

Descrição da fermentação batelada de *Lactobacillus acidophilus* la5 por modelo híbrido de rede neural e utilização das células em produção de ração animal

Tais Magalhães Abrantes Pinheiro ¹, Hemely Gonçalves ¹, Thaíssa Rodrigues Araújo ¹, Paula Rúbia Ferreira Rosa ¹, Vicelma Luiz Cardoso ¹, Ubirajara Coutinho Filho ¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química.
E-mail para contato: taisabrant@gmail.com

RESUMO – O soro de queijo é uma biomassa rica em nutrientes e muito abundante, podendo ser utilizada na produção de probióticos para alimentação animal e humana. Neste trabalho, foi estudado a fermentação de soro de queijo para produção de células probióticas em produtos para alimentação animal. Foi avaliado a utilização de modelo híbrido de rede neural e balanço de massa (MHRN) no estudo da produção das células. Foi observado que o MHRN foi capaz de representar de forma satisfatória a produção de biomassa, consumo de lactose, alteração da massa protéica, além de avaliar o declínio do crescimento celular que deve ser melhor investigado como fator responsável pela redução da viabilidade celular para células probióticas obtidas de meios fermentados com tempos de fermentação superiores a 40 horas.

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de soro de queijo no mercado é alta devido à proporção deste subproduto na produção do queijo, sendo que para cada quilo de queijo produzido gera-se 10 litros de soro. O soro é uma biomassa rica em nutrientes e, portanto, muito utilizada em vários processos fermentativos entre os quais a produção de enzimas, biogás, etanol, suplementos para alimentação animal e probióticos. Na produção de probióticos há um especial interesse pela espécie *Lactobacillus acidophilus* e trata-se de um tradicional probiótico. Esta espécie de bactéria facultativa exige um ambiente com baixa tensão de oxigênio para colonizar o intestino de seres humanos e outros animais (Corcoran *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2012; Nimrata, Boonthai, Vuthiphandchai, 2011)..

A avaliação da produção de células de *Lactobacillus acidophilus* pode ser realizada de diversas maneiras. Uma destas é a utilização de redes neurais artificiais (RNAs) que são capazes de processar informações para situações dinâmicas e avaliar diferentes problemas de natureza simples e complexa.

As RNAs são formadas por sistemas de cálculo com elementos chamados de nós ou neurônios que são capazes de processar informações por interconexão inspirados na estrutura e funcionamento de neurônios reais (Haykin, 2001; Silva *et al.*, 2000). A forma tradicional de funcionamento da RNA pode ser conceituada como uma caixa preta na qual nenhum conhecimento prévio sobre o processo é

necessário, ou seja, a rede neural constrói um modelo no qual o conjunto de neurônios tem sua capacidade de avaliar o fenômeno através de treino que tem como base entradas e saídas de informações associadas ao processo sem a necessidade de conhecimentos prévios como balanço de massa, cinética do processo ou outras informações. Esta forma de caixa preta de RNA tem como vantagem o fato de ser a única forma de modelar quando não há conhecimentos suficientes sobre o fenômeno e tem como crítica, principalmente para processo complexos, a necessidade de grande quantidade de observações e falhas associadas aos resultados que representem a extrapolações (Saraceno *et al.*, 2010; Baughman, Liu, 1995).

A forma caixa preta pode ser modificada pela associação da estrutura interna da RNA a um modelo que utiliza conhecimento prévio sobre o processo como, por exemplo, os balanços de massa de forma a constituir um modelo híbrido de rede neural (MHRN). Nesta situação os parâmetros associados ao conhecimento influem no treino da rede e o MHRN passa a gerar estimativas melhores de resultados e extrapolações de resultados mesmo com o uso de um menor número de pontos que as redes tradicionais (Psichogios, Ungar, 1992; Saraceno *et al.*, 2010).

Na Figura 1 é representada uma RNA tradicional (Fig.1a) e uma configuração de MHRN (Fig.1b). O MHRN gera os valores dos parâmetros (p) e as respostas do modelo construído com os princípios que descrevem o conhecimento do processo (por exemplo integração das equações de um modelo diferencial) gera respostas (d) que influem nos pesos que possibilitam a rede a ajustar os parâmetros necessários nas funções de transferência associadas aos neurônios. Uma exemplo que ilustra esta situação é considerar insatisfatório os pesos toda vez em que as respostas obtidas não tiverem sentido físico, como, por exemplo, a situação que estas são negativas quando fisicamente devem ser positivas (Psichogios, Ungar, 1992; Saraceno *et al.*, 2010).

