

Redes neurais artificiais aplicadas para o estudo da produção de ácido succínico via processo fermentativo

ANDRADE, Flaviana Diuk*; GONZALES, Tatiane**; ALEGRE, Ranulfo Monte**; DUARTE, Elis Regina****

Resumo

O ácido succínico, metabólito comum de microrganismos, utilizado no mercado alimentício é produzido exclusivamente por via fermentativa e grande atenção tem sido dada para o uso de matérias-primas renováveis para esse fim. Este trabalho teve como objetivo determinar as variáveis que influenciam na produção de ácido succínico por via fermentativa utilizando a cepa *Actinobacillus succinogenes* (CIP 106512) por meio de um planejamento fatorial fracionário e testar diferentes arquiteturas de redes neurais artificiais para modelar esse processo. As redes neurais artificiais (RNAs) utilizadas possuem três camadas e foram do tipo *Multilayer Perceptron* (MLP), com o algoritmo de aprendizagem *Backpropagation*. Utilizaram-se 13 e 6 dados experimentais para a aprendizagem e teste das redes, respectivamente. Variaram-se os números de neurônios da camada intermediária, a taxa de aprendizagem e as funções de ativação. Após a avaliação das arquiteturas, verificou-se que a função de ativação sigmoideal apresentou um melhor desempenho comparada à tangente hiperbólica e que o número de neurônios e taxa de aprendizagem influenciam diretamente no erro. O modelo neural que apresentou o menor erro quadrático foi a rede com a função sigmoideal, taxa de aprendizagem 0,1 e 5 neurônios na camada intermediária. Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível determinar as variáveis que mais influenciam na produção do ácido succínico e a construção do modelo neural para o processo.

Palavras-chave: Biotecnologia. Inteligência artificial. Modelagem. Otimização.

Artificial neural networks applied to the production of succinic acid by fermentation

Abstract

The succinic acid is a microorganism common metabolite used in the food market which is produced exclusively by fermentation, and great attention has been given to the use of renewable raw materials for this purpose. This study

* Aluna de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Ponta Grossa.

** Mestre e aluna doutoranda pela Universidade Estadual de Campinas.

*** Professor-doutor pela Universidade Estadual de Campinas.

**** Professora-doutora pela Universidade Estadual de Ponta Grossa; erduarte@uepg.br

aimed to determine the variables that influence the production of succinic acid by fermentation using *Actinobacillus succinogenes* strain (CIP 106512) through a fractional factorial design and to test different architectures of artificial neural networks to model this process. Artificial neural networks are made of three layers and were the Multilayer Perceptron (MLP) type, with Backpropagation learning algorithm. Experimental data for learning and testing of networks were used, 13 and 6, respectively. The number of neurons in the hidden layer, learning rate and activation functions was varied. After evaluation of architectures, it was found that the sigmoidal activation function showed a better performance than the hyperbolic tangent and that the number of neurons and learning rate directly influence the error. The neural model with the lowest squared error was the network with the sigmoid function, learning rate 0,1 and 5 neurons in the intermediate layer. This work allowed to determine which variables most influence in the succinic acid production and in the construction of the neural model for this process.

Keywords: Biotechnology. Artificial intelligence. Modeling. Optimization.

1 INTRODUÇÃO

O ácido succínico é um ácido dicarboxílico considerado um dos mais importantes produtos químicos e pode ser usado como precursor do 1,4-butanodiol e tetraidrofurano (ZEIKUS; JAIN; ELANKOVAN; SONG; LEE, 2006). O ácido succínico e seus derivados possuem ampla aplicação como polímeros biodegradáveis, tintas, detergentes, reguladores de crescimento de plantas e aditivos alimentares (ZEIKUS; JAIN; ELANKOVAN, 1999; WU; ZHOU; YE, 2007). No entanto o ácido succínico utilizado no mercado de alimentos é produzido unicamente por processo fermentativo (GIACOMELLI et al., 2004).

Este ácido é produzido industrialmente por meio de processo de síntese química a partir do butano, altamente poluente por ser baseado em petróleo, que é transformado em anidrido maleico, hidrogenado para anidrido succínico e hidratado para ácido succínico (GLASSNER et al., 1995). Pode ser obtido como intermediário do ciclo ácido tricarboxílico (TCA) e como um dos produtos de fermentação do metabolismo anaeróbico, pois é um metabólito comum formado pelas plantas, animais e microrganismos (NGHIEM et al., 1997; VALENTINE, 1999; LEE et al., 2002; MOON et al., 2004).

