

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

DETECÇÃO, DIAGNÓSTICO E PROPOSTA DE SOLUÇÕES
BASEADAS EM MODELOS MATEMÁTICOS PARA FALHAS NA
ETAPA DE PROPAGAÇÃO DO INÓCULO DO BIOPROCESSO
INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE FARNESENO

RODRIGO CARBULONI

ORIENTADOR: Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira

ARARAQUARA-SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

DETECÇÃO, DIAGNÓSTICO E PROPOSTA DE SOLUÇÕES
BASEADAS EM MODELOS MATEMÁTICOS PARA FALHAS NA
ETAPA DE PROPAGAÇÃO DO INÓCULO DO BIOPROCESSO
INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE FARNESENO

RODRIGO CARBULONI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr Samuel Conceição de Oliveira

ARARAQUARA-SP
2020

C264d Carbuloni, Rodrigo.
Detecção, diagnóstico e proposta de soluções baseadas em modelos matemáticos para falhas na etapa de propagação do inóculo do bioprocessamento industrial de produção de farneseno / Rodrigo Carbuloni. – Araraquara: [S.n.], 2020.
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Samuel Conceição de Oliveira.

1. Densidade ótica. 2. Fermentadores de sementes. 3. Fermentação industrial. 4. Melhoria de bioprocessos. 5. Oxigênio dissolvido. 6. Fermentação asséptica. I. Oliveira, Samuel Conceição de, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETECÇÃO, DIAGNÓSTICO E PROPOSTA DE SOLUÇÕES BASEADAS EM MODELOS MATEMÁTICOS PARA FALHAS NA ETAPA DE PROPAGAÇÃO DO INÓCULO DO BIOPROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE FARNESENO

AUTOR: RODRIGO CARBULONI

ORIENTADOR: SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. DILE PONTAROLO STREMEL

Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal / Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 15 de julho de 2020

*Dedico esta dissertação à minha mãe, esposa e filhos
por cederem seu tempo e atenção para que eu pudesse
me dividir entre trabalho, estudo e família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e orientar nas decisões entre elas a de ter a oportunidade de fazer este curso que é muito importante para mim.

À empresa na qual trabalho e seu time por compartilharem o conhecimento.

A todos envolvidos no PPG-EBB (Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos), por oferecer esta oportunidade de conhecimento e fortalecer a conexão entre Universidade e Indústria, algo ainda distante e fora da realidade em algumas esferas.

Ao Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano por ser protagonista, entusiasta e incentivador da parceria entre Universidade e Empresa.

Em especial ao Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira pela dedicação e paciência na orientação e grande suporte nesta caminhada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Curva de crescimento microbiano.....	14
3.2 Influência de fatores externos (ambientais) sobre o crescimento microbiano.....	17
3.3 Modelagem matemática de bioprocessos.....	21
3.4 Bioprocesso industrial de produção de farneseno.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Densidade Ótica.....	28
4.2 Concentração de Açúcares e Etanol.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Detecção de falhas no processo fermentativo de produção industrial de farneseno.....	30
5.2 Diagnóstico e proposta de soluções.....	31
5.2.1 Pressão aplicada ao fermentador.....	32
5.2.2 Tamanho do inóculo.....	36
5.2.3 Meio de cultivo insuficiente quanto ao aspecto nutricional.....	38
5.2.4 Inibição por excesso de substrato e/ou por inibidores presentes na solução de substrato disponibilizada no início do processo em batelada ou acumulados durante o crescimento microbiano.....	41
5.2.5 Modo de cultivo celular inadequado.....	42
5.3 Factibilidade das soluções propostas e considerações sobre aspectos econômicos	43
6. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi diagnosticar e analisar possíveis causas do crescimento microbiano insuficiente atualmente observado na etapa de propagação do inóculo do bioprocesso industrial de produção de farneseno da unidade da companhia holandesa DSM, localizada em Brotas-SP. As causas levantadas foram: (i) pressão aplicada ao fermentador; (ii) tamanho do inóculo; (iii) meio de cultivo nutricionalmente insuficiente; (iv) inibição pelo próprio substrato e/ou por inibidores presentes no meio inicial ou acumulados durante o crescimento microbiano; (v) modo de cultivo das células inadequado. Soluções para a resolução do problema, baseadas em modelos matemáticos, foram propostas visando avaliar a eficácia de tais soluções por meio de técnicas de modelagem e simulação de processos. Dentre as soluções apresentadas, aquela referente à pressão aplicada ao fermentador foi implementada na unidade industrial, obtendo-se resultados satisfatórios quanto à densidade ótica atingida nos cultivos, embora, com um tempo demasiadamente longo em relação ao especificado. Para as demais soluções propostas, foram delineadas as condições para a realização das simulações e em se concluindo que as soluções são viáveis tecnicamente e economicamente, todas elas são consideradas factíveis do ponto de vista prático-operacional.

Palavras-chave: densidade ótica, fermentadores de sementes, fermentação industrial, melhoria de bioprocessos, oxigênio dissolvido, fermentação asséptica.

ABSTRACT

The general objective of this study was to diagnose and analyze possible causes of the insufficient microbial growth currently observed in the inoculum propagation stage of the farnesene industrial production bioprocess in the DSM company unit, located in Brotas-SP. The causes raised were: (i) pressure applied to the fermenter; (ii) size of the inoculum; (iii) nutritionally insufficient culture medium; (iv) inhibition by the substrate itself and/or by inhibitors present in the initial medium or accumulated during microbial growth; (v) inadequate cell culture. Solutions for solving the problem, based on mathematical models, were proposed in order to evaluate the effectiveness of such solutions through modeling and process simulation techniques. Among the solutions presented, the one referring to the pressure applied to the fermenter was implemented in the industrial unit, obtaining satisfactory results in terms of the optical density reached in the cell cultivates, although with a time that is too long in relation to that specified. For the other proposed solutions, the conditions for conducting the simulations were outlined and in concluding that the solutions are technically and economically viable, all of them are considered feasible from a practical-operational viewpoint.

Keywords: optical density, seed fermenters, industrial fermentation, bioprocess improvement, dissolved oxygen, aseptic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva padrão de crescimento mostrando as diversas fases do desenvolvimento microbiano	15
Figura 2: Velocidade específica de crescimento (μ) em função da concentração de nutriente (S).....	18
Figura 3: Etapas do processo fermentativo de produção industrial de farneseno.....	25
Figura 4: Crescimento celular (densidade ótica) versus tempo de cultura.....	30
Figura 5: Visão geral do impacto da pressão do ar nas células microbianas sob cultivo: transferência de massa de oxigênio, crescimento microbiano e estresse oxidativo.....	32
Figura 6: Morfologia de <i>Candida utilis</i> durante cultivos em batelada alimentada com escalonamento de pressão.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelos cinéticos não estruturados para μ_x , μ_s , μ_p e μ_d	24
Tabela 2 – Valores para padrões de linearidade e faixa aceitável ($\pm 5\%$) para determinação da concentração de açúcares e etanol utilizando-se kit enzimático.....	29
Tabela 3 – Valores iniciais e finais das concentrações de células e substrato e tempo final de cultivo para cada batelada realizada no <i>IF</i> à pressão de 1.0 bar.....	31
Tabela 4 – Valores iniciais e finais das concentrações de células e substrato e tempo final de cultivo para cada batelada realizada no <i>IF</i> à pressão de 0.5 bar.....	35

LISTA DE SÍMBOLOS

D	Taxa de diluição (F/V)
F	Vazão de alimentação do reator
K_s	Constante de saturação de Monod
K_p	Constante de inibição pelo produto
P	Concentração de produto no fermentador
r_x	Velocidade de crescimento celular
r_p	Velocidade de formação de produto
r_s	Velocidade de consumo de substrato
S	Concentração de substrato no reator
S_0	Concentração inicial de substrato
t	Tempo
V	Volume útil do sistema de fermentação
V_0	Volume inicial de meio
X	Concentração de biomassa no reator
$Y_{P/S}$	Coeficiente de conversão de substrato em produto
$Y_{X/S}$	Coeficiente de conversão de substrato em biomassa
α	Coeficiente cinético de formação de produto associada ao crescimento celular
β	Coeficiente cinético de formação de produto não associada ao crescimento celular
μ	Velocidade específica de crescimento celular
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular
μ_P	Velocidade específica de formação de produto
μ_S	Velocidade específica de consumo de substrato

1. INTRODUÇÃO

O trans- β -farneseno (farneseno) é um hidrocarboneto de cadeia longa ramificada a partir da qual é possível, por meio de transformações químicas, obter uma ampla variedade de produtos tais como fármacos, cosméticos, perfumes, lubrificantes e biocombustíveis para ônibus e aviões.

Benjamin *et al.* (2016) descrevem a síntese química do trans- β -farneseno como sendo dispendiosa e de baixo rendimento, o que faz da via fermentativa, apesar da possibilidade de ocorrência de problemas inerentes a um bioprocessos (contaminação, inibição, repressão catabólica, mutação genética, baixa velocidade de reação, falta de homogeneidade em reatores de grandes porte, baixas concentrações e baixas velocidades de reação, assepsia dentre outros), uma alternativa bastante vantajosa para a síntese desse bioproduto uma vez que utiliza matéria-prima de fonte renovável (cana-de-açúcar) em detrimento de fontes oriundas do petróleo, tornando-se também uma alternativa ambientalmente amigável.

O bioprocessos de produção de farneseno no Brasil envolve a utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas obtidas por técnicas de biologia sintética desenvolvidas pela empresa *Amyris*, a qual transfere tais microrganismos modificados para adaptação às condições de processo praticadas no Brasil, procedimento este denominado de tropicalização do processo. Deste modo, são gerados ao longo do ano vários clones visando aumentar a produtividade e a eficiência do bioprocessos.

A produção de trans- β -farneseno inicia-se tendo como matéria-prima o xarope de cana-de-açúcar, o qual é esterilizado visando evitar contaminação durante a operação. O bioprocessos é realizado num sistema de *seed-trains*, consistindo de um biorreator de inóculo inicial para propagação do microrganismo, um biorreator intermediário para acumulação de biomassa e ativação da rota de produção do trans- β -farneseno e um biorreator principal no qual o xarope de açúcar é convertido em isoprenóides, incluindo o farneseno. Em seguida são realizados os processos de separação, recuperação e purificação do farneseno, compreendendo o *downstream processing*. A ampliação de escala ou *scale up* consiste em se transpor para uma operação industrial de grande porte resultados obtidos em equipamentos de laboratório ou em escala piloto. Trata-se, portanto, da tarefa de ampliar a escala de trabalho, sendo este um dos problemas mais complexos da Engenharia de

Bioprocessos, pois se a viabilidade técnico-econômica for atingida nas escalas reduzidas, as condições que levaram a esta viabilidade devem também ser reproduzidas na escala industrial para que a instalação possa operar com sucesso, o que requer a adoção de critérios adequados para a ampliação de escala. Dado um certo bioprocessos, especificamente aeróbio, como é o caso do bioprocessos de produção de farneseno, não existe um único critério rígido e seguro para se realizar a ampliação de escala, havendo, na verdade, vários critérios e, uma vez fixado um deles, todos os demais serão diferentes nas escalas crescentes. A eleição de um critério depende da experiência no bioprocessos específico, ou seja, no conhecimento do comportamento do microrganismo em diferentes condições. Assim, se o microrganismo for extremamente demandante de oxigênio dissolvido, um critério natural a ser adotado é o k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio), mantendo-se o mesmo valor deste parâmetro nas diferentes escalas a fim de fornecer o adequado suprimento de oxigênio ao microrganismo. Se ele for sensível ao cisalhamento no biorreator, muito cuidado se deve ter quanto à velocidade periférica das turbinas (ND_i), sendo N a frequência de agitação e D_i , o diâmetro do impelidor. No caso do microrganismo ser sensível a vários fatores, a situação torna-se mais complexa ainda, exigindo a adoção de mais de um critério para a ampliação de escala, caso em que podem ocorrer resultados inesperados com maior frequência em reatores de maior porte.