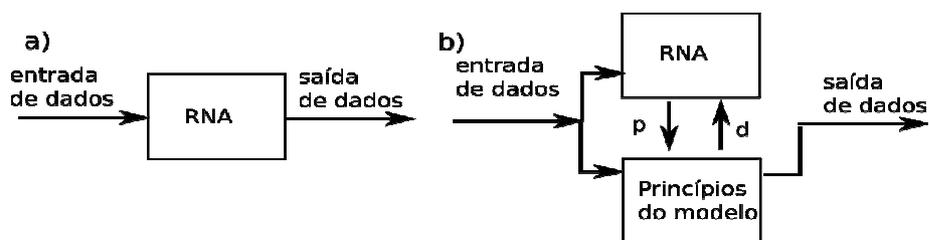


Figura 1: a) RNA tradicional; b) MHRN (Psichogios, Ungar, 1992-adaptado)

O presente trabalho tem como objetivo estudar a produção de células de *Lactobacillus acidophilus* em soro de leite utilizando o MHRN, avaliar a estabilidade das células geradas neste estudo para diferentes tempos de fermentação e avaliar as previsões associadas ao MHRN que podem ser de alguma forma associada a previsão da estabilidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e Fermentação

Foi utilizado *Lactobacillus acidophilus* La5 cultivado por fermentação batelada em soro de queijo reconstituído nas condições otimizadas presentes na literatura (Rosa *et al.*; 2013) correspondentes a concentração de lactose de 31,0 g/L, pH de 6,45 e 1,04 g/L de inóculo.

2.2. Métodos analíticos

A concentração de lactose tanto no meio fermentado não hidrolisado quanto no meio hidrolisado foi determinada por ensaio espectrofotométrico com glicose oxidase. A biomassa de lactose foi calculada pelo balanço $L=1,9(G_2 - G_1)$, no qual L representa a concentração de lactose e G_1 , G_2 são as concentrações de glicose antes e depois da hidrólise ácida (20 μ L HCl 11,5 mol/L; 90 °C; 5 min). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry, 1951) e a concentração de células foi determinada pela massa seca, após centrifugação do meio.

2.3. Avaliação das fermentações por redes neurais com RNA e MHRN

O sistema híbrido foi avaliado em programa de rede neural escrito em linguagem R. O programa apresenta:

- multicamadas (duas camadas ocultas);
- um número variável de neurônios em cada camada oculta e um máximo de buscas dos pesos dos nós (N=2000 e 20000);
- taxa de aprendizagem de 0,002;
- momento linear igual à 0,2 com função de transferência tangente hiperbólica para as camadas ocultas e função de transferência linear para camada de saída.

No ajuste dos pesos das redes foi definido que a maior diferença de concentração entre os valores previstos e experimentais do modelo fosse inferior ao valor fixo (neste trabalho 0,1 g/L) ou que fosse atingido o número máximo de buscas apresentado. O modelo de Verlhust (Sistema de Equações representadas em Eq. 1) com parâmetros ajustados pela RNA foi utilizado para comparar os resultados obtidos como MHRN (Sistema de Equações representadas em Eq. 2) que estima três respostas associadas ao sistema μ , V_L e V_P sem associar estas respostas a nenhum modelo específico.

Nestes modelos "X" é a concentração de células de lactobacilos (g/L), "L" a concentração de lactose (g/L), "P" a concentração de proteína (g/L). Os parâmetros μ_m , X_m , Y_{LX} representam, respectivamente, a máxima velocidade de crescimento celular (h^{-1}), máxima concentração celular (g/L), coeficiente estequiométrico que relaciona a massa de lactose com a massa de células (g/g). Já as variáveis μ , V_L e V_P são, nesta ordem, a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}), velocidade de consumo do substrato ($g.L^{-1}.h^{-1}$) e a velocidade de redução da concentração do proteína ($g.L^{-1}.h^{-1}$).

