

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

**MODELAGEM, SIMULAÇÃO E AJUSTE DE CONDIÇÕES
OPERACIONAIS DA ETAPA DE CRESCIMENTO CELULAR DO
BIOPROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE FARNESENO**

FABIANO ANTONIO DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

Araraquara-SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

MODELAGEM, SIMULAÇÃO E AJUSTE DE CONDIÇÕES
OPERACIONAIS DA ETAPA DE CRESCIMENTO CELULAR DO
BIOPROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE FARNESENO

FABIANO ANTONIO DE SOUZA

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

S729m Souza, Fabiano Antonio de.
Modelagem, simulação e ajuste de condições operacionais da etapa de crescimento celular do bioprocesso industrial de produção de farneseno / Fabiano Antonio de Souza. – Araraquara: [S.n.], 2020.
69 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. Modelagem matemática. 2. Simulação. 3. Bioprocesso. 4. Farneseno. 5. Escala industrial. I. Oliveira, Samuel Conceição de, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MODELAGEM, SIMULAÇÃO E AJUSTE DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA ETAPA DE CRESCIMENTO CELULAR DO BIOPROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE FARNESENO

AUTOR: FABIANO ANTONIO DE SOUZA

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. FELIX MONTEIRO PEREIRA

Departamento de Engenharia Química / Escola de Engenharia de Lorena - USP

Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

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

Araraquara, 30 de junho de 2020

*Dedico este trabalho, com muito amor e
gratidão, à minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que em sua infinita sabedoria colocou força em meu coração para vencer essa etapa de minha vida.

Agradeço à minha família e meus amigos por todo o carinho, amor e força. Sou grato, especialmente, à minha esposa, grande parceira e incentivadora e a Lara minha filha por dividir seu tempo.

Agradeço ao meu time de processos e ao Renato Lopes, por me conceder o tempo e confiança durante o período de estudo.

Agradeço a todos os professores do PPG-EBB (Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos), especialmente ao Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira pela orientação deste trabalho. Obrigado por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência.

RESUMO

SOUZA, F. A. **Modelagem, simulação e ajuste de condições operacionais da etapa de crescimento celular do bioprocesso industrial de produção de farneseno.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Araraquara, 2020.

Atualmente um número crescente de indústrias tem utilizado bioprocessos para converter açúcares em diferentes produtos. Baseando-se na demanda de bioprodutos é imprescindível atingir elevados volumes de produção e nesse contexto, quaisquer perdas ou atrasos impactam negativamente na produtividade do bioprocessos. Desde que a identificação e o controle dos parâmetros de fermentação dependentes de escala são fundamentais para alcançar uma operação de alto desempenho em escala industrial, a otimização das variáveis intervenientes no processo de fermentação torna-se uma tarefa necessária que pode ser facilitada pelo uso de técnicas de modelagem e simulação de processos. Neste sentido, objetivou-se neste estudo modelar, simular e ajustar as condições operacionais da segunda fase da etapa de multiplicação celular do bioprocessos industrial de produção de farneseno. Baseado numa abordagem não segregada e não estruturada das células microbianas, o modelo matemático proposto consistiu de duas equações diferenciais ordinárias representativas dos balanços de massa de células e substrato no *IF* (*Initial Fermenter*). Para a integração numérica das equações diferenciais utilizou-se o método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem e para o ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo, utilizou-se o método dos mínimos quadrados em conjunto com o algoritmo de Marquardt. Os resultados obtidos mostraram que o modelo matemático proposto descreveu satisfatoriamente a tendência de comportamento das variáveis de estado modeladas (concentração de substrato e densidade ótica) para dois conjuntos de bateladas realizadas em pressões de 1.0 e 0.5 bar aplicadas no IF, validando o modelo para estudos de simulação, otimização e controle do bioprocessos. A partir de simulações levando em conta vários aspectos do bioprocessos tais como tamanho do inóculo, suplementação do meio de cultura com substratos melhoradores do crescimento, possibilidade de ocorrência de fenômenos de inibição e modo de cultivo (batelada ou batelada alimentada), foi possível ajustar as condições operacionais da etapa de crescimento celular no *IF* visando atingir os valores alvos de densidade ótica e de tempo de crescimento celular especificados para esta etapa do bioprocessos industrial de produção de farneseno.

Palavras-chave: Modelagem matemática; Simulação; Bioprocessos; Farneseno; Escala industrial.

ABSTRACT

SOUZA, F. A. **Modeling, simulation and adjustment of operational conditions of the cell growth stage of the industrial bioprocess of farnesene production** (Master in Biomaterials and Bioprocess Engineering) - School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, 2020.

Currently, an increasing number of industries have used bioprocesses to convert sugars into different products. Based on the demand for bioproducts, it is essential to achieve high production volumes and, in this context, any losses or delays have a negative impact on the productivity of the bioprocess. Since the identification and control of scale-dependent fermentation parameters are essential to achieve a high-performance operation at an industrial level, the optimization of the intervening variables in the fermentation process becomes a necessary task that can be facilitated by the use of process modeling and simulation techniques. In this sense, the objective of this study was to model, simulate and adjust the operational conditions of the second phase of the cell multiplication stage of the industrial bioprocess for producing farnesene. Based on a non-segregated and unstructured approach to microbial cells, the proposed mathematical model consisted of two ordinary differential equations representative of cell mass and substrate balances in the IF (Initial Fermenter). For the numerical integration of the differential equations, the 4th-order Runge-Kutta-Gill method was used and for the adjustment of the model's kinetic parameters, the least squares method was used together with the Marquardt algorithm. The results obtained showed that the proposed mathematical model satisfactorily described the behavioral trend of the modeled state variables (substrate concentration and optical density) for two sets of batches performed at pressures of 1.0 and 0.5 bar applied in the IF, validating the model for studies of simulation, optimization and control of the bioprocess. From simulations taking into account various aspects of the bioprocess such as inoculum size, supplementation of the culture medium with growth enhancing substrates, the possibility of occurrence of inhibition phenomena and cultivation mode (batch or batch fed), it was possible to adjust the operational conditions of the cell growth stage in the IF aiming to reach the target values of optical density and cell growth time specified for this stage of the industrial bioprocess of farnesene production.

Keywords: Mathematical modeling; Simulation; Bioprocess; Farnesene; Industrial scale

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos processos fermentativos.....	21
Figura 2: Curvas de ajuste aos dados de um ensaio de fermentação idealizado.....	23
Figura 3: Curva de crescimento microbiano em cultivo descontínuo.	26
Figura 4: Taxa específica de crescimento microbiano em função da concentração do substrato limitante segundo o modelo de Monod	27
Figura 5: Linearização do modelo de Monod.	28
Figura 6: Estrutura do trans - β -farneseno.	33
Figura 7: Aplicações do farneseno.	34
Figura 8: Fluxograma macro do processo industrial de produção de farneseno da DSM.....	35
Figura 9: Etapas do processo fermentativo.....	36
Figura 10: Etapa 1 Fase C do processo fermentativo.	40
Figura 11: Curva de crescimento celular (D. O.) em função do tempo de cultivo.....	41
Figura 12: Gráficos do ajuste do modelo aos dados experimentais de cada batelada à pressão de 1.0 bar.	46
Figura 13: Gráficos do ajuste do modelo aos dados experimentais de cada batelada à pressão de 0.5 bar.	48
Figura 14: Simulações relativas à análise da influência da concentração de inóculo. ...	52
Figura 15: Simulações relativas à análise da utilização de substratos melhoradores. ...	54
Figura 16: Simulações relativas à análise da possibilidade de ocorrência de inibição...57	
Figura 17: Simulação da operação fed-batch.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valor do coeficiente calculado para cada batelada..	44
Tabela 2: Valores dos parâmetros cinéticos do modelo ajustados para cada pressão aplicada no IF.....	45
Tabela 3: Resultados das simulações visando analisar a influência da concentração de inóculo sobre o crescimento microbiano no IF à pressão de 0.5 bar.	51

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Velocidade específica de crescimento celular
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular
r_x	Velocidade volumétrica de crescimento celular
r_p	Velocidade volumétrica de formação de produto
r_s	Velocidade volumétrica de consumo do substrato
K_s	Constante de saturação de Monod
K_i	Constante de inibição pelo substrato
X	Concentração de microrganismos num instante t
X_m	Máxima concentração de biomassa na qual cessa o crescimento celular
Y_i	Rendimento de reação do processo biológico “ i ”
$Y_{X/S}$	Rendimento em massa celular
$Y_{P/S}$	Rendimento em produto
S	Concentração de substrato num instante t
P	Concentração de produto num instante t
P_m	Máxima concentração de produto na qual cessa o crescimento celular
M	Expoente do termo de inibição pela biomassa
N	Expoente do termo de inibição pelo produto
F	Vazão volumétrica da corrente de alimentação de substrato
V_p	Volume de processamento no reator
S_e	Concentração de substrato na corrente de alimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL	16
3.2 ESTERILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E MEIOS	17
3.2.1 Métodos de Esterilização	18
3.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS	20
3.3.1 Fermentação Descontínua ou Batelada	21
3.3.2 Fermentação Descontínua Alimentada ou Semi-Contínua.....	22
3.3.3 Fermentação Contínua.....	22
3.4 CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	23
3.4.1 Velocidade Específica de Crescimento (μ_x).....	24
3.4.2 Rendimento em Massa Celular ($Y_{x/s}$)	24
3.4.3 Rendimento em Produto ($Y_{p/s}$).....	25
3.4.4 Curva de Crescimento Microbiano	26
3.4.5 Modelo Cinético de Monod.....	27
3.4.6 Inibição do Crescimento	29
3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS	29
3.6 VARIAÇÃO DE ESCALA.....	32
3.7 BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FARNESENO	33
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	37
4.2 ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODELO MATEMÁTICO	37
4.3 DADOS EXPERIMENTAIS.....	38
4.4 MÉTODOS NUMÉRICOS DE RESOLUÇÃO DE EQUAÇÕES DIFERENCIAIS	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 DETECÇÃO DE FALHAS NO BIOPROCESSO	40

5.2 PROPOSIÇÃO E SIMULAÇÃO DE ALTERNATIVAS PARA SOLUÇÃO DAS FALHAS	42
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICE A – SOLUÇÃO ANALÍTICA DO SISTEMA DE EQUAÇÕES DIFERENCIAIS REPRESENTATIVAS DO MODELO MATEMÁTICO	67

1. INTRODUÇÃO

Atualmente um número crescente de indústrias tem utilizado bioprocessos para converter açúcares em diferentes produtos. Em comparação com os processos químicos de produção, os bioprocessos possuem requisitos de energia e custos ambientais relativamente baixos, reduzida geração de resíduos e potencial para obtenção de produtos biodegradáveis, usando matérias-primas renováveis como a cana de açúcar (ROCHA *et al.*, 2013).

Um bioprocesso é um processo que, geralmente, libera energia, podendo ocorrer na presença ou ausência de oxigênio, a partir de um conjunto de reações enzimáticas, por meio das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples pela ação de microrganismos. O cultivo de microrganismos se desenvolve nos chamados biorreatores, equipamentos nos quais há a manipulação de parâmetros físicos, como temperatura, pH, entre outros, de forma a regular a biocatálise.

No caso estudado neste trabalho, o bioprocessos ocorre de forma asséptica, garantindo a destruição de microrganismos patogênicos e deteriorantes que são maléficos para o processo de obtenção do farneseno.

O farneseno é um hidrocarboneto a partir do qual é possível obter, por via química, vários produtos com aplicações em diversos setores. A síntese química do farneseno apresenta-se economicamente inviável devido ao alto custo e ao baixo rendimento das etapas de reação, o que fez a via fermentativa tornar-se uma alternativa bastante vantajosa para a síntese desse bioproduto, pois utiliza matéria prima de fonte renovável (xarope de cana de açúcar), sendo também ambientalmente atrativa.

Assim como em todos os bioprocessos utilizados industrialmente, o desenvolvimento do processo de produção de farneseno envolveu uma etapa prévia de ampliação de escala. Yang (2010) *apud* Crater e Lievense (2018), afirmam que o baixo desempenho de algumas fermentações em grande escala está na maioria das vezes relacionado ao aumento de escala. Isso porque não se pode garantir que, ao passar de uma escala para outra, o microrganismo agirá sobre o substrato nas mesmas condições que levaram o bioprocessos ao melhor desempenho na escala anterior.

O bioprocesso de produção de farneseno ocorre em duas etapas, sendo a primeira, a etapa de multiplicação e acumulação de células e a segunda, a etapa de produção de farneseno propriamente dita. A etapa de multiplicação celular é subdividida em três fases (A, B e C). O presente estudo está relacionado à fase C a qual influencia diretamente na fase de produção do farneseno, uma vez que atualmente, não estão sendo atingidos os valores alvos determinados para esta fase em escala industrial, o que tem acarretado perdas significativas de volumes de produção.

Sabendo-se que a identificação e o controle dos parâmetros de fermentação dependentes da escala são fundamentais para alcançar uma operação de alto desempenho, o ajuste desses fatores torna-se uma tarefa imprescindível para que os valores alvos sejam atingidos em escala industrial.

Neste sentido, objetiva-se no presente trabalho ajustar, por meio de modelagem e simulação, as condições operacionais para que os valores alvo determinados em escala de bancada para a segunda fase da etapa de multiplicação celular do processo de produção de farneseno sejam atingidos em escala industrial.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi ajustar os parâmetros de aumento de escala da segunda fase do processo de multiplicação celular do bioprocessamento de produção de farneseno utilizando-se técnicas de modelagem matemática e simulação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- Detectar falhas no bioprocessamento industrial de produção de farneseno, especificamente na etapa de propagação do inóculo no fermentador inicial e de sementes;
- Elaborar hipóteses sobre as possíveis causas do crescimento insuficiente da biomassa atualmente observado na planta industrial e propor soluções cujas eficácias possam ser preliminarmente avaliadas por modelagem e simulação;
- Propor e ajustar um modelo matemático aos dados experimentais obtidos no *Initial Fermenter (IF)*;
- Realizar as simulações relativas a cada solução proposta e interpretar os resultados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão abordados tópicos referentes ao trabalho a ser realizado, visando proporcionar um embasamento teórico e, desta forma, fornecer condições para o entendimento da pesquisa desenvolvida.

3.1 MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL

De acordo com Schmidell (2001), o sucesso de um bioprocesso depende da correta definição de quatro pontos básicos: microrganismos, meio de cultivo, forma de condução do processo e recuperação do produto.

No que concerne aos microrganismos de interesse industrial, esses podem ser obtidos de diferentes formas. O primeiro a se saber é por meio do isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais, tais como solo, água, plantas, etc. Esta atividade requer o isolamento de culturas puras e, apesar de permitir a descoberta de novas linhagens de interesse industrial, envolve muito trabalho experimental e custos significativamente elevados (SCHMIDELL, 2001).

Outra maneira de se obter os microrganismos para utilização na indústria é por meio da compra em coleções de cultura, sendo esta opção atualmente bastante viável devido à existência de diversas coleções de cultura em vários países.

Existe ainda a possibilidade da obtenção de microrganismos que são na realidade mutantes naturais isolados que podem eventualmente ocorrer no processo de proliferação de uma dada célula, os quais podem ser testados objetivando a análise de sua potencialidade produtiva (SCHMIDELL, 2001). Outra opção é a obtenção de mutantes induzidos por técnicas convencionais, como submeter suspensões de células ou esporos a radiações ultravioleta (UV) ou a substâncias químicas mutagênicas. Por fim, as técnicas de engenharia genética podem ser utilizadas para obter microrganismos recombinantes, também conhecidos como organismos geneticamente modificados (OGM), de forma muito mais dirigida do que as metodologias convencionais anteriormente mencionadas.

Deve-se ressaltar que, para uma aplicação industrial, espera-se que os microrganismos apresentem características gerais como elevada eficiência de conversão de substrato em produto, permitir o acúmulo de produto no meio de forma a se ter elevada concentração de produto no caldo fermentado, não produzir substâncias incompatíveis com o produto, apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico, não ser patogênico, não exigir condições de processo muito complexas e nem meios de cultura dispendiosos e permitir a rápida liberação do produto para o meio (SCHMIDELL, 2001).

No que se refere aos meios de cultivo, Schmidell (2001) reporta que as características gerais que estes devem apresentar são as seguintes: ser o mais barato possível, atender às necessidades nutricionais do microrganismo, auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado, o que evita variações drásticas de pH, evitar excessiva formação de espuma, não provocar problemas na recuperação do produto, ter componentes que permitam algum tempo de armazenagem a fim de estarem disponíveis neste tempo, ter composição razoavelmente fixa e não causar dificuldades no tratamento final dos efluentes gerados.

3.2 ESTERILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E MEIOS

Em alguns processos biotecnológicos industriais, a eliminação parcial da população microbiana dos equipamentos é suficiente para garantir a qualidade que se deseja no produto. Na ampla maioria dos bioprocessos é necessário operar com culturas puras, ou seja, livre de contaminantes. Para lidar com essas situações existem diferentes técnicas para alcançar o tipo adequado de assepsia.

A esterilização é o processo que consiste na inativação e/ou destruição completa dos microrganismos quanto à sua capacidade reprodutiva pela aplicação de métodos físicos ou químicos. Segundo Rodrigues *et al.* (2001), o termo esterilização possui significado absoluto, uma vez que uma substância ou material não pode ser parcialmente estéril.

A desinfecção, diferentemente da esterilização, é um processo que reduz o número de microrganismos a um nível razoável de segurança. Este processo geralmente envolve o uso de um agente químico e não implica necessariamente na

eliminação total de todos os microrganismos viáveis. Rodrigues *et al.* (2001) afirmam que há uma variação no resultado da desinfecção, sendo a mesma “direcionada aos mais prejudiciais, principalmente em sua forma vegetativa, que é menos resistente que a forma esporulada”.

Como antecipado, a esterilização pode ser definida como a capacidade de remover ou destruir formas de vida microbiana, incluindo bactérias, fungos e vírus entre outros (CROW, 1993). A esterilização é de extrema importância para a indústria, sendo amplamente aplicada em diversas etapas dos seus processos. Os métodos mais utilizados na escala industrial são os métodos físicos e químicos. Os métodos físicos mais utilizados são a esterilização por calor úmido, calor seco, radiação ultravioleta, ultrassom e radiação de partículas ionizantes. Os métodos químicos consistem na limpeza dos equipamentos industriais por meio de líquidos ou gases que matam os microrganismos ou anulam a sua capacidade reprodutiva, entre os compostos utilizados estão os fenóis, ozônio, hipoclorito, formaldeído e dióxido de enxofre.