Um bioprocessos em escala industrial pode apresentar muitas vezes resultados diferentes daqueles obtidos em testes em uma escala menor de P & D (Pesquisa e Desenvolvimento) escala de bancada e piloto, podendo tais resultados impactar negativamente todo o processo produtivo, aumentando o custo total do bioproduto. Isso se deve ao fato de não se poder garantir que, ao aumentar a escala, o microrganismo realizará suas atividades nas mesmas condições da escala menor, podendo-se obter resultados surpreendentes, geralmente negativos, isto é, menor produção ou menor velocidade de obtenção de produto.

Assim, são de extrema importância os estudos de modelagem e simulação como ferramentas auxiliares na padronização das fases dos processos industriais a fim de garantir e reproduzir os protocolos operacionais do processo, principalmente nas fases iniciais de produção, as quais podem cascatear problemas para as demais etapas do bioprocessos.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é diagnosticar e analisar possíveis causas do crescimento microbiano limitado atualmente observado no *IF (Initial Fermenter)* da unidade de produção industrial de farneseno, propondo soluções para o problema cujas eficácias possam ser preliminarmente investigadas utilizando-se técnicas de modelagem e simulação de bioprocessos.

Para o cumprimento do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- levantar possíveis causas do crescimento limitado da biomassa tais como pressão aplicada ao fermentador, baixa concentração de células no inóculo, insuficiência nutricional do meio de cultivo quanto a substratos melhoradores do crescimento, inibição por excesso de substrato e/ou por outros inibidores presentes no meio inicial ou acumulados durante o crescimento microbiano, modo de cultivo celular inadequado;
- analisar as causas levantadas no item anterior e delinear soluções para o problema que possam ser testadas preliminarmente utilizando-se modelos matemáticos apropriados;
- analisar a factibilidade das soluções propostas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção, devido ao escopo do estudo, serão revisados vários aspectos sobre o crescimento microbiano e a sua modelagem, bem como sobre o bioprocesso industrial de produção de farneseno.

3.1 Curva de crescimento microbiano

Dispondo-se de técnicas de avaliação qualitativa e quantitativa de uma população microbiana é possível seguir e estudar a curva de crescimento. Para isso, realiza-se uma cultura clássica, na qual, após a inoculação, o crescimento decorre até a completa exaustão dos nutrientes do meio, mantendo-se constantes a temperatura e o pH em valores favoráveis ao crescimento.

O estudo consiste então em seguir, em função do tempo (t), a evolução da concentração celular (X), expressa em número ou massa seca de células por unidade de volume de cultura. O padrão de comportamento da curva de crescimento é sempre o mesmo, apresentando várias fases como indicado na Figura 1, as quais são descritas a seguir (SCRIBAN, 1984; SCHMIDELL *et al.*, 2001; HISS, 2013; DORAN, 2013)

- (1) - *Fase de latência ou lag*

Segue após a inoculação do microrganismo no meio de cultura, constituindo-se num período de adaptação no qual as células sintetizam particularmente as enzimas que serão necessárias para metabolizar o substrato, não havendo reprodução celular durante esta fase, isto é, $X = \text{constante} = X_0$, sendo X_0 a concentração celular no tempo $t=0$. Nesta fase, tanto a taxa ($r_x=dX/dt$) quanto a velocidade específica ($\mu=r_x/X$) de crescimento são nulas.

- (2) - *Fase de aceleração*

Decorre após a fase *lag*, quando então, inicia-se o crescimento devido à reprodução celular. Nesta fase, a concentração celular (X) aumenta, no início lentamente, mas depois, mais rapidamente. A taxa de reprodução (dX/dt) também aumenta, bem como a velocidade específica de crescimento (μ).

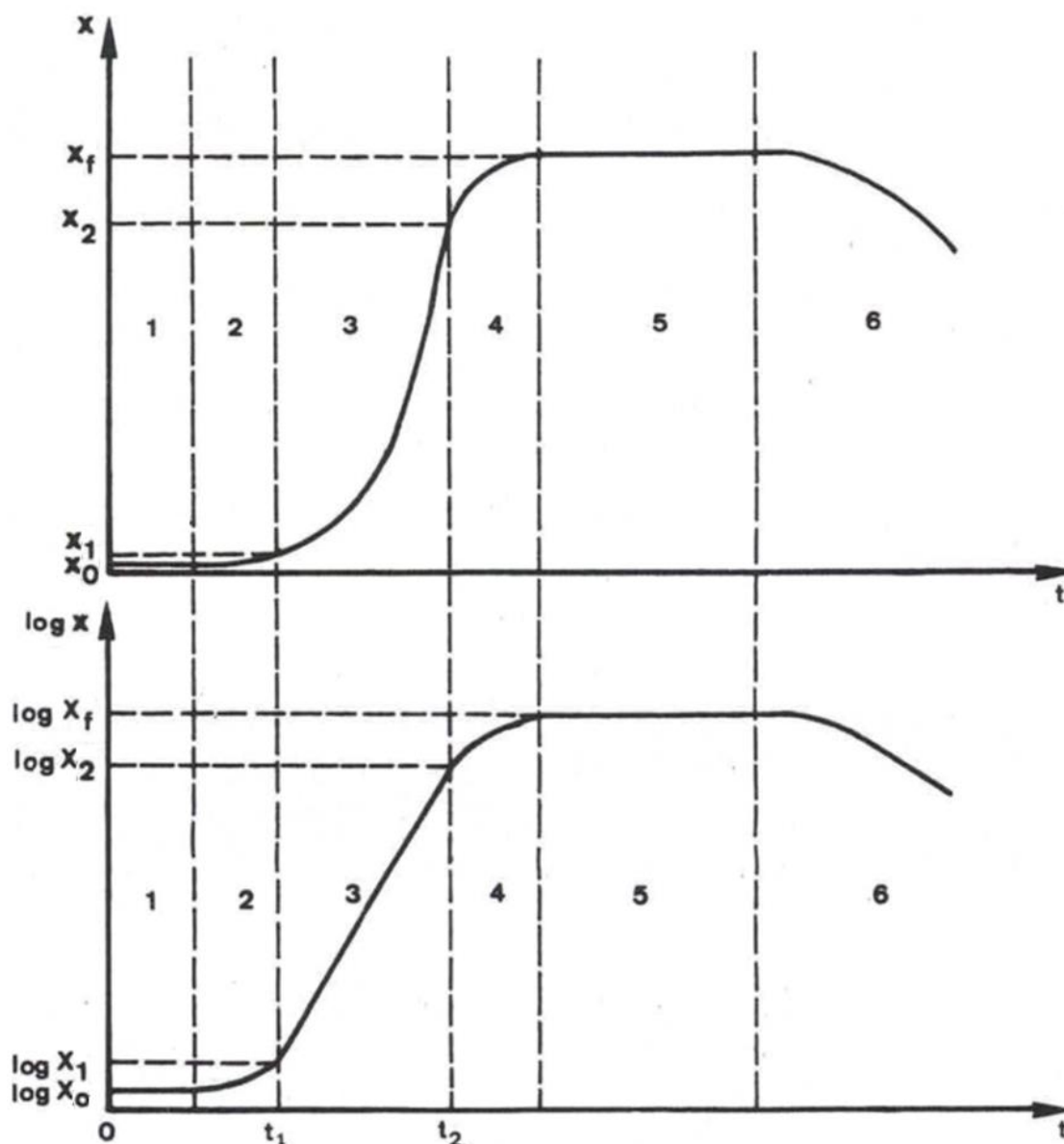


Figura 1: Curva padrão de crescimento mostrando as diversas fases do desenvolvimento microbiano
Fonte: SCRIBAN, 1984.

- (3) - *Fase exponencial*

Quando a velocidade específica de reprodução celular (μ) atinge seu valor máximo (μ_{max}), tem-se o início da fase exponencial cuja duração transcorrerá enquanto μ for constante neste valor máximo. Nesta fase, o tempo de duplicação da população microbiana (tempo de geração) torna-se mínimo, sendo este tempo dependente das condições ambientais tais como meio de cultura, temperatura, pH, oxigenação, etc.

Para algumas bactérias, o tempo de geração pode ser muito breve como para *Escherichia coli* que é de 20 min a 37 °C. Para certas bactérias termófilas, cultivadas a 55 °C, este tempo pode ser até de 15 minutos. Para outras, de desenvolvimento mais lento, é muito longo, podendo atingir vários dias. Para leveduras, o tempo de geração mínimo está compreendido entre 1,3 e 2 horas (SCRIBAN, 1984).

Durante a fase exponencial, a taxa de crescimento aumenta proporcionalmente à concentração celular, sendo μ_{max} a constante de proporcionalidade, isto é, $dX/dt = \mu_{max}X$. Integrando-se esta equação entre os tempos t_1 e t_2 , obtém-se uma expressão exponencial para o crescimento nesta fase, dada por (SCRIBAN, 1984; SCHMIDELL *et al.*, 2001; HISS, 2013; DORAN, 2013):

$$X_2 = X_1 \cdot \exp[\mu_{max} \cdot (t_2 - t_1)] \quad (1)$$

- (4) - Fase de desaceleração

Em um determinado instante a curva de crescimento atinge um ponto de inflexão, o qual corresponde ao esgotamento do meio de cultura devido à exaustão de um ou mais nutrientes necessários ao crescimento e, em muitos casos, à acumulação de produtos inibidores resultantes do metabolismo microbiano. Nesta fase, X continua a aumentar, mas, após o ponto de inflexão, dX/dt e μ se reduzem.

- (5) - Fase estacionária

Nesta fase não ocorre crescimento líquido da biomassa, atingindo-se o valor máximo e estacionário de X (X_f). Esta fase pode ser interpretada como o resultado de três situações possíveis, sendo a primeira situação aquela na qual haveria uma igualdade entre as velocidades específicas de crescimento e morte do microrganismo. A segunda situação corresponderia àquela na qual as células desenvolveriam um metabolismo de manutenção, sem crescimento e morte celular. A terceira situação seria aquela na qual o crescimento é interrompido devido à acumulação no meio de produtos do próprio metabolismo celular que são inibidores ou tóxicos aos microrganismos. Para todas as situações descritas, o encerramento do crescimento acarreta modificações na estrutura bioquímica das células.

