



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Estudo Computacional-Experimental do
Comportamento Oscilatório em
Fermentações Contínuas com
Zymomonas mobilis.**

Anna Carolina Rapôso Camêlo

Recife-PE
Fevereiro, 2004

Anna Carolina Rapôso Camêlo

**Estudo Computacional-Experimental do
Comportamento Oscilatório em
Fermentações Contínuas com
Zymomonas mobilis.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof^o. Dr. Carlos Edison Lopes

Prof^o. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

Departamento de Engenharia Química da UFPE
2004

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2004 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

Prof. Dr. Carlos Edison Lopes
Departamento de Antibióticos - UFPE

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro
Departamento de Antibióticos - UFPE

Prof. Dr. Maurício Bezerra de Souza Junior
Escola de Química - UFRJ

Profª Dra. Maria Los Angeles Perez Fernandez Palha
Departamento de Engenharia Química - UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão,
Milton José Camêlo, Maria José Rapôso Camêlo
e André Frederico Rapôso Camêlo, pelo amor,
dedicação e formação do meu ser.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, que sem eles eu não seria o que sou hoje.

A Lucas Salgado Cole pelo companheiro, compreensão, amizade e amor e a Eduardo Cole, Ana Carmem Salgado Cole, Bruno Salgado Cole e Leonardo Cole Neto, por terem sido meus amigos e pelo amor existente entre nós.

Aos meus queridos orientadores e amigos Carlos Edison Lopes e Irapuan Oliveira Pinheiro, pelos ensinamentos, conversas, incentivo e dedicação deste trabalho.

Aos queridos mestres e amigos Alfredo Arnóbio da Gama e a Maria Los Angeles Palha, por terem sido os maiores incentivadores na minha busca pelo crescimento profissional.

À minha amiga do mestrado Tatiana, por todos os momentos vividos e dedicados em conjunto.

Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes, por ter cedido gentilmente as cepas de *Zymomonas mobilis*,

Aos meus amigos eternos, Ana Cristina, Eduardo Laureano, Paulo Roberto, Idevan Júnior, Niara, Renata, Thays, Geysa, Pedrinho, Paulo Negão e Tom por todo incentivo, carinho e amizade.

Às novas amigas Christine, Emanuelle e Marcela, do Departamento de Antibióticos, pelas conversas, pela amizade e pela dura rotina dividida durante um ano.

Aos colegas do Departamento de Antibióticos: Adriana, Rita, Cynthia Souza, Cíntia, Danilo, Vanda, Orlando, André Lacerda, Claudemir, André Coelho, Edélvio.

Ao Departamento de Engenharia Química e de Antibióticos da UFPE por todo apoio e estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

A *Capex*, pelo suporte financeiro durante todo desenvolvimento deste trabalho

“... eu sou mameluco, sou de Casa Forte, sou de Pernambuco, eu sou Leão do Norte...”

Lenine

SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Epígrafe	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	05
2.2. Fermentação Contínua	09
2.3. Modelos Cinéticos de Fermentação	11
2.3.1. Modelo de Limitação por Substrato	11
2.3.2. Modelo de Inibição por Produto	11
2.3.3. Modelo de Inibição por Substrato	13
2.3.4. Modelo de Inibição por Substrato e Produto	14
2.4. Estudo do Comportamento Oscilatório e Modelagem	16
2.5. Estudo da Dinâmica de Sistemas Fermentativos	19
2.5.1. Resultados Experimentais de Multiplicidade de Estados Estacionários em Biosistemas	20
2.5.2. Resultados Experimentais e teóricos de Comportamento Oscilatório em Biosistemas	20
2.6. Estudo da Dinâmica de Sistemas Não-Lineares	22
2.6.1. Estabilidade Linear e Não-Linear	23
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Microrganismo	34
3.2. Manutenção	34
3.3. Meio de Crescimento	34
3.4. Preparação do Inoculo	35
3.5. Equipamentos	36