A esterilização de biorreatores, tubulações, bombas, centrífugas, misturadores, separadores e outros equipamentos que são utilizados em bioprocessos é realizada por meio de calor úmido e, quando isso não é possível, se utilizam agentes químicos adequados a cada situação. O material laboratorial utilizado no setor industrial é esterilizado por calor úmido e seco, por meio de autoclaves e fornos, respectivamente. Os meios de cultura são esterilizados por calor úmido e o ar do processo fermentativo é esterilizado pela filtração em cartuchos esterilizantes (LOROUGE 2012; MORIYA; MODENA, 2008; RICHARDS, 1968).

3.2.1 Métodos de Esterilização

Existem vários métodos de esterilização, os quais, dependendo do agente esterilizante, podem ser físicos ou químicos, sendo possível utilizar combinações destes métodos, desde que a configuração escolhida atenda à eficiência desejada. A seguir são apresentados alguns destes métodos.

- Esterilização por Calor Úmido

A temperatura elevada, associada ao alto grau de umidade, representa um dos métodos mais eficazes para a destruição de microrganismos (RODRIGUES *et al.*, 2001). A esterilização pelo calor úmido pode ser alcançada utilizando-se equipamentos que operam balanceando tempo, temperatura e pressão atmosférica, como por exemplo, aquela conduzida em autoclave. Esse método é recomendado para as soluções aquosas, equipamentos e instrumentos, vestuários, mangueiras e filtros especiais (ISAACSON, 2009 *apud* SARAIVA, 2016).

A esterilização por calor úmido se dá pela desnaturação das proteínas que ocorre pelo aumento do nível de hidratação no interior das células, causando mudanças irreversíveis (RODRIGUES *et al.*, 2001).

- Esterilização por Calor Seco

O processo de eliminação de microrganismos por calor seco é um dos métodos de esterilização mais utilizados e de muito fácil aplicação, entretanto, trata-se de um processo mais lento e menos eficaz que o calor úmido. Este método é realizado em estufas de convecção por gravidade ou convecção mecânica e é mais adequado para materiais e recipientes de vidro, metais, substâncias em pó, ceras, soluções e suspensões oleosas e tecidos especiais (ISAACSON, 2009 *apud* SARAIVA, 2016). Ao contrário da esterilização por calor úmido, na esterilização por calor seco, ocorre a diminuição do nível de hidratação das células, sendo a destruição dos microrganismos realizada pela oxidação de seus constituintes químicos (RODRIGUES *et al.*, 2001).

- Esterilização por Irradiação de Luz Ultravioleta (UV)

Este método de esterilização consiste na exposição do produto à radiação ionizante da luz UV pelo tempo adequado, a qual ao ser absorvida pelas estruturas celulares resultam em lesões letais.

- Esterilização por Radiação Ionizante

O bombardeio de microrganismos por radiações ionizantes eletromagnéticas gera alterações significativas nas moléculas de DNA dos microrganismos, danificando-as, irreversivelmente. Segundo Rodrigues *et al.* (2001) as radiações ionizantes eletromagnéticas são principalmente, alfa, beta, gama, raios X, raios catódicos, além de prótons, nêutrons e elétrons de alta energia.

- Esterilização por Agentes Gasosos

A utilização de agentes gasosos para esterilização e desinfecção de equipamentos não é comum em bioprocessos. Tais agentes atuam como agentes alquilantes, por meio da substituição de um átomo de hidrogênio de grupos funcionais como proteínas e ácidos nucleicos, bloqueando os grupos ativos das moléculas (RODRIGUES *et al.*, 2001). Os agentes de esterilização gasosa mais comuns são o óxido de etileno, óxido de propileno, formaldeído e betapropiolactona (RODRIGUES *et al.*, 2001). A utilização de gases quimicamente reativos como o formaldeído (CH_2O) e o óxido de etileno (CH_2)₂O são os indicados (SHINDE *et al.*, 2009 *apud* SARAIVA, 2016).

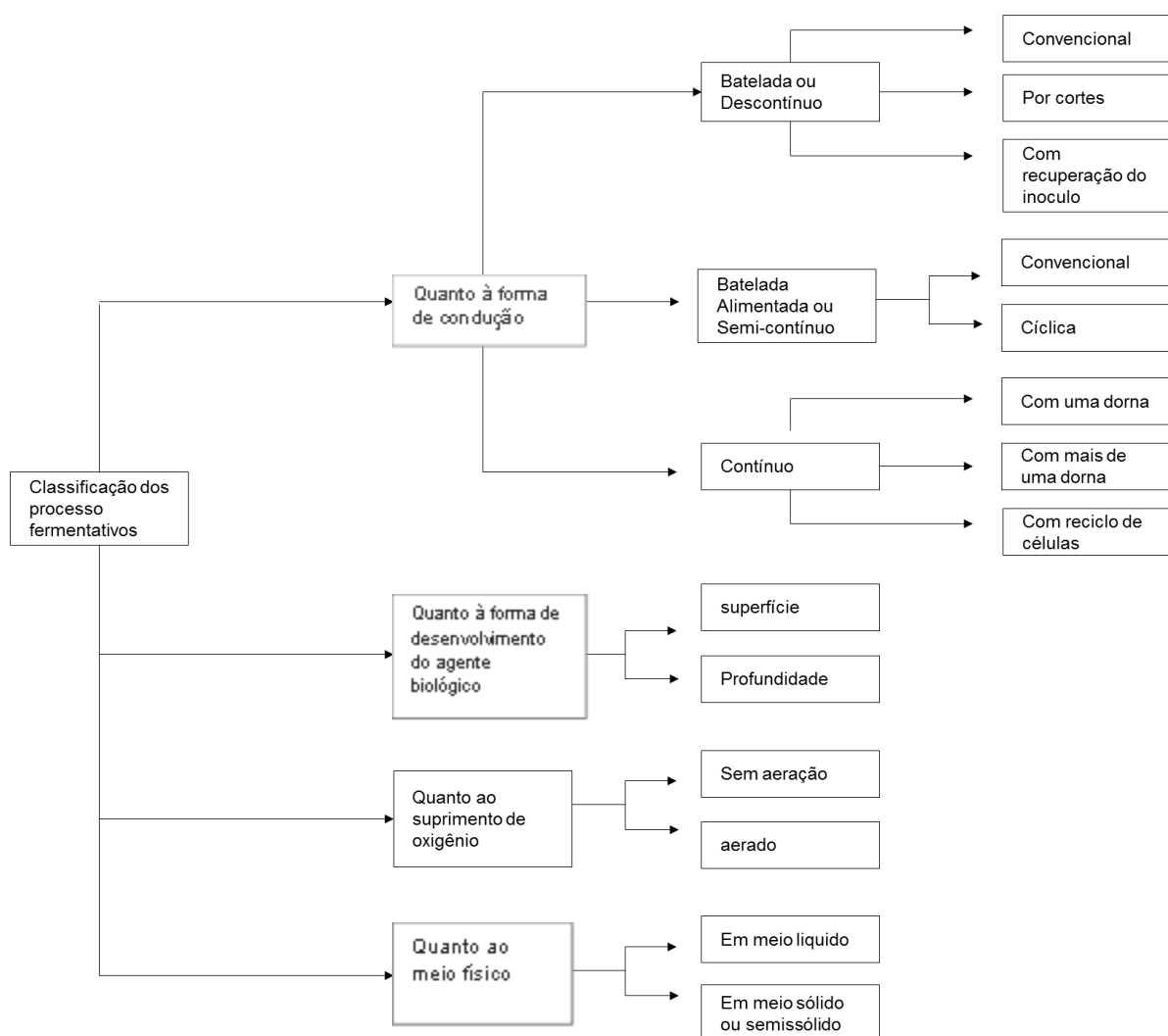
3.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS

São aqueles nos quais um microrganismo se reproduz em um meio contendo nutrientes apropriados à obtenção de bioprodutos que são comumente utilizados na indústria química, farmacêutica, alimentícia e outras.

Um processo fermentativo genérico consiste em quatro etapas principais: o preparo do meio de fermentação cuja composição depende do produto que se deseja obter; a fermentação que é a etapa na qual microrganismos como bactérias, leveduras ou fungos transformam as matérias-primas em produtos; tratamentos finais, compreendendo etapas de separação e purificação, que são os processos necessários para se obter o produto com a qualidade e a pureza necessárias para sua aplicação, e finalmente o tratamento dos resíduos gerados.

Os processos fermentativos podem ser classificados de diferentes maneiras conforme esquematizado na Figura 1. Nesta revisão optou-se por abordar a classificação dos processos fermentativos quanto à sua forma de condução.

Figura 1: Classificação dos processos fermentativos.



Fonte: O AUTOR (2019).

3.3.1 Fermentação Descontínua ou Batelada

O processo descontínuo é conduzido com um inóculo por dorna, após a preparação do meio contendo o substrato adequado ao desenvolvimento do microrganismo. Na batelada simples, a fermentação inicia-se após o preenchimento do

biorreator, instante no qual se mistura o mosto com o inóculo (TOSETTO, 2002). Quando a atividade biológica encerra-se por falta de nutriente ou excesso de inibidor, a fermentação é considerada concluída. Esse processo pode levar a baixos rendimentos e produtividades, pois sendo o substrato totalmente disponibilizado no início da fermentação, pode haver efeitos de inibição, repressão, ou desvio do metabolismo celular para a formação de produtos indesejados. Este tipo de processo é mais usual em fermentações laboratoriais, farmacêuticas e na produção de cachaça (CARVALHO; SATO, 2001; PORTO, 2005).

3.3.2 Fermentação Descontínua Alimentada ou Semi-Contínua

A operação em modo batelada alimentada é definida como uma técnica de processos microbianos no qual um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos gerados permanecem até o final da fermentação. A alimentação pode ser constante ou variante com o tempo, de forma contínua ou intermitente (CARVALHO; SATO, 2001). Neste tipo de processo, o metabolismo microbiano pode ser deslocado para diferentes vias metabólicas conforme o nível de concentração de substrato vigente no fermentador, podendo levar ao acúmulo do produto desejado (CARVALHO; SATO, 2001). A operação em modo batelada alimentada tem por objetivo aumentar a produtividade em relação à operação em modo descontínuo, a qual é considerada baixa. Segundo Lee *et al.* (1983), várias estratégias de controle da concentração de nutrientes têm sido desenvolvidas para processos descontínuos alimentados. O processo de fermentação descontínua alimentada tem o reúso do fermento como principal característica, separando os microrganismos do fermentado em centrífugas ou sedimentadores pela diferença de dimensões e densidades (VIEGAS, 1999; BORGES, 2008).

3.3.3 Fermentação Contínua

O processo de fermentação contínua caracteriza-se pela alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante e a retirada contínua de caldo

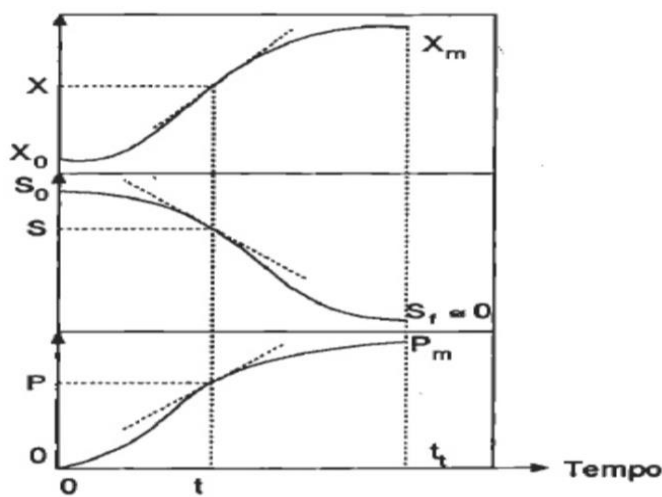
fermentado (FACCIOTTI, 2001). A manutenção de um volume constante de líquido no reator é de primordial importância para que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis de estado (concentrações de microrganismos, substrato e produto) permaneçam constantes ao longo do tempo de operação do sistema.

Neste modo de operação podem ser usados reatores do tipo tubular ou reatores de mistura completa. Estes últimos podem ser arranjados em série visando a uma maior conversão de substrato (ANDRIETTA, 1994). A operação do sistema contínuo pode, ainda, ser realizada com recirculação de células, aumentando-se assim as velocidades de reação devido à maior concentração de microrganismos que se estabelece no reator com consequente aumento da produtividade do sistema (FACCIOTTI, 2001).

3.4 CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

O estudo cinético de processos fermentativos tem por objetivo analisar a evolução da concentração de células, substrato e produtos em função do tempo de fermentação. Este acompanhamento permite a aquisição de conhecimento básico do processo, podendo-se ajustar curvas (modelos) que representem adequadamente o bioprocesso, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2: Curvas de ajuste aos dados de um ensaio de fermentação idealizado.



Fonte: HISS (2001).

Para o estudo cinético deve-se escolher o produto de interesse (P) e o substrato limitante (S) do crescimento celular, sendo X a concentração de microrganismos. Hills (2001) ressalta que para um estudo cinético é necessário o conhecimento de valores intermediários e não apenas valores iniciais e finais das variáveis de estado (concentração de microrganismos, substrato, produto, oxigênio dissolvido) para que seja possível uma análise adequada do processo.

O conhecimento das cinéticas envolvidas no bioprocessos é essencial para a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial, permitindo comparar o desempenho entre diferentes condições de cultivo (HILLS, 2001).

3.4.1 Velocidade Específica de Crescimento (μ_X)

A velocidade específica de crescimento microbiano (μ_X) relativa à concentração de microrganismos (X) contida no meio num dado instante t é dada pela Equação (1):

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{X} r_X \quad (1)$$

Observa-se que a velocidade volumétrica de crescimento da biomassa (r_X) pode ser relacionada à velocidade específica de crescimento (μ_X) pela Equação (2).

$$r_X = \mu_X X \quad (2)$$

As taxas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto podem ser relacionadas entre si utilizando-se parâmetros de rendimento de reação do processo biológico “ r ”, designados por Y_i , como segue.

3.4.2 Rendimento em Massa Celular ($Y_{X/S}$)

O rendimento de reação $Y_{X/S}$ representa a massa celular produzida em base seca dividida pela massa de substrato consumida no meio de cultura (S), conforme a Equação (3).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{\frac{dX}{dt}}{-\frac{dS}{dt}} = \frac{r_X}{-r_S} \quad (3)$$

Rearranjando-se a Equação (3), tem-se:

$$r_S = -\frac{r_X}{Y_{X/S}} \quad (4)$$

Assim, é possível substituir a Equação (2) na Equação (4) de modo que a taxa de consumo de substrato seja relacionada com a velocidade específica de crescimento do microrganismo, de acordo com a Equação (5).

$$r_S = -\frac{\mu_X X}{Y_{X/S}} \quad (5)$$

3.4.3 Rendimento em Produto ($Y_{P/S}$)

O rendimento $Y_{P/S}$ no produto metabólico representa a massa de produto obtido (P) dividida pela massa de substrato consumida (S), sendo definido matematicamente pela Equação (6).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{\frac{dP}{dt}}{-\frac{dS}{dt}} = \frac{r_P}{-r_S} \quad (6)$$

Readequando, tem-se:

$$r_P = -Y_{P/S} r_S \quad (7)$$

Substituindo a Equação (5) na Equação (7), tem-se:

$$r_P = \left(\frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \right) \mu_X X \Rightarrow r_P = \alpha \mu_X X, \quad \alpha = \left(\frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \right) \quad (8)$$

A Equação (8) relaciona a taxa de produção com a velocidade específica de crescimento microbiano (μ_x), sendo utilizada nos casos em que a formação de produto está associada ao crescimento celular, tal como na produção de etanol, na qual a produção do álcool está associada ao crescimento da levedura.

3.4.4 Curva de Crescimento Microbiano

Uma curva de crescimento microbiano apresenta o comportamento geral mostrado na Figura 3.

Figura 3: Curva de crescimento microbiano em cultivo descontínuo.



Fonte: RECH (2009).

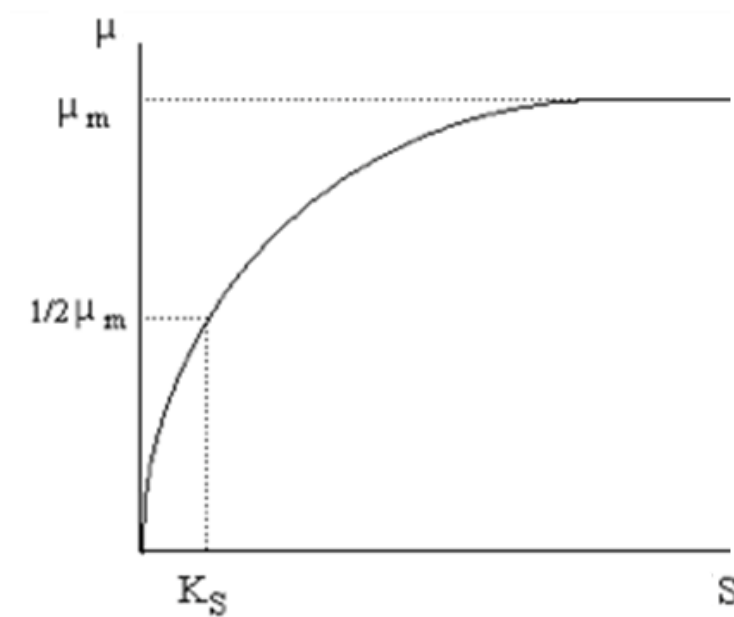
Após a inoculação, ocorre uma fase de latência, em que o microrganismo se adapta às condições do meio. Em seguida, decorre uma fase na qual as células crescem a uma velocidade específica constante máxima, sendo esta fase denominada de exponencial ou logarítmica. À medida que o crescimento prossegue, os nutrientes vão se esgotando e os produtos vão sendo excretados pelos microrganismos, a velocidade de crescimento diminui e finalmente o crescimento cessa devido ao esgotamento de um nutriente ou ao acúmulo de algum produto tóxico, denominando-se esta fase de estacionária. Por fim, inicia-se a fase de declínio, na qual a concentração celular diminui devido à velocidade de morte exceder a velocidade de produção de novas células (HILLS, 2001).

3.4.5 Modelo Cinético de Monod

A forma da relação entre a velocidade específica de crescimento e a concentração de um nutriente limitante foi estabelecida em 1949 por Monod. No modelo de Monod, está implícito que a taxa específica de crescimento de microrganismos é proporcional à taxa de consumo de alguns nutrientes extracelulares limitantes, conhecido também como modelo de rendimento constante, sendo considerado satisfatório para descrever o crescimento de vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e outros (SMITH; WALTMAN,1995).