- (6) - *Fase de declínio*

Esta fase caracteriza-se pela diminuição do número de células viáveis devido à mortalidade celular cuja taxa aumenta progressivamente, e, simultaneamente, a concentração de biomassa decresce devido à autólise promovida por enzimas das próprias células.

As duas últimas fases são muito importantes no caso de microrganismos produtores de metabólitos secundários. Nestas fases, a atividade bioquímica é consideravelmente modificada por controle de mecanismos de regulação específicos.

3.2 Influência de fatores externos (ambientais) sobre o crescimento microbiano

Os fatores principais que podem afetar o comportamento da curva de crescimento mostrada na Figura 1 são os seguintes:

- *Concentração dos compostos necessários ao crescimento*

Durante a fase exponencial de crescimento, a velocidade específica de crescimento é constante e independente da concentração dos vários compostos do meio de cultura. Porém, abaixo de um certo nível de concentração isso não é mais verificado. Ao cultivar um microrganismo em meio sintético que tenha em excesso todos os nutrientes necessários ao microrganismo, exceto um, o crescimento não ocorrerá à velocidade específica máxima, sendo dependente da concentração deste nutriente conforme mostrado na Figura 2.

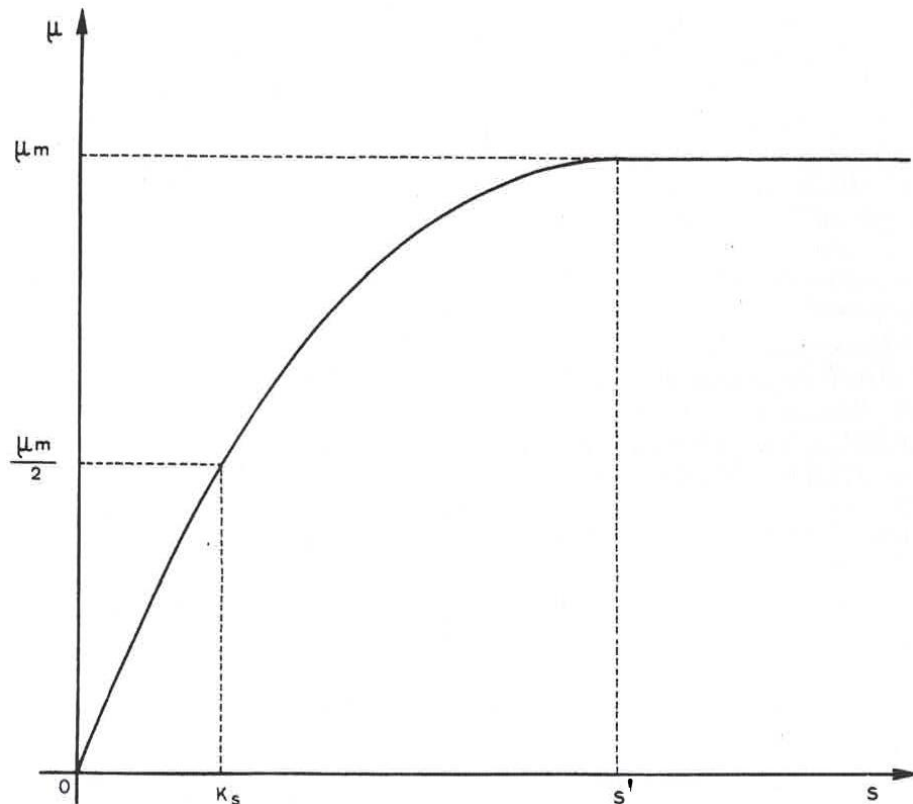


Figura 2: Velocidade específica de crescimento (μ) em função da concentração de nutriente (S)
Fonte: SCRIBAN, 1984.

Na Figura 2, para todas as concentrações superiores a S' , a velocidade específica de crescimento (μ) será máxima, o que permite explicar porque μ é constante durante a fase exponencial, fase na qual todos os nutrientes do meio estão em excesso, em concentrações superiores a S' . Também, permite explicar o que ocorre na fase de desaceleração do crescimento, quando μ torna-se gradativamente menor que μ_{max} devido às concentrações serem cada vez menores que S' .

O comportamento mostrado na Figura 2 foi estudado por Monod, que propôs descrever μ em função de S usando a seguinte relação empírica, deduzida, por analogia, da equação proposta por Michaelis-Menten para a cinética enzimática (SCRIBAN, 1984; SCHMIDELL *et al.*, 2001; HISS, 2013; DORAN, 2013):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2)$$

Na Equação (2), K_s é a constante de saturação, a qual corresponde à concentração de substrato para a qual o valor de μ é metade do valor de μ_{max} , sendo K_s dependente da cepa, substrato, temperatura e pH. Para substratos glicídicos, K_s está geralmente compreendido entre 1 e 100 mg/L e para compostos nitrogenados, é frequentemente muito mais baixo.

O oxigênio dissolvido também obedece à Equação (2) quando esse é um nutriente limitante do crescimento de microrganismos aeróbios, o que ocorre quando sua concentração no meio se torna inferior à concentração crítica comparável a S' .

Deve-se salientar que um elevado aumento da concentração de açúcar no meio provoca uma diminuição da velocidade específica de crescimento devido à forte pressão osmótica exercida pelo meio sobre as células. Acima de uma determinada concentração elevada, o crescimento da maioria dos microrganismos fica bloqueado devido à inibição por excesso de substrato (SCRIBAN, 1984; SCHMIDELL *et al.*, 2001; HISS, 2013; DORAN, 2013).

Somente os microrganismos osmotolerantes e osmófilos conseguem se reproduzir em tais condições, o que é aproveitado nas indústrias de estabilização de produtos naturais tais como as frutas. Um efeito comparável pode ser obtido pelo aumento da concentração de sal (NaCl), quando somente os microrganismos halófilos são capazes de se desenvolver, sendo esta propriedade explorada em frigoríficos (SCRIBAN, 1984).

● *Temperatura*

A temperatura exerce uma forte influência sobre o conjunto da atividade celular microbiana. Em baixas temperaturas, a atividade pode ser completamente bloqueada. Analogamente às reações químicas, o crescimento microbiano é acelerado por um aumento da temperatura, podendo-se considerar globalmente que a velocidade de crescimento dobra quando a temperatura se eleva em 10 °C. Entretanto, a partir de uma dada temperatura, alguns constituintes (enzimas, ácidos nucléicos) ou estruturas celulares (invólucros) podem sofrer uma alteração ou inativação, levando à destruição térmica dos microrganismos.

Para todos os microrganismos, a velocidade específica de crescimento atinge seu valor máximo em uma temperatura situada em um intervalo relativamente estreito, sendo que conforme este intervalo, os microrganismos podem ser classificados como:

a) *Psicrófilos*

Possuem temperatura ótima de crescimento em torno de 15 °C, podendo o crescimento também ocorrer, à velocidade reduzida, em temperaturas próximas de 0 °C e até 25 °C. Abaixo e acima dessas temperaturas, respectivamente, não ocorre crescimento. Em sua temperatura ótima, esses microrganismos apresentam velocidade de crescimento relativamente baixa em relação à dos outros microrganismos.

b) *Mesófilos*

Desenvolvem-se melhor em temperaturas intermediárias próximas à 30 °C, sendo que o crescimento da maior parte desses microrganismos não ocorre abaixo de 15 °C e acima de 45 °C.

c) *Termófilos*

Exigem temperaturas em torno de 55 °C para crescerem rapidamente nessas condições. Abaixo de 37 °C e acima de 65 °C, o crescimento diminui consideravelmente, podendo até mesmo ser completamente inibido.

● ***pH***

O efeito do pH sobre o conjunto da atividade celular é também significativo, similar ao efeito da temperatura. Ao seguir a velocidade específica de crescimento de um dado microrganismo em função do pH, em um dado meio no qual este parâmetro é controlado, nota-se que essa velocidade atinge valor máximo em um valor de pH ou em um intervalo de pH ótimo. Fora desse intervalo, a velocidade é menor, tornando-se nula para valores suficientemente baixos e elevados de pH.

Os pHs alcalinos são, geralmente, prejudiciais aos microrganismos, situando-se o limite de tolerância entre 9 e 9,5. Para valores compreendidos entre 0 e 8, observam-se diferentes tipos de comportamento ligados à habilidade dos microrganismos em tolerar e/ou metabolizar ácidos orgânicos (ou minerais) presentes no meio. Assim, as bactérias são, em geral, neutrófilas, apresentando melhor crescimento em pHs próximos de 7 e quando o pH diminui para 5, são inibidas (SCRIBAN, 1984). Entretanto, algumas delas, com metabolismo acidogênico, são capazes de se reproduzir em pHs inferiores como é o caso de certas cepas de *Bacillus*, mas sobretudo de bactérias lácticas cujo crescimento está associado à transformação dos açúcares em ácido láctico e de bactérias acéticas, que, devido à vias metabólicas incompletas, excretam ácido acético, podendo o pH ao final do crescimento atingir um valor inferior a 3. Certas bactérias (*Thiobacillus*), com metabolismo quimiolitotrófico ao oxidarem compostos minerais sulfurados a sulfato, geram ácido sulfúrico que pode reduzir o pH até 1 (SCRIBAN, 1984).

Quanto às leveduras e aos fungos filamentosos, possuem boa habilidade para metabolizar ácidos orgânicos e se desenvolver muito bem em um amplo intervalo de pH compreendido entre 3 e 8, sendo o valor ótimo dependente do ácido orgânico e da cepa microbiana em questão (SCRIBAN, 1984).

3.3 Modelagem matemática de bioprocessos

A modelagem matemática pode ser definida como: processo de concepção e formulação do conjunto de equações representativas do bioprocessos. Logicamente, a descrição completa de todas as vias e interações metabólicas que ocorrem em um processo biológico seria uma tarefa impossível (OHBA, 1998).

Segundo Sinclair e Kristiansen (1987), ao se modelar um bioprocessos, devem ser considerados somente aspectos relevantes nos quais se tem interesse. Desta forma, um modelo é uma série de relações entre as variáveis de interesse de um sistema em estudo. Dependendo do grau de conhecimento sobre o sistema, a modelagem matemática pode ser realizada segundo uma abordagem empírica ou fenomenológica do bioprocessos.

Na abordagem fenomenológica, busca-se descrever os fenômenos principais envolvidos no bioprocesso, usando-se para isso os princípios básicos de conservação de massa, energia e quantidade de movimento, equações constitutivas, compreendendo taxas de reação e relações de equilíbrio termodinâmico, dentre outras, além da formulação de hipóteses simplificadoras, condições iniciais e de contorno quando necessárias (OLIVEIRA, 2017).

Geralmente, a modelagem fenomenológica de bioprocessos é feita segundo uma abordagem não segregada e não estruturada da população microbiana; isto é, a população celular é considerada homogênea, com as células possuindo mesmas características de idade, tamanho e sendo representadas por uma única variável, a massa celular ou o número de células, sem considerar variações de concentração de componentes intracelulares na descrição do bioprocessos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; HISS, 2013; DORAN, 2013).

Na abordagem empírica, o bioprocessos é visto como uma caixa-preta, desconhecendo-se totalmente os mecanismos de causa e efeito entre as variáveis de entrada e de saída do processo. As variáveis de saída são correlacionadas empiricamente com as de entrada por meio de funções denominadas de transferência, as quais podem ser modelos polinomiais, exponenciais, logarítmicos, hiperbólicos, sigmoidais, dentre outros modelos de ajuste, modelos estatísticos baseados em planejamento de experimentos e na teoria de regressão e modelos de redes neurais — muito usados para descrever sistemas complexos, tais como os bioprocessos (OLIVEIRA, 2017).

Obviamente, modelos empíricos não podem ser comparados a modelos fenomenológicos quando o objetivo é o conhecimento detalhado dos principais fenômenos envolvidos no bioprocessos ou a realização de extrapolações, uma vez que esses modelos possuem faixa de validade restrita às condições operacionais nas quais foram concebidos, diferente dos modelos fenomenológicos que são mais extrapoláveis devido a serem baseados em princípios básicos.

Nos casos em que a abordagem fenomenológica não seja estritamente necessária, pode-se substituí-la pela empírica desde que não haja prejuízo da capacidade preditiva do modelo em decorrência dessa substituição (OLIVEIRA, 2017).

A abordagem empírica visa aumentar a capacidade de análise de sistemas complexos, principalmente naquelas situações em que uma abordagem fenomenológica se torna impraticável por uma série de motivos. Pode-se citar como exemplo o caso de vários bioprocessos de produção de metabólitos secundários, nos quais estão envolvidos complexos aspectos bioquímicos, tais como efeitos de repressão catabólica e diferenciação morfológica da biomassa durante o cultivo, além de problemas operacionais relacionados à transferência de oxigênio devido ao comportamento não newtoniano exibido pelo meio reacional, quando fungos filamentosos são utilizados (CRUZ, 1996; LOPES, 2007). Outro exemplo é aquele de como modelar os efeitos do pH e da temperatura sobre o crescimento microbiano. Apesar de existirem modelos fenomenológicos para esse fim, sabe-se que de um ponto de vista biológico, a velocidade específica de crescimento varia em função da temperatura ou pH segundo uma curva parabólica, cujo máximo é verificado para o pH ou temperatura ótima. Assim, a forma geral das equações empíricas propostas para descrever a velocidade específica de crescimento celular em função do pH e da temperatura é a de um polinômio de 2º grau nessas variáveis, conforme apresentado a seguir (SCRIBAN, 1984):

$$\mu = b_0 + b_1T + b_2T^2 + b_3pH + b_4pH^2 + b_5T \cdot pH \quad (3)$$

Na Equação (3), b_i ($i=0, 1, \dots, 5$) são constantes determinadas por ajuste da referida equação a dados experimentais de μ em função do pH e da temperatura T .

É na elaboração das equações cinéticas que reside toda a dificuldade e, portanto, toda a arte da formulação dos modelos fenomenológicos de bioprocessos, sendo tais equações aquelas que indicam como as variáveis de estado do bioprocessos em estudo interferem nas velocidades específicas de crescimento e morte celular, de geração de produtos metabólicos e de consumo de substrato (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Nesse sentido, a Tabela 1, elaborada a partir de informações obtidas de Bonomi e Schmidell (2001), sintetiza os modelos cinéticos não estruturados mais comumente empregados para representar as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), consumo de substrato (μ_s), formação de produto (μ_p) e morte celular (μ_d).

Tabela 1 – Modelos cinéticos não estruturados para μ_x , μ_s , μ_p e μ_d

(1) Crescimento num único substrato limitante:	(8) Produção de produto metabólico inib
$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$ (MONOD)	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \frac{K_p}{K_p + P}$ (AIBA; SHOE
$\mu_x = \frac{\mu_m S^n}{K_s^n + S^n}$ (MOSEER)	$\mu_p = \frac{\mu'_m S}{K'_s + S} \frac{K'_p}{K'_p + P}$
$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s X + S}$ (CONTOIS)	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} e^{-K_p P}$ (AIBA <i>et al.</i>)
(2) Morte celular: $\mu_d = -K_d$ (SINCLAIR; KRISTIANSEN)	$\mu_p = \frac{\mu'_m S}{K'_s + S} e^{-K'_p P}$
(3) Crescimento num único substrato limitante e inibidor:	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)$ (GHOSE; TYA
$\mu_x = \frac{\mu_a S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$ (ANDREWS)	$\mu_p = \frac{\mu'_m S}{K'_s + S} \left(1 - \frac{P}{P'_m}\right)$
$\mu_x = \frac{\mu_a}{1 + \frac{K_s}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$ (WU <i>et al.</i>)	$\mu_x = \frac{\mu_{m1} S_1}{K_{s1} + S_1} + \frac{\mu_{m2} S_2}{K_{s2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}}$ (DUNN ET <i>et al.</i>)
(4) Crescimento com múltiplo substrato limitante (uso preferencial de S_1):	(5) Crescimento com múltiplo substrato limitante (uso simultâneo de S_1 e S_2):
$\mu_x = \frac{\mu_m S_1 S_2}{(K_{s1} + S_1)(K_{s2} + S_2)}$ (MEGEE <i>et al.</i>)	μ_x velocidade específica de crescimento μ_d velocidade específica de morte μ_p velocidade específica de produção μ_s velocidade específica de consumo de sul $S, S_1, S_2, \dots$ concentrações de substratos limita P concentração de produto $Y_{x/s}$... fator de conversão de substrato em célu m_s consumo de substrato para manutenção
(6) Consumo do substrato limitante para manutenção:	$\mu_m, K_s, n, K_d, \mu_d, K_i, \mu_{m1}, \mu_{m2}, K_{s1}, K_{s2}, \mu_0, \mu_1, \mu_2, \alpha, K_p, \mu'_m, K'_s, K'_p, P_m, P'_m$ parâmetros cinético
$\mu_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x + m_s$ (PIRT)	
(7) Produção de produto metabólico associado e não associado ao crescimento:	
$\mu_p = \alpha \mu_x + \beta$ (LUEDEKING; PIRET)	

3.4 Bioprocesso industrial de produção de farneseno

Na Figura 3 é apresentado um fluxograma simplificado do bioprocesso de produção industrial de farneseno da companhia holandesa DSM, unidade de Brotas-SP. O processo é dividido em duas etapas, sendo a Etapa 1, a de multiplicação celular e a Etapa 2, a de produção de farneseno. A etapa de multiplicação celular é dividida em três fases: A, B e C.

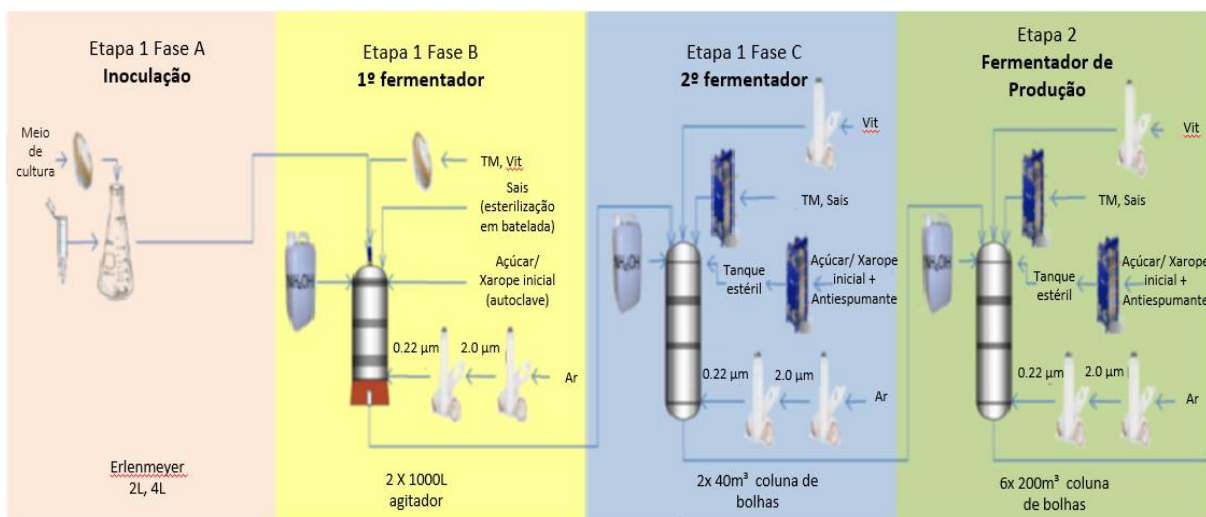


Figura 3: Etapas do processo fermentativo de produção industrial de farneseno.

Fonte: Amyris, 2013.

A Etapa 1, Fase A, consiste na multiplicação celular em escala laboratorial, utilizando frascos Erlenmeyer de 2 e 4 L. A fase B é a primeira fase da multiplicação celular em escala industrial, a qual é conduzida em dois fermentadores iniciais (*Initial Fermenter, IF*), com volumes de 1 m³, com tempo previsto de 48 horas, utilizando-se uma estirpe industrial de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada.

A Fase C consiste na segunda fase da multiplicação celular, a qual é conduzida parte em modo batelada e parte em modo batelada alimentada em dois biorreatores de coluna de bolhas com volumes de 40 m³. O tempo de duração dessa fase é também de 48 horas, ocorrendo na sequência a transferência do inóculo para a Etapa 2, na qual é realizada a produção do farneseno em escala industrial no fermentador principal, um biorreator de coluna de bolhas de 200 m³. A Etapa 1, Fase C, impacta diretamente a Etapa 2 do bioprocesso, na qual o objetivo não é o crescimento celular, mas sim a produção de farneseno num determinado tempo e volume.

O bioprocesso de produção de farneseno tem como característica principal ser uma fermentação asséptica na qual se deve manter somente a cepa cultivada, exterminando-se qualquer outro tipo de microrganismo no meio de fermentação. Para garantir a assepsia do sistema são empregados dois métodos principais: filtração e tratamento térmico em altas temperaturas. A filtração consiste em utilizar filtros que retêm partículas menores que 0,2 microns, garantindo que outros microrganismos como bactérias e leveduras selvagens não contaminem a fermentação. Estes filtros são utilizados no tratamento de ar e amônia aquosa que são continuamente adicionados durante a fermentação. No tratamento térmico é empregado vapor direto no tanque vazio à temperatura de 130 °C de forma a esterilizar o sistema antes do início da fermentação. Devido ao grande volume dos fermentadores industriais, torna-se inviável a esterilização do reator carregado com o meio de cultura, realizando-se este processo separadamente. Para o processo de esterilização contínua dos meios de cultura e açúcares é utilizado o sistema de tratamento com UHT (*Ultra High Temperature*), o qual é aplicado nas etapas 1 fase C e etapa 2 para esterilizar respectivamente o xarope de cana-de-açúcar, maltose e o meio de cultura constituído por vitaminas, sais minerais, metais e antiespumante. O processo com UHT consiste em submeter a um tratamento térmico os meios, após serem diluídos com água ou usados diretamente sem diluição como é o caso do xarope de cana-de-açúcar, com um fluxo contínuo de calor fornecido por vapor a alta temperatura por um curto período de tempo, entre 2 e 5 segundos, reduzindo-se a quantidade de contaminantes e podendo manter a esterilidade do meio após o tratamento em recipientes fechados por mais de 15 dias a 30 °C. Especificamente em processos de fermentação asséptica os fermentadores são herméticos, com controle de pressão. A eficiência do tratamento com UHT pode ser expressa em números de reduções decimais da população microbiana alcançada ao final do processo de esterilização. Diferente de processos convencionais de fermentação industrial, como a fermentação alcoólica, que possuem índices de contaminação aceitáveis variando entre 10^3 UFC/mL na matéria-prima e 10^5 UFC/mL no processo de fermentação, o processo de fermentação asséptica não permite índices superiores a 10^{-4} UFC/mL no meio de produção.