Sistema de equações que utilizam Verlhust ajustado pela RNA :

$$dX/dt = \mu_m \cdot X(1 - X/X_m) \quad \text{e} \quad dL/dt = Y_{LX} \cdot dX/dt - m \cdot X \quad (1)$$

Sistema de equações ajustadas pelo MHRN :

$$dX/dt = \mu X, \quad dL/dt = -V_L \quad \text{e} \quad dP/dt = -V_P \quad (2)$$

No uso do modelo de Verlhust não foi calculada a concentração de proteína, pois esta não pode ser explicada como função exclusiva do consumo pelas células, uma vez que a proteína precipita ao longo do processo. No MHRN foi utilizado como descrito na literatura (Psichogios, Ungar, 1992; Saraceno *et al.*, 2010): os valores de μ , V_L e V_P foram estimados para os diferentes tempos e foram utilizados para solução das equações diferenciais do sistema (2) e as soluções obtidas de X , L e P foram utilizadas pela rede para avaliar o treinamento dos neurônios.

2.4. Avaliação das células na produção de insumos para ração animal

As células obtidas por fermentação de 40, 60 e 80h foram centrifugadas e secas em estufa de circulação forçada a 45 °C por 2h e submetidas à teste de viabilidade que foi definido como a avaliação da perda de viabilidade após o armazenamento por 5 dias. Nesta avaliação a quantificação das células foi feita por plaqueamento em ágar MRS (Rosa *et al* 2013). A viabilidade celular foi definida como percentagem de células vivas restantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 representa os valores médios das concentrações obtidas em duplicata para fermentação de soro de queijo. Pode-se observar que o crescimento celular se encerra após 48 horas de fermentação, enquanto o consumo de substrato não reduz após este tempo, o que pode ser explicado pelo metabolismo associado à manutenção das células ativas.

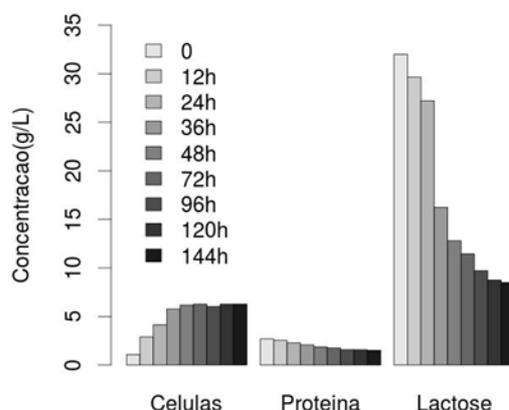


Figura 2 – Valores experimentais obtidos na fermentação de *Lactobacillus acidophilus* La5 (31 g/L de lactose, pH 6.45 e 1.04 g/L de inóculo)

Na Tabela 1 são apresentados os quatro melhores resultados da avaliação da configuração da RNA segundo o modelo descrito pelas equações de Verlhust, para o número máximo de 2000 buscas e configurações de rede com duas camadas ocultas com número de neurônios variáveis entre 2 e 6 neurônios. Os maiores erros foram obtidos para a concentração de lactose e embora nenhuma das redes tenha gerado a diferença entre concentração final inferior a 0,1 g/L (para lactose), pode-se observar que a configuração com três neurônios na primeira camada oculta ($N_1=3$) e seis na segunda ($N_2=6$) foi a que melhor representou o sistema. Os erros apresentados com 20000 buscas não foram menores do que os erros apresentados para 2000 buscas.

Tabela 1: Parâmetros do modelo e quantidades de neurônios na primeira camada oculta (N_1) e segunda camada oculta (N_2) para o uso de rede neural híbrida

Camadas	Erro máximo (g/L)	Parâmetros
$N_1=3, N_2=6$	7,78	$\mu_M=0,173 \text{ h}^{-1}, Y_{LX}=6,088 \text{ g/g}, X_M=6,008 \text{ g/L}$ e $m=0,000182 \text{ h}^{-1}$
$N_1=4, N_2=3$	11,51	$\mu_M=0,0973 \text{ h}^{-1}, Y_{LX}=3,89 \text{ g/g}, X_M=6,008 \text{ g/L}$ e $m=0,000295 \text{ h}^{-1}$
$N_1=4, N_2=6$	10,57	$\mu_M=0,115 \text{ h}^{-1}, Y_{LX}=4,46 \text{ g/g}, X_M=6,008 \text{ g/L}$ e $m=0,000303 \text{ h}^{-1}$
$N_1=2, N_2=5$	12,42	$\mu_M=0,0860 \text{ h}^{-1}, Y_{LX}=3,565 \text{ g/g}, X_M=6,008 \text{ g/L}$ e $m=0,00002831 \text{ h}^{-1}$

Na Figura 3 são apresentados os resultados fornecidos pelo modelo proveniente da RNA que melhor representa os dados experimentais (Tab. 1) correspondente a $N_1=3, N_2=6$. Pode-se observar que a RNA foi capaz de gerar parâmetros que integrados avaliam corretamente o término do crescimento, mas não foi capaz de representar adequadamente a concentração de lactose no final do processo. Esta situação se deve ao fato que o uso de um modelo específico associado à rede neural (no presente trabalho o modelo de Verlhust) restringe a capacidade da rede. Rosa e colaboradores (2013) observaram que o uso de outros modelo como Mond e Contois não forneceram resultados melhores que o obtido que o uso da RNA para obter valores fixos de μ_m, Y_{LX}, m e X_M .