O comportamento da taxa específica de crescimento microbiano em função da concentração de um substrato limitante presente no meio, de acordo com o modelo de Monod, pode ser observado na Figura 4.

Figura 4: Taxa específica de crescimento microbiano em função da concentração do substrato limitante segundo o modelo de Monod.



Fonte: DUTTA (2008).

De acordo com a equação de Monod (Equação (9)), o aumento da concentração de nutrientes depois de atingida a velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), não afeta a taxa específica de crescimento.

A Equação (9), proposta por Monod, é normalmente utilizada para descrever a relação entre a velocidade específica de crescimento do microrganismo e a concentração de um único substrato limitante, na ausência de efeitos de inibição.

$$\mu_X = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (9)$$

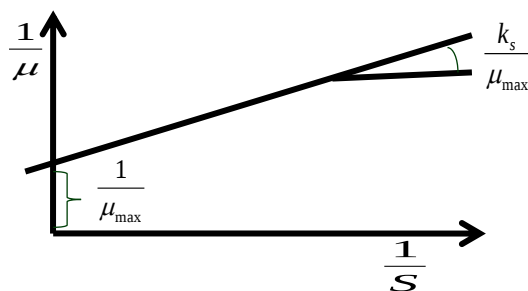
Na Equação (9): μ_X é a velocidade específica de crescimento (h^{-1}), μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); K_s é a constante de saturação de Monod (g/L); S é a concentração do substrato limitante (g/L).

As constantes cinéticas do modelo de Monod podem ser determinadas por meio de regressão não linear da Equação (9) ou por ajuste da sua equação linearizada pelo método de Lineweaver-Burk (BAILEY ; OLLIS, 1986), dada pela Equação (10):

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{K_s}{\mu_{max}} \right) \frac{1}{S} + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \quad (10)$$

A Figura 5 apresenta o gráfico da linearização do modelo de Monod pelo método de Lineweaver-Burk.

Figura 5: Linearização do modelo de Monod.



Fonte: Adaptado de Cornish-Bowden (2013)

3.4.6 Inibição do Crescimento

Com o crescimento celular, ocorre a produção de certos metabólitos, que ao se acumularem no meio, podem inibir o crescimento dos microrganismos. A equação de Monod não leva em conta o efeito inibidor tanto do substrato quanto do produto formado. Entretanto, são várias as formas encontradas na literatura que relacionam a velocidade específica de crescimento do microrganismo com fatores de inibição.

O modelo proposto por Andrews (1968) é uma destas formas, a qual leva em conta o fator de inibição pelo substrato, conforme apresentado na Equação (11).

$$\mu_X = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (11)$$

onde K_i é a constante de inibição pelo substrato.

Outra forma é aquela proposta por Lee *et al.* (1983), a qual leva em consideração limitação pelo substrato e termos de inibição pelo produto e pela própria biomassa, conforme dado pela Equação (12).

$$\mu_X = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^N \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^M \quad (12)$$

onde N e M são os expoentes dos termos de inibição pelo produto e pela biomassa, respectivamente, os quais modulam a intensidade da inibição.

3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS

Bonomi e Schmidell (2001) definem a modelagem matemática de bioprocessos como sendo a representação, por meio de equações matemáticas, dos balanços de massa para cada componente no biorreator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam.

Volesky e Votruba (1992) mencionam que é necessário ter em mente que um modelo é baseado na idealidade, estando sempre suscetível a erros de medidas, entre outras incertezas experimentais, uma vez que nem todas as variáveis podem ser controladas ou medidas com precisão durante os experimentos.

Os modelos matemáticos de bioprocessos podem ser classificados em empíricos e fenomenológicos. Nos modelos empíricos, o bioprocesso é visto como uma caixa preta desconhecendo-se totalmente os mecanismos de causa-efeito entre as variáveis independentes e dependentes do processo. As variáveis dependentes são correlacionadas empiricamente com as independentes por meio de funções chamadas de transferência, tais como modelos polinomiais, exponenciais, logarítmicos e outros, os quais são ajustados a partir de dados experimentais das variáveis de estado do bioprocessos.

Segundo Pinto e Lage (2001), modelos fenomenológicos são válidos para uma grande faixa de condições operacionais de um processo, entretanto, muitas vezes o conhecimento necessário para um sistema específico não é disponível. Esses modelos, baseiam-se em princípios de conservação de massa e energia, equações termodinâmicas, equações de velocidade como, por exemplo, de transferência de calor e massa, expressões cinéticas descrevendo o consumo e a geração de espécies dentro do volume de controle, equações constitutivas, além de condições iniciais e de contorno quando for o caso (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Os modelos matemáticos de bioprocessos podem ainda ser classificados quanto ao grau de descrição da população microbiana como segue (BAILEY; OLLIS, 1986):

- modelos não-estruturados e não-segregados: modelos nos quais as células dos microrganismos são consideradas como solutos, não havendo entre elas diferenças de tamanho, idade, atividade e composição intracelular;
- modelos estruturados e não-segregados: modelos nos quais as células são tratadas como indivíduos homogêneos, descrevendo-se alguns componentes internos, porém a composição média é semelhante;
- modelos não-estruturados e segregados: modelos nos quais as células são tratadas como indivíduos distintos, porém descritos por um único componente;
- modelos estruturados e segregados: modelos nos quais as células dos microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e multicomponente.

Andrietta (1994) desaconselha a utilização de modelos que consideram as células como indivíduos distintos constituídos de vários componentes, ou seja, modelos do tipo segregado e estruturado devido à complexidade que estes modelos assumem, principalmente relacionada ao elevado número de parâmetros cinéticos, gerando dificuldades na determinação dos mesmos.

Ao desenvolver um modelo matemático para prever as variáveis de saída e o estado do sistema a partir das variáveis de entrada, podem ser utilizadas expressões matemáticas ou expressões lógicas para representar as relações de causa e efeito que ocorrem em um bioprocessos. Nielsen (2003) descreve como as equações de balanço são capazes de estabelecer o modelo completo, especificando os fluxos de entrada e saída no volume de controle e as quantidades convertidas neste volume. Essas conversões no volume de controle são representadas por equações cinéticas de taxa, as quais associadas aos balanços de massa especificam o modelo completo do bioprocessos (NIELSEN, 2003).

Desse modo, modelos matemáticos para simulação de bioprocessos podem ser utilizados para o projeto de uma planta industrial baseado em dados obtidos em escala bancada/piloto, prevendo o comportamento do processo, auxiliando na determinação das condições operacionais economicamente ótimas, definindo limites operacionais e permitindo inferir sobre possíveis mudanças com vistas à otimização do bioprocessos (DOBRE; MARCANO, 2007).

Assim, a formulação de modelos matemáticos para bioprocessos depende das variáveis dependentes ou de respostas (concentração de microrganismo, substrato produto, oxigênio dissolvido (no caso de processos aeróbios) ao longo do tempo e/ou espaço) e das variáveis independentes (entradas) em um determinado sistema, no caso, um fermentador. A dependência das concentrações com o tempo será determinada pela natureza estática ou dinâmica da operação do fermentador enquanto que a dependência espacial será determinada pelo tipo de fermentador utilizado no processo (mistura completa ou fluxo pistonado).

3.6 VARIAÇÃO DE ESCALA

Segundo Badino Jr. e Schmidell (2001), o aumento de escala de processos industriais parte normalmente de uma produção em escala menor para outra em escala maior. Esta variação de escala é conhecida como “*scale-up*” ou aumento de escala, caso contrário, tem-se o “*scale-down*” ou a redução de escala que é utilizada quando há necessidade de realização de ensaios em pequena escala.

Alguns estudos abordam como ocorrem essas variações de escala de processos, relatando os problemas que ocorrem na transposição de dados obtidos em escala de laboratório para a escala de produção industrial. Um dos grandes problemas da variação de escala está em reproduzir na escala industrial as condições que proporcionaram o bom desempenho do bioprocessamento em escala de bancada e piloto.

O desenvolvimento de qualquer bioprocessamento é realizado em três escalas crescentes a saber: escala de bancada/laboratório, escala piloto e escala industrial. A escala de bancada tem menor custo operacional, maior flexibilidade e seus volumes de trabalho estão compreendidos entre 200 mL a 2 L. É nessa escala que são realizados os estudos básicos, incluindo a seleção de microrganismos, desenvolvimento e otimização do meio de cultura e determinação das condições mais adequadas para o processo (temperatura, pH, nível de oxigênio dissolvido, etc.), modo de operação do biorreator (descontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo), além da definição e otimização dos processos de separação e purificação do bioproduto. Quando se atinge um desempenho adequado nesta etapa, pode ser feita então a ampliação para a escala piloto (BADINO JR.; SCHMIDELL, 2001).

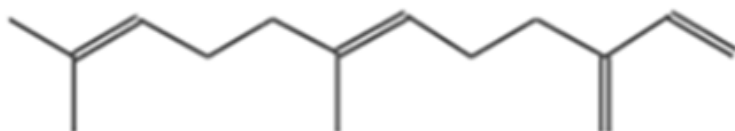
As operações da escala piloto têm um custo maior, por isso, é necessário manter constante grande parte das variáveis, como a temperatura, pH e nível de oxigênio dissolvido definidos na escala anterior de bancada. Nesta fase, é de extrema importância definir os critérios de ampliação de escala e determinar a sua grandeza, para que o desempenho seja igual ao observado na escala de bancada. Por exemplo, se os microrganismos forem extremamente exigentes quanto à oxigenação do meio, muita atenção deve ser dada ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), pois trata-se de um parâmetro-chave em bioprocessamentos aeróbios. Nessa escala trabalha-se com volumes de processamento entre 50 e 500 L.

Por fim, a escala industrial visa à produção em alta escala e ao lado econômico do processo. Na escala industrial, as operações devem ocorrer sob condições similares às da escala piloto visando manter o adequado desempenho do bioprocesso e obter uma produção rentável e lucrativa. Conforme Badino Jr. e Schmidell (2001), os volumes nessa escala variam entre 5 e 600 m³.

3.7 BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE FARNESENO

Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas para a produção de produtos renováveis, dentre as quais estão aquelas que utilizam bactérias e leveduras geneticamente modificadas, as quais são utilizadas para a fermentação de açúcares derivados de biomassas, gerando compostos intermediários que podem ser transformados em diversos produtos finais. Dentre estas tecnologias está a produção do farneseno que é realizada por meio de um bioprocesso (WESTFALL; GARDNER, 2011). O farneseno é um hidrocarboneto de cadeia longa e ramificada (Figura 6), encontrado no estado líquido, produzido a partir de uma estirpe industrial de *S. cerevisiae*, modificada geneticamente.

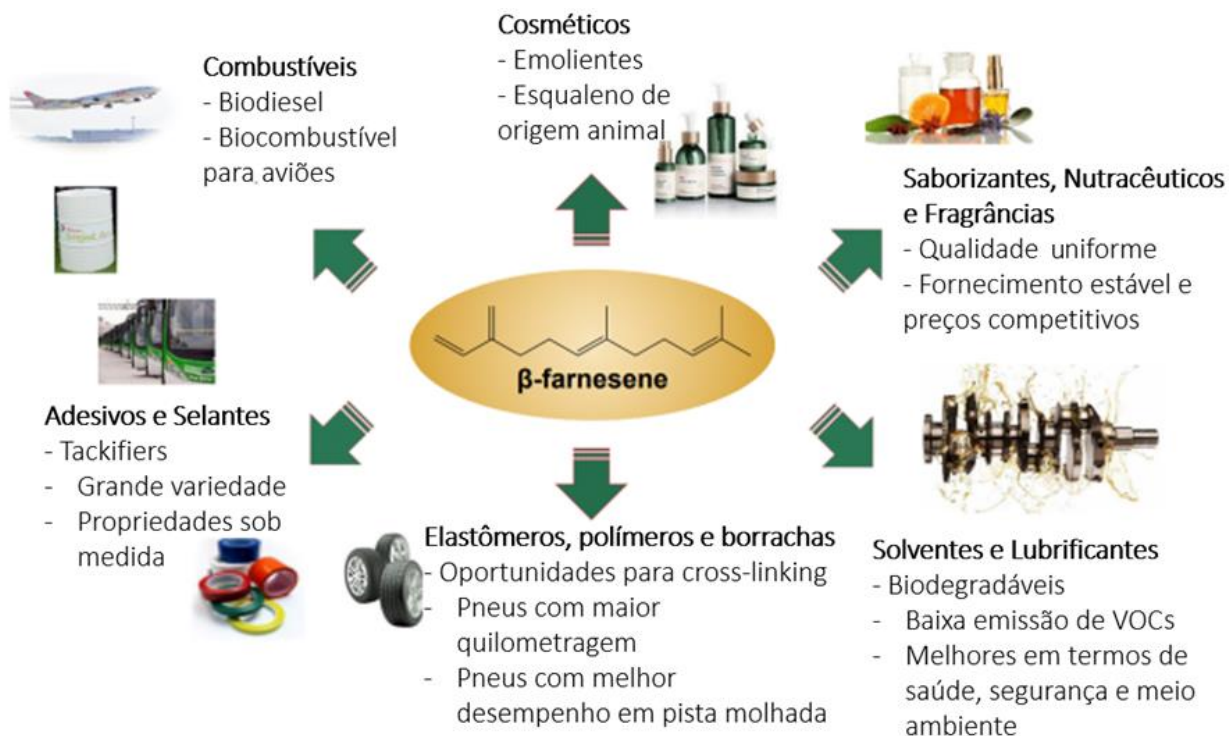
Figura 6: Estrutura do trans - β -farneseno.



Fonte: AMYRIS (2019).

O farneseno pode ser usado como precursor para inúmeras aplicações, desde produtos químicos especiais a combustíveis de alta performance (Figura 7), eliminando a necessidade de derivados fósseis.

Figura 7: Aplicações do farneseno.

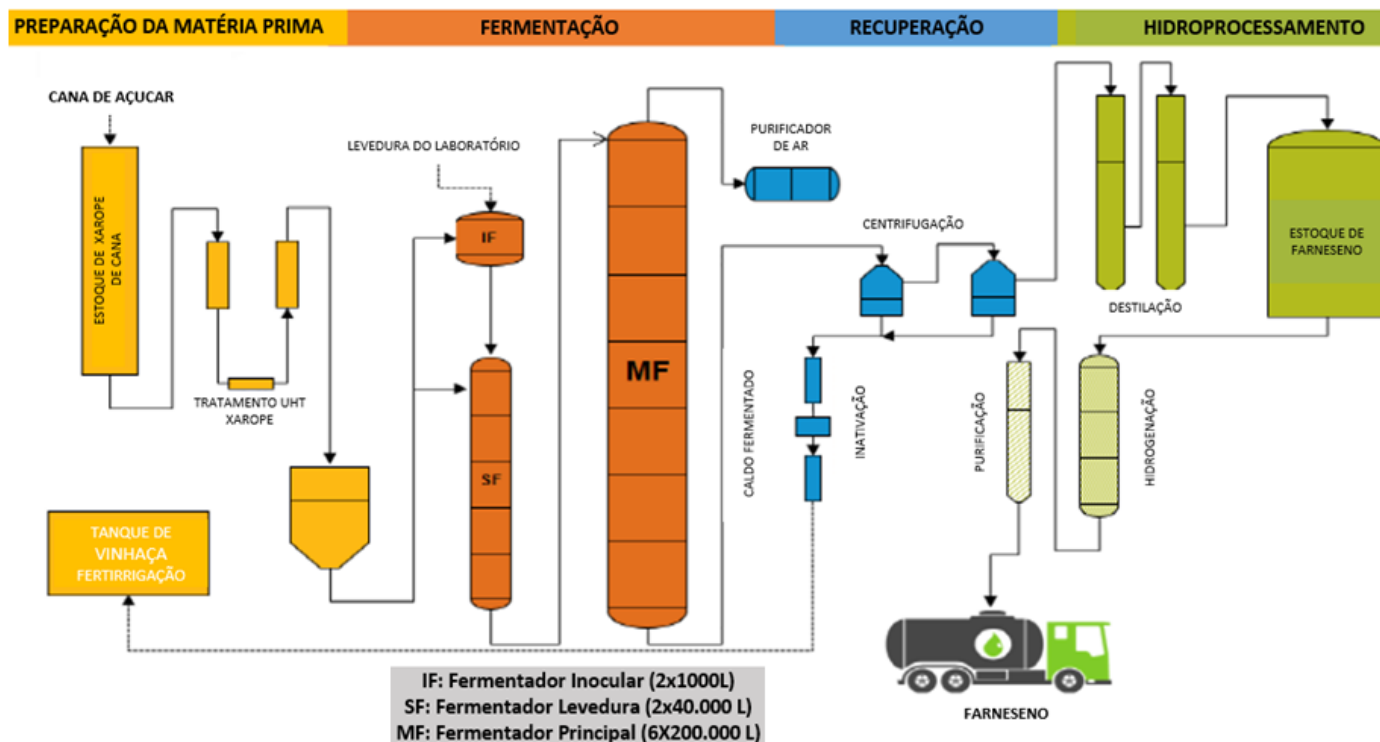


Fonte: AMYRIS (2019).

O farneseno pode ser usado como solvente, apresentando características similares às do d-limoneno, como emissão zero de VOCs (*Volatile Organic Compounds*) e biodegradabilidade completa. A substância também encontra aplicações como insumo para a produção de nutracêuticos, cosméticos (esqualano, um emoliente que atende à 30% da demanda mundial), óleos básicos lubrificantes e agente de polimerização para borracha. Segundo o “Relatório Global de Farneseno 2019”, o consumo total de farneseno em 2018 foi de $1,2167 \times 10^{10}$ toneladas métricas, sendo a produção de nutracêuticos o principal campo de aplicação, representando 46,55% do consumo em 2018. Quanto a outras aplicações, a demanda de pneus e LFR, uma borracha líquida derivada biologicamente do farneseno, apresenta grande potencial. Analistas preveem crescimento do mercado farneseno 27% com $4,523 \times 10^{10}$ toneladas métricas durante 2020-2024.

O fluxograma do bioprocesso de produção de farneseno da companhia holandesa DSM é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Fluxograma macro do processo industrial de produção de farneseno da DSM.