Sendo os fatores controladores do processo de esterilização a temperatura e o tempo, na esterilização do xarope a temperatura deve ser mantida em 121 °C, pois acima desta, pode ocorrer a caramelização dos açúcares presentes no xarope, o que torna operacional apenas alterar o tempo de residência na unidade de UHT. É esperada a redução de contaminantes iniciais de 10^3 UFC/mL no xarope não estéril para valores de 10^{-3} UFC/mL a 10^{-4} UFC/mL após o tratamento, podendo-se obter no sistema até 9 reduções decimais em comparação com a contagem inicial de contaminantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para o desenvolvimento deste estudo consistiu em detectar, diagnosticar e delinear soluções para o crescimento celular insuficiente na etapa de propagação do inóculo do bioprocessamento industrial de produção de farneseno da companhia holandesa DSM, unidade de Brotas-SP.

Uma vez detectadas falhas na etapa mencionada do referido bioprocessamento, um diagnóstico sobre as possíveis causas dessas falhas foi apresentado e soluções de correção para os problemas foram propostas e discutidas tecnicamente, analisando-se primeiramente a possibilidade de investigação da eficácia de tais soluções por técnicas de modelagem e simulação e, secundariamente, a factibilidade dessas soluções.

A seguir são apresentados os métodos analíticos empregados na determinação das principais variáveis de estado monitoradas durante a etapa de crescimento celular no *IF (Initial Fermenter)*.

4.1 Densidade ótica

A determinação da Densidade Ótica (D. O.) foi feita *off-line* por análise espectrofotométrica de amostras retiradas da cultura microbiana, sendo um método rápido, mas, indireto de medida da concentração celular. A análise consiste em colocar a amostra retirada em uma célula fotossensível (fotocélula), fazendo-se incidir sobre a amostra um feixe de luz e medindo-se a luz transmitida por meio de um espectrofotômetro. A intensidade de luz transmitida pela amostra (I) depende do comprimento de onda (540, 600 ou 640 nm) e da intensidade da luz incidente (I_0), da turbidez do meio (τ) e do parâmetro associado ao caminho ótico percorrido pela luz na célula de medida (b). A Densidade Ótica (D.O.) da amostra corresponde à transmitância, a qual é determinada a partir da relação $I = I_0 e^{-b\tau}$, obtendo-se $D.O. = b\tau = \ln(I_0/I)$. Dentro de certos limites, existe uma relação linear entre a concentração celular e a D. O. da amostra.

4.2 Concentração de açúcares e etanol

A determinação da concentração de açúcares e etanol foi realizada em equipamento YSI 2700 SELECT que opera utilizando-se de uma reação enzimática com o composto analisado de forma a promover a liberação de elétrons, os quais geram uma corrente elétrica ao passar por um eletrodo de platina, que é medida e transformada em concentração do composto inicial. O mesmo equipamento pode ser configurado para leitura de etanol, sacarose, glicose, dentre outros, substituindo-se os reagentes utilizados tais como membranas enzimáticas, padrões de calibração e tampão.

Para análises de compostos distintos, os princípios de operação e manutenção se mantêm os mesmos, porém deve-se atentar para as diferenças nas concentrações dos padrões de calibração, linearidade, e faixas de detecção, pois são diferentes para cada composto, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Valores para padrões de linearidade e faixa aceitável ($\pm 5\%$) para determinação da concentração de açúcares e etanol utilizando-se kit enzimático

Composto	Padrão de Linearidade	Faixa Aceitável (g/L)
Sacarose	YSI 2778 – 25,0 g/L	23,75 a 26,25
Glicose	YSI 1531 – 9,0 g/L	8,55 a 9,45
Etanol	YSI 2790 B – 3,2 g/L	3,04 a 3,36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção de falhas no processo fermentativo de produção industrial de farneseno

Atualmente, a fase C da etapa 1 não atinge os valores alvos pretendidos como tempo, volume e densidade ótica, o que provoca impactos negativos na Etapa 2 do bioprocessamento, ocasionando perdas acumuladas de produtividade na Etapa 2. A Figura 4 mostra o crescimento celular, em termos de densidade ótica, versus o tempo de cultivo no SF (Fase C, Etapa 1). Nesta figura, podem-se observar os valores alvos obtidos em bancada (linhas pretas), os valores desejados (linhas vermelhas) e os valores reais obtidos no processo industrial (pontos). Assim, o ajuste das condições operacionais da Fase C da Etapa 1 pode atender à demanda desejada e evitar perdas de produtividade do bioprocessamento.

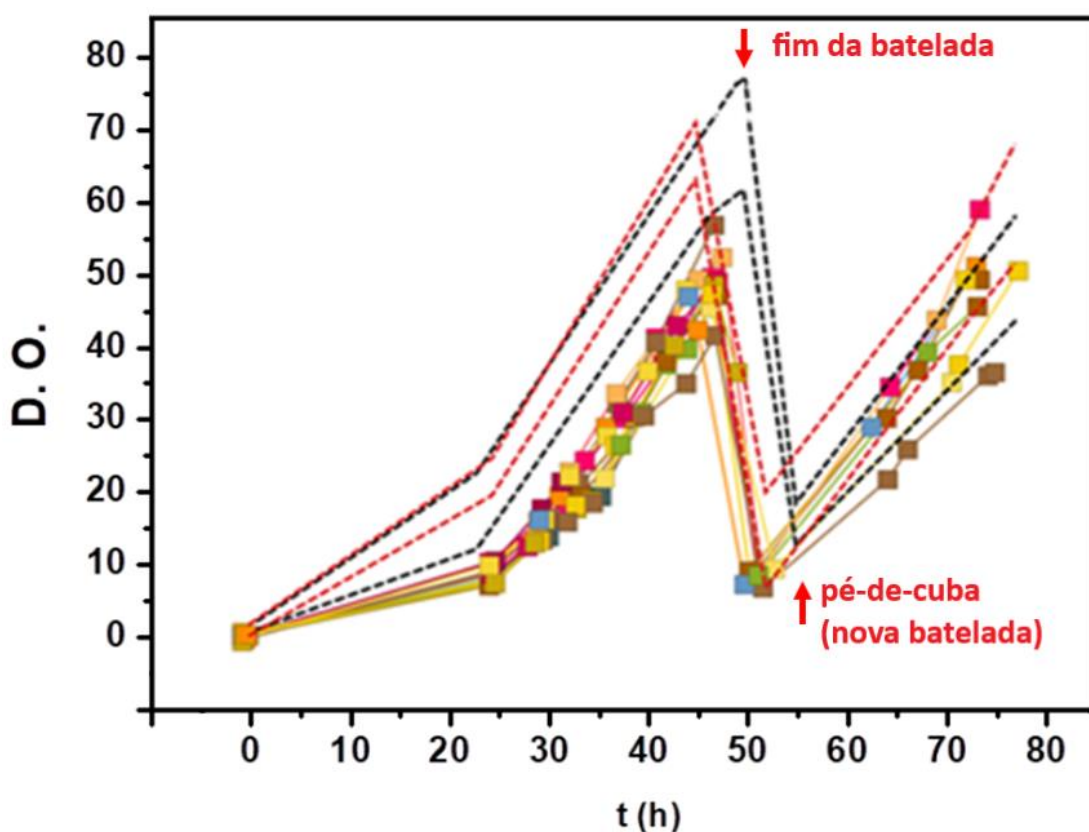


Figura 4: Crescimento celular (densidade ótica) versus tempo de cultura.
Fonte: Amyris, 2017.

Entretanto, o desempenho da Fase C depende de como transcorre o crescimento microbiano na Fase B. Atualmente, observa-se no *IF* (*Initial Fermenter*) um crescimento da biomassa muito abaixo daquele observado em escala de bancada, não se atingindo a concentração de massa seca e densidade ótica (D. O.) ideais de serem transferidas para a fase seguinte do processo (Fase C), a qual é realizada no *SF* (*Seed Fermenter*).

A proposta do P & D (Pesquisa e Desenvolvimento) é transferir a cultura para o *SF* após um tempo de cultivo no *IF* de 48 horas, ao final do qual se espera obter uma D. O. entre 42 e 46, o que não é atualmente alcançado em escala industrial, mesmo para tempos longos de cultivo, conforme mostram os dados da Tabela 3, acarretando um tempo maior de processo e de utilização do *IF*, alterando a qualidade/quantidade do inóculo da Fase C e afetando todas as fases posteriores ao *SF*, com diminuição da produtividade global do processo.

Tabela 3 – Valores iniciais e finais da densidade ótica (D. O.) e da concentração de substrato e tempo final de cultivo para cada batelada realizada no *IF* à pressão de 1.0 bar

Pressão (bar)	Batelada	D.O. ₍₀₎ (-)	S ₀ (g/L)	D.O. _(f) (-)	S _f (g/L)	t _f (h)
1.0	01	0.11	50.6	30.8	0.17	55.0
	02	0.12	52.7	28.8	0.05	58.0
	03	0.09	54.0	31.2	3.91	54.0
	04	0.10	56.6	21.5	0.14	60.0
	05	0.10	51.1	27.1	0.06	58.0
	06	0.09	63.8	23.0	4.37	58.0
	07	0.20	74.9	27.9	3.00	58.0
	08	0.10	75.3	28.8	3.10	60.0

5.2 Diagnóstico e proposta de soluções

Diversas podem ser as causas do crescimento insuficiente da biomassa observado atualmente na planta industrial, incluindo: (i) pressão aplicada ao fermentador; (ii) tamanho do inóculo; (iii) meio de cultivo insuficiente quanto ao aspecto nutricional; (iv) inibição por excesso de substrato e/ou por inibidores presentes na solução de substrato disponibilizada no início do processo em batelada ou acumulados durante o crescimento microbiano; (v) modo de cultivo celular inadequado.

