

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THIAGO JOSÉ BARBOSA MESQUITA

**ESTRUTURAS DE CONTROLE DE BIORREATOR BASEADAS EM
FLUXOS METABÓLICOS PARA FERMENTAÇÕES MICRO-
AERADAS**

SÃO CARLOS-SP

2021

THIAGO JOSÉ BARBOSA MESQUITA

**ESTRUTURAS DE CONTROLE DE BIORREATOR BASEADAS EM
FLUXOS METABÓLICOS PARA FERMENTAÇÕES MICRO-
AERADAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Zangirolami

SÃO CARLOS-SP

2021

Mesquita, Thiago José Barbosa

Estruturas de controle de biorreator baseadas em fluxos metabólicos para fermentações micro-aeradas / Thiago José Barbosa Mesquita -- 2021.
169f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Teresa Cristina Zangirolami

Banca Examinadora: Teresa Cristina Zangirolami,
Antonio Carlos Luperni Horta, Roberto de Campos
Giordano, José Geraldo da Cruz Pradella, Eugénio
Manuel de Faria Campos Ferreira, Gilson Campani
Júnior

Bibliografia

1. Controle avançado de Biorreatores. 2. Micro-aeração.
3. Fermentação Alcoólica. I. Mesquita, Thiago José
Barbosa. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Thiago José Barbosa Mesquita, realizada em 15/04/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano (UFSCar)

Prof. Dr. Jose Geraldo da Cruz Pradella (UNIFESP)

Prof. Dr. Eugénio Manuel de Faria Campos Ferreira (UMinho)

Prof. Dr. Gilson Campani Júnior (UFLA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Ele, aos meus pais e toda a minha família que esteve dando suporte e estimulando achar motivação para cumprir mais uma etapa da vida profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial, iluminar, proteger, reservar o melhor e me renovar em todos os passos dessa caminhada pela estrada da vida, permitindo alcançar as metas. Pois Ele era e é e há de vir.

Ao meu pai, Gentil Mesquita, à minha mãe, Darlene Mesquita, ao meu irmão, Gabriel, que sempre estiveram ao meu lado, sempre querendo que realizasse tudo de maneira justa, íntegra, honrosa e sempre fazendo o meu melhor, em frente e mais além.

As minhas avós, Maria e Therezinha, por ajudar a formar meu caráter sempre demonstrando solidariedade, carinho e ternura, torcendo pelas vitórias e conquistas. Aos meus avôs, Almir e Gentil, dedico novamente homenagem e espero continuar honrando vosso legado.

À toda minha família aqui no Brasil e nos EUA (tios, tias, primos e primas) que permitiram viver momentos que são indelévels e constituem meus alicerces.

À minha professora orientadora, Dra. Teresa Cristina Zangirolami, e co-orientadores, Dr. Antônio Carlos Luperni Horta e Dr. Roberto de Campos Giordano, que foram essenciais para meu crescimento acadêmico, profissional e humano. Sendo sempre solícitos e presentes, seja na solução de problemas, no desenvolvimento do trabalho e na partilha do valioso conhecimento e experiência que possuem. Obrigado pela oportunidade de subir mais um degrau.

Muito obrigado aos professores Dr. Gilson Campani Jr, Dr. Marcelo Ribeiro e Dr. Fernando Lima. Vocês também foram de suma importância para o desenvolvimento dessa tese. Também foram sempre solícitos e estavam sempre dispostos a ajudar na construção da pesquisa com muita criatividade.

Ao grupo de pesquisa LaDABio (UFSCar/DEQ), LaFaC (UFSCar/DEQ) e CODES (WVU) por todo apoio e suporte na execução e discussão dos resultados. Muito obrigado por toda ajuda, atenção e tempo que foram dispensados, por todo apoio, disponibilidade e parceria.

Agradeço minha banca avaliadora, que dispuseram de tempo para auxiliar o trabalho com importantes sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos técnicos do departamento, cujo suporte permitiram a execução dos trabalhos.

Aos meus companheiros de pós-graduação e laboratório, Caroline Perez, Juliana Sandri e Vanessa Guedes, Camila Fávaro, Alice Torres, José Roberto... Todos com os quais pude compartilhar as experiências, os risos, os congressos, a descontração, a superação, o crescimento, de maneira que auxiliaram direta e indiretamente no cumprimento das minhas atividades, deixando sempre lembranças.

Aos amigos e companheiros que conheci nos Estados Unidos, Brent Bishop, Daniel Kesting, Iuri Lima, Rebbeca Kim, Ronald Alexander, San Dih, Vitor Gazzaneo. Vocês tornaram minha estadia especial e significativa.

Sou extremamente grato aos irmãos do Small Group, André Viana, Patrícia Viana, Jéssica da Luz, Família Bolyard, Heleno Bispo e John Vanosdol. Vocês estão em meu coração e são muito especiais para mim.

Também agradeço, à CAPES, CNPq e à FAPESP pelo financiamento

Muito Obrigado!!

*“ Sola fide;
Sola scriptura;
Solus Christus;
Sola gratia;
Soli Deo gloria”*
(Martinho Lutero)

“No princípio era o Verbo, e o Verbo
estava com Deus, e o Verbo era Deus”
(João 1:1)

“Desista da ideia de me fazer desistir”
(Jiraya)

RESUMO

O fornecimento de oxigênio como nutriente limitante em biorreatores é um desafio, visto que os microrganismos podem apresentar necessidades metabólicas diferentes, somada à dificuldade de se medir esta variável em baixas concentrações. Apesar dos obstáculos, a micro-aeração tem se mostrado essencial para bioprocessos como as fermentações alcólicas. Portanto, tendo como estudo de caso fermentações alcólicas catalisada por leveduras, o objetivo dessa tese é desenvolver um sistema de controle para biorreatores baseados em fluxos metabólicos para controlar o fluxo metabólico de oxigênio em condição de micro-aeração. O trabalho envolveu duas abordagens distintas de controle, avaliadas em fermentações micro-aeradas de *Saccharomyces cerevisiae*, como estudo de caso. A execução da proposta foi dividida em quatro etapas: (i) obtenção das matrizes de fluxos metabólicos por simulações do modelo metabólico iND 750 e treinamento das Redes Neurais Artificiais; (ii) realização de experimentos de caracterização de duas cepas industriais de *S. cerevisiae* (FT858L e FERMELE) em cultivos em mini-reatores para modelagem matemática da cinética de crescimento; (iii) avaliação experimental da estratégia de controle com a Rede Neural incorporada; (iv) modelagem matemática do crescimento celular, da formação de produto e do consumo de substrato e oxigênio em condição micro-aerada, seguida por análise de operabilidade e simulação do sistema controle baseado em algoritmo biomimético. Os experimentos foram realizados em meio mínimo (5,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 2,0 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1,5 g.L⁻¹ ureia; 3 ppm Kamoran), tendo hexoses como fonte de carbono, pH de 4,5 e temperatura de 30°C. Na etapa (ii) as fermentações foram conduzidas em mini-reatores (5 mL), dotados de saída para o CO₂, com acompanhamento pela perda de massa devido à produção de CO₂. Na etapa (iii), a cepa FT858L, selecionada na etapa anterior por apresentar melhor desempenho, foi utilizada nas fermentações em batelada conduzidas em biorreator tipo tanque agitado de 5 L com alta carga de glicose. Três estratégias diferentes de suprimento de oxigênio foram avaliadas e comparadas: a) manutenção de um de fluxo de ar constante; b) uso de PID e outros controladores para manter o quociente respiratório (RQ) na faixa de variação desejada; c) aplicação de controle baseado em fluxos metabólicos com incorporação de redes neurais para controlar o fluxo de O₂. O controle baseado nas redes neurais foi eficiente na manutenção das condições desejadas de micro-aeração, levando à obtenção de altos valores de rendimento (0,48 g_{Etanol}.g_{Substrato}⁻¹), produtividade (4,2 g.L⁻¹.h⁻¹) e viabilidade celular (95%). Esse desempenho foi superior ao das outras estratégias avaliadas, que apresentaram rendimento entre 0,33-0,40 g_{Etanol}.g_{Substrato}⁻¹ e produtividade entre 3,4-3,7 g.L⁻¹.h⁻¹. O modelo cinético incorporando inibição por substrato e etanol, obtido a partir dos dados gerados em experimentos simples em mini-reatores, foi capaz de descrever o crescimento, a formação de produto e o consumo de substrato em fermentação convencional e micro-aerada realizadas em biorreatores. O modelo cinético foi ainda empregado na análise da operabilidade do processo e na simulação do controle da micro-aeração por algoritmo biomimético. O controlador baseado no algoritmo biomimético foi capaz de manter os fluxos de O₂ e CO₂ nos setpoints desejados, resultando em produtividade de 4,0 g.L⁻¹.h⁻¹. Os resultados obtidos demonstram a importância do desenvolvimento de controladores precisos e robustos para a intensificação de processos cujo desempenho seja favorecido pela micro-aeração.

Palavras-chave: Bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Controle baseado em fluxos metabólicos, Controle avançado de Biorreatores, Micro-aeração, Fermentação Alcólica.

ABSTRACT

The supply of oxygen as a limiting nutrient in bioreactors is a challenge, as microorganisms may have different metabolic requirements, besides the difficulty of measuring this variable in low levels. Despite the obstacles, micro-aeration has been shown to be essential for bioprocesses such as alcoholic fermentations. Therefore, using yeast catalyzed alcoholic fermentations as a case study, the objective of this thesis is to develop a control system for bioreactors based on metabolic fluxes to control the oxygen metabolic flux under micro-aeration conditions. This work involves two distinct control approaches, which used *Saccharomyces cerevisiae* micro-aerated cultivations as study case. The execution of the proposal was divided into four stages: (i) Obtaining of the metabolic fluxes matrices by simulations of the metabolic model iND750 and training of artificial neural networks; (ii) Conducting experiments to characterize two industrial *cerevisiae* strains (FT858L and FERMEL) in mini-reactors cultivations for mathematical modeling of the growth kinetics; (iii) Experimental evaluation of the control strategy with the artificial neural network incorporated; (iv) Mathematical modeling of cell growth, product formation, substrate and oxygen consumption in micro-aerated conditions, followed by operability analysis and simulation of the control system using a biomimetic algorithm. The experiments were carried out in minimal medium ($5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $2.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of urea; 3ppm Kamoran), with hexoses as a carbon source, pH 4.5, and temperature of 30°C . In step (ii), the fermentations were carried out in mini-reactors (5 mL) equipped with a CO_2 exit, in which the loss of mass due to the production of CO_2 was monitored. In step (iii), following the strain selection in terms of performance, the FT858L yeast was used in batch fermentations conducted in 5 L stirred tank bioreactor with a high glucose load. Three different oxygen supply strategies were evaluated and compared: a) simple maintenance of a constant air flowrate; b) use of PID and other controllers to keep the respiratory quotient (RQ) at the desired range; c) use of a control based on metabolic fluxes with neural networks incorporated to maintain the O_2 flux. The control based on neural networks was efficient in maintaining the desirable conditions of micro-aeration, leading to high yield values ($0.48\text{ g}_{\text{Ethanol}}\cdot\text{g}_{\text{Substrate}}^{-1}$), productivity ($4.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and cell viability (95%). This performance was superior to the achieved in other evaluated strategies, which presented a yield between $0.33\text{-}0.40\text{ g}_{\text{Ethanol}}\cdot\text{g}_{\text{Substrate}}^{-1}$ and productivity between $3.4\text{-}3.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. The kinetic model incorporating substrate and ethanol inhibition and based on data generated in simple experiments in mini-reactors was able to describe the growth, product formation, and substrate consumption in conventional and micro-aerated fermentations carried out in bioreactors. The kinetic model was also used in the analysis the process operability and in the simulations of the biomimetic control algorithm for micro-aeration. The biomimetic controller was able to maintain the O_2 and CO_2 fluxes at the desired set points, resulting in a productivity of $4.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. The results obtained demonstrate the importance of the development of precise and robust controllers for the intensification of processes whose performance is favored by micro-aeration.

Keywords: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Metabolic flux-based control, Microaeration, Advanced bioreactor control, Alcoholic fermentation

Índice de ilustrações

Figura 3.1 - Principais vias metabólicas associadas ao consumo de glicose.....	29
Figura 3.2 - Esquema do mapeamento usando um modelo de processo e o conjunto de entradas (CED) para obter o conjunto de saídas (CSD).	39
Figura 3.3 - Esquema do mapeamento inverso usando um conjunto de saídas objetivo desejado (CSO) para alcançar um conjunto de entrada objetivo (CEO).....	40
Figura 3.4 - Diagrama de blocos de um sistema de controle malha fechada	42
Figura 3.5 - Representação de uma rede neural com duas camadas intermediárias.....	43
Figura 3.6 – Inspiração do funcionamento de um algoritmo biomimético.	47
Figura 3.7 - Fluxograma do BIO-CS, no qual cada etapa (a) – (e) é detalhada abaixo.....	48
Figura 4.1 - Concentrações de glicose inferidas a partir dos dados de mCO_2 e velocidade de consumo de substrato para cada condição inicial de concentração de substrato estudada, para (A) FT858L e (B) FERMEL. Velocidade de consumo de glicose (r_s) em $g_{\text{Substrato}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30°C, $DO_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ $g \cdot L^{-1}$), viabilidade inicial = 75%. ^{a,b,c,...g,h} Valores de r_s comparados usando o teste Tukey (nível de confiança de 95%), onde as mesmas letras significam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação estatística do r_s para diferentes concentrações iniciais de substrato foi realizada para os conjuntos de dados das Figuras 4.1A, 4.1B, e 4.3A.....	70
Figura 4.2 - Concentração de glicose inferida a partir dos dados de mCO_2 e velocidade de consumo de substrato para cada concentração inicial de etanol estudada, para (A) FT858L e (B) FERMEL. Velocidade de assimilação de glicose (r_s) em ($g_{\text{Substrato}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30 °C, $DO_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ $g \cdot L^{-1}$ viabilidade inicial = 75%. ^{a,b,c,...g,h} Valores de r_s comparados usando o teste Tukey (nível de confiança de 95%), onde as mesmas letras significam que não houve diferença estatisticamente significativa. Foi realizada a comparação estatística de r_s para diferentes concentrações iniciais etanol para os conjuntos de dados das Figuras 4.2A, 4.2B, e 4.3B.	74
Figura 4.3 - Concentração de ART inferida em melão a partir dos dados de mCO_2 e velocidade de assimilação de substrato para FT858L, (A) variação da concentração inicial de melão (em termos de ART) e (B) variação da concentração inicial de etanol. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, melão como fonte de carbono, estática, pH 4,5, 30°C, $DO_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ $g \cdot L^{-1}$), viabilidade inicial = 75%. ^{a,b,c,...g,h} Valores de r_s comparados usando o teste Tukey (nível de confiança de 95%), onde as mesmas letras significam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação estatística do r_s para diferentes concentrações iniciais de substrato foi realizada para os conjuntos de dados das Figuras 4.1A, 4.1B, e 4.3A. Foi realizada a comparação estatística de r_s para diferentes concentrações iniciais etanol para os conjuntos de dados das Figuras 4.2A, 4.2B, e 4.3B.....	76

- Figura 4.4** - Comparação do mCO_2 estimado vs mCO_2 experimental final. A estimativa de mCO_2 foi obtida utilizando a relação estequiométrica entre o etanol produzido e o CO_2 (1:1), a partir de concentrações de etanol medidas nas suspensões finais de fermentação. A linha vermelha representa a igualdade do mCO_2 estimado e do mCO_2 experimental final, enquanto as linhas pontilhadas representam um desvio de $\pm 10\%$ dessa igualdade. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, meio mínimo e meio com melão, estática, pH 4.5, $30^\circ C$, $DO_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ g.L⁻¹), viabilidade inicial = 75%..... 77
- Figura 4.5** - Velocidade específica de crescimento inferida e modelagem cinética: para FT858L, variando a concentração de (A) glicose e (B) etanol; para FERMEI variando a concentração de (C) glicose e (D) etanol; para FT858L com (E) variando a concentração de melão (ART) e (F) variando a concentração de etanol com melão como fonte de carbono. — resultados simulados; \circ velocidade específica de crescimento experimental e concentração de substrato inferidas com dados mCO_2 . Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, meio mínimo (A-D) ou complexo com melão como fonte de carbono (E e F), estática, pH 4,5, $30^\circ C$, $DO_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%. Ajuste da Eq. 4.14 para os dados de inibição do etanol: pontos de concentração inicial de etanol entre 0 a 120 g.L⁻¹ utilizados para regressão linear (FT858L, B e F); pontos de concentração inicial de etanol entre 0 a 60 g.L⁻¹ utilizados para regressão linear (FERMEI, D)..... 78
- Figura 4.6** - Validação do modelo cinético para o cultivo em biorreator em condições anaeróbicas (PBB) utilizando FT858L em meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose, e (D) glicerol. — resultados simulados; modelo cinético gerado pela metodologia de estudos em mini-reator, sem reparametrização; \circ Dados experimentais. Condições experimentais: $V = 4$ L, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, $30^\circ C$, $DO_0 = 6$ ($C_{x0} = 3$ g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica. 80
- Figura 4.7** - Valores experimentais vs. valores preditos para o cultivo anaeróbico em biorreator (PBB) utilizando FT858L e meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose e (D) glicerol. Condições experimentais: $V = 4$ L, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, $30^\circ C$, $DO_0 = 6$ ($C_{x0} = 3$ g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica. 82
- Figura 4.8** - Cultivo micro-aerado em biorreator (Q_{fix-B} , $Q_{ar} = 0,36$ L.min⁻¹) utilizando FT858L em meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose, e (D) glicerol. — resultados simulados; modelo gerado utilizando pela metodologia de estudos em mini-reator; \circ Dados experimentais. Condições experimentais: $V = 4$ L, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, $30^\circ C$, $DO_0 = 6$ ($C_{x0} = 3$ g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica. 83
- Figura 4.9** - Valores experimentais vs. valores preditos para o cultivo micro-aerado (Q_{fix-B}) utilizando FT858L e meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose e (D) glicerol. Condições experimentais: $V = 4$ L, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, $30^\circ C$, $DO_0 = 6$ ($C_{x0} = 3$ g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose,

etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. Cx medido por leituras de densidade ótica. 84

- Figura 5.1** - Esquema de construção da lógica de controle baseada em fluxos metabólicos. (I) Mapeamento dos fluxos metabólicos usando simulações de modelos metabólicos em escala genômica (GSM); (II) Treinamento das Redes Neurais artificiais (RNA); (III) Estrutura de controle do biorreator (SUPERSYS_UCM). **1** Conversor analógico ao digital (cFP – *compact Field Point* 2020, National Instruments); **2** Analisador de gases (Quantek 902P); **3** Temperatura (termopar), pressão, concentração de oxigênio dissolvido (COD, sensor InPRO 6800 e transmissor modelo CE, O2 4050) e pH (sensor InPRO 3250 e transmissor GLI PRO); **4** Medidores de fluxo (modelo GFC, Aalborg); **5** Bomba peristáltica para controle de pH (modelo C/L, Masterflex). O tempo de aquisição do sistema foi de 0,2 segundos, com salvamento de dados a cada 10 s. Para todas as variáveis com a aquisição on-line, foi adicionado um filtro exponencial associado a um filtro de mediana para suavizar as leituras e reduzir o ruído dos sensores. Adaptado de Mesquita *et al.* (2019). 90
- Figura 5.2** – Resumo das estratégias de cultivo aplicadas às fermentações em biorreatores com *S. cerevisiae*. 95
- Figura 5.3** - Estrutura da RNA obtida: W - peso de cada neurônio; b - *bias* de cada neurônio. A RNA tem uma camada oculta com 41 neurônios em que a função de transferência é uma tangente sigmoide. A camada de saída tem um neurônio e a função de transferência é puramente linear. 100
- Figura 5.4** - (A) Histograma dos erros da RNA com 41 neurônios na camada oculta. (B) MSE minimizado. (C) Previsão da RNA camada oculta. O – Previsão RNA; X – Dados simulados Optflux. Em cada caixa estão ilustrados os fluxos metabólicos de substrato são (JSMM) avaliados. As frequências ou instâncias representam a frequência das amostras do conjunto de dados em relação ao erro. 101
- Figura 5.5** – Desempenho dos controladores baseados em RQ. Fluxos metabólicos inferidos on-line para (A) HC-RQ e (B) PID-RQ; variável manipulada e medição da COD para (C) HC-RQ e (D) PID-RQ; quociente respiratório para (E) HC-RQ e (F) PID-RQ. Em (A) e (B), — JO₂Exp e - - - JCO₂Exp. Em (C) e (D), — DOC e - - - QAr. Em (E) e (F), — RQ e - - - *setpoint* RQ. Condições experimentais: V= 4L, meio mínimo, 500 rpm, pH 4,5, 30°C, DO₀=6 (densidade ótica inicial) (C_{x0}=3 g.L⁻¹), viabilidade inicial =75% 103
- Figura 5.6**– Desempenho dos cultivos conduzidos com vazão de ar constante (Q_{fix}) e do cultivo do tipo PBB. Fluxos metabólicos inferidos on-line para (A) Q_{fix}-B, (B) Q_{fix}-MB e (C) PBB. Variável manipulada e medição DOC para (D) Q_{fix}-B, (E) Q_{fix}-MB e (F) PBB. O quociente respiratório (RQ) para (G) Q_{fix}-B e (H) Q_{fix}-MB. Em (A), (B) e (C), — JO₂Exp e - - - JCO₂Exp. Em (D), (E) e (F), — COD e - - - QAr . Em (G) e (H), — RQ. Condições experimentais: V= 4L, Meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, OD₀=6 (C_{x0}=3 g.L⁻¹), viabilidade inicial =75% 105
- Figura 5.7** - Desempenho do cultivo usando o controle proposto para fluxos metabólicos. Fluxos metabólicos inferidos on-line para (A) FM-RNA e (B) FM-RNA-PI. Variável manipulada e medição (COD) para (C) FM-RNA e (D) FM-RNA PI. O quociente respiratório (RQ) para (E) FM-RNA e (F) FM-RNA-PI. Em (A) e (B) - - -JO₂SP , — JO₂Exp , - - - JCO₂Exp. Em (C) e (D), — COD e - - - QAr. Em (E)

e (F), — RQ. Condições experimentais: V= 4L, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, OD₀=6 (C_{x0}=3 g.L⁻¹), viabilidade inicial =75% 108

- Figura 6.1-** Estrutura de controle do biorreator 124
- Figura 6.2-** Valores simulados para as concentrações de: biomassa (C_x)- FM-RNA (A) e FM-RNA-PI (D); etanol (C_e)- FM-RNA (B) e FM-RNA-PI (E); e substrato (C_s) - FM-RNA (C) e FM-RNA-PI (F). Erro padrão residual (RSE)..... 127
- Figura 6.3 -** Valores previstos vs experimentais para as concentrações de: biomassa (C_x) - FM-RNA (A) e FM-RNA-PI (D); etanol (C_e)- FM-RNA (B) e FM-RNA-PI (E); e substrato (C_s) - FM-RNA (C) e FM-RNA-PI (F) 128
- Figura 6.4-** Mapeamento obtido pela análise de operabilidade do processo a partir do modelo proposto. Em que: (A) Conjunto de entradas disponíveis '□'; (B) e (C) Conjunto de saídas disponíveis '□' e conjunto de saídas objetivo '●'; (D) Espaço de entradas disponíveis '—' e conjunto de entradas objetivo '●' 129
- Figura 6.5 -** Comparação entre os dados de operabilidade do processo CEO (○), dados experimentais FM-RNA (□), dados experimentais FM-RNA-PI (Δ) para J_{CO2} e Q_{Are}..... 130
- Figura 6.6-** Saídas e ações de controle para simulações do BIO-CS. (A) Saída J_{O2}; (B) Saída de J_{CO2}; (C) Q_{Are}- Vazão manipulada de ar; (D) Q_{N2e}- Vazão manipulada de nitrogênio..... 131
- Figura 6.7 -** Adição de ruído ao BIO-CS. (A) Saída J_{O2}; (B) Saída J_{CO2}; (C) Vazão manipulada de ar; (D) Vazão manipulada de nitrogênio; (E) Concentração de biomassa; (F) Concentração de etanol; (G) Concentração de substrato; (H) Perfil da fração de oxigênio no gás de saída. Foram avaliados ruídos de 1% na medição (C_x, y_{O2s} e y_{CO2s}); desvio do modelo (*model mismatch*) com um desvio padrão de 1% do μ_{sOxidativo} e μ_{sRedutivo}; perturbação de -10% em Q_{Are} e Q_{N2e}. A seta em (C) e (D) indica o momento em que a perturbação foi introduzida nas variáveis manipuladas..... 133
- Figura 6.8-** Resultados de saída e entrada para implementação simulada de PI. (A) Saída J_{O2}; (B) Saída J_{CO2}; (C) Q_{Are}- Vazão manipulada de ar; (D) Q_{N2e}- Vazão manipulada de nitrogênio. 134

Índice de tabelas

Tabela 3.1 – Características necessárias para que um microrganismo seja indicado para fermentação alcoólica.	27
Tabela 4. 1 - Índices de desempenho utilizados para avaliar as cepas de levedura em diferentes condições iniciais de concentração de fonte de carbono. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30 °C, $DO_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ g.L ⁻¹), viabilidade inicial = 75%. C_x é a concentração de biomassa, X é a conversão de substrato, e $Y_{P/S}$ é o rendimento do etanol (calculado utilizando a concentração final obtida a partir da análise HPLC). ^{a...g} C_x ; ^{h...k} $Y_{P/S}$; ^{l...s} Viabilidade: Mesmas letras sobrescritas significam que não há diferença estatística com o mesmo grupo de índices comparado usando o teste Tukey em um nível de confiança de 95%.	71
Tabela 4. 2 - Índices de desempenho utilizados para avaliar as cepas de levedura em diferentes condições iniciais de concentração de etanol. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30 °C, $OD_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2$ g.L ⁻¹), viabilidade inicial = 75%. C_x é a concentração de biomassa, X é a conversão de substrato,e $Y_{P/S}$ é o rendimento do etanol (calculado utilizando a concentração final obtida a partir da análise HPLC). ^{a...g} C_x ; ^{h...n} $Y_{P/S}$; ^{o...t} Viabilidade: Mesmas letras sobrescritas significam que não há diferença estatística com o mesmo grupo de índices comparado usando o teste Tukey em um nível de confiança de 95%.	73
Tabela 4. 3 - Condições iniciais utilizadas nas simulações dos experimentos bioreatores (PBB e QFix-B).....	81
Tabela 4.4 - Parâmetros obtidos experimentalmente e utilizados nas simulações dos experimentos bioreatores (PBB e QFix-B).	81
Tabela 5.1 – Ganhos do PID para o Caso B	96
Tabela 5.2 – Índices de desempenho dos cultivos para os estudos de caso avaliados. (Condições experimentais: $V= 4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, $OD_0=6$ ($C_{x0}=3$ g.L ⁻¹), viabilidade inicial =75% . Glicose, etanol e glicerol concentrações medidas no HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica. ^{a,b} $Y_{X/S}$; ^{c...e} $Y_{EtOH/S}$; ^{f...j} Pr_{EtOH} ; ^{k...m} $Y_{EtOH/X}$; ^{n...p} $Y_{EtOH/Glyc}$; ^{q,r} Viabilidade. Médias comparadas usando teste Tukey com 95% de nível de confiança, as mesmas letras sobrescritas significam que não há diferença estatística dentro do mesmo grupo de índice de desempenho	111
Tabela 6.1 - Valores de parâmetros de descrição e modelo.	119
Tabela 6.2 - Condições iniciais para a estimativa do parâmetro, validação, mapeamento de operabilidade e simulações de controlador.	123
Tabela 6.3 - Medidas de desempenho do ITAE (<i>Integrated Time Absolute Error</i>) para o BIO-CS e PI com e sem ruído. Os erros padrão são das triplicatas das simulações.134	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ART	Açúcares redutores totais	
b	<i>Bias</i> do neurônio	
cFP	Compact Fieldpoint	
C_S	Concentração de substrato	(g.L ⁻¹)
C_{S0}	Concentração inicial de substrato	(g.L ⁻¹)
C_x	Concentração <i>at-line</i> em massa seca de células	(g _{MS} .L ⁻¹)
C_e	Concentração de etanol	(g.L ⁻¹)
C_f	Fator de correção	
COD	Concentração <i>in-line</i> de oxigênio dissolvido	(% saturation)
BIO-CS	<i>Biologically inspired control strategy</i>	
EtOH	Etanol	
GSM	<i>Genome-scale metabolic model</i> (Modelo em escala Genômica)	
Glyc	Glicerol	
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiências, CLAE)	
HC-RQ	Cultivo com uma heurística de controle para controle de RQ	
J_{O₂}^{Exp}	Fluxo metabólico experimental de O ₂	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_{CO₂}^{Exp}	Fluxo metabólico experimental de CO ₂	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_{O₂}^{RNA}	Fluxo metabólico de O ₂ (Rede Neural)	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_{CO₂}^{RNA}	Fluxo metabólico de CO ₂ (Rede Neural)	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_{O₂}^{MM}	Fluxo metabólico de O ₂ (Modelo Metabólico)	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_{CO₂}^{MM}	Fluxo metabólico de CO ₂ (Modelo Metabólico)	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_S^{MM}	Fluxo metabólico de substrato (Modelo Metabólico)	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
J_{O₂}^{SP}	Setpoint do fluxo de O ₂	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
K_c	Ganho proporcional	
K_s	Constante de Monod	(g.L ⁻¹)
m_x	Massa seca de células	(g _M)
m_s	Constante de manutenção em relação ao substrato	(mmol.g _{MS} ⁻¹ .h ⁻¹)
mCO₂	dados de massa de CO ₂	(g)

FM-RNA	Estratégia de controle para fermentação micro-aerada com Redes Neurais incorporadas.	
FM-RNA-PI	Estratégia de controle para fermentação micro-aerada com Redes Neurais incorporadas e controlador PI como controle secundário	
$\dot{n}_{O_2}^e$	Vazão molar de O ₂ na entrada do biorreator	(mol.h ⁻¹)
$\dot{n}_{O_2}^s$	Vazão molar de O ₂ na saída do biorreator	(mol.h ⁻¹)
$\dot{n}_{CO_2}^e$	Vazão molar de CO ₂ na entrada do biorreator	(mol.h ⁻¹)
$\dot{n}_{CO_2}^s$	Vazão molar de CO ₂ na saída do biorreator	(mol.h ⁻¹)
OD	Densidade ótica <i>at-line</i>	
PBB	Cultivo tipo planta de bioetanol brasileiro	
pFBA	<i>parsimonious Flux Balance Analysis</i>	
PID-RQ	Cultivo com uso de PID para controle de RQ	
P_e	Pressão <i>on-line</i> de entrada	(atm)
Pr_{p,Etanol}	Produtividade volumétrica de etanol	(g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
P_s	Pressão de saída	(atm)
Pm	Constante de inibição de etanol	(g.L ⁻¹)
Q_{gas}^e	Vazão de gás de entrada	(L.min ⁻¹)
Q_{gas}^s	Vazão de gás de saída	(L.min ⁻¹)
Q_{AR}	Vazão de ar	(L.min ⁻¹)
Qfix-B	Cultivo com aeração baixa e constante	
Qfix-MB	Cultivo com aeração muito baixa e constante	
R	Constante universal dos gases	(atm.L.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
r_i	Velocidade de produção ou consumo de <i>i</i>	(mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)
r_{CO2}	Velocidade de produção de carbono	(mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)
r_{O2}	Velocidade de consumo de oxigênio	(mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)
RNA	Rede neural artificial	
RSE	<i>Residual Standard Error</i> (Erro residual)	
RQ	<i>Respiratory quotient</i> (Quociente respiratório)	
S	Substrato	
Sm	Constante de inibição de substrato	(g.L ⁻¹)
SUPERSYS_MCU	Sistema supervisorio: Unidade de controle metabólico	

t	Tempo	(h)
T_e	Temperatura de entrada	(K)
T_s	Temperatura <i>In-line</i> de saída	(K)
T_i	Ganho integral	(min)
T_d	Ganho derivativo	(min)
V	Volume	(L)
VHG	<i>Very High Gravity</i> (Alta concentração de glicose)	
vvm	<i>Vessel volumes per minute</i> (volume de ar por volume de meio, por minuto)	
vvh	<i>Vessel volumes per hour</i> (volume de ar por volume de meio, por hora)	
y_{CO₂}^e	Fração de entrada de CO ₂ estimada <i>on-line</i>	
y_{CO₂}^s	Fração de saída de CO ₂ estimada <i>on-line</i>	
y_{O₂,AR}	Fração de O ₂ no ar	
y_{O₂}^e	Fração de entrada de O ₂ estimada <i>on-line</i>	
y_{O₂}^s	Fração de saída de O ₂ estimada <i>on-line</i>	
ŷ	Estado ou valor predito	
y	Estado ou valor experimental	
Y_{i/S}	Rendimento do componente “i” por substrato consumido	(g _i ·g _{substrato} ⁻¹)
Y_{X/S}	Rendimento de células	(g _x ·g _{substrato} ⁻¹)
X_{exp}	Conversão experimental	(%)
X_(t)	Conversão no instante t	(%)
μ	Velocidade específica de crescimento	(h ⁻¹)
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento	(h ⁻¹)
Δt	Intervalo de tempo (Iteração do programa)	(h)
Δt_{lag}	Delay	(s)
ΔAr	Valor constante somado ou subtraído da vazão final de ar	(L·min ⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1	BIOCOMBUSTÍVEIS.....	26
3.2	LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	32
3.4	CONTROLE E INTENSIFICAÇÃO DE BIOPROCESSOS	34
3.5	BIOLOGIA DE SISTEMAS	35
3.6	OPERABILIDADE DE PROCESSOS	37
3.7	ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA BIOPROCESSOS	41
3.7.1	Sistemas clássicos de controle: controlador Proporcional Integral Derivativo (PID).....	41
3.7.2	Redes Neurais.....	42
3.7.2.1	Redes Neurais como <i>softsensors</i>	43
3.7.2.2	Redes Neurais como metamodelos.....	44
3.7.3	Lógica Nebulosa ou <i>Fuzzy</i>	45
3.7.4	Controle preditivo baseado em modelo	46
3.7.4.1	Algoritmos Biomiméticos	46
3.8	ESTRATÉGIAS DE CONTROLE APLICADAS AOS BIOPROCESSOS.....	49
3.9	MICRO-AERAÇÃO EM FERMENTAÇÕES	51
3.9.1	Estratégias de cultivo e de controle para manutenção da micro-aeração.....	53
4	UMA METODOLOGIA EXPERIMENTAL SIMPLES PARA CARACTERIZAR A CINÉTICA DOS MICRORGANISMOS HOMO FERMENTATIVOS APLICADA À FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR <i>S. cerevisiae</i>	59
4.1	INTRODUÇÃO.....	59
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.2.1	Microrganismos e meios de cultura	61
4.2.2	Preparação inóculo	61
4.2.3	Estratégia experimental	61
4.2.3.1	Experimentos com mini-reatores.....	62

4.2.3.2	Influência da concentração de glicose na velocidade específica de crescimento.....	62
4.2.3.3	Inibição pelo etanol	62
4.2.3.4	Influência do melão na velocidade específica de crescimento	63
4.2.3.5	Procedimentos de cálculo baseados na massa de CO ₂ liberados.....	63
4.2.4	Cultivos HG em biorreatores	66
4.2.5	Modelagem cinética e validação	66
4.2.6	Procedimentos analíticos.....	68
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.3.1	Influência da concentração de glicose.....	69
4.3.2	Tolerância ao etanol	72
4.3.3	Influência do melão.....	75
4.3.4	Confiabilidade da metodologia.....	76
4.3.5	Modelo cinético da velocidade específica de crescimento	77
4.3.6	Validação do Modelo	79
4.3.7	Extensão do modelo cinético.....	83
4.4	CONCLUSÃO.....	85
5	A APRENDIZAGEM DE MÁQUINA APLICADA AO CONTROLE DE BIORREACTORES ORIENTADO POR FLUXOS METABÓLICOS COMO ALTERNATIVA PARA FERMENTAÇÕES MICRO-AERADAS.	87
5.1	INTRODUÇÃO.....	87
5.2	METODOLOGIA	89
5.2.1	Estrutura de controle	89
5.2.2	Mapeando metabólico usando o modelo em escala genômica	92
5.2.3	Redes neurais artificiais	93
5.2.4	Lei de controle para manipulação da vazão de ar.....	94
5.2.5	Estudos de caso: Estratégias de micro-aeração	94
5.2.6	Micro-organismo e meio de cultura.....	97
5.2.7	Cultivo em biorreatores	97
5.2.8	Procedimentos analíticos.....	98
5.2.8.1	Concentração celular e viabilidade.....	98
5.2.8.2	Concentração de Açúcares e Metabólitos.....	98
5.2.9	Estimativa de fluxos metabólicos experimentais, produtividade, rendimentos, e velocidade específica de crescimento	98
5.3	RESULTADOS	99

5.3.1	Rede Neural Artificial	99
5.3.2	Estudos de caso	102
5.3.3	Caso A (HC-RQ) e Caso B (PID-RQ)	103
5.3.4	Caso C (Qfix-B), Caso D (Qfix-MB) e Caso E (PBB)	104
5.3.5	Casos F: FM-RNA e FM-RNA-PI	107
5.3.6	Desempenho das estratégias de fermentação	109
5.4	CONCLUSÃO	114
6	OPERABILIDADE E CONTROLE BIOMIMÉTICO DE UM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SOB MICRO-AERAÇÃO	115
6.1	INTRODUÇÃO	115
6.2	METODOLOGIA	117
6.2.1	Estudo de caso: fermentação micro-aerada	117
6.2.2	Modelo de crescimento em condições micro-aeradas	117
6.2.3	Operabilidade do processo	122
6.2.4	Implementação do BIO-CS	123
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
6.3.1	Validação modelo	126
6.3.2	Operabilidade do processo	128
6.3.3	BIO-CS: Resultados da implementação	131
6.3.3.1	BIO-CS <i>Tuning</i> (Caso I)	131
6.3.3.2	Ruídos de medição (Caso II), desvio do modelo do processo (Caso III) e rejeição de perturbação (Caso IV)	132
6.3.3.3	Comparação de Desempenho com controlador proporcional-integral (PI)	134
6.4	CONCLUSÃO	135
7	CONCLUSÃO GERAL	137
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	139
9	REFERÊNCIAS	140
10	APÊNDICE A	155
11	APÊNDICE B	159
12	APÊNDICE C	165

1 INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos para a produção de biocombustíveis, produtos farmacêuticos ou alimentícios requer a condução do bioprocesso sob o controle rigoroso de vários fatores. O fornecimento de nutrientes importantes, como o oxigênio, é fundamental para atender à alta demanda celular em cultivos aeróbios, por exemplo. Nestes casos, são utilizadas desde estratégias convencionais, envolvendo controladores PID (DIAZ *et al.* 1995), até aquelas mais avançadas e robustas, que usam redes neurais (METE *et al.*, 2012) e algoritmos geométricos (GOMES; MENAWAT, 2000).

Apesar da inegável relevância industrial dos cultivos aeróbios, outra classe de bioprocessos também merece atenção: a dos cultivos em condições microaeróbias ou sob limitação por oxigênio. A produção de 2-3 butanodiol por *Enterobacter aerogenes* (ZENG, *et al.*, 1994) ou de vacinas contra organismos patogênicos como *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* (MARTHOS *et al.*, 2015; VAN DE WATERBEEMD *et al.*, 2013) dependem da manutenção de condições microaeróbias para maximizar o rendimento em produto ou biomassa, respectivamente.

No caso do etanol de primeira geração, obtido principalmente pela fermentação do melão da cana usando como biocatalisador *S. cerevisiae* (AMORIM *et al.*, 2011; PACHECO, 2011) e do qual o Brasil é um dos maiores produtores mundiais, a micro-aeração favorece a preservação da viabilidade da cultura devido a regeneração eficiente dos cofatores, fundamental para a produtividade e estabilidade dos processos fermentativos contínuos (LÓPEZ-ABELAIRAS *et al.*, 2013; ALFENORE *et al.*, 2004).

Nesta tese, atenção especial é dada à influência do fornecimento de oxigênio sobre a produção e a produtividade em etanol em consequência do papel desempenhado pelo oxigênio no metabolismo de leveduras. Porém, não é trivial manter o fornecimento de O₂ em condições microaeróbias durante uma fermentação, e há poucos estudos que abordam essa questão. A abordagem do problema sob a ótica do controle convencional, *feedback*, baseia-se na medida da concentração de oxigênio dissolvido (COD -da ordem de ppm) por sensores altamente sensíveis, que são caros e de curta durabilidade (CARIUS *et al.*, 2014). De acordo com ZENG e DECKWER (1996), as estratégias convencionais não são adequadas para o controle do fornecimento de O₂ em condições limitadas (COD abaixo de 1,5% da saturação).

A concepção do presente trabalho se baseia na aplicação de estratégias avançadas de controle de bioprocessos em sincronia com o campo da Biologia de Sistemas (NANDIKOLLA

et al., 2011). Com a disseminação de modelos metabólicos reconstruídos em escala genômica (Genome-Scale Metabolic Models - GSMs), é possível, *a priori*, simular *in silico* o metabolismo de um organismo, identificando a faixa de fluxos que favorece a formação do produto de interesse (AGREN; OTERO; NIELSEN, 2013; BIDEAUX *et al.*, 2016; HJERSTED; HENSON; MAHADEVAN, 2007; MESQUITA *et al.*, 2019) ou ainda minimizar a produção de algum metabólito indesejado (GUDMUNDSSON; NOGALES, 2015; BRO *et al.*, 2006), em diferentes condições de crescimento. De maneira geral, os GSMs são uma compilação das informações do metabolismo de um organismo extraídas a partir do genoma e complementadas com dados experimentais. A aplicação dos modelos em escala genômica (modelos estequiométricos) aos processos transientes é feita admitindo que a hipótese de estado pseudo-estacionário é implícita. Ou seja, devido à dinâmica lenta de crescimento das leveduras em condições de micro-aeração é possível uma reestimativa frequente dos fluxos durante as fermentações que serão usadas pelo algoritmo de controle, por exemplo.

Essa abordagem conjunta foi inicialmente explorado no mestrado de Mesquita (2017). Nessa primeira abordagem, avaliou-se o uso de modelos substitutos na forma de correlações matemáticas para representar o modelo em escala genômica. Esses modelos substitutos foram usados para compor as leis de controle. Foram avaliadas principalmente duas estratégias de controle em cultivos batelada alimentada: uma estratégia usando conceitos de controle malha aberta e outra baseada em conceitos de controle malha fechada, cujo objetivo do controlador foi manter o quociente respiratório dentro da faixa desejada manipulando a composição da fase gasosa fornecida ao biorreator. Os resultados indicaram um aumento no rendimento ($0,46 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) e na produtividade em etanol ($6,0 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) quando comparado aos cultivos plenamente anaeróbios. Portanto, essa estratégia se mostrou como uma boa aproximação para o uso dos modelos em escala genômica.

Portanto, a continuação do desenvolvimento da estratégia de controle baseada em fluxos metabólicos deste Doutorado é uma evolução do trabalho iniciado no Mestrado. O sistema de controle foi aprimorado, incorporando modificações na lógica, no *hardware* e no *software*, para fermentações em batelada com concentração moderada da fonte de carbono (High Gravity- HG). Desta forma, reproduziu-se nos estudos a demanda metabólica real das células observada nas fermentações industriais, inclusive em condições desfavoráveis, caracterizadas pela elevada concentração de etanol. Neste contexto, a presente tese se insere no projeto temático FAPESP “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas”, Processo 2016/10636-8.

O texto está organizado em 9 capítulos. O capítulo 1 se refere a essa introdução geral à Tese, seguido do capítulo 2, o qual se refere aos objetivos a serem alcançados por este trabalho. O capítulo 3 envolve uma revisão da literatura para contextualização do trabalho e referencial teórico. Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento do projeto de pesquisa estão distribuídos nos capítulos 4, 5 e 6. Estes capítulos foram estruturados na forma de artigo científico, apresentando introdução, metodologia e conclusão. O capítulo 4 se refere à caracterização das cepas de leveduras para identificação da cinética das e modelagem do perfil de crescimento em biorreator, sendo baseado em publicação fruto desta Tese na *Industrial Biotechnology* (MESQUITA et al., 2021a). No capítulo 5, são apresentados os resultados da estrutura de controle para micro-aeração em biorreatores baseado em redes neurais. Esse conteúdo também foi baseado em trabalho recentemente publicado na revista *Biotechnology and Bioengineering* (MESQUITA et al., 2021b). No capítulo 6, são apresentados os resultados do controlador (SuperSys_UCM), desenvolvido em parceria com o grupo CODES (Control, Optimization and Design of Energy Systems) no West Virginia University, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando V. Lima, durante a realização de Doutorado sanduiche. O capítulo 7 expõe a conclusão geral da Tese e o capítulo 8 aborda algumas possibilidades de continuidade do projeto de pesquisa. No capítulo 9 estão descritas todas as referências usadas nessa Tese.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um sistema de controle capaz de manter o fluxo de O₂ fornecido ao biorreator dentro da faixa de variação desejada através da manipulação vazão e composição da fase gasosa, aprimorando o desempenho de fermentações em condições microaeróbias.