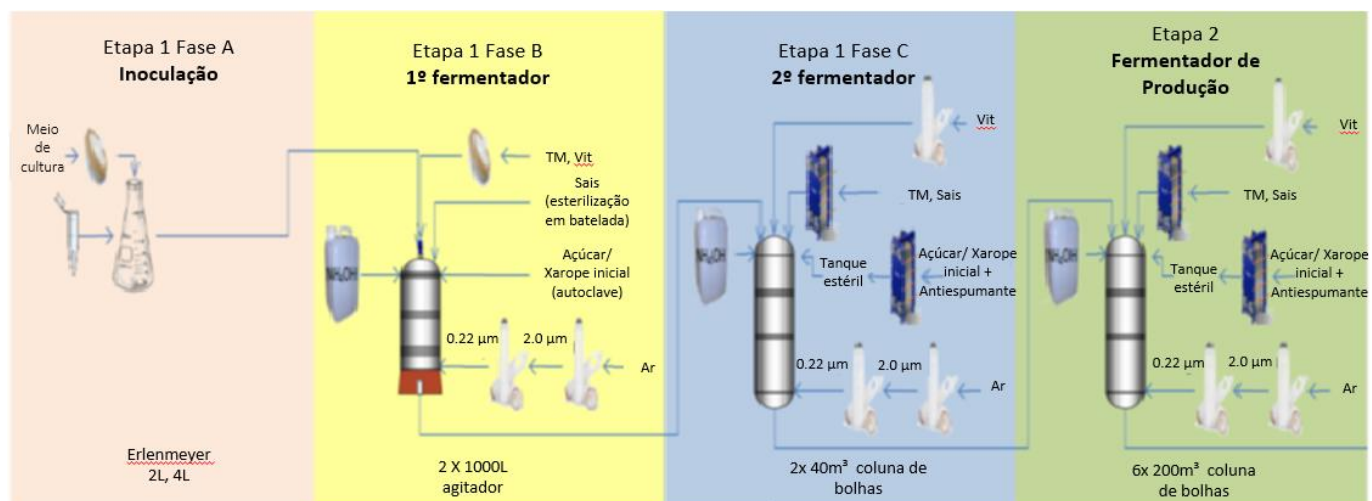
Fonte: AMYRIS (2013).

O bioprocesso está dividido em duas etapas, sendo a Etapa 1 a de multiplicação celular e a Etapa 2, a de produção do farneseno. A etapa de multiplicação celular é subdividida em três fases (A, B e C), conforme a Figura 9.

A Etapa 1, fase A, consiste na multiplicação celular em escala laboratorial. A fase B é a primeira fase da multiplicação celular já em escala industrial, enquanto a fase C consiste na segunda fase da multiplicação celular nessa escala.

O bioprocesso é conduzido em modo batelada alimentada em parte da fase C. As entradas no fermentador são substrato (xarope de cana), ar, amônia, vitaminas, metais, sais e agente antiespumante. Todo o processo ocorre de forma asséptica, e por isso, necessita de maior controle. Para tanto, toda a matéria prima que entra no biorreator é esterilizada usando UHT (*Ultra High Temperature*) que chega a atingir 140°C por dois minutos de retenção destruindo toda forma de vida. Para alcançar essa temperatura é necessário injetar vapor saturado a 6 barg durante o processo.

Figura 9: Etapas do processo fermentativo.



Fonte: AMYRIS (2013).

4. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho consistiu na elaboração de hipóteses sobre as possíveis causas do crescimento insuficiente da biomassa atualmente observado na planta industrial e a proposição de soluções para esse problema passíveis de serem investigadas por modelagem e simulação. Quatro hipóteses foram aventadas: (i) baixa concentração de inóculo, (ii) ausência de substratos melhoradores do crescimento no meio de cultivo, (iii) inibição por inibidores presentes na solução de substrato disponibilizada no início da batelada ou por compostos acumulados durante o metabolismo celular e (iv) modo inadequado de condução do bioprocessamento quanto à alimentação de nutrientes. Para essas hipóteses, foram propostas quatro soluções cujas eficácias foram investigadas por meio de modelagem e simulação conforme descrito a seguir.

4.1 MODELAGEM MATEMÁTICA

Para o desenvolvimento do trabalho foi necessário propor um modelo matemático que representasse satisfatoriamente o comportamento das variáveis de estado principais do crescimento microbiano no *IF*. O modelo matemático proposto baseou-se numa abordagem não segregada da população microbiana e numa abordagem não estruturada da célula e consistiu na elaboração das equações de balanço de massa das principais variáveis de estado envolvidas no bioprocessamento, além da proposição de equações cinéticas para as taxa específicas de reação.

4.2 ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODELO MATEMÁTICO

O ajuste do modelo matemático aos dados experimentais consistiu em determinar, por regressão não linear, os valores dos parâmetros que minimizassem a soma dos quadrados dos resíduos (*SQR*) entre os valores experimentais e os valores calculados das variáveis de estado modeladas. Para tanto, utilizou-se o método de Marquardt (FROMENT *et al.*, 2010) para fazer aproximações sucessivas nos valores dos parâmetros até que o valor mínimo da função *SQR* fosse atingido.

4.3 DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais de concentração de células expressa como D. O. e de concentração de substrato (sacarose) utilizados neste estudo foram fornecidos pela unidade da companhia holandesa DSM localizada em Brotas-SP. Os dados referem-se a 18 bateladas realizadas na planta industrial a diferentes concentrações iniciais de células e substrato, sendo 08 conduzidas à pressão de 1.0 bar e 10 à pressão de 0.5 bar no *IF*. A determinação analítica da concentração de biomassa foi feita *off-line* por análise espectrofotométrica da densidade ótica (D. O.) de amostras retiradas do *IF*, sendo um método rápido, mas, indireto de medida da concentração de células em crescimento (CARBULONI, 2020). A determinação da concentração de substrato (sacarose) 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 de substrato (CARBULONI, 2020).

A detecção de falhas no bioprocesso foi feita analisando-se a série histórica dos dados da planta nos anos de 2016 e 2017 referentes à curva de crescimento no *SF* (*Seed Fermenter*), a qual impacta a etapa seguinte de produção de farneseno.

4.4 MÉTODOS NUMÉRICOS DE RESOLUÇÃO DE EQUAÇÕES DIFERENCIAIS

Considerando que a simulação dinâmica de bioprocessos em reatores homogêneos recai em um problema de resolução de um sistema de equações diferenciais ordinárias, uma classe de métodos que tem sido muito utilizada para resolver este tipo de problema são os métodos de integração numérica de Runge-Kutta de 4ª ordem, sendo um deles utilizado neste trabalho. Para isso, o sistema de equações diferenciais ordinárias representativas dos balanços de massa dos componentes no biorreator foi escrito da seguinte forma (Equações (13)-(15)):

$$\frac{dy_1}{dx} = f_1(x, y_1, y_2, \dots, y_n) \quad ; \quad y_1(x_0) = y_{1_0} \quad (13)$$

$$\frac{dy_2}{dx} = f_2(x, y_1, y_2, \dots, y_n) \quad ; \quad y_2(x_0) = y_{2_0} \quad (14)$$

$$\frac{dy_n}{dx} = f_n(x, y_1, y_2, \dots, y_n) \quad ; \quad y_n(x_0) = y_{n_0} \quad (15)$$

Nas Equações (13)-(15), y_i ($i = 1, 2, \dots, n$) representa a concentração do componente i e x a variável tempo.

Em notação matricial, a representação do sistema fica dada pelas Equações (16)-(19), a seguir:

$$\frac{dy}{dx} = \underline{f}(x, \underline{y}) \quad ; \quad \underline{y}(x_0) = \underline{y}_0 \quad (16)$$

sendo:

$$\underline{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix} ; \quad \underline{f}(x, \underline{y}) = \begin{bmatrix} f_1(x, y_1, y_2, \dots, y_n) \\ f_2(x, y_1, y_2, \dots, y_n) \\ \vdots \\ f_n(x, y_1, y_2, \dots, y_n) \end{bmatrix} ; \quad \underline{y}_0 = \begin{bmatrix} y_{1_0} \\ y_{2_0} \\ \vdots \\ y_{n_0} \end{bmatrix} \quad (17-19)$$

A seguir é apresentada a fórmula do método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem (Equações (20)-(24)) aplicada a sistemas de problemas de valor inicial, como é o caso (RAMIREZ, 1989; FOGLER, 1992; CONSTANTINIDES; MOSTOUFI, 1999).

$$\underline{y}_{j+1} = \underline{y}_j + \frac{h}{6} \left[\underline{k}_1 + (2 - \sqrt{2})\underline{k}_2 + (2 + \sqrt{2})\underline{k}_3 + \underline{k}_4 \right] \quad (20)$$

sendo:

$$\underline{k}_1 = \underline{f}(x_j, \underline{y}_j) \quad (21)$$

$$\underline{k}_2 = \underline{f}\left(x_j + \frac{h}{2}, \underline{y}_j + \frac{h}{2}\underline{k}_1\right) \quad (22)$$

$$\underline{k}_3 = \underline{f}\left(x_j + \frac{h}{2}, \underline{y}_j + \left(\frac{1}{\sqrt{2}} - \frac{1}{2}\right)h\underline{k}_1 + \left(1 - \frac{1}{\sqrt{2}}\right)h\underline{k}_2\right) \quad (23)$$

$$\underline{k}_4 = \underline{f}\left(x_j + h, \underline{y}_j - \frac{h}{\sqrt{2}}\underline{k}_2 + \left(1 + \frac{1}{\sqrt{2}}\right)h\underline{k}_3\right) \quad (24)$$

$j = 1, 2, \dots, m$; $m = (x_f - x_0)/h - 1$; $h = \text{passo de integração}$

Essa fórmula foi implementada na forma de uma rotina numérica em linguagem de programação FORTRAN, a qual foi utilizada como parte integrante do programa de ajuste dos parâmetros e para a realização das simulações necessárias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DE FALHAS NO BIOPROCESSO

Na Etapa 1, Fase C (Figura 10), o bioprocesso em batelada alimentada é realizado em dois biorreatores de coluna de bolhas em escala industrial, com volumes de 40 m³, utilizando uma estirpe industrial de *S. cerevisiae* geneticamente modificada. O tempo de duração dessa fase é de 48 horas. Na sequência, há transferência para a Etapa 2, na qual é realizada a produção em escala industrial no fermentador principal (biorreator coluna de bolhas de 200 m³), equipado com trocador de calor de placas para remover o calor metabólico.

A Etapa 1, Fase C, impacta diretamente a Etapa 2 do bioprocesso de produção de farneseno, na qual o objetivo não é o crescimento celular, mas sim a produção do hidrocarboneto dentro de um determinado tempo e volume.

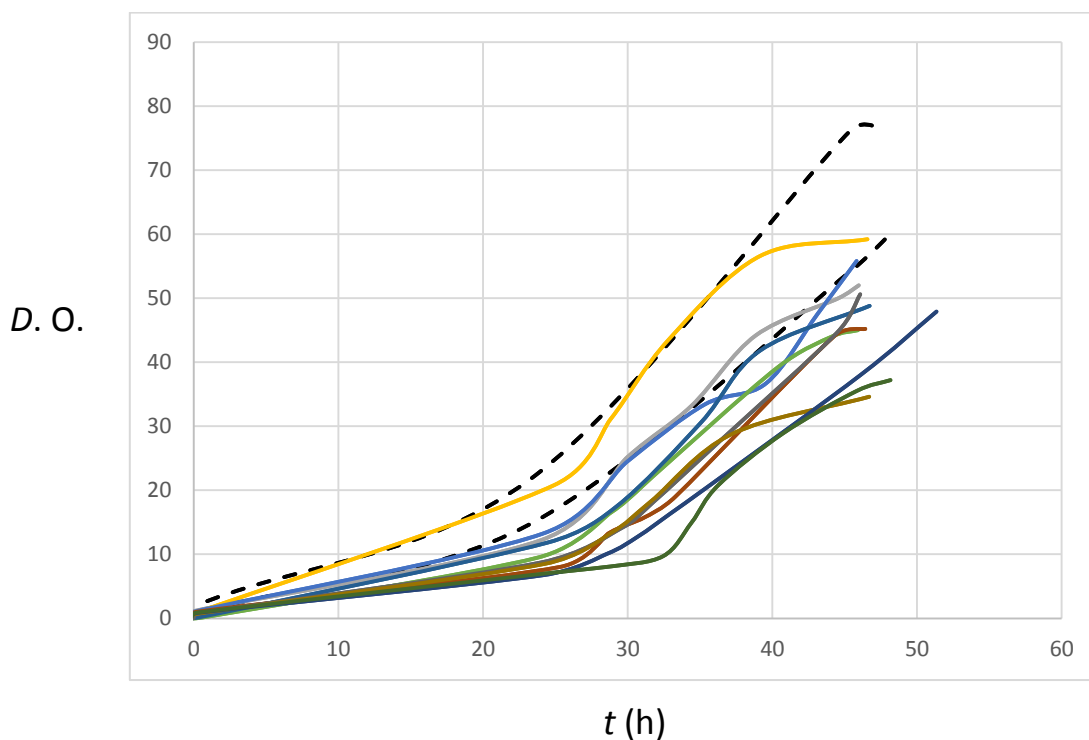
Figura 10: Etapa 1 Fase C do processo fermentativo.



Fonte: AMYRIS (2013).

Atualmente a Fase C da Etapa 1 não atinge os valores alvos determinados como tempo, volume e densidade ótica, o que provoca impactos negativos na Etapa 2 do processo, ocasionando uma perda inicial de 4,3% de produtividade na Etapa 2, acumulada ao longo de 2016 e 2017 (Figura 11).

Figura 11: Curva de crescimento celular em termos de D. O. como função do tempo de cultivo no SF (*Seed Fermenter*)



Fonte: AMYRIS (2017).

Na Figura 11 podem-se observar os valores alvos obtidos em bancada (linhas tracejadas pretas), e os valores reais obtidos no processo (linhas de demais cores). O ajuste da Etapa 1, Fase C, pode atender à demanda desejada, entretanto, para haver ganhos expressivos tem-se a necessidade de reduzir a perda estimada em torno de 597 ton/ano para se ter uma melhoria de aproximadamente 4,3% na produção de farneseno.

5.2 PROPOSIÇÃO E SIMULAÇÃO DE ALTERNATIVAS PARA SOLUÇÃO DAS FALHAS

Visando resolver o problema ora apresentado por meio de técnicas de modelagem e simulação, inicialmente foram vislumbradas quatro alternativas para fomentar o crescimento microbiano ao nível de densidade ótica (D. O.) desejado.

- Alternativa 01:

Esta alternativa parte da hipótese de que a concentração celular no inoculo (X_0) esteja abaixo da necessária, o que retarda o crescimento celular nos períodos iniciais do bioprocessamento, refletindo este atraso em toda a curva de crescimento e resultando em uma concentração de biomassa insuficiente ao final do tempo desejado. Pode-se então pensar em, na Etapa 1 - Fase B, aumentar X_0 , de modo a atingir os alvos de DO e tempo pretendidos para esta fase, assegurando as condições exigidas para o início da fase C.

Para a análise da influência da concentração inicial de células (concentração de inóculo, X_0) sobre o crescimento microbiano no *IF* (*Initial Fermenter*) é necessário propor um modelo matemático para esta fase do bioprocessamento, ajustar seus parâmetros, validá-lo e depois utilizá-lo para realizar as simulações pretendidas.

O modelo aqui proposto para descrever o comportamento dinâmico das duas variáveis de estado medidas (concentração celular, expressa em densidade ótica e concentração de substrato, dada em gramas de ART (Açúcares Redutores Totais) por litro) é não estruturado, não segregado, não considera efeitos inibitórios de nenhuma espécie (substrato, produto ou outro inibidor) e nem limitação por oxigênio, sendo representado pelos balanços de massa de células e do substrato limitante, conforme as Equações (25) e (26):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X X \quad (25)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_S X \quad (26)$$

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_X) e de consumo de substrato (μ_S) são dadas pelas Equações (27) e (28), respectivamente:

$$\mu_X = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S} \quad (27)$$

$$\mu_S = \frac{\mu_X}{Y_{X/S}} \quad (28)$$

Os valores das variáveis de estado S e X em função de t , $X_0 = X(0)$, $S_0 = S(0)$, μ_{max} , K_S e $Y_{X/S}$ podem ser determinados de duas formas: analiticamente ou numericamente. A solução analítica do sistema de EDOs dado pelas Equações (25) e (26) e condições iniciais X_0 e S_0 , é apresentada passo a passo no Apêndice A, obtendo-se como resultados finais as Equações (29) e (30). De outra forma, a solução numérica consiste em integrar, por meio de método numérico apropriado, as equações diferenciais ao longo do tempo, partindo-se das condições iniciais X_0 e S_0 .

$$[X_0 + Y_{X/S}(S_0 + K_S)] \ln \left[\frac{X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)}{X_0} \right] - K_S Y_{X/S} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{max}(X_0 + Y_{X/S}S_0)t \quad (29)$$

$$X = X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S) \quad (30)$$

Os parâmetros cinéticos do modelo μ_{max} e K_S foram estimados por regressão não linear, utilizando-se o método de Marquardt para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) entre os valores experimentais e os calculados pelo modelo da concentração de células e de substrato, conforme a Equação (31). Foram ajustados dois conjuntos de parâmetros diferentes, um para cada pressão (P) aplicada no *IF* (0.5 e 1.0 bar). O *IF* operava inicialmente à pressão de 1.0 bar, condição na qual foram selecionados, para análise, dados de 8 bateladas (Batch 01-08) realizadas a diferentes concentrações iniciais de células (X_0) e de substrato (S_0). Posteriormente, para avaliar o efeito da pressão sobre a evolução do crescimento nesta fase do bioprocesso, o *IF* passou a ser operado à pressão de 0.5 bar, selecionando-se para análise, os resultados de 10 bateladas (Batch 11-20) realizadas, também, com diferentes X_0 e S_0 .

$$SQR = \sum_{i=1}^N (X_{exp,i} - X_{calc,i})^2 + \sum_{i=1}^N (S_{exp,i} - S_{calc,i})^2 \quad (31)$$

Para a determinação do coeficiente de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), calculou-se o valor médio deste coeficiente para as diferentes bateladas realizadas nas duas pressões aplicadas ao *IF*, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valor do coeficiente $Y_{X/S}$ calculado para cada batelada.

$P(\text{bar})$	Batch	X_0 (D. O.)	S_0 (g/L)	X_f (D. O.)	S_f (g/L)	$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)}$
1.0	01	0.11	50.6	30.8	0.17	0.61
	02	0.12	52.7	28.8	0.05	0.54
	03	0.09	54.0	31.2	3.91	0.62
	04	0.10	56.6	21.5	0.14	0.38
	05	0.10	51.1	27.1	0.06	0.53
	06	0.09	63.8	23.0	4.37	0.39
	07	0.20	74.9	27.9	3.00	0.39
	08	0.10	75.3	28.8	3.10	0.40
$\bar{Y}_{X/S} = 0.48$						
0.5	11	0.24	65.4	48.2	3.34	0.77
	12	0.25	59.7	43.0	0.10	0.72
	13	0.27	67.6	48.4	0.07	0.71
	14	0.17	74.5	42.5	1.94	0.58
	15	0.18	77.8	53.4	1.97	0.70
	16	0.29	79.5	44.2	0.00	0.55
	17	0.16	76.1	40.1	3.90	0.55
	18	0.36	75.4	52.0	0.29	0.69
	19	0.10	70.9	38.0	0.31	0.54
	20	0.14	74.0	42.3	0.27	0.57
$\bar{Y}_{X/S} = 0.64$						

Fonte: O AUTOR (2020).

