} = -Dy + \theta^T \phi \quad (\text{A.9.1})$$

em que θ se refere aos parâmetros associados às matrizes de coeficientes de rendimento e ϕ , adiante chamado vector regressor, se refere às diferenças entre os vectores de entrada e de saída do reactor, variáveis conhecidas.

A solução geral do controlo adaptativo linearizante, para a presente situação, é obtida por:

$$D = \frac{1}{-y} \left[\frac{dy_{ref}}{dt} + \lambda_1 (y_{ref} - y) - \theta^T \phi \right] \quad (\text{A.9.2})$$

No caso de os coeficientes de rendimento presentes em θ serem mal conhecidos ou variáveis no tempo deve implementar-se uma versão adaptativa do controlador, englobando a estimação em linha dos parâmetros θ . A equação anterior é, então, reescrita como:

$$D = \frac{1}{-y} \left[\frac{dy_{ref}}{dt} + \lambda_1 (y_{ref} - y) - \hat{\theta}^T \phi \right] \quad (\text{A.9.3})$$

Nesta situação, a dinâmica do erro de controlo, $\tilde{y} = (y_{ref} - y)$, é calculada pela substituição da equação (A.9.3) na (A.9.1), obtendo-se:

$$\frac{d\tilde{y}}{dt} = \frac{d(y_{ref} - y)}{dt} = -\lambda_1 \tilde{y} - \tilde{\theta}^T \phi \quad (\text{A.9.4})$$

em que $\tilde{\theta} = (\theta - \hat{\theta})$.

Lei de adaptação de parâmetros segundo o projecto de Lyapunov

A técnica ou projecto de Lyapunov para a adaptação de parâmetros conduz à seguinte lei de adaptação:

$$\frac{d\hat{\theta}}{dt} = -\Gamma \phi(F, Q)(y_{ref} - y) \quad (\text{A.9.5})$$

em que $\phi(F, Q)$ é o vector regressor, função de F e Q , e Γ é a matriz de ganhos do estimador, definida positivamente.

A dinâmica do erro de estimação pode, então, ser escrito por:

$$\frac{d\tilde{\theta}}{dt} = \frac{d(\theta - \hat{\theta})}{dt} = \Gamma \phi \tilde{y} + \frac{d\theta}{dt} \quad (\text{A.9.6})$$

A dinâmica do sistema de erros formada pelo erro de controlo \tilde{y} , equação (A.9.4), e pelo erro de estimação $\tilde{\theta}$, equação (A.9.6), pode ser descrita por:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \tilde{y} \\ \tilde{\theta} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\lambda_1 & -\phi \\ \Gamma \phi & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \tilde{y} \\ \tilde{\theta} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} \frac{d\theta}{dt} \quad (\text{A.9.7})$$

cuja equação característica apresenta as raízes $0.5\lambda_1 \pm \sqrt{0.25\lambda_1^2 - \Gamma\phi^2}$ e λ_1 é o parâmetro do controlador.

Perrier e Dochain (1993) propõem fixar a dinâmica de ciclo fechado através da escolha de um pólo duplo real (equivalente a tornar o discriminante nulo), obtendo-se a seguinte relação entre os parâmetros do controlador e do estimador:

$$\Gamma = 0.25\lambda_1^2 \phi^{-2} \quad (\text{A.9.8})$$

Os ganhos do estimador são, deste modo, automaticamente fixados através da sintonização dos parâmetros do controlador.

Substituindo a equação anterior na equação de adaptação (A.9.5), obtém-se:

$$\frac{d\hat{\theta}}{dt} = -0.25\lambda_1^2 \phi^{-1}(y_{ref} - y) = -\gamma \phi^{-1}(y_{ref} - y) \quad (\text{A.9.9})$$

com $\gamma \equiv 0.25\lambda_1^2$.

Estimador de segunda ordem

Nota-se nesta última equação (Ferreira, 1995) uma semelhança com a equação de adaptação das taxas específicas empregue no estimador de dinâmica de resposta de 2ª ordem (capítulo 5).

Diferenciando para um dado θ_i , a equação de adaptação de θ , para γ constante, (equação (A.9.9) tem-se:

$$\frac{d^2\hat{\theta}_i}{dt^2} = -\frac{\gamma}{\phi_i} \frac{d\tilde{y}}{dt} + \frac{\gamma}{\phi_i^2} \frac{d\phi_i}{dt} \tilde{y} \quad (\text{A.9.10})$$

Combinando esta equação com (A.9.7) e rearranjando obtém-se a seguinte equação de 2ª ordem:

$$\frac{1}{\gamma} \frac{d^2\hat{\theta}_i}{dt^2} + \frac{1}{\gamma} \left(\lambda_1 + \frac{1}{\phi_i} \frac{d\phi_i}{dt} \right) \frac{d\hat{\theta}_i}{dt} + \hat{\theta}_i = \theta_i \quad (\text{A.9.11})$$

Definindo:

$$\gamma \equiv \frac{1}{\tau^2} \quad \text{e} \quad \lambda_1 \equiv \frac{2\zeta}{\tau} - \frac{1}{\phi_i} \frac{d\phi_i}{dt} \quad (\text{A.9.12}), (\text{A.9.13})$$

a equação (A.9.11) transforma-se em

$$\tau^2 \frac{d^2\hat{\theta}_i}{dt^2} + 2\zeta\tau \frac{d\hat{\theta}_i}{dt} + \hat{\theta}_i = \theta_i \quad (\text{A.9.14})$$

o que significa que cada $\hat{\theta}_i$ converge para o seu verdadeiro valor θ_i com uma dinâmica de resposta de segunda ordem com um período natural de oscilação τ e um coeficiente de amortecimento ζ .

Finalmente, a lei de adaptação é escrita em função de τ

$$\frac{d\hat{\theta}_i}{dt} = -\tau^{-2} \phi_i^{-1} (y_{ref} - y) \quad (\text{A.9.15})$$

A formulação baseada na dinâmica de convergência de 2ª ordem apresenta como vantagens a ligação da sintonização do controlador à sintonização do estimador através de dois parâmetros com algum significado físico - constante de tempo e coeficiente de amortecimento característicos dos sistemas de 2ª ordem. O ganho do controlador é, então, função do regressor $\phi(t)$, sendo portanto variável no tempo.

A.9.1 Bibliografia

- Ferreira, E. *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Biotecnológicos*. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Portugal, 1995.
- Perrier, M., Dochain, D. Evaluation of Control Strategies for Anaerobic Digestion Processes. *Int. J. Adaptive Control and Signal Processing*, 7, 309-321, 1993.