5.2.1 Pressão aplicada ao fermentador

A transferência de oxigênio em bioprocessos aeróbios pode ser incrementada aumentando-se a pressão parcial de oxigênio no meio, sendo uma das formas para conseguir isso, operar o fermentador sob altas pressões (BAILEY; OLLIS, 1986). O aumento da pressão e consequentemente da pressão parcial de oxigênio em bioprocessos aeróbios pode ter efeitos positivos ou negativos, dependendo da pressão aplicada, dos microrganismos, das condições de cultura e do intervalo de concentração de oxigênio dissolvido (ONKEN; LIEFKE, 1989). Pressões parciais de oxigênio acima de 1.0 bar são tóxicas às culturas aeróbias, pois inibem o crescimento microbiano e a formação de produto (ONKEN; LIEFKE, 1989). As culturas podem ser inibidas devido à formação de formas ativas de oxigênio em excesso dentro da célula, as quais requerem uma atmosfera redutora local (BAILEY; OLLIS, 1986). Lopes *et al.* (2014) reportam que acima de certos limites o aumento da pressão parcial de oxigênio, resultante do aumento da pressão de ar, pode gerar efeitos nocivos sobre a atividade celular devido à formação de espécies reativas de oxigênio e apresentam um esquema na qual mostram uma visão geral do impacto do aumento da pressão de ar sobre o cultivo de células microbianas, a qual é reproduzida na Figura 5.

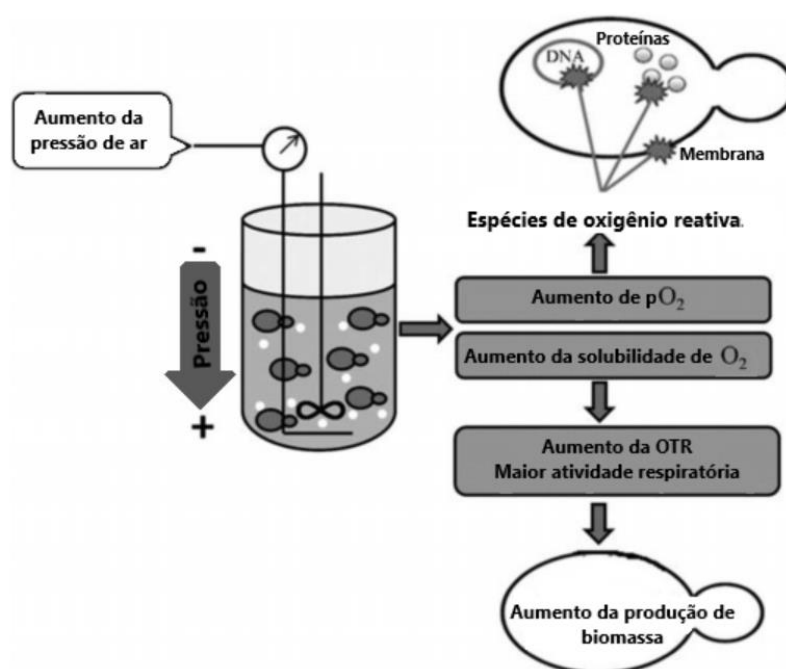


Figura 5: Visão geral do impacto da pressão do ar nas células microbianas sob cultivo: transferência de massa de oxigênio, crescimento microbiano e estresse oxidativo. (Fonte: Adaptado de Lopes *et al.*, 2014)

Também, se por um lado o aumento da pressão total favorece a dissolução do oxigênio no meio, por outro, desfavorece o desprendimento de gases dissolvidos que podem ser tóxicos ao metabolismo microbiano tal como é o CO₂ para leveduras em pressões parciais acima de 100 mbar (ONKEN; LIEFKE, 1989).

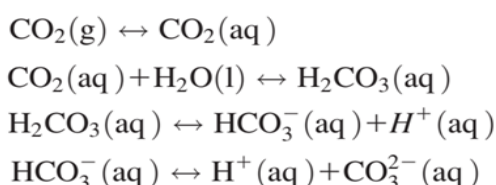
Alguns estudos dos efeitos do aumento da pressão do ar sobre o crescimento microbiano obtiveram resultados positivos quando a pressão aplicada foi menor que 6 bar. Coelho *et al.* (2004) observaram que em um cultivo aeróbico em batelada de *Saccharomyces cerevisiae* a taxa específica de crescimento dobrou ao se aplicar uma pressão de 6 bar. Dong *et al.* (2007) observaram uma redução de 4,5 vezes na densidade celular em um cultivo aeróbico em batelada a 15 bar, resultando também na acumulação de trealose e glutatona. Lopes *et al.* (2014) verificaram que culturas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tiveram melhorias na taxa específica de crescimento e no rendimento em massa celular quando pressurizadas com ar até 10 bar.

De outra forma, Pinheiro *et al.* (1997) verificaram uma redução de 2,2 vezes na taxa específica de crescimento em culturas em batelada com 6 bar de pressão de ar em comparação com experimento realizado com 1,2 bar. Belo *et al.* (2005) e Pinheiro *et al.* (1997) observaram uma diminuição na concentração de etanol quando utilizaram oxigênio puro à pressão acima de 3 bar, acarretando um efeito de inativação sobre a levedura, o que permitiu concluir que a causa da inibição celular foi a toxicidade do oxigênio em excesso e não a pressão total de ar, assim como concluíram que a natureza do gás e não a pressão total é fundamental para a respiração celular. Observaram também que as células de *Saccharomyces cerevisiae* quando expostas a oxigênio puro acima de 3 bar tiveram o desprendimento dos brotos atrasado, com redução da porcentagem de células brotantes.

Dong *et al.* (2007) relatam alterações morfológicas em células microbiana, pois sob pressão atmosférica, células de *Saccharomyces cerevisiae* eram redondas mas à 5 bar as células tornaram-se mais ovais e com pressão de 15 bar observaram-se mudanças na estrutura da membrana e morte celular, assim como no tamanho das células de *Saccharomyces cerevisiae*. O aumento da pressão de ar exerce compressão sobre a célula, causando estresse oxidativo e danos à membrana das células tais como peroxidação lipídica, mudanças na permeabilidade e fluidez da membrana, o que pode levar à perda de componentes internos.

Segundo Lopes *et al.* (2014), a variação das concentrações de O₂ e CO₂ é a responsável pela variação de desempenho de espécies microbianas em fermentações aeróbicas. Embora os resultados mostrem uma apreciação pelo aumento da contrapressão em fermentadores aeróbicos de modo a melhorar a concentração da saturação do oxigênio resulta também no aumento da concentração de CO₂ dissolvido, prejudicando o desenvolvimento das leveduras.

Como a solubilidade do CO₂ na água é cerca de 2,5 vezes maior que a do O₂, o CO₂ sob pressão irá se dissolver mais, acidificando o meio e gerando íons hidrogenocarbonato e carbonato, alterando o pH conforme as seguintes equações químicas de equilíbrio.



Os fermentadores aeróbicos geralmente são mantidos a contrapressão menor que 1 bar, mas, podendo escalonar esta pressão aumentando-a ao longo do tempo de fermentação, como feito por Pinheiro *et al.* (2014) durante cultivos batelada e batelada alimentada de *Candida utilis* (Figura 6).

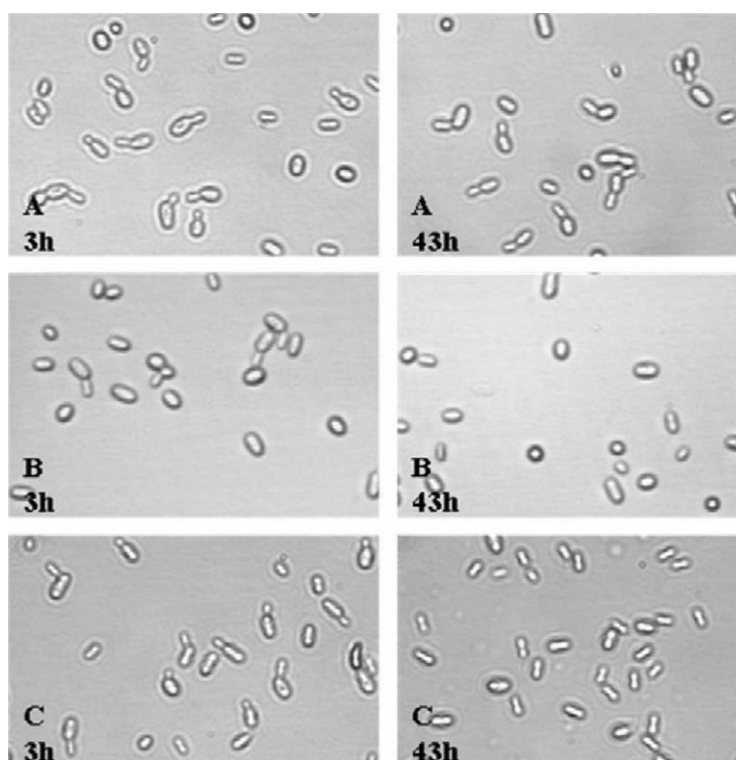


Figura 6: Morfologia de *Candida utilis* durante cultivos em batelada alimentada com escalonamento de pressão: A – 1 bar, B – 6 bar, C – 12 bar (**Fonte:** Pinheiro *et al.*, 2014)

Em um biorreator a pressão total em cada ponto é a soma da pressão operacional (pressão no topo do reator) e a pressão hidrostática exercida pela coluna de líquido acima deste ponto. Assim, em biorreatores industriais contendo solução de meio até 10 metros de altura com uma compressão no topo de 1,5 bar de pressão, resultará no fundo uma pressão de 2,5 bar e a solubilidade dos gases oxigênio e dióxido de carbono no fundo do tanque será aproximadamente 70 % maior do que no topo do biorreator, sendo essa diferença de solubilidade tanto maior quanto maior for a altura de líquido nos reatores (PINHEIRO, 2004; ONKEN; LIEFKE, 1989). Por isso é importante os estudos de escalonamento industrial, pois essas diferenças entre a fase de P & D (Pesquisa e Desenvolvimento) e a aplicação industrial resultam em diferenças de produtividade visto que em escala de produção são utilizados fermentadores *air-lift* com aeradores no fundo do tanque enquanto que na escala piloto, foram utilizados fermentadores de tanque agitado, os quais apresentam homogeneidade maior do meio.

Desde que os efeitos da pressão sobre bioprocessos aeróbios são controversos na literatura, havendo tanto relatos positivos quanto negativos, optou-se, numa primeira tentativa, por reduzir a pressão no *IF* para 0,5 bar visando resolver o problema de crescimento insuficiente na fase B da Etapa 1 do bioprocessamento industrial de produção de farneseno. Os resultados finais obtidos em dez bateladas realizadas a esta pressão estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores iniciais e finais da densidade ótica (D. O.) e da concentração de substrato e tempo final de cultivo para cada batelada realizada no *IF* à pressão de 0.5 bar

Pressão (bar)	Batelada	D.O. ₍₀₎ (-)	S ₀ (g/L)	D.O. _(f) (-)	S _f (g/L)	t _f (h)
0.5	11	0.24	65.4	48.2	3.34	58.0
	12	0.25	59.7	43.0	0.10	60.0
	13	0.27	67.6	48.4	0.07	58.0
	14	0.17	74.5	42.5	1.94	58.0
	15	0.18	77.8	53.4	1.97	68.0
	16	0.29	79.5	44.2	0.00	60.0
	17	0.16	76.1	40.1	3.90	62.0
	18	0.36	75.4	52.0	0.29	68.0
	19	0.10	70.9	38.0	0.31	58.0
	20	0.14	74.0	42.3	0.27	58.0

Analisando-se os dados da Tabela 4, verifica-se que a redução da pressão de operação no *IF* para 0.5 bar favoreceu o crescimento microbiano, pois o valor médio do coeficiente de conversão de substrato em células $Y_{X/S}$, definido como $Y_{X/S} = (D.O._{(f)} - D.O._{(0)}) / (S_0 - S_f)$, nesta pressão foi 0.64 enquanto que na pressão de 1.0 bar foi 0.48, 33.33% superior. Além disso, com exceção de um único caso (Batelada 19), todos as demais bateladas atingiram a densidade ótica pretendida para esta fase, porém, em tempos muito superiores ao estipulado (48 h), o que requer a proposição e a análise de outras alternativas para a completa resolução do problema, no que diz respeito à densidade ótica e ao tempo especificados para esta etapa do bioprocessamento.