Analisando-se os dados da Tabela 1 verifica-se que a redução da pressão de operação no IF para 0.5 bar favoreceu o crescimento microbiano, pois o valor médio de $Y_{X/S}$ nesta pressão foi 33.33% superior ao observado à pressão de 1.0 bar. O efeito do aumento da pressão em bioprocessos aeróbios é controverso na literatura, havendo relatos positivos e negativos, isto é, se por um lado o aumento da pressão favorece a oxigenação do meio, por outro, desfavorece a desgaseificação de gases que podem ser tóxicos ao metabolismo microbiano tal como o CO_2 é para as leveduras (CARBULONI, 2020).

Na Tabela 2 estão apresentados os conjuntos de valores de parâmetros, seus respectivos desvios padrão, SQR , N (número de pontos experimentais) e a MQR (média quadrática residual) para cada pressão de operação aplicada no IF.

Tabela 2 – Valores dos parâmetros cinéticos do modelo ajustados para cada pressão aplicada no *IF*.

P (bar)	μ_{max} (h^{-1})	K_S (g/L)	SQR	N	$MQR=SQR/N$
1.0	0.10892 ± 0.00643	1.2249 ± 2.8262	1891.93	24	78.83
0.5	0.14636 ± 0.01706	24.4650 ± 9.6440	2264.03	30	75.47

Fonte: O AUTOR (2020).

Conforme se observa na Tabela 2, com exceção de K_S à pressão de 1.0 bar, todos os demais parâmetros cinéticos foram estimados com boa precisão, pois os respectivos desvios-padrão das estimativas são suficientemente menores que os próprios valores dos parâmetros. Aplicou-se o teste de Tukey (HAYNES, 2013) para verificar se os valores de μ_{max} estimados para cada pressão, assim como os valores de K_S , são estatisticamente diferentes entre si, o que foi comprovado a um nível de confiança de 95%.

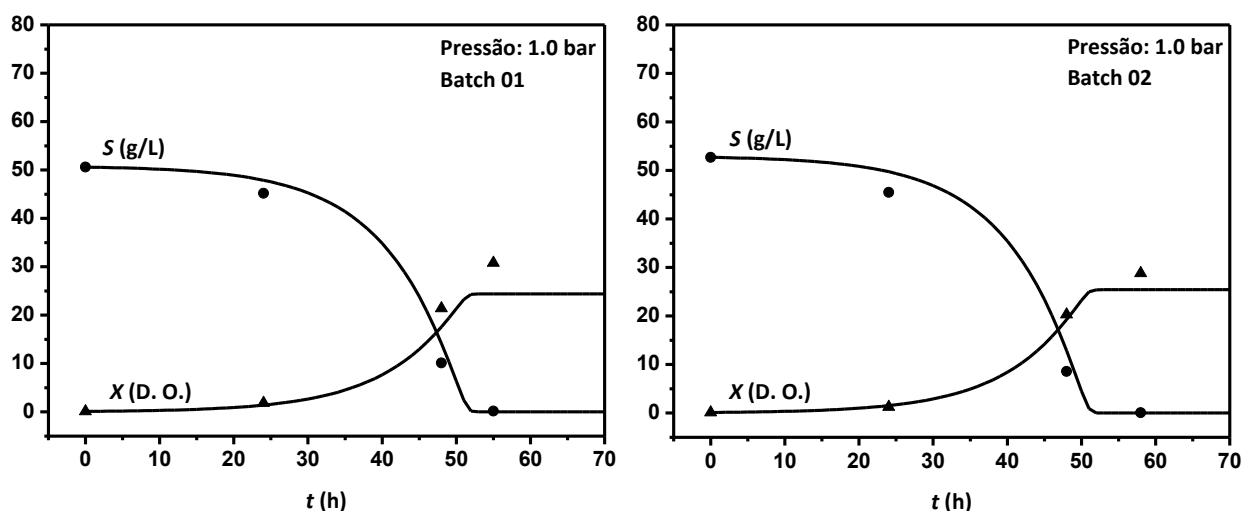
Quando comparados com dados da literatura, os valores estimados de μ_{max} apresentam-se muito abaixo daqueles reportados por Blanch e Clark (1997) para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em glicose, que é um dos açúcares invertidos no qual a sacarose é transformada pela ação da invertase localizada na membrana das leveduras, sendo frutose o outro açúcar produzido na reação enzimática. Este resultado demonstra que μ_{max} tem potencial para ser incrementado tornando mais rápido o crescimento microbiano no *IF*.

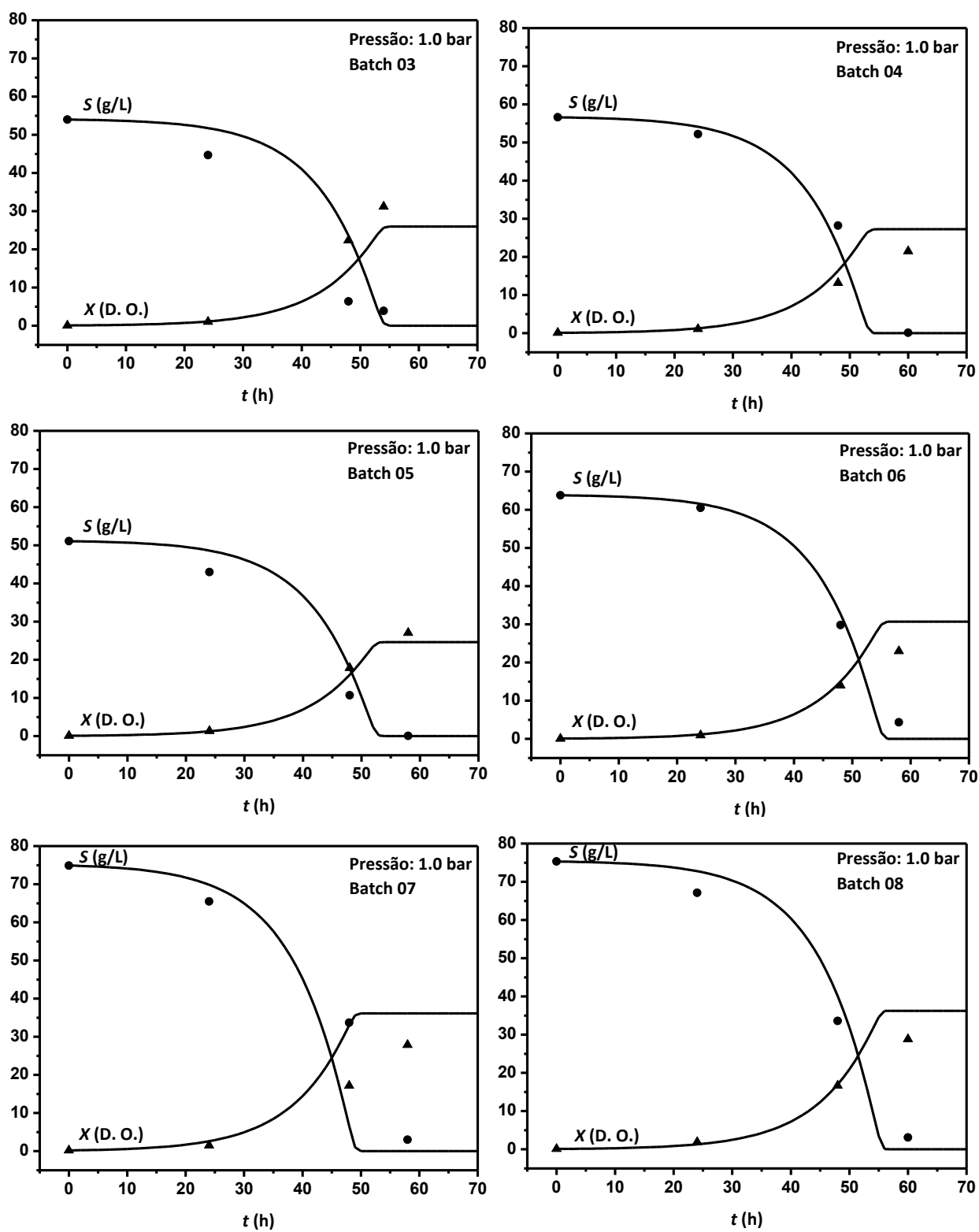
Quanto aos efeitos da pressão sobre os parâmetros cinéticos, observa-se que o valor de μ_{max} a 0.5 bar é 34.37% superior ao valor obtido a 1.0 bar, indicando que a redução de pressão no *IF* favorece o crescimento microbiano devido provavelmente à maior desgaseificação do CO_2 do meio, reduzindo-se assim os efeitos negativos desse gás sobre o metabolismo celular. Sigler e Höfer (1991) observaram a ocorrência de inibição de diversas enzimas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando a pressão parcial de CO_2 era superior a 0.5 bar. Com relação ao parâmetro K_S , este mostrou-se inesperadamente alto para a pressão de 0.5 bar, tendo em vista os valores comumente observados deste parâmetro para crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em

glicose (BLANCH; CLARK, 1997; DORAN, 2013). Uma explicação para este resultado seria a maior sensibilidade do modelo às variações em μ_{max} do que em K_S , fazendo com que a estimativa de μ_{max} seja privilegiada durante o ajuste do modelo em detrimento à de K_S . Além disso, os parâmetros μ_{max} e K_S na equação de Monod estão fortemente correlacionados estatisticamente de modo que a estimativa de um influencia na do outro. Assim, devido a μ_{max} ter sido estimado com maior precisão que K_S , é possível que durante a busca pelo seu valor ótimo, a estimativa de K_S tenha sido prejudicada, obtendo-se um valor incomum para este parâmetro.

Conforme Alvarado (2017), a validação de um modelo matemático deve ser feita confrontando-se as previsões do modelo com dados experimentais não utilizados na etapa de ajuste de parâmetros e quando isso é feito, ou seja, quando o modelo é comparado com os próprios dados utilizados no ajuste, esse procedimento denomina-se de verificação do modelo. Assim, analisando-se os gráficos mostrados nas Figuras 12 e 13, verifica-se um bom ajuste do modelo matemático aos dados experimentais de todas as bateladas realizadas em diferentes X_0 , S_0 e pressões aplicadas ao IF, com descrição satisfatória dos perfis temporais das variáveis de estado modeladas (X e S).

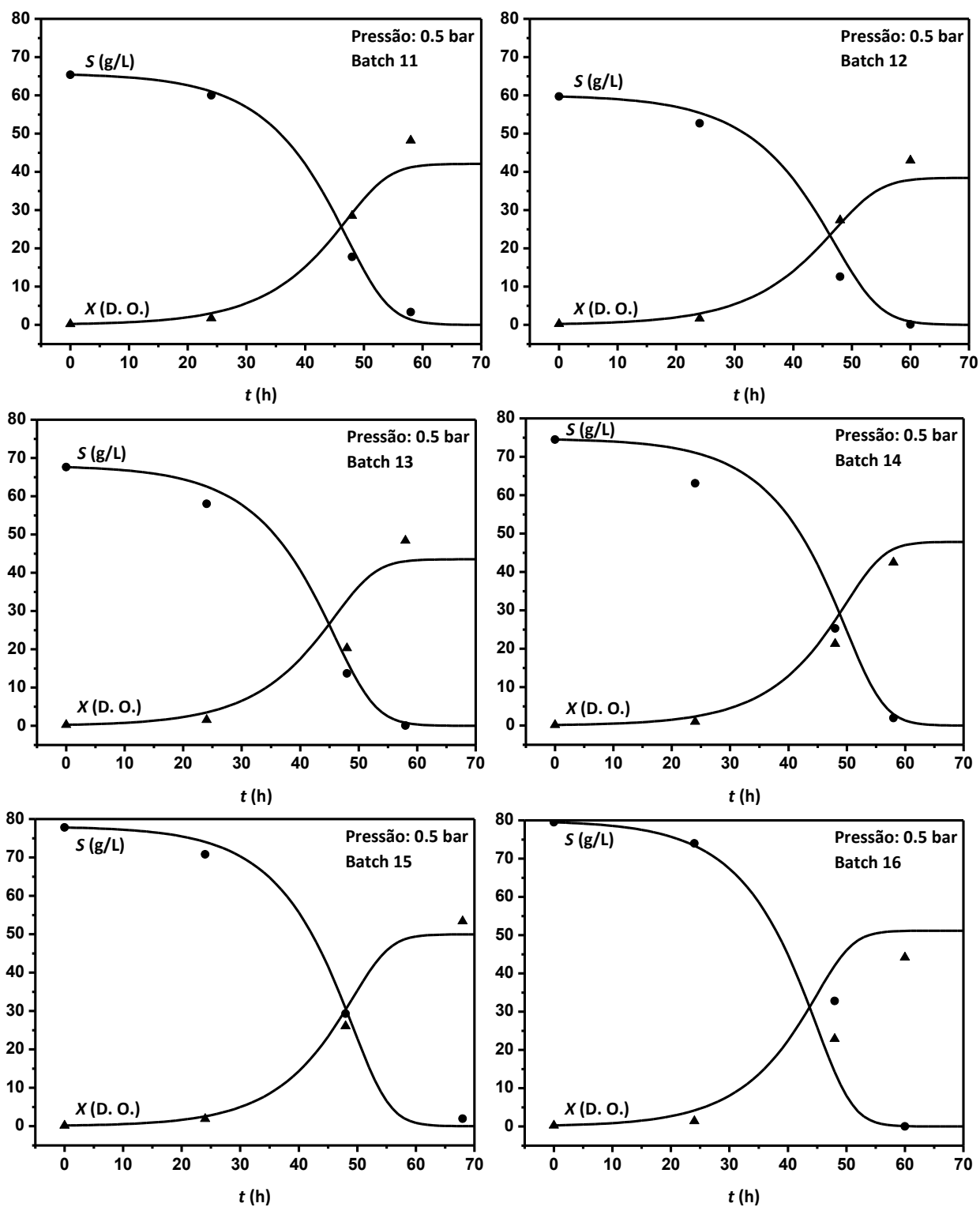
Figura 12: Gráficos do ajuste do modelo aos dados experimentais de cada batelada à pressão de 1.0 bar.

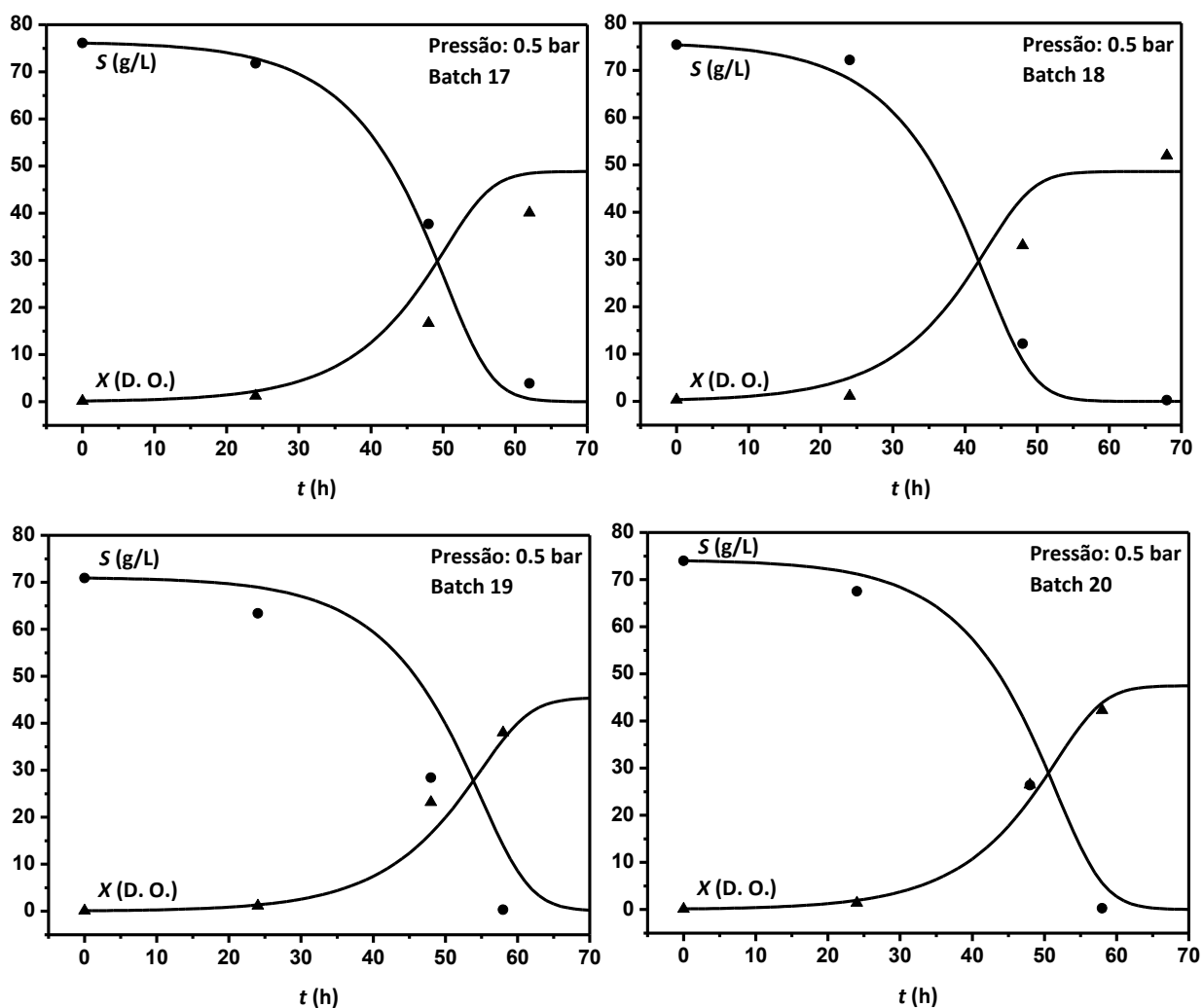




Fonte: O AUTOR (2020).

Figura 13: Gráficos do ajuste do modelo aos dados experimentais de cada batelada à pressão de 0.5 bar.





Fonte: O AUTOR (2020).