As matérias-primas da produção de ácido succínico na indústria petroquímica são caras, não renováveis e causam sérios problemas de poluição. Por isso, grande atenção tem sido concedida à utilização de matérias-primas renováveis, mediante fermentação anaeróbica para a produção de ácido succínico, que está entre os produtos químicos de valor agregado a partir de biomassa (WERPY; PETERSEN, 2004; DORADO et al., 2009; ZHENG et al., 2010; LI; SILES; THOMPSON, 2010; YU et al., 2010). Segundo McKinlay, Vieille e Zeikus (2007), a produção de ácido succínico por fermentação a partir de recursos renováveis e de dióxido de carbono, um dos gases do efeito estufa, poderia ser mais rentável do que a produção de processos baseados em petróleo.

Para a produção fermentativa de ácido succínico vários estudos já foram realizados e investigada uma grande variedade de microrganismos, como *Mannheimia succiniciproducens* (Kim

et al., 2009), *Actinobacillus succinogenes* (GUETTLER; RUMLER; JAIN, 1999; URBANCE et al., 2003), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (NGHIEM et al., 1997), *Escherichia coli* (WU et al., 2007), *Fibrobacter succinogenes* S85 (NOUAILLE et al.; 2004), *Corynebacterium glutamicum* (OKINO et al.; 2008), e *Aspergillus awamori* e *Aspergillus oryzae* (DU et al., 2008). Para cada microrganismo foram utilizadas de diferentes fontes, segundo Guettler, Rumler e Jain (1999), entre as linhagens de produção de ácido succínico, o *Actinobacillus succinogenes* tem grande potencial porque pode converter diferentes fontes de carbono em ácido succínico. Entre esses microrganismos, o *Actinobacillus succinogenes* e o *Anaerobiospirillum succiniciproducens* têm sido mais intensamente estudados devido à sua capacidade de produzir uma quantidade relativamente grande de ácido succínico (SONG; LEE, 2006).

A modelagem é uma ferramenta computacional que tem sido aplicada em diversos processos biotecnológicos (CHEN et al., 2000; MELEIRO; MACIEL FILHO, 2000; TATJEWSKI, 2007; MELEIRO; ZUBEN; MACIEL FILHO, 2009; RIVERA et al., 2010), em que é necessário considerar as não linearidades inerentes dos processos que apresentam dinâmica complexa. A aplicação de (RNA's) na modelagem, otimização e simulação de processos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, por serem modelos matemáticos que possuem estrutura e comportamento parecidos com o do cérebro humano (BRAGA; CARVALHO; LUDERMIR, 2007). Sua estrutura é formada por neurônios que são interligados entre si por canais de informação, chamados de interconexões. Estas, por sua vez, possuem um peso que armazena o conhecimento da rede e cada neurônio calcula os sinais enviados pelas interconexões que gera um novo peso enviado para a próxima camada.

Os objetivos deste trabalho foram: determinar as variáveis que influenciam na produção de ácido succínico por via fermentativa utilizando a cepa *Actinobacillus succinogenes* (CIP 106512) por meio de um planejamento fatorial fracionário e testar diferentes arquiteturas de redes neurais artificiais para modelar esse processo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

2.1.1 Microrganismo, meio de cultivo e obtenção do inóculo

Para a realização dos experimentos, foi inoculada a cepa *Actinobacillus succinogenes* (CIP 106512), obtida do Instituto Pasteur (França), em ágar inclinado TSA (Trypticase Soy Agar – BBL) com os seguintes componentes para o seu crescimento (em g.L⁻¹ de água deionizada): extrato de levedura 5,0; NaHCO₃ 10,0; NaH₂PO₄.H₂O 8,5; K₂HPO₄ 15,5.

Depois do meio ser esterilizado, foi ajustado o seu pH para 7 com HCl 6N. Foram adicionadas asepticamente ao meio soluções de carboidratos previamente autoclavadas separadamente, em que as concentrações finais de cada meio são de acordo com os níveis do planejamento.

2.1.2 Condições de cultivo

Em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 80 ml do meio, foi inoculada a cultura do tubo com ágar inclinado. Esses meios de culturas foram mantidos em temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm durante aproximadamente 16h em incubadora refrigerada orbital, para a obtenção do inóculo.

Para fazer as fermentações foram utilizados frascos de penicilina contendo 30 ml de meio com CO₂ na fase gasosa. Após o meio ser esterilizado por 15min a 121 °C, foi inoculado com 5% (v/v) de inóculo e incubado nas condições de agitação e temperatura de acordo com os níveis do planejamento por 24 horas.