3.6. Concentração de Células	36
3.7. Vazão Volumétrica	37
3.8. Concentração de Glicose e Etanol	38
3.9. Controle de Contaminação	38
3.10. Estudo Computacional	39
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Resultados Computacionais	42
4.2. Resultados Experimentais	59
4.2.1. Fermentação em Batelada	59
4.2.2. Fermentação Contínua	60
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES	69
5.1. Conclusões	70
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	71
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICES	
Apêndice 1: Curva Padrão para Determinação da Concentração do microrganismo <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11	
Apêndice 2: Instalação do AUTO no Linux Red Hat	
Apêndice 3: AUTO97 – Subrotina Particular para Utilização do AUTO	
Apêndice 4: Dados Experimentais das Fermentações Contínuas com Diferentes Taxas de Diluição	
ANEXO: Dados experimentais de fermentações contínuas.(LI, 1995)	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Estrutura dos principais hopanóides encontrados na membrana celular da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> .	7
FIGURA 2.2	Via de Entner-Duodoroff.	8
FIGURA 2.3	Comportamento dinâmico de um sistema bidimensional em diferentes combinações de valores característicos.	25
FIGURA 2.4	Diagrama de bifurcação tipo sela-nó ou dobra (fold).	27
FIGURA 2.5	Diagrama de bifurcação transcritical.	28
FIGURA 2.6	Diagrama de bifurcação supercrítico de forquilha.	29
FIGURA 2.7	Diagrama de bifurcação subcrítico de forquilha.	30
FIGURA 2.8	Diagrama de bifurcação de Hopf.	31
FIGURA 3.1	Esquema adotado no preparo do inóculo	34
FIGURA 3.2	Fermentador B. Braun Biotech International, modelo BIOSTAT®B	35
FIGURA 3.3	Fermentador New Brunswick modelo BIOFLO III	36
FIGURA 3.4	Sistema de controle da vazão volumétrica	37
FIGURA 4.1	Diagrama de bifurcação da concentração de biomassa (X) – Condição 1.	45
FIGURA 4.2	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 1.	45
FIGURA 4.3	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 1.	46
FIGURA 4.4	Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) proposto por Monod (1949)	47
FIGURA 4.5	Diagrama de bifurcação da concentração de biomassa (X)– Condição 2.	48
FIGURA 4.6	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S)– Condição 2.	48
FIGURA 4.7	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P)– Condição 2	49

FIGURA 4.8	Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) – Condição 01 com $S_F = 187$.	50
FIGURA 4.9	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 01 com $S_F = 187$.	50
FIGURA 4.10	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 01 com $S_F = 187$.	51
FIGURA 4.11	Diagrama de bifurcação com diferentes valores para concentração de alimentação	52
FIGURA 4.12	Diagrama de bifurcação da concentração de célula (X) – Condição 3	53
FIGURA 4.13	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 3.	53
FIGURA 4.14	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 3.	54
FIGURA 4.15	Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) – Condição 4.	54
FIGURA 4.16	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 4.	55
FIGURA 4.17	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 4	55
FIGURA 4.18	(a) Simulação dinâmica da condição 3 com diferente taxas de diluição: (•) $D = 0,02$, (– –) $D = 0,07$ e (—) $D = 0,14$. (b) Diagrama de bifurcação da condição 3.	56
FIGURA 4.19	Simulação Dinâmica da condição 04 em estudo.	57
FIGURA 4.20	Determinação da velocidade específica de crescimento.	58
FIGURA 4.21	Fermentação 1 – Biomassa – Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,06h^{-1}$).	59
FIGURA 4.22	Fermentação 1 – Substrato – Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,06h^{-1}$).	60
FIGURA 4.23	Fermentação 1 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,06h^{-1}$).	60
FIGURA 4.24	Fermentação 2 – Biomassa - Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,0675h^{-1}$).	61

FIGURA 4.25	Fermentação 2 – Substrato - Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,0675h^{-1}$).	61
FIGURA 4.26	Fermentação 2 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,0675h^{-1}$).	62
FIGURA 4.27	FIGURA 4.27: Fermentação 3 – Biomassa - Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,07h^{-1}$).	63
FIGURA 4.28	Fermentação 3 – Substrato – Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,07h^{-1}$).	63
FIGURA 4.29	Fermentação 3 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ($D = 0,07h^{-1}$).	64
FIGURA 4.30	Diagrama de bifurcação da concentração de célula (X) – Condição 3	64
FIGURA 4.31	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 3	65
FIGURA 4.32	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 3	6
FIGURA AI-1	Curva de calibração para a <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11	