5.2.2 Tamanho do inóculo

O principal objetivo do desenvolvimento de inóculo para a propagação da levedura é produzir uma quantidade de células ativas que proporcione a menor duração possível da fase *lag* na cultura subsequente, ou seja, no processo de aumento de escala industrial por *seed-trains*, por meio do qual ocorrem algumas fases de transferência para tanques de tamanho diferentes. Segundo Pamboukian (1997), existem trabalhos na literatura que enfocam a importância da etapa de inoculação em processos fermentativos, mostrando que o tipo e a qualidade do inóculo têm um efeito considerável no resultado da fermentação, pois podem influenciar na morfologia de crescimento do microrganismo durante o bioprocessamento.

A duração da fase *lag* varia, principalmente, com a quantidade, idade e sobretudo com o estado bioquímico (fisiológico) das células. Se as células do inóculo forem provenientes de um meio de cultura de composição diferente (substrato diferente), a adaptação enzimática (fenômeno de indução) pode levar maior tempo. Entretanto, se as células inoculadas forem oriundas de um meio com a mesma composição, a idade das células é que determina a duração da fase *lag* (SCRIBAN, 1984). A diminuição da fase *lag*, geralmente, provoca uma diminuição do tempo total de fermentação, aumentando a produtividade do processo (PAMBOUKIAN, 1997).

O volume de inóculo pode variar entre 5 % e 10 % do volume de cultura (BAILEY; OLLIS, 1986) dependendo do modo de operação empregado que pode ser batelada ou batelada alimentada, sendo importante realizar a transferência do inóculo quando os níveis de concentração de açúcares forem próximos de zero para que ocorra máxima conversão em biomassa e não transferir açúcares residuais para a próxima fase. Além disso, devem ser transferidas células provenientes da fase de cultivo exponencial, na qual as células estão metabolicamente ativas.

A produção de inóculo para fermentações em laboratório é relativamente simples e raramente excede dois estágios. No caso industrial, é necessária a preparação de um inóculo de boa qualidade e em volume suficiente para a inoculação do fermentador na etapa final de produção (PAMBOUKIAN, 1997). Assim, nos processos industriais, a etapa de produção do inóculo compreende vários estágios de transferência, visando, em muitos casos, a obtenção de um grande volume de inóculo (PARTON; WILLIS, 1990). Segundo Reisman (1988), todas as etapas de produção do inóculo devem ser monitoradas a fim de se manter a viabilidade e a produtividade das células. Corbett (1987) enfatizou que, quanto maior o número de estágios envolvidos no processo, maior é a chance de o microrganismo não se manter suficientemente ativo (produtivo), particularmente no caso de cepas mutantes, que são, geralmente, instáveis. Outro aspecto é a questão do custo elevado quando se tem vários germinadores, os quais são reatores tão sofisticados quanto o reator de produção.

Strehaiano *et al.* (1983) estudaram o efeito do inóculo em fermentações alcoólicas e obtiveram a diminuição do tempo de fermentação com o aumento da fração de inóculo. Maiorano (1982) estudou a influência da concentração de esporos do inóculo na produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* em cultivo semi-sólido. A produção de enzimas aumentou com o aumento da concentração de esporos até o limite de $1,0 \times 10^6$ esporos/grama de matéria seca, acima do qual não houve influência da concentração de esporos sobre a produção enzimática.

Diante desse cenário, uma solução para acelerar o crescimento da levedura na Fase B da Etapa 1, visando atingir a D.O. requerida no tempo desejado, seria aumentar o tamanho do inóculo, isto é, aumentar a concentração de células transferidas para o início dessa fase.

Para a investigação da influência da concentração inicial de células X_0 (tamanho do inóculo) sobre a curva de crescimento microbiano encontra-se na literatura um modelo matemático baseado na cinética de Monod que descreve os perfis temporais da concentração de substrato (S) e de células (X) em função dos parâmetros do modelo (μ_{max} , K_S e $Y_{X/S}$), das condições iniciais (S_0 e X_0) e do tempo de cultura (t), sendo representado pelas seguintes equações (BAILEY; OLLIS, 1986):

$$\left[X_0 + Y_{X/S}(S_0 + K_S) \right] \ln \left[\frac{X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)}{X_0} \right] - K_S Y_{X/S} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{max} (X_0 + Y_{X/S} S_0) t \quad (4)$$

$$X = X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S) \quad (5)$$

A partir desse modelo matemático é possível realizar simulações aumentando-se X_0 e verificar se o aumento do tamanho do inóculo pode ser uma solução para o problema do crescimento limitado da levedura no IF.

5.2.3 Meio de cultivo insuficiente quanto ao aspecto nutricional

Um meio de cultivo deve atender às necessidades nutricionais do microrganismo cultivado e ser de baixo custo quando se visa a uma aplicação industrial.

Para a realização de suas atividades celulares, os microrganismos utilizam vários açúcares como fonte de carbono e energia, incluindo glicose, sacarose, frutose ou ainda polissacarídeos como o amido e a celulose. Como fonte de nitrogênio são utilizados sais como NH_4HSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ou aminoácidos ou a uréia, a qual facilita o controle de pH. As fontes de fósforo utilizadas são os fosfatos solúveis como o monoamônio fosfato (MAP) ou o diamônio fosfato (DAP), os quais também são fontes de nitrogênio. Além desses nutrientes, é necessário adicionar, também na forma de sais solúveis, outros elementos em quantidades muito reduzidas, como Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn e Co, os quais constituem-se nos micronutrientes do meio.

Meios de cultura assim constituídos são denominados de meios definidos ou sintéticos, os quais possuem composição química bem determinada e podem ser reproduzidos sempre que desejável.

Dessa forma, para microrganismos que apresentam bom desempenho em tais meios, espera-se uma maior estabilidade dos sistemas produtivos, bem como a não ocorrência de problemas nas etapas de recuperação e purificação do produto final, razão pela qual, esses meios, mesmo sendo mais custosos, podem ser preferidos desde que possibilitem uma maior economicidade nas etapas de *downstream*.

Quanto aos meios mais complexos e, portanto, menos onerosos, justificativa pela qual são empregados na maioria dos bioprocessos em grande escala, cabe mencionar aqueles baseados em matérias-primas naturais, incluindo caldo de cana-de-açúcar, melaços, farinhas diversas (farinha de trigo, milho, soja, cevada), água de maceração de milho (*corn steep liquor*) e outras.

Essas matérias-primas são de composição química indefinida, podendo-se conhecer os teores dos açúcares disponíveis, nitrogênio, fósforo, mas não dos sais minerais devido ao elevado número de constituintes presentes. Para melhorar as características nutricionais de meios de cultura à base de materiais naturais, geralmente faz-se a suplementação desses meios com alguns sais, particularmente aqueles contendo nitrogênio e fósforo.

Evidentemente que a composição química dessas matérias-primas dependerá de uma série de fatores, tais como solo, variedade vegetal, safra, clima, processamento durante a colheita, estocagem, dentre outras, o que gera a expectativa de ocorrerem oscilações nos bioprocessos que empregam essas matérias-primas, obrigando as unidades industriais a manterem instalações piloto para o ajuste da composição do meio a cada novo lote de matéria-prima recebido, a fim de evitar grandes oscilações na operação de biorreatores de grande porte.

Apesar de essas matérias-primas naturais poderem causar problemas adicionais na recuperação e purificação do produto final, assim como problemas nos tratamentos das águas residuárias, ainda continuam sendo matérias-primas preferidas em um grande número de casos por serem mais baratas.

No entanto, para uma grande variedade de linhagens, é necessária a adição de certos "fatores de crescimento", ou seja, alguns aminoácidos específicos ou vitaminas (como biotina, tiamina, riboflavina e outros). Quando essas necessidades específicas são conhecidas, o que nem sempre ocorre, é possível adicionar tais fatores de crescimento visando melhorar as características nutricionais do meio. Entretanto, o custo destes meios assim suplementados pode tornar-se inviável,

particularmente para instalações de grande porte, cabendo uma análise de custo/benefício dessa alternativa.

Para o suprimento das necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, com requisitos nutricionais pouco conhecidos, podem ser adicionados certos componentes complexos de comprovado valor nutricional tais como a peptona (hidrolisado de proteínas) e os extratos de levedura, carne e malte.

Esses componentes, adicionados individualmente ou conjuntamente, permitem suplementar meios de cultura com os fatores de crescimento ausentes em um meio complexo.

A partir do exposto anteriormente, fica claro que pode ser possível aumentar o acúmulo de leveduras no *IF* suplementando-se o meio de cultivo com compostos melhoradores do crescimento microbiano. Uma análise do modelo de Tsao e Hanson (1975) (Equação (6)), mostra que esses compostos melhoradores do crescimento quando presentes em quantidades suficientes no meio podem incrementar a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) conforme demonstrado a seguir:

$$\mu = \left(k_0 + \frac{k_1 S_1}{K_1 + S_1} + \frac{k_2 S_2}{K_2 + S_2} \right) \left(\frac{G}{K_G + G} \right) \quad (6)$$

Na Equação (6), S_1 , S_2 representam as concentrações dos substratos melhoradores enquanto G representa a concentração do substrato essencial ao crescimento. Na ausência do substrato essencial, $G = 0$ e, conseqüentemente, $\mu = 0$, isto é, não ocorre crescimento sem esse substrato. No meio mínimo, isto é, sem os substratos melhoradores, $S_1 = 0$, $S_2 = 0$ e $\mu_{\max} = k_0$. Na ausência apenas de S_2 , tem-se $S_2 = 0$ e $\mu_{\max} = k_0 + k_1$. Estando os três substratos presentes no meio, tem-se $\mu_{\max} = k_0 + k_1 + k_2$. Concluindo, $\mu_{\max}$ pode ser aumentada pela suplementação do meio com substratos melhoradores do crescimento microbiano.

A eficácia dessa solução pode ser testada no presente caso utilizando-se o mesmo modelo baseado na cinética de crescimento de Monod (Equações (4) e (5)), no qual um dos parâmetros é justamente $\mu_{\max}$. Assim, simulações podem ser realizadas aumentando-se o valor de $\mu_{\max}$ para simular o efeito de substratos melhoradores sobre o crescimento microbiano visando verificar se os valores alvos podem ser atingidos.