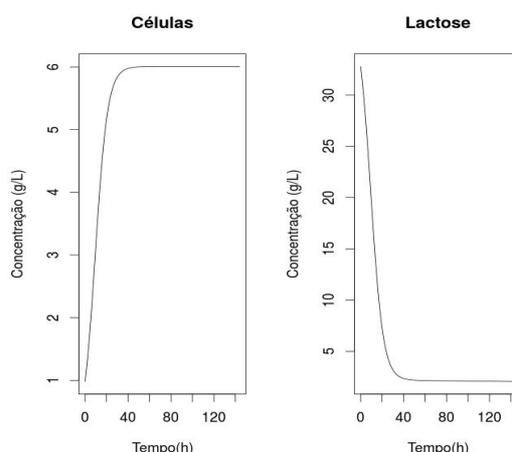


Figura 3: Concentrações de células e lactose simuladas a partir dos parâmetros da RNA com duas camadas ocultas de 3 e 6 neurônios ($\mu_M=0,173 \text{ h}^{-1}, X_M=6,08 \text{ g/L}, Y_{LX}=6,09 \text{ g/g}$ e $m=0,000182 \text{ h}^{-1}$).

Na Figura 4 são apresentados os resultados da rede neural híbrida sem o uso de um modelo específico na descrição do crescimento e consumo das células e mesma arquitetura de rede descrita anteriormente (duas camadas ocultas com $N_1=3$ e $N_2=6$ neurônios artificiais). Nesta nova situação o erro máximo obtido foi de 5.46% correspondente a estimativa de 11,1 g/L de lactose para 96h de fermentação (o valor experimental para este tempo é de 11,8 g/L). Pode-se observar que o uso do modelo híbrido tornou a rede capaz de descrever de forma mais adequada o consumo de lactose do soro e expressar a alteração da concentração de proteína avaliada experimentalmente. No MHRN também foi observado que a máxima concentração celular ocorre para 77h (6,09 g/L) e para 144h houve uma redução nesta concentração para 96,5% (5,88 g/L) do valor máximo.

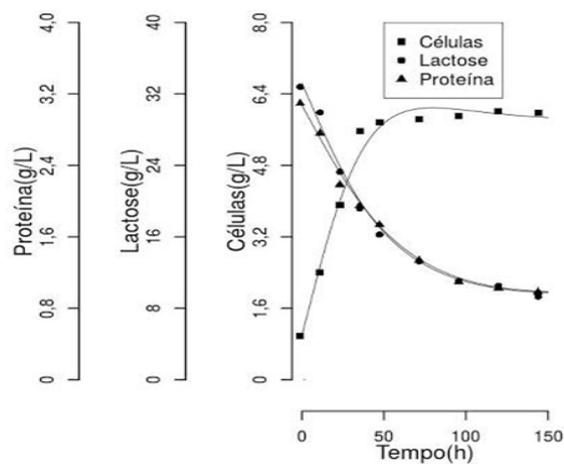


Figura 4: Concentrações de células (■), lactose (●) e proteína (▲) obtidas na rede neural híbrida com três e seis neurônios ($N_1=3$, $N_2=6$) nas camadas ocultas.

Na Figura 5 são apresentados os parâmetros cinéticos estimados pelo MHRN. Pode-se observar que a velocidade específica de crescimento celular (μ) é decrescente com valores negativos para tempos superiores a 81h ($\mu=-3.26.10^{-6} h^{-1}$ para $t=81h$ e $\mu=-7.73.10^{-4} h^{-1}$ para $t=144h$). A velocidade de consumo do substrato atinge o máximo ($V_L=0,4144 g/L.h$) para 10h ou seja até este tempo tem-se um maior consumo de substrato mesmo com a redução da velocidade de crescimento celular progressiva. Fato semelhante também é observado para redução de proteína o que sugere que a cinética possa ser melhor descrita por modelos estruturados, nos quais o consumo de lactose e proteína devem ser associados a mecanismos internos das células.