2.1.3 Planejamento experimental

Para verificar as variáveis que influenciam na produção de ácido succínico, foi utilizado um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF 2⁵⁻¹) (com adição de três réplicas no ponto central, totalizando 19 ensaios), onde as variáveis são as concentrações de glicose e extrato de levedura, temperatura, pH inicial e agitação e a resposta à produção de ácido succínico.

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário e seus níveis codificados e reais

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Glicose (g.l ⁻¹) X ₁	19,29	30,88	42,45
Ext.Levedura (g.l ⁻¹) X ₂	5	8	11
Temperatura (°C) X ₃	33	37	41
pH inicial X ₄	6	7	8
Agitação (RPM) X ₅	100	200	300

Fonte: os autores.

A significância e os efeitos de cada variável na produção de ácido succínico foram analisados utilizando-se o *Software Statistic 5.5*.

2.1.4 Métodos analíticos

O crescimento celular foi analisado por densidade ótica a 660 nm (OD_{660}) com um espectrofotômetro UV-visível. A massa celular foi estimada usando uma curva padrão de densidade ótica *versus* peso de células secas. As concentrações de glicose residual e ácido succínico foram analisadas em HPLC (LaChrom Elite®, 22350 VWR-Hitachi column oven International GmbH, Darmstadt, Germany) equipado com uma coluna de troca iônica Metacarb 67H (Varian, Palo Alto, USA) com temperatura da coluna de 50 °C e 0,005N H_2SO_4 como fase móvel a um fluxo de 0,6 ml.mim⁻¹.

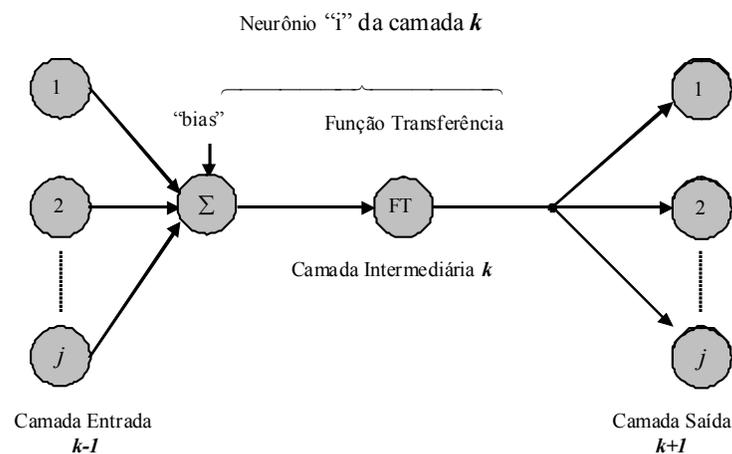
2.2 MODELO BASEADO EM REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Para o desenvolvimento do modelo foram utilizadas redes neurais artificiais, do tipo *Multilayer Perceptron Neural Network* (MLP), principalmente pela sua arquitetura de fácil compreensão e uma forma matemática simples, o que resulta em uma ferramenta fácil para modelagem e otimização. A seguir são discutidos elementos topológicos importantes na construção do modelo neural.

2.2.1 Arquitetura da rede

Em redes do tipo MLP o fluxo das informações segue a direção no sentido da entrada dos dados para a saída (*forward*) e consiste em três tipos de camadas (Figura 1). Primeiramente os dados do sistema vão para a camada de entrada e seguem para a camada intermediária que processa as informações e as envia até a camada de saída de dados, conforme as Equações 1 e 2.

Figura 1 – Camadas de Rede Neural Artificial



Fonte: os autores.

$$S_i^{(k)} = w_{i,0}^{(k)} + \sum_{j=1}^{(n_{k-1})} w_{i,j}^{(k)} X_j^{(k-1)} \quad (1)$$

$$X_i^{(k)} = f(S_i^{(k)}) \quad (2)$$

Considerando um neurônio “i” da camada “k”, recebe um conjunto de informações “ $X_j^{(k-1)}$ ”, correspondentes as saídas “ n_{k-1} ” dos neurônios da camada anterior, ponderadas, cada uma, pelo correspondente peso da conexão “ $w_{i,j}^{(k)}$ ”. O neurônio soma essas entradas ponderadas e o valor resultante é por sua vez somado a um limite interno de ativação, um bias que pode ser descrito por “ $w_{i,0}^{(k)}$ ”. A esse sinal resultante, o neurônio “i” produz uma resposta “ $X_i^{(k)}$ ”, de acordo com uma função limite ou função de ativação $f(\cdot)$, sendo normalmente aplicadas as funções sigmoidal ou tangente hiperbólica.