Uma vez concebido e verificado o modelo matemático, este pode ser usado para analisar, por meio de simulações, a influência da concentração inicial de células (concentração de inóculo, X_0) sobre o crescimento microbiano no *IF* (*Initial Fermenter*), considerando as seguintes restrições:

- o intervalo mínimo operacional desejável para a densidade ótica (D. O.) ao final da batelada no *IF* está compreendido entre 42 e 46, mas, valores superiores a este intervalo são permitidos;
- o tempo requerido de cultivo para atingir-se o intervalo mínimo desejado de D. O. não pode ser superior a 48 h;
- a conversão de substrato (δ) mínima ao final do tempo de cultivo de 48 h deve ser igual ou superior a 95%, isto é, $\delta \geq 95\%$.

Assim, foram realizadas simulações aumentando-se a concentração de inóculo (X_0) em cada batelada do *IF* operado à pressão de 0.5 bar (pressão na qual o *IF* passou a operar definitivamente) até determinar o valor da concentração de inóculo mínima necessária para atender as restrições operacionais exigidas pelo processo e os resultados destas simulações estão apresentados na Tabela 3 e Figura 14.

Analisando-se os dados da Tabela 3 e a Figura 14, observa-se que, com exceção da batelada 12, os valores mínimos de X_0 determinados foram suficientes para fazer o crescimento microbiano no *IF* atingir os valores alvos de D. O. e conversão de substrato no tempo desejado de 48 h. Obviamente que maiores densidades celulares dentro e acima do intervalo requerido de 42 a 46 D. O. podem ser obtidas pela utilização de concentrações celulares no inóculo acima dos valores mínimos determinados. Na batelada 12, mesmo utilizando-se uma concentração de inóculo bem maior que as das outras bateladas (1.8), o valor alvo de D. O. não foi atingido mesmo havendo total conversão do substrato, diferente do que ocorreu experimentalmente quando uma D. O. de 43 foi atingida em 60 horas. A explicação para este resultado é que o valor do coeficiente de conversão de substrato em células adotado no modelo ($Y_{X/S} = 0.64$) não permite que seja produzida biomassa suficiente de modo a atingir a concentração mínima desejada a partir da quantidade inicial de substrato utilizada nesta batelada (59.7 g/L). Entretanto, quando se utiliza o valor de $Y_{X/S}$ observado experimentalmente nesta batelada ($Y_{X/S} = 0.72$), a concentração celular e a conversão mínimas são atingidas.

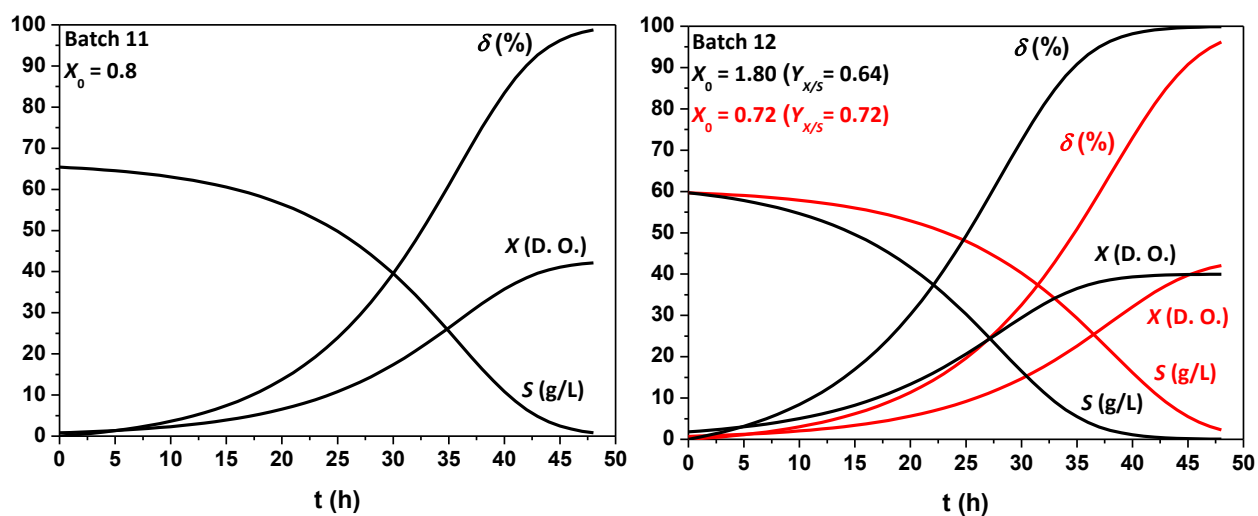
Ainda sobre a Tabela 3, observa-se que os valores mínimo (1.33) e máximo (6.00) de R_2 , a razão entre a concentração de inóculo usada em cada batelada ($(X_0)_u$) e aquela mínima necessária ($(X_0)_n$), correspondem, de forma esperada, aos valores mínimo (209.44) e máximo (709.00) de R_1 , a razão substrato/inóculo utilizada.

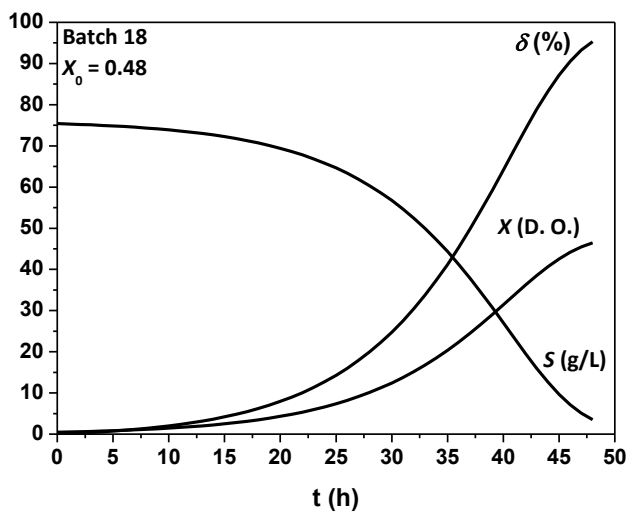
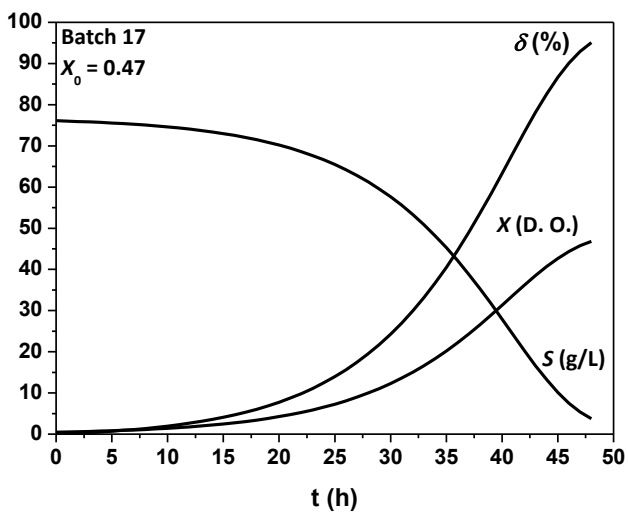
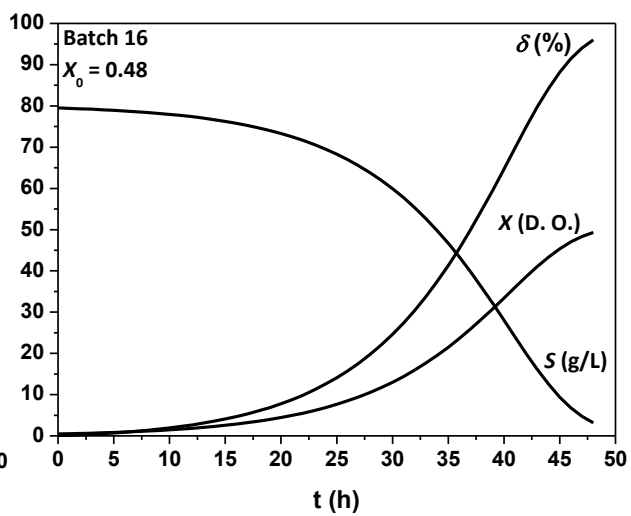
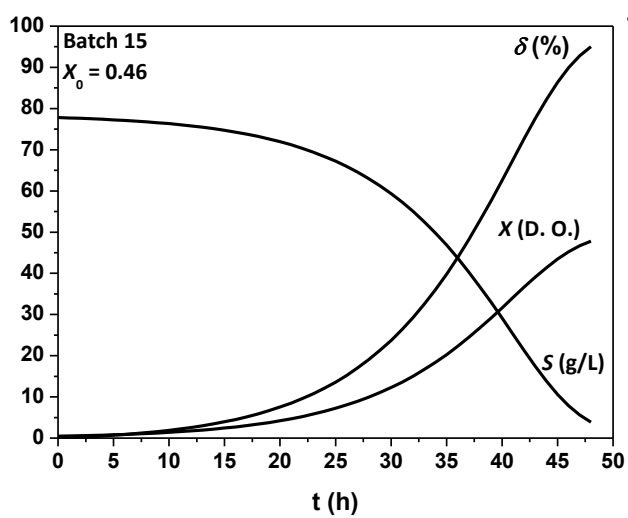
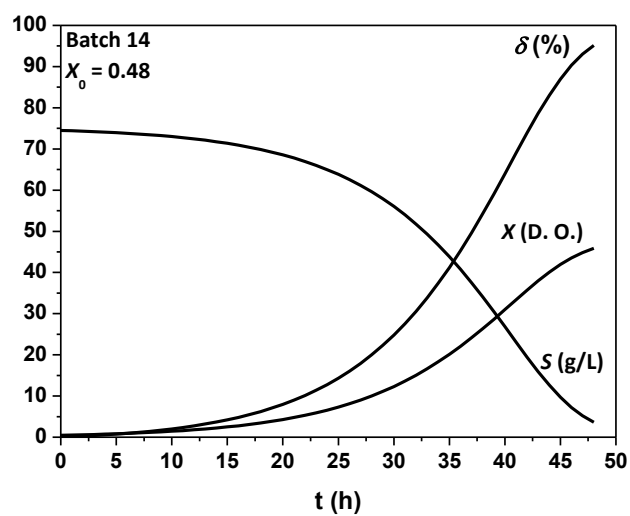
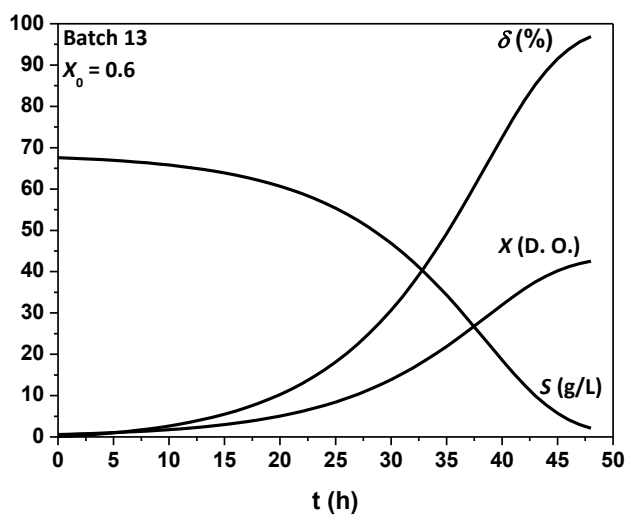
Tabela 3 – Resultados das simulações visando analisar a influência da concentração de inóculo sobre o crescimento microbiano no IF à pressão de 0.5 bar.

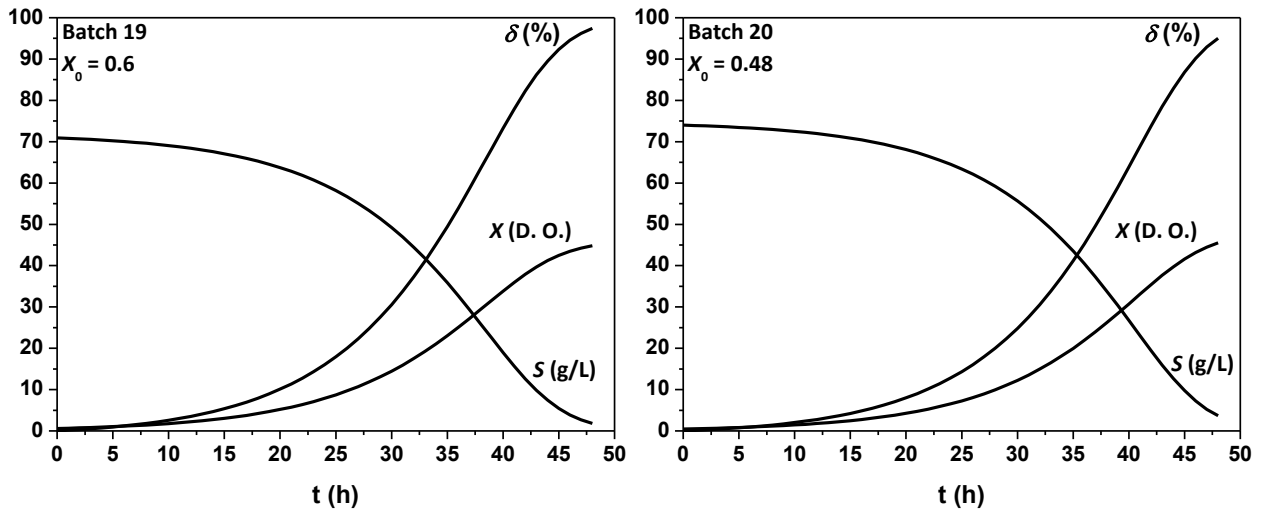
Batelada	S_0 (g/L)	$(X_0)_u$ (D. O.)	$(X_0)_n$ (D. O.)	$R_1 = S_0/(X_0)_u$ (g/g)	$R_2 = (X_0)_u/(X_0)_n$ (-)	X (t=48 h) (D. O.)	δ (t=48 h) (%)
Batch 11	65.4	0.24	0.80	272.50	3.33	42.13	98.74
Batch 12	59.7	0.25	1.80	238.80	7.20	39.97	99.90
			0.72		2.88	42.07	96.20
Batch 13	67.6	0.27	0.60	250.37	2.22	42.53	96.93
Batch 14	74.5	0.17	0.48	438.24	2.82	45.85	95.15
Batch 15	77.8	0.18	0.46	432.22	2.56	47.78	95.03
Batch 16	79.5	0.29	0.48	274.14	1.66	49.32	95.99
Batch 17	76.1	0.16	0.47	475.63	2.94	46.78	95.09
Batch 18	75.4	0.36	0.48	209.44	1.33	46.47	95.31
Batch 19	70.9	0.10	0.60	709.00	6.00	44.80	97.40
Batch 20	74.0	0.14	0.48	528.57	3.43	45.50	95.05

Fonte: O AUTOR (2020).

Figura 14: Simulações relativas à análise da influência da concentração de inóculo.







Fonte: O AUTOR (2020).

• Alternativa 02:

Esta alternativa parte da observação de que na literatura sobre modelagem de bioprocessos, encontra-se o conceito de substratos melhoradores do crescimento, os quais, caso ausentes, não são limitantes para a proliferação microbiana, mas, quando presentes, promovem um crescimento mais vigoroso da biomassa. Para melhor compreensão e ilustração desse conceito, apresenta-se a seguir o modelo proposto por Tsao e Hanson (1975) para crescimento microbiano em múltiplos substratos:

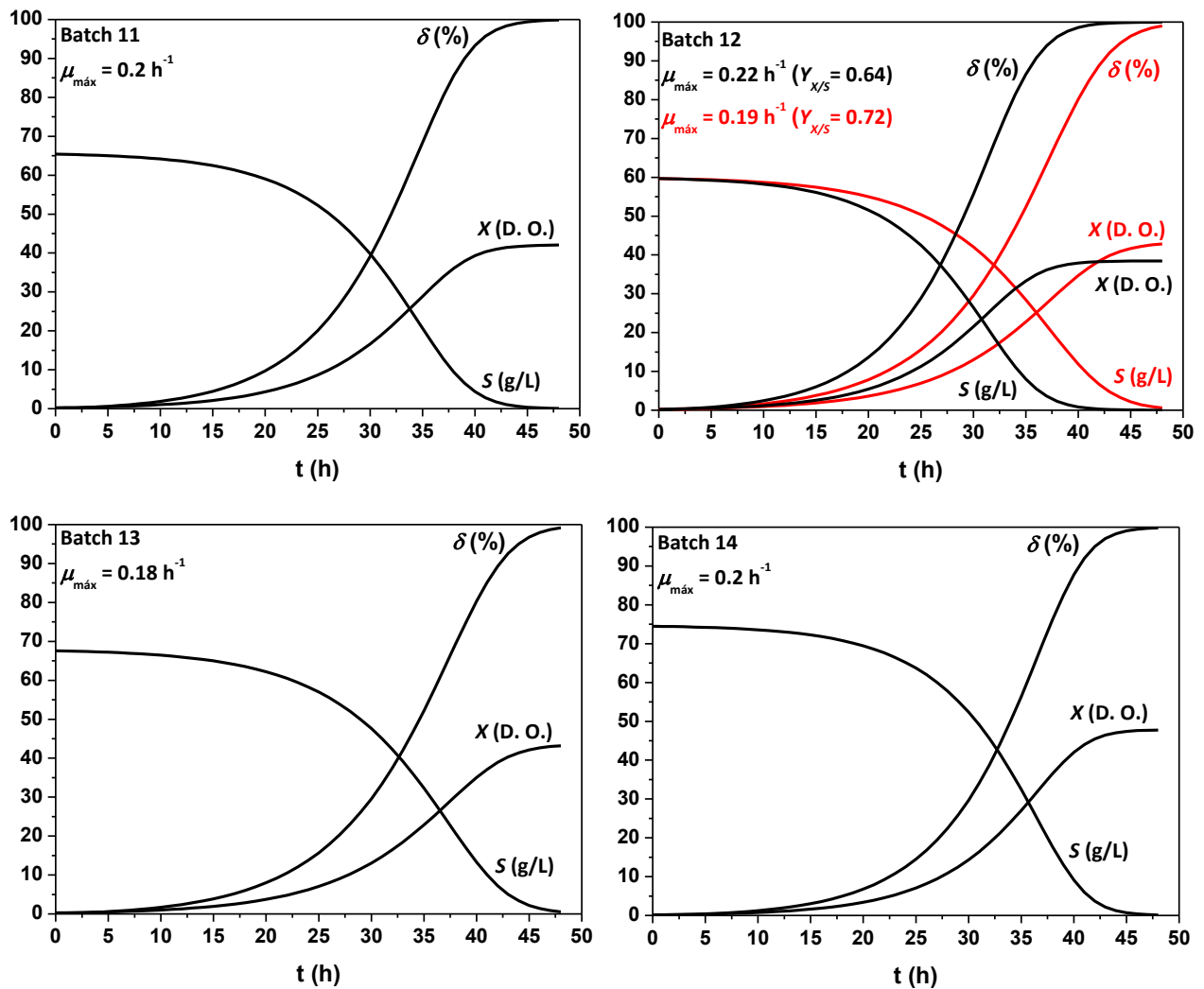
$$\mu_X = \left(k_0 + \frac{k_1 S_1}{K_1 + S_1} + \frac{k_2 S_2}{K_2 + S_2} \right) \left(\frac{G}{K_G + G} \right) \quad (32)$$