Em termos de objetivos específicos, destacam-se:

- Caracterizar cepas industriais para aplicação nas fermentações em biorreator;
- Aplicar conhecimentos de Biologia de Sistemas e operabilidade do processo para definir a faixa de fluxos de oxigênio e de substrato que favorecem os fluxos em etanol como reposta, aprofundando o entendimento sobre o metabolismo de *S. cerevisiae*;
- Analisar, modelar e validar o crescimento da levedura em condições fermentativas e de micro-aeração;
- Aprimorar o sistema de monitoramento introduzindo estruturas avançadas de controle, como os algoritmos biomiméticos, e uso do *deep learning*, com as redes neurais;
- Avaliar os desempenhos dos cultivos conduzidos sob as novas estratégias de controle em termos de produtividade em etanol usando cepa de levedura industrial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

A crise climática tem estimulado a busca por fontes alternativas de energia. Dentre as opções, os biocombustíveis são uma das alternativas mais estudadas. Todas as substâncias cuja obtenção de energia se dá pela fixação biológica podem ser denominadas de biocombustíveis. Ou seja, a fonte energética é produzida por um ser vivo ou é um resíduo decorrente do metabolismo (LEE; LAVOIE, 2013; SCHOBERT, 2013). De acordo com a origem e as características da matéria-prima, os biocombustíveis são subdivididos, principalmente, em quatro gerações:

- (i) primeira geração: produzido diretamente a partir dos açúcares presentes em cultivares agrícolas (e.x.: caldo de cana-de-açúcar ou xarope de beterraba) (SCHOBERT, 2013);
- (ii) segunda geração: produzido principalmente a partir de material lignocelulósico (e.x.: bagaço de cana-de-açúcar ou palha de milho) (SCHOBERT, 2013);
- (iii) terceira geração: usa microrganismos como matéria-prima (e.x.: micro-algas) (SALADINI *et al.*, 2016);
- (iv) quarta geração: modifica geneticamente os microrganismos da geração anterior para obter um rendimento preferível de hidrogênio em relação ao carbono (HC), além de criar um sumidouro artificial de carbono para eliminar ou minimizar as emissões de carbono (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

A produção do etanol tem sido a de maior expansão e de geração de emprego no cenário dos biocombustíveis. O etanol tem baixo teor de impurezas quando comparado à gasolina, e o processo de fermentação alcoólica já está bem consolidado. Logo, o etanol representa uma oportunidade de diminuir a dependência energética de fontes fósseis (FAIRLEY, 2011; FARRELL *et al.*, 2006).

No Brasil, o uso da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) para obtenção de etanol é o mais comum. É uma espécie vegetal com a capacidade de produção simultânea de alimentos e energia; e apresenta um balanço de carbono é baixo, ou seja, mantendo nas proporções a emissão e captação. (JAMES, 2007). A partir do caldo rico em açúcares é feita a conversão biológica para álcool de primeira geração ou simples obtenção de açúcar para consumo. A produção de biocombustíveis a partir do bagaço é feita em três etapas principais: pré-tratamento

do resíduo da etapa anterior, sacarificação dos polissacarídeos e fermentação dos açúcares pelos microrganismos. A otimização dessas etapas ainda tem sido fonte para diversos estudos e investimentos na busca da excelência do processo (TALEBNIA, 2015).

3.2 LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentação alcoólica é uma das etapas cruciais. Ela caracteriza um processo biológico, o qual precisa ter as condições operacionais plenamente estabelecidas. Uma delas é a definição do microrganismo a ser utilizado. O microrganismo ideal precisa ser capaz preencher uma série de características consideradas essenciais ao processo, tornando-se um biocatalisador eficiente (Tabela 3.1). Entre os microrganismos existentes e capazes de realizar a fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a que preenche a maior parte dos requisitos sugeridos (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

Tabela 3.1– Características necessárias para que um microrganismo seja indicado para fermentação alcoólica.

Características essenciais	Características desejadas
Ampla utilização de tipos de substratos	Uso simultâneo de açúcares
Boa produtividade de etanol	Hidrólise de celulose e hemicelulose
Mínima formação de subprodutos	Status de “ <i>Generally regarded as safe</i> ” (Seguro a saúde humana)
Alta tolerância ao etanol	Reutilizável
Tolerância a outros possíveis inibidores	Suplementação mínima de nutrientes
Tolerância ao processo	Tolerância a pH baixos e altas temperaturas

Fonte: Adaptado de Zaldivar, Nielsen e Olsson (2001)

As leveduras têm sido utilizadas pela humanidade de maneira direta e indireta por muito tempo. O principal exemplo dessa interação é a produção e o consumo de bebidas alcoólicas por várias civilizações ao longo da história. É um dos microrganismos mais estudados, tendo seu genoma completamente sequenciado. Ela é capaz gerar adenosina

trifosfato (ATP) que precisa para o próprio desenvolvimento na presença de oxigênio (aeróbico) ou na ausência dele (anaeróbico). Logo a quantidade de oxigênio disponível e o tipo de substrato empregado irá definir se o metabolismo será completamente aeróbico e oxidativo ou fermentativo (KUNZE; MANGER; PRATT, 2014; PIRES; BRÁNYIK, 2015; TENGE, 2009).

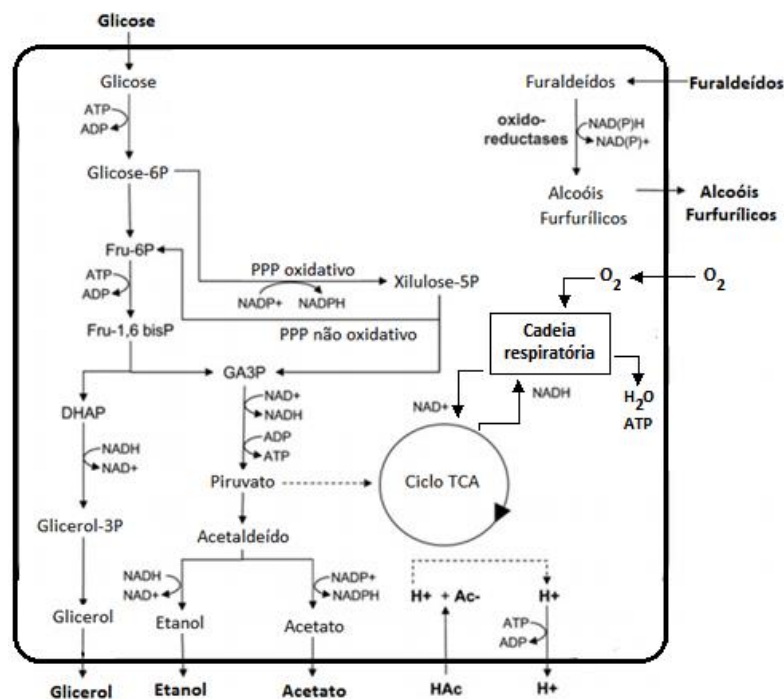
Em termos de fonte de carbono, o uso de hexoses pelas leveduras já é um fato consolidado. Porém, para pentoses, como o caso da xilose, é preciso contornar a baixa velocidade de assimilação dessa fonte de carbono. O uso integral dos açúcares disponíveis no substrato lignocelulósico para a produção de etanol é considerado um requisito essencial por viabilizar o aproveitamento da fração hemicelulósica presente nos resíduos agroindustriais (SIMS *et al.*, 2010).

No caso da *S. cerevisiae*, apesar de apresentar genes que permitam que o microrganismo consuma a pentose, eles não têm expressão significativa. Além disso, durante o metabolismo do açúcar ocorre um desequilíbrio na produção e consumo de NADH/ NAD⁺, propiciando o acúmulo do intermediário xilitol e diminuindo a quantidade de etanol obtido em condições anaeróbicas (WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015). E apesar da levedura ser capaz de assimilar o isômero da xilose denominado de D-xilulose, outro problema encontrado é a baixa eficiência da Via Pentose Fosfato (PPP) e equilíbrio do NADP⁺/NAPDH (MISKOVIC *et al.*, 2017; WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015). Ou seja, durante o metabolismo em condições anaeróbicas, ocorre um acúmulo de NADP⁺, pois o NAPDH é preferencialmente utilizado como cofator pela xilose redutase (XR, conversão de xilose em xilitol), e um acúmulo de NADH, pois somente o NAD⁺ é usado como cofator pela xilitol desidrogenase (XDH, conversão de xilitol em D-xilulose). O NADPH é regenerado pela PPP, cuja enzima marca-passo é a glicose 6P-desidrogenase. Porém, só uma pequena quantidade de NAD⁺ é regenerada para a reação da XDH. Como consequência da escassez do cofator NAD⁺, o xilitol é acumulado (MISKOVIC *et al.*, 2017; NISSEN *et al.*, 2001; WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015)

Três estratégias principais têm sido adotadas para melhorar a assimilação da pentose: (i) inserção de genes bacterianos que expressem a xilose isomerase de maneira significativa (TEMER *et al.*, 2017), (ii) inserção de genes que auxiliem na utilização eficiente da pentose e suas vias metabólicas (DEMEKE *et al.*, 2013a, 2013b), (iii) melhorias no controle do processo para aumento no consumo de xilulose (GOLDEMBERG, 2011; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Essas estratégias reduzem direta ou indiretamente grande parte da dependência do equilíbrio redox.

A manutenção do equilíbrio redox é um ponto chave para a rede metabólica. Ele garante o funcionamento adequado das vias de interesse (LIU *et al.*, 2016) e diminui os riscos de estresse oxidativo (BURPHAN *et al.*, 2018). A quantidade de difosfopiridina nucleotídeo oxidado (NAD^+) presente nas células é finita, e as reações de oxidação dos carboidratos geram difosfopiridina nucleotídeo reduzidas (NADH). Portanto é necessário o equilíbrio da relação NADH/NAD^+ que permite o funcionamento das vias glicolíticas. As células devem manter o suprimento de NAD^+ por intermédio de rotas metabólicas, as quais podem levar ao acúmulo de certos compostos, como citado anteriormente. Quando a célula está em estado plenamente aeróbio, NADH é reoxidado pela cadeia de transporte de elétrons que leva à fosforilação oxidativa. O último aceptor de elétrons é o oxigênio e, posteriormente, a água é formada. Em um processo fermentativo, as vias oxidativas se tornam inativas, portanto a produção de ATP e a recuperação de NAD^+ ocorrem mediante a redução do acetaldeído em etanol, produção de polióis (ex.: glicerol, arabitol, xilitol e ribitol) e ácidos orgânicos (ex.: piruvato, fumarato e succinato) (KUNZE; MANGER; PRATT, 2014; PIRES; BRÁNYIK, 2015; TENGE, 2009) (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Principais vias metabólicas associadas ao consumo de glicose



Fonte: Adaptado de ALMEIDA *et al.* (2011)

Portanto, o oxigênio como substrato induz a expressão gênica e regulação do metabolismo. Ou seja, ele influencia na distribuição do fluxo de carbono pela célula e conseqüentemente na sua viabilidade. Quando a levedura é exposta a um excesso de oxigênio ocorre o efeito Pasteur, o processo fermentativo é inibido e a produção de biomassa aumenta, já que se torna mais vantajoso produzir energia pela fosforilação oxidativa. Outro fenômeno interessante que ocorre com as leveduras é o chamado efeito de Crabtree, quando em presença de uma alta concentração de glicose mesmo em condições aeróbicas, o metabolismo da célula é direcionado para fermentação e produção de álcool, conseqüentemente diminuindo o consumo de oxigênio e reduzindo o fluxo de carbono para o ciclo TCA (KUNZE; MANGER; PRATT, 2014; PIRES; BRÁNYIK, 2015; TENGE, 2009) (Figura 3.1).

A necessidade metabólica pelo oxigênio varia geneticamente entre as células. Para ilustrar, a quantidade assimilada desse nutriente está ligada à produção e ao consumo de esteróis e ácidos graxos. Eles podem ser assimilados do meio ou sintetizados a partir de carboidratos, porém é preciso a presença de oxigênio para formação desses compostos no último caso (BRIGGS *et al.*, 2004). Os esteróis e ácidos graxos são usados na composição da membrana celular. Sem a suplementação de esteróides e ácidos graxos, quando em plena anaerobiose, as leveduras não apresentam um bom desenvolvimento (FORNAIRON-BONNEFOND *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2006). Outro exemplo é a resposta genética da levedura em relação ao oxigênio. O genoma da levedura é sensível aos níveis de oxigênio presentes, e somado ao estado metabólico da célula, influenciam a ativação dos genes. Se a condição ambiental se aproxima da restrição de oxigênio, um número maior de genes são ativados e são distintos daqueles ativados em comparação ao transcriptoma alterado pela aerobiose (LAI *et al.*, 2006).

De acordo com Verbelen *et al.* (2009), quando em alta densidade celular, a expressão de um grupo determinado de genes no início do processo de fermentação determina o curso do processo. A realização de uma etapa de preoxigenação é capaz de imbuir às células uma resposta ao estresse, tornando-as robustas. Entre os genes mais ativos estão SDO1 e CTT1, ambos associados ao estresse oxidativo. O SDO1 codifica a enzima superóxido dismutase, que catalisa a conversão do ânion superóxido para oxigênio e peróxido de hidrogênio. O CTT1 codifica a catalase citosólica, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (HERRERO *et al.*, 2008). A expressão de ambos os genes é máxima nos primeiros instantes do cultivo quando os níveis de oxigenação são altos. Já em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, a expressão dos genes permanece baixa.

Outro exemplo da influência do oxigênio na expressão gênica é em relação ao gene OLE1. Ele é encarregado de expressar a enzima ácido graxo dessaturase, a qual é dependente

de oxigênio e apresenta maior expressão em condições de limitação de oxigênio. De modo semelhante, o gene ATF1 também apresenta superexpressão quando há baixa disponibilidade de oxigênio. O ATF1 é responsável pela síntese de álcool acetil transferases (enzimas responsáveis pelo equilíbrio de ésteres na célula). O mecanismo de regulação do OLE1 e de transcrição do ATF1 apresenta caráter hipóxico. Ou seja, esses dois genes que estão ligados à produção de ácidos graxos tem sua maior expressão em condições de baixa aeração (VERBELEN *et al.*, 2009).

Assim, as variações de respostas são resultantes de todas as interações complexas dos diferentes fenótipos, estímulos ambientais e etapas de adaptação das cepas. Diante disso, as cepas industriais geralmente são selecionadas de uma população natural com características desejáveis à aplicação industrial e posteriormente otimizadas (QIU *et al.*, 2019; UEBAYASHI; SHIMIZU; MATSUDA, 2018). Em geral, a levedura de panificação é empregada como insumo no início dos processos fermentativos industriais, e variantes apresentando fenótipos interessantes pode ser selecionadas para uso posterior (BASSO *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm investido no isolamento de cepas personalizadas, tanto de leveduras do gênero *Saccharomyces* como outras leveduras, ou ainda no melhoramento de cepas já usadas em processos industriais. Este é o caso da cepa *Ethanol Red*, uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* muito utilizada no contexto europeu (SMUGA-KOGUT *et al.*, 2019; WALLACE-SALINAS; GORWA-GRAUSLUND, 2013). Apesar do uso já consolidado da *Ethanol Red*, há um esforço em explorar a diversidade natural das leveduras para cepas com melhor produtividade em condições de estresse industrial (RUYTERS *et al.*, 2015; SANDOVAL-NUÑEZ *et al.*, 2018).

O estudo comparativo e uso de cariotipagem para identificação de características desejadas são empregados para selecionar cepas mais adaptadas ao ambiente (UEBAYASHI; SHIMIZU; MATSUDA, 2018). Através dessas técnicas a literatura relata que cepas voltadas à produção de saquê (Kyokai7 e Kyokai9) apresentam melhor produtividade de etanol em meios mínimos, definidos e complexos. Já as cepas voltadas à produção de vinho (QA23 e EC1118) têm uma regulação positiva do ciclo do ácido cítrico em condições de fermentação e baixo desempenho em meio mínimos. Cada cepa estudada apresenta características únicas para aplicações distintas (UEBAYASHI; SHIMIZU; MATSUDA, 2018).

No Brasil, as cepas precisam suportar condições de reutilização de células, que irão resultar em altas densidades celulares e em tempos curtos de fermentação. As plantas de produção de bioetanol brasileiras operam usando principalmente as cepas PE-2, BG-1 e CAT-1, que foram isoladas diretamente em processos industriais e identificadas usando técnicas de

DNA mitocondrial e cariotipagem. O uso dessas cepas permite redução de perdas e do risco de contaminação (BASSO *et al.*, 2008; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Portanto, em termos de processo, é preciso caracterizar de maneira eficaz as cepas utilizadas, com intuito de garantir boas práticas de cultivo de forma a manter a viabilidade celular e controlar os níveis de contaminação, além é claro de favorecer a formação do produto de interesse.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Devido a diversos fatores, o uso contínuo do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* permitiu adaptar as leveduras às condições industriais e gerar cepas qualificadas ao ambiente das biorrefinarias (BASSO *et al.*, 2008; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; LOPES *et al.*, 2017). No entanto, essas cepas adaptadas ainda precisam ser caracterizadas em relação à cinética de crescimento em diferentes condições de cultivo, de forma que a estirpe mais adequada para uma determinada condição de fermentação seja selecionada racionalmente.

A produção de etanol pode ser realizada utilizando processos com alta concentração de substrato e/ou produtos, o que pode acabar induzindo diversos estresses (CRAY *et al.*, 2015). Por exemplo, o estresse induzido pela pressão osmótica pode causar desnaturação de proteínas, fluidização das bicamadas lipídicas, acidificação intracelular e formação de subprodutos que inibem a absorção de nutriente e produção do biocombustível. Da mesma forma, o acúmulo do etanol desempenha um papel importante na velocidade de fermentação (ARANDA; DEL OLMO, 2003; CRAY *et al.*, 2015). Esses distúrbios no metabolismo celular podem levar a alterações na cinética de crescimento (BENBADIS *et al.*, 2009; CRAY *et al.*, 2015).

Além da influência dos substratos e produtos presentes no meio, a qualidade da matéria-prima também pode afetar a cinética de fermentação. Por exemplo, a qualidade do melão e do caldo de cana-de-açúcar pode ser afetada pela presença de compostos inibitórios, provenientes de outras etapas de preparação da matéria-prima (RIVERA *et al.*, 2007, 2017). Esses fatores reforçam a importância do desenvolvimento de modelos para mapear as respostas das cepas nos cultivos, permitindo otimizar as configurações e condições de cultivos em grande escala (ANDRADE *et al.*, 2013). A resposta do microrganismo frente às condições estressantes é extremamente valiosa para a intensificação dos processos industriais. Assim, é importante que os dados experimentais em escala de laboratório, bem como os modelos matemáticos derivados deles, sejam capazes de reproduzir o comportamento do biocatalisador no maior número de condições possíveis (WOODLEY, 2017).

Portanto, a disponibilidade de metodologias capazes de replicar as condições industriais em laboratório é um fator importante para melhorar os processos em larga escala. Um processo fácil de monitorar pode facilitar a aquisição e avaliação de dados experimentais, especialmente quando vários experimentos são necessários. Os biorreatores de tanque agitado são sistemas confiáveis para a realização de estudos de fermentação (CARDOSO *et al.*, 2020). No entanto, a avaliação de diversas condições de cultivo usando biorreatores em escala de bancada exige tempo, esforço e suprimentos, além do custo do equipamento e instrumentação (CARDOSO *et al.*, 2020). Por outro lado, o monitoramento da fermentação por medição da massa de CO₂ liberada (MILESSI *et al.*, 2020c) é uma estratégia promissora que permanece pouco explorada.

Essa metodologia permite a extração rápida e eficiente de dados cinéticos, sem exigir grandes volumes de amostras e sem perturbar a condição anaeróbica. Empregando algumas equações estequiométricas, os dados de CO₂ podem ser usados para estimativa direta da conversão de açúcar, produção de etanol e velocidade de crescimento. Essas informações podem ser prontamente utilizadas para caracterização de processos em relação ao rendimento, ao crescimento, e a cinética de inibição. Além disso, essa metodologia pode ser empregada para fins de seleção das condições de cultivo mais adequadas (por exemplo: temperatura, pH e composição de meio de cultivo), comparação de diferentes cepas de leveduras recombinantes ou selvagens, e escalonamento do processo. A análise cinética permite a avaliação do crescimento do microrganismo na presença de fontes de carbono não habituais (MUSSATTO; ROBERTO, 2004), durante etapas de evolução adaptativa (OCHOA-ESTOPIER *et al.*, 2011) e também pode fornecer *insights* sobre mecanismos regulatórios (SHOEMAKER; GREEN, 2011). Devido ao papel significativo do etanol no desempenho da fermentação (ORTIZ-MUÑIZ *et al.*, 2010), esforços consideráveis foram feitos para identificar modelos de crescimento capazes de descrever os efeitos inibitórios desse álcool sobre as cepas de leveduras industriais e as condições de produção (LEMOS *et al.*, 2018; SONEGO *et al.*, 2018).

Alguns modelos mais complexos procuram descrever o fenômeno Crabtree em *S. cerevisiae* ao dividir a velocidade de consumo de substrato em consumo de substrato pela via redutiva (produção de etanol) e consumo de substrato pela via oxidativa (produção de biomassa) (SONNLEITNER; KÄPPELI, 1986). Dessa forma é possível representar uma condição de crescimento respiro-fermentativo que ocorre devido uma limitação ou gargalo no fluxo metabólico de substrato que a levedura era capaz de consumir. Ou seja, ao atingir um limiar superior de fluxo de substrato parte desse fluxo é desviado para via redutiva, o que representaria uma condição com ampla disponibilidade da fonte de carbono (DEWASME; WOUWER, 2008;

SCHEIBLAUER et al., 2018; SONNLEITNER; KÄPPELI, 1986; VALENTINOTTI et al., 2003). A mesma abordagem de modelagem para crescimento respiro-fermentativo foi estendida para descrever a dinâmica de crescimento de *E. coli* em condição de metabolismo *overflow* (DEWASME et al., 2011).

A elucidação da cinética de crescimento das cepas permite o desenvolvimento de modelos matemáticos que podem ser usados na formulação de estratégias de controle e na otimização do processo. É possível traçar uma estrutura de controle capaz de suprir as necessidades metabólicas em uma região onde a formação do produto seja a maior possível com o mínimo de comprometimento do metabolismo.

3.4 CONTROLE E INTENSIFICAÇÃO DE BIOPROCESSOS

Ao se propor melhorias de desempenho de um processo é preciso que a proposta corresponda com os critérios técnicos, econômicos e ambientais. O uso de um modelo matemático auxilia na definição dos objetivos, seja de controle ou de otimização. Esse modelo se torna, então, um aspecto crucial, pois ele precisa validar o fenômeno a ser descrito (CARDONA; SANCHEZ; GUTIERREZ, 2010; LIN; TANAKA, 2006).

Para os processos bioquímicos, a otimização e o controle de variáveis precisam englobar boa parte de toda a informação disponível do bioprocessos. Essa informação é proveniente dos fenômenos de transporte presentes, das reações bioquímicas complexas e até mesmo dos mecanismos celulares regulatórios. Esse cenário é dinâmico, por exemplo, em paralelo ao crescimento celular estão ocorrendo outras reações catalisadas por enzimas, tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Esse dinamismo pode acarretar uma carga maior de ruídos e comportamentos distantes dos cenários ideais. Eventuais alterações genéticas e alterações metabólicas acrescentam um desafio adicional na validação de modelos e criação de estruturas de controle (BOUDREAU; MCMILLAN, 2007; SONNLEITNER, 2012).

A mesma estratégia de controle e monitoramento on-line usada em um bioprocessos pode ou não ser aplicada com êxito em outro. Nem sempre os parâmetros de um controlador usado no cultivo de um microrganismo A podem ser usados no cultivo de um microrganismo B. Além disso, ao se aproximar do limite de detecção dos sensores a tarefa de aferir alguns parâmetros fisiológicos se torna mais complicada. Uma forma de contornar esses obstáculos e generalizar o problema é realizar um controle inferencial do processo, cuja ação de controle depende de medidas secundárias, ou seja, medidas de variáveis que permitam a inferência do estado da variável controlada. Usualmente, variáveis como temperatura e pH são medidas, pois

sensores com sensibilidade e capacidade de aferição das variáveis bioquímicas (composição celular, enzimas, proteínas, entre outros) são de alto custo de investimento e de manutenção, e uso limitado a escala laboratorial (BOUDREAU; MCMILLAN, 2007; STANKE; HITZMANN, 2013).

Logo, a complexidade do sistema de controle será consequência dos objetivos do controle e de quão bem definido é o processo (DOCHAIN, 2010; NICOLETTI *et al.*, 2013). Dentro desse contexto, a Biologia de Sistemas surge como um campo capaz de fornecer uma variedade de dados que ajudam na construção do conhecimento acerca do bioprocessos, e na perícia em desenvolver estratégias consistentes de cultivo/controle. Através do uso de ferramentas de bioinformática é possível prever o comportamento das células em diferentes condições ambientais, considerando as características do genótipo e fenótipo (NANDIKOLLA *et al.*, 2011).

Como já citado, é necessário primeiro entender as regiões viáveis de operação, ou seja, é necessário saber se com um determinado conjunto de variáveis que serão manipuladas pode atingir a meta desejada (por exemplo, produtividade ou concentração) (GAZZANEO *et al.*, 2020). A operabilidade do sistema é uma abordagem interessante para entender melhor o processo antecipadamente e promover sua intensificação (TIAN *et al.*, 2018). A análise de operabilidade também deve ser usada em bioprocessos, pois permite que biorrefinarias obtenham altos rendimentos de produtos e custo-benefício otimizado (SVENSSON; ERIKSSON; WIK, 2015).

3.5 BIOLOGIA DE SISTEMAS

Uma característica interessante da Biologia de Sistemas é ser um campo multidisciplinar do conhecimento. O uso conjunto da biologia, matemática, física, bioquímica, biologia molecular e ciência da computação é um dos pilares principais da Biologia de Sistemas. Dentro dessa área do conhecimento, as “ômicas” são as responsáveis por identificar, caracterizar e quantificar as moléculas biológicas em diferentes níveis, por exemplo, pela expressão genética (Genômica), função das proteínas (Proteômica) e reações químicas envolvendo metabólitos (Metabolômica) (KIM *et al.*, 2012). Contudo, muitas dessas informações não são quantitativas, e mesmo quando podem ser quantificadas, nem sempre é possível estabelecer a relação com mudanças no fenótipo ao longo das etapas de regulação (WINTER; KRÖMER, 2013). Por isso é importante que haja integração entre esses diferentes níveis de informação.

Para a visualização dessa integração e da rede de reações se recorre à análise de fluxos metabólicos (Fluxômica). Esses fluxos são os resultados de toda a expressão gênica, concentração de metabólitos e regulação do indivíduo (inclusive as considerações termodinâmicas) (CASCANTE; MARIN, 2008). Através dessa análise de fluxos, avalia-se a distribuição dos metabólitos por várias vias de reação. Essa camada adicional possibilita caracterização mais adequada de qualquer resposta e efetiva interconexão com outras “ômicas” (WINTER; KRÖMER, 2013).

Dessa forma se obtém uma visão holística dos diferentes sistemas biológicos e das diversas interações inerentes de cada um (NANDIKOLLA *et al.*, 2011). Essa resposta é possível graças à associação de dados experimentais e da literatura, tanto no processamento dos dados quanto na modelagem (CVIJOVIC; BORDEL; NIELSEN, 2011). Essa característica tem sido explorada para a criação de fábricas celulares com intuito de produzir diversos derivados químicos e combustíveis (DUNLOP *et al.*, 2014; ZHANG; RODRIGUEZ; KEASLING, 2011), além de produtos farmacêuticos (ANGERMAYR; PASZOTA; HELLINGWERF, 2012) e ingredientes alimentícios (KHODAYARI; CHOWDHURY; MARANAS, 2015).

Todo o conhecimento obtido nesses diversos níveis é integrado, compilado e complementado com dados experimentais para reconstrução dos modelos metabólicos em escala genômica (Genome Scale Metabolic Models-GSMM) (FRANCKE; SIEZEN; TEUSINK, 2005). A união dos GSMMs, de métodos de otimização, como FBA (*Flux Balance Analysis* -Análise do Balanço de Fluxos) que assumem um balanço de fluxos para o conjunto de reações metabólicas, e de uma função objetivo permitem simular ou otimizar uma célula *in silico* em softwares dedicados, como o Optflux (ROCHA *et al.*, 2010).

Os modelos metabólicos geram um perfil completo da rede celular, a partir do qual a visualização das condições ambientais ótimas é elucidada, tanto para maximização de um produto ou minimização de um metabólito não desejado. Por conseguinte, essas informações podem ser transformadas em estratégias adequadas de controle do processo (GARCIA-ALBORNOZ; NIELSEN, 2013; LEE *et al.*, 2011).

S. cerevisiae e *E. coli* são os microrganismos mais bem caracterizados e apresentam diversos modelos metabólicos já publicados. No caso da levedura, alguns exemplos são: *iFF708* (FORSTER *et al.*, 2003), *iN750* (DUARTE; HERRGÅRD; PALSSON, 2004), *Yeast 1.0* (HERRGÅRD *et al.*, 2008), *iMM904* (MO; PALSSON; HERRGARD, 2009), *Yeast 4.0* (DOBSON *et al.*, 2010). Cada modelo representa uma melhoria em relação ao anterior pelo aumento da quantidade de informações que são acrescentadas, e apresentam diferentes números de genes, reações (abrangência do modelo) e compartimentalização das estruturas

(ÖSTERLUND, NOOKAEW e NIELSEN, 2011). Essas características podem ser exploradas de diferentes formas dependendo da complexidade do estudo.

O modelo *iFF708* foi usado no trabalho de Bro *et al.* (2006) para traçar estratégias racionais de cultivo a fim de melhorar a produção de etanol associada à redução do glicerol. A abordagem de engenharia metabólica com melhor resultado favoreceu o aumento da concentração final de etanol em 3%, enquanto o principal ganho foi a redução de 40% do glicerol ao final do experimento. O uso de xilose e glicose permitiu o aumento de 25 % na produção de etanol em outra modificação genética feita na levedura.

Hjersted, Henson e Mahadevan (2007) usaram as informações obtidas do modelo *iND750* como base para avaliar diferentes abordagens de engenharia metabólica. O intuito foi incrementar a produção de etanol em um processo batelada alimentada usando glicose e uma mistura glicose/xilose. Uma determinada inserção de genes promoveu um ganho de 5,25 % em comparação com a cepa selvagem em cultivos com glicose. Porém, quando submetidas às condições microaeróbicas, a estirpe selvagem teve um aumento de produtividade de 3%. Analisando as mesmas condições de aeração, porém com a mistura glicose/xilose, o cultivo com a levedura geneticamente modificada submetida à anaerobiose incrementou o rendimento de etanol em 12 %.

Outro uso do modelo *iFF708* foi demonstrado no trabalho de Agren, Otero, Nielsen (2013). O objetivo foi aumentar a produção de ácido succínico por *S. cerevisiae* através de mutações genéticas. A avaliação foi feita em modo batelada plenamente aerado e sob anaerobiose, tendo glicose como fonte de carbono. A condição de anaerobiose favoreceu uma estirpe com deleção de um gene específico ($Y_{SUC/S} = 0,02 \text{ C-mol}_{\text{Succinato}} \cdot \text{C-mol}_{\text{Glicose}}^{-1}$).

3.6 OPERABILIDADE DE PROCESSOS

A análise de operabilidade ou pesquisa operacional de um processo é uma ferramenta aplicada para geração de sistemas modulares e intensificados, principalmente os relacionados à energia, como o projeto de reatores de membrana polimérica (BISHOP; LIMA, 2020; CARRASCO; LIMA, 2017) ou para estabelecer condições operacionais dos trocadores de calor (TIAN; PISTIKOPOULOS, 2019a). É possível integrar os passos referentes aos processos e à seleção de estratégias de controle ainda nos estágios iniciais de planejamento (GAZZANEO *et al.*, 2020). A análise da operabilidade de um processo apresenta capacidade de quantificar incertezas operacionais, distúrbios e restrições visando operar o processo de forma otimizada e viável. Essa abordagem minimiza as condições não viáveis ao controle ou regiões em que o

controlador não seja capaz de atuar corretamente (GAZZANELO *et al.*, 2020; GAZZANELO; LIMA, 2019).

O conceito de índice de operabilidade (IO) foi introduzido como uma forma de avaliar a eficácia de um determinado projeto, quantificando a capacidade das entradas do processo em direcionar as saídas pelo espaço de saída desejado enquanto rejeita as perturbações. Esse conceito em estado estacionário, multivariável e não linear fornece *insights* na fase de síntese do processo sobre operações futuras da planta (GEORGAKIS *et al.*, 2003; VINSON; GEORGAKIS, 2000, 2002). Abordagens dinâmicas de operabilidade também foram desenvolvidas para avaliar restrições de saídas transitórias (LIMA; GEORGAKIS, 2009).

O mapeamento das saídas de um processo é indispensável para quantificar a capacidade de viabilidade e a controlabilidade do processo. Ao realizar esse mapeamento, segundo Gazzaneo *et al.* (2020), desafios intrínsecos foram trazidos para a análise de operabilidade, como não-conformidades no espaço, não-linearidades e dimensionalidade do sistema. Para superar esses desafios, principalmente no campo da operabilidade ou da flexibilidade, algumas abordagens podem ser elencadas, como métodos de aproximação simplicial (mapeamento feito usando programação linear, limitando o espaço estudado em tetraedros ou triângulos, *simplex*) (GOYAL; IERAPETRITOU, 2002) e metamodelos (baseado no uso de técnicas de “krigagem”) (BOUKOUVALA; MUZZIO; IERAPETRITOU, 2010).

Como citado anteriormente, a operabilidade do processo permite a avaliação ou mapeamento de um conjunto de saídas (em um Conjunto de Saídas Disponível - CSD) com base em um conjunto de entradas disponíveis (no Conjunto de Entrada Disponível - CED) usando um modelo linear ou não linear do processo (GEORGAKIS *et al.*, 2003). Ao usar as informações da análise de operabilidade é possível determinar as melhores condições de operação ou de projeto do processo para o qual a meta de produção é viável de ser alcançada (GAZZANELO; LIMA, 2019).

Para realizar a análise de operabilidade são necessários modelos que representem o processo, que podem ser modelos fenomenológicos ou modelos caixa preta (CARRASCO; LIMA, 2017). O modelo do processo (M) descreve a relação entre entradas e saídas e pode ser representado pela Eq. 3.1:

$$M = \begin{cases} \dot{x} = f(x, u, d) \\ y = g(x, u, d) \\ h1(\dot{x}, x, y, \dot{u}, u, d) = 0 \\ h2(\dot{x}, x, y, \dot{u}, u, d) \geq 0 \end{cases} \quad (3.1)$$

Em que $x \in R^r$ são as variáveis de estado de processo, e $u \in R^m$ é o vetor de variáveis manipuladas. As derivadas de (x, u) relacionadas ao tempo são (\dot{x}, \dot{u}) respectivamente. Além disso, $d \in R^q$ e $y \in R^n$ são os vetores de perturbação/ruído e saída, respectivamente. f e g são representações dos mapas não lineares com as dimensões apropriadas. Por fim, h_1 e h_2 incluem as restrições de processo associadas às normas de produtividade e segurança.

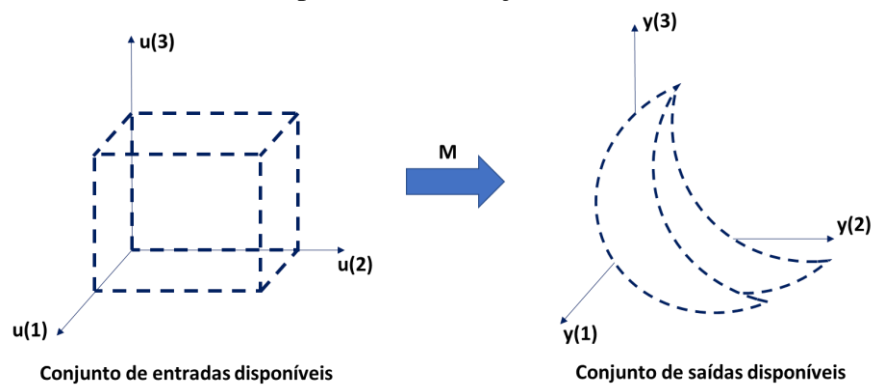
A CED, com base na estrutura e nos limites físicos do processo, pode ser definida pela Eq. 3.2, enquanto o CSD é calculado utilizando o modelo de processo (M) e as variáveis de entrada CED (Eq. 3.3).

$$CED = \{u | u_i^{\min} \leq u_i \leq u_i^{\max}; 1 \leq i \leq m\} \quad (3.2)$$

$$CSD = \{y | y = M(u, d); u \in CED, d \text{ fixado}\} \quad (3.3)$$

A figura 3.2 é uma ilustração puramente esquemática do mapeamento do modelo de CED para CSD.

Figura 3.2 - Esquema do mapeamento usando um modelo de processo e o conjunto de entradas (CED) para obter o conjunto de saídas (CSD).



Em alguns casos, o CSD do processo não é suficiente para satisfazer alguns indicadores de produção, como produtividade e qualidade do produto. A associação das variáveis de saída com esses indicadores pode ajudar na definição de um novo conjunto chamado Conjunto de Saídas Objetivos (CSO) que pode ser expresso como na Eq. 3.4:

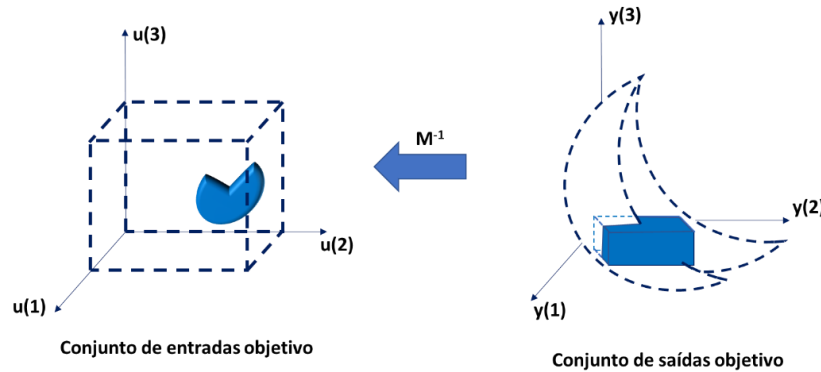
$$CSO = \{y | y_j^{\min} \leq y_j \leq y_j^{\max}; 1 \leq j \leq n\} \quad (3.4)$$

O CSO pode ser descrito por bordas ou linhas contínuas que conectam os vértices dados por y^{\min} e y^{\max} para cada saída ou pontos descontínuos que discretizam tais bordas (CARRASCO; LIMA, 2017). Como o CSO é definido como o espaço de saída onde o processo é destinado a ser operado, o espaço de entrada necessário para alcançar as saídas no CSO é

chamado de Conjunto de Entradas Objetivo (CEO). O CEO pode ser encontrado pela inversão do modelo como exemplificado na Eq. 3.5 (Figura 3.3)

$$CEO = \{u | u = M^{-1}y; y \in CSO\} \quad (3.5)$$

Figura 3.3 - Esquema do mapeamento inverso usando um conjunto de saídas objetivo desejado (CSO) para alcançar um conjunto de entrada objetivo (CEO).



O CEO pode ser determinado pela inversão do modelo utilizando um algoritmo de otimização não linear (programação não linear, PNL em P1)(CARRASCO; LIMA, 2018) que minimiza a função objetivo, dada pela Eq. 3.6, cuja escolha depende do modelo de processo (Eq. 3.1):

$$P1: \varphi = \min_{u_k^*} \sum_{j=1}^p \left(\frac{y_{j,k} - y_{j,k}^*}{y_{j,k}} \right)^2 \quad (3.6)$$

Em que cada $y_{j,k}$ corresponde a um ponto do CSO observando um conjunto específico. Além disso, j representa o índice da variável de saída, e k o índice de um ponto de um total de pontos p no agrupamento. Dessa forma, os CSO (Eq. 3.7) podem ser escritos como

$$CSO = \{y | y = (y_1, y_2 \dots y_p)\} \quad (3.7)$$

O resultado do otimizador consiste em um conjunto de pontos calculados para cada CSO, $u_k^* = (u_1^*, u_2^*, \dots u_p^*)$. Os u_k^* pontos definem um CEO*, que é chamado de CEO viável ou factível e é dado por:

$$CEO^* = \{u^* | u^* = (u_1^*, u_2^*, \dots u_p^*)\} \quad (3.8)$$

O novo conjunto de entradas pode ser usado para recalcular o CSO viável, CSO* em Eq. 3.9 utilizando o modelo de processo:

$$CSO^* = \{y^* | y^* = M(u^*); u^* \in CEO^*\} \quad (3.9)$$

Mais detalhes sobre a formulação de otimização podem ser visto na literatura (CARRASCO; LIMA, 2017, 2018).

Para alcançar a intensificação de um bioprocessos, um alto nível de integração do processo é necessário. Isso implica considerar fatores como: as fortes interconexões entre as diferentes unidades do processo; possíveis dificuldades de operação; e indicadores econômicos e ambientais (DEMIREL; LI; HASAN, 2019; SVENSSON; ERIKSSON; WIK, 2015). Nesse contexto, o uso da operabilidade do processo permitiria extrair o desempenho máximo desse bioprocessos. A utilização dessa ferramenta também ajudaria a manter a flexibilidade, a confiabilidade e a estrutura de controle dos bioprocessos em relação à sustentabilidade e às novas matérias-primas (DEMIREL; LI; HASAN, 2019; SVENSSON; ERIKSSON; WIK, 2015). Um exemplo da aplicação dessa técnica no campo da engenharia de sistemas de bioprocessos se encontra no capítulo 6 da presente tese.

Para garantir a qualidade do processo e as condições mapeadas pelos estudos *in silico* ou pelo uso de algoritmos de operabilidade é preciso estratégias de controle eficazes que mantenham as variáveis do processo nos níveis desejados. Grandes flutuações dessas variáveis irão afetar a qualidade do produto final e afastar o processo das condições ideais (SIMUTIS; LÜBBERT, 2015). Para exercer o efetivo controle do processo, existe um leque de controladores e estratégias diferentes que podem ser abordadas, desde a teoria clássica (Controladores *feedback*, ex.: PID) até sistemas mais avançados (Model Predictive Control, MPC; ou que usem informações de sistemas de aprendizado, como Redes Neurais Artificiais).

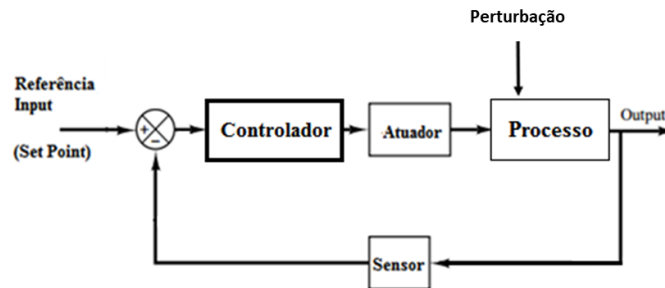
3.7 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA BIOPROCESSOS

3.7.1 Sistemas clássicos de controle: controlador Proporcional Integral Derivativo (PID)

Os principais controladores usualmente empregados em controle de processos são: liga-desliga (on-off), proporcional (P), proporcional-integral (PI), proporcional derivativo (PD) e proporcional integral derivativo (PID) (OGATA, 2010). Para sistemas de malha fechada (Figura 3.4), esses controladores comparam o valor de saída do processo com o valor desejado (*setpoint*) e calculam o valor do erro. Esse erro associado a uma lei de controle produzirá um sinal de controle para um atuador que tentará minimizar o erro entre a medida e o desejado. Essa característica acaba tornando esse tipo de sistema mais rápido na atuação, porém podem ser mais suscetíveis a perturbações de medida e no sistema, uma vez que são baseados em sistemas lineares ou linearizados em determinado ponto de operação. Controladores PID são

aplicados principalmente em sistemas SISO (Single-Input/Single-Output) devido à simplicidade de construção (DORF; BISHOP, 2011; OGATA, 2010).

Figura 3.4- Diagrama de blocos de um sistema de controle malha fechada



Fonte: Adaptado de OGATA (2010)

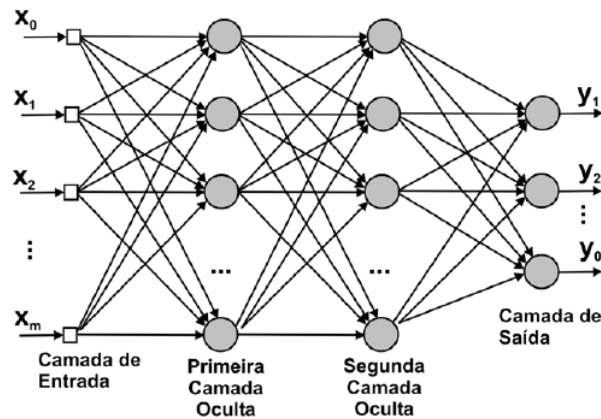
3.7.2 Redes Neurais

Os recursos computacionais têm se tornado mais sofisticados e são cada vez mais explorados para solucionar problemas não-lineares e dinâmicos, nos quais a definição de um modelo fenomenológico é inicialmente complicada. A chamada Inteligência Artificial (IA) pode armazenar e analisar quantidades consideráveis de informações, sendo capaz de tomar decisões e/ou aprender com dados anteriores, de modo que se aproxime do modo de aprendizado humano (NELLES, 2001). Devido a essa flexibilidade, diversas estratégias de controle podem incorporar essas estruturas de IA, como redes neurais artificiais (RNAs) ou mesmo lógicas *fuzzy*, em diferentes níveis da malha de controle para melhorar a estabilidade do processo em questão.