Cada camada pode ter um número diferente de neurônios que são interligados por meio de parâmetros ajustáveis (pesos) que estão reunidos. Os neurônios das camadas de entrada e saída estão associados às condições iniciais e as respostas do sistema, respectivamente. O número de neurônios da camada intermediária é que vai determinar a complexidade da rede (HAYKIN, 2008). Aumentando o número de neurônios, tem-se uma maior complexidade da rede, o que pode exigir um maior tempo computacional para ajuste dos parâmetros. Dessa forma, estes devem ser avaliados para cada sistema, buscando otimizar a arquitetura da rede (STRAPASSON, 2003).

Diversas pesquisas foram desenvolvidas na área de otimização de processos biotecnológicos comprovando que os dados obtidos mediante de um *design* de experimentos é suficiente para a construção de uma modelo neural eficiente (BAS; BOYAC, 2007; SARACENO et al., 2010).

Para o desenvolvimento do modelo neural foram avaliadas arquiteturas de redes formadas por três camadas. A camada de entrada é composta por cinco neurônios e a camada de saída por um neurônio. As variáveis de entrada foram a glicose (X_1), extrato de levedura (X_2), temperatura (X_3), pH inicial (X_4) e agitação (X_5); e a variável de saída foi o ácido succínico após um tempo de fermentação de 24 horas, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} com os níveis das variáveis e resposta de ácido succínico (continua)

Ensaio	Glicose (g.l ⁻¹)	Levedura (g.l ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	Ácido 24 horas (g.l ⁻¹)
Ensaio 1*	42,45	11	41	8	300	13,08
Ensaio 2	42,45	11	41	6	100	3,84
Ensaio 3	42,45	11	33	8	100	7,82

Tabela 2 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁵⁻¹ com os níveis das variáveis e resposta de ácido succínico (conclusão)

Ensaio	Glicose (g.l ⁻¹)	Levedura (g.l ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	Ácido 24 horas (g.l ⁻¹)
Ensaio 4*	42,45	11	33	6	300	3,68
Ensaio 5	42,45	5	41	8	100	10,50
Ensaio 6	42,45	5	41	6	300	3,08
Ensaio 7	42,45	5	33	8	300	7,36
Ensaio 8*	42,45	5	33	6	100	2,38
Ensaio 9*	19,29	11	41	8	100	11,99
Ensaio 10	19,29	11	41	6	300	2,91
Ensaio 11	19,29	11	33	8	300	4,07
Ensaio 12	19,29	11	33	6	100	3,31
Ensaio 13*	19,29	5	41	8	300	13,47
Ensaio 14	19,29	5	41	6	100	4,28
Ensaio 15	19,29	5	33	8	100	9,54
Ensaio 16*	19,29	5	33	6	300	3,94
Ensaio 17*	30,87	8	37	7	200	9,56
Ensaio 18	30,87	8	37	7	200	8,05
Ensaio 19	30,87	8	37	7	200	9,51

Fonte: os autores.

*Nota: Ensaio utilizados para testar.

2.2.2 Aprendizagem da rede

Aprendizagem é a modificação sistemática dos pesos sinápticos das conexões entre os neurônios das diversas camadas, de modo a armazenar o conhecimento apresentado à rede (HAYKIN, 1994).

Para o treinamento das redes ambos os dados de entrada e saída foram escalados em um intervalo de 0,1 até 0,9. Para iniciar os pesos e biases utilizaram-se pequenos números randômicos. Subsequentemente, os pesos foram ajustados por meio do algoritmo de aprendizagem *backpropagation* (BISHOP, 1995), baseado no método de gradiente descendente e implementado em Fortran.