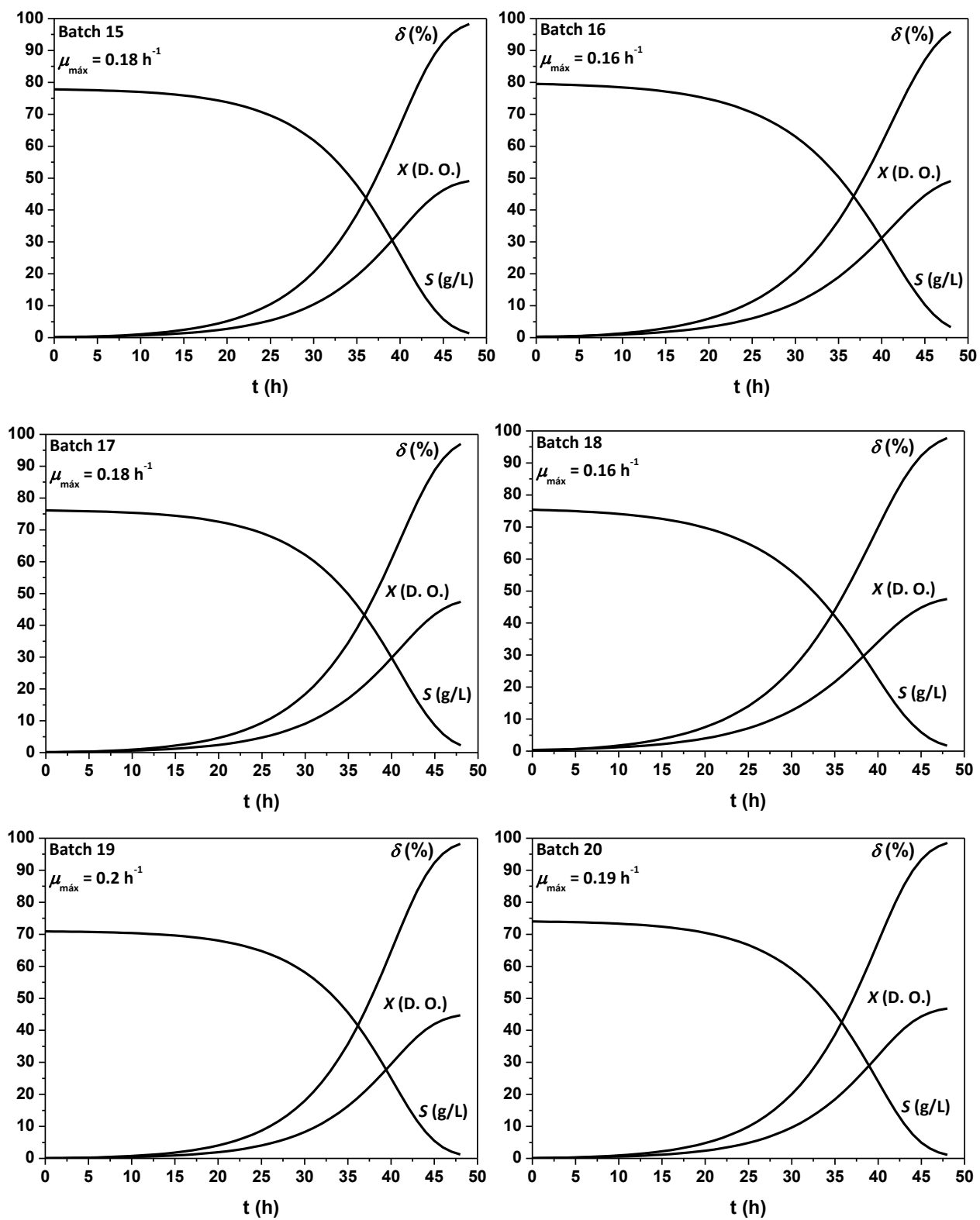
Na Equação (32), S_1 , S_2 são os substratos melhoradores e G o substrato essencial do crescimento. Observa-se que na ausência do substrato essencial G não há crescimento, isto é: $\mu_X = 0$. Na ausência dos substratos melhoradores S_1 e S_2 : $\mu_{\max} = k_0$. Na ausência de S_2 : $\mu_{\max} = k_0 + k_1$. E na presença de S_1 e S_2 : $\mu_{\max} = k_0 + k_1 + k_2$. Ou seja, o valor da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) pode ser aumentado pela suplementação do meio com substratos melhoradores do crescimento microbiano.

Para a investigação dessa alternativa visando à obtenção de maior densidade celular no tempo estipulado e com a conversão de substrato mínima requerida (95%), o modelo matemático desenvolvido anteriormente pode ser utilizado para fazer simulações aumentando-se $\mu_{\max}$ até determinar a partir de qual valor deste parâmetro, para cada batelada, ficam atendidas as restrições operacionais exigidas pelo processo e os resultados destas simulações estão apresentados na Figura 15.

Observa-se nos gráficos da Figura 15 que foi possível determinar, para cada batelada, um valor de $\mu_{\max}$ superior ao do modelo, o qual poderia ser atingido, conforme já demonstrado, pela suplementação do meio com substratos melhoradores, fazendo com que o crescimento no IF atenda as exigências requeridas pelo processo em termos de densidade celular, tempo de cultivo e conversão de substrato. Assim, constatado que a suplementação do meio com substratos melhoradores pode resolver o problema do crescimento celular insuficiente no IF, a próxima etapa seria, então, identificar quais substratos melhoradores seriam estes e qual o custo/benefício de implementação desta alternativa visando avaliar a viabilidade econômica da mesma.

Figura 15: Simulações relativas à análise da utilização de substratos melhoradores.





Fonte: O AUTOR (2020).

• Alternativa 03:

Esta alternativa parte da hipótese de que possa estar havendo inibição do crescimento microbiano por compostos presentes na solução inicial de substrato ou por metabólitos acumulados durante o cultivo. Existem três tipos básicos de inibição, incluindo a competitiva, não competitiva e incompetitiva, as quais afetam os parâmetros cinéticos como segue. Tomando como referência o modelo de Monod, com parâmetros $\mu'_{\max}$ e K'_S , tem-se as seguintes relações entre estes parâmetros e os originais $\mu_{\max}$ e K_S (sem inibição), sendo I a concentração do inibidor (RICHARD, 1985):

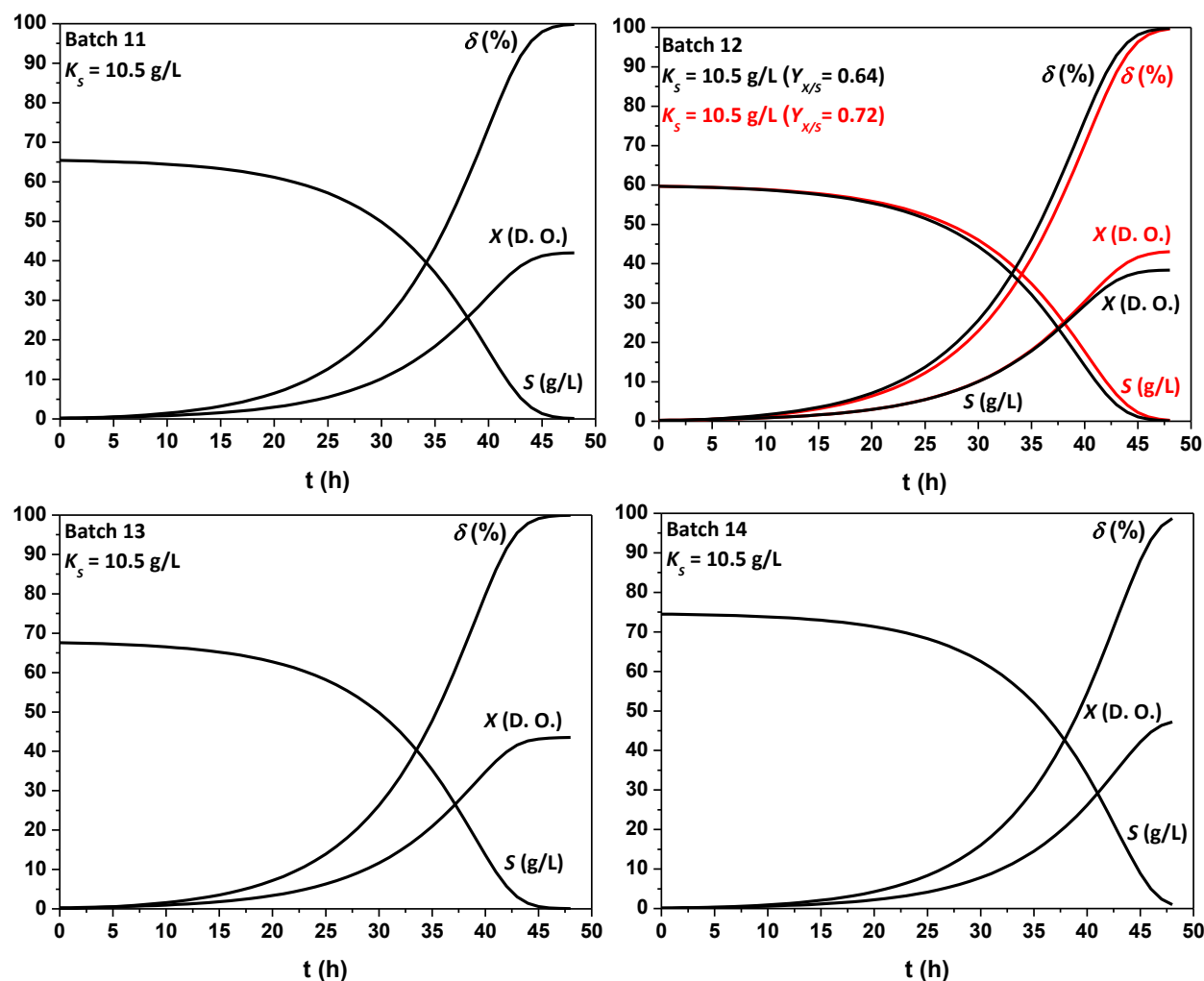
- inibição não competitiva: $\mu'_{\max} = \mu_{\max} / (1 + I / K_i)$ e $K'_S = K_S$;
- inibição competitiva: $\mu'_{\max} = \mu_{\max}$ e $K'_S = K_S (1 + I / K_i)$;
- inibição incompetitiva: $\mu'_{\max} = \mu_{\max} / (1 + I / K_i)$ e $K'_S = K_S / (1 + I / K_i)$.

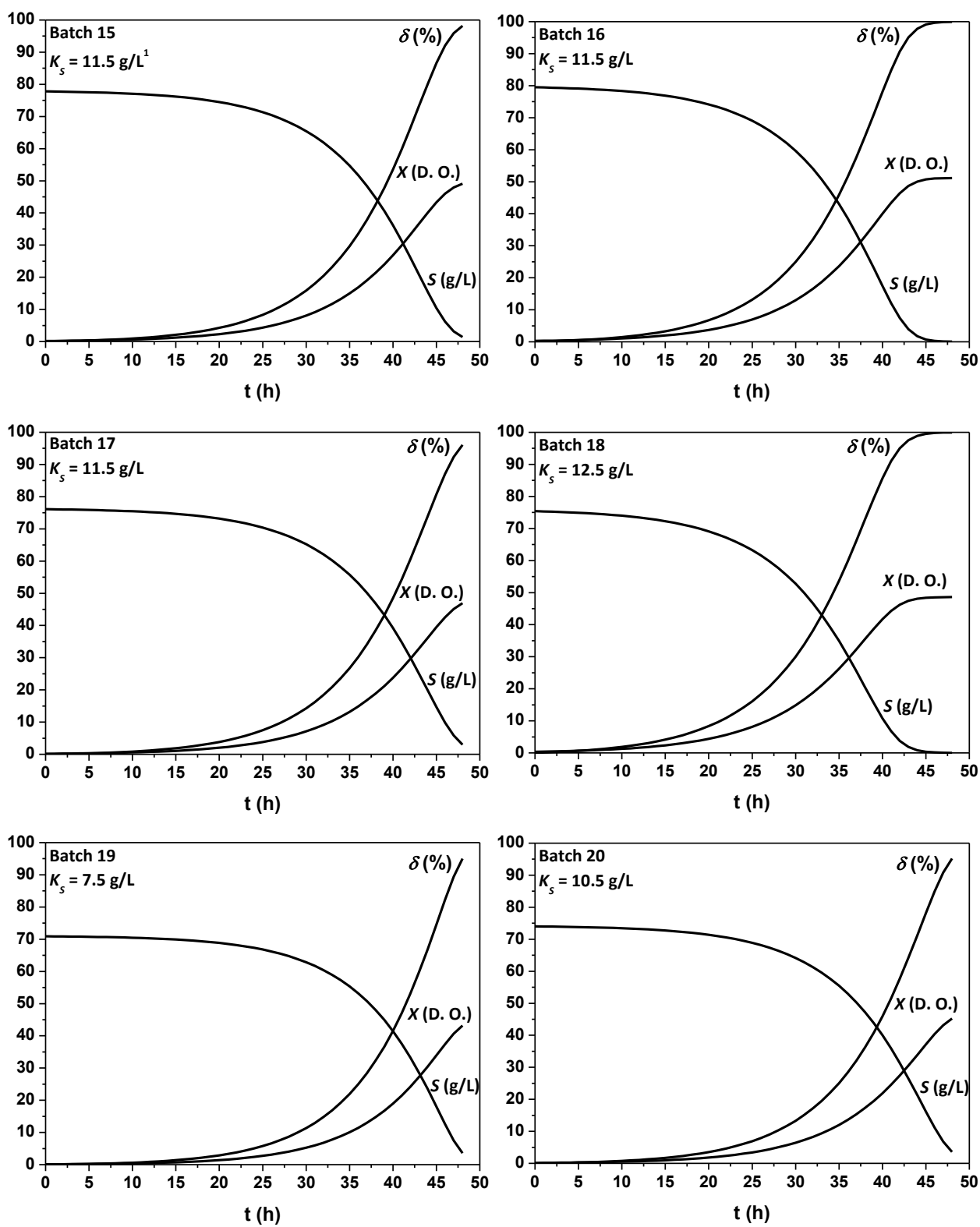
Para a análise da possibilidade de ocorrência de efeitos inibitórios sobre o crescimento microbiano, serão considerados os dois primeiros casos (inibição competitiva e não competitiva), pois neles apenas um dos parâmetros originais é afetado. No caso da inibição não competitiva, a velocidade específica máxima de crescimento fica diminuída pelo efeito inibitório. Assim, simulações aumentando-se o valor de $\mu_{\max}$ corresponderiam a uma atenuação da inibição e revelariam se o crescimento microbiano seria suficiente para atingir os valores alvo no tempo desejado de 48 horas. A análise feita na alternativa 2, em que $\mu_{\max}$ foi aumentado gradativamente, mostrou que isso é possível sim, havendo um valor mínimo deste parâmetro a partir do qual os valores alvo são atingidos. Assim, tais simulações seriam redundantes, uma vez que os resultados seriam os mesmos, embora com significados diferentes. As simulações pertinentes então são aquelas referentes ao caso da inibição competitiva, para a qual, a constante de saturação se apresenta mais alta do que a original por incorporar o termo de inibição $(1 + I / K_i)$. Desta forma, simulações foram realizadas diminuindo-se K_S até determinar, para cada batelada, o valor máximo deste parâmetro abaixo do qual, o crescimento microbiano é capaz de atingir os valores alvo especificados para o processo (Figura 16).

De acordo com os gráficos apresentados na Figura 16, foi possível determinar, para cada batelada, um valor máximo de K_S abaixo do qual, o crescimento microbiano no *IF* consegue atender às exigências do processo no que se refere à densidade celular, tempo de cultivo e conversão de substrato.

Uma forma de evitar ou minimizar tais inibições seria mudar o modo de condução do crescimento de batelada para batelada alimentada visando controlar a concentração dos inibidores no meio e assim evitar efeitos inibitórios sobre a atividade celular durante o crescimento. Entretanto, para a análise da eficácia dessa modificação seria necessário dispor de um modelo matemático que levasse em consideração estes efeitos de inibição, o que não é o caso, devendo-se ampliar o modelo atual para incorporar tais efeitos após a realização de estudos comprobatórios da ocorrência da inibição e da identificação dos inibidores.

Figura 16: Simulações relativas à análise da possibilidade de ocorrência de inibição.





Fonte: O AUTOR (2020).

• Alternativa 04:

Esta alternativa consiste em mudar o modo de condução do bioprocessamento de batelada para batelada alimentada visando avaliar se essa simples mudança operacional promove um maior e mais rápido crescimento celular no IF. Para tanto, o seguinte modelo matemático dado pelas Equações (33), (34) e (35), as quais representam os balanços de massa total, células e produto, foi utilizado nesta análise:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (33)$$

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu_X XV \Rightarrow V \frac{dX}{dt} + X \frac{dV}{dt} = \mu_X XV \Rightarrow \frac{dX}{dt} = \mu_X X - \left(\frac{F}{V}\right) X \quad (34)$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_e - \mu_S XV \Rightarrow V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = FS_e - \mu_S XV \Rightarrow \frac{dS}{dt} = \left(\frac{F}{V}\right) (S_e - S) - \mu_S X \quad (35)$$

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_X) e de consumo de substrato (μ_S) são dadas pelas Equações (27) e (28), apresentadas anteriormente.