LISTA DE SÍMBOLOS

X	–	concentração de células (g/L);
S	–	concentração de glicose (g/L);
S _F	–	concentração de glicose na alimentação (g/L);
S _i	–	concentração de glicose abaixo da qual não ocorre inibição
P	–	concentração de etanol (g/L);
P _{ma}		Parâmetro da equação 3.8 relacionado à inibição do crescimento por etanol (g/L);
P _{mb}		Parâmetro da equação 3.8 relacionado com a concentração acima da qual não há crescimento de células (g/L);
P _{me}		Parâmetro da equação 3.9 relacionado com a concentração acima da qual não há crescimento de células nem de etanol (g/L);
P _{ob}		Parâmetro da equação 3.8 relacionado com a concentração mínima para inibição do crescimento por etanol (g/L);
Z	–	Média ponderada de 2 ^a ordem da velocidade de variação da concentração de etanol (gL ⁻¹ h ⁻¹);
W	–	média ponderada de 1 ^a ordem da velocidade de variação da concentração de etanol (gL ⁻¹ h ⁻¹);
t	–	tempo (h);
D	–	taxa de diluição (h ⁻¹);
Y _{P/S}	–	Coefficiente de rendimento de glicose em etanol (g/g);
Q _P	–	Velocidade específica de produção de etanol (g/g-h);
Q _{Pmax}	–	Velocidade específica de produção de etanol máxima (g/g-h)
K _i	–	Parâmetro relacionado à inibição por substrato (g/L).
K _s	–	Parâmetro relacionado a saturação por substrato (g/L).
K _{mp}	–	parâmetro de saturação de substrato para taxa de produção de etanol (g/L)
μ _{max}	–	Velocidade específica de crescimento máxima (h ⁻¹);
μ(S, P, Z)	–	Velocidade específica de crescimento dinâmico (h ⁻¹);
μ(S, P)	–	Velocidade específica de crescimento instantâneo (h ⁻¹);
β	–	parâmetro da equação que pondera o peso da história da velocidade (h ⁻¹);
α		parâmetro da equação que pondera o peso da história da velocidade (h ⁻¹);
a e b		Parâmetros relacionados com a inibição de etanol no crescimento.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Composição do meio de crescimento	33
TABELA 3.2	Concentração utilizada do meio de crescimento	34
TABELA 4.1	Parâmetros utilizados no Modelo Dinâmico em fermentações com <i>Z. mobilis</i>	44
TABELA 4.2	Condições de operação da Fermentação 1	59
TABELA 4.3	Condições de operação da Fermentação 2	61
TABELA 4.4	Condições de Operação de Fermentação 3	63
TABELA A1.1	Modificação do arquivo “.bash_profile”	

RESUMO

Diversos relatos de comportamento oscilatório em fermentações contínuas em CSTBR's já foram feitos e os microorganismos que têm apresentado esse comportamento dinâmico mais frequentemente são *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. A ocorrência de oscilações pode favorecer ou prejudicar os processos bioquímicos. Desta forma, é fácil perceber a importância de estudar, através de modelagem e simulação, fermentações contínuas que apresentam tais comportamentos. Os objetivos deste trabalho foram estudar o modelo proposto por LI (1995), para representar o comportamento dinâmico da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29129 em fermentações contínuas utilizando o software computacional AUTO97, e realizar experimentos em fermentadores com *Zymomonas mobilis* Ag11 para confirmação dos comportamentos dinâmicos previstos. Os resultados computacionais mostram que os diagramas de bifurcação apresentam boa concordância com os resultados experimentais obtidos da literatura. Os comportamentos dinâmicos estudados incluem estado estacionário, oscilação amortecida e oscilação sustentada. Foram realizadas fermentações contínuas usando glicose como substrato limitante. Oscilações das concentrações de biomassa, substrato e etanol foram observadas, apresentando coerência com os diagramas de bifurcação.

Palavras chaves: Fermentação, Oscilação, Diagrama de Bifurcação, Modelagem, *Zymomonas mobilis*