O algoritmo de aprendizagem apresenta basicamente duas etapas. Na primeira, os neurônios da camada de entrada são apresentados à rede, propagados pela camada intermediária por meio dos pesos até a camada de saída. A rede é fornecida com a resposta desejada para os sinais de entrada. A saída prevista d_i e a saída desejada $X_i^{(k)}$ são comparadas com uma outra e o erro é calculado entre a saída prevista e a saída real. O critério de erro utilizado nesta rede é o erro quadrático médio. Na segunda etapa, o erro gerado pela saída é então retropropagado e os pesos das conexões reajustados proporcionalmente ao erro, o que dá o ajuste $\Delta w_{i,j}^{(k)}$ no peso de uma conexão entre os neurônios j e i conforme a Equação 3:

$$\Delta w_{i,j}^{(k)} = 2\eta \delta_i^{(k)} X_j^{(k-1)} \quad (3)$$

Onde η é a taxa de aprendizagem, $\delta_i^{(k)}$ é o erro equivalente e i é um neurônio de saída ou um neurônio oculto. Para os neurônios de saídas, o erro equivalente ocorre pela Equação 4:

$$\delta_i^{(k)} = (d_i - X_i^{(k)})f'(S_i^{(k)}) \quad (4)$$

E para os neurônios da camada intermediária, segue a Equação 5:

$$\delta_i^{(k)} = f'(S_i^{(k)}) \sum_{l=1}^{n_{k+1}} (\delta_l^{(k+1)} w_{l,i}^{(k+1)}) \quad (5)$$

Como não há saídas de destino para os neurônios ocultos, na Equação 5, a diferença entre saída de destino e real de um neurônio oculto i passa a ser a soma ponderada dos $\delta_l^{(k+1)}$ termos já obtidos para os neurônios l ligados à produção de i .

Assim, de forma iterativa, começando com a camada de saída, o termo δ é computado para os neurônios em todas as camadas e atualiza o peso determinado para todas as conexões.

A taxa de aprendizagem η é um termo que influencia diretamente na escolha da melhor arquitetura da rede, pois relaciona a velocidade de aprendizagem da rede. Pode variar entre 0 e 1.

O conjunto de dados utilizados para aprendizagem e teste das redes foram os 19 ensaios obtidos pelo planejamento fatorial fracionário, onde, destes 19 ensaios, 14 foram usados para o treinamento e 5 para o teste da rede (conforme a Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta as diferentes arquiteturas testadas para determinação do modelo neural, com variações do número de neurônios na camada intermediária, a taxa de aprendizagem e a função de ativação. Para avaliar a performance das redes foram considerados os erros quadráticos de cada arquitetura.

Tabela 3 – Arquiteturas de Redes Estudadas para o Modelo Neural

Camada oculta	Neurônios na camada oculta	Função de ativação	Taxa de aprendizagem
1	2 -20	Sigmoidal	0,1-0,5-0,9
1	2 -20	Tangente hiperbólica	0,1-0,5-0,9

Fonte: os autores.

Em seguida, as redes neurais com arquiteturas diferentes são treinadas com o conjunto de dados de treinamento, e seus desempenhos são avaliados em sua capacidade de fazer previsões corretas do conjunto de dados de validação em termos de erro quadrado médio (MSE), de acordo com a seguinte equação:

$$MSE = \sum_{l=1}^{n_k} (d_l - X_l^{(k)})^2 \quad (6)$$

Na Equação 6, d_l é o parâmetro de saída desejada e $X_l^{(k)}$ é a predição das redes neurais, que neste estudo é a produção de ácido succínico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES: ACRESCENTAR OUTROS ESTUDOS PARA A PRODUÇÃO DOS ÁCIDOS ANTERIORES

3.1 VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

Analisando os efeitos das variáveis na produção de ácido succínico de acordo com o planejamento fatorial fracionário, foi observado que as variáveis “glicose” e “extrato de levedura” apresentaram efeito negativo, (aproximadamente 0,1), não significativo, indicando que deveríamos diminuir a concentração de ambas no meio de cultivo. Os autores Lin et al. (2008) também relataram a diminuição significativa na produção de ácido succínico com a concentração de glicose acima de 100 g/l. Em estudos anteriores, outras fontes de carbono foram usadas, obtendo-se quantidades relativamente grandes de ácido succínico, como arabinose, frutose, galactose, lactose, malse, xilose, sacarose, entre outras (ANDERSSON et al., 2007).

As variáveis temperatura e pH foram as que apresentaram maior efeito sobre a produção de ácido succínico (2,57 e 6,24), indicando que devemos utilizar níveis maiores de temperatura (41 °C) e pH (8). Van der Werf; Guettler e Jain (1997) relataram que células do crescimento foram afetadas negativamente em pH baixo, possivelmente refletindo maior necessidade de manutenção em menor valores de pH. Lee et al. (1999) também observaram que no aumento do pH para 7,2 houve uma diminuição no rendimento de ácido succínico.