Os valores das variáveis de estado V , X e S em função de t , F , X_0 , S_0 , S_e , μ_{max} , K_S e $Y_{X/S}$ somente podem ser obtidos por integração numérica das Equações (33) a (35), partindo-se de dadas condições iniciais X_0 e S_0 . O valor de X_0 foi especificado como sendo a média das concentrações iniciais de células utilizadas nas diversas bateladas realizadas ($\bar{X}_0 = 0.22$ D.O.) enquanto que o valor adotado de S_0 foi nulo, isto é, considerou-se que não havia substrato no interior do reator no instante inicial. Para a determinação da vazão volumétrica da corrente de alimentação de substrato (F) capaz de perfazer o volume de processamento do reator (V_p), levou-se em consideração que o tempo de enchimento do IF deveria ser igual ao tempo estipulado para o crescimento ($t = 48$ h), sendo a concentração de substrato nessa corrente (S_e) calculada a partir da Equação (36), a qual garante que a massa de substrato acumulada fornecida ao longo da operação em batelada alimentada ($FS_e t_e$) será igual à média das massas disponibilizadas no início de cada batelada ($(\bar{S}_0)_{batch} V_p$).

$$FS_e t_e = (\bar{S}_0)_{batch} V_p \Rightarrow S_e = \frac{(\bar{S}_0)_{batch} V_p}{F t_e} ; (\bar{S}_0)_{batch} = 72.0 \text{ g/L} \quad (36)$$

O volume de processamento no reator (V_p) variou entre 950 e 1050 L, dependendo do preparo de cada batelada. Assim, para a simulação considerou-se um volume médio de 1000 L. Segundo Schmidell e Facciotti (2001), o inóculo no reator descontínuo alimentado deve ocupar uma fração volumétrica entre 10 e 20 %. Na simulação, considerou-se uma fração intermediária de 15%, resultando num volume de inóculo de 150 L (volume inicial no reator).

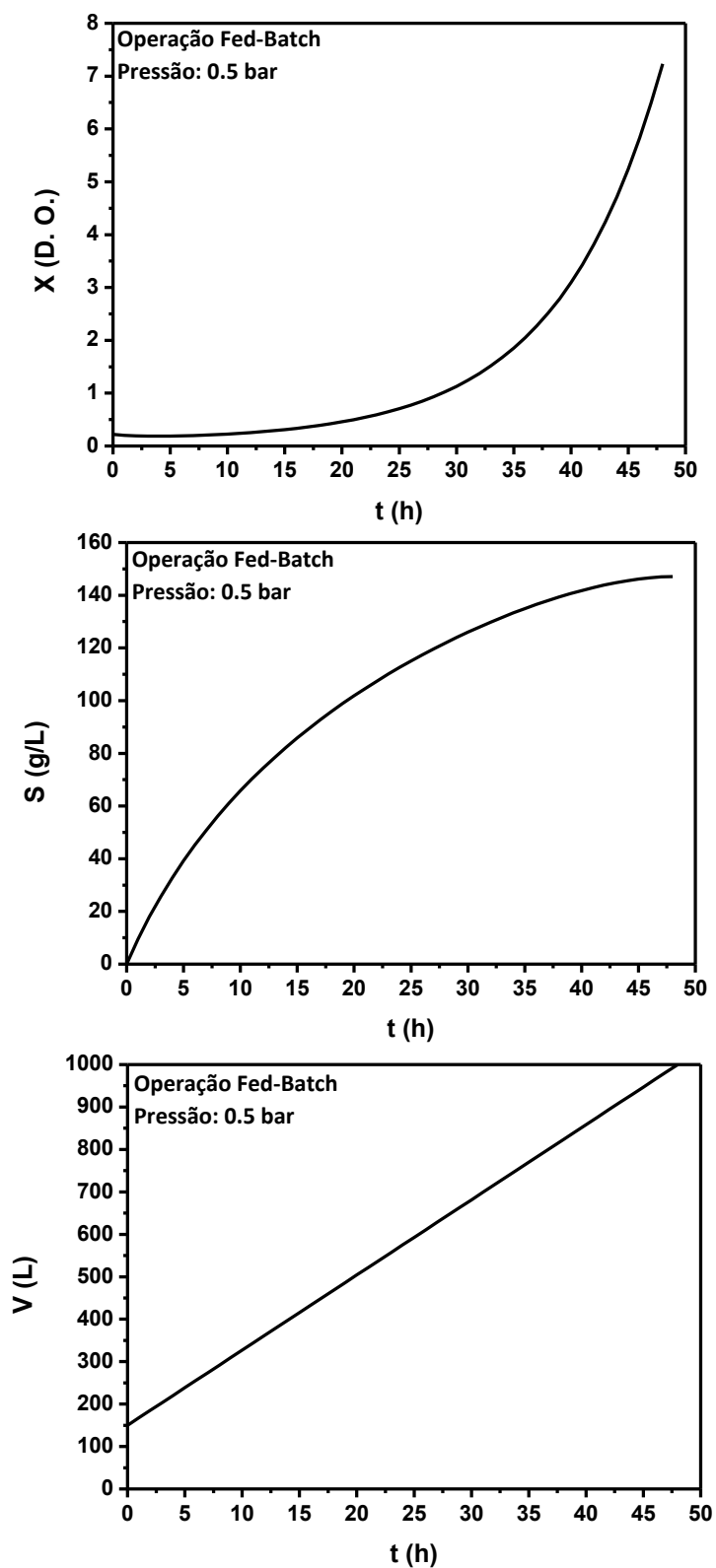
A vazão volumétrica de alimentação ficou dada então por $F = (1000-150)/48 = 17.71$ L/h e a concentração de substrato na alimentação por $S_e = \frac{72.0 \times 1000}{17.71 \times 48} = 84.7$ g/L.

A operação do reator em modo *fed-batch* foi então simulada e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17. De acordo com esta figura, observa-se que a mudança no modo de condução do cultivo de batelada para batelada alimentada não surtiu o efeito desejado de fomentar o crescimento e o consumo de substrato, ao contrário, apresentou pior desempenho, o qual é atribuído ao efeito de diluição que ocorre em sistemas batelada alimentada, retardando o crescimento celular e provocando um grande acúmulo de substrato no meio. Dessa forma, a operação *fed-batch* fica descartada devido aos resultados insatisfatórios apresentados.

Considerações sobre aspectos econômicos:

O aumento da capacidade produtiva ou a redução de perda que ocorreria com a implementação isolada ou combinada das alternativas que se mostraram tecnicamente viáveis para resolução do problema resultariam num acréscimo do volume de produção ao redor de 597 ton/ano, implicando positivamente uma receita em torno de US\$ 1.461 milhões anuais, valor este que pode variar com o preço unitário de venda.

Figura 17: Simulação da operação fed-batch.



Fonte: O AUTOR (2020).

6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes conclusões podem ser feitas:

- O modelo matemático fenomenológico, não segregado e não estruturado proposto, descreveu satisfatoriamente os dados experimentais da etapa de crescimento microbiano durante o bioprocessamento industrial de produção de farneseno, validando sua utilização para estudos de simulação, otimização e controle do bioprocessamento;
- De acordo com as simulações realizadas, é possível atingir, pelo aumento da concentração do inóculo, os valores alvos de densidade ótica, tempo de cultivo e conversão de substrato pretendidos para a etapa de crescimento microbiano no *IF*;
- A suplementação do meio de cultura com substratos melhoradores mostrou-se viável tecnicamente para incrementar o crescimento microbiano no *IF* e assim atender às especificações do processo quanto aos parâmetros de desempenho desejados. Entretanto, a implementação prática desta alternativa deve ser precedida por uma análise econômica visando avaliar o custo/benefício;
- A atenuação de possíveis efeitos de inibição favorece o crescimento celular e permite que os valores alvos sejam atingidos no *IF*. Contudo, a análise de estratégias para atenuar estes efeitos inibitórios requer a comprovação experimental das inibições sofridas pelos microrganismos e o desenvolvimento de modelos matemáticos mais abrangentes que incluam a descrição das inibições;
- A operação do *IF* em modo *fed-batch* da forma como foi simulada não resultou em incremento do crescimento microbiano, apresentando desempenho muito inferior ao do modo batelada, com pouca formação de células e grande acúmulo de substrato no reator;
- A implementação isolada ou combinada das alternativas que se mostraram tecnicamente viáveis para a resolução do problema pode se reverter em economicidade e aumento do volume de produção do bioprocessamento;
- As técnicas de modelagem e simulação empregadas neste trabalho mostraram-se ferramentas adequadas para a análise e a otimização do bioprocessamento industrial de produção de farneseno, com baixíssimo custo de investimento, rapidez, segurança e sem a necessidade de realização de testes na própria planta industrial.

7. REFERÊNCIAS

- ALTERTHUMM, F. Elementos de microbiologia. *In*: BORZANI, w. et al. (editor). *Biotecnologia Industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.1, p. 13-17.
- ALVARADO, C. S. M. *Estudo e implementação de métodos de validação de modelos matemáticos aplicados no desenvolvimento de sistemas de controle de processos industriais*. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2017.
- AMYRIS. *MegaBio: An integrated process for production of farnesene, a versatile platform chemical, from domestic lignocellulosic feedstock*. DOE Bioenergy Technologies Office (BETO) 2019 Project Peer Review. Biochemical Conversion Session; Quinn Mitrovich, 2019.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 10, p. 707-723, 1968.
- ANDRIETTA, S.R. *Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial*. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas,1994.
- BADINO JUNIOR, A. C. B; SCHMIDELL, W.; Variação de Escala. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (editors). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, Cap. 15, p. 333-353.
- BAYLEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical engineering fundamentals*. 2nd. ed. New York: McGraw Hill, 1986.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. *Biochemical Engineering*. Boca Raton: CRC Press, 1997.
- BORGES, P.C.S. *Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- CARBULONI, R. *Detecção, diagnóstico e proposta de soluções baseadas em modelos matemáticos para falhas na etapa de propagação do inóculo do bioprocessos industrial de produção de farneseno*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2020.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. *In*: BORZANI, W. et al. (editor). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.193-204.

CRATER, J.; LIEVENSE, J. Scale-up of Industrial Microbial Processes. *FEMS microbiology letters*. v. 365, n. 13, 2018. DOI 10.1093/femsle/fny138.

CROW, S. Sterilization processes. Meeting the demands of today's health care. *Technology Nursing Clinics of North America*, v. 28, p. 687–95, 1933.

CONSTANTINIDES, A.; MOSTOUFI, N. *Numerical methods for chemical engineers with MATLAB applications*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall PTR, 1999

CORNISH-BOWDEN, A. *Fundamentals of enzyme kinetics*. 4th.ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2013.

CULLER, S. A bioengineering platform to industrialize biotechnology. *Chemical Engineering Progress*, v. 112, n. 9, p. 42-51, 2016.

DAMASO, M. C. T; COURI, S. *Fermentação*. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html. Acesso em: 10 maio 2019.

DOBRE, T. G.; MARCANO, J. G. S. *Chemical Engineering: Modeling, Simulation and Similitude*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2007.

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. 2nd. ed. New York: Academic Press, 2013.

DUTTA, R. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Nueva Delhi, India: Ane Books Índia, 2008.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: BORZANI, W. et al. (editor). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, p. 223-246.

FROMENT G. F.; BISCHOFF K. B.; DE WILDE J. *Chemical Reactor Analysis and Design*. 3rd. ed. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010. 900 p

FOGLER, H.S. *Elements of chemical reaction engineering*. 2nd. ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall International, 1992.

GLOBAL FARNESENE MARKET 2019 *Report*. Disponível em: <https://www.marketwatch.com/press-release/farnesene-market-size-share-2019-global-industry-overview->. Acesso em: 10 nov. 2019.

HAYNES W. Tukey's Test. In: DUBITZKY W.; WOLKENHAUER O.; CHO KH.; YOKOTA H. (editors) *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, NY: Springer, 2013.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (editors). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, Cap. 6, p. 93-121.

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 2, p. 497-511, 1983.

LEROUGE, S. Introduction to sterilization: definitions and challenges. In: LEROUGE, S.; SIMMONS, A. *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*. Waltham, MA: Woodhead Publishing, 2012. p. 1-19.

MONOD, J. The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology*, Paio Alto, v.3, p.371-394, 1949.

MORIYA, T.; MÓDENA, J. L. P. Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 265-273, 2008.

NILSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. *Bioreaction engineering principles*. 2nd. ed. New York, N.Y.: Kluwer Academic, 2003.

NOORMAN H.J.; HEIJNEN J.J. Biochemical engineerings grand adventure. *Chemical Engineering Science*. v. 170, p. 677-693, 2017. DOI 170:677–93.

PINTO, J. C.; LAGE, P. L. C. *Métodos numéricos em problemas de Engenharia Química*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2001.

PORTO, L. M. *Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica continua com reatores de mistura ligados em série*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RICHARDS, J.W. *Introduction to Industrial Sterilization*. London: Academic Press, 1968. p. 173.

RAMIREZ, W. F. *Computational methods for process simulation*. Stoneham: Butterworth Publishers, 1989.

RECH, R. *Bioengenharia para engenharia química*. Porto Alegre: UFRGS, 2009.76 p.

RICHARD, H. Enzimologia e Biocatálise. In: SCRIBAN, R. (editor). *Biotecnologia*. São Paulo: Editora Manole, 1985. p.179-207.

ROCHA, M.; MENDES, R.; ROCHA, O.; ROCHA, I.; FERREIRA, E. C. Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms. *Expert Systems with applications*, v. 41, n. 5, p. 2186-2195, 2014. ISSN 0957-4174.

RODRIGUES, M. F. A.; PRADELLA, J. G.C; URENHA, L.C. Esterilização do equipamento. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (editors). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, Cap. 3, p. 19-38.

SARAIVA, A. S.B. *Avaliação de Riscos, Qualificação de Equipamentos de Esterilização, Despirogenização e Produção*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) - Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade nova de Lisboa. Lisboa, p. 26-30, 2016.

SCHMIDELL, W.; BONOMI, A. Modelagem Matemática e Simulação de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (editors). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, Cap. 7, p. 123-178.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (editors). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, Cap. 8, p. 179-192.

SIGLER, K.; HOFER, M. Mechanism of acid extrusion in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1071, p. 375-391, 1991.

SMITH, H.L; WALTMAN, P. *The theory of the chemostat: dynamics of microbial competition*. Cambridge: University Press, 1995.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. *Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2007.

TOSETTO, G. M. *Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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.

VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique*, v. 10, p. 113-121, 1838.

VIEGAS, M.C. *Desenvolvimento de um reator da bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras floculantes*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

VOLESKY, V. B.; VOTRUBA, J. *Modeling and Optimization of Fermentation Processes*. Amsterdam: Elsevier, 1992.

WESTFALL, P. J.; GARDNER, T. S. Industrial fermentation of renewable diesel fuels. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 3, p. 344-350, 2011.

APÊNDICE A – SOLUÇÃO ANALÍTICA DO SISTEMA DE EQUAÇÕES DIFERENCIAIS REPRESENTATIVAS DO MODELO MATEMÁTICO

Neste apêndice, apresenta-se a solução analítica do sistema de equações diferenciais ordinárias representativas do modelo matemático, o qual compreende as equações de balanço de massa de células e de substrato, dadas a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} X, \quad X(0) = X_0 \quad (A.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} X, \quad S(0) = S_0 \quad (A.2)$$

Dividindo-se a Equação (A.1) pela Equação (A.2), obtém-se:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dS} = -Y_{X/S} &\Rightarrow dX = -Y_{X/S} dS \Rightarrow \int_{X_0}^X dX = -Y_{X/S} \int_{S_0}^S dS \Rightarrow X - X_0 = -Y_{X/S} (S_0 - S) \Rightarrow \\ X &= X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S) \end{aligned} \quad (A.3)$$

Para obter $S = S(t)$, inicialmente substitui-se a Equação (A.3) na Equação (A.2):

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} (X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)) \Rightarrow \\ \frac{dS}{dt} &= -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \left\{ \frac{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)] S}{K_S + S} \right\} \end{aligned} \quad (A.4)$$

Separando-se as variáveis:

$$\frac{K_S + S}{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)] S} dS = -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} dt \quad (A.5)$$

$$\left\{ \frac{K_S}{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)] S} + \frac{1}{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)]} \right\} dS = -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} dt \quad (A.6)$$

Expandindo-se o termo entre chaves em uma soma de frações parciais:

$$\frac{K_S}{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)] S} = \frac{C_1}{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)]} + \frac{C_2}{S} = \frac{C_1 S + C_2 [X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)]}{[X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)] S} \quad (A.7)$$

Desenvolvendo-se a igualdade entre os numeradores da Equação (A.7) visando determinar as constantes C_1 e C_2 :

$$K_S = C_1 S + C_2 [X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)] \Rightarrow$$

$$K_S = C_1 S + C_2 X_0 + C_2 Y_{X/S} S_0 - C_2 Y_{X/S} S \Rightarrow$$

$$K_S = (C_1 - C_2 Y_{X/S}) S + C_2 (X_0 + Y_{X/S} S_0) \Rightarrow$$

$$\begin{cases} C_1 - C_2 Y_{X/S} = 0 \\ C_2 (X_0 + Y_{X/S} S_0) = K_S \end{cases} \Rightarrow$$

$$C_1 = \frac{Y_{X/S} K_S}{X_0 + Y_{X/S} S_0} \quad (\text{A.8})$$

$$C_2 = \frac{K_S}{(X_0 + Y_{X/S} S_0)} \quad (\text{A.9})$$

Substituindo-se a Equação (A.7) na Equação (A.6), obtém-se:

$$\begin{aligned} \int_{S_0}^S \left[\frac{C_1}{[X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)]} + \frac{C_2}{S} + \frac{1}{[X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)]} \right] dS &= -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \int_0^t dt \Rightarrow \\ \int_{S_0}^S \frac{(C_1+1)}{[X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)]} dS + \int_{S_0}^S \left(\frac{C_2}{S} \right) dS &= -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} t \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

Fazendo-se a mudança de variável $[X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)] = u$ e calculando-se as integrais indicadas na Equação (A.10), chega-se a:

$$\frac{(C_1+1)}{Y_{X/S}} [-\ln u]_{u_0}^u + C_2 \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} t \quad (\text{A.11})$$

Multiplicando-se ambos os membros da Equação (A.10) por $(-Y_{X/S})$:

$$(C_1 + 1) [\ln u]_{u_0}^u - Y_{X/S} C_2 \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{max} t \Rightarrow$$

$$(C_1 + 1) \left[\ln \frac{u}{u_0} \right] - Y_{X/S} C_2 \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{max} t \Rightarrow$$

$$\left[\frac{K_S Y_{X/S}}{X_0 + Y_{X/S} S_0} + 1 \right] \ln \frac{X_0 + Y_{X/S} (S_0 - S)}{X_0} = \frac{K_S Y_{X/S}}{X_0 + Y_{X/S} S_0} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{max} t \quad (\text{A.12})$$

Sendo $u = [X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)]$, obtém-se:

$$[X_0 + Y_{X/S}(S_0 + K_S)] \ln \left[\frac{X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)}{X_0} \right] - K_S Y_{X/S} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = \mu_{max} (X_0 + Y_{X/S} S_0) t \quad (\text{A.13})$$