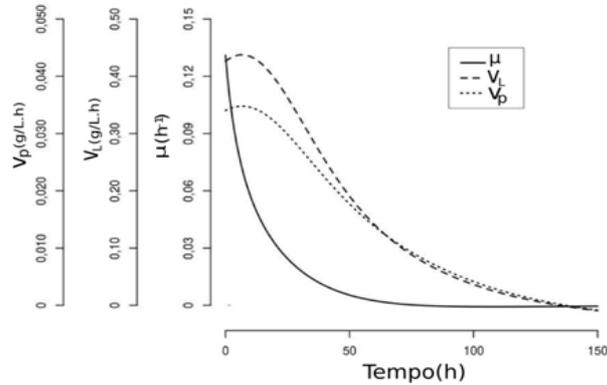


Figura 5: Valores das velocidades de geração de células (μ) e consumo de proteína (V_P) e lactose (V_L) fornecidos pelo MHRN

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da porcentagem de células viáveis restantes após cinco dias de preparo das células secas retiradas do meio de fermentação de soro de queijo após 40, 50 e 60h de fermentação. Pode-se observar que embora os resultados obtidos, Figura 3, indiquem que para tempos superiores a 40 horas a manutenção da concentração das células ocorra pelo consumo da lactose, a estabilidade das células é reduzida para os tempos superiores a 40h. Uma hipótese desta mudança na viabilidade corresponde ao envelhecimento das células. O MHRN faz a previsão do envelhecimento das células, mas este assunto merece ser melhor investigado, porque o tempo previsto de 77 horas é superior ao obtido experimentalmente (Tabela 2).

Tabela 2: Viabilidade celular após 5 dias de armazenamento (concentração inicial de células no produto de 10^8 células/g) obtida para preparações secas de células obtidas de diferentes tempos de fermentação de soro de queijo

Tempo de fermentação (h)	40	50	60
Viabilidade (% células vivas)	20	18	18

4. CONCLUSÃO

O modelo de rede neural híbrido (MHRN) se mostrou mais apropriado na descrição da fermentação de *Lactobacillus acidophilus* La5 do que o modelo de RNA associado a Verlhust. Os resultados da viabilidade das células obtidas e a previsão do MHRN sugerem que a influência do tempo de fermentação merece ser melhor investigada como fator importante na estabilidade das células probióticas obtidas no fim da fermentação e que nesta descrição modelos mais elaborados de MHRN serão capazes de melhores previsões.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq , CAPES, FAPEMIG (Processo PCE-00089-14) e UFU pelo apoio ao presente trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- BAUGHMAN, D.R. LIU, Y.A. Neural network in bioprocessing and chemical Engineering. Academic Press, 488p, 1995.
- CORCORAN, B. M. , STANTON, C , FITZGERALD, G.F , ROSS, R.P. (2005) Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 6, 3060–3067.
- HAYKIN, S. Redes Neurais: Princípios e práticas, trad. Paulo Martins Engel. 2ed. Porto Alegre: Bookman, 900 páginas, 2001.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J, *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265–275, 1951.
- NIMRATA, S., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V., (2011). Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*, 169 , 244–258
- PSICHOGIOS, D. C. ; UNGAR, L. H. A Hybrid Neural Network-First Principles Approach to Process Modeling October 1992 Vol. 38, No. 10, p. 1499-1511
- SANCHEZ, B, RUIZ, L, GUEIMONDE, M, RUAS-MADIEDO, P. , MARGOLLES, A. (2012) Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 56-63
- BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1 polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, p. 532-537, 2010.
- ROSA, P.R.; SA, E.M.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V.L. Immobilized *Lactobacillus acidophilus* produced from whey and alginate. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, No. 02, 267 - 276, 2013.
- SARACENO, A.; CURCIO, S.; CALABRO, V.; IORIO, G. A hybrid neural approach to model batch fermentation of ricotta cheese whey to ethanol. *Comp. and Chem. Eng. Trans.*, v.34, p. 1590-1596, 2010.
- SILVA, R.G.; CRUZ, A.J.G.; HOKKA, C.O.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. A hybrid feedforward neural network model for the cephalosporin C production process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, São Paulo-Brazil, v. 17, n.04-07, p. 587-597.