5.2.4 Inibição por excesso de substrato e/ou por inibidores presentes na solução de substrato disponibilizada no início do processo em batelada ou acumulados durante o crescimento microbiano

É possível estar havendo inibição do crescimento microbiano por excesso de substrato disponibilizado no início do cultivo e/ou por inibidores presentes no meio inicial uma vez que, em se tratando de meio complexo, sua composição poderá conter substâncias inibidoras do crescimento. Além disso, produtos inibidores oriundos do próprio metabolismo das células podem se acumular durante o crescimento e inibi-las.

Raciocinando-se em termos do modelo de crescimento baseado na cinética de Monod, esses inibidores quando presentes têm o poder de mascarar os valores de $\mu_{\max}$ e K_S , aumentando-se K_S e mantendo-se $\mu_{\max}$ inalterado quando a inibição é do tipo competitiva ou diminuindo-se $\mu_{\max}$ e mantendo-se K_S inalterado quando a inibição é não-competitiva. Quando a inibição é do tipo incompetitiva, ambos os parâmetros são afetados. Uma forma de evitar tais inibições seria mudar o modo de condução do bioprocessamento de batelada para batelada alimentada visando controlar a quantidade de substrato e/ou diluir outros inibidores no meio e assim evitar efeitos inibitórios sobre o crescimento celular durante o bioprocessamento. Entretanto, para a análise da eficácia dessa solução seria necessário dispor de um modelo matemático que contemplasse estes efeitos de inibição, após a realização de estudos experimentais para comprovar a ocorrência de tais inibições, bem como para identificar quais são os inibidores e a partir de quais concentrações eles se tornam inibitórios.

O que pode ser feito é realizar simulações utilizando-se o modelo baseado na cinética de Monod para verificar se atenuando os efeitos de possíveis inibições, o que corresponderia a aumentar o valor de $\mu_{\max}$ (caso da inibição não competitiva) ou diminuir o valor de K_S (caso da inibição competitiva), o crescimento microbiano atingiria os valores de D. O. e tempo especificados para esta etapa do bioprocessamento.

5.2.5 Modo de cultivo celular inadequado

Pode ser que o modo de cultivo batelada esteja sendo inadequado para a etapa de propagação do inóculo no bioprocessamento industrial de produção de farneseno. Assim, a mudança do modo de cultivo de batelada para batelada alimentada visa avaliar se essa estratégia promoverá um maior e mais rápido crescimento celular no *IF*. É sabido que na produção industrial de biomassa de levedura busca-se controlar, por meio da utilização de diversos perfis de taxa de alimentação (constante, linear, exponencial e outros), a disponibilidade da fonte de carbono no fermentador visando minimizar a síntese de etanol como consequência do efeito de repressão do metabolismo respiratório pela glicose (efeito *Crabtree*), evitando que haja excesso de substrato no meio, o qual poderia ser deslocado para a produção de álcool, diminuindo, assim, o rendimento da conversão de substrato em células (PIRES, 2017; CARVALHO; SATO, 2001).

Para avaliar a eficácia dessa solução por meio de simulação, o modelo matemático de crescimento microbiano em reator batelada deve ser adaptado para reator batelada alimentada, incluindo-se nas equações de balanço de massa de células e de substrato o termo referente à diluição que ocorre no sistema devido à alimentação contínua de substrato até o enchimento do reator, o que requer a inclusão de uma equação para descrever a taxa de variação temporal do volume de meio no reator.

Na simulação do processo de crescimento microbiano em modo batelada alimentada deve-se considerar que a quantidade total de substrato a ser disponibilizada ao longo do tempo de enchimento do *IF* (t_e) deve ser a mesma disponibilizada no início da operação em batelada. Para tanto, deve-se determinar a vazão volumétrica da corrente de alimentação de substrato (F) que, no tempo estipulado para o crescimento (48 h), tempo este que no caso deve ser igual ao tempo de enchimento, seja capaz de atingir o volume de processamento desejado no reator (V_p), sendo a concentração de substrato nessa corrente (S_e) calculada a partir da Equação (7), a qual garante que a massa de substrato acumulada fornecida ao longo da operação em batelada alimentada será igual àquela disponibilizada no início da operação em batelada.

$$FS_e t_e = (S_0)_{batch} V_p \quad (7)$$

Na Equação (7): $F = (V_p - V_0)/t_e$, sendo V_0 o volume inicial de meio no fermentador, o qual corresponde ao volume de inóculo. Segundo Schmidell e Facciotti (2001), o inóculo no reator descontínuo alimentado deve ocupar uma fração volumétrica entre 10 e 20 %, fração esta que deve ser especificada na simulação.

5.3 Factibilidade das soluções propostas e considerações sobre aspectos econômicos

Dentre as cinco soluções propostas, a redução da pressão total no *IF* foi a única implementada na planta, tendo surtido efeito positivo quanto ao atingimento da densidade ótica especificada para o processo, porém, sem atender ao tempo estipulado para isso. Entretanto, a implementação desta solução revestiu-se de grande importância para a completa resolução do problema, pois o *IF* passou a operar permanentemente nesta nova pressão.

As demais soluções, desde que comprovadas suas viabilidades técnico-econômicas por meio de simulações empregando modelos matemáticos apropriados, são factíveis do ponto de vista prático-operacional, não se vislumbrando, a princípio, problemas na implementação delas.

Sobre os aspectos econômicos, o impacto da melhoria implementada resultou em redução de utilidades como ar, vapor, energia elétrica e produtos químicos, otimizando a performance e a disponibilidade dos equipamentos nas fases posteriores do bioprocessamento devido à antecipação da produtividade desejada no fermentador principal em 20 horas, o que gerou um acréscimo do volume de produção anual acumulado de 1 %, resultando numa receita anual de mais de 2 milhões de dólares. Esta receita varia com a cotação do dólar e com o custo das utilidades, havendo tendência de obtenção de maiores receitas quando ocorre desvalorização do real.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram diagnosticadas e analisadas possíveis causas do crescimento microbiano insuficiente atualmente observado na etapa de propagação do inóculo do bioprocesso industrial de produção de farneseno da companhia holandesa DSM. Soluções para o problema baseadas em conceitos de modelagem matemática de bioprocessos foram propostas e suas eficácias preliminarmente investigadas por meio de simulações empregando modelos matemáticos apropriados e representativos do crescimento microbiano no reator de propagação, devendo estes ser previamente desenvolvidos e validados a partir de dados experimentais do processo.

Cinco causas foram apontadas e suas respectivas soluções foram propostas, dentre as quais, uma já foi testada na planta, resolvendo parcialmente o problema no que diz respeito à obtenção da D.O. desejada, sem, entretanto, atender ao requisito de tempo. Simulações referentes às demais soluções propostas devem ser realizadas visando avaliar suas eficácias na resolução do problema e se eficazes, devem ser complementadas por análises de custo/benefício visando concluir sobre a viabilidade econômica das mesmas.

Conceitos de modelagem matemática de bioprocessos mostraram-se muito úteis para o estabelecimento de critérios racionais visando à detecção, diagnóstico e proposta de soluções para falhas na etapa de propagação do inóculo do bioprocessos industrial de produção de farneseno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**, 2nd. ed. New York: Mc. Graw Hill, 1986.

BELO, I.; PINHEIRO, R.; MOTA, M. Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. **Journal of Biotechnology**. v. 115, p. 397–404, 2005.

BENJAMIN, K. R.; SILVA, I. R.; CHERUBIM, J. P.; MCPHEEA, D.; PADDON, C. J. Developing Commercial Production of Semi-Synthetic Artemisinin, and of β -Farnesene, an Isoprenoid Produced by Fermentation of Brazilian Sugar. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 8, p. 1339-1345, 2016.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.) **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v.2, p.123-178.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001 v. 2, Cap. 10, p. 205-218.

COELHO M. A. Z.; BELO I.; PINHEIRO R.; AMARAL A. L.; MOTA M.; COUTINHO J. A. P.; FERREIRA E.C. Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: study by automated image analysis. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2004;66:318–324.

CORBETT, K. Production of antibiotics. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. London: Academic Press, 1987. p. 425- 448.

CRUZ, A. J. G. **Modelagem fenomenológica e simulação por redes neurais do bioprocesso de produção da penicilina-G**. São Carlos, 1996, 150p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochem Eng J**. 2007;37:226–230.

DORAN, P. **Bioprocess Engineering Principles**. 2nd. ed. Waltham: Academic Press, 2013.

HISS, H. Cinética de Fermentações: **Uma análise matemática da atividade microbiana**. Joinville, SC: Clube dos Autores, 2013.

LOPES, J. S. **Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de retamicina por microrganismo filamentosso *Streptomyces olindensis***. São Paulo, 2007, 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (USP).

LOPES, M.; OLIVEIRA, C.M.; DOMINGUES, L.; MOTA, M.; BELO, I. Enhanced heterologous protein production in *Pichia pastoris* under increased air pressure. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 5, p. 1040-1047, 2014.

LOPES, M.; MOTA, M.; BELO, I. Over-pressurized bioreactors: Application to microbial cell cultures. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 4, p. 767–775, 2014. DOI: 10.1002/btpr.1917. Epub 2014 May 8.

MAIORANO, A. E. **Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi- sólido**. São Paulo, 1982.144p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

OHBA, M. S. **Modelagem matemática da produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. São Paulo, 1998, 213p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (USP).

OLIVEIRA, S. C. Mathematical Modeling of Batch Antibiotic Production: Comparative Analysis between Phenomenological and Empirical Approaches. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 7, p. 1-6, 2017.

ONKEN, U.; LIEFKE, E. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. **Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology**. v. 40, p. 137–169. 1989.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori***. São Paulo, 1997, 189p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP).

PARTON, C.; WILLIS, P. Strain preservation, inoculum preparation and development. In: McNEIL, B.; HARVEY, L.M. **Fermentation: a practical approach**, Oxford: IRL Press, 1990, p. 39 - 64.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. Enzymictec. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756–762, 2000.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* under increased air and oxygen pressures. **Biotechnology Letters**, v.19, p. 703–708, 1997.

PINHEIRO, R.; LOPES, M.; BELO, I.; MOTA, M. *Candida utilis* metabolism and morphology under increased air pressure up to 12 bar. **Process Biochemistry**. v. 49, n. 3, p. 374-379, 2014.

PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia das leveduras**. Braga, 2004, 292p. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia Universidade do Minho (UMinho).

PIRES, J. M. C. **Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio.** (Tese de Doutorado), Universidade de Évora, Portugal, 2017.

REISMAN, H. B. **Economic analysis of fermentation processes.** Boca Raton: CRC Press, 1988. p.14 – 35.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, Cap. 8, p. 179-192.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial.** volume 2: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia.** São Paulo: Editora Manole Ltda., 1984.

SINCLAIR, G. G.; KRISTIANSEN, B. **Fermentation kinetics and modeling.** New York: Taylor & Francis, 1987.

STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 2, p. 135 - 140, 1983.

TSAO, G.T.; HANSON, T.P. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1591–1598, 1975.