A variável agitação apresentou efeito negativo (-0,59), porém não significativo, devendo utilizar um menor nível de agitação para uma maior produção de ácido succínico (Tabela 4).

De acordo com Borges, Souza e Pereira Junior (2010), as variáveis que mais influenciaram na produção de ácido succínico foram pH, temperatura e extrato de levedura. Em estudos realizados por Zhang et al. (2011), a produção de ácido succínico foi maior para os níveis de glicose e extrato de levedura mais altos, adicionando também carbonato de magnésio, com a finalidade de moderar a queda do pH durante a fermentação.

Tabela 4 – Efeitos estimados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a resposta de ácido succínico (24 horas)

	Efeito	Erro padrão	t (2)	p-valor
Média	6,72	0,49	13,77	<0,0001
Glicose	0,11	1,06	0,10	0,9205
Extrato de levedura	0,10	1,06	0,09	0,9248
Temperatura ^a	2,57	1,06	2,42	0,0308
pH ^a	6,24	1,06	5,87	<0,0001
Agitação	-0,59	1,06	-0,55	0,5911

Fonte: os autores.

3.2 CONSTRUÇÃO DO MODELO NEURAL

A Tabela 5 apresenta os resultados do Erro Quadrado Médio, para as diferentes arquiteturas propostas (Tabela 3) utilizando como função de ativação a sigmoidal e tangencial.

Tabela 5 – Erro médio quadrático para as Arquiteturas Estudadas

Neurônios da camada intermediária	Sigmoideal			Tangente hiperbólica		
	$\eta = 0,1$	$\eta = 0,5$	$\eta = 0,9$	$\eta = 0,1$	$\eta = 0,5$	$\eta = 0,9$
2	0,3389	0,3085	0,4450	0,0776	0,1673	0,2928
3	0,1621	0,1787	0,1803	0,0954	0,3887	3,6081
4	0,1557	0,1807	0,0875	0,1010	0,2444	4,7127
5	0,0094	0,0708	0,0600	0,0269	2,4258	3,7710
6	0,0123	0,0871	0,0765	0,5195	3,7614	0,4369
7	0,0356	0,1652	0,1028	1,4567	3,3246	3,7002
8	0,0298	0,0792	0,0633	0,6649	2,5582	0,2501
9	0,0804	0,0747	0,0689	0,8234	0,1875	3,7672
10	0,0576	0,0883	0,0996	1,7970	0,2468	6,9395
11	0,0567	0,0835	0,0670	1,3971	4,3786	3,5842
12	0,0466	0,0733	0,0675	1,5178	3,4638	3,7710
13	0,0504	0,0731	0,0565	1,7358	6,4516	5,3256
14	0,0419	0,0778	0,0621	2,2367	3,5165	5,3256
15	0,0205	0,0452	0,0503	2,7732	0,1325	5,3256
16	0,0391	0,0818	0,0621	2,6417	4,7299	5,3256
17	0,0159	0,1003	0,1386	2,6430	3,5825	1,9915
18	0,0308	0,0778	0,0524	2,8925	3,5842	1,9915
19	0,0357	0,0775	0,0646	1,8624	3,4939	8,4947
20	0,0384	0,0654	0,0723	1,5076	4,6875	0,2501

Fonte: os autores.

Na Tabela 5 observa-se que os menores erros quadráticos para a função sigmoidal, para as taxas de aprendizagem estudadas (0,1, 0,5 e 0,9), foram apresentados com redes formadas com 8, 15 e 15 neurônios na camada intermediária.

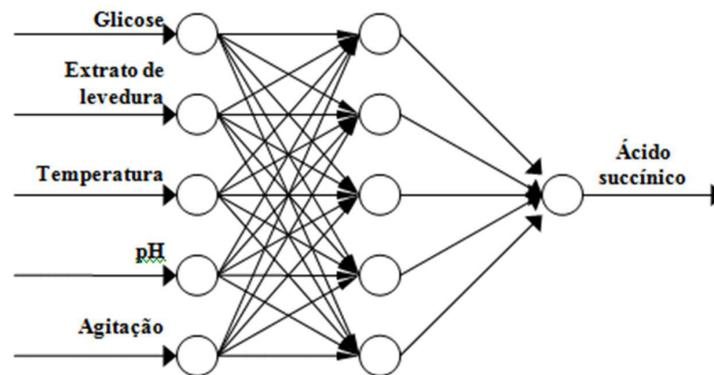
Os resultados do erro quadrático para a função de ativação tangente hiperbólica também são apresentados na Tabela 5 e pode-se observar que os valores dos erros são maiores comparados com a função sigmoidal. Os menores erros quadráticos para as taxas de aprendizagem estudadas (0,1, 0,5 e 0,9), foram apresentados com redes formadas com 5,15 e 20 neurônios na camada intermediária.

Dessa forma, pode-se observar que comparando o elemento topológico “taxa de aprendizagem”, quanto maior for o valor deste elemento, maior será o número de neurônios

necessários na camada intermediária, para a rede apresentar menores erros. Além disso, o aumento no número de neurônios na camada intermediária não significa uma diminuição do erro analisado, pois este aumento gera uma maior complexidade da rede.

O menor erro quadrático foi observado para a rede com a função sigmoideal, cinco neurônios na camada intermediária e taxa de aprendizagem 0,1, sendo esta a topologia escolhida para representar o modelo neural, formado pelas cinco entradas (glicose, levedura, temperatura, pH e agitação) e uma saída (ácido) (Figura 2).

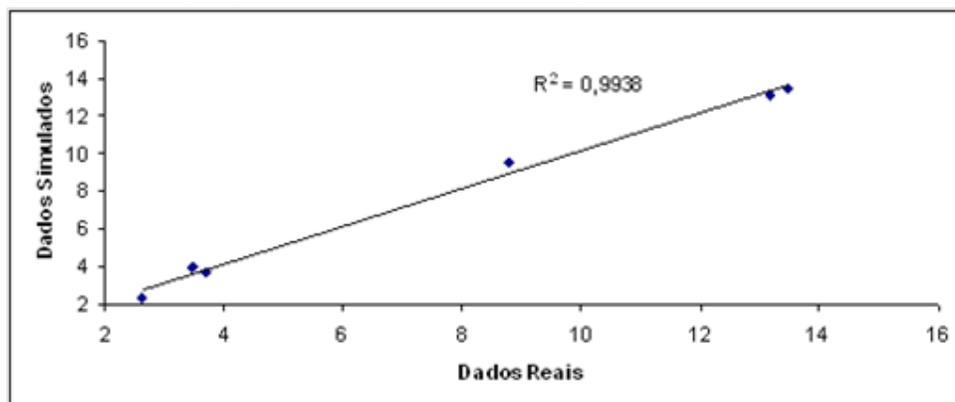
Figura 2 – Arquitetura do Modelo Neural



Fonte: os autores.

O Gráfico 1 mostra a comparação dos valores experimentais e dos valores gerados pelo modelo neural selecionado. Pode-se observar que a rede conseguiu representar o processo com um alto valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 99,38\%$), demonstrando que o modelo neural teve um ótimo ajuste, pois os valores gerados estão muito próximos dos valores reais.

Gráfico 1 – Comparação dos dados reais e simulados pelo Modelo Neural



Fonte: os autores.

4 CONCLUSÃO

Para uma otimização da produção de ácido succínico, de acordo com o planejamento fatorial fracionário, concluímos que as variáveis temperatura e pH apresentaram maior influência, devendo utilizar para os meios de cultura os maiores níveis de temperatura e pH, 41 °C e 8, respectivamente.

Para as arquiteturas estudadas se pode concluir que no processo estudado, a função de ativação sigmoidal apresentou um melhor desempenho comparada à tangente hiperbólica. Quanto menor for a taxa de aprendizagem (velocidade) menores os erros quadráticos apresentados e menor o número de neurônios necessários na camada intermediária, para um número fixo de iterações. As melhores arquiteturas para as funções de ativação sigmoidal e tangente hiperbólica foram com taxa de aprendizagem de 0,1 e 5 neurônios na camada intermediária. A rede escolhida para representar o modelo neural é composta por cinco neurônios na camada intermediária, função de ativação sigmoidal e taxa de aprendizagem de 0,1.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, C. et al. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Process**, v. 23, p. 381-388, 2007.

BAS, D.; BOYAC, I. H. Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 846-854, 2007.

BISHOP, C. M. **Neural networks for pattern recognition**. Oxford: Oxford University Press, 1995.

BORGES, E. R.; SOUZA, L. B. R; PEREIRA JUNIOR, N. Study of Succinic Acid Production by *Actinobacillus Succinogenes*. **Jornal of Life Sciences**, v. 4, p. 5-12, 2010.

BRAGA, A. P.; CARVALHO, A. C.; LUDERMIR, T. B. **Redes Neurais Artificiais: teoria e aplicações**. 2. ed. São Carlos: LTC, 2007.

CHEN, L. et al. Hybrid modeling of biotechnological processes using neural networks. **Control Engineering Practice**, n. 8, p. 821-827, 2000.

DORADO, P.; LIN, S.K.C.; KOUTINAS, A.; DU, C.; WANG, R.H.; WEBB, C. Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 51-59, 2009.

DU, C. et al. A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid. **Bioresour. Technol**, v. 99, n. 17, p. 8310-8315, 2008.

GIACOMELLI, F. C. et al. Inhibitor effect of succinic acid on the corrosion resistance of mild steel: electrochemical, gravimetric and optical microscopic studies. **Materials Chemistry and Physics**, v. 83, p. 124-128, 2004.

GLASSNER, D. A. et al. Purification Process for succinic acid produced by fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 51/52, p. 73-82, 1995.

GUETTLER, M. V.; RUMLER D.; JAIN M. K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 1, p. 207-216, 1999.

HAYKIN, S. **Neural Networks a Comprehensive Foundation**. New York: Macmillan Collge Publishing, 1994.

_____. **Redes neurais: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

KIM, T.Y. et al. In silico analysis of the effects of H₂ and CO₂ on the metabolism of a capnophilic bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. **Journal Biotechnology**, v. 144, p. 184-189, 2009.

LEE, P.C. et al. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 49-55, 1999.

_____. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* (MBEL55E), from bovine rumen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 663-668, 2002.

LIN, S. K. C. et al. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 128-135, 2008.

LI, Q.; SILES, J. A.; THOMPSON, I. P. Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentations of *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 671-678, 2010.

MCKINLAY, J. B.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Prospects for a bio-based succinate industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 727-740, 2007.

MELEIRO, L. A. C.; ZUBEN, F. J. V.; MACIEL FILHO, R. Constructive learning neural network applied to identification and control of a fuel-ethanol fermentation process. **Engineering Applications of Artificial Intelligence**, v. 22, p. 201-215, 2009.

MELEIRO, L. A. C.; MACIEL FILHO, R. A self-tuning adaptive control applied to an industrial large scale ethanol production. **Computers and Chemical Engineering**, v. 24, p. 925-930, 2000.

MOON, S. K. et al. Production of fumaric acid using rice bran and subsequent conversion to succinic acid through a two-step process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 843-855, 2004.

NGHIEM, N. P. et al. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 565-576, 1997.

NOUAILLE, R. et al. Production of maltodextrin 1-phosphate by *Fibrobacter succinogenes* S85. **FEBS Letters**, v. 576, p. 226-230, 2004.

OKINO, S. et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 459-464, 2008.

RIVERA, E. C. et al. Development of real-time state estimators for reaction-separation processes: A continuous flash fermentation as a study case. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, p. 402-409, 2010.

SARACENO, A. et al. A hybrid neural approach to model batch fermentation of “ricotta cheese whey” to ethanol. **Computers & Chemical Engineering**, v. 34, p. 1590-1596, 2010.

SONG, H.; LEE, S. Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 352-361, 2006.

STRAPASSON, R. A. **Otimização das variáveis do bioprocesso de fermentação no estado sólido para produção de ácido fumárico a partir de resíduos agroindustriais, utilizando redes neurais**. 2003. 112 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

TATJEWSKI, P. **Advanced Control of Industrial Processes, Structures and Algorithms**. Springer: London, 2007.

URBANCE, S. E. et al. Medium Evaluation and Plastic Composite Support Ingredient Selection for Biofilm Formation and Succinic Acid Production by *Actinobacillus succinogenes*. **Food Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 53-65, 2003.

VALENTINE, B. Office of Industrial Technologies. **Production of succinic acid from wood wastes and plants**. Chemicals, 1999.

VAN der WERF, M. J.; GUETTLER, M. V.; JAIN, M. K. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. **Journal of Applied Microbiology**, v. 167, p. 332-342, 1997.

WERPY, T.; G. PETERSEN. **Top value added chemicals from biomass, vol. 1. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO., 2004.

WU, H. et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* pflB ldhA double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7837-7843, 2007.

YU, J. et al. Development of succinic acid production from corn cob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 19, p. 1033-1040, 2010.

ZEIKUS, J. G.; JAIN, M. K.; ELANKOVAN, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 545-552, 1999.

ZHANG, Y. et al. Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM). **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, p. 1-8, 2011.

ZHENG, P. et al. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7889-7894, 2010.

Recebido em 6 de outubro de 2011

Aceito em 16 de janeiro de 2012