As redes neurais artificiais foram baseadas nas estruturas biológicas do cérebro e apresentam capacidade de processamento, aprendizado e adaptação. As RNAs apresentam muitas unidades simples (neurônios), fortemente conectadas e ponderadas.

As unidades de saída são denominadas de neurônios de saída e o agrupamento desses neurônios forma a camada de saída. Cada um dos nós presentes no centro da rede são neurônios intermediários ou ocultos que compõem a camada intermediária ou oculta. Assim como na camada de saída, cada neurônio intermediário apresenta uma função de ativação associada. Os neurônios de entrada são os únicos que recebem e repassam as entradas associadas à rede sem realizar qualquer modificação (Figura 3.5) (NELLES, 2001; STEYER; GÉNOVÉSI; HARMAND, 2010).

Figura 3.5 - Representação de uma rede neural com duas camadas intermediárias



Fonte: Barbosa; Freitas; Neves (2005)

Cada sinal de entrada apresenta um respectivo peso que representa sua influência na saída. Após a aplicação dos pesos é realizada uma soma ponderada dos sinais que produzirá um nível de resposta ou atividade. As redes neurais apresentam algoritmos específicos de aprendizagem que fazem o ajuste dos pesos para cada sinal de entrada, tendo por base o padrão apresentado como saída. Portanto, é necessário que a RNA seja treinada com dados bem estruturados, para que quando apresentada a um grupo novo de sinais de entrada, gere um sinal de saída correto. A representatividade da saída depende de quantas interações a RNA realizou, ou seja, quão bom foi o treinamento. Um número insuficiente de iterações no treinamento pode levar a respostas não confiáveis, assim como o excesso pode gerar uma RNA tendenciosa (HEIDER; PIOVOSO; GILLESPIE, 2002).

3.7.2.1 Redes Neurais como *softsensors*

Outra estrutura computacional que pode ser citada dentro dos sistemas avançados de controle inferencial são os sensores virtuais ou *software sensors* (*softsensor*). Eles permitem estimar variáveis de interesse usando como dados de entrada medidas secundárias. Os *softsensors* estão estruturados em dois pilares principais. O primeiro se refere aos sensores de *hardware* que irão fornecer informações das variáveis online que estão relacionadas com a variável de interesse. O segundo é o modelo matemático descrito em um algoritmo que irá descrever a interdependência entre os dados dos sensores disponíveis e a variável alvo (LANTZ *et al.*, 2010; NICOLETTI *et al.*, 2013).

De forma geral, os sensores por softwares são organizados em três classes: (i) sensores baseados em modelos (aqueles com conhecimento prévio do processo descrito na forma de modelos matemáticos); (ii) sensores baseados em dados (usam a aprendizagem de outros

sistemas similares para inferir variável de interesse); (iii) sensores híbridos (englobam recursos das classes i e ii) (LANTZ *et al.*, 2010; NICOLETTI *et al.*, 2013).

Em relação aos bioprocessos, os *softsensors* baseados em modelos geralmente são construídos usando as relações estequiométricas e balanços de massa ou de energia. É possível, por exemplo, o uso de um *softsensor* que determine o início da fase de crescimento celular pela medida do quociente respiratório (RQ) (JOBÉ *et al.*, 2003). Ou ainda, que estime a atividade metabólica pela velocidade de produção de gás carbônico (NILSSON; TAHERZADEH; LIDÉN, 2001; TAHERZADEH; NIKLASSON; LIDÉN, 2000). Porém, esse tipo de sensor precisa do uso de filtros (ex.: filtro exponencial ou ainda filtro de Kalman) pois são muito suscetíveis aos ruídos do sinal (LANTZ *et al.*, 2010; SUNDSTRÖM; ENFORS, 2008).

Os *softsensors* baseados em dados usam métodos ou algoritmos de aprendizado de padrões para estimar as variáveis de interesse, como é o caso das já mencionadas redes neurais. O aprendizado e a adaptação a partir de outros sistemas é interessante para aplicação nos processos que apresentam muitos dados disponíveis, pois garantem um bom treinamento e validação do algoritmo. Para sistemas cujos dados são heterogêneos (apresentam poucas similaridades entre as condições estudadas), realiza-se uma etapa adicional de pré-processamento de informações e utilização de filtros que permitam uma melhor performance do controlador (LANTZ *et al.*, 2010; SUNDSTRÖM; ENFORS, 2008). O *softsensor* é uma opção de custo operacional e de investimento reduzido pois utiliza a estrutura disponível do processo.

3.7.2.2 Redes Neurais como metamodelos

Devido à característica de aprendizado de padrões das RNAs, essas estruturas computacionais também podem ser usadas como metamodelo ou modelo substituto. Metamodelos são aproximações funcionais de modelos ou sistemas mais complexos. A otimização e análises de sensibilidade dos sistemas complexos originais podem demandar uma alta capacidade computacional, e o artifício dos metamodelos surge para facilitar essas análises pela simplificação do modelo e redução do esforço computacional (DAVIS; CREMASCHI; EDEN, 2018; KIM; BOUKOUVALA, 2019).

A construção de um modelo substituto exige avaliar o modelo original para obtenção de dados necessários à construção. A ideia básica é realizar uma “regressão” dos dados de entrada e saída e assim obter um modelo caixa preta que representa o modelo original. Essa representação pode ser realizada a nível global ou local.

Os metamodelos globais são funções que aproximam o sistema ao longo de todo o espaço estudado. A construção desses metamodelos geralmente está associada a algoritmos de otimização global, o que permite afirmar que a resposta do metamodelo será global e representativa em relação ao sistema original dentro de um intervalo de confiança e do espaço avaliado. A utilização de interpoladores *Kriging* (método de regressão) e de redes neurais são mais comuns nesses casos (HENAO; MARAVELIAS, 2010). No caso das RNAs, além do problema de sobre-treinamento/sub-treinamento, deve-se ter cuidado com respostas oscilatórias que a rede pode apresentar entre amostragens (EASON; CREMASCHI, 2014). No trabalho de Mesquita *et al.* (2020b) usaram-se as redes neurais como um modelo reduzido do modelo metabólico a fim de estimar os valores do quociente respiratório a partir de dados de fluxos metabólicos de oxigênio e dióxido de carbono.

Os metamodelos locais geralmente são construídos usando otimizações obtidas por metodologias de superfícies de resposta. Essa metodologia ajusta sequencialmente polinômios de primeira e segunda ordem em uma sub-região de espaço de busca maior, e em seguida usa esse modelo para procurar por direções que minimizem a função objetivo. Essas superfícies são descartadas após minimização da função objetivo e apresentam como desvantagem o fato de não serem facilmente aplicáveis em sistemas de alta dimensionalidade (BAŞ; BOYACI, 2007).

3.7.3 Lógica Nebulosa ou *Fuzzy*

Outra IA importante é a lógica *fuzzy*, que usa expressões linguísticas para lidar com incertezas. Ela não requer um modelo matemático, é um processo baseado em regras. Por admitir valores intermediários entre FALSO (0) e VERDADEIRO (1), é considerada uma extensão da lógica booleana. O valor 0,5 pode representar o TALVEZ e 0,9 QUASE VERDADE, e conjuntos são usados para representar a expressão linguística. Um conjunto A pode ser definido como um conjunto de pares ordenados $A = \{(x, \mu_A(x)) \mid x \in X, \mu_A : X \rightarrow [0,1]\}$, onde X contém todos os elementos de medida que podem ocorrer, e $\mu_A(x)$ é uma função de pertinência de x em A, que associa cada elemento de X a um determinado grau de pertinência. A função de pertinência pode assumir qualquer forma, por exemplo uma função gaussiana (NELLES, 2001; STANKE; HITZMANN, 2013).

A lógica *fuzzy* é dividida em três passos:

- (i) fuzzificação da função de pertinência: é usada para determinar o grau de pertinência das entradas para uma expressão;
- (ii) inferência dos operadores *fuzzy*: são aplicados (OR e AND), sendo equivalentes ao máximo e mínimo dos graus de pertinência;

- (iii) defuzzificação: todas as saídas das regras são reunidas em um único conjunto, cujo centroide é geralmente calculado como o valor para ação do controlador (STANKE; HITZMANN, 2013).

3.7.4 Controle preditivo baseado em modelo

O controle preditivo baseado em modelo (*Model predictive control*, MPC) é uma forma de controle na qual, usando o estado atual do processo e um modelo de espaço de estados, a ação de controle atual é obtida resolvendo on-line, em cada instante da amostragem, um problema de controle ideal com horizonte finito. A otimização produz uma trajetória ideal de controle e a primeira ação de controle desta trajetória é aplicada ao processo (CAMACHO; BORDONS, 2007).

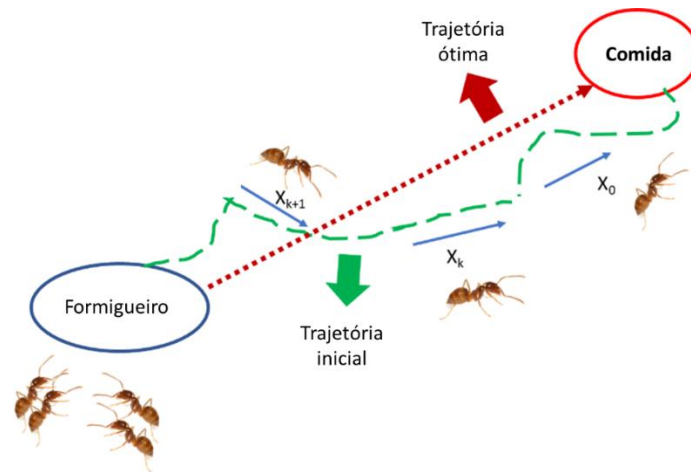
Essa é sua principal diferença em relação ao controle convencional, que utiliza uma lei de controle pré-computada. Uma característica importante do MPC é capacidade de lidar com problemas cujas leis de controle sejam difíceis de definir off-line, além de lidar com sistemas não-lineares e suas respectivas restrições. Outra característica muito requisitada em um MPC é a capacidade de ser implementado em sistemas *Multi-Input/Multi-Output* (MIMO), ou seja, capacidade de controlar multivariáveis no processo (MAYNE *et al.*, 2000).

3.7.4.1 Algoritmos Biomiméticos

A incorporação de algoritmos biomiméticos na estratégia de controle é uma alternativa interessante para lidar com problemas não-lineares, como é o caso dos bioprocessos. Essa estrutura computacional permite considerar múltiplas variáveis de processo com alto grau de interrelação e seus respectivos desvios do modelo ideal.

O *Biologically-Inspired Optimal Control Strategy* ou BIO-CS combina as regras de comportamento das formigas com conceitos de controle para o cálculo de trajetórias dos agentes individuais. Para entender melhor o conceito do BIO-CS, suponha que uma formiga pioneira encontre comida caminhando aleatoriamente. Esta formiga pioneira (agente zero) traçaria então um caminho sinuoso de volta ao ninho e começaria o “recrutamento de grupo”. As formigas que estão atrás (ou agentes seguidores) iriam, um após o outro, endireitar a trilha um pouco a partir do caminho original até que os caminhos dos agentes convergissem para uma linha conectando o ninho e a fonte de alimento, apesar da falta de senso de geometria da formiga individual. Ao cooperarem em grande número, as formigas realizam tarefas que seriam difíceis de alcançar individualmente (Figura 3.6) (MIRLEKAR; LI; LIMA, 2017).

Figura 3.6 – Inspiração do funcionamento de um algoritmo biomimético.



Fonte: Adaptado de Mirlekar; Li; Lima (2017)

As principais etapas presentes no algoritmo BIO-CS aplicado ao controle de processos são resumidas no fluxograma mostrado na figura 3.7 (MIRLEKAR *et al.*, 2018a, 2018b). As etapas (a)-(e) são descritas da seguinte forma:

(a) Definem-se as condições iniciais, o caminho viável inicial para a variável de entrada (correspondente a um palpite inicial para o agente zero) e os parâmetros de iteração do BIO-CS (tempo de pesquisa, tempo de discretização e tempo de amostragem);

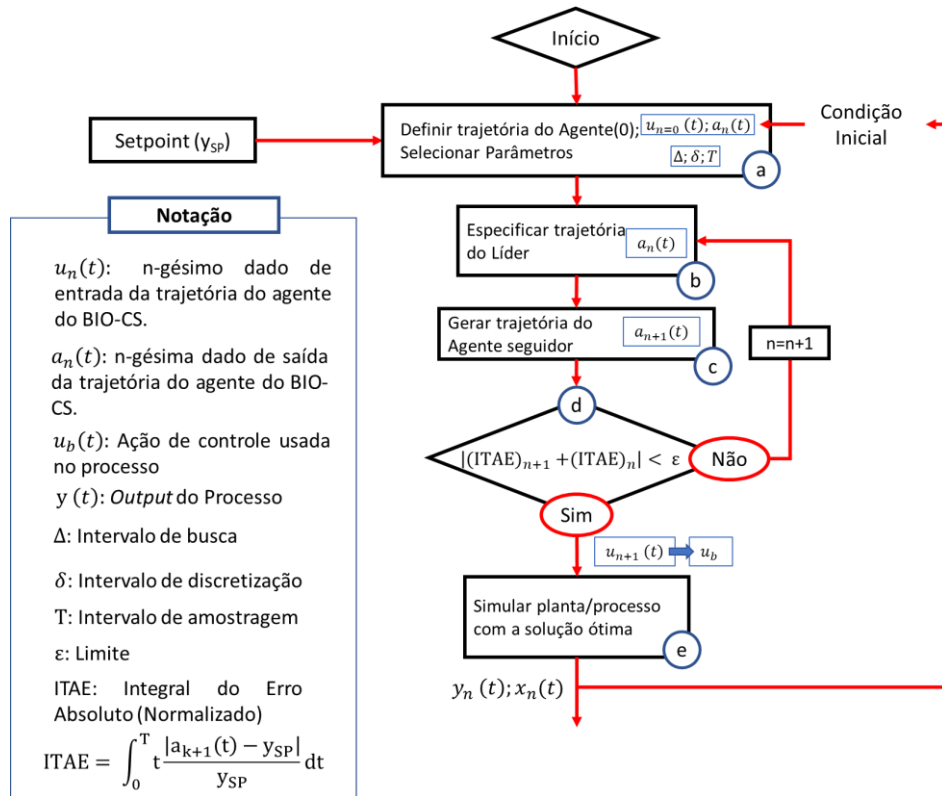
(b) Especifica-se a trajetória obtida como a trajetória do agente líder;

(c) Gera-se o caminho do agente seguidor usando otimizadores para controle ideal (por exemplo, *solvers* baseados em gradiente). O agente seguidor se comunica com o líder por parâmetros de algoritmo predefinidos para calcular sua trajetória;

(d) Define-se e se verifica o *Integrated Time Absolute Error* (ITAE) para a trajetória do seguidor para um período definido pelo usuário. Se o valor do ITAE estiver dentro de um determinado limiar (ϵ), o BIO-CS convergiu para a solução. Caso não, especifica-se a trajetória do seguidor atual como o próximo líder e as etapas (b) e (c) são repetidas;

(e) Simula-se o processo com o perfil de controle/entrada ideal obtido no BIO-CS (de acordo com um horizonte de tempo de amostragem). O sinal de feedback contendo saídas atuais do processo, $y(t)$, é enviado para atualizar condições para o próximo período de amostragem e fechar o ciclo.

Figura 3.7- Fluxograma do BIO-CS, no qual cada etapa (a) – (e) é detalhada



Fonte: Adaptado de Mirlekar; Li; Lima (2017)

Para a implementação do BIO-CS em loops de controle de multivariado, o problema de controle ideal é definido da seguinte forma (Eq. 3.10):

$$\min_{u(t)} \varphi = \int_{t_i}^{t_f} (\|y(t) - y_{SP}\|_Q^2 + \|u(t) - u^-(t)\|_R^2) dt \quad (3.10)$$

$$\text{no qual: } \dot{x} = f(x(t), u(t)) \quad y = g(x(t), u(t))$$

E os limites são definidos como: $x(t)^{min} \leq x(t) \leq x(t)^{max}$, $u(t)^{min} \leq u(t) \leq u(t)^{max}$

A função objetivo do controle ideal da Eq. 3.10, denotada por φ , é minimizada ao longo de um período definido. Aqui, t_i e t_f são os tempos de início e fim, respectivamente, similar ao horizonte de previsão do MPC. A função objetivo (φ) geralmente consiste em manter simultaneamente várias saídas em seus setpoints desejados, y_{SP} , com a adição do termo de supressão de entrada que considera movimentos de entrada passados, $u^-(t)$. Estes termos correspondem às minimizações da soma dos erros quadrados dentre as variáveis e seus valores

desejados/passados (MIRLEKAR *et al.*, 2018a). Mais informações sobre o BIO-CS podem ser encontradas na literatura (MIRLEKAR *et al.*, 2018c, 2018b; MIRLEKAR; LI; LIMA, 2017).

Em relação ao MPC clássico, o BIO-CS permite o uso de trajetória de setpoint dinâmico para melhoria contínua das trajetórias de entrada/saída, e permite o emprego de métodos heurísticos ou baseados em gradientes para computação dos movimentos de controle, apenas para mencionar algumas das principais diferenças (MIRLEKAR *et al.*, 2018c). Essas características são interessantes do ponto de vista de bioprocessos por permitirem uma gama maior de estratégias de controle a serem testadas.

3.8 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE APLICADAS AOS BIOPROCESSOS

O uso dos sistemas inteligentes e das estruturas de controle abrangem diversas oportunidades de estudo e aplicação prática. Elas podem ser usadas para a otimização de meios de cultura (TIAN *et al.*, 2013), simulação do processo (SILVA *et al.*, 2012c) ou ainda avaliação prática de estruturas inovadoras de controle.

As pesquisas realizadas com as redes neurais têm a finalidade de produzir um mecanismo universal de solução de problemas (BUNGAY, 1996; STANKE; HITZMANN, 2013). Del rio-chanona *et al.* (2016) usaram uma rede neural *feedforward* de duas camadas ocultas para melhorar a produção de C-ficocianina por cianobactérias. A partir da predição da velocidade de produção de biomassa, acúmulo de produto e velocidade de consumo de nitrato no caldo de cultivo pela rede neural, uma estratégia de alimentação foi definida para as bateladas alimentadas. As entradas usadas para predição foram a concentração de biomassa, concentração de nitrato no meio de cultura e a concentração de ficocianina nas células. Os cultivos batelada alimentada em fotobiorreator tiveram acúmulo superior do pigmento quando submetido à estratégia proposta.

Takahashi *et al.* (2015) propuseram o uso de redes neurais na produção de biofármacos. A rede neural teve como principal objetivo estimar a concentração de células animais viáveis além de outros metabólitos. Os dados de espectroscopia de UV/Vis foram usados como principal entrada da rede. Essa estrutura de *softsensor* predisse com boa precisão as concentrações de glutamato, glicose, glutamina, lactato, bem como concentração de células viáveis. A estrutura proposta, segundo os autores, representa uma oportunidade de redução dos custos na quantificação dos componentes do meio de cultivo.

Outros processos comuns nas biorrefinarias podem ser beneficiados de estruturas de controle com uso dos sistemas inteligentes aliado às estruturas clássicas. Fonseca *et al.* (2018) propuseram aplicar, em um processo de sacarificação, uma estrutura de controle adaptativa

feedforward (sistema que antecipa o efeito de distúrbios aprimorando o controle da variável de interesse). A estratégia de controle *fuzzy* adaptativa *feedforward-feedback* foi usada em um *loop* de controle para concentração do produto durante a alimentação de um reator enzimático. Essa estratégia rejeitava os distúrbios associados à concentração de substrato e enzimas na alimentação. Em relação às estruturas clássicas, a proposta conseguiu evitar um número maior de distúrbios melhorando a performance do processo.

Uma das variáveis de grande importância em cultivos é a velocidade específica de crescimento das células (μ). Tavasoli *et al.* (2019) propuseram uma estrutura de controle para a vazão de alimentação em cultivos de *Pichia pastoris*, tendo como objetivo manter μ no valor ótimo para maximizar a produção de alfa 1-antitripsina (A1AT, proteína recombinante). A estrutura central do sistema proposto consistiu em uma rede neural multiperceptron de 3 camadas, aplicada para ajustar a alimentação de metanol com base no consumo de hidróxido de amônia. Esse “ μ -estado” permitiu que o cultivo de validação alcançasse 120 g.L⁻¹ de células e 324 mg. L⁻¹ de A1AT.

Em outra abordagem, também visando à produção de biomassa de *Pichia pastoris* recombinante usando metanol como fonte de carbono, Beiroti *et al.* (2019) desenvolveram uma rede neural recorrente. Durante a fase de indução das bateladas alimentadas, a velocidade de produção de CO₂ (Carbon Evolution Rate, CER), a concentração de oxigênio dissolvido e a vazão de alimentação de metanol foram utilizadas para estimar a concentração de células. A rede foi capaz de prever com precisão a concentração de biomassa celular, sendo um outro exemplo de *softsensor* de concentração celular utilizado em processos de produção de proteínas recombinantes.

Aceves-lara *et al.* (2010) usaram um MPC juntamente com um algoritmo de reconhecimento de padrões (Pattern Search – PS) e um algoritmo iterativo de colônia de formigas (Iterative Ant Colony Algorithm - IACA) para avaliar a otimização dinâmica da produção de etanol. O sistema estudado era composto de dois reatores: o primeiro (R1) era voltado para produção de biomassa, com meio rico em oxigênio e baixa concentração de etanol; já o reator (R2) foi dedicado para produção de etanol, e micro-aerado (aeração constante) e com um módulo de ultrafiltração acoplado. O sistema de controle automático foi responsável por manipular diversas vazões ao longo do cultivo (vazão de alimentação de fonte de carbono, vazão de reciclo de células, vazão de purga, entre outros) para manter a produtividade e rendimento de etanol nos *setpoints* desejados. As simulações atingiram uma concentração final de etanol de 80 g.L⁻¹ e rendimento de 0,45 g_{etanol}. g_{substrato}⁻¹ após 30h de cultivo (tempo de simulação).

3.9 MICRO-AERAÇÃO EM FERMENTAÇÕES

A estratégia convencional de suplementação de oxigênio em reatores tipo tanque agitado é baseada no controle da concentração do oxigênio dissolvido (COD), com uma vazão constante de ar ou oxigênio, e pela manipulação da velocidade de rotação do impelidor. Normalmente, os sistemas de monitoramento de biorreatores já vêm equipados com um controlador PID de parâmetros ajustáveis (DIAZ *et al.* 1995).

À medida que as limitações do controle PID convencional vêm sendo reconhecidas e os recursos computacionais se tornando mais acessíveis, diferentes estratégias de controle têm sido desenvolvidas para tornar o controle da COD mais robusto. Dentre elas, destacam-se o uso de controle preditivo adaptativo (DIAZ *et al.*, 1995) ou uso de algoritmos geométricos (GOMES; MENAWAT, 2000) para definir o perfil de manipulação da velocidade do impelidor; ou ainda, incorporação de redes neurais artificiais para ajudar na definição da vazão de ar a ser aplicada (METE *et al.*, 2012). As aplicações dessas estratégias de controle avançado vão desde cultivos de alta densidade celular em reatores convencionais (HORTA *et al.*, 2012, 2014) a cultivos conduzidos em reator pneumático pressurizado (CAMPANI *et al.*, 2017).

A variável RQ pode ser integrada como variável controlada com intuito de estabelecer uma estratégia de controle capaz de manipular o metabolismo da fonte de carbono. Facilmente estimado a partir de medições de gases e disponível on-line, o RQ fornece informações valiosas sobre a atividade respiratória de *S. cerevisiae*. E mesmo assim, apesar de ser extensivamente estudado para manipulação da vazão de alimentação de substrato em culturas aeróbias de *S. cerevisiae* (TIPPMANN *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2010), foi pouco explorado para estabelecer estratégias de controle pela manipulação da fase gasosa em condições de micro-aeração.

Um dos trabalhos que abordam esse tema é o de Franzén, Albers e Niklasson (1996) em fermentações contínuas. No referido estudo, a composição da corrente de gás de entrada foi manipulada para manter o RQ no *setpoint*, garantindo as condições microaeróbias. O RQ estimado foi controlado por um PID. O caráter altamente dinâmico dessa variável exigiu um filtro exponencial de primeira ordem. O filtro permitiu estabilidade do sistema ao variar gradualmente o RQ (*setpoint*) de 10 a 50. Para os autores, as medidas de oxigênio são a maior fonte de erro. A análise desses dados foi realizada por Franzén (2003) e indicou que um rendimento de $0,43 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ em RQ igual a 12 foi obtido.

A escassez de trabalhos que envolvam controle do bioprocessamento e micro-aeração voltados para fermentação pode ser consequência de que não há um consenso sobre quais realmente sejam as condições de micro-aeração. Na natureza, os ambientes micro-óxicos são

encontrados em locais tais como nódulos de raízes (KUZMA; HUNT; LAYZELL, 1993), biofilmes (KÜHL; RICKELT; THAR, 2007) e trato gastrointestinal de animais (CHARRIER; BRUNE, 2003). Portanto, controlar essas condições em um cultivo é um desafio, o que dificulta o estudo de microrganismos como *Helicobacter pylori* (microaerófilo) e *Bacteroides fragilis* (nanoaeróbios) (MORRIS; SCHMIDT, 2013).

Em termos de bioprocessos e controle de biorreatores, Zeng e Deckwer (1996) propuseram uma definição para a condição de micro-aeração. A condição proposta pelos autores foi obtida ao revisarem trabalhos anteriores envolvendo a produção microaeróbia de 2,3-butanediol por *Enterobacter aerogenes*. Em um processo microaeróbio, a tensão do oxigênio dissolvido se aproxima de zero e o aumento da força motriz (gradiente de concentração) eleva a eficiência da transferência de oxigênio. A velocidade específica de consumo de oxigênio (qO_2 , $\text{mmolO}_2.\text{g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pode ser descrita por uma equação tipo Monod, na qual $qO_2^{\text{máx}}$ é a velocidade máxima de consumo de oxigênio, K_o (mg.L^{-1}) é a constante de saturação e C_o (mg.L^{-1}) é a concentração de oxigênio.

$$qO_2 = qO_2^{\text{máx}} \frac{C_o}{K_o + C_o} \quad (3.11)$$

Ao observarem o modelo e os dados experimentais, os autores propuseram que o metabolismo celular começa a sofrer alteração quando o fornecimento de oxigênio obedecer a C_o menor ou igual a cerca de $4 K_o$. Relacionando K_o com a concentração de oxigênio dissolvido, torna possível determinar se o cultivo está em condição micro-aerada ou próxima dela. Generalizando, os microrganismos apresentam valores de K_o variando entre 0,01-0,1 mg.L^{-1} , que podem ser convertidos a uma faixa de 0,1-1,5% da concentração de saturação do oxigênio dissolvido. Nessa faixa, o cultivo estaria submetido a uma condição de microaerobiose. Concentrações de oxigênio dissolvido tão baixas são difíceis de manter e de serem aferidas por sensores comuns. Com base nesse cenário, os autores ainda propuseram acompanhar qO_2 , e a taxa de transferência de oxigênio, OTR ($\text{mmolO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$):

$$qO_2 = \frac{\text{OTR}}{C_x} \quad (3.12)$$

$$\text{OTR} = K_L a^* (C_o^* - C_o) \approx K_L a^* C_o^* \quad \text{em } C_o \approx 0 \quad (3.13)$$

Dos quais, $K_L a$ (h^{-1}) é o coeficiente de transferência volumétrico; C_o^* (mmol.L^{-1}) é a concentração de saturação de oxigênio; C_o (mmol.L^{-1}) é concentração real de oxigênio; e C_x ($\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$) é a concentração de células. A proposta requer que a biomassa viável seja quantificada para o acompanhamento adequado e é dependente do microrganismo usado. Em um dos

trabalhos revisados, um PID foi responsável por manipular a vazão de ar para o controlar o RQ (ZENG *et al.*, 1994). A *Enterobacter* apresentou um consumo específico de oxigênio ideal de $3,6 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A partir dessa condição, a bactéria estaria em um ambiente com limitação de oxigênio. Essa condição resultou em um RQ de 4,46 e uma velocidade específica de formação de 2,3-butanediol de $0,61 \text{ g}_{\text{Produto}}.\text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

3.9.1 Estratégias de cultivo e de controle para manutenção da micro-aeração

Os trabalhos presentes na literatura abordam o tema de micro-aeração de duas formas principais: ou é usado um fluxo de ar constante (*sparged* ou *headspace*), sem qualquer controle, em frascos agitados ou biorreator; ou uma estratégia de controle de biorreator associada a estruturas de inferência ou que usam informações metabólicas. Esses trabalhos estão descritos a seguir.

Alfenore *et al.* (2004) avaliaram a micro-aeração com um fluxo constante moderado de ar (100 L.h^{-1}) no *headspace* de um reator de 20 L. A condição avaliada apresentou uma concentração final de etanol de 131 g.L^{-1} , porém inferior à concentração de etanol obtida no cultivo plenamente aeróbio, que foi de 147 g.L^{-1} . A concentração final de glicerol também foi superior para a condição estudada atingindo cerca $12,2 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto a aeróbia apresentou cerca de 4 g.L^{-1} . Segundo os autores, o acúmulo do glicerol pode ser atribuído ao baixo nível de aeração fornecido, tornando-se a única rota disponível para reoxidação do NADH acumulado.

Okuda *et al.* (2007) estudaram a influência da micro-aeração mantendo a vazão de ar constante em cultivos de *Escherichia coli* KO11 em hidrolisado de madeiras usadas na construção civil. A estratégia de micro-aeração alcançou concentração de $35,4 \text{ g.L}^{-1}$ do álcool, sendo a taxa de transferência de oxigênio (OTR) igual a $4 \text{ mmolO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em comparação, quando em condições anaeróbias ($\text{OTR} = 0 \text{ mmolO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), a concentração final de etanol foi $28,8 \text{ g.L}^{-1}$ e nem todos dos açúcares redutores foram consumidos. A condição de micro-aeração proporcionou a redução da formação dos ácidos orgânicos, porém houve um aumento na concentração de acetato. O cultivo com OTR de $15 \text{ mmolO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ alcançou uma concentração de etanol $26,6 \text{ g.L}^{-1}$, pois houve indícios do consumo de etanol pelas células depois de 24h.

Deniz, Imamoglu, Vardar-sukan (2014) também estudaram cultivos de *E. coli* KO11 usando bagaço de marmelo como fonte de carbono e vazões constantes de ar. Várias condições de OTR ($0, 2, 5, 9, 16 \text{ mmolO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram avaliadas com duração de 64h cada uma. OTR de $5 \text{ mmolO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ propiciou a máxima concentração de etanol ($20,51 \text{ g.L}^{-1}$), um rendimento

global de $0,33 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e a maior conversão de substrato (93,49%). Os dados desse trabalho estão em consonância com trabalho anterior de Okuda *et al.* (2007). Em ambas as propostas, a micro-aeração permitiu a manutenção do suprimento de NAD^+ , aumentou os fluxos pela via glicolítica e pela via Pentose Fosfato. Nesses experimentos, a assimilação de xilose até o esgotamento teve início após o consumo completo das hexoses. O completo consumo da xilose foi possível graças ao decréscimo dos níveis de NADH (manutenção do equilíbrio redox), e ao ATP gerado pela via de produção de acetato e pela via da respiração celular.

Fromanger *et al.* (2010) avaliaram cultivos em batelada alimentada de *Candida shehatae*. Os experimentos foram desenvolvidos em duas etapas: (i) a primeira aerada para produção de biomassa (8 e $12 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$); (ii) e a segunda etapa consistiu em limitar o fornecimento de oxigênio usando vazões constantes de ar e iniciar a alimentação de meio por pulsos ($650 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ da fonte de carbono). A levedura apresentou uma taxa média de assimilação de oxigênio (OUR ou ainda J_{O_2}) de 0,30 a $2,48 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. As células submetidas às condições acima da faixa estabelecida apresentaram o metabolismo plenamente aeróbio. Usando xilose e OUR de $1,19 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a concentração máxima de etanol foi de $48,81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Enquanto usando o limite superior de OUR ($2,48 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e glicose, a concentração máxima de etanol atingiu $54,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Os fluxos de glicerol e outros polióis variaram de 7,5 a $18,1 \text{ mmol}_{\text{poliól.}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Para os autores, ao se limitar a respiração celular, a produção de etanol se torna cada vez mais associada à geração de biomassa. Nesse caso, somente a rota de produção de etanol não é suficiente para suprir a necessidade energética da célula.

Silva *et al.* (2011) estudaram a fermentação de xilose por *Pichia stipitis* combinando diferentes vazões constantes de ar e agitação. A formação de produto foi favorecida por agitação de 250 rpm e aeração de 0,25 vvm. Os autores consideraram essa condição como micro-aerada devido o valor em vvm baixo e menor que 0,5 vvm. Nessa condição, a quantidade final de etanol foi de $26,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. A condição micro-aerada estudada foi caracterizada pelo coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio (k_{LA}) mantido em $4,8 \text{ h}^{-1}$. Em outros experimentos, o uso de um k_{LA} acima do estudado estimulou o crescimento celular e afetou negativamente a produtividade de etanol.

Ainda estudando fermentação de xilose por *Pichia stipitis*, Silva *et al.* (2012a) também definiram condições de transferência de oxigênio ideais para produção de etanol usando diferentes combinações de vazão de ar e agitação. Nesse trabalho, o aumento do k_{LA} alterou a produção de etanol em termos de rendimento e produtividade. O melhor rendimento de etanol ($Y_{\text{P/S}}=0,33 \text{ g}_{\text{Etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Substrato}}^{-1}$) foi obtido com k_{LA} de $0,7 \text{ h}^{-1}$, enquanto as maiores produtividades

volumétricas ($Q_p=0,32-0,38 \text{ g}_{\text{etanol}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) foram obtidas com o k_{LA} variando de $4,9-18,7 \text{ h}^{-1}$. Portanto, para essa espécie, foi proposto uma região ideal de k_{LA} entre $2,3 \text{ h}^{-1}$ e $4,9 \text{ h}^{-1}$. Essa faixa de trabalho promoveria a produtividade de etanol, elevando a concentração final de etanol a $26,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, consumo integral de substrato e concentração final de biomassa de $15 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$, com 96h de experimento.

A intermitência da aeração também é uma estratégia de cultivo estudada para alcançar a micro-aeração, ou seja, submissão dos microrganismos a condições intermitentes de aeração e anaerobiose (ON-OFF da vazão de ar). López-Abelairas *et al.* (2013) usaram essa estratégia para produzir etanol em reator contínuo por *S. cerevisiae*, sendo que o fluxo de ar igual $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ era fornecido no *headspace*. Sob condições microaerófilas contínuas, houve um aumento da excreção de outros metabólitos além do etanol (glicerol, ácido láctico, ácido acético e ácido succínico), enquanto a intermitência de micro-aeração/anaerobiose favoreceu a redução da concentração desses compostos. A estratégia de intermitência também favorece uma produtividade de etanol mais elevada, maior estabilidade do sistema e consumo mais eficiente do mosto de trigo.

Em termos de estratégias de controle aplicadas a biorreator, Carius *et al.* (2014) propuseram um controlador de oxigênio dissolvido para estudar o efeito da limitação de oxigênio em cultivos contínuos de *Rhodospirillum rubrum*, baseado em modelo com dois graus de liberdade (2DOF). Esse controlador é composto por uma parte *feedforward*, baseado em um otimizador (*scatter search algorithm*) para gerar transições entre os estados estacionários (*setpoints*), e um controlador *feedback* PID, responsável por compensar os erros do modelo e perturbações do processo. O sinal de um sensor de oxirredução (potencial redox) *in situ* foi usado para alterar a composição do gás de entrada através da manipulação das vazões de gás nitrogênio e ar. A estratégia estabilizou eficazmente os estados estacionários depois de transitar entre níveis diferentes de limitação de oxigênio, garantindo que esse nutriente fosse o único substrato limitante durante os experimentos.

Farrell *et al.* (2015) desenvolveram a proposta de um “OD-estado” (Dissolved Oxygen-stat) para cultivos batelada alimentada de *E. coli* recombinante a fim de produzir subunidades de vacinas. Foram estudadas diferentes combinações de vazão constante de ar e agitação constante. Para a manutenção do nível de oxigênio dissolvido e garantir que o OUR não ultrapassasse o OTR, um controlador PID manipulava a vazão de alimentação. A estrutura de controle foi avaliada em termos de *up-scale* (reatores de 2, 20 e 200 L) e ela foi capaz de manter os níveis de oxigênio dissolvido no reator piloto. A indução realizada nas condições

proporcionadas pelo controlador promoveu maiores níveis de biomassa e proteínas de melhor qualidade.

A estrutura de controle de LIU *et al.* (2016) abordou o uso do potencial redox (sensor ORP) de fermentações em condições Very High Gravity (VHG, alta carga de substrato) de uma cepa floculante de *S. cerevisiae* SPSC01. A lógica proposta consistiu em manipular a aeração para garantir a manutenção do ORP no *setpoint* (em mV) por um sistema de liga/desliga da bomba de ar. O cultivo anaeróbio (ORP < -200mV) apresentou a menor formação de etanol e a presença de glicose residual após 72h de cultivo. Cultivos com vazão constante de ar (0,05 e 0,2 vvm) tiveram rápida formação de biomassa e consumo da glicose. Contudo, segundo os autores, a vazão de 0,2 L.min⁻¹ foi suficiente para causar o *stripping* do etanol resultando em uma concentração final menor de etanol. A fermentação conduzida de acordo com a estrutura de controle proposta foi a que apresentou melhor desempenho, em termos de floculação do levedo e viabilidade e da produção de etanol.

Para incorporar a informação de modelos metabólicos, alguns trabalhos propõem um controle preditivo com otimização em dois níveis: o primeiro nível se refere à otimização da formação de biomassa utilizando um modelo metabólico reduzido e simplificado e tendo os estados do sistema como condições iniciais; e o segundo nível é referente à otimização do controle ótimo realizado pelo MPC usando informações das variáveis de estado do reator e a resposta do modelo metabólico simplificado.

Chang *et al.* (2016) simularam um sistema de controle que manipulava as vazões de alimentação e o oxigênio dissolvido para maximizar a massa de etanol ao fim da batelada alimentada (produtividade de etanol no *setpoint* desejado). O microrganismo avaliado foi a *S. cerevisiae* e o modelo metabólico consistia somente das principais equações estequiométricas importantes na produção do bioetanol. De acordo com as simulações, após 15h de fermentação, o sistema atingiu uma concentração final de etanol de 13 g.L⁻¹.

Jabarivelisdeh *et al.* (2020) também usaram uma estratégia de otimização em dois níveis, sendo empregado um MPC adaptativo. O modelo metabólico reduzido utilizado foi de *E. coli*, e o cenário estudado foi de produção de etanol usando glicerol como fonte de carbono em processos em batelada. Os autores também incluíram um *Moving Horizon Estimator* (MHE) para ajuste de parâmetros do modelo metabólico. A otimização do modelo reduzido fornecia os estados necessários ao MPC para manipular o consumo específico de oxigênio das células. Ao fim de 15h de simulação, o sistema alcançou uma concentração final de etanol de 7 g.L⁻¹ a partir de 23 g.L⁻¹ de substrato, representando um rendimento de 0,30 g_{etanol}.g_{substrato}⁻¹.

O uso de informações de fluxos metabólicos aplicados ao controle de biorreatores foi também explorado por Mesquita *et al.* (2019). A estratégia consistiu em manipular a vazão de ar e de alimentação de acordo com modelos na forma de correlações matemáticas dos dados metabólicos obtidos *in silico*. Semelhante ao que será descrito no capítulo 5 dessa Tese, diferentes fluxos de assimilação de glicose (J_s) e de oxigênio (J_{O_2}) foram usados como dados de entrada, empregando-se o método de otimização pFBA (parsimonious Flux Balance Analysis) (LEWIS *et al.*, 2010) e o modelo escala genômica iND750 (DUARTE; HERRGÅRD; PALSSON, 2004). A maximização da biomassa foi utilizada como função objetivo, pois as outras funções objetivo não representavam bem o funcionamento real das células.

A partir das simulações do GSM, foi possível observar regiões de fluxos de assimilação da fonte de carbono (J_s) e de oxigênio (J_{O_2}) que proporcionaram um aumento no fluxo metabólico de etanol (J_{EtOH}) (MESQUITA, 2017). Para obtenção dessas regiões, em cada fluxo de substrato estudado, o fluxo de oxigênio foi reduzido até o ponto que foi observado um máximo para o etanol, após esse ponto os fluxos de etanol começaram a sofrer redução. Como as condições de fluxos máximos de etanol foram obtidas em condições muito baixas de fluxo de oxigênio, a região operacional selecionada representou cerca de 80-90% do fluxo máximo de etanol (denominados de pontos ótimos de produção de etanol). Dessa forma a estratégia de cultivo para o fornecimento de oxigênio e instrumentação com *hardware* disponível seria factível de ser desenvolvida. Os modelos inseridos que compuseram a lei de controle foram definidos observando os pontos ótimos de produção de etanol. No trabalho desenvolvido no mestrado, foram avaliadas uma estratégia de controle tipo malha aberta e outra estratégia tipo malha fechada. No caso dos cultivos com o controle tipo malha fechada o objetivo de controle foi manter o quociente respiratório das células (RQ) dentro da faixa desejada.

As estratégias foram avaliadas em cultivos batelada alimentada conduzidos com levedura de panificação comercial, em meio mínimo contendo glicose. Alcançou-se rendimento de etanol de cerca de $0,46 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e produtividade de cerca de $6,0 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Esses valores foram superiores ao rendimento ($0,38 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) e à produtividade ($3,4 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) obtidos em experimento que reproduziu a estratégia de fermentação tipicamente adotada em usinas (sem fornecimento de fase gasosa), o que demonstra o potencial do sistema de controle proposto (MESQUITA, 2017). Porém, apesar dos resultados promissores obtidos, verificou-se que a estratégia proposta se tornava menos eficiente, superestimando os fluxos fornecidos de oxigênio e substrato em relação aos fluxos realmente assimilados pelas células, à medida que a concentração de etanol no meio aumentava, levando à ocorrência de inibição pelo produto e/ou à perda de viabilidade (MESQUITA *et al.*, 2019).

Por fim, com base nos trabalhos apresentados que tratam do fornecimento de O_2 ou da produção de um metabólito específico, a presente proposta procura contribuir no desenvolvimento de controle avançado do fornecimento de O_2 para biorreatores em condições de micro-aerobiose. O uso conjunto das ferramentas de Biologia de Sistemas, Redes Neurais como modelos para um problema inverso, Operabilidade de Processos, Algoritmos Biomiméticos e do controle clássico não é usual e foi pouco abordado pela literatura até o momento. Um controlador que identifique e forneça oxigênio de acordo com os fluxos ideais para maximizar um determinado metabólito é promissor, permitindo, neste caso, o surgimento de novas estratégias eficientes de cultivo desenhadas com um controlador a nível metabólico.

4 UMA METODOLOGIA EXPERIMENTAL SIMPLES PARA CARACTERIZAR A CINÉTICA DOS MICRORGANISMOS HOMOFERMENTATIVOS APLICADA À FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR *S. cerevisiae*

4.1 INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é um dos processos mais conhecidos e mais estudados para a conversão de açúcares em etanol. No entanto, é necessário um microrganismo adequado para garantir um processo de produção competitivo. O microrganismo deve ser capaz de cumprir uma série de pré-requisitos considerados essenciais, como tolerância às condições industriais, amplo uso de fonte de carbono e alta produtividade (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

Entre os vários microrganismos capazes de realizar a fermentação alcoólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo com maior tolerância às condições industriais (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Devido a diversos fatores de estresse, o uso contínuo desta levedura contribuiu para a sua adaptação evolutiva, gerando cepas industriais qualificadas ao ambiente das biorrefinarias (BASSO *et al.*, 2011, 2008; LOPES *et al.*, 2017). Porém, essas cepas isoladas do ambiente industrial ainda precisam ser caracterizadas em relação às condições ótimas de cultivo e cinética de crescimento, para uma seleção racional da cepa a ser propagada durante o resto do processo produtivo.

As biorrefinarias geralmente operam com uma alta concentração de fonte de carbono, o que acaba desencadeando diferentes estresses ao metabolismo celular, como é o caso da pressão osmótica (CRAY *et al.*, 2015). A presença de inibidores provenientes de etapas de pré-tratamento da matéria-prima ou a alta concentração de etanol também são fontes de estresses que podem levar a fortes alterações na cinética de crescimento (BENBADIS *et al.*, 2009; CRAY *et al.*, 2015; RIVERA *et al.*, 2017). A obtenção do perfil cinético do microrganismo submetido a diferentes condições de cultivo que simulam as condições industriais é um passo importante para melhoria do processo (WOODLEY, 2017).

O monitoramento da fermentação pela liberação da massa de CO₂ é uma alternativa eficiente para o estudo de diversas condições de cultivo anaeróbio. Essa metodologia exige menos tempo de bancada e recursos (MILESSI *et al.*, 2020) em relação aos estudos em biorreatores (CARDOSO *et al.*, 2020). Os dados de liberação de massa de CO₂ podem ser facilmente convertidos em dados de conversão de açúcar, produção de etanol e velocidade de

crescimento. Com toda essa informação disponível é possível caracterizar o crescimento do microrganismo homofermentativo sem alterar as condições de anaerobiose.

Este capítulo apresenta uma metodologia simples baseada na medição da massa de CO₂ liberada (Apêndice A, Figura A-1), que pode ser utilizada para identificação de modelos cinéticos, possibilitando uma avaliação rápida do desempenho das cepas de *S. cerevisiae* em diferentes condições fermentativas. Os estudos de caso apresentados empregaram cepas industriais de levedura em condições comumente encontradas em usinas de produção de etanol. O modelo cinético gerado a partir das medições de CO₂ foi validado utilizando dados de um biorreator de 5 L operado em condições HG (High Gravity, carga moderada da fonte de carbono).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A abordagem experimental adotada neste capítulo se baseou no uso de mini-reatores para acompanhar as fermentações, com monitoramento por medidas de massa dos mini-reatores para acompanhar a produção de CO₂ (Seção 4.2.3.1 e Figura 4.1). Dezesesseis dessas fermentações (em duplicatas) foram realizadas com intuito de avaliar o desempenho de duas cepas de leveduras industriais, cultivadas em composições diferentes de meio de cultura, a fim de avaliar a influência de diferentes concentrações iniciais de glicose, etanol, e melaço no crescimento da levedura, conforme descrito na seção 4.2.3. Em seguida, foram obtidos os perfis das variáveis de estado da fermentação (concentrações de substrato, etanol e biomassa) a partir dos dados de massa de CO₂ medidos, utilizando-se o conjunto de equações mostradas na seção 4.2.3.5. Cada cepa foi caracterizada em termos de cinética de consumo de substrato e da influência da inibição de etanol (seção 4.2.5), dessa forma foi possível selecionar a cepa industrial mais adequada aos cultivos em biorreator. Na avaliação da confiabilidade da metodologia proposta, os valores experimentais da massa total de CO₂ liberada para cada condição estudada nos mini-reatores foram comparados com os valores estequiométricos de massa de CO₂ estimada a partir das concentrações de etanol (medidas pelo HPLC em amostras obtidas ao final da fermentação). A confiabilidade da abordagem experimental também foi averiguada através de simulações de fermentação HG utilizando os modelos cinéticos previamente identificados (seção 4.2.5) e validando os resultados simulados com dados experimentais dos cultivos em biorreator (seção 4.2.4).

4.2.1 Microrganismos e meios de cultura

Todos os experimentos foram realizados utilizando as leveduras industriais liofilizadas FT858L e FERMEEL, gentilmente doadas pela Fermentec Ltda (Piracicaba, Brasil). Foram utilizadas duas composições de meios: meio mínimo definido e industrial. O meio mínimo definido ($5,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $2,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ureia, 3 ppm Kamoran[®]) foi usado com glicose como fonte de carbono (SILVA *et al.*, 2012a). O pH foi corrigido para 4,5 antes da incubação. O antibiótico Kamoran[®] foi gentilmente doado pela Química Real (Belo Horizonte, Brasil). Para os estudos com meio de fermentação industrial, o melaço de cana-de-açúcar, gentilmente doado pela Ipiranga Agroindustrial S.A. (Descalvado, Brasil), foi diluído, complementado com componentes do meio mínimo e utilizado como única fonte de carbono. Todos os experimentos foram realizados em condições não assépticas. O uso de melaço teve como objetivo reproduzir as condições de fermentação em usinas brasileiras de bioetanol (BASSO *et al.*, 2008).

4.2.2 Preparação inóculo

Para o preparo dos inóculos, as leveduras liofilizadas foram hidratadas e ativadas. Para hidratação, foram adicionados 0,25 g de células liofilizadas a frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de água esterilizada e incubados a 250 rpm e 30°C por cerca de 1 h (SCHMIDT; HENSCHKE, 2015). Em seguida, um volume de 100 mL do meio mínimo descrito anteriormente (com a concentração de cada componente duplicada) foi adicionado ao frasco, e a ativação foi realizada por 2 h, sob as mesmas condições de incubação (SCHMIDT; HENSCHKE, 2015).

4.2.3 Estratégia experimental

Os estudos de caracterização das cepas industriais foram realizados em mini-reatores, utilizando o meio mínimo, considerando a influência das concentrações do substrato e do etanol na cinética de crescimento. A cepa com melhor desempenho foi selecionada para o estudo da cinética de crescimento no meio de fermentação industrial (à base de melaço de cana-de-açúcar), bem como para realizar os cultivos em biorreator. O procedimento experimental para cada estudo é descrito nas próximas seções, bem como os procedimentos de cálculo que recorreram aos mini-reatores para avaliar o consumo de substrato, a formação do produto, e a velocidade específica de crescimento. Os experimentos em mini-reatores foram realizados em

duplicata. Ao final da fermentação, a densidade ótica (DO) do caldo foi medida, e a viabilidade celular foi determinada. A suspensão final foi então centrifugada a 10.000 rpm (9.520 rcf) por 10 min, a -4 °C, e a fração livre de células foi armazenada a -20 °C para análise do substrato e concentrações do produto, conforme descrito na seção 4.2.6.

4.2.3.1 Experimentos com mini-reatores

Os experimentos de caracterização das cepas foram realizados em mini-reatores de 5 mL (Apêndice A, Figura A-1) dotados de saída de gás, contendo 4 mL do meio (DEMEKE *et al.*, 2015; MILESSI *et al.*, 2020c). Após a inoculação, os mini-reatores foram incubados estaticamente, com temperatura controlada de 30°C. A densidade ótica inicial (DO) foi de 4,5 para todas as fermentações.

As fermentações conduzidas nos mini-reatores foram monitoradas pela determinação da massa de CO₂ liberada, utilizando uma balança analítica. A massa de CO₂ liberada (mCO₂, em g) foi calculada utilizando a Eq. 4.1, que também considera a evaporação do meio isento de células (mini-reator de controle).

$$mCO_{2(t)} = (\text{Condição } N_{m,0} - \text{Condição } N_{m,t}) - (\text{Controle }_{m,0} - \text{Controle }_{m,t}) \quad (4.1)$$

Condição $N_{m,0}$ = Massa inicial do mini-reator ($t = 0$) para condição de cultivo N;

Condição $N_{m,t}$ = Massa de mini-reator no momento t para condição de cultivo N;

Controle $_{m,0}$ = Massa inicial do mini-reator ($t = 0$) para o controle (somente meio de cultura);

Controle $_{m,t}$ = Massa de mini-reator no momento t para o controle (somente meio de cultura).

4.2.3.2 Influência da concentração de glicose na velocidade específica de crescimento

A influência da concentração de substrato na cinética de crescimento foi investigada utilizando o meio mínimo definido (seção 4.2.1) complementado com dez concentrações iniciais de glicose: 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 g.L⁻¹. Para cada condição, a fermentação foi encerrada quando a produção de CO₂ cessou.

4.2.3.3 Inibição pelo etanol

Para ambas as cepas de levedura, a inibição do etanol foi avaliada pela suplementação do meio mínimo (seção 4.2.1) com cinco concentrações iniciais diferentes de etanol: 30, 60,

90, 120 e 150 g.L⁻¹. Também foi realizado um experimento de referência, sem suplementação de etanol (0 g.L⁻¹ de etanol como concentração inicial). Para todas essas condições, a concentração inicial de glicose foi de 30 g.L⁻¹. A evaporação foi avaliada utilizando mini-reatores controle preparados apenas com o meio, sem inóculo, juntamente com as respectivas concentrações iniciais de etanol. Os experimentos foram encerrados quando a produção de CO₂ cessou para a condição com 0 g.L⁻¹ de etanol.

4.2.3.4 Influência do melão na velocidade específica de crescimento

A avaliação da cinética de crescimento também foi realizada para um meio industrial, sendo o melão de cana-de-açúcar utilizado como fonte de carbono, substituindo a glicose. Nesta etapa, apenas a cepa mais promissora identificada nos experimentos anteriores foi utilizada. A fonte de carbono nesta etapa foi a sacarose, que é convertida em glicose e frutose pela enzima invertase presente no periplasma da célula de levedura (KULSHRESTHA *et al.*, 2013). A concentração de substrato (Cs) foi representada por açúcares redutores totais (ART).

O melão utilizado nesses experimentos tinha uma concentração de ART de 800±10 g.L⁻¹. Da mesma forma que o procedimento descrito anteriormente (seção 4.2.3.2), foram avaliadas diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores totais: 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 g.L⁻¹. Para cada condição, a fermentação foi encerrada quando a produção de CO₂ cessou.

A inibição por etanol também foi estudada para a levedura selecionada cultivada em melão. O procedimento foi o mesmo descrito na seção 4.2.3.3, sendo a glicose substituída por melão de cana-de-açúcar em uma concentração inicial de ART de 30 g.L⁻¹. Os experimentos terminaram quando a produção de CO₂ parou para a condição com 0 g.L⁻¹ de etanol.

4.2.3.5 Procedimentos de cálculo baseados na massa de CO₂ liberados

Os dados de mCO₂ forneceram informações importantes para avaliação do desempenho dos cultivos. Estes dados de mCO₂ foram compilados como descritos na seção 4.2.3.1. Para condições iniciais conhecidas e assumindo que todos os experimentos em mini-reatores eram anaeróbios, os dados de massa de CO₂ fornecem informações suficientes para inferir todos os estados do cultivo (concentração de células, substratos e etanol), utilizando conceitos de balanço de massa e algumas correlações, conforme descrito a seguir.

As massas de etanol e de substrato podem ser calculadas usando a equação estequiométrica para formação de etanol a partir de hexoses: cada 2 mols de CO₂ produzidos correspondem a 2 mols de etanol, enquanto 1 mol de hexose é consumido (SHULER; KARGI, 2002). Assim, é produzido 1,05 g de etanol e consumido 2,05 g de glicose (ou açúcar redutor) por g de CO₂ produzido. As concentrações de substrato e etanol foram obtidas dividindo a massa correspondente pelo volume do meio no mini-reator. Utilizando os dados de massa de CO₂ no tempo t ($mCO_{2(t)}$), a massa de CO₂ no final do cultivo ($mCO_{2(fim)}$), e a conversão experimental ($X_{exp(fim)}$) (Eq. 4.2) foi possível estimar a conversão do substrato em um momento t ($X_{(t)}$) (Eq. 4.3). A concentração residual de substrato foi calculada usando a Eq. 4.4. Para obter ($X_{exp(fim)}$), a concentração inicial de substrato (C_{S0}) e a concentração final de substrato ($C_{S,f}$) no meio foram medidos pelo HPLC.

$$X_{exp(fim)} = \frac{C_{S0} - C_{S,f}}{C_{S0}} \quad (4.2)$$

$$X_{(t)} = \frac{mCO_{2(t)}}{mCO_{2(fim)}} * X_{exp(fim)} \quad (4.3)$$

$$C_S(t) = C_{S0} * (1 - X_{(t)}) \quad (4.4)$$

Para estimar a velocidade de consumo de glicose (r_s), o balanço de massa para o substrato para processos batelada (Eq. 4.5) foi aplicado apenas aos dados da fase de crescimento a uma velocidade específica de crescimento constante, sendo o r_s obtido por regressão linear.

$$\frac{dC_S}{dt} = -r_s \quad (4.5)$$

Os valores de DO podem ser obtidos utilizando as informações mCO_2 . Para isso, a massa de CO₂ foi normalizada (Eq. 4.6):

$$mCO_{2,norm} = \frac{mCO_{2,t} - mCO_{2,0}}{mCO_{2,f} - mCO_{2,0}} \quad (4.6)$$

Onde: $mCO_{2,norm}$ = massa de CO₂ normalizada;
 $mCO_{2,t}$ = massa de CO₂ no tempo t;
 $mCO_{2,f}$ = massa final de CO₂ ;
 $mCO_{2,0}$ = massa inicial de CO₂ .

Neste caso, a variação da densidade ótica normalizada (ΔDO_{norm}) pode ser empiricamente correlacionada com a variação do $mCO_{2,norm}$ através de uma função linear, segundo Eq. 4.7:

$$\Delta DO_{norm} = b * (\Delta mCO_{2,norm}) + c \quad (4.7)$$

Na Eq. 4.7, b e c são os parâmetros da função linear. A constante b apresentou valor de $0,98 \pm 0,01$, enquanto a constante c foi descartada por ser estatisticamente igual a zero. As equações obtidas foram as mesmas para as duas cepas. Para o ajuste da Eq. 4.7 foi realizado um conjunto separado de experimentos com meio mínimo ($C_s = 30 \text{ g.L}^{-1}$) por 12 h, com as fermentações do mini-reator (em triplicata) sendo finalizadas a cada hora para a aferição da massa do mini-reator, bem como a determinação da concentração celular por leituras de densidade ótica (DO) em $\lambda = 600 \text{ nm}$ e pelo método de massa seca (OLSSON; NIELSEN, 1997). A equação 4.7 é válida quando o crescimento celular é univocal à produção de etanol, como ocorre sob condição anaeróbica, assumida para todos os experimentos em mini-reator. A Eq. 4.7 foi escrita em termos de dados normalizados para que a correlação pudesse ser aplicada a qualquer densidade ótica inicial (concentração inicial do inóculo)

A densidade ótica no tempo t (DO) foi estimada usando Eq. 4.8:

$$DO = \Delta DO_{\text{norm}}(DO_f - DO_0) + DO_0 \quad (4.8)$$

Onde, DO_0 é a densidade ótica inicial ($\lambda = 600 \text{ nm}$) do cultivo e DO_f é a densidade ótica final do cultivo. A conversão das medidas de DO para concentração celular, $C_x \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$ foi realizado empregando a Eq. 4.9 (cepa FT858L) e a Eq. 4.10 (cepa FERMEL).

$$C_x = (0,47 \pm 0,01) \cdot DO \quad R^2 = 0,98 \quad (4.9)$$

$$C_x = (0,49 \pm 0,02) \cdot DO \quad R^2 = 0,97 \quad (4.10)$$

Deve-se notar que, para os experimentos em mini-reator, as leituras de DO foram obtidas no início e no final dos experimentos, enquanto para o biorreator, as leituras *at-line* eram realizadas a cada hora. O grande número de experimentos (diferentes condições iniciais de substrato e etanol) compensa a falta de dados de DO ao longo das fermentações para os experimentos em mini-reator. Para todas as leituras de DO, o meio livre de células foi usado como referência (branco).

A velocidade específica de crescimento (μ_v) durante a fase de crescimento em velocidade constante, pode ser descrita por Eq. 4.11 (SHULER; KARGI, 2002):

$$\ln(Cx_t) = \ln(Cx_0) + \mu_v * t \quad (4.11)$$

Onde, Cx_t é a concentração de biomassa no tempo t e Cx_0 é a concentração inicial de biomassa.

Os rendimentos globais de etanol foram calculados utilizando os dados de concentração experimental obtidos a partir das análises do HPLC, segundo eq. 4.12.

$$Y_{P/S} = \frac{(\text{Massa Final} - \text{Massa Inicial})_{\text{Etanol}}}{(\text{Massa Inicial} - \text{Massa Final})_{\text{Glicose ou Açúcares Redutores}}} \quad (4.12)$$

4.2.4 Cultivos HG em biorreatores

Duas fermentações em batelada foram realizadas em biorreator de tanque agitado de 5 L. A primeira fermentação foi semelhante ao processo típico da “Planta Brasileira de Bioetanol” (PBB), conduzido sem fornecimento de gás ao biorreator. A fermentação PBB foi utilizada para validar o modelo de crescimento descrito pela Eq. 4.13 (seção 4.2.5). O crescimento celular sob uma condição micro-aerada foi avaliado no segundo cultivo (Qfix-B), o qual foi conduzido mantendo-se o fornecimento de vazão de ar constante em 0,36 L.min⁻¹. No caso do Qfix-B, os resultados foram utilizados para obter uma expressão cinética modificada que fosse capaz de descrever o crescimento sob limitação de oxigênio. O sistema de supervisão (SUPERSYS), desenvolvido *in-house* utilizando o *Labview*[®], foi utilizado para monitoramento e controle durante o cultivo (HORTA *et al.*, 2012, 2015).

O volume de meio foi de 4 L e polipropileno glicol (PPG) foi adicionado para controle de espuma (1mL.L⁻¹). O meio mínimo descrito na seção 4.2.1 foi empregado. A temperatura foi controlada a 30°C, o pH em 4,5, e a agitação foi mantida em 500 rpm. O controle do pH foi feito pela adição automática de 20% NH₄OH ou 20% H₃PO₄. A concentração inicial de glicose foi de 150g.L⁻¹, com o objetivo de alcançar uma condição HG (Very High Gravity), reproduzindo o processo *Melle-Boinot* (AMORIM *et al.*, 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; LOPES *et al.*, 2016) utilizado na maioria das plantas brasileiras de bioetanol. A concentração celular inicial foi de 3,0 g.L⁻¹. Amostras (20 mL) foram feitas a cada hora para determinação da densidade ótica, bem como para análises de substrato e metabólitos. As barras de erro mostradas para os dados dos biorreatores representam o desvio padrão das triplicatas amostrais.

4.2.5 Modelagem cinética e validação

Utilizando as equações da seção 4.2.3.5, os dados adquiridos durante os experimentos com mini-reatores foram convertidos em informações cinéticas descrevendo as mudanças na velocidade específica de crescimento para as diferentes concentrações de substrato e etanol estudadas. É proposto o uso do modelo cinético descrito pela Eq. 4.13, que considera tanto a inibição do produto (termo III) (TYAGI; GHOSE, 1982), quanto a inibição por substrato (termo II) (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968):

$$\mu = \overbrace{\frac{\mu_{\max} \cdot C_s}{K_s + C_s}}^{\text{termo I}} \cdot \overbrace{\exp\left(-\frac{C_s}{S_m}\right)}^{\text{termo II}} \cdot \overbrace{\left(1 - \frac{C_p}{P_m}\right)}^{\text{termo III}} \quad (4.13)$$

Onde μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento, K_s é a constante de saturação, C_s é a concentração de substrato, S_m é a constante de inibição do substrato, C_p é a concentração de etanol, e P_m é a constante de inibição do produto.

Os parâmetros μ_{\max} e K_s foram obtidos utilizando dados dos experimentos em mini-reator sem influência de altas concentrações de substrato sobre o crescimento celular ($C_s < 60 \text{ g.L}^{-1}$). Ambos os parâmetros foram obtidos pelo ajuste do termo I da Eq. 4.13 aos dados de μ (obtidos usando a Eq. 4.11) *versus* as concentrações de C_s (condição estudada).

Com ambos os parâmetros definidos e fixados, S_m foi obtido utilizando todos os dados dos experimentos de influência de fonte de carbono. Deve-se notar que a constante S_m descreve apenas o efeito da alta concentração de substrato nas células. Em outras palavras, apenas dados correspondentes a concentrações de etanol inferiores a 30 g.L^{-1} foram utilizados para a obtenção de S_m (estágio inicial de fermentação), de modo que qualquer interferência da concentração de etanol na cinética de inibição por substrato foi evitada. Para a estimativa de S_m , os termos I e II da Eq. 4.13 foram ajustados aos dados experimentais selecionados.

O parâmetro P_m foi obtido utilizando dados dos estudos em mini-reator que avaliaram a inibição por etanol e a Eq. (4.14), a qual foi obtida a partir da Eq. 4.13 reduzida aos termos I e III. Nesse caso, a inibição por substrato (termo II) pode ser desconsiderada, já que o estudo da cinética de inibição por etanol foi realizado em concentração inicial de substrato de 30 g.L^{-1} . Supondo C_s suficientemente alto tal que $(K_s + C_s) \approx C_s$ (apenas dados experimentais do início das fermentações foram selecionados para atender a essa suposição), a Eq. 4.13 reduzida aos termos I e II pode ser simplificada, gerando a Eq. 4.14.

$$\mu = \mu_{\max} * \left(1 - \frac{C_p}{P_m}\right) \quad (4.14)$$

Todos os parâmetros foram estimados utilizando-se o algoritmo *Trust-Region* no aplicativo de *curve fitting* do Matlab®.

Para avaliar a confiabilidade da abordagem experimental proposta com base nos dados da massa liberada de CO_2 , o modelo foi validado utilizando os dados experimentais de biorreator das concentrações de biomassa (obtidos por leituras de DO), glicose e etanol (análises HPLC). A função Matlab® *ode15s* foi usada para resolver o sistema de equação diferenciais ordinárias (Eqs. 4.15-4.17).

$$\frac{d(C_x)}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (4.15)$$

$$\frac{d(C_p)}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot (\mu \cdot C_x) \quad (4.16)$$

$$\frac{d(C_s)}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_x + m_s \cdot C_x\right) \quad (4.17)$$

A constante de manutenção (m_s) foi estimada pela minimização do erro quadrado médio (MSE, Eq. 4.18), utilizando o algoritmo de otimização global *simulated annealing* (SA) (HORTA *et al.*, 2014). O algoritmo SA é uma rotina de otimização global já implementada. Os rendimentos dos produtos ($Y_{P/S}$) e células ($Y_{X/S}$) foram obtidos por regressão linear, utilizando os dados experimentais dos cultivos em biorreator obtidos a partir das medidas de HPLC e concentração de biomassa (leituras de DO), respectivamente. Os produtos considerados foram etanol e glicerol (uma equação para cada um, semelhante a Eq. 4.16). Ressalta-se que não foi realizada reparametrização, por isso foi um forte teste de validação do modelo obtido a partir dos dados do mini-reator. Na Eq. 4.18, x_i representa o valor experimental, \hat{x}_i é o valor previsto, e np é o número de pontos experimentais.

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \hat{x}_i)^2}{np} \quad (4.18)$$

Os resultados simulados foram comparados aos experimentais. A avaliação do ajuste do modelo proposto (Eqs. 4.13 e 4.15-4.17) aos dados experimentais foi feita mediante o cálculo do erro padrão residual (RSE) (Eq. 4.19). Na Eq. 4.19, x_i representa o valor experimental, \hat{x}_i é o valor previsto, e np é o número de pontos experimentais. Também foi realizada uma extensão do modelo para cultivo micro-aerado, com a Eq. 4.19 sendo também utilizada para avaliar o do ajuste desta extensão.

$$RSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{np} (x_i - \hat{x}_i)^2}{np-2}} \quad (4.19)$$

4.2.6 Procedimentos analíticos

A viabilidade celular foi monitorada no final dos experimentos de caracterização e nos cultivos em biorreator, utilizando um microscópio ótico (DM3000, Leica) e contagem de células em uma câmara de Neubauer, de acordo com a técnica azul de metileno (MILESSI *et al.*, 2020c).

As concentrações de etanol, glicerol, glicose, sacarose e frutose foram determinadas por HPLC com detector de índice de refração (Modelo 410, Waters) (MILESSI *et al.*, 2020c). O sistema foi operado com a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad), fase móvel consistindo em ácido sulfúrico de 5 mM, a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹, e temperatura de 50°C.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como apontado anteriormente, a estratégia experimental proposta pode ser empregada para diversos fins. As seções 4.3.1 e 4.3.2 apresentam a aplicação da metodologia para caracterizar o desempenho de duas cepas industriais de *S. cerevisiae* (FT858L e FERMELE), com intuito de selecionar racionalmente a cepa mais adequada. Os dados brutos de massa de CO₂ para todas as fermentações em mini-reator estão disponíveis no Apêndice A (Figuras A-2 a A-4). Como o nome indica, a seção 4.3.3 aborda a influência do melão na cinética de crescimento da cepa selecionada usando a mesma estratégia experimental proposta. A seção 4.3.4 apresenta uma discussão sobre a confiabilidade da abordagem experimental proposta. Na seção 4.3.5, os parâmetros estimados para o modelo cinético são apresentados e comparados com a literatura. E, finalmente, a validação do modelo com dados experimentais dos cultivos em biorreator e a extensão do modelo para uma condição micro-aerada são apresentadas e discutidas nas seções 4.3.6 e 4.3.7, respectivamente.

4.3.1 Influência da concentração de glicose

A concentração de substrato inferida no momento t (Eq. 4.4) foi utilizada para determinar a velocidade de consumo de substrato (r_s , Eq. 4.5) para cada concentração inicial de substrato estudada (Figura 4.1). Além da velocidade de consumo de substrato, outros índices de desempenho, como viabilidade celular e conversão (mostrados na Tabela 4.1), foram avaliados para identificar a cepa de levedura mais promissora a ser utilizada em cultivos em biorreator de 5 L. Para todas as concentrações iniciais de glicose estudadas, a velocidade de consumo de substrato foi estatisticamente a mesma (teste de Tukey com nível de confiança de 95%) para FT858L e FERMELE (Figuras 4.1A e 4.1B), com um valor médio de $5,9 \pm 0,2$ g_{Substrato} · L⁻¹ · h⁻¹.

Para concentrações iniciais de glicose de 120 g · L⁻¹ ou acima, o consumo de substrato desacelerou após 14 horas de cultivo (Figura 4.1B). Essa mudança no perfil da velocidade de consumo da fonte de carbono sugere que, nas condições utilizadas, a cepa FERMELE foi mais sensível ao etanol produzido à medida que a fermentação prosseguia e maiores concentrações de etanol se acumulavam.

Figura 4.1 - Concentrações de glicose inferidas a partir dos dados de mCO_2 e velocidade de consumo de substrato para cada condição inicial de concentração de substrato estudada, para (A) FT858L e (B) FERMEL. Velocidade de consumo de glicose (r_s) em $g_{\text{Substrato}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$.

Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4 \text{ mL}$, meio mínimo, estático, $\text{pH } 4,5$, 30°C , $\text{DO}_0 = 4,5$ ($C_{X0} = 2,2 \text{ g} \cdot L^{-1}$), viabilidade inicial = 75%. ^{a,b,c...g,h} Valores de r_s comparados usando o teste Tukey (nível de confiança de 95%), onde as mesmas letras significam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação estatística do r_s para diferentes concentrações iniciais de substrato foi realizada para os conjuntos de dados das Figuras 4.1A, 4.1B, e 4.3A.

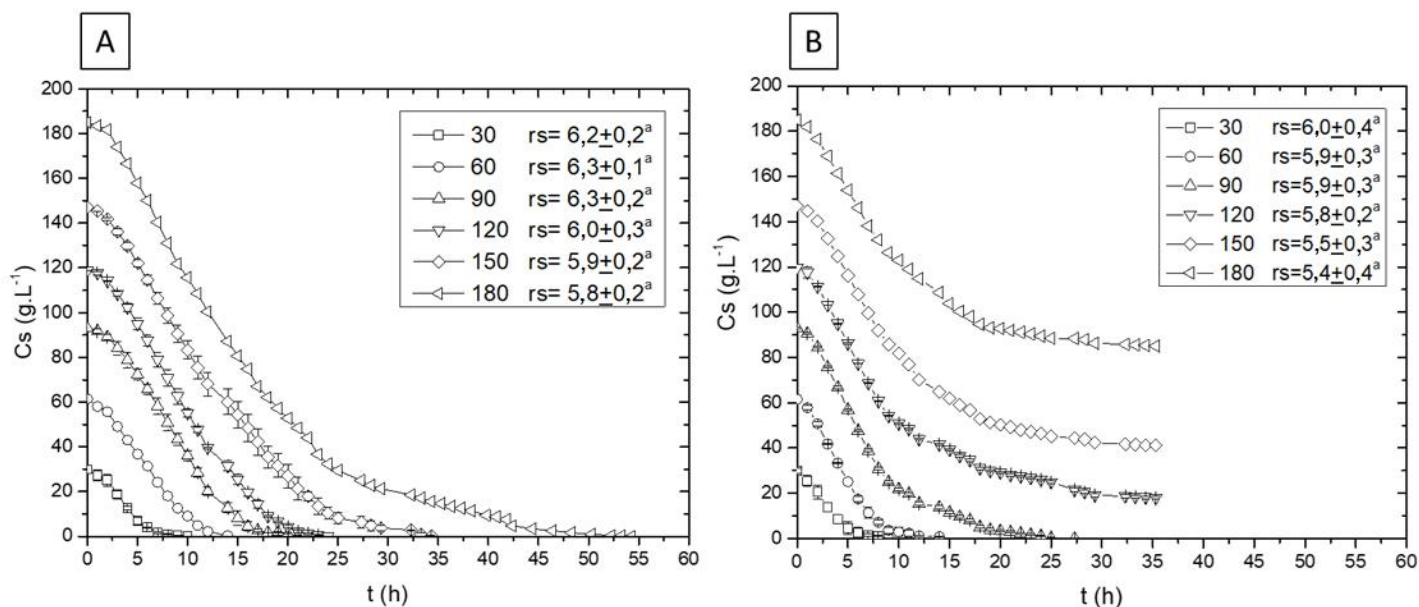


Tabela 4. 1 - Índices de desempenho utilizados para avaliar as cepas de levedura em diferentes condições iniciais de concentração de fonte de carbono. Todos os experimentos em mini-reatores, V = 4 mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30 °C, DO₀ = 4,5 (C_{X0} = 2,2 g.L⁻¹), viabilidade inicial = 75%. C_x é a concentração de biomassa, X é a conversão de substrato, e Y_{P/S} é o rendimento do etanol (calculado utilizando a concentração final obtida a partir da análise HPLC). ^{a...g} C_x; ^{h...k} Y_{P/S}; ^{l...s} Viabilidade: Mesmas letras sobrescritas significam que não há diferença estatística com o mesmo grupo de índices comparado usando o teste Tukey em um nível de confiança de 95%.

(A)	FT858L em Meio Mínimo				FERMEL em Meio Mínimo			
Glicose (g.L ⁻¹)	Final Cx (g.L ⁻¹)	X (%)	Y _{P/S} (g _{etanol} . g _{substrato} ⁻¹)	Viabilidade Final (%)	Final Cx (g.L ⁻¹)	X (%)	Y _{P/S} (g _{etanol} . g _{substrato} ⁻¹)	Viabilidade Final (%)
29,9±0,7	3,2±0,1 ^a	100,00	0,43±0,02 ^{hj}	85±5 ^{lm}	2,6±0,1 ^b	100,00	0,35±0,02 ⁱ	85±5 ^{lm}
62±1	3,9±0,1 ^{ce}	99,80	0,42±0,01 ^{hj}	80±3 ^m	3,2±0,1 ^{ad}	100,00	0,34±0,02 ⁱ	56±4 ⁿ
93±1	4,2±0,1 ^c	100,00	0,39±0,01 ^h	56±3 ⁿ	3,8±0,1 ^{ce}	100,00	0,33±0,02 ⁱ	19±4 ^o
120±2	4,20±0,05 ^c	99,36	0,39±0,02 ^h	45±3 ^p	3,8±0,1 ^{ce}	85,07	0,34±0,01 ⁱ	6±2 ^q
148±3	3,8±0,1 ^{ce}	100,0	0,40±0,01 ^h	34±2 ^r	3,8±0,1 ^{ce}	72,11	0,33±0,03 ⁱ	2±1 ^s
185±3	3,6±0,1 ^{ade}	100,0	0,40±0,01 ^h	6±2 ^s	3,5±0,1 ^{ade}	54,02	0,33±0,02 ⁱ	0
(B)	FT858L em Melaço							
Melaço (g.L ⁻¹)	Final Cx (g.L ⁻¹)	X (%)	Y _{P/S} (g _{etanol} . g _{substrato} ⁻¹)	Viabilidade Final (%)				
33±2	4,3±0,1 ^c	100,0	0,49±0,01 ^k	90±2 ^l				
65±3	4,7±0,1 ^{fg}	100,0	0,48±0,01 ^k	85±3 ^{lm}				
95±3	4,8±0,1 ^{fg}	100,0	0,48±0,02 ^k	80±5 ^m				
124±3	4,8±0,1 ^{fg}	100,0	0,47±0,01 ^{jk}	61±5 ⁿ				
152±2	4,8±0,1 ^{fg}	100,0	0,47±0,01 ^{jk}	53±4 ^{np}				
184±3	5,0±0,1 ^g	100,0	0,48±0,03 ^{jk}	22±4 ^o				

Sob a condição de 120 g.L^{-1} de glicose, a conversão final obtida para FERMEL foi reduzida em 22%. Conversões ainda menores foram observadas para FERMEL nas concentrações iniciais de glicose de 150, 180 e 120 g.L^{-1} (Figura 4.1B). A viabilidade celular da cepa FERMEL (Tabela 4.1) diminuiu à medida que a concentração de substrato aumentava, enquanto a viabilidade celular da FT858L só começou a decrescer a partir da concentração de glicose de 90 g.L^{-1} . A diminuição da viabilidade da FERMEL pode ter contribuído para a redução observada na conversão.

Para FT858L (Tabela 4.1), o rendimento em etanol de $0,40 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ foi o mesmo para todas as condições estudadas. Um menor rendimento em etanol de $0,34 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ foi obtido para FERMEL (Tabela 4.1). Em geral, uma maior concentração celular final (Cx) foi obtida para FT858L, em comparação com FERMEL (Tabela 4.1). Houve um aumento da concentração celular final para FT858L e FERMEL até a concentração de glicose de 90 e 60 g.L^{-1} respectivamente. A partir da concentração de glicose de 90 g.L^{-1} , a concentração celular final permaneceu a mesma para os ensaios com a FERMEL. Tal diferença nos rendimentos em etanol e nas concentrações de células finais sugere que as células da cepa FERMEL redirecionaram seus recursos para a manutenção celular, em vez de usá-los para produção de etanol ou crescimento (Vos *et al.*, 2016).

4.3.2 Tolerância ao etanol

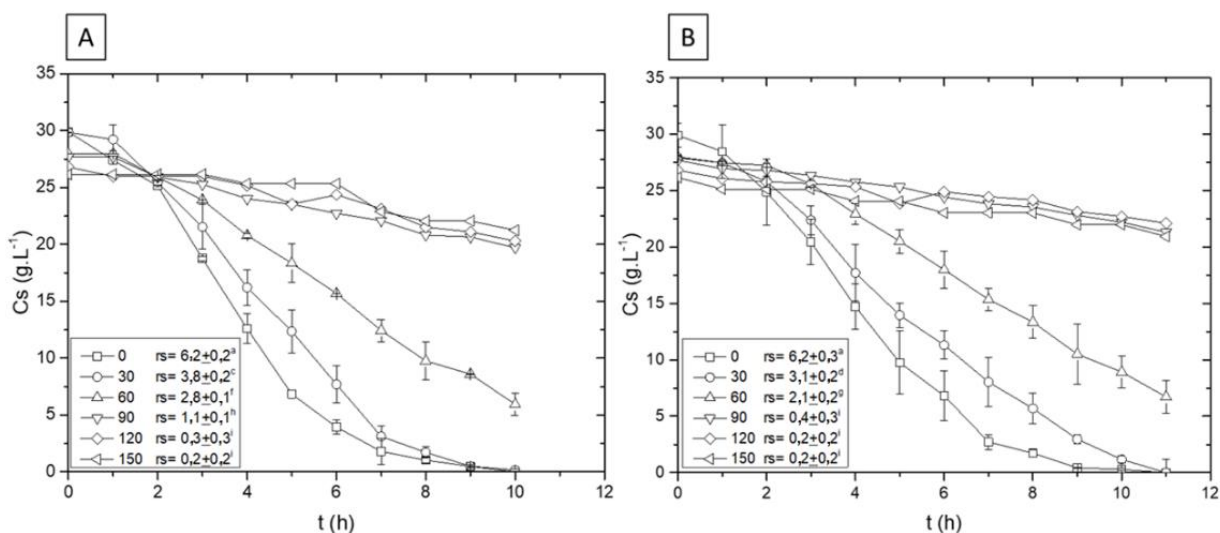
Na faixa de concentração de etanol de 30 a 90 g.L^{-1} , FT858L apresentou melhor desempenho em relação à velocidade de consumo de substrato (Figura 4.2A), em comparação com FERMEL (Figura 4.2B). Nas concentrações de etanol de 120 e 150 g.L^{-1} , não houve diferença entre as cepas para a velocidade de consumo da fonte de carbono (Figuras 4.2A e 4.2B), conversão, viabilidade celular final, concentração celular final e rendimento em etanol (Tabela 4.2). Para ambas as cepas de levedura, o metabolismo foi bastante reduzido, com uma diminuição da concentração celular e sem células viáveis após 10h de fermentação sob alta concentração de etanol (120 ou 150 g.L^{-1}) (Tabela 4.2). Para a FERMEL, a viabilidade reduzida (Tabela 4.2) evidencia sua maior sensibilidade ao etanol, mesmo quando há apenas 30 g.L^{-1} de etanol no meio.

Tabela 4. 2 - Índices de desempenho utilizados para avaliar as cepas de levedura em diferentes condições iniciais de concentração de etanol. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4 \text{ mL}$, meio mínimo, estático, $\text{pH } 4,5$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{OD}_0 = 4,5$ ($C_{X0} = 2,2 \text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial = 75% . C_x é a concentração de biomassa, X é a conversão de substrato, e $Y_{P/S}$ é o rendimento do etanol (calculado utilizando a concentração final obtida a partir da análise HPLC). ^{a...g} C_x ; ^{h...n} $Y_{P/S}$; ^{o...t} Viabilidade: Mesmas letras sobrescritas significam que não há diferença estatística com o mesmo grupo de índices comparado usando o teste Tukey em um nível de confiança de 95% .

(A)	FT858L em Meio Mínimo				FERMEL em Meio Mínimo			
Etanol (g.L^{-1})	Final C_x (g.L^{-1})	X (%)	$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)	Viabilidade Final (%)	Final C_x (g.L^{-1})	X (%)	$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)	Viabilidade Final (%)
0	3,2±0,1 ^a	100,0	0,43±0,02 ^h	85±5 ^o	2,5±0,1 ^b	100,0	0,35±0,02 ⁱ	85±5 ^o
30,0±0,7	3,0±0,2 ^{ad}	100,0	0,37±0,01 ⁱ	66±2 ^p	2,0±0,1 ^{cf}	87,7	0,28±0,02 ^j	22±4 ^q
60±1	2,6±0,1 ^{de}	77,9	0,30±0,02 ^j	53±3 ^r	1,9±0,1 ^{cf}	73,0	0,20±0,01 ^k	12±3 ^s
91±1	2,2±0,1 ^{ce}	29,6	0,24±0,02 ^k	36±5 ^t	1,7±0,1 ^f	22,0	0,17±0,02 ^{kl}	0
120±2	1,9±0,1 ^{cf}	21,3	0,15±0,03 ^l	0	1,62±0,04 ^f	17,4	0,12±0,04 ^l	0
150±1	1,8±0,1 ^{cf}	16,7	0,04±0,03 ^m	0	1,53±0,06 ^f	20,0	0,02±0,04 ^m	0
(B)	FT858L em Melaço							
Etanol (g.L^{-1})	Final C_x (g.L^{-1})	X (%)	$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)	Viabilidade Final (%)				
0	4,3±0,1 ^g	100,0	0,49±0,01 ⁿ	90±2 ^o				
29±2	3,6±0,2 ^a	100,0	0,44±0,02 ^{hn}	72±2 ^p				
60±1	3,3±0,1 ^a	81,1	0,35±0,02 ⁱ	60±3 ^r				
90±1	2,81±0,07 ^{ad}	53,0	0,11±0,03 ^l	36±5 ^t				
121±2	2,3±0,1 ^{ce}	17,0	0,06±0,05 ^m	0				
151±1	2,3±0,1 ^{ce}	12,3	0,02±0,03 ^m	0				

Figura 4.2 - Concentração de glicose inferida a partir dos dados de mCO_2 e velocidade de consumo de substrato para cada concentração inicial de etanol estudada, para (A) FT858L e (B) FERMEL. Velocidade de assimilação de glicose (r_s) em ($g_{\text{Substrato}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4 \text{ mL}$, meio mínimo, estático, $pH 4,5$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $DO_0 = 4,5$ ($C_{X0} = 2,2 \text{ g.L}^{-1}$ viabilidade inicial = 75%. ^{a,b,c,...g,h} Valores de r_s comparados usando o teste

Tukey (nível de confiança de 95%), onde as mesmas letras significam que não houve diferença estatisticamente significativa. Foi realizada a comparação estatística de r_s para diferentes concentrações iniciais etanol para os conjuntos de dados das Figuras 4.2A, 4.2B, e 4.3B.



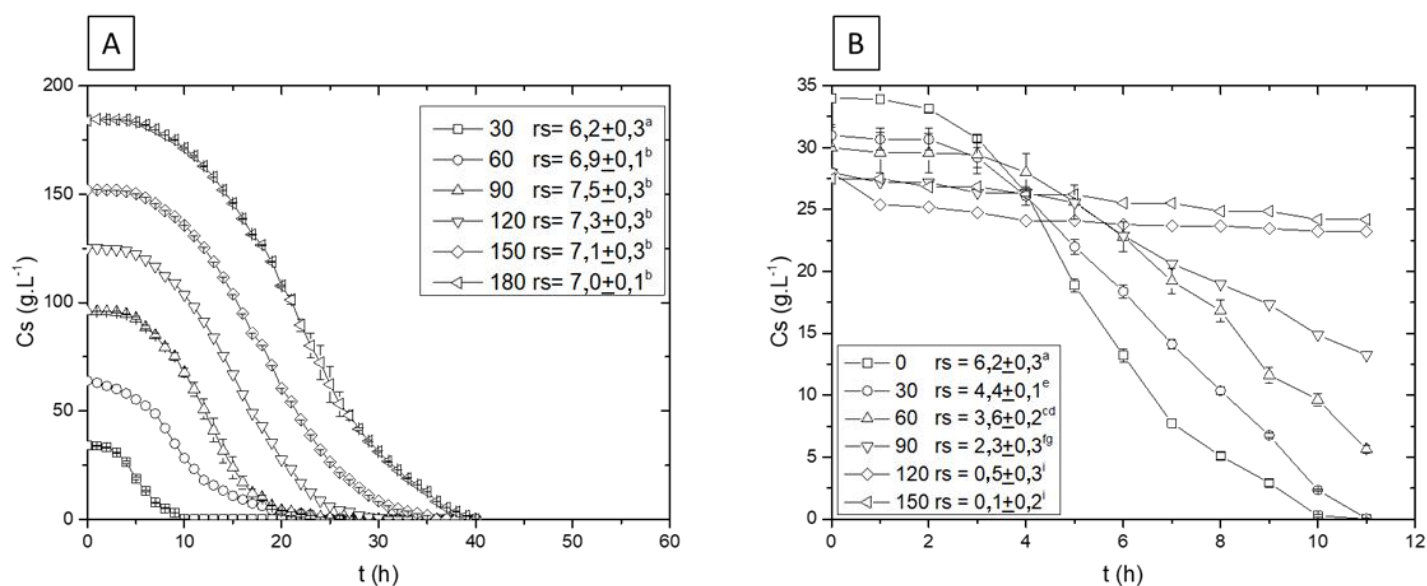
A tolerância ao etanol está relacionada a fatores nutricionais e fisiológicos. De acordo com a literatura, há uma faixa de concentração de etanol (34 a 51 g.L^{-1}) em que as leveduras começam a alterar seu metabolismo devido à toxicidade do álcool (CARLSEN; DEGN; LLOYD, 1991; LEAO; VAN UDEN, 1982). A resposta ao estresse causado pelo etanol também impacta na produção de energia, levando ao aumento da expressão genética associada à glicólise, à função mitocondrial e à diminuição da expressão genética para processos relacionados ao crescimento celular (STANLEY *et al.*, 2010). A manutenção do funcionamento dos vacúolos também é importante para a tolerância ao etanol, possivelmente devido aos papéis desta organela na renovação e manutenção do equilíbrio iônico (ALEXANDRE *et al.*, 2001; LAM *et al.*, 2014; THUMM, 2000). Para a maioria das condições estudadas, a FT858L apresentou melhor pontuação de desempenho do que FERMEL. Assim, FT858L foi selecionada como a cepa mais promissora para as próximas etapas.

4.3.3 Influência do melaço

A tolerância ao etanol também pode ser influenciada pela composição do meio. Todos os experimentos discutidos acima foram realizados com meio mínimo. No entanto, ambas as cepas foram isoladas a partir de fermentações industriais, por isso estão mais adaptadas aos meios industriais. Nas plantas de bioetanol brasileiras, a maioria das fontes de carbono são baseadas em melaço, rico em sacarose, e contendo nutrientes adicionais, incluindo vitaminas (como riboflavina) e minerais (como cálcio e ferro) (JONES; THOMAS; INGLEDEW, 1994; USDA, 2019). Essa composição enriquecida com nutrientes pode melhorar o crescimento celular e a tolerância ao etanol. Por essas razões, foram realizados experimentos utilizando meio formulado com melaço.

A melhoria proporcionada pela composição do meio foi observada nos valores obtidos para a velocidade de consumo de substrato (Figura 4.3A), viabilidade e concentração celular final (Tabela 4.1). Comparando-se os experimentos realizados com FT858L em diferentes meios (Figuras 4.1A e 4.3A), começando com uma concentração de glicose de 60 g.L^{-1} , a velocidade média de consumo de substratos usando melaço foi de $7,1 \pm 0,3 \text{ g}_{\text{Substrato}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, representando um incremento foi de 20% em relação ao valor observado utilizando o meio mínimo. A concentração celular final (Tabela 4.1) também foi maior para os experimentos com melaço, com aumento de 20%. O aumento da viabilidade final pode ser relacionado à maior fração de melaço adicionado para atingir a concentração de açúcar desejada, pois também aumentou as concentrações de nutrientes disponíveis para as células (Tabela 4.1). Da mesma forma, o meio com melaço resultou em maiores velocidades de consumo de substrato (Figura 4.3B) para concentrações iniciais de etanol na faixa de 30 a 90 g.L^{-1} , ao serem comparados com os cultivos em meio definido (Figura 4.2A). No entanto, os valores finais para viabilidade, conversão, e concentração de biomassa foram semelhantes para os dois meios, em todas as concentrações iniciais de etanol (Tabela 4.1).

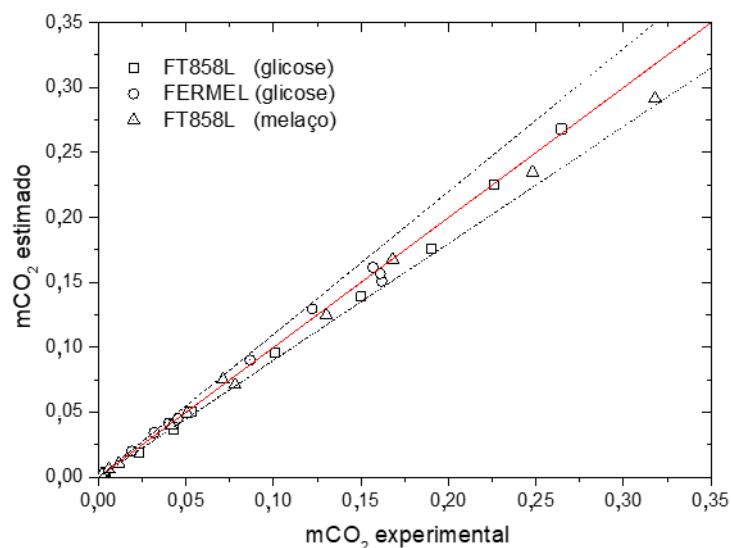
Figura 4.3 - Concentração de ART inferida em melão a partir dos dados de mCO_2 e velocidade de assimilação de substrato para FT858L, (A) variação da concentração inicial de melão (em termos de ART) e (B) variação da concentração inicial de etanol. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4$ mL, melão como fonte de carbono, estática, pH 4,5, $30^\circ C$, $DO_0 = 4,5$ ($Cx_0 = 2,2$ g.L⁻¹), viabilidade inicial = 75%. ^{a,b,c,...g,h}. Valores de r_s comparados usando o teste Tukey (nível de confiança de 95%), onde as mesmas letras significam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação estatística do r_s para diferentes concentrações iniciais de substrato foi realizada para os conjuntos de dados das Figuras 4.1A, 4.1B, e 4.3A. Foi realizada a comparação estatística de r_s para diferentes concentrações iniciais etanol para os conjuntos de dados das Figuras 4.2A, 4.2B, e 4.3B.



4.3.4 Confiabilidade da metodologia

É importante avaliar a confiabilidade da metodologia proposta antes de realizar novos estudos (como a modelagem cinética) com base nos dados de massa de CO_2 recuperados das fermentações em mini-reator. A qualidade dos dados experimentais obtidos em mini-reatores pode ser comprometida por problemas como arraste de água e etanol por bolhas de CO_2 , ou, pela retenção do CO_2 no *headspace*. Assim, foi feita uma comparação entre mCO_2 estimado a partir da concentração final de etanol (quantificada pelo HPLC nas amostras coletadas no final dos experimentos em mini-reator) e a massa total experimental final mCO_2 (a partir de medições de massa). Os resultados são mostrados na Figura 4.4, incluindo todos os dados de todos os experimentos em mini-reator realizados.

Figura 4.4 - Comparação do $m\text{CO}_2$ estimado vs $m\text{CO}_2$ experimental final. A estimativa de $m\text{CO}_2$ foi obtida utilizando a relação estequiométrica entre o etanol produzido e o CO_2 (1:1), a partir de concentrações de etanol medidas nas suspensões finais de fermentação. A linha vermelha representa a igualdade do $m\text{CO}_2$ estimado e do $m\text{CO}_2$ experimental final, enquanto as linhas pontilhadas representam um desvio de $\pm 10\%$ dessa igualdade. Todos os experimentos em mini-reatores, $V = 4 \text{ mL}$, meio mínimo e meio com melão, estática, $\text{pH } 4.5$, 30°C , $\text{DO}_0 = 4,5$ ($C_{x0} = 2,2 \text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial = 75%.



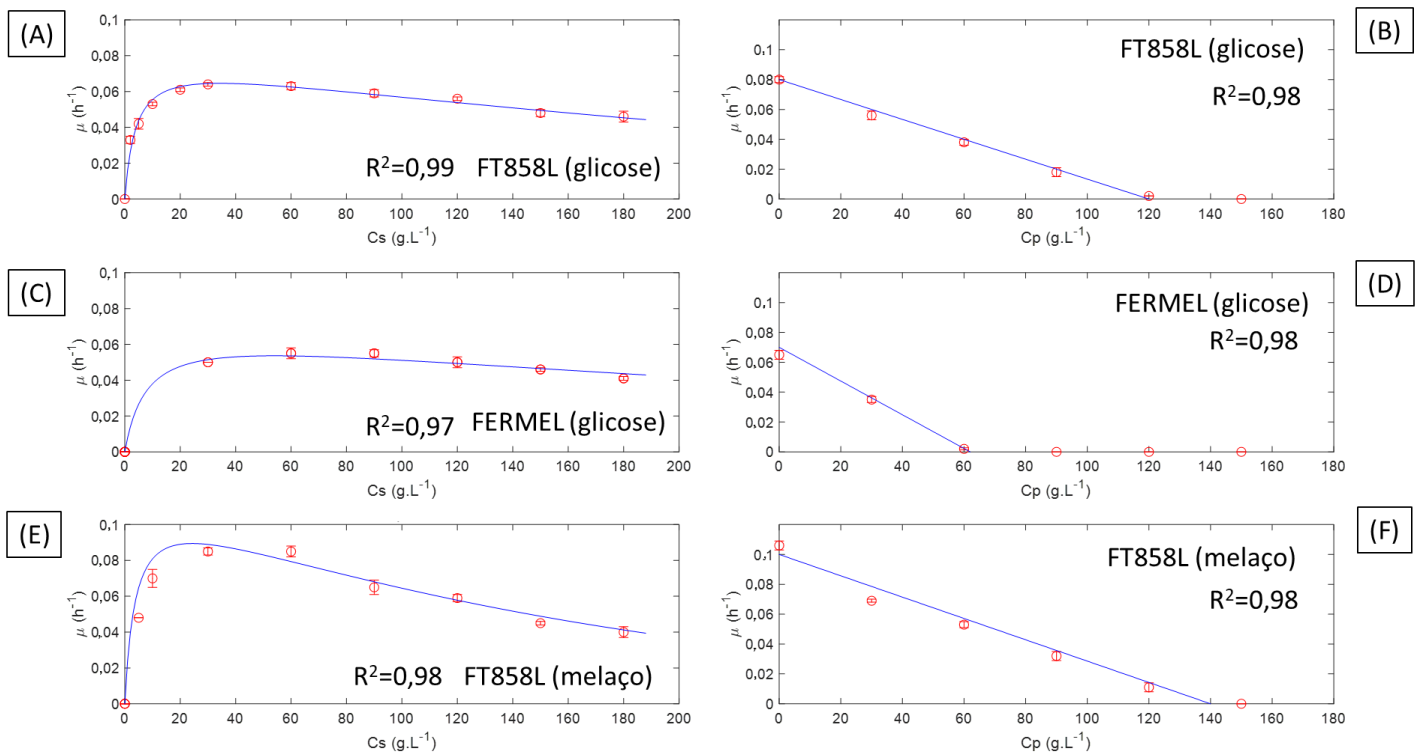
Os valores $m\text{CO}_2$ obtidos a partir das medidas de peso estão dentro de $\pm 10\%$ de desvio dos cenários ideais, para quase todos os pontos experimentais. Em valores baixos de $m\text{CO}_2$ são observados os maiores desvios, o que pode ser atribuído à imprecisão das medidas de massa, embora uma balança analítica com quatro dígitos significativos tenha sido usada para monitorar o peso do mini-reator. Portanto, os ruídos inerentes à metodologia não impediram sua aplicabilidade. Os resultados (Figura 4.4) confirmam a validade da abordagem experimental proposta para um microrganismo homofermentativo como o *S. cerevisiae*, cultivado sob condições anaeróbicas. A confiabilidade da metodologia proposta será novamente abordada na seção 4.3.6.

4.3.5 Modelo cinético da velocidade específica de crescimento

Além da comparação das cepas e do meio em relação ao desempenho de fermentação, outro propósito da metodologia proposta foi coletar dados confiáveis, em experimentos simples, para permitir a modelagem da cinética de crescimento microbiano. Utilizando os dados inferidos de concentração de células, etanol e substrato (seção 4.2.3.5), foi possível identificar 3 expressões diferentes de velocidade de crescimento (Eqs. 4.20-4.22 e Figura 4.5), a partir do

modelo geral proposto na Eq. 4.13. Os valores dos parâmetros e seus erros padrões (seção 4.2.5) são apresentados nas Eqs. 4.20-4.22. As figuras 4.5A, 4.5C e 4.5E mostram o ajuste da Eq. 4.13, sem o termo contabilizando a inibição do etanol $\left(1 - \frac{C_p}{P_m}\right)$, aos diferentes dados iniciais de concentração de substrato. As figuras 4.5B, 4.5D, e 4.5F mostram o ajuste da Eq. 4.14 aos diferentes dados iniciais de concentração de etanol.

Figura 4.5 - Velocidade específica de crescimento inferida e modelagem cinética: para FT858L, variando a concentração de (A) glicose e (B) etanol; para FERMEL variando a concentração de (C) glicose e (D) etanol; para FT858L com (E) variando a concentração de melaço (ART) e (F) variando a concentração de etanol com melaço como fonte de carbono. — resultados simulados; ○ velocidade específica de crescimento experimental e concentração de substrato inferidas com dados mCO₂. Todos os experimentos em mini-reatores, V = 4 mL, meio mínimo (A-D) ou complexo com melaço como fonte de carbono (E e F), estática, pH 4,5, 30 °C, DO₀ = 4,5 (C_{X0} = 2,2 g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%. Ajuste da Eq. 4.14 para os dados de inibição do etanol: pontos de concentração inicial de etanol entre 0 a 120 g.L⁻¹ utilizados para regressão linear (FT858L, B e F); pontos de concentração inicial de etanol entre 0 a 60 g.L⁻¹ utilizados para regressão linear (FERMEL, D).



O parâmetro de inibição por etanol (120 g.L^{-1} , Eq. 4.20) para FT858L cultivada com glicose foi próximo ao valor de 115 g.L^{-1} relatado pela literatura (RIVERA *et al.*, 2017). O parâmetro de inibição por substrato (330 g.L^{-1} , Eq. 4.20) também foi semelhante ao valor relatado no mesmo trabalho (235 g.L^{-1})(RIVERA *et al.*, 2017). O valor obtido para o parâmetro K_s (4 g.L^{-1} , Eq. 4.20) foi próximo ao valor de $4,1 \text{ g.L}^{-1}$ também relatado na literatura (Andrade *et al.*, 2013).

$$\text{FT858L:} \quad \mu = \frac{(0.080 \pm 0.004) * C_s}{((4 \pm 1) + C_s)} * \left(1 - \frac{C_p}{120 \pm 5}\right) * \exp\left(-\frac{C_s}{330 \pm 30}\right) \quad (4.20)$$

$$\text{FERMEL:} \quad \mu = \frac{(0.070 \pm 0.001) * C_s}{((8 \pm 3) + C_s)} * \left(1 - \frac{C_p}{62 \pm 10}\right) * \exp\left(-\frac{C_s}{420 \pm 30}\right) \quad (4.21)$$

$$\text{FT858L (em melão):} \quad \mu = \frac{(0.11 \pm 0.01) * C_s}{((5 \pm 1) + C_s)} * \left(1 - \frac{C_p}{140 \pm 2}\right) * \exp\left(-\frac{C_s}{230 \pm 20}\right) \quad (4.22)$$

A fonte de carbono também influenciou a velocidade de crescimento celular. A partir de uma comparação das curvas, uma diferença pode ser observada entre a cinética de crescimento de FT858L em meio mínimo (Figura 4.5A) e com melão (Figura 4.5E). FT858L cultivada com melão apresentou maiores velocidades específicas de crescimento, especialmente para concentrações de substratos de até 40 g.L^{-1} (Figuras 4.5Ae 4.5E), conforme refletido na velocidade específica máxima de crescimento (Eq. 4.22). No entanto, a inibição do substrato foi intensificada (valor do parâmetro S_m em Eq. 4.22), causando uma diminuição constante na velocidade de crescimento para concentrações de substrato acima de 90 g.L^{-1} . As células de levedura cultivadas com melão apresentaram melhor tolerância ao aumento das concentrações de etanol, o que se refletiu no valor do parâmetro P_m (Eq. 4.22). A identificação de um modelo cinético para melão como um substrato único é útil do ponto de vista industrial. Além disso, a metodologia proposta poderia ser estendida a outros estudos, como a avaliação da influência da temperatura na cinética de crescimento.

4.3.6 Validação do Modelo

A etapa de validação é crucial para garantir que a metodologia experimental proposta reproduza satisfatoriamente uma fermentação real em uma escala maior. Assim, utilizou-se o modelo proposto para a cepa FT858L (Eq. 4.19, obtida a partir dos dados experimentais em

mini-reator e as condições iniciais da Tabela 4.3) com glicose como substrato, para simular os perfis de formação de biomassa e produtos, bem como o consumo de substrato. Os resultados previstos foram comparados aos dados experimentais obtidos em fermentação conduzida em biorreator de 5 L (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Validação do modelo cinético para o cultivo em biorreator em condições anaeróbicas (PBB) utilizando FT858L em meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose, e (D) glicerol. — resultados simulados; modelo cinético gerado pela metodologia de estudos em mini-reator, sem reparametrização; ○ Dados experimentais. Condições experimentais: $V = 4\text{L}$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{DO}_0 = 6$ ($C_{x0} = 3\text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica.

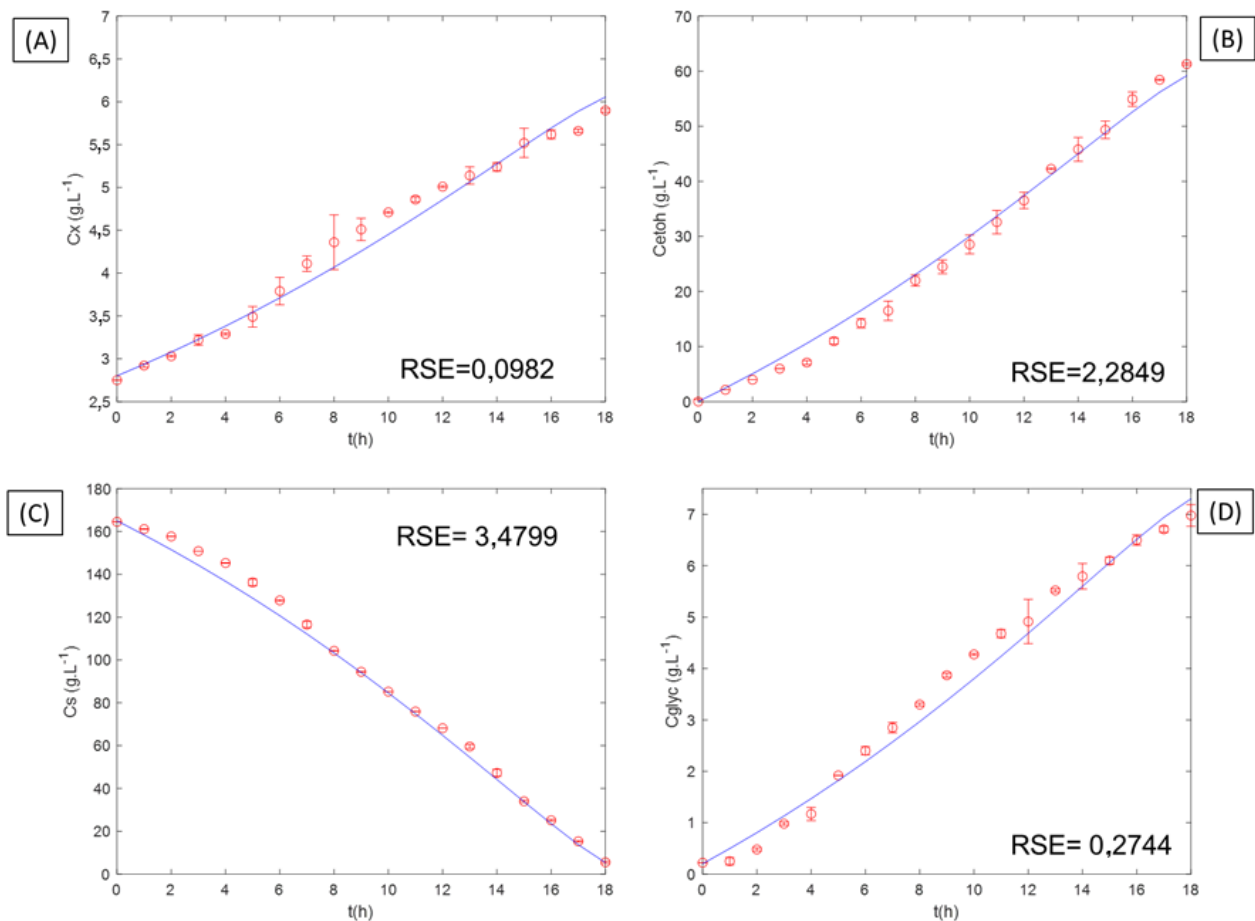


Tabela 4.3 - Condições iniciais utilizadas nas simulações dos experimentos bioreatores (PBB e QFix-B).

Parâmetros de simulação	Anaeróbio (PBB)	Micro-Aeração (Qfix-B)
C_{S0} (g.L ⁻¹)	165	168
C_{X0} (g.L ⁻¹)	2,8	2,8
$C_{p0,EtOH}$ (g.L ⁻¹)	0	0
$C_{p0,glicerol}$ (g.L ⁻¹)	0	0
Conversão (%)	97	99

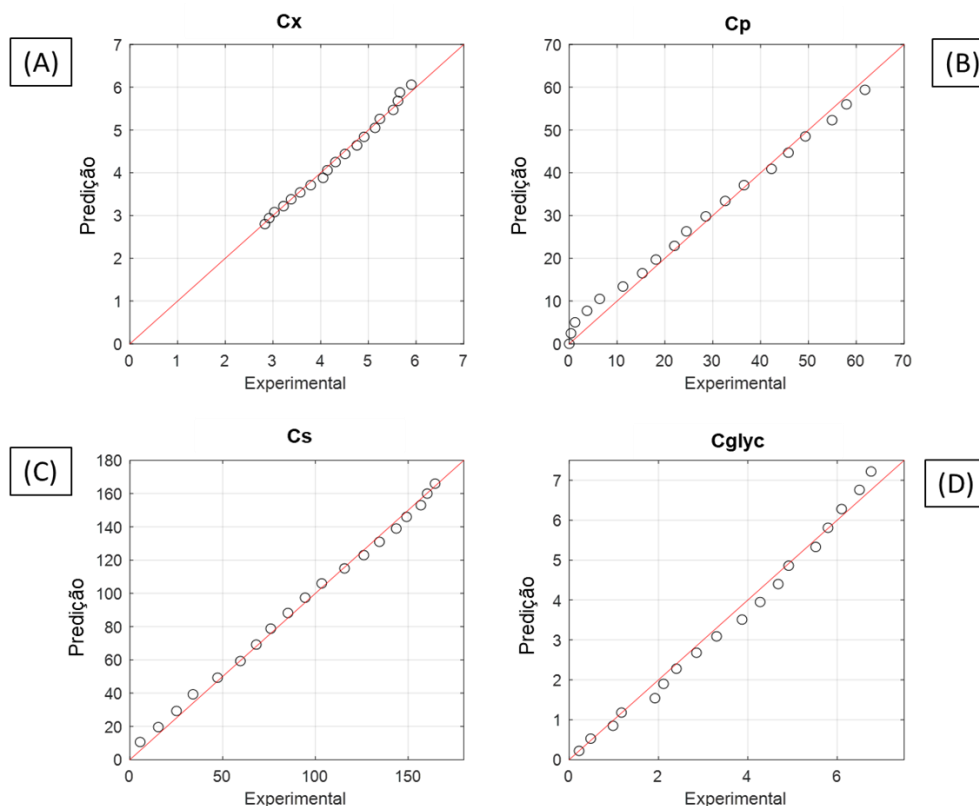
O valor do parâmetro de rendimento em etanol para a fermentação em biorreator ($Y_{P/S}=0,39\pm 0,02$ g_{Etanol}·g_{Substrato}⁻¹; Tabela 4.4) foi essencialmente o mesmo estimado para a condição da fermentação em mini-reator com concentração inicial de glicose de 150 g.L⁻¹ ($Y_{P/S} = 0,40$ g_{Etanol}·g_{Substrato}⁻¹; Tabela 4.1). O coeficiente de manutenção (m_s) estimado foi de $0,15\pm 0,02$ g_{Substrato}⁻¹·g_{MS}⁻¹·h⁻¹, cujo valor é consistente com os dados encontrados na literatura ($0,1$ g_{Substrato}⁻¹·g_{MS}⁻¹·h⁻¹) para o cultivo de levedura em condições anaeróbias (VOS *et al.*, 2016).

Tabela 4.4 - Parâmetros obtidos experimentalmente e utilizados nas simulações dos experimentos bioreatores (PBB e QFix-B).

Parâmetros de simulação	Anaeróbio (PBB)	Micro-Aeração (QFix-B)
$Y_{X/S}$ (g _{células} ·g _{substrato} ⁻¹)	0,023±0,001	0,030±0,003
$Y_{EtOH/S}$ (g _{etanol} ·g _{substrato} ⁻¹)	0,39±0,02	0,370±0,003
$Y_{Glyc/S}$ (g _{glicerol} ·g _{substrato} ⁻¹)	0,048±0,003	0,046±0,005

A abordagem de modelagem proposta mostrou bons valores de RSE para todas as variáveis de estado, bem como uma concordância satisfatória entre os valores previstos e os dados experimentais (Figuras 4.6), indicando um bom ajuste do modelo. O RSE ficou abaixo de 4 para todos os estados analisados, com os maiores erros para a previsão do substrato. Os maiores desvios ocorreram para os pontos de dados experimentais com baixas concentrações, principalmente devido à propagação de erros causados pela diluição amostral, especialmente para o etanol (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Valores experimentais vs. valores preditos para o cultivo anaeróbico em biorreator (PBB) utilizando FT858L e meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose e (D) glicerol. Condições experimentais: $V = 4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $DO_0 = 6$ ($C_{X_0} = 3\text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica.



No entanto, os desvios não prejudicaram a qualidade da descrição do modelo ou a adequação da metodologia proposta para a obtenção dos parâmetros cinéticos. Assim, a principal hipótese por trás da abordagem desenvolvida foi confirmada, uma vez que os resultados de validação mostraram que o modelo identificado a partir de medições de CO_2 foi capaz de descrever com precisão todos os estados em uma fermentação real.

4.3.7 Extensão do modelo cinético

Também foi feita uma avaliação da capacidade de previsão do modelo de crescimento em condição de fermentação não padrão. Para isso, o modelo de crescimento foi ajustado aos dados obtidos para uma condição de cultivo micro-aerada (Figura 4.8) e os resíduos analisados (Figura 4.9). Este experimento em biorreator operando no modo batelada foi realizado fornecendo uma vazão de ar constante (0,09 vvm). Esta condição de operação é classificada como micro-aerada devido à baixa vazão específica de ar utilizada (OKUDA *et al.*, 2007). Com exceção da corrente de ar, as condições de fermentação eram as mesmas empregadas para o cultivo PBB.

Figura 4.8 - Cultivo micro-aerado em biorreator (Q_{fix-B} , $Q_{ar} = 0,36 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) utilizando FT858L em meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose, e (D) glicerol. — resultados simulados; modelo gerado utilizando dados experimentais de estudos em mini-reator; \circ Dados experimentais. Condições experimentais: $V = 4\text{L}$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30 °C, $DO_0 = 6$ ($C_{x_0} = 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica. RSE se refere ao erro residual padrão.

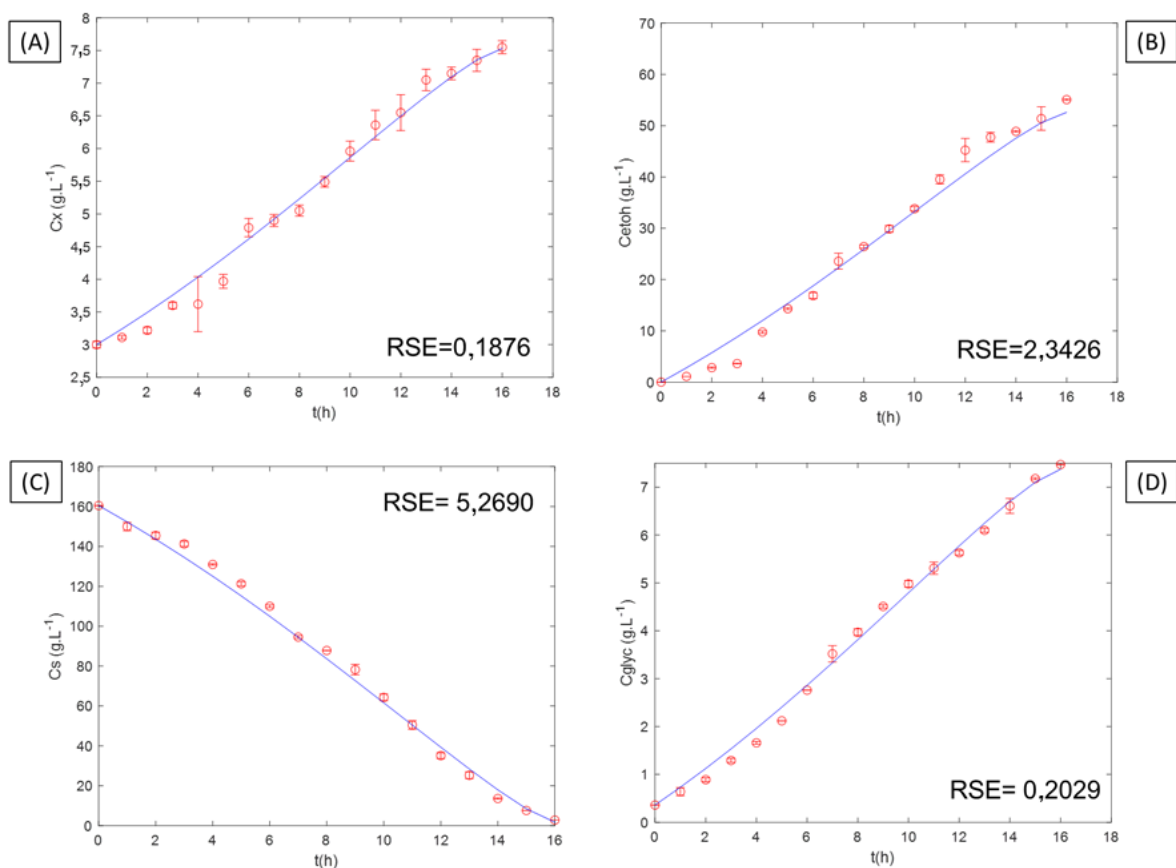
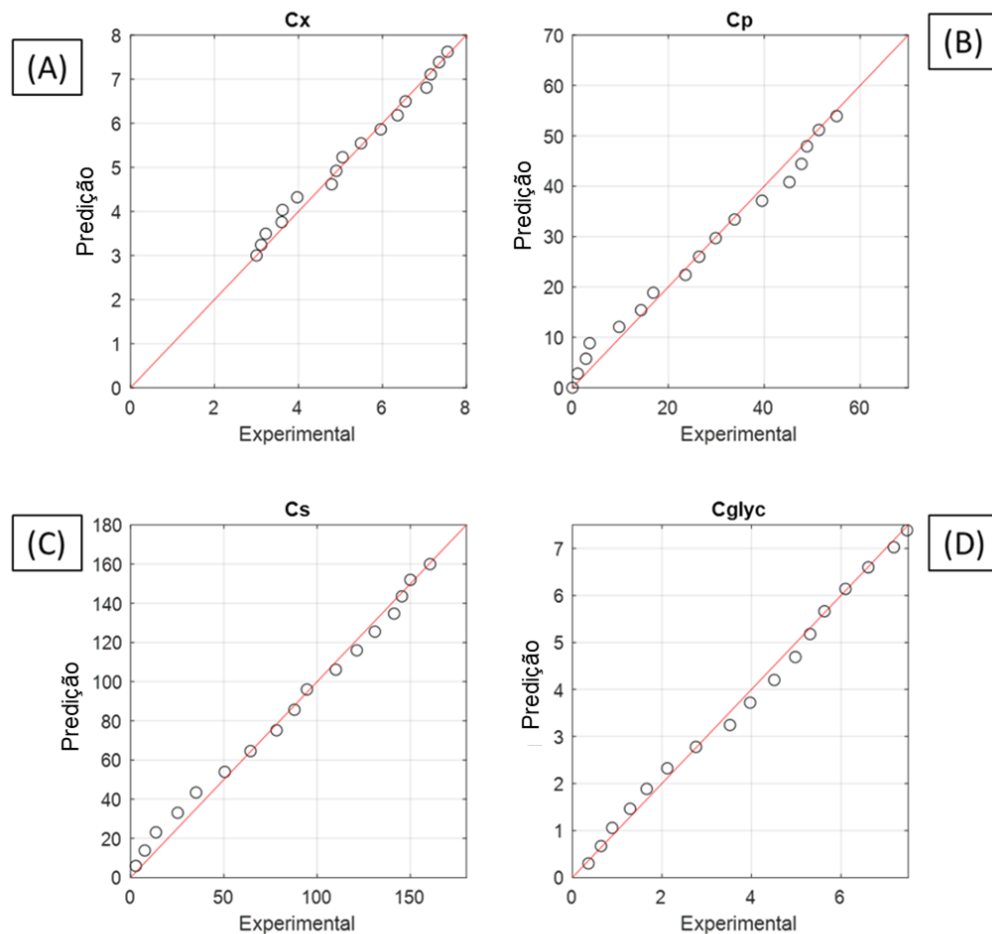


Figura 4.9 - Valores experimentais vs. valores preditos para o cultivo micro-aerado (Qfix-B) utilizando FT858L e meio mínimo: (A) biomassa, (B) etanol, (C) glicose e (D) glicerol. Condições experimentais: $V = 4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30 °C, $DO_0 = 6$ ($C_{X0} = 3 \text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial=75%. Concentrações de glicose, etanol, e glicerol medidas utilizando HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica.



O mesmo conjunto de EDOs (seção 4.2.5) foi utilizado para modelar o cultivo em batelada, com apenas os valores dos coeficientes de rendimento ($Y_{X/S}$, $Y_{EtOH/S}$, e $Y_{Glyc/S}$; Tabela 4.3) atualizados para executar a simulação referente ao cultivo Qfix-B (condições iniciais da Tabela 4.3). A presença do termo de inibição do substrato não descreveu corretamente o crescimento da levedura (dados não apresentados), de modo que o modelo geral representado pela Eq. 4.13 foi modificado pela supressão do termo de inibição do substrato, resultando na Eq. 4.23.

$$\mu = \frac{(0,080 \pm 0,004) * C_s}{((4 \pm 2) + C_s)} * \left(1 - \frac{C_p}{120 \pm 3}\right) \quad (4.23)$$

Deve-se destacar que apenas essas modificações na expressão cinética e nos coeficientes de rendimento foram suficientes para descrever a cinética de crescimento celular para um estado metabólico diferente desencadeado pelo baixo fluxo de oxigênio fornecido (Figura 4.8). De acordo com o modelo, o etanol manteve seu papel como um dos principais inibidores do crescimento da levedura, enquanto a inibição por substrato foi efetivamente minimizada.

É sugerido que a energia exigida pela célula é produzida principalmente utilizando os caminhos redutivos, com parte do substrato sendo redistribuído através da rede metabólica, para garantir a manutenção celular (RIVERA *et al.*, 2017). Em condições anaeróbicas, a alta concentração de glicose apresenta estresse adicional para as células, mesmo em um ambiente com condições controladas, de modo que a inclusão do termo de inibição por substrato foi essencial para descrever o crescimento celular, como observado nas simulações do experimento PBB (Figura 4.6). No entanto, a cinética de crescimento celular mudou na presença de oxigênio. As velocidades de crescimento celular são afetadas pelas restrições impostas pelas condições ambientais (NIEBEL; LEUPOLD; HEINEMANN, 2019). O oxigênio fornecido em Qfix-B pode ter aliviado os efeitos da alta concentração de glicose nas células.

Em relação ao ajuste do modelo, a expressão cinética atualizada (Eq. 4.23) apresentou valores satisfatórios de RSE para todas as variáveis (Figura 4.8) e boa concordância com os pontos experimentais (Figura 4.9). Neste caso, o RSE ficou abaixo de 6 para todas as variáveis de estado, com os maiores erros também para a previsão da concentração de substrato (Figura 4.8). Pelos mesmos motivos explicados anteriormente, ocorreram maiores desvios para os pontos experimentais com baixas concentrações.

4.4 CONCLUSÃO

A medição da liberação da massa de CO₂ fornece uma ferramenta simples, acessível, e eficaz para monitoramento, estudos cinéticos e otimização da fermentação de *S. cerevisiae* em biorreatores, inclusive utilizando cepas geneticamente modificadas. A metodologia proposta se mostrou confiável e reproduzível, com um rico conjunto de dados experimentais que podem ser utilizados para comparação de diferentes cepas e triagem. Com equações de balanço de massa e correlações simples, a abordagem proposta foi aplicada para caracterizar a cinética do crescimento da levedura em diferentes meios, e identificou os efeitos inibitórios do

substrato e do produto. Esses resultados revelaram forte inibição por etanol, mesmo para cepas industriais e concentrações moderadas de etanol (30 g.L^{-1}), o que causou perda de viabilidade e redução das velocidades de consumo de açúcar. Estudos de validação e extensão de modelo mostraram que as expressões cinéticas derivadas dessa simples abordagem experimental foram suficientemente precisas para descrever fermentações HG em biorreatores, confirmando o potencial de uso da metodologia proposta em simulações e análises de diferentes modos de operação de biorreator.

Para a aplicação bem-sucedida dessa metodologia, alguns requisitos de processos devem ser cumpridos. É importante que as mudanças na massa geral do sistema possam ser acompanhadas com precisão utilizando uma balança analítica. Por essa razão, a metodologia é particularmente indicada para espécies homofermentativas (no estudo de caso descrito aqui, o etanol foi o principal produto metabólico). Para microrganismos heterofermentadores (como bactérias facultativas, que produzem vários ácidos em condições de fermentação), devem ser consideradas modificações da metodologia, compreendendo correlações empíricas e leituras frequentes de densidade ótica

5 A APRENDIZAGEM DE MÁQUINA APLICADA AO CONTROLE DE BIORREATORES ORIENTADO POR FLUXOS METABÓLICOS COMO ALTERNATIVA PARA FERMENTAÇÕES MICRO-AERADAS.

5.1 INTRODUÇÃO

A produção de alguns compostos pela via bioquímica depende da manutenção da limitação do fornecimento de oxigênio para maximizar o rendimento do produto desejado, como acetona por *Escherichia coli* (MAY et al., 2013), etanol por *Kluyveromyces marxianus* (GAO et al., 2015) e *Saccharomyces cerevisiae* (RIVERA et al., 2017) organismos patogênicos como *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* (MARTHOS et al., 2015; VAN DE WATERBEEMD et al., 2013).

A micro-aeração favorece a manutenção do equilíbrio redox, que é fundamental para a produtividade e estabilidade dos processos de fermentação contínua (ALFENORE et al., 2004; LÓPEZ-ABELAIRAS et al., 2013). A regeneração dos cofatores (NAD⁺ e NADPH) em toda a rede metabólica é essencial (DEMEKE et al., 2013; WASYLENKO & STEPHANOPOULOS, 2015), pois esses cofatores são utilizados em diversas rotas responsáveis pela produção de aminoácidos e proteínas necessárias para o crescimento e manutenção celular (BERGDAHL et al., 2012; RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; BETTIGA, 2009). No caso da ocorrência do desequilíbrio redox, é possível que o cenário de regeneração insuficiente dos cofatores leve ao estresse oxidativo. Como consequência, há uma redução na assimilação da fonte de carbono e da viabilidade celular (OKUDA et al., 2007). Assim, o fornecimento eficiente e limitado de O₂ durante toda a fermentação permite a minimização de cenários em que ocorra o desequilíbrio de redox e consequentemente estresse oxidativo (BURPHAN et al., 2018), sem a plena ativação da via oxidativa.

Normalmente em o controle de biorreatores, o fornecimento de oxigênio durante cultivos utiliza uma abordagem baseada no controle feedback, a partir da medição da concentração de O₂ dissolvido (COD, na ordem de ppm). No entanto, para níveis muito baixos de concentração de oxigênio (COD < 1,5% da saturação de oxigênio) (ZENG; DECKWER, 1996), os sensores de COD capazes de aferir com precisão nessa faixa são caros e de curta durabilidade (CARIUS et al., 2014). Ou seja, as estratégias convencionais não são indicadas. Além disso, um rigoroso controle da COD em uma faixa tão restrita e baixa seria problemático, pois seria facilmente afetado pela dinâmica do bioprocessos gerando instabilidades. Ou seja,

estratégias convencionais de feedback podem ter desempenho insatisfatório (CAMPANI et al., 2019; KUPRIJANOV et al., 2009).

Portanto, em um ambiente micro-aeróbio, o desenvolvimento de uma estratégia de controle não é simples. Algumas abordagens já foram descritas pela literatura com intuito de definir regiões operacionais e condições experimentais, tais como: o uso de uma vazão de ar constante no *headspace* (ALFENORE et al., 2004) ou o uso de diferentes condições de taxa de transferência de oxigênio usando baixa vazão específica de ar (DENIZ et al., 2014; SILVA et al., 2012). Em termos de malha de controle, alguns trabalhos na literatura utilizaram o controle de RQ para cultivos contínuos (FRANZÉN; ALBERS; NIKLASSON, 1996) ou estratégias baseadas no potencial redox (LIU et al., 2016) mantido em regiões que corresponderiam a condições micro-aeróbias.

Felizmente, com o avanço da Biologia de Sistemas e a disseminação de modelos metabólicos em escala de genoma (GSMs), é possível simular o metabolismo de um organismo *in silico* (NANDIKOLLA et al., 2011). Dessa forma, pode-se obter um certo nível de entendimento sobre as respostas celulares em relação às mudanças nas condições de cultivo mesmo sem a realização de estudos *in vivo*. Os GSMs são capazes de gerar um mapeamento completo da rede metabólica celular, a partir do qual as condições ambientais ideais, tanto para maximizar a síntese de um produto (AGREN; OTERO; NIELSEN, 2013; BIDEAUX et al., 2016) ou reduzir um metabólito indesejado (BRO et al., 2006; GUDMUNDSSON e NOGALES, 2015) são elucidadas. Essas informações podem ser traduzidas em estratégias adequadas de controle de processos (GARCIA-ALBORNOZ; NIELSEN, 2013; MESQUITA et al., 2019). É claro que a aplicação de GSMs a processos transientes deve ser feita com cautela, sabendo que a hipótese de estado pseudo-estacionário é implícita. Mas a lenta dinâmica de crescimento dos cultivos microbianos sob limitação por oxigênio pode justificar essa opção: o uso de novas medições pelo sistema de monitoramento como dados de entrada permite a reestimativa contínua dos fluxos durante o cultivo, atualizando assim as informações utilizadas pelo algoritmo de controle.

No entanto, o processamento on-line do GSM, durante a operação do biorreator, pode exigir um grande esforço computacional. Uma das abordagens para contornar esse problema consiste em usar um modelo metabólico mais simples, que pode ser otimizado on-line (CHANG; LIU; HENSON, 2016; JABARIVELISDEH et al., 2020), mas requer conhecimento prévio das principais rotas metabólicas envolvidas na síntese do produto desejado. Outra alternativa seria usar modelos substitutos ou meta-modelos, que são mais simples e preservam as mesmas respostas básicas de um modelo completo (PAPADOPOULOU; NIKOLOS;

KARATZAS, 2010). Os modelos substitutos variam de uma simples correlação matemática (MESQUITA et al., 2019) até modelos gerados por técnicas de aprendizagem mais avançadas, como Redes Neurais Artificiais (RNAs) (IBRAHIM et al., 2019; MESQUITA et al., 2020).

No contexto de bioprocessos, as RNAs podem aprender relações complexas entre variáveis (STANKE; HITZMANN, 2012), o que permite que elas sejam usadas como *softsensor* em bioprocessos (BEIROTI et al., 2019; TAVASOLI et al., 2019b) bem como modelos substitutos (BOUKOUVALA; MUZZIO; IERAPETRITOU, 2010; COZAD; SAHINIDIS; MILLER, 2014). Até agora, há poucos estudos abordando o uso de RNA para reproduzir as ricas informações fornecidas pelos GSM nas estruturas de controle (MESQUITA et al., 2020).

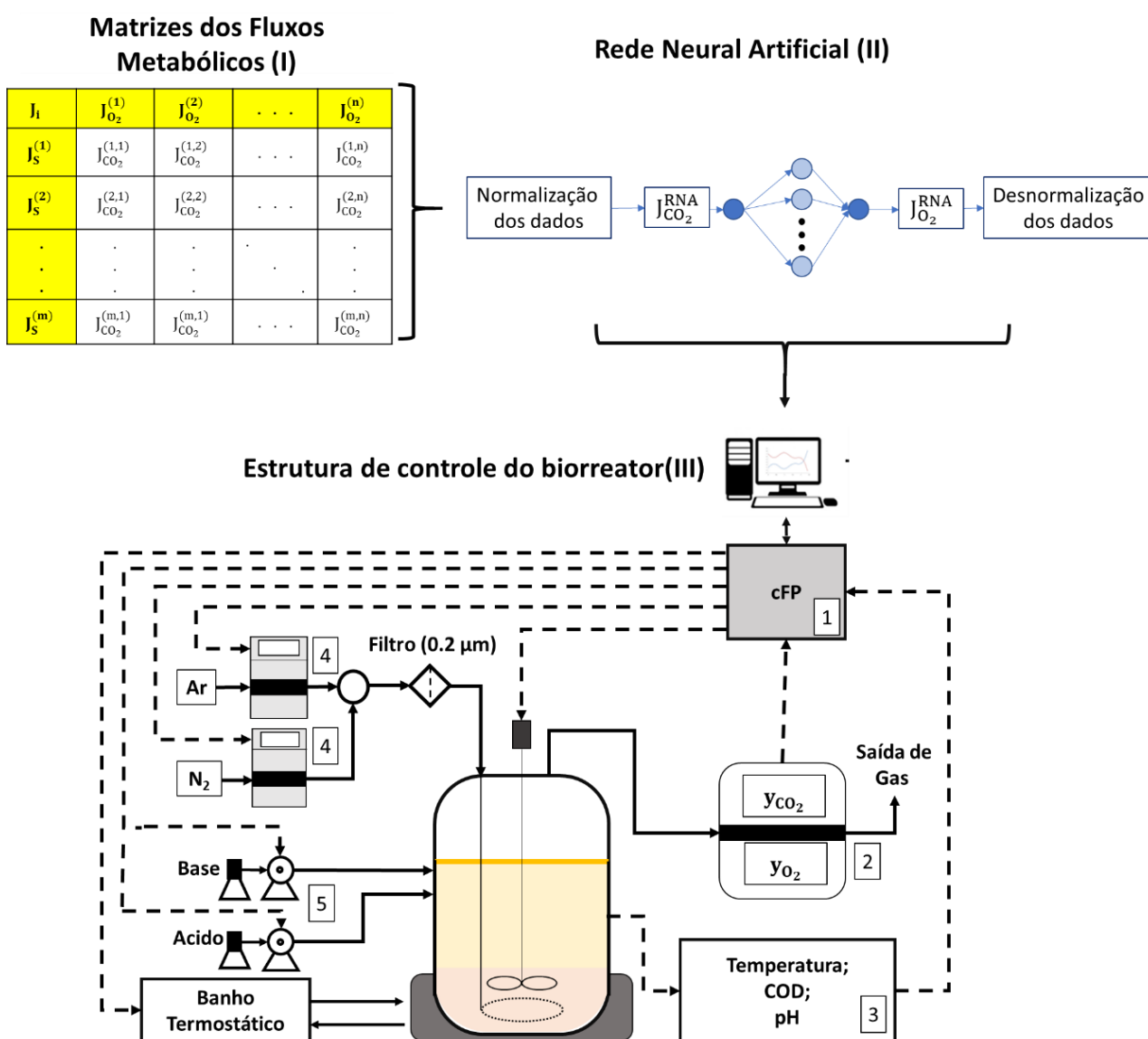
Este capítulo propõe o uso de uma Rede Neural Artificial como modelo substituto para o conjunto de dados metabólicos fornecidos pelas simulações das células *in silico*, e a integração da RNA obtida em uma estrutura de controle para micro-aeração. A produção de etanol por *S. cerevisiae* foi escolhida como um estudo de caso para avaliar o desempenho do controlador. A composição da fase gasosa foi automaticamente manipulada para controlar o fluxo metabólico de O₂ de acordo com as condições de limitação identificadas *in silico*, e direcionar o metabolismo celular para o estado desejado, favorecendo maior produção de etanol. Além do sistema de controle baseado em fluxos metabólicos, as estratégias de micro-aeração comumente relatadas (controle baseado em RQ e vazão de ar constante) também foram avaliadas em biorreator.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Estrutura de controle

A estrutura de controle proposta (Figura 5.1) se baseia em fluxos metabólicos obtidos a partir de simulações de modelo metabólico em escala genômica, que foram usados como dados de treinamento de uma Rede Neural Artificial com intuito de gerar um modelo substituto.

Figura 5.1 - Esquema de construção da lógica de controle baseada em fluxos metabólicos. (I) Mapeamento dos fluxos metabólicos usando simulações de modelos metabólicos em escala genômica (GSM); (II) Treinamento das Redes Neurais artificiais (RNA); (III) Estrutura de controle do biorreator (SUPERSYS_UCM). **1** Conversor analógico ao digital (cFP – compact Field Point 2020, National Instruments); **2** Analisador de gases (Quantek 902P); **3** Temperatura (termopar), pressão, concentração de oxigênio dissolvido (COD, sensor InPRO 6800 e transmissor modelo CE, O2 4050) e pH (sensor InPRO 3250 e transmissor GLI PRO); **4** Medidores e controladores de fluxo mássico (modelo GFC, Aalborg); **5** Bomba peristáltica para controle de pH (modelo C/L, Masterflex). O tempo de aquisição do sistema foi de 0,2 segundos, com salvamento de dados a cada 10 s. Para todas as variáveis com a aquisição on-line, foi adicionado um filtro exponencial associado a um filtro de mediana para suavizar as leituras e reduzir o ruído dos sensores. Adaptado de Mesquita *et al.* (2019).



Como mostrado na Figura 5.1, o desenvolvimento do controlador envolveu três etapas principais:

I) Mapeamento metabólico:

Várias simulações do modelo metabólico foram executadas usando diferentes combinações de fluxos metabólicos de substrato (J_S^{MM}) e de oxigênio ($J_{O_2}^{MM}$) como dados de entrada para mapear as saídas de fluxos metabólicos (em CO₂, etanol, biomassa etc.). Os fluxos metabólicos são definidos como a razão entre a velocidade de produção ou consumo de um componente "i" e a concentração celular (Eq. 5.1).

$$\text{Fluxo Metabólico } (J_i) = \frac{r_i}{C_x} \quad (5.1)$$

Em que, J_i é o fluxo metabólico do componente i (substrato, produtos, CO₂ e O₂), em mmol.g_{MS}⁻¹.h⁻¹; C_x é a concentração celular, em g_{MS}.L⁻¹; e r_i (mmol. L⁻¹.h⁻¹) é a velocidade de consumo ou produção do componente i . Vale ressaltar que para essa etapa do trabalho foi assumida a hipótese de estado pseudo-estacionário devido a dinâmica lenta do cultivo

A etapa (I) é essencial para definir uma região operacional baseada em respostas metabólicas (MESQUITA et al., 2019). Na sigla J_i^{MM} , o sobrescrito se refere ao modelo metabólico (MM), e o subscrito "i" se refere a cada componente: substrato (S), oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂), biomassa (X), etanol (EtOH), e glicerol (GOH).

II) Treinamento RNA:

O treinamento utilizou os dados normalizados (Eq. 5.2) dos fluxos metabólicos obtidos para o aprendizado da rede. As informações de fluxo metabólico foram normalizadas para o treinamento da RNA, a fim de atenuar problemas de interpolação que podem ocorrer quando a RNA infere os dados. Neste trabalho, o fluxo de CO₂ normalizado ($J_{CO_2}^{RNA}$) foi a entrada da RNA e o fluxo metabólico normalizado de O₂ ($J_{O_2}^{RNA}$) a saída. Ou seja, a RNA neural foi obtida para ser um modelo de problema inverso.

$$J_i^{RNA} = \frac{J_{i,t}^{MM} - J_{i,min}^{MM}}{J_{i,max}^{MM} - J_{i,min}^{MM}} \quad (5.2)$$

III) Configuração do Sistema de Supervisão e Unidade de Controle Metabólico (SUPERSYS_UCM):

Nesta etapa, foi realizada a construção da RNA estruturada como modelo substituto para o sistema de supervisão. A cada iteração, o algoritmo usa a RNA e o $J_{CO_2}^{Exp}$ inferido (Eq. 5.4)

para atualizar os valores de $J_{O_2}^{RNA}$, que é posteriormente desnormalizado e buscado pelo sistema de supervisão (rastreamento de *setpoint*). A lei de controle assume o $J_{O_2}^{RNA}$ como *setpoint* para a variável controlada $J_{O_2}^{Exp}$ (fluxo metabólico de oxigênio inferido, Eq 5.3), e manipula a vazão de ar de entrada (Q_{AR}) para alcançar o objetivo de controle. O $J_{CO_2}^{Exp}$ é coletado a partir das medições em tempo real da composição do gás de saída ($y_{CO_2}^S$ e $y_{O_2}^S$) e inferência *at-line* de biomassa (C_X) (Eq 5.4). O $J_{O_2}^{Exp}$ (Eq 5.3) foi inferido de maneira análoga ao $J_{CO_2}^{Exp}$

$$J_{O_2}^{Exp} = \frac{1}{C_X \cdot V} \left(y_{O_2}^e \cdot \frac{Q_{gas}^e \cdot P_e}{T_e \cdot R} - y_{O_2}^s \cdot \frac{Q_{gas}^s \cdot P_s}{T_s \cdot R} \right) \quad (5.3)$$

$$J_{CO_2}^{Exp} = \frac{1}{C_X \cdot V} \left(y_{CO_2}^s \cdot \frac{Q_{gas}^s \cdot P_s}{T_s \cdot R} - y_{CO_2}^e \cdot \frac{Q_{gas}^e \cdot P_e}{T_e \cdot R} \right) \quad (5.4)$$

Os termos P_e , T_e e Q_{gas}^e são as condições de pressão, temperatura e vazão da fase gasosa na entrada do biorreator, respectivamente. P_e é a pressão de entrada medida, T_e é a temperatura padrão do fluxômetro, e Q_{gas}^e é controlada pelo fluxômetro. Os termos P_s , T_s e Q_{gas}^s referem-se às condições da fase gasosa na saída do reator. P_s é considerado igual à pressão atmosférica, e T_s é a mesma temperatura do meio de cultivo. Q_{gas}^s é obtido utilizando o balanço de material para o gás inerte N_2 e V é o volume do meio. $y_{CO_2}^e$ e $y_{CO_2}^s$ são a fração molar de entrada e a fração molar de saída de CO_2 , respectivamente. Enquanto, $y_{O_2}^e$ é a fração molar entrada de O_2 , e $y_{O_2}^s$ é a fração molar de saída de O_2 . R é a constante da lei do gás universal.

5.2.2 Mapeando metabólico usando o modelo em escala genômica

O mapeamento metabólico *in silico* (off-line) foi realizado através do software livre Optflux 3.3.0 (ROCHA *et al.*, 2010), utilizando o pFBA (*parsimonious Flux Balance Analysis*) (LEWIS *et al.*, 2010) como método de otimização e o modelo GSM iND750 (DUARTE; HERRGÅRD; PALSSON, 2004). A função objetivo maximizada foi o crescimento da biomassa, pois representa melhor o comportamento real do microrganismo que se esforça para crescer nas condições de cultivo em biorreator (CHANG *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.*, 2019; JABARIVELISDEH *et al.*, 2020).

Como dito anteriormente, diferentes combinações de dados de entrada foram utilizadas para realizar o mapeamento dos dados de saída a partir das simulações do metabolismo celular.

As faixas de fluxos estudadas foram as seguintes: fluxos metabólicos de assimilação de carbono (J_S^{MM}) entre 0,5 - 30 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$; e fluxos de oxigênio ($J_{O_2}^{MM}$) entre 0,02 (limitação severa de oxigênio) – 12 (totalmente aeróbio) $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (FRANZÉN, 2003). Para esclarecer mais um pouco a estratégia usada para o mapeamento, os fluxos de J_S^{MM} foram fixados, enquanto os fluxos de $J_{O_2}^{MM}$ foram gradualmente reduzidos até que se observasse um J_{EtOH}^{MM} máximo. Este procedimento foi repetido para vários valores J_S^{MM} . Dessa forma, fluxos de entrada $J_{O_2}^{MM}$ ótimos foram identificados para cada valor de J_S^{MM} , sendo considerada uma faixa de 75 a 100% do J_{EtOH}^{MM} máximo obtido nas simulações para a identificação da região de fluxo ótimo de etanol e dos valores correspondentes de J_S^{MM} e $J_{O_2}^{MM}$ que definem essa região. Mais detalhes podem ser vistos em trabalho publicado na literatura (Mesquita *et al.*, 2019). As simulações do GSM nas faixas definidas para J_S^{MM} (0,5 - 30 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e $J_{O_2}^{MM}$ (0,02 e 12 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$) resultaram em valores de $J_{CO_2}^{MM}$ variando entre 55,5 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 0,9 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$; J_{EtOH}^{MM} entre 44 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 0,9 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$; e J_{Glyc}^{MM} entre $1,3 \times 10^{-3}$ $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 0 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A fonte de carbono estudada foi a glicose, e todos os fluxos de entrada e saída foram compilados em matrizes. Foram selecionados os dados referentes aos fluxos de etanol (J_{EtOH}^{MM}) na região de fluxos ótimos para treinamento da RNA (Mesquita *et al.*, 2019).

5.2.3 Redes neurais artificiais

As informações de fluxo metabólico selecionadas foram normalizadas e utilizadas no treinamento e validação das redes neurais perceptron multicamadas (NELLES, 2001). A construção da rede seguiu uma abordagem simples (HORTA *et al.*, 2011, 2014; MESQUITA *et al.*, 2020). A rede neural tem uma configuração de uma entrada e uma saída (SISO, *single input-single output*), cuja entrada é $J_{CO_2}^{RNA}$ e a saída é $J_{O_2}^{RNA}$.

Diferentes arquiteturas de rede, número de neurônios nas camadas ocultas e funções de transferência (linear, sigmoideal ou tangente hiperbólica) foram testadas. A função “feedforwardnet” do Matlab® foi usada junto com a função de treinamento “trainlm” (Levenberg-Marquardt) para minimizar o erro quadrático médio (MSE) das previsões de RNA.

A precisão das RNAs estudadas também foi avaliada em termos de Erro Médio Absoluto (MAE), por meio de validação cruzada quádrupla com dados selecionados aleatoriamente. O conjunto de dados consistiu em 715 pares de valores $J_{CO_2}^{RNA}$ vs $J_{O_2}^{RNA}$, obtidos a partir de simulações do modelo metabólico. Subconjuntos aleatórios dos dados foram usados para treinamento (70% dos dados), teste (15%) e validação (15%), de acordo com as

configurações padrão do Matlab®. A raiz quadrada média do erro é apresentada na seção de resultados. Em seguida, o erro absoluto da predição para cada grupo foi utilizado para a obtenção do MAE (HORTA et al., 2008, 2014)

5.2.4 Lei de controle para manipulação da vazão de ar

A Eq. 5.5 expressa a lei de controle que atualiza a vazão de ar (Q_{Ar}) e regula o fornecimento de oxigênio. Esta equação foi obtida a partir do balanço molar na fase gasosa do biorreator (mais detalhes estão presentes no Apêndice B). O algoritmo de controle funciona da seguinte forma: a cada minuto, a RNA atualiza o fluxo metabólico de oxigênio ($J_{O_2}^{RNA}$) a ser desnormalizado. Depois, o novo setpoint ($J_{O_2}^{SP}$) é usado para ajustar vazão de ar, complementado com medições periódicas *at-line* (a cada hora) de concentração celular (Cx) e os dados on-line da composição do gás de saída ($y_{CO_2}^S, y_{O_2}^S$). Assim, o sistema promove uma atualização na condição de aeração de acordo com a necessidade celular (demanda de J_{O_2}), utilizando as informações da composição da fase gasosa efluente como *feedback*. $y_{O_2,ar}$ e $y_{N_2,ar}$ são as frações molares de oxigênio e de nitrogênio no ar, respectivamente.

$$Q_{Ar} = \frac{(Cx * J_{O_2}^{SP} * V * R) + Q_{N_2} * \left(\frac{y_{O_2}^S}{(1 - y_{O_2}^S - y_{CO_2}^S)} * \frac{P_s}{T_s} \right)}{\left(\frac{y_{O_2,ar} * P_e}{T_e} \right) - y_{N_2,ar} * \left(\frac{y_{O_2}^S}{(1 - y_{O_2}^S - y_{CO_2}^S)} * \frac{P_s}{T_s} \right)} \quad (5.5)$$

As Eq. 5.1-5.5 são parte dos estudos de caso para micro-aeração que usa RNA como modelo substituto. Além do estudo de caso que aborda o controlador proposto, outros estudos de caso descrevendo outras estratégias de micro-aeração serão descritos nas seções a seguir.

5.2.5 Estudos de caso: Estratégias de micro-aeração

Para a avaliação da estratégia de controle proposta nesse capítulo em uma situação de processo real, a estrutura foi aplicada ao processo de produção de etanol por *S. cerevisiae*. Foram realizadas quatro fermentações adicionais baseadas em duas estratégias de micro-aeração mais simples, já relatadas, bem como uma fermentação convencional, semelhante à empregada nas Plantas Brasileiras de Bioetanol (PBB) (Figura 5.2).

Todos os estudos de caso foram conduzidos nas mesmas condições de cultivo (Seções 5.2.6 e 5.2.7). As principais características dos estudos de caso estão resumidas na Figura 5.2 e eles são mais detalhadamente descritos a seguir.

Figura 5.2 – Resumo das estratégias de cultivo aplicadas às fermentações em biorreatores com *S. cerevisiae*.

Identificação do Experimento	Identificação do Estudo de Caso	Representação esquemática	Breve descrição
HC-RQ	A		Heurística de controle do RQ
PID-RQ	B		Controle de RQ por PID
Qfix-B	C	$Q_{Ar} = 0,36 \text{ L.min}^{-1}$ → Biorreator	Vazão de ar baixa e constante
Qfix-MB	D	$Q_{Ar} = 0,057 \text{ L.min}^{-1}$ → Biorreator	Vazão de ar muito baixa e constante
PBB	E	Sem vazão de entrada	Fermentação anaeróbia
FM-RNA	F1		Estrutura de controle de $J_{O_2}^{Exp}$ que inclui a RNA
FM-RNA-PI	F2		Estrutura de controle de $J_{O_2}^{Exp}$ que inclui a RNA + PI

- Caso A (Heurística de Controle de RQ, HC-RQ).** Essa estratégia de micro-aeração é semelhante à aplicada para a produção de etanol em cultivos contínuos com *S. cerevisiae* (FRANZÉN; ALBERS; NIKLASSON, 1996). A estratégia consiste em uma simples heurística de adicionar ou subtrair um valor constante na vazão de ar (variável manipulada) ($\Delta Ar = 0,001 \text{ L.min}^{-1}$) para manter o quociente respiratório (*respiratory quotient*, RQ, variável controlada), definido pela Eq. 5.6, dentro da faixa de 7-9 $\text{mol}_{CO_2}.\text{mol}_{O_2}^{-1}$ como esquematizado na Figura 5.2. Essa faixa foi definida de acordo com os resultados do trabalho anterior (Mesquita *et al.*, 2019)

$$RQ = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} = \frac{J_{CO_2}}{J_{O_2}} \tag{5.6}$$

- Caso B (PID para controlar RQ, PID-RQ).** O controle convencional PID (STEPHANOPOULOS, 1984) representado na Figura 5.2 também foi empregado para manter

o RQ (Eq. 5.6) no *setpoint* desejado ($8 \text{ molCO}_2 \cdot \text{molO}_2^{-1}$), manipulando a vazão de ar. Os ganhos proporcionais, integrais e derivativos (Tabela 5.1) foram inicialmente baseados na literatura (FRANZÉN; ALBERS; NIKLASSON, 1996), e durante a realização do experimento uma nova sintonia para os ganhos foi realizada utilizando o método oscilatório Ziegler-Nichols (Tabela 5.1) (OGATA, 2010).

Tabela 5.1 – Ganhos do PID para o Caso B

Ganhar	Franzén <i>et al.</i> (1996)	Re-sintonia
Proporcional (Kc)	-0,971	-0,003
Integral (Ti, min)	2,25	0,5
Derivativo (Td, min)	0,57	0,12

- **Caso C (Vazão de ar fixa e baixa, Qfix-B).** Nesse caso, uma vazão de ar fixa em $0,36 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ foi utilizada, sem qualquer ação de controle em relação à fase gasosa. A escolha do valor da vazão de ar foi baseada na vazão média de ar dos dois casos anteriores (Casos A e B) (MESQUITA et al., 2021a). Uma estratégia semelhante foi investigada por Silva *et al.* (2011) para melhorar a produção de etanol em fermentação batelada usando *Pichia stipitis*.
- **Caso D (Vazão de ar fixa e muito baixa, Qfix-MB).** Nesse estudo de caso foi utilizada uma vazão de ar muito baixa e constante ($0,057 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$). Esse valor corresponde a 15% da vazão de ar previamente fixada (Caso C), e se baseia na média de todas as vazões de ar definida pelo FM-RNA-control (caso F1), descrito abaixo.
- **Caso E (Plantas de Bioetanol Brasileiras, PBB).** Neste estudo de caso, foi realizada uma fermentação padrão, sem vazão de gás ou sistema de controle. Esse estudo de caso reproduz o processo *Melle-Boinot* comumente utilizado em usinas brasileiras para a produção de etanol (AMORIM et al., 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; LOPES et al., 2016; MESQUITA et al., 2021a).
- **Casos F: Fermentação micro-aerada utilizando apenas RNA como modelo substituto (FM-RNA, F1) ou a RNA mais um controlador PI (FM-RNA-PI, F2).** Este caso usa a estrutura de controle proposta, a qual incorpora a rede neural como meta-modelo. Esse grupo de estudo de caso compreende a estratégia originalmente proposta (Seção 5.2.4) e uma variação dela, na qual um controlador PI foi introduzido para corrigir desvios ou descasamento

do modelo que poderiam ocorrer. O controlador PI usou o $J_{O_2}^{Exp}$ (inferido pelo balanço de massa) como feedback. Assim, foi utilizado o erro entre $J_{O_2}^{Exp}$ e $J_{O_2}^{SP}$ para definir ações adicionais de controle (Figura 5.2). Mais especificamente, o controlador PI definiu pequenas ações de controle a serem adicionadas (ou subtraídas) à vazão de ar definida pela lei de controle. O controlador PI foi ativado quando a razão ($J_{O_2}^{Exp}/J_{O_2}^{SP}$) atingiu valor acima de 5 ou abaixo de 0,2. Uma vez ativado, o PI permaneceu ativo até o final da fermentação.

5.2.6 Micro-organismo e meio de cultura

Os experimentos foram realizados utilizando a levedura industrial FT858L, gentilmente doada pela Fermentec Ltda (Piracicaba, Brasil) (FERMENTEC, 2018; MESQUITA et al., 2021a). As células liofilizadas foram hidratadas e ativadas para preparar o inóculo utilizado nos biorreatores, conforme descrito no capítulo 4 dessa tese. Todos os experimentos em biorreatores utilizaram meio mínimo definido (KH_2PO_4 5,0 g.L⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,0 g.L⁻¹, ureia 1,5 g.L⁻¹, antibiótico Kamoran® 3.0 ppm, e polipropilenoglicol 1 mL.L⁻¹ como anti-espumante) (MESQUITA et al., 2021a; MILESSI et al., 2020a). O antibiótico foi gentilmente doado pela Química Real Ltda (Belo Horizonte, Brasil). Glicose foi a única fonte de carbono usada nos experimentos. A glicose foi adicionada na concentração inicial de 150 g.L⁻¹ para se aproximar das condições de fermentações industriais com alta carga de fonte de carbono (*Very High Gravity*, HG) (JOANNIS-CASSAN et al., 2014).

5.2.7 Cultivo em biorreatores

Seis cultivos em batelada foram realizados utilizando um biorreator de tanque agitado contendo 4L do meio mínimo (seção 5.2.3). Amostras (20 mL) foram coletadas em tubos Falcon a cada hora e imediatamente colocadas no gelo. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para analisar a densidade ótica e a viabilidade celular. O restante foi centrifugado, e o sobrenadante filtrado e congelado para análise da concentração de metabólitos e de substrato. A média amostral e seu erro padrão são apresentados como resultados experimentais.

Em todos os estudos de caso (seção 5.2.2), exceto para o caso E (PBB), os biorreatores foram operados com uma vazão de nitrogênio (Q_{N_2}) constante e fixada em 0,7 L.min⁻¹. A vazão constante de nitrogênio foi utilizada para garantir que a fase gasosa alcançasse rapidamente o analisador de gases (Quantek 902P) e minimizar o atraso nas análises da composição do gás. Para os estudos de caso de A até E, o software SUPERSYS® foi utilizado para aquisição e

supervisão de dados (HORTA *et al.*, 2012). Sua versão modificada, o SUPERSYS_MCU, foi utilizada para aquisição de dados e supervisão dos estudos de caso F. A temperatura foi mantida por um sistema de controle independente a 30°C, o pH a 4,5, e a agitação a 500 rpm. O controle de pH foi feito pela adição automática de NH₄OH 20% ou H₃PO₄ 20%.

5.2.8 Procedimentos analíticos

5.2.8.1 Concentração celular e viabilidade

As leituras de densidade ótica (DO, $\lambda=600\text{nm}$) foram utilizadas para o monitoramento *at-line* de crescimento celular (Mesquita *et al.*, 2019). O crescimento celular também foi acompanhado por medições de massa seca (OLSSON; NIELSEN, 1997). Ambas as variáveis foram linearmente correlacionadas (Eq. 5.7), de forma que foi possível converter leituras de DO em concentração de massa celular seca C_X (g_{ms}. L⁻¹).

$$C_X = (0,48 \pm 0,01) * OD \quad R^2 = 0,98 \quad (5.7)$$

A viabilidade celular foi monitorada em todos os experimentos utilizando microscopia ótica (microscópio LEICA DM3000) e contagem de células em câmara de Neubauer de acordo com a técnica azul de metileno (MILESSI *et al.*, 2020b).

5.2.8.2 Concentração de Açúcares e Metabólitos

As concentrações de etanol, glicerol e glicose foram medidas *off-line* em HPLC com detecção de índice de refração (Modelo 410, Waters) (MILESSI *et al.*, 2020b) nas seguintes condições: Coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad); solução de ácido sulfúrico de 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹; temperatura de 50 °C.

5.2.9 Estimativa de fluxos metabólicos experimentais, produtividade, rendimentos, e velocidade específica de crescimento

Conforme descrito na Seção 2.1, os fluxos metabólicos experimentais foram estimados *on-line* (relacionados à fase gasosa) e *off-line* (para biomassa, substrato e produtos, como etanol e glicerol). A velocidade de consumo ou produção do componente i (r_i , mmol.L⁻¹.h⁻¹) foi obtida por balanço de massa (componentes da fase líquida, Eqs. 5.8-5.10) ou balanço molar (componentes da fase gasosa, Eqs. 5.11-5.13) (Mesquita *et al.* 2019). Os fluxos experimentais calculados *on-line* ou *off-line* são identificados como (J_i^{Exp}) para distingui-los dos outros fluxos utilizados na estrutura de controle

- Células: $r_x = \frac{1}{V} * \frac{d(m_x)}{dt}$ (5.8)

- Substrato: $r_s = -\frac{1}{V} * \frac{d(m_s)}{dt}$ (5.9)

- Produto: $r_p = \frac{1}{V} * \frac{d(m_p)}{dt}$ (5.10)

- CO₂: $r_{CO_2} = y_{CO_2}^s \cdot \frac{Q_{gas}^e (1 - y_{CO_2}^e - y_{O_2}^e) \cdot P_e}{(1 - y_{CO_2}^s - y_{O_2}^s) T_{e \cdot R}} - y_{CO_2}^e \cdot \frac{Q_{gas}^e \cdot P_e}{T_{e \cdot R}}$ (5.11)

- O₂: $r_{O_2} = y_{O_2}^e \cdot \frac{Q_{gas}^e \cdot P_e}{T_{e \cdot R}} - y_{O_2}^s \cdot \frac{Q_{gas}^e (1 - y_{CO_2}^e - y_{O_2}^e) \cdot P_e}{(1 - y_{CO_2}^s - y_{O_2}^s) T_{e \cdot R}}$ (5.12)

- Q_{gas}^s: $Q_{gas}^s = \frac{(1 - y_{CO_2}^e - y_{O_2}^e) \cdot P_e \cdot T_s}{(1 - y_{CO_2}^s - y_{O_2}^s) T_{e \cdot P_s}} Q_{gas}^e$ (5.13)

m_x , m_s , e m_p são massa celular (g), massa de substrato (g) e massa do produto (g), respectivamente.

Os rendimentos do produto ($Y_{i/s}$) para biomassa, etanol e glicerol (Eq. 5.14) e a produtividade volumétrica (Pr_{EtOH}) para etanol (Eq.5.15) foram obtidos como índices globais, de acordo com as definições a seguir:

$$Y_{i/s} = \frac{(\text{Massa Final} - \text{Massa Inicial})_{\text{Produto},i}}{(\text{Massa Inicial} - \text{Massa Final})_{\text{Glicose}}} \quad (5.14)$$

$$Pr_{EtOH} = \frac{\text{Concentração Final de EtOH}}{\text{Tempo Total de Cultivo}} \quad (5.15)$$

Todos os parâmetros e médias foram submetidos ao teste Tukey com 95% de nível de confiança para análise estatística.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Rede Neural Artificial

O controle de micro-aeração proposto exigiu uma avaliação detalhada da influência do oxigênio no metabolismo da levedura. Portanto, o modelo metabólico foi usado para mapear diferentes combinações de fluxos de entrada (J_S^{MM} e $J_{O_2}^{MM}$) e as saídas correspondentes (fluxos de etanol, biomassa, CO₂ e glicerol) para identificar a melhor região operacional (Mesquita, et al., 2020). Em relação ao controle, a estrutura de entrada/saída selecionada para a RNA possui o $J_{CO_2}^{RNA}$ normalizado (Eq. 5.2) como entrada e o $J_{O_2}^{RNA}$ normalizado como saída (Figura 5.3). Esta

é uma abordagem de problema inverso, onde a RNA calcula o fluxo de oxigênio que forneceria um fluxo de CO₂ especificado.

Vários tamanhos de rede e funções de transferência foram testados, e a melhor arquitetura da RNA foi obtida usando o esquema de uma entrada/uma saída com 41 neurônios ocultos na única camada oculta. A combinação de $J_{CO_2}^{RNA}$ e $J_{O_2}^{RNA}$ foi selecionada porque se mostrou a configuração mais simples dos dados simulados, que viabilizasse a manipulação em tempo real da vazão de ar. Os dados usados para a geração da RNA (Figura 5.4C) não se sobrepuseram e cada linha correspondeu a uma condição de assimilação de substrato distinta.

Figura 5.3 - Estrutura da RNA obtida: W - peso de cada neurônio; b - *bias* de cada neurônio. A RNA tem uma camada oculta com 41 neurônios em que a função de transferência é uma tangente sigmoide. A camada de saída tem um neurônio e a função de transferência é puramente linear.

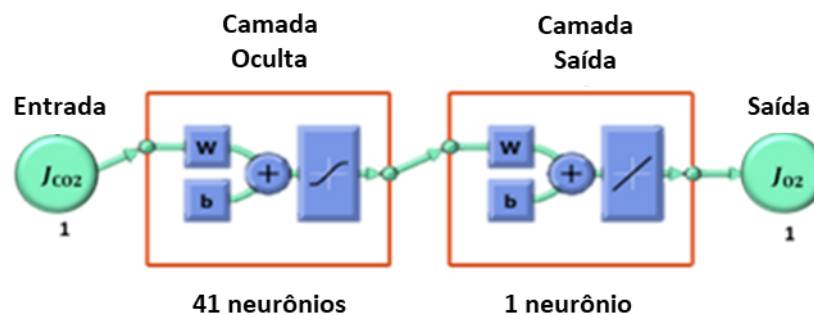
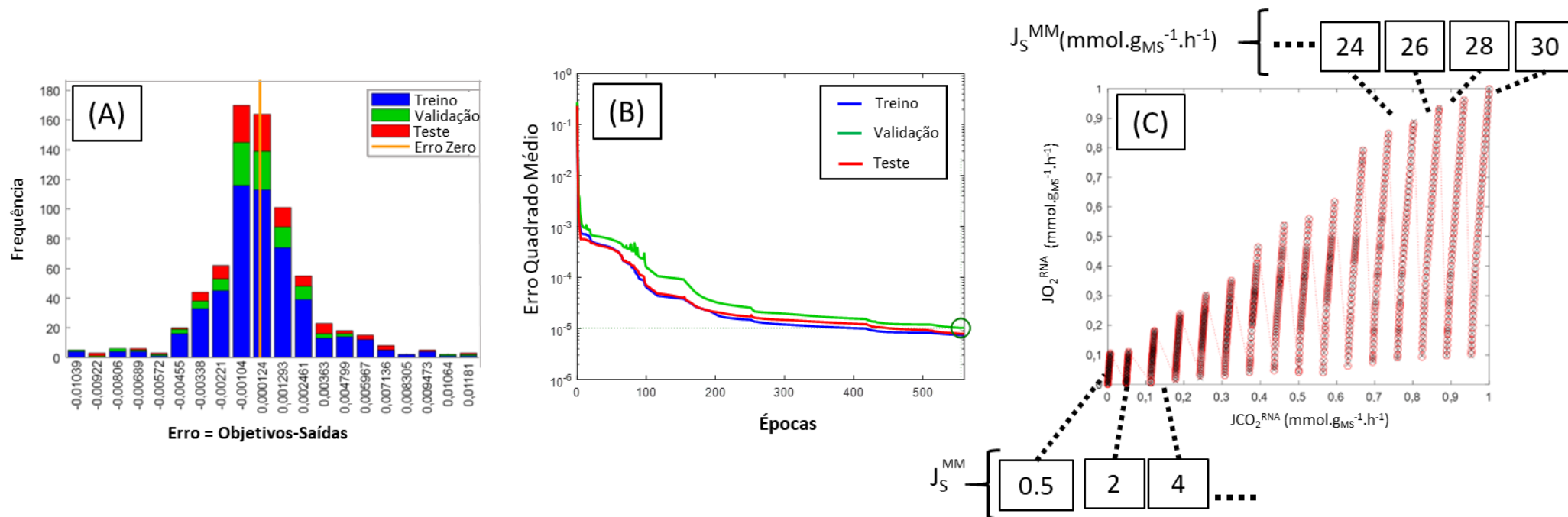


Figura 5.4 - (A) Histograma dos erros da RNA com 41 neurônios na camada oculta. (B) MSE minimizado. (C) Previsão da RNA. **O** – Previsão RNA; **X** – Dados simulados Optflux. Em cada caixa estão ilustrados os fluxos metabólicos de substrato são (J_S^{MM}) avaliados. As frequências ou instâncias representam a frequência das amostras do conjunto de dados em relação ao erro



O histograma de erro para esta configuração pode ser visto na Figura 5.4A. Neste caso, a raiz do erro quadrado médio (RMSE) foi de $0,30 \times 10^{-2} \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os dados de teste, e o erro absoluto médio (MAE) foi de $0,05 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a validação cruzada quádrupla. A função de transferência era uma sigmóide na camada oculta e puramente linear na camada de saída. O treinamento foi interrompido quando um dos critérios de parada do algoritmo foi atingido (épocas de treinamento, gradiente mínimo ou o número de verificações de validação), neste caso, o número de verificações de validação (Figura 5.4B). O número de verificações de validação representa o número de iterações sucessivas após as quais a diminuição do MSE associado ao desempenho da validação se estabilizou.

É importante mencionar que a RNA usada no algoritmo de controle segue uma abordagem de problema inverso, ou seja, ela calcula um fator causal $J_{\text{O}_2}^{\text{RNA}}$ a partir de uma variável mensurável $J_{\text{CO}_2}^{\text{RNA}}$. Isso implica que, se fosse utilizado o modelo metabólico, os cálculos seriam iterativos, situação claramente inviável para aplicações de controle. Além disso, os tempos computacionais dos simuladores metabólicos podem variar de 2 a 360 segundos (HEIRENDT et al., 2019), dependendo das restrições utilizadas e da complexidade do modelo metabólico. Especificamente no caso do presente trabalho, o tempo de simulação da RNA treinada foi da ordem de 70 milissegundos, enquanto a solução do mesmo problema exigiria várias simulações do modelo metabólico, em um procedimento iterativo. Ou seja, vários fluxos de J_{O_2} seriam testados *in silico* até encontrar um valor de J_{CO_2} correspondente calculado on-line, requerendo um tempo computacional da ordem de alguns minutos.

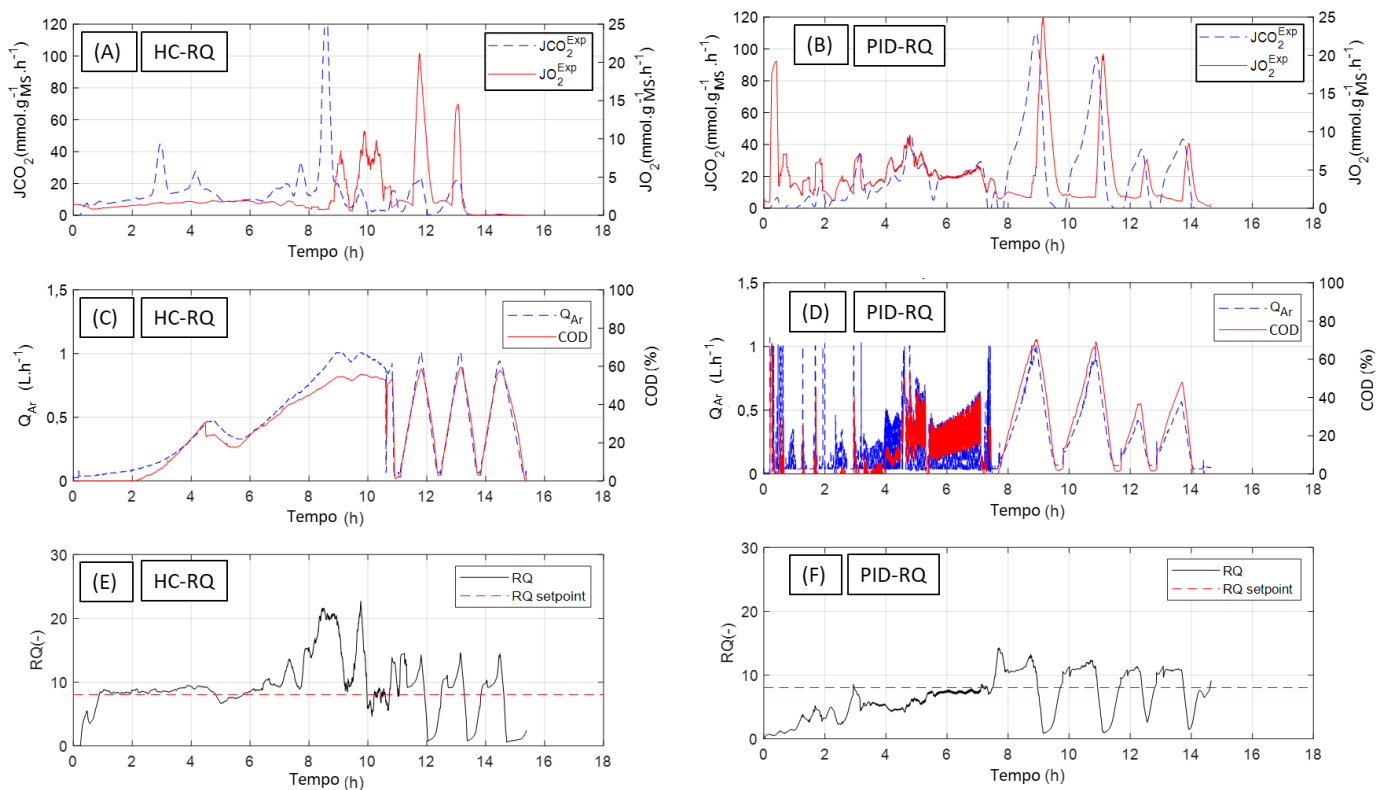
5.3.2 Estudos de caso

Como previamente exposto, foram realizados quatro experimentos para avaliar estratégias de micro-aeração mais simples; uma fermentação reproduzindo o processo brasileiro convencional de produção de etanol; e outros dois cultivos micro-aerados para avaliar a estrutura de controle proposta no presente capítulo. A ideia foi avaliar o real potencial do controle de fornecimento de O_2 (FM-RNA e FM-RNA-PI), comparando-o com as outras estratégias de micro-aeração ou de fermentação já relatadas na literatura. Os perfis de formação de biomassa, consumo de substrato e formação de produtos estão disponíveis no Apêndice B da tese (Figuras B-1 a B-3) para os estudos de caso HC-RQ, PID-RQ, Qfix-MB, FM-RNA e FM-RNA-PI. Para estudos de caso Qfix-B (Figura 4.6 e no Apêndice B, figura B-2A) e PBB (Figura 4.8 e no Apêndice B, figura B-2C), os perfis das principais variáveis são mostrados no Capítulo 4.

5.3.3 Caso A (HC-RQ) e Caso B (PID-RQ)

A heurística de controle proposta no estudo de caso A (Figura 5.2) visava manter o RQ dentro da faixa de controle (Figura 5.5E) adicionando ou subtraindo um pequeno valor constante da vazão de ar. A vazão do ar aumentou gradualmente (Figura 5.5C) até 10h de cultivo por causa da heurística aplicada para manter o RQ sob controle. Conseqüentemente, os valores de $J_{CO_2}^{Exp}$, $J_{O_2}^{Exp}$ (Figura 5A) e COD (Figura 5.5C) seguiram essa tendência, aumentando gradualmente. Após 10h, ocorreu um comportamento oscilatório para todos os estados.

Figura 5.5 – Desempenho dos controladores baseados em RQ. Fluxos metabólicos inferidos on-line para (A) HC-RQ e (B) PID-RQ; variável manipulada e medição da COD para (C) HC-RQ e (D) PID-RQ; quociente respiratório para (E) HC-RQ e (F) PID-RQ. Em (A) e (B), — $J_{O_2}^{Exp}$ e - - - $J_{CO_2}^{Exp}$. Em (C) e (D), — Q_{Ar} e - - - COD. Em (E) e (F), — RQ e - - - setpoint RQ. Condições experimentais: $V=4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4,5, 30°C, $DO_0=6$ (densidade óptica inicial) ($Cx_0=3 g.L^{-1}$), viabilidade inicial =75%.



As ações de controle do caso B (PID-RQ) foram ruidosas e oscilantes (Figura 5.5D) desde o início do cultivo, apesar de todos os dados com aquisição on-line terem sido submetidos

ao filtro digital para mitigar o ruído. Houve maior sensibilidade dos estados obtidos on-line (COD, $J_{CO_2}^{Exp}$ e $J_{O_2}^{Exp}$) em relação às ações de controle ruidosas para o caso B e a COD (Figura 5.5D) foi imediatamente afetada. Apesar do comportamento ruidoso, ambos $J_{CO_2}^{Exp}$ e $J_{O_2}^{Exp}$ (Figura 5.4B) mostraram um perfil semelhante, como resultado do esforço do controlador para manter o RQ no *setpoint*. Esse perfil extremamente ruidoso ilustra a necessidade de reestimativa dos ganhos mesmo em condições de cultivo semelhantes. A reestimativa dos ganhos também promove uma atenuação no desgaste das válvulas do fluxômetro. Após 8h, foram utilizados novos ganhos de PID, e apesar do comportamento oscilatório permanecer, ele foi atenuado e todos os estados observados on-line (DOC, $J_{O_2}^{Exp}$ e $J_{CO_2}^{Exp}$) seguiram o mesmo padrão de oscilação.

Um comportamento instável era esperado ao utilizar um PI ou PID devido à sua limitação quando aplicado em um processo com dinâmicas altamente não lineares, como é o caso da alteração da composição da fase gasosa em cultivos batelada (KUPRIJANOV *et al.*, 2009).

O padrão oscilatório observado especificamente após 9h (oscilações entre os valores mínimo e máximo) pode ser atribuído à definição de r_{O_2} (Eq. 5.12) e RQ (Eq 5.6) para ambos os casos HC-RQ (Figura 5.5E) e PID-RQ (Figura 5.5F). Devido ao aumento da vazão de ar, o termo referente à fração de oxigênio no gás de entrada se torna próximo da fração de oxigênio no efluente gasoso, reduzindo o denominador do cálculo do RQ para valores próximos a zero. O RQ calculado mostrou uma resposta sensível às oscilações (Figura 5.5E e 5.5F), o que impossibilitou que o sistema convergisse para o *setpoint* desejado. A instabilidade no RQ (Figuras 5.5E e 5.5F) causa constantes mudanças na vazão de ar e, conseqüentemente, com reflexos nos dados de oxigênio dissolvido (Figuras 5.5C e 5.5D).

5.3.4 Caso C (Qfix-B), Caso D (Qfix-MB) e Caso E (PBB)

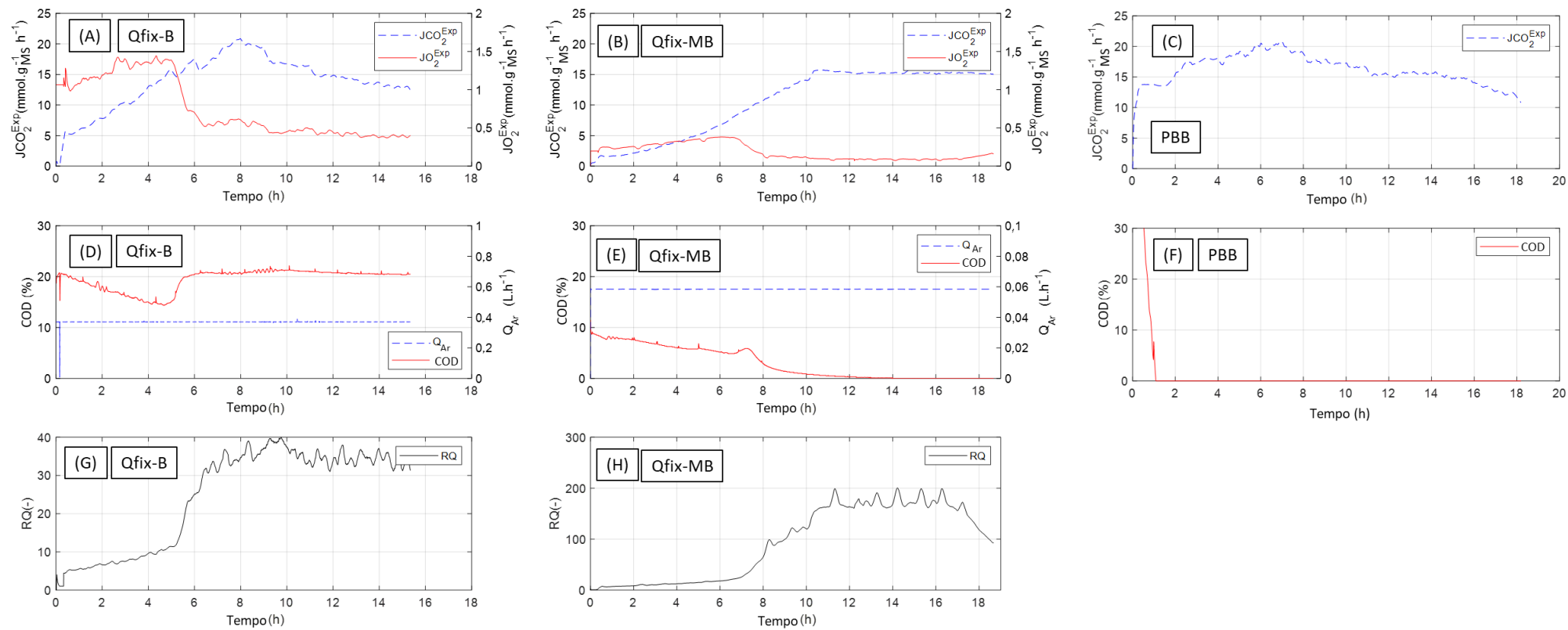
Os casos C (Qfix-B), D (Qfix-MB) e E (PBB) foram usados para avaliar condições micro-aeradas com fornecimento constante de ar (C, D) ou nenhum fornecimento de ar (E). Ambos os estudos com vazão constante de ar (Qfix-B e Qfix-MB) mostraram o mesmo padrão de diminuição constante do oxigênio dissolvido disponível no início da fermentação (Figura 5.6D e 5.6E, respectivamente). Mas para Qfix-B, houve um aumento repentino após 5h de fermentação e a COD estabilizou em 20 % de saturação (Figura 5.5D). Para o estudo de caso Qfix-MB (Figura 5.6E), o aumento da COD é observado como um pequeno pulso em torno de 7h de cultivo. No entanto, devido à baixa vazão de ar, após 13 horas de cultivo, o O_2 fornecido foi consumido pelas células e as medições da sonda indicaram a COD perto de zero (Figura

5.6E). Para o estudo de caso PBB (Figura 5.6F), houve um consumo completo do oxigênio após 1h de cultivo, o que o caracterizou como um processo totalmente anaeróbico.

Em relação aos fluxos metabólicos, $J_{O_2}^{Exp}$ se manteve constante até o momento em que o COD aumentou, quando, então, diminuiu e se estabilizou em níveis mais baixos (Figura 5.6A e 5.6B). Para o $J_{CO_2}^{Exp}$, houve um aumento inicial nos três casos seguido de estabilização nos valores registrados (Figura 5.6A, 5.6B e 5.6C). Conseqüentemente, os valores de RQ permaneceram estáveis tanto para os casos Qfix-B quanto Qfix-MB. No caso da vazão muito baixa os valores muito elevados de RQ são reflexos dos valores baixos de $J_{O_2}^{Exp}$ nas últimas 9h de cultivo (Figura 5.6G e 5.6H)

Figura 5.6– Desempenho dos cultivos conduzidos com vazão de ar constante (Qfix) e do cultivo do tipo PBB. Fluxos metabólicos inferidos on-line para (A) Qfix-B, (B) Qfix-MB e (C) PBB. Variável manipulada e medição da COD para (D) Qfix-B, (E) Qfix-MB e (F) PBB. O quociente respiratório (RQ) para (G) Qfix-B e (H) Qfix-MB. Em (A), (B) e (C), — $J_{O_2}^{Exp}$ e - - $J_{CO_2}^{Exp}$. Em (D), (E) e (F), — COD e - - - Q_{Ar} . Em (G) e (H), — RQ. Condições experimentais: V= 4L, Meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, OD₀=6 (Cx₀=3 g.L⁻¹), viabilidade inicial =75%.

Figura 5.6



Também é interessante mencionar que o $J_{CO_2}^{Exp}$, $J_{O_2}^{Exp}$ e RQ seguiram tendências semelhantes para ambos os casos de vazão de ar fixa (Figuras 5.6A, 5.6B, 5.6Ge 5.6H), apesar das diferenças nos valores de vazão de ar, o que permitiu um $J_{O_2}^{Exp}$ seis vezes maior para Qfix-B nas primeiras 5 horas. Uma diminuição súbita do $J_{O_2}^{Exp}$ para ambos os experimentos Qfix ocorreu e pode sinalizar uma mudança no metabolismo das células.

Segundo Alfenore *et al.* (2004), a produção de energia por leveduras é dividida em duas fases. Na primeira fase, há produção simultânea de energia através das vias metabólicas de produção de biomassa e geração de etanol. Na segunda fase, o investimento na formação da biomassa é reduzido e pode se tornar constante. Segundo os autores, nesta fase, a quantidade líquida de energia gerada pela produção de etanol seria suficiente para suprir as necessidades de manutenção da célula. Assim, essas alterações metabólicas refletiriam nos fluxos de assimilação de oxigênio, que seriam maiores na primeira fase e menores na segunda.

5.3.5 Casos F: FM-RNA e FM-RNA-PI

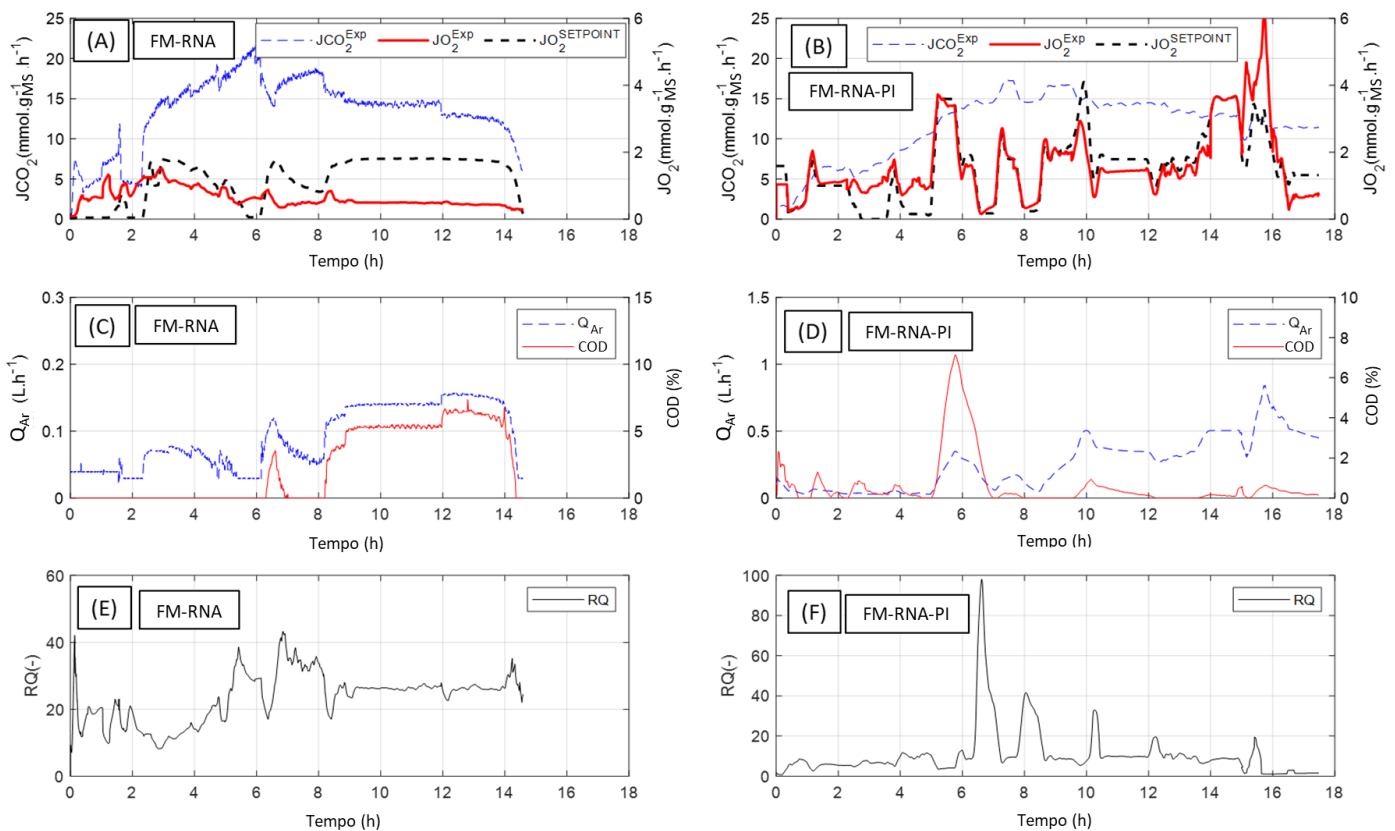
Ambas as estratégias FM-RNA tiveram uma manipulação mais conservadora na vazão de ar (Figura 5.7C e 5.7D). Além disso, o sistema de controle proposto se mostrou suficiente ao enfrentar distúrbios de medição. A diferença básica entre os casos FM-RNA e FM-RNA-PI é que este último teve um controlador PI implementado para reduzir o erro estacionário na variável controlada (Figura 5.7A). A razão por trás da adição do controlador PI é o comportamento que o caso FM-RNA mostrou para o $J_{O_2}^{Exp}$, o qual permaneceu constante após 8h de cultivo (Figura 5.7A). Esse comportamento foi observado em trabalhos anteriores utilizando controle baseado em fluxos metabólicos (MESQUITA *et al.*, 2019), e também foi observado perfil semelhante nos casos Qfix-B e Qfix-MB, conforme discutido na seção 5.3.4. Vale ressaltar que somente os modelos GSM não são capazes de reproduzir a alteração metabólica acima mencionada (Alfenore *et al.*, 2004).

Mas, na estrutura de controle FM-RNA (Figura 5.2), o modelo GSM é usado para prever valores de $J_{O_2}^{SP}$, que, por sua vez, são usados na Eq. 5.5 (lei de controle) para atualizar a vazão de ar. Logo, um aumento do COD (Figura 5.7C) é consequência do fornecimento adicional de oxigênio, ou seja, o excedente de oxigênio é proveniente do Q_{Ar} superestimado. Alguns fatores são responsáveis por esse excedente, um dos principais é que a estrutura de controle proposta é rigorosamente uma estrutura de controle malha aberta, sem ação de controle em relação ao erro, mas que apresentou características de controle proporcional (presença de

um erro estacionário). O erro estacionário observado acabou levando o sistema a uma condição de fornecimento adicional de ar. Outro fator que contribuiu para o aumento da COD foi a redução da assimilação do oxigênio presente no caldo de cultivo devido à redução da atividade metabólica das células na presença de maiores concentrações de etanol. Por essas razões, para lidar com esse desvio do modelo GSM e melhorar o desempenho do controlador se propôs o controlador FM-RNA-PI (Perfis de concentração disponíveis no Apêndice B, Figura B-3).

Figura 5.7 - Desempenho do cultivo usando o controle proposto para fluxos metabólicos.

Fluxos metabólicos inferidos on-line para (A) FM-RNA e (B) FM-RNA-PI. Variável manipulada e medição (COD) para (C) FM-RNA e (D) FM-RNA PI. O quociente respiratório (RQ) para (E) FM-RNA e (F) FM-RNA-PI. Em (A) e (B) --- $J_{O_2}^{SP}$, — $J_{O_2}^{Exp}$, - - - $J_{CO_2}^{Exp}$. Em (C) e (D), — COD e - - - Q_{Ar} . Em (E) e (F), — RQ. Condições experimentais: $V=4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, $OD_0=6$ ($Cx_0=3 g.L^{-1}$), viabilidade inicial =75% .



Para o caso F2, o componente de controle PI foi ativado por volta de 5h de cultivo quando a razão ($J_{O_2}^{Exp}/J_{O_2}^{SP}$) estava acima de 5 (Figura 5.7B), que coincidiu com o aumento da COD acima de 1,5%. Ele atuou como um controlador secundário até o final do experimento,

fornecendo pequenos incrementos na vazão de ar (Figura 5.7D). A inserção do PI permitiu que o $J_{O_2}^{Exp}$ se mantivesse efetivamente perto $J_{O_2}^{SP}$ (Figura 5.7B).

Além disso, $J_{O_2}^{Exp}$ foi afastado do platô do fluxo metabólico de oxigênio observado na estratégia FM-RNA (Figura 5.7A e 5.7B). O oxigênio dissolvido permaneceu próximo de 0% após 6,5 h mesmo para vazões de ar tão altas quanto $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 5.7D) devido ao consumo de oxigênio ter sido estimulado na estratégia FM-RNA-PI, sendo o fluxo de oxigênio cerca de três vezes maior que aquele observado na estratégia FM-RNA (Figuras 5.7A e 5.7B).

O padrão do $J_{CO_2}^{Exp}$ foi semelhante para os casos FM-RNA (Figura 5.7A) e FM-RNA-PI (Figura 5.7B), e atingiu um valor máximo de $16 \text{ mmol}\cdot\text{g}_{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. $J_{CO_2}^{Exp}$ foi reduzido ao longo do tempo à medida que o substrato foi esgotado. O valor máximo de $J_{CO_2}^{Exp}$ é coerente quando comparado com as estratégias anteriores. O caso Qfix-MB tinha $J_{CO_2}^{Exp}$ constante em torno de $15 \text{ mmol}\cdot\text{g}_{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, e o $J_{CO_2}^{Exp}$ do estudo de caso PBB (completamente anaeróbico) atingiu $20 \text{ mmol}\cdot\text{g}_{MS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Em relação ao RQ, permaneceu em torno de 30, para o caso FM-RNA, após o aumento observado na COD (Figura 5.7E). Para o caso F2, após 6h, o RQ permaneceu abaixo de 10 com algumas oscilações semelhantes a picos (Figura 5.7F), que coincidiram com o $J_{O_2}^{Exp}$ muito baixo (Figura 7B), como explicado anteriormente para os casos PID-RQ e HC-RQ.

5.3.6 Desempenho das estratégias de fermentação

As estratégias estudadas para a produção de etanol podem ser avaliadas a partir de diversos aspectos conectados, iniciando pela aplicação da micro-aeração, que desencadearam diferentes respostas celulares, e influenciaram os índices de desempenho reunidos na Tabela 5.2. O perfil de concentração para os casos HC-RQ, PID-RQ, Qfix-MB, FM-RNA e FM-RNA-PI estão disponíveis no Apêndice deste capítulo (Apêndice B) ou no capítulo anterior (capítulo 4. Figuras 4.6 e 4.8) para os casos Qfix-B e PBB.

Um aspecto a ser destacado é a importância do comportamento oscilatório observado na vazão de ar, na COD, no RQ e no $J_{O_2}^{Exp}$ para manter o consumo de oxigênio. Olhando para as figuras 5.5A, 5.5B, 5.6A, 5.6B, 5.7A e 5.7B, fica claro que os mais altos níveis de fluxos de oxigênio foram atingidos para as estratégias HC-RQ, PID-RQ e RNA-PI. Em média, o $J_{O_2}^{Exp}$ para essas estratégias de cultivo foi pelo menos o triplo dos valores observados em Qfix-B (Figura

5.6A, últimas nove horas) realizado com $0,36 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, que é superior à vazão média de ar definida pelo controlador em RNA-PI ($0,3\pm 0,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Além disso, nos cultivos HC-RQ, PID-RQ e RNA-PI, o $J_{\text{O}_2}^{\text{Exp}}$ permaneceu elevado ao longo dos experimentos, e como discutido anteriormente, para os casos Qfix-B, Qfix-MB e FMA-RNA, não foram observados valores tão altos. No caso do RNA-PI, os estímulos no fornecimento de oxigênio podem ter atrasado a ocorrência da segunda fase metabólica (produção de energia principalmente pela via redutiva) descrita pela literatura (ALFENORE *et al.*, 2004), já que as células pareciam manter a primeira fase metabólica (produção simultânea de energia por vias oxidativas e redutivas).

No entanto, o aumento do consumo de O_2 pode favorecer a formação de biomassa em detrimento da produção de etanol. Consequentemente, as estratégias de HC-RQ e PID-RQ apresentaram os maiores valores de rendimento em biomassa e os mais baixos em etanol (Tabela 5.2), sugerindo uma grande ativação do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

Este *shift* metabólico para a formação da biomassa é provavelmente a principal fraqueza do controle de micro-aeração baseado em RQ, uma vez que várias relações entre $J_{\text{CO}_2}^{\text{Exp}}$ e $J_{\text{O}_2}^{\text{Exp}}$ (Eq. 5.6) pode atender ao *setpoint* desejado. Assim, os controles de RQ quando usados isoladamente podem falhar na manutenção dos níveis de micro-aeração adequados, e uma restrição adicional para controlar o $J_{\text{O}_2}^{\text{Exp}}$ ou monitoramento preciso da COD teriam que ser incorporadas na estrutura de controle de RQ para evitar o *shift* metabólico.

O experimento Qfix-MB realizado com uma baixa vazão de ar resultou em rendimentos de biomassa, etanol, e glicerol semelhantes aos observados para a fermentação PBB (Tabela 5.2). Tanto para Qfix-MB quanto para PBB, o metabolismo da levedura foi direcionado para a via redutiva, com a redução dos fluxos pela via oxidativa. O Qfix-B, que tinha $J_{\text{O}_2}^{\text{Exp}}$ superior ao Qfix-MB, apresentou um desempenho intermediário, com menor rendimento em etanol e maior formação de biomassa.

Os casos F apresentaram os maiores rendimentos em etanol ($Y_{\text{EtOH/S}}=0,48 \text{ g}_{\text{etanol}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) e rendimento em biomassa estatisticamente igual ($Y_{\text{X/S}}=0,027 \text{ g}_{\text{células}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$). No caso do rendimento em biomassa, ele foi estatisticamente o mesmo para todos os estudos de caso analisados. Como característica da cepa estudada, parece que essa levedura não investe tanto no crescimento celular, provavelmente porque foi isolada do ambiente de fermentação industrial. Embora o FMA-RNA apresentasse baixo fluxo de consumo de oxigênio (em comparação com FMA-RNA-PI), ele foi três vezes superior, em média, quando comparado aos valores de $J_{\text{O}_2}^{\text{Exp}}$ alcançados no experimento Qfix-MB. Assim, o controle baseado em fluxo

metabólico conseguiu manter os fluxos de consumo de oxigênio dentro da região operacional adequada que maximiza a produção de etanol (MESQUITA et al., 2019).

A produtividade (Pr_{EtOH} , Tabela 2) apresentou valor médio de $3,40 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para os casos A até E. Para as estruturas de controle propostas FMA-RNA e FMA-RNA-PI, a produtividade foi maior quando comparada aos demais casos com um valor médio de $4,16 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Para comparação, segundo Amorim *et al.* (2011), em fermentações industriais, o tempo estimado em tanques de fermentação varia de 6 a 12h com volumes úteis de 500 a 3000 m^3 . As concentrações finais de etanol atingem cerca de 7 a 11% (v/v), conseqüentemente, a produtividade volumétrica varia em uma faixa de 4,6 a $10 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tabela 5.2 – Índices de desempenho dos cultivos para os estudos de caso avaliados. (Condições experimentais: $V=4\text{L}$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C , $OD_0=6$ ($C_{x0}=3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), viabilidade inicial =75% . Glicose, etanol e glicerol concentrações medidas no HPLC. C_x medido por leituras de densidade ótica. ^{a,b} $Y_{X/S}$; ^{c...e} $Y_{EtOH/S}$; ^{f...j} Pr_{EtOH} ; ^{k...m} $Y_{EtOH/X}$; ^{n...p} $Y_{EtOH/Glyc}$; ^{q,r} Viabilidade. Médias comparadas usando teste Tukey com 95% de nível de confiança, as mesmas letras sobrescritas significam que não há diferença estatística dentro do mesmo grupo de índice de desempenho

Indicadores de Desempenho	HC-RQ (Caso A)	PID-RQ (Caso B)	Qfix-B (Caso C) (Capítulo 4)	Qfix-Baixo (Caso D)	PBB (Caso E) (Capítulo 4)	FM-RNA (Caso F1)	FM-RNA-PI (Caso F2)
Y_{X/S} (g _{células} · g _{substrato} ⁻¹)	0,033±0,001 ^a	0,033±0,002 ^a	0,030±0,003 ^{ab}	0,024±0,001 ^b	0,023±0,001 ^b	0,026±0,001 ^{ab}	0,027±0,001 ^{ab}
Y_{EtOH/S} (g _{etanol} · g _{substrato} ⁻¹)	0,34±0,01 ^c	0,34±0,01 ^c	0,370±0,003 ^c	0,40±0,01 ^d	0,39±0,01 ^d	0,48±0,02 ^e	0,48±0,01 ^e
Pr_{EtOH} (g · L ⁻¹ · h ⁻¹)	3,370±0,005 ^f	3,677±0,002 ^g	3,50±0,02 ^h	3,00±0,06 ⁱ	3,41±0,06 ^h	4,226±0,007 ^j	4,1±0,2 ^j
Y_{EtOH/X} (g _{etanol} · g _{células} ⁻¹)	10,5±0,5 ^k	10,5±0,9 ^k	12,3±0,8 ^k	16,7±0,2 ^l	16,9±0,2 ^l	18,5±0,2 ^m	18,0±0,1 ^m
Y_{EtOH/Glyc} (g _{etanol} · g _{glicérol} ⁻¹)	7,5±0,3 ⁿ	7,7±0,4 ⁿ	7,6±0,1 ⁿ	7,8±0,3 ^{no}	8,3±0,1 ^o	10,4±0,2 ^p	10,7±0,5 ^p
Viabilidade celular final (%)	88±3 ^q	88±2 ^q	85±4 ^q	87±3 ^q	88±3 ^q	95±1 ^r	96±1 ^r

Tabela 5.2

Os valores de produtividade superior relatados para fermentações industriais estão relacionados ao uso de melaço e temperaturas mais altas, enquanto os experimentos deste capítulo foram realizados em meio mínimo a 30°C. De acordo com a literatura, um meio formulado com melaço apresenta produtividade de etanol cerca de 50% maior, como foi visto no capítulo 4 (MESQUITA et al., 2021a).

Quanto a relação de etanol produzido por célula ($Y_{EtOH/X}$) e a relação do etanol por glicerol ($Y_{EtOH/Glyc}$), os estudos de caso FMA-RNA e FMA-RNA-PI tiveram os maiores valores (valor médio de $Y_{EtOH/X}=18,3 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1}$ e $Y_{EtOH/Glyc}=10,6 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{glicerol}}^{-1}$), reforçando a hipótese de ativação do ciclo TCA paralelo à síntese do etanol induzida pela estratégia de controle.

Em relação à viabilidade celular, todos os experimentos começaram com 75% de células viáveis. Os casos A (HC-RQ) para E (BBP) apresentaram viabilidade celular final média de 87%, enquanto os casos FMA-RNA e FMA-RNA-PI foram estatisticamente diferentes, com viabilidade celular final de 96%. A última estratégia de cultivo pode ter permitido um fornecimento racional de fluxo de oxigênio, que ativou a cadeia respiratória da levedura. É possível que a ativação parcial da respiração celular ajudou a capacidade de manutenção e fermentação das células, seja energizando e estabilizando os processos relacionados às mitocôndrias ou pela regeneração efetiva dos cofatores, reduzindo o desequilíbrio da redox (HERRERO et al., 2008; LIU et al., 2016). Os fluxos de assimilação do O_2 mais altos alcançados devido ao aumento da respiração também contribuíram para reduzir o desvio entre $J_{O_2}^{SP}$ e $J_{O_2}^{Exp}$, melhorando o desempenho do controle.

De forma geral, os resultados confirmaram a eficácia do controle baseado em fluxos metabólicos para cultivos micro-aerados. A abordagem de *deep learning* apresentada neste capítulo foi crucial para permitir o uso das informações complexas e ricas geradas pelo modelo em escala genética na estrutura de controle. Essa abordagem também pode ser útil como "primeiro palpite" na definição das condições operacionais ideais para os biorreatores. No entanto, é imprescindível observar a faixa de operação aplicada à RNA e se o modelo metabólico é válido nas condições estudadas. Esta é a principal ressalva quanto ao uso dos modelos metabólicos, pois não é recomendável extrapolar a faixa definida. Mas essa restrição não diminui a importância de sua aplicação.

5.4 CONCLUSÃO

O uso da RNA como modelo substituto do modelo em escala genômica permitiu uma estrutura de controle eficaz para fermentação micro-aerada. A estratégia de controle proposta foi implementada com sucesso no sistema de supervisão e manipulou a vazão do ar para acompanhar as necessidades metabólicas sob fornecimento limitado de oxigênio. Os experimentos de controle baseados em RNA, quando comparados com outras estratégias de micro-aeração ($P_{r,EtOH}=3,68 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $Y_{EtOH/S}=0,350 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) ou com fermentação anaeróbica ($P_{r,EtOH}=3,41 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $Y_{EtOH/S}=0,40 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$), mostrou desempenho superior, com ações de controle mais suaves e maior produtividade ($P_{r,EtOH}=4,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e rendimento do etanol ($Y_{EtOH/S}=0,48 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$), bem como perfis conservadores da variável manipulada.

A abordagem proposta está em consonância com os preceitos da Indústria 4.0, fornecendo um sistema descentralizado, modular e flexível com aquisição e tratamento de dados *on-line*. No entanto, o sistema tem espaço para melhorias incluindo a incorporação, por exemplo, de um sensor de biomassa, o que permitiria obter dados *on-line* de viabilidade celular e poderia melhorar o desempenho das estratégias de controle propostas. Outras metodologias para geração de um modelo substituto, além das RNAs, também poderiam ser avaliadas. Finalmente, a mesma estratégia pode ser aplicada a outros bioprocessos que necessitam de micro-aeração para maximizar a formação do produto de interesse.

6 OPERABILIDADE E CONTROLE BIOMIMÉTICO DE UM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SOB MICRO-AERAÇÃO

6.1 INTRODUÇÃO

Os bioprocessos precisam ser conduzidos sob um controle rigoroso de diversas variáveis como, por exemplo, o fornecimento adequado de fonte de carbono e oxigênio, para direcionar as células à máxima produção do produto de interesse e garantir a qualidade do mesmo (NICOLETTI et al., 2009; STANKE e HITZMANN, 2013). Normalmente, para a maioria dessas variáveis, os sistemas de monitoramento de biorreatores já estão equipados com controladores PID (Proporcional-Integral-Derivado) com configurações ajustáveis (ALFORD, 2006). No entanto, mesmo para o fornecimento de oxigênio em condições totalmente aeróbicas, são observadas limitações dos controladores convencionais PID devido às condições operacionais e biológicas que podem afetar a dinâmica do processo (KUPRIJANOV et al., 2009). O uso de controle preditivo baseado em modelo ou *Model Predictive Control* (MPC) para tais processos seria, portanto, uma alternativa promissora, pois o MPC pode lidar com restrições de processo e dinâmica de processos não-lineares (CAMPANI et al., 2019; GOMES e MENAWAT, 2000; METE et al., 2012).

Como explanado anteriormente, processos conduzidos em micro-aeração ou limitação de oxigênio tem aplicação industrial e relevância no contexto da pesquisa acadêmica, para viabilizar estudos do metabolismo em resposta a diferentes níveis de disponibilidade de oxigênio. São exemplos de aplicação dessa condição de cultivo a produção biocombustível como etanol por *Kluyveromyces marxianus* (GAO et al., 2015), *Saccharomyces cerevisiae* (RIVERA et al., 2017) e *Escherichia coli* recombinante (NIEVES et al., 2011). Processos voltados à obtenção de membranas fotossintéticas por *Rhodospirillum rubrum* (CARIUS et al., 2014) ou poli-3-hidroxi-butirato (PHB) por *Escherichia coli* recombinante (WU et al., 2014) também são conduzidos em condições microaeradas.

Como também apresentado no capítulo anterior, o desenvolvimento de uma estrutura de controle para essa classe de processos é altamente desafiador, pois há obstáculos adicionais associados ao limite de medição dos sensores e alto custo de equipamentos capazes de medir níveis baixos de oxigênio dissolvido (CARIUS et al., 2014). Para uma configuração de controle bem-sucedida, é necessário primeiro compreender as regiões viáveis de operação. Em, outras

palavras, é preciso conhecer se um determinado conjunto de variáveis de entrada pode conduzir o processo ao objetivo desejado, por exemplo, maximizar a produtividade ou concentração de um dado produto (GAZZANEO et al., 2020). O campo de estudo de operabilidade do processo é essencial para entender melhor as regiões operacionais de um processo de antemão e permitir a sua intensificação (LIMA et al., 2010; TIAN et al., 2018). A análise de operabilidade tem sido aplicada principalmente aos sistemas de energia, por exemplo, para o projeto de reatores de membrana (BISHOP e LIMA, 2020; CARRASCO e LIMA, 2017) ou para definir as condições operacionais dos trocadores de calor (TIAN e PISTIKOPOULOS, 2019). Porém, no cenário atual da quarta revolução industrial, a análise de operabilidade também pode ser utilizada em bioprocessos, pois permite que plantas como biorrefinarias alcancem altos rendimentos de produtos com menor custo de produção (SVENSSON; ERIKSSON; WIK, 2015). Tal análise também ajudaria na avaliação da flexibilidade, confiabilidade e controlabilidade, considerando a sustentabilidade e a utilização de novas matérias-primas (DEMIREL; LI; HASAN, 2019; SVENSSON; ERIKSSON; WIK, 2015).

Os bioprocessos requerem um algoritmo de controle robusto para manter a condição de operação na região ideal. Nesse sentido, a implementação de estratégias de controle que utilizem algoritmos biomiméticos é uma alternativa interessante para lidar com dinâmica de sistemas não lineares. O *Biologically-Inspired Optimal Control Strategy* (BIO-CS), em particular, utiliza técnicas não lineares de otimização (por exemplo, método do ponto interior) para obter soluções ideais para sistemas dinâmicos. O BIO-CS é inspirado no comportamento biológico de colônias de formigas (interações líder-seguidor), em combinação com conceitos de controle ideal na busca por alcançar um objetivo definido. A estrutura do BIO-CS permite o uso de múltiplas variáveis de processo como entrada, mesmo que elas tenham alto grau de correlações (MIRLEKAR; LI; LIMA, 2017). O BIO-CS tem mostrado capacidade em lidar com problemas complexos, assegurando o desempenho do processo em diferentes condições, e pode ser usado como MPC (MIRLEKAR et al., 2018b).

Esse capítulo propõe uma nova estratégia de controle de uma fermentação micro-aerada, utilizando a produção de etanol por levedura *S. cerevisiae* como estudo de caso. Primeiramente foi realizada a análise de operabilidade utilizando o modelo que descreve o crescimento do microrganismo sob limitação de fornecimento de oxigênio. Em seguida, por meio de simulações, foi avaliado o desempenho do BIO-CS em manipular as vazões de entrada de ar e nitrogênio, buscando manter as células no estado metabólico ideal para alcançar a maior produção de etanol possível definida pela análise de operabilidade. Esta estratégia, que integra a análise da operabilidade com um algoritmo de controle biomimético, contempla aspectos

importantes do desenvolvimento de processo associado com engenharia de sistemas de bioprocessos (KOUTINAS et al., 2012) e Indústria 4.0. Em relação a este último, alguns pontos importantes são a descentralização do processo, envolvendo a tomada de decisão pelo próprio sistema; a aquisição e processamento imediato de dados, ampliando a capacidade de operar em tempo real; e, finalmente, aspectos de modularidade (LASI et al., 2014; ZHOU; TAIGANG LIU; LIFENG ZHOU, 2015), pois seria possível aplicar a mesma estrutura de controle a diferentes microrganismos e modos de operação de biorreatores.

6.2 METODOLOGIA

6.2.1 Estudo de caso: fermentação micro-aerada

A estrutura sequencial proposta de operabilidade do processo e BIO-CS foi avaliada para um processo de fermentação micro-aerada em batelada. Todas as simulações e o mapeamento apresentados a seguir foram realizados utilizando o MATLAB® (2019a). Para implementar o controlador biomimético, foi proposto um modelo capaz de descrever o crescimento da levedura em condições limitadas de oxigênio, o qual será apresentado na próxima seção. Dois conjuntos de dados experimentais dos cultivos micro-aerados FM-RNA e FM-RNA-PI foram utilizados para a avaliação do modelo (capítulo 5). O primeiro conjunto de dados (FM-RNA) foi usado para a estimativa de parâmetros e o segundo (FM-RNA-PI), para validação. Para lembrar, o primeiro conjunto de dados experimentais (FM-RNA) teve o perfil de aeração definido por uma lei de controle que incorporou informações inferidas de uma Rede Neural Artificial (RNA). O segundo conjunto também utilizou as informações inferidas pela RNA, mas um controlador proporcional-integral foi adicionado como controle secundário para aprimorar o perfil de aeração (FM-RNA-PI). Os dados experimentais do cultivo FM-RNA também foram utilizados para determinar os parâmetros cinéticos e os coeficientes de rendimento apresentados neste capítulo, que estão disponíveis na Tabela 6.1, assim como as condições iniciais apresentadas na Tabela 6.2.

6.2.2 Modelo de crescimento em condições micro-aeradas

O modelo dinâmico proposto (Eqs. 6.1-6.12) inclui duas variáveis manipuladas (Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$ ambas em $L \cdot \text{min}^{-1}$) e seis estados: concentração de substrato, C_s , $g \cdot L^{-1}$ (Eq. 6.4); concentração de biomassa (em massa seca), C_x , $g_{ms} \cdot L^{-1}$ (Eq. 6.5); concentração de etanol, C_e ,

$g.L^{-1}$ (Eq. 6.6); fração de saída de oxigênio, $y_{O_2}^{out}$ (Eq. 6.7); e os fluxos J_{O_2} (Eq. 6.8) e J_{CO_2} (Eq. 6.9). O fluxo metabólico de oxigênio (J_{O_2} , $mmol. g_{MS}^{-1}. h^{-1}$, Eq. 6.8) e o fluxo metabólico de dióxido de carbono (J_{CO_2} , $mmol. g_{MS}^{-1}. h^{-1}$, Eq. 6.9) são os estados controlados para garantir a produtividade ideal de etanol em condições micro-aeradas. As considerações e os balanços de massa utilizados para a obtenção do modelo são apresentados no Apêndice C. O modelo do processo se baseia em balanços de massa que descrevem a dinâmica dos principais componentes. Para descrever o fluxo de substrato, considera-se seu consumo pelas rotas oxidativa ($J_S^{Oxidativo}$, ciclo do ácido cítrico) e redutiva ($J_S^{Redutivo}$, acetaldeído ao etanol) (SONNLEITNER; KÄPPELI, 1986).

A abordagem é semelhante à empregada em outros estudos propostos na literatura, voltados principalmente para estratégias de alimentação (DEWASME; WOUWER, 2008; SCHEIBLAUER et al., 2018; VALENTINOTTI et al., 2003). Ambos os fluxos de substrato ($J_S^{Redutivo}$, Eq. 6.1; e $J_S^{Oxidativo}$, Eq. 6.2) são determinados por um sistema de equações lineares, nas quais os fluxos de oxigênio e dióxido de carbono estão correlacionados pelo rendimento de cada componente em relação ao substrato (SHULER; KARGI, 2002; STEPHANOPOULOS et al., 1998). Os fluxos de substrato $J_S^{Redutivo}$ e $J_S^{Oxidativo}$ foram incorporados ao sistema de equações diferenciais.

$$J_{O_2} = \left(\frac{Y_{O_2}}{S}\right)^{Oxidativo} * J_S^{Oxidativo} \quad (6.1)$$

$$J_{CO_2} = \left(\frac{Y_{CO_2}}{S}\right)^{Oxidativo} * J_S^{Oxidativo} + \left(\frac{Y_{CO_2}}{S}\right)^{Redutivo} * J_S^{Redutivo} \quad (6.2)$$

$$J_S = \left(J_S^{Oxidativo} + J_S^{Redutivo}\right) \quad (6.3)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = - \left[\left(J_S^{Oxidativo} + J_S^{Redutivo}\right) * C_X + m_s * C_X \right] \quad (6.4)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\left(\frac{Y_X}{S}\right)^{Oxidativo} * J_S^{Oxidativo} + \left(\frac{Y_X}{S}\right)^{Redutivo} * J_S^{Redutivo} \right) * C_X \quad (6.5)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \left(\left(\frac{Y_P}{S}\right)^{Micro-aerado} * J_S \right) * C_X \quad (6.6)$$

$$\frac{dy_{O_2}^s}{dt} = \left(\frac{y_{O_2}^e * Q_{gas}^e}{V_r} * \frac{T_s}{P_s} * \frac{P_e}{T_e} - \frac{y_{O_2}^s * Q_{gas}^s}{V_r} \right) - J_{O_2} * C_X * V * \frac{T_s * R}{P_s * V_r} \quad (6.7)$$

$$\tau_1 * \frac{dJ_{O_2}}{dt} + J_{O_2} = \left(\frac{k_L a * C_{O_2, sat}}{C_x} \right) \quad (6.8)$$

$$\tau_2 * \frac{dJ_{CO_2}}{dt} + J_{CO_2} = \left[\frac{1}{V * C_x * C_f} * (y_{CO_2}^e * Q_{gas}^e * \frac{P_e}{T_e * R} - y_{CO_2}^s * Q_{gas}^s * \frac{P_s}{T_s * R}) \right] \quad (6.9)$$

$$y_{CO_2}^s = 1 - y_{O_2}^s - \frac{(1 - y_{O_2}^e - y_{CO_2}^e) * Q_{gas}^e}{Q_{gas}^s} * \frac{T_s}{P_s} * \frac{P_e}{T_e} \quad (6.10)$$

$$k_L a = 3600 * 7,65 * 10^{-6} * N^{0,778} * \frac{Q_{Ar}^e}{V}^{0,688} * \mu_{visc}^{-0,620} \quad (6.11)$$

$$Q_{gas}^s = (1,30 \pm 0,05) * Q_{gas}^e \quad (6.12)$$

Uma resposta de primeira ordem foi assumida para as dinâmicas de J_{O_2} e J_{CO_2} (Eq. 6.8 e 6.9) para levar em conta as condições não modeladas, como atrasos nas atuações das válvulas, concentrações não homogêneas de O_2 e CO_2 dentro do reator, composição transiente do gás na dispersão multifásica e dinâmica do metabolismo celular (Campani et al., 2019). As constantes de tempo τ_1 e τ_2 (h) nas Eq. 6.8 e 6.9, respectivamente, foram determinadas experimentalmente, com base na resposta média dos fluxos J_{O_2} e J_{CO_2} sujeita a mudanças degrau em Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$. C_f (Eq. 6.9) é um fator de correção adicionado para auxiliar no ajuste do modelo. Eq. 6.11 define o $k_L a$ e pode ser encontrado na literatura (BUSTAMANTE; CERRI; BADINO, 2013). Nessa equação, N é a velocidade do impelidor (rpm), Q_{Ar}^e é a vazão de ar de entrada ($L \cdot min^{-1}$), e μ_{visc} é a viscosidade dinâmica (Pa.s). A Tabela 6.1 mostra os valores dos parâmetros usados nas simulações.

Tabela 6.1- Valores de parâmetros de descrição e modelo.

		(continua)
Parâmetros	Descrição	Valor
τ_1 (h)	Constante para dinâmica do J_{O_2} (Obtido usando o algoritmo SA)	0,47±0,01
τ_2 (h)	Constante para dinâmica do J_{CO_2} (Obtido usando o algoritmo SA)	0,52±0,02
μ_{max} (h^{-1})	Velocidade específica máxima de crescimento (MESQUITA et al., 2021a)	0,080±0,004

Tabela 6.1- Valores de parâmetros de descrição e modelo.

(continua)

Parâmetros	Descrição	Valor
K_s (g.L ⁻¹)	Constante de saturação de Monod (MESQUITA et al., 2021a)	4±2
P_m (g.L ⁻¹)	Constante de inibição por etanol (MESQUITA et al., 2021a)	120±3
C_f	Fator de correção para auxiliar o ajuste da dinâmica de J_{CO_2}	1,62±0,03
m_s (mmols.gx ⁻¹ . L ⁻¹)	Constante de manutenção (Obtido usando o algoritmo SA)	0,180±0,007
$(\frac{Y_p}{s})^{Micro-aerado}$ (g _{etanol} .g _{substrato} ⁻¹)	Rendimento do etanol com base no substrato para micro-aeração (Capítulo 5)	0,48±0,01
$(\frac{Y_x}{s})^{Oxidativo}$ (g _{biomassa} .g _{substrato} ⁻¹)	Rendimento de biomassa com base no substrato para a fase oxidativa (Capítulo 5)	0,033±0,002
$(\frac{Y_x}{s})^{Redutivo}$ (g _{biomassa} .g _{substrato} ⁻¹)	Rendimento de biomassa com base no substrato para a fase redutiva (Capítulo 5)	0,024±0,001
$(\frac{Y_{O_2}}{s})^{Oxidativo}$ (mol _{O2} .mol _{substrato} ⁻¹)	O ₂ e proporção de substrato para a fase oxidativa (Calculado usando os dados experimentais obtidos no capítulo 5)	1,18±0,02
$(\frac{Y_{CO_2}}{s})^{Oxidativo}$ (mol _{CO2} .mol _{substrato} ⁻¹)	Razão entre O ₂ consumido em relação ao substrato para a fase oxidativa (Calculado usando os dados experimentais obtidos no capítulo 5)	1,20±0,01
$(\frac{Y_{CO_2}}{s})^{Redutivo}$ (mol _{CO2} .mol _{substrato} ⁻¹)	Rendimento em CO ₂ em relação ao substrato para a fase oxidativa (Calculado usando os dados experimentais obtidos no capítulo 5)	1,65±0,05
$C_{O_2,sat}$ (g.L ⁻¹)	Concentração de saturação de oxigênio a 303 K (SANDER, 2015)	7,94x10 ⁻³
T_s (K)	Temperatura da fase fase gasosa na saída do biorreator	303
T_e (K)	Temperatura da fase gasosa na entrada do biorreator	294
P_s (atm)	Pressão da fase gasosa na saída do biorreator	1,07

Tabela 6.1- Valores de parâmetros de descrição e modelo (continuação)

Parâmetros	Descrição	Valor
P_e (atm)	Pressão da fase gasosa na entrada do biorreator	1,00
R (L.atm.mmol ⁻¹ . K ⁻¹)	Constante universal dos gases	82,05
V (L)	Volume de meio	4
V_r (L)	Volume ocupado pelo gás	5
N (rpm)	Velocidade de agitação	500
μ_{visc} (Pa.s)	Viscosidade dinâmica da água (CRITTENDEN <i>et al.</i> , 2012)	$0,798 \times 10^{-3}$

(conclusão da tabela 6.1)

Como dito anteriormente, os parâmetros m_s (Eq. 6.4) e C_f (Eq. 6.9) foram estimados através da minimização do Erro Quadrado Médio (*Mean Square Error*, MSE) utilizando um algoritmo de *Simulated Annealing* (SA) no MATLAB para ajustar o modelo aos dados experimentais (concentrações de biomassa, substrato, etanol) do primeiro conjunto de dados experimentais (FM-RNA). O segundo conjunto de dados experimentais (FMA-RNA-PI) foi utilizado para validar o modelo.

Os efeitos da inibição por etanol foram incorporados considerando uma condição limite. Neste capítulo, o processo foi considerado em estado micro-aerado se a velocidade de crescimento limitada pelo substrato (representada por uma equação do tipo Monod, Eq. 6.13, obtida no capítulo 4) fosse maior do que a velocidade de crescimento oxidativo (Eq. 6.14). A definição de um valor crítico de velocidade de crescimento ($\mu^{\text{Limitado Subst}}$, Eq. 6.13) é importante para determinar matematicamente se o crescimento da levedura é principalmente limitado por oxigênio ou definido pela limitação da fonte de carbono ou por efeitos inibitórios do etanol.

$$\mu^{\text{Limitado Subst}} = \frac{(0,080 \pm 0,004) * C_s}{(4 \pm 2) + C_s} * \left(1 - \frac{C_e}{(120 \pm 3)}\right) \quad (6.13)$$

$$\mu^{\text{Limitado Oxigênio}}_{\text{Oxidativo}} = \left(\frac{Y_X}{S}\right)^{\text{Oxidativo}} * J_S^{\text{Oxidativo}} \quad (6.14)$$

Se a condição ($\mu_{\text{Oxidativo}}^{\text{Limitado Oxigênio}} < \mu^{\text{Limitado Subst}}$) for verdadeira, significa que o oxigênio é o principal nutriente limitante e as Eq. 6.1-6.12 são usadas para simular o crescimento celular. Se a condição ($\mu_{\text{Oxidativo}}^{\text{Limitado Oxigênio}} < \mu^{\text{Limitado Subst}}$) é falsa, significa que a velocidade específica de crescimento está limitada pelo esgotamento da fonte de carbono ou devido aos efeitos de inibição por etanol. Nesse caso, a Eq. 6.13 é usada para descrever o crescimento das células e o conjunto de EDOs para as concentrações de substrato, células e etanol passa a ser representado pelas equações 6.15, 6.16 e 6.17, respectivamente, em substituição às equações 6.4, 6.5 e 6.6. As outras equações permanecem as mesmas.

$$\frac{dC_s}{dt} = - \left[\frac{1}{(Y_x)_s^{\text{Micro-aerado}}} * \mu * C_x + m_s * C_x \right] \quad (6.15)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu) * C_x \quad (6.16)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \left((Y_p)_x^{\text{Micro-aerado}} * \mu \right) * C_x \quad (6.17)$$

O ajuste do modelo aos dados experimentais foi analisado através do Erro Padrão Residual (RSE) (Eq. 6.18) e da construção do gráfico de “valores previstos” vs “valores experimentais”.

$$RSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \hat{x}_i)^2}{np-2}} \quad (6.18)$$

6.2.3 Operabilidade do processo

Antes de definir as metas do controlador BIO-CS, é necessário avaliar o espaço de saída do processo através do mapeamento das saídas e das entradas. Com essas informações de mapeamento, é possível determinar os *setpoints* e as regiões de operação viáveis para obter alta produção de etanol. O mapeamento do Conjunto de Saídas Disponível (CSD) utilizando o modelo proposto e baseado em um conjunto de entradas disponíveis (dentro do Conjunto de Entradas Disponível - CED) é realizado utilizando o Aplicativo de Operabilidade do Processo (*hiperlink* disponível no Apêndice C) no MATLAB desenvolvido por Gazzaneo *et al.* (2020). O mapeamento inverso também pode ser feito usando o mesmo aplicativo do MATLAB. Os limites das variáveis para o mapeamento são definidos observando os resultados de várias simulações do modelo metabólico (MESQUITA *et al.*, 2019). Para o CED, três entradas foram

utilizadas para o mapeamento proposto: uma variável on-line para fins de monitoramento (J_{CO_2} , variando de 0 a 40 $\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e as duas variáveis manipuladas (Q_{Ar}^e , variando de 0,03 a 1 L.min^{-1} , e $Q_{N_2}^e$, variando de 0,03 a 2 L.min^{-1}).

O J_{CO_2} é normalmente uma saída (resposta celular), mas nesta etapa, a análise de operabilidade foi feita a partir da perspectiva do modelo metabólico, a fim de prever os *setpoints* para o controle. Em outras palavras, a definição do J_{CO_2} como entrada para fins de operabilidade permitiu uma melhor compreensão e visualização das regiões operacionais viáveis e inviáveis (superfície de resposta), o que não foi possível quando essa variável foi usada como saída do mapeamento. Para o CSD, são avaliados neste estudo os três estados correspondentes às concentrações mensuráveis das três principais variáveis de estado (C_s , C_x e C_e) do estudo de caso. As condições iniciais de concentração para o mapeamento e todas as outras simulações estão descritas na Tabela 6.2. Tais condições correspondem a uma fermentação com carga moderada de fonte de carbono (*High Gravity*, HG) (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Tabela 6.2 - Condições iniciais para a estimativa do parâmetro, validação, mapeamento de operabilidade e simulações de controlador.

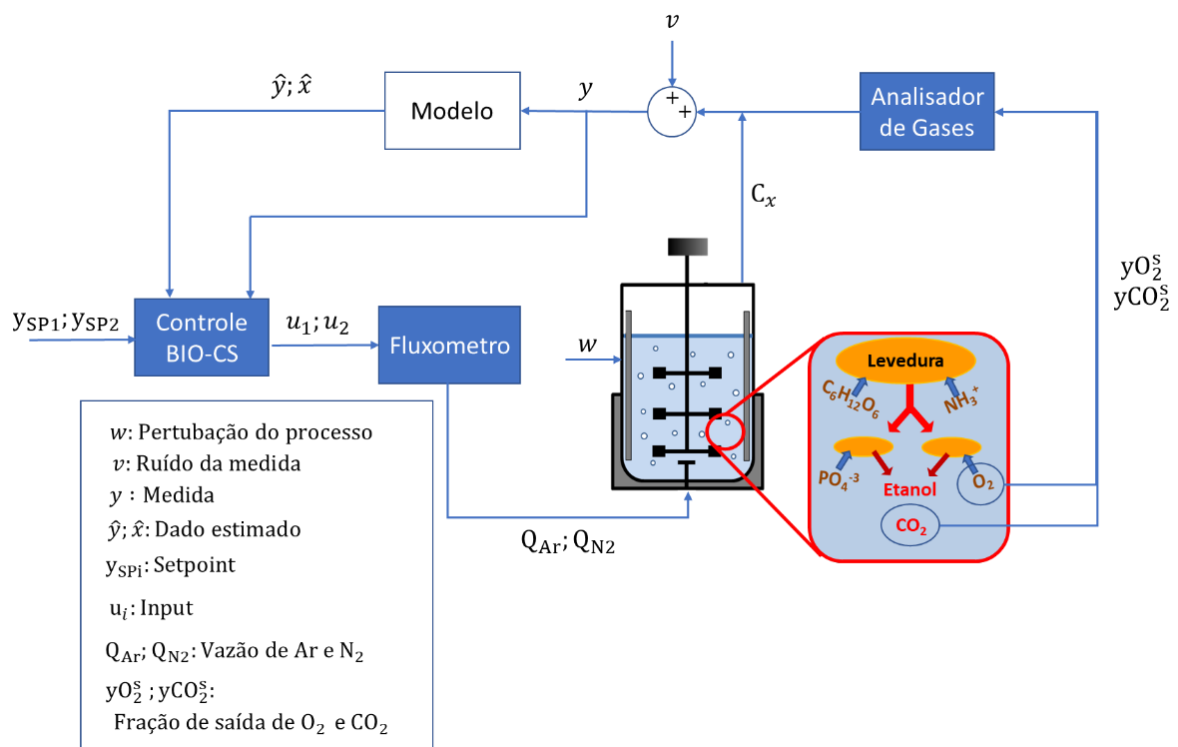
Condição	Descrição	Valor
$y_{O_2,0}$ (-)	Fração inicial de O_2	0
J_{O_2} ($\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Fluxo metabólico de O_2 inicial	0
J_{CO_2} ($\text{mmol.g}_{MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Fluxo metabólico de CO_2 inicial	0
$C_{s,0}$ (g.L^{-1})	Concentração inicial de glicose	150
$C_{x,0}$ (g.L^{-1})	Concentração inicial de células	3
$C_{e,0}$ (g.L^{-1})	Concentração inicial de etanol	0

6.2.4 Implementação do BIO-CS

Para o caso específico de suprir baixos fluxos de oxigênio, o sistema de controle deve ser capaz de manipular variáveis como vazão de ar de entrada (Q_{Ar}^e) e vazão de nitrogênio ($Q_{N_2}^e$) para levar o bioprocessamento a condições de maior produtividade e fluxos de etanol (ver esquema na Figura 6.1). Assim, a estratégia de controle gira em torno da manipulação de Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$ para fornecer a vazão de oxigênio necessária (Q_{O_2}). Essa manipulação da fase gasosa permite que as células de levedura sintetizem etanol, mantendo regeneração de nicotinamida dinucleotídeo (NAD+) nos níveis adequados para as funções celulares, com mínima formação de biomassa

(KUNZE; MANGER; PRATT, 2014; PIRES; BRÁNYIK, 2015). As informações de *feedback* utilizadas para determinar a manipulação da composição da fase gasosa se baseiam no J_{CO_2} e J_{O_2} inferidos que são obtidos a partir de dados de $y_{CO_2}^S$ e $y_{O_2}^S$. As frações $y_{CO_2}^S$ e $y_{O_2}^S$ são registradas on-line a partir de um analisador de gases. Também são usadas medidas *at-line* de concentração celular (C_x). O controlador tem dois setpoints a seguir (J_{O_2} e J_{CO_2}), que podem ser seguidos pela manipulação da fase gasosa do biorreator. Como dito anteriormente, os setpoints de J_{CO_2} e J_{O_2} são obtidos através do mapeamento. Algumas as simulações do modelo em escala genômica utilizando o modelo metabólico iND750 (DUARTE; HERRGÅRD; PALSSON, 2004) também ajudaram a delinear a definição do setpoint de J_{O_2} (MESQUITA et al., 2019).

Figura 6.1- Estrutura de controle do biorreator



Na Figura 6.1, o termo v é o ruído de medição, e o termo w representa o ruído do processo que pode aparecer em processos reais, neste caso, distúrbios do metabolismo das células. O termo y representa as saídas medidas somadas ao ruído nas medidas. O termo y é utilizado no modelo proposto para determinar os estados \hat{y} e \hat{x} , que são alimentados ao controlador. As concentrações de componentes (C_s , C_x e C_e) são estimadas utilizando o sistemas de EDOs descrito anteriormente (Eq.6.2-6.4). O controlador decide a ação de controle a ser implementada (u_1 para Q_{Ar}^e , e u_2 para $Q_{N_2}^e$) resolvendo o problema de otimização restrita (Eq. 6.16) e de busca aos setpoints (y_1^{SP} para J_{O_2} e y_2^{SP} para J_{CO_2}). Nesta etapa, o J_{O_2} e o J_{CO_2} são

utilizados como informação de saída para fins de controle, pois são os principais estados metabólicos que precisam ser mantidos para alcançar altas concentrações de etanol utilizando as condições estudadas. O otimizador baseado em gradiente *dynopt* (CIZNIAR *et al.*, 2005) é empregado para a otimização da resposta.

A função objetivo a ser minimizada consiste em manter as 2 saídas simultaneamente em seus setpoints (2 x 2 *Multi-Input/Multi-Output*, MIMO) com o termo de supressão de entrada da seguinte forma (Eq. 6.19):

$$\min_{u_1(t), u_2(t)} \varphi = \int_{t_i}^{t_f} \left(wt_1 * (y_{1(t)} - y_1^{sp})^2 + wt_2 * (y_{2(t)} - y_2^{sp})^2 + \dots \right) \left(\dots wt_3 * (u_{1(t)} - u_{1(t)}^{-1})^2 + wt_4 * (u_{2(t)} - u_{2(t)}^{-1})^2 \right) dt \quad (6.19)$$

Em que, o y_1 é o estado controlado 1 (J_{O_2}) e seu setpoint é y_1^{sp} ; e o y_2 é estado controlado 2 (J_{CO_2}), enquanto seu setpoint é y_2^{sp} . u_1 (Q_{Ar}^e) e u_2 ($Q_{N_2}^e$) são as ações de controle no tempo t , enquanto u_1^{-1} e u_2^{-1} são as últimas ações de controle usadas. Os termos t_i e t_f se referem ao horizonte de tempo empregado no solver usado pelo BIO-CS. Os termos w_1 ($w_1=39$) e w_2 ($w_2=27$) são os pesos usados para melhorar o desempenho de rastreamento do setpoint. Os termos w_3 ($w_3=1,1$) e w_4 ($w_4=1,1$) são os pesos usados para melhoria da ação de controle reduzindo o overshoot (termo de supressão dos dados de entrada).

Os limites de Q_{Ar}^e ($0,03 \leq Q_{Ar}^e \leq 1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) e $Q_{N_2}^e$ ($0,03 \leq Q_{N_2}^e \leq 2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) são escolhidos de acordo com as limitações de funcionamento do equipamento. Supõe-se que o processo tenha a temperatura constante de 30°C, pH de 4,5 e velocidade de agitação constante de 500 rpm usando uma configuração de controle independente e totalmente operacional (Capítulo 5, Mesquita *et al.*, 2019).

Os seguintes casos foram considerados para analisar o desempenho da estrutura de controle proposta:

Caso I - Sem ruído: Usado para a sintonia dos parâmetros BIO-CS;

Caso II - Ruídos de medição (v): Ruídos estocásticos representados pela distribuição normal com desvio padrão de 1% para as medições (C_x , $y_{O_2}^s$ e $y_{CO_2}^s$) que são introduzidos ao longo das simulações;

Caso III - Ruído de processo ou desvio do modelo do processo (*plant-model mismatch*, w): Ruídos estocásticos representados pela distribuição normal com desvio padrão de 1% que são adicionados durante a simulação do processo ao termos $J_S^{Oxidativo}$ e $J_S^{Redutivo}$;

Caso IV - Rejeição de Perturbação (*disturbance rejection*): perturbações não medidas de -10%, que foram introduzidas durante um intervalo de tempo amostral em diferentes momentos aos valores nominais de cada variável Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$. Tais perturbações refletiriam mudanças bruscas na operação dos fluxômetros, por exemplo, mudança de pressão repentina e momentâneo.

Para avaliar melhor a qualidade do controle proposto, calculou-se a integral do erro absoluto ponderado pelo tempo (ITAE) (Eq. 6.20), mostrado na seção de resultados. As condições iniciais para as simulações são as mesmas indicadas anteriormente (seção 3.2).

$$ITAE = \int_{t_i}^{t_f} t \frac{|y_1 - y_1^{sp}|}{y_1^{sp}} * dt + \int_{t_i}^{t_f} t * \frac{|y_2 - y_2^{sp}|}{y_2^{sp}} * dt \quad (6.20)$$

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de validação do modelo são apresentados na próxima subseção (6.3.1), seguido da operabilidade do processo, que mostra as regiões operacionais viáveis para o processo proposto (subseção 6.3.2). Finalmente, o controle é avaliado seguindo os resultados obtidos pelo mapeamento (subseção 6.3.3).

6.3.1 Validação modelo

Na Figura 6.2, as linhas sólidas exibem o resultado da simulação utilizando dados experimentais para Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$ como dados de entrada. Note que o modelo descreve bem a concentração e dinâmica dos componentes (MESQUITA et al., 2019).

Foram utilizados dois conjuntos de dados experimentais (FM-RNA e FM-RNA-PI, capítulo 5) para biomassa (Figura 6A e Figura 6D), etanol (Figura 6.2B e Figura 6.2E), e substrato (Figura 6.2C e Figura 6.2F). O primeiro conjunto (Figuras 6.2A, 6.2B, 6.2C) foi utilizado para estimar parâmetros (ms e Cf), e o segundo conjunto foi utilizado para validar o modelo proposto (Figuras 6.2D, 6.2E, 6.2F). O RSE do primeiro conjunto de dados apresentou o maior erro relacionado à dinâmica da concentração de substrato ($RSE < 9$), porém em relação ao segundo conjunto de dados o RSE se manteve abaixo de 5. Os desvios observados na Figura 6.2 não comprometeram a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais, como também pode ser observado na Figura 6.3. As setas presentes no perfil do cultivo FM-RNA-PI (Figuras 6.2D, 6.2E e 6.2F) indicam o momento em que ocorreu a mudança no modelo usado de acordo com a condição descrita na seção 6.2.2

Figura 6.2- Valores simulados para as concentrações de: biomassa (C_x)- FM-RNA (A) e FM-RNA-PI (D); etanol (C_e)- FM-RNA (B) e FM-RNA-PI (E); e substrato (C_s) - FM-RNA (C) e FM-RNA-PI (F). Erro padrão residual (RSE). As setas em (D), (E) e (F) indicam o momento em que ocorreu a mudança de modelo usado (seção 6.2.2).

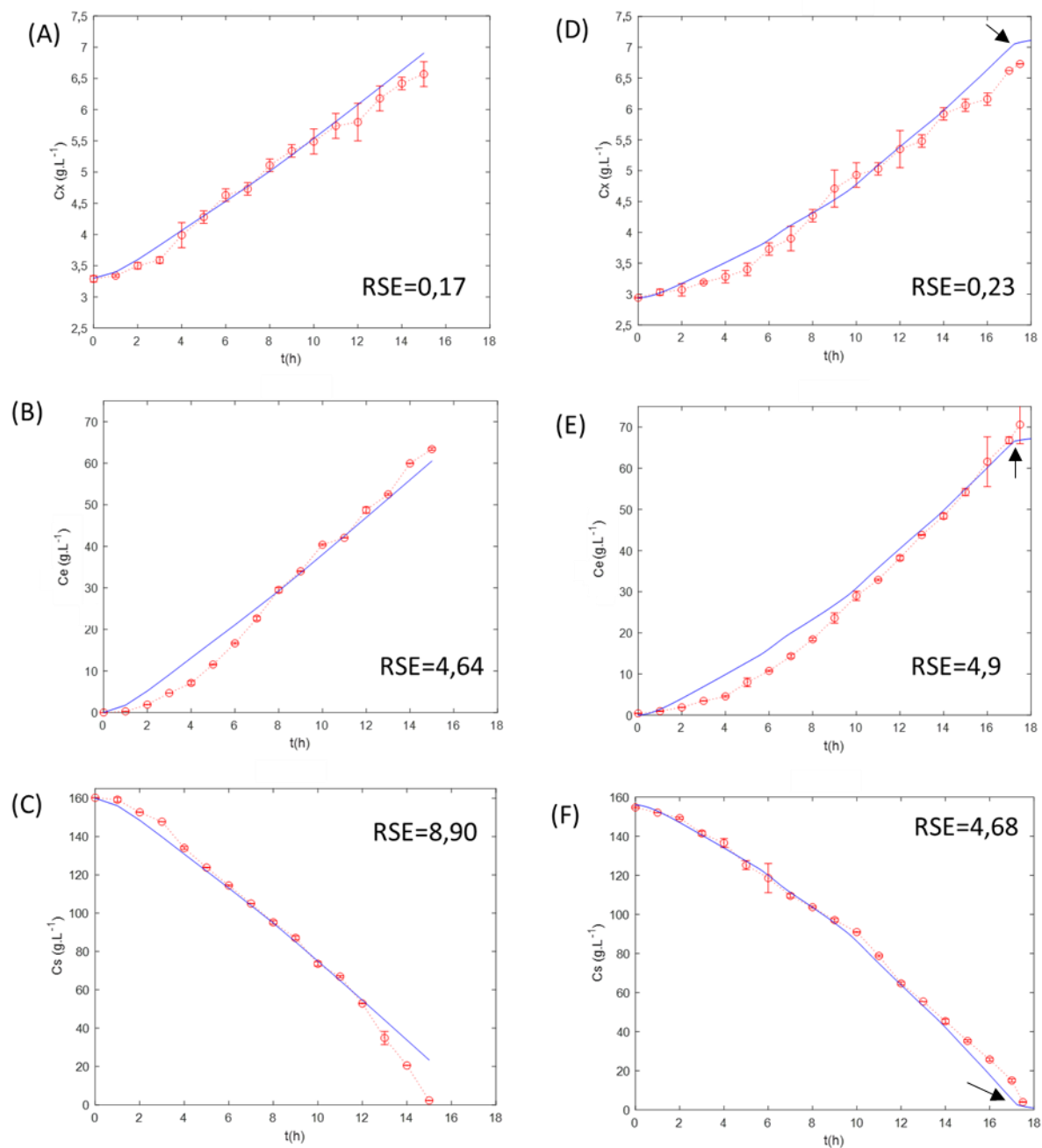
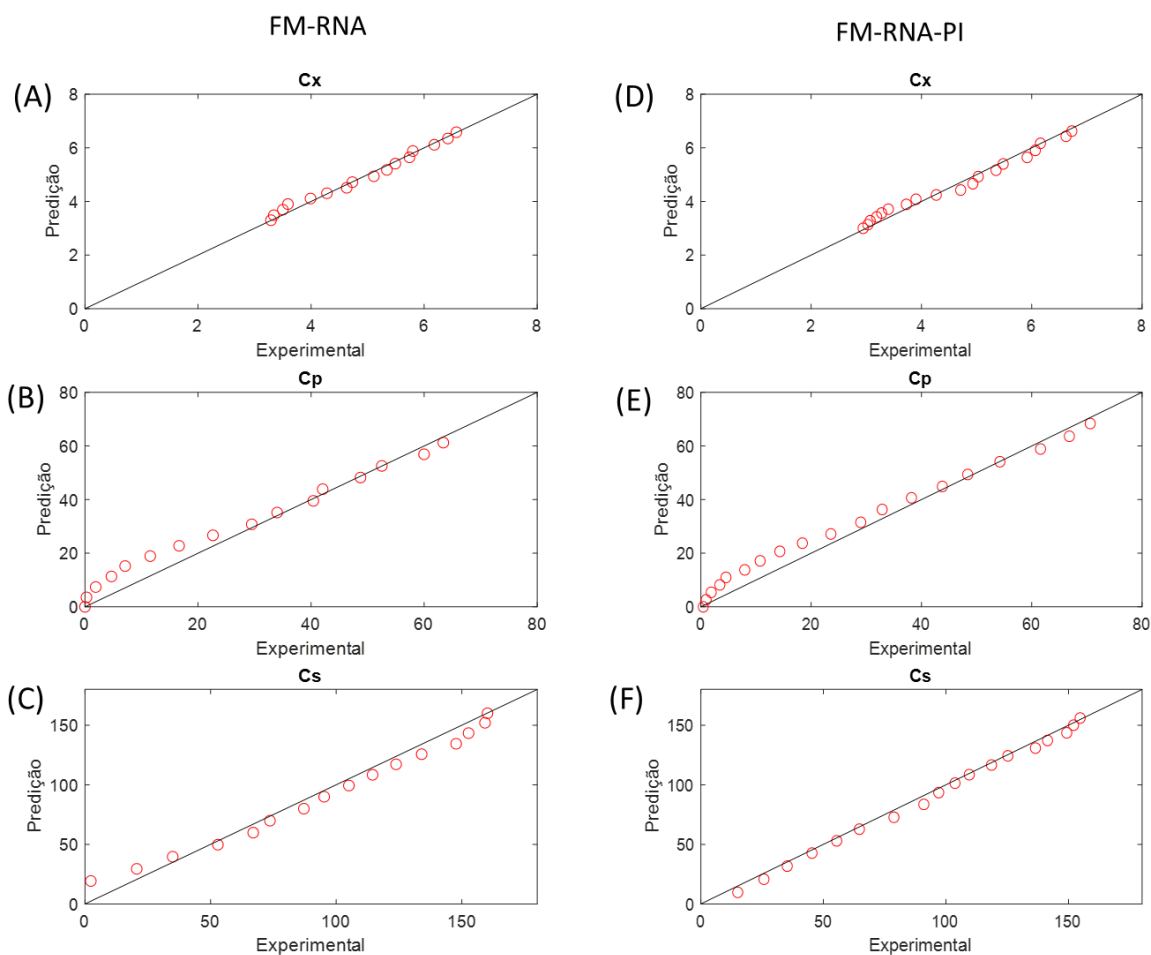


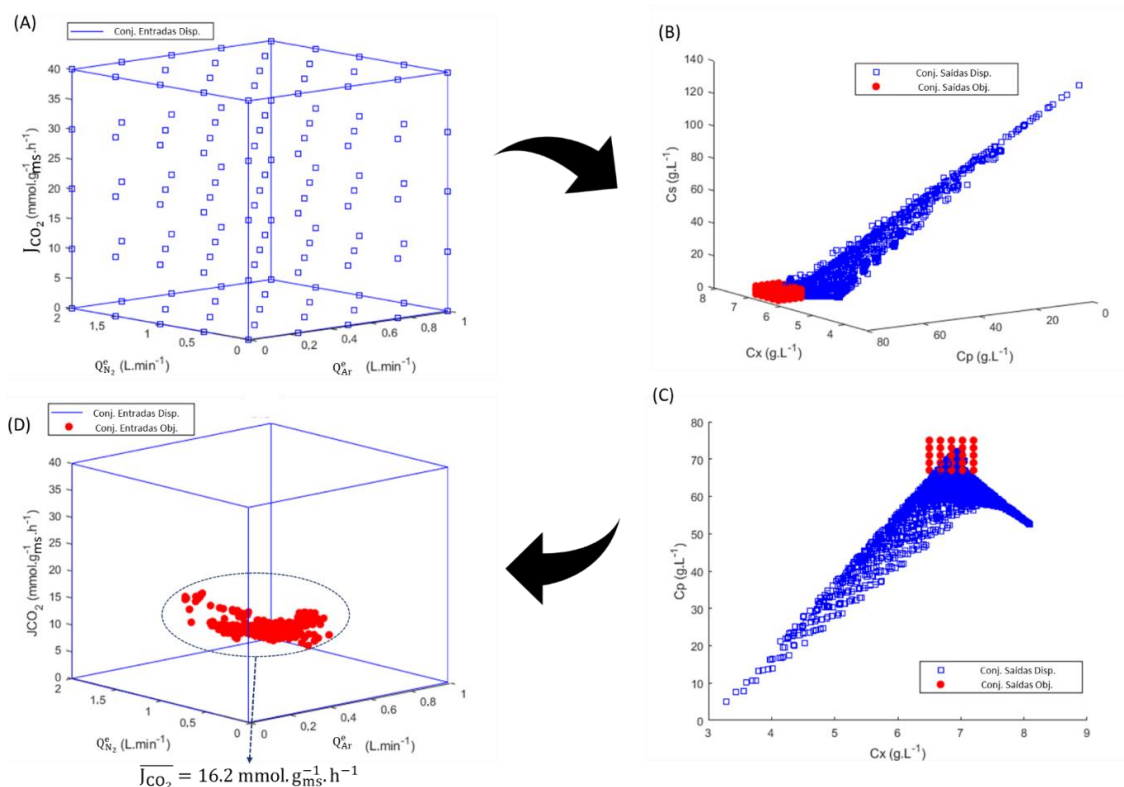
Figura 6.3 - Valores previstos vs experimentais para as concentrações de: biomassa (C_x) - FM-RNA (A) e FM-RNA-PI (D); etanol (C_e) - FM-RNA (B) e FM-RNA-PI (E); e substrato (C_s) - FM-RNA (C) e FM-RNA-PI (F)



6.3.2 Operabilidade do processo

Conforme indicado na subseção 6.2.3, o CED (Conjunto de Entradas Disponíveis) proposto (Figura 6.4A) é utilizado no mapeamento juntamente com o modelo proposto para o processo. Como resultado, o CSD apresenta um máximo de concentração de etanol ($C_p=72 \text{ g.L}^{-1}$; nas Figuras 6.4B e 6.4C), com consumo completo da fonte de carbono (Concentração final de substrato, $C_s=0 \text{ g.L}^{-1}$) e concentração de biomassa (C_x) de $6,8 \text{ g.L}^{-1}$. O ponto de máximo observado é o limite imposto pelo rendimento experimental do etanol. Se a condição limite imposta pela velocidade de crescimento for superada, então a concentração final de etanol cai para $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração de biomassa se aproxima de $8,0 \text{ g.L}^{-1}$, tendendo a uma condição de baixa produção de etanol e manutenção da concentração de biomassa (Figura 6.4C).

Figura 6.4- Mapeamento obtido pela análise de operabilidade do processo a partir do modelo proposto. Em que: (A) Conjunto de entradas disponíveis '□'; (B) e (C) Conjunto de saídas disponíveis '□' e conjunto de saídas objetivo '●'; (D) Espaço de entradas disponíveis '—' e conjunto de entradas objetivo '●'



O CSO define simultaneamente a maior concentração possível para o etanol, a menor concentração possível para as células e consumo completo de substrato. Assim, a faixa do CSO é definida como 67 a 74 g.L⁻¹ para etanol; de 6,5 a 7,2 g.L⁻¹ para a biomassa e de 0 a 5 g.L⁻¹ para a glicose (Figura 6.4C, pontos vermelhos).

Conforme indicado na subseção 6.2.3, o J_{CO_2} é uma variável monitorada on-line que seria utilizada como informação de saída do mapeamento. Porém, no presente estudo, essa variável é utilizada como informação de entrada para a definição da região operacional, como previamente indicado. Essa abordagem facilitou a definição do estado metabólico ideal (*setpoints*) em que as células devem ser mantidas, e quais são viáveis ou não. Com o *setpoint* do J_{CO_2} definido, essa variável foi incorporada como entrada em novas simulações do modelo de escala genômica (Mesquita *et al.*, 2019) para definir o *setpoint* para J_{O_2} .

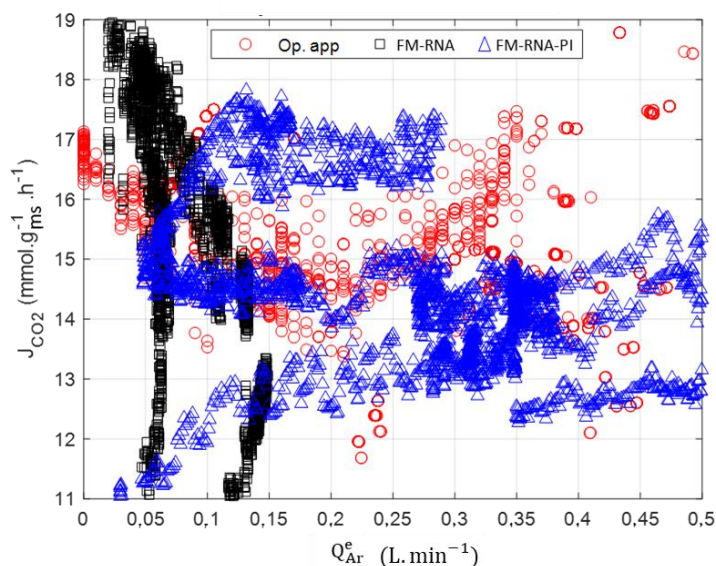
O CEO (Figura 6.4D) resultante define a região de operação das vazões de ar e de nitrogênio a serem aplicadas no biorreator. A faixa da vazão de ar (Q_{Ar}^e) variou de 0 a 0,7 L.min⁻¹, enquanto a faixa da vazão de nitrogênio ($Q_{N_2}^e$) variou de 0,3 a 1,2 L.min⁻¹. O fluxo metabólico de dióxido de carbono (J_{CO_2}) variou de 12 a 20 mmol.gms⁻¹.h⁻¹, com um valor médio de

($16,2 \pm 0,8$) $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figura 6.4D) sendo usado como *setpoint*. E o *setpoint* de J_{O_2} foi definido como $2,1 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. As condições nas quais o substrato não é completamente consumido (Figura 6.4C) ocorrem em regiões cujo o tempo de cultivo para o consumo do substrato é mais longo ($>19\text{h}$) do que o observado experimentalmente para a conversão completa da glicose.

Em termos de comparação, a região operacional obtida pela análise de operabilidade prevê valores de um J_{CO_2} de ($16,2 \pm 0,8 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$), que é estatisticamente igual (teste de Tukey com 95% de confiança) aos valores de $14 \pm 2 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $13 \pm 3 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, observados experimentalmente para FM-RNA e FM-RNA-PI, respectivamente. Em outras palavras, pode-se afirmar que os dados experimentais estão dentro da mesma região do CSO, como mostrado na Figura 6.5. A comparação dos perfis exibidos na Figura 6.5 indica que as células foram mantidas em condições micro-aeradas ideais durante os experimentos FM-RNA e FM-RNA-PI, de acordo com a análise de operabilidade. Essa constatação demonstra a consistência do modelo proposto e da região operacional obtida.

Além disso, pode-se inferir que mantendo os fluxos metabólicos de oxigênio e gás carbônico nos *setpoints* propostos, a estrutura de controle implementada deve ser capaz de manter a célula sob oferta limitada de oxigênio durante todo o cultivo. Neste caso, os efeitos da inibição do etanol seriam minimizados e se tornariam apenas proeminentes no final da fermentação, quando a concentração de substrato atinge níveis mais baixos.

Figura 6.5 - Comparação entre os dados de operabilidade do processo CEO (\circ), dados experimentais FM-RNA (\square), dados experimentais FM-RNA-PI (\triangle) para J_{CO_2} e Q_{Ar}^e .



6.3.3 BIO-CS: Resultados da implementação

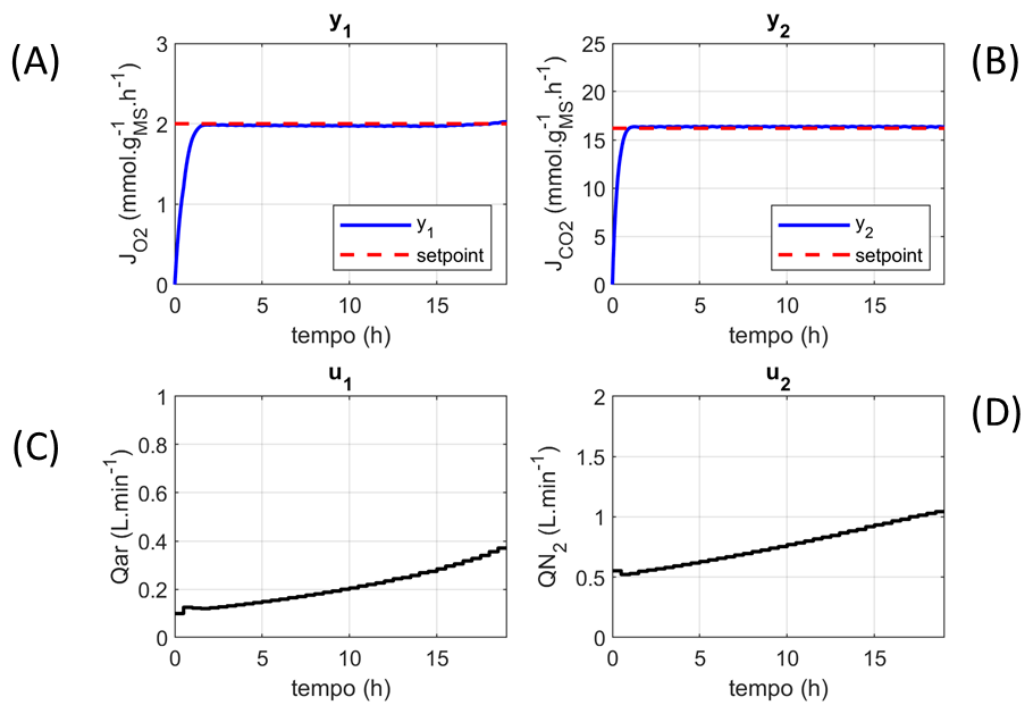
Os resultados da implementação do BIO-CS para os quatro cenários estudados são apresentados nesta seção.

6.3.3.1 BIO-CS *Tuning* (Caso I)

Para o algoritmo BIO-CS, primeiramente as condições iniciais e os parâmetros de ajuste (*tuning*) precisam ser definidos (Eq. 6.19, $w_{t1}=39$, $w_{t2}=27$, $w_{t3}=1.1$, $w_{t4}=1.1$). Para esta etapa, várias combinações de peso do controlador foram testadas para o ajuste do *setpoint* considerando um tempo de simulação de 19h.

Como pode ser visto nos resultados para o caso sem ruído (Caso I na Figura 6.6), o controlador teve um bom desempenho para manter o fluxo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono nos setpoints desejados, cujo o ITAE médio foi de $(7,067 \pm 0,001)$. Como esperado, o Q_{Ar}^e e o $Q_{N_2}^e$ foram aumentados em pequenos degraus para acompanhar a necessidade metabólica por oxigênio de acordo com o aumento da concentração celular. Vale ressaltar que as variáveis manipuladas foram alteradas dentro dos limites determinados pela análise de operabilidade.

Figura 6.6- Saídas e ações de controle para simulações do BIO-CS. (A) Saída J_{O_2} ; (B) Saída J_{CO_2} ; (C) Q_{Ar}^e - Vazão manipulada de ar; (D) $Q_{N_2}^e$ - Vazão manipulada de nitrogênio.



6.3.3.2 Ruídos de medição (Caso II), desvio do modelo do processo (Caso III) e rejeição de perturbação (Caso IV)

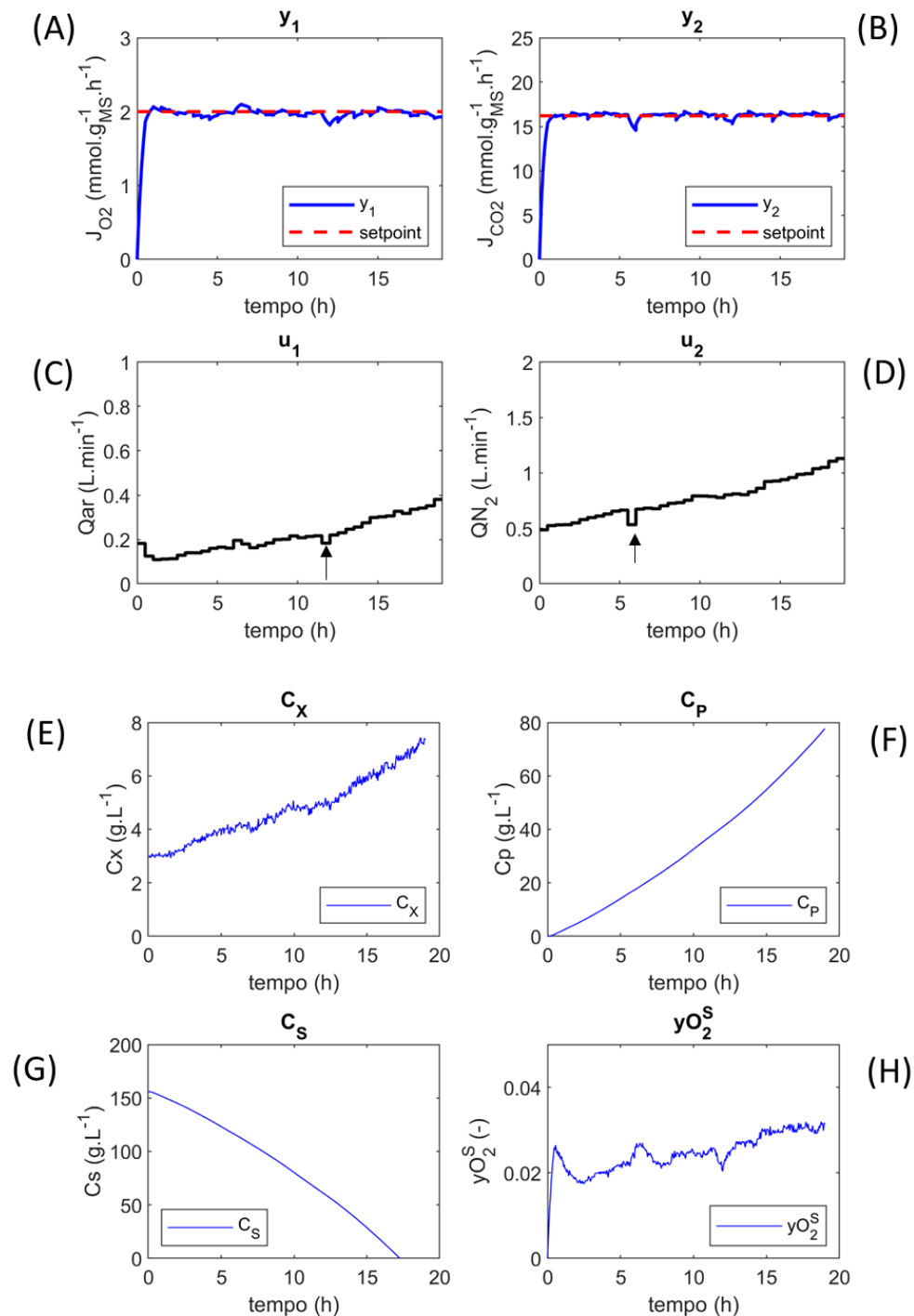
Os casos de ruído de medição (1% da medição, Caso II) e o desvio do modelo do processo (1% do $J_S^{\text{Oxidativo}}$ e J_S^{Redutivo} ; Caso III) foram implementados ao longo das simulações (na Figura 6.7E e 6.7H), enquanto a perturbação não medida (-10% distúrbios não medidos no Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$, Caso IV) ocorreu em dois momentos da simulação (uma perturbação às 5h para Q_{Ar}^e , e outra às 12h para $Q_{N_2}^e$) (ver Figuras 6.7C e 6.7D, onde os distúrbios são indicados por setas).

Entre os cenários avaliados, o efeito do ruído de medição de 1% em C_x (Caso II, Seção 6.2.4) (assumindo distribuição gaussiana, Figura 6.7E), seguido pelo ruído em $y_{CO_2}^S$ (Caso II, Figura 6.7H), tiveram as maiores influências no desempenho do controle. O controle ainda manteve o desempenho com uma média razoável ITAE de $(7,5 \pm 0,3)$ mesmo quando submetido a todos os ruídos propostos simultaneamente.

O controlador tolerou ruídos de até 5% para as medidas. Em relação ao desvio do modelo do processo (Caso III, Seção 6.2.4), o controlador tolerou distúrbios de até 4%. Tal análise de perturbação é feita para descobrir os limites de estabilidade do controlador no processo de fermentação em batelada. Na prática, esses distúrbios devem ser mais frequentes no início (fase *lag*) e no final da fermentação (fase estacionária) já que os fluxos metabólicos não são constantes (ROLFE *et al.*, 2012; SWINNEN *et al.*, 2004).

No entanto, o aumento da perturbação nas variáveis manipuladas ainda pode afastar o sistema do estado ideal e pode também comprometer o desempenho do controle. Isso seria uma consequência do modo de operação em batelada estudado, com fornecimento de glicose variando ao longo do tempo. No início, quando a fonte de carbono não é o nutriente limitante, é mais fácil corrigir e superar os distúrbios. A razão é que as células estão no crescimento à velocidade constante e, portanto, os fluxos metabólicos são constantes, assim é mais fácil reconduzir os fluxos metabólicos aos estados desejados. Essas correções são mais difíceis de serem realizadas no final do cultivo, pois a velocidade de crescimento passa a ser modulada pelo pouco substrato disponível. No entanto, o sistema de controle mantém os fluxos metabólicos de oxigênio e dióxido de carbono o mais próximo possível do setpoint desejado, mantendo as condições micro-aeradas, o que pode ser observado na Figura 6.7A. No caso de processos contínuos e até mesmo bateladas-alimentadas, a influência desses ruídos seria reduzida, pois a velocidade de crescimento poderia ser mantida constante pela alimentação do substrato.

Figura 6.7 - Adição de ruído ao BIO-CS. (A) Saída J_{O_2} ; (B) Saída J_{CO_2} ; (C) Vazão manipulada de ar; (D) Vazão manipulada de nitrogênio; (E) Concentração simulada de biomassa (C_x); (F) Concentração simulada de etanol (C_e); (G) Concentração simulada de substrato (C_s); (H) Perfil da fração de oxigênio no gás de saída. Foram avaliados ruídos de 1% na medição (C_x , $y_{O_2}^S$ e $y_{CO_2}^S$); desvio do modelo (*model mismatch*) com um desvio padrão de 1% do $\mu_S^{Oxidativo}$ e $\mu_S^{Redutivo}$; perturbação de -10% em Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$. A seta em (C) e (D) indica o momento em que a perturbação foi introduzida nas variáveis manipuladas.



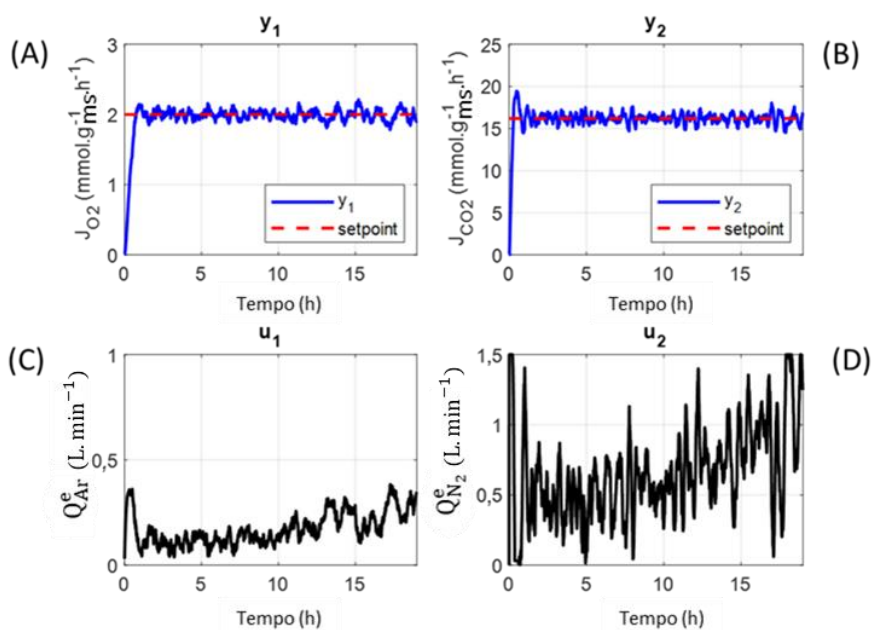
6.3.3.3 Comparação de Desempenho com controlador proporcional-integral (PI)

Um controlador PI (Proporcional-Integral, Figura 6.8 e Tabela 6.3) também foi estudado para comparar com o desempenho do BIO-CS. Dois controladores PI paralelos (*Single-Input/Single-Output*, SISO) foram definidos e sintonizados, um para cada variável controlada e utilizando as mesmas condições do BIO-CS. Um PI visou controlar o J_{O_2} , manipulando Q_{Ar}^e , e o outro PI manipulou o $Q_{N_2}^{in}$ para controlar o J_{CO_2} . Os controladores PI foram ajustados usando o método oscilatório de Ziegler-Nichols (STEPHANOPOULOS, 1984).

Tabela 6.3 - Medidas de desempenho do ITAE (*Integrated Time Absolute Error*) para o BIO-CS e PI com e sem ruído. Os erros padrão são das triplicatas das simulações.

Condição	ITAE para BIO-CS		ITAE para PI	
	J_{O_2}	J_{CO_2}	J_{O_2}	J_{CO_2}
Sem ruídos	2,421±0,001	4,646±0,001	0,954±0,001	29,132±0,001
Com ruídos	2,7±0,4	4,8±0,1	1,04±0,3	35,3±0,4

Figura 6.8- Resultados de saída e entrada para implementação simulada de PI. (A) Saída J_{O_2} ; (B) Saída J_{CO_2} ; (C) Q_{Ar}^e - Vazão manipulada de ar; (D) $Q_{N_2}^e$ - Vazão manipulada de nitrogênio.



Comparando-se com os resultados do BIO-CS, o ITAE sem adição de ruído é (30,086±0,001) para os controladores PI. O maior componente ITAE está relacionado ao J_{CO_2} ,

devido à maior influência de ambos Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$ sobre esta variável. Com a adição do ruído de medição (Caso II) e desvio de modelo do processo (Caso III) (Figura 6.8), o ITAE total sobe para $(36,5 \pm 0,4)$. Os perfis de Q_{Ar}^e e $Q_{N_2}^e$ (Figura 6.8C e 6.8D) são muito instáveis e ruidosos para lidar com os estados metabólicos. Além disso, vale ressaltar que os resultados aqui mostrados são os casos de simulação bem sucedidos. Outras simulações tiveram comportamento errático que não tem significado físico, devido ao PI levar o processo para regiões altamente instáveis. O mesmo comportamento errático ocorreu quando os distúrbios não medidos (Caso IV) foram aplicados ao controlador PI.

As mudanças bruscas nas variáveis manipuladas pelo PI podem levar a condições imprevistas na modelagem, especialmente para a fase gasosa no biorreator. Por exemplo, como indicado no trabalho de Campani *et al.* (2019), essas mudanças afetam outras variáveis de cultivo, como a taxa de transferência de oxigênio. No caso desse capítulo, a interferência pode ser devido aos atrasos no tempo na atuação da vazão de gás e composição da fase gasosa no reator, o que levou a um crescimento celular diferente em relação ao descrito pelo modelo. O resumo do ITAE dos estudos de caso está mostrado na Tabela 6.3.

6.4 CONCLUSÃO

Este capítulo propõe uma nova abordagem para definir as condições operacionais ideais para cultivos micro-aerados, bem como uma nova estrutura de controle para a regulação de fluxos metabólicos por meio da manipulação da fase gasosa do biorreator.

Os parâmetros foram estimados a partir de dados experimentais reais para uma cepa de levedura industrial e simulações de modelos em escala genômica. O modelo foi capaz de descrever com sucesso o comportamento dos principais componentes (C_x , C_s e C_e) durante todo o cultivo. Tal modelo pode ser usado em várias condições, apenas atualizando o rendimento e informações cinéticas que são intrínsecas às cepas que estão sendo utilizadas.

Essa estrutura sequencial (operabilidade de processo e BIO-CS) permitiu a implementação de uma estratégia de controle capaz de regular o metabolismo da levedura para aumentar a produtividade do etanol apenas por meio da manipulação da composição do gás de entrada. A aplicação da operabilidade do processo proporcionou condições operacionais viáveis para alcançar alta concentração de etanol. O BIO-CS determinou com sucesso um perfil ideal de composição de gás de entrada para manter os fluxos metabólicos no estado metabólico necessