

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 15/07/2022.

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 bioprocesso, especificamente aeróbio, como é o caso do bioprocesso 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 bioprocesso 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 bioprocesso 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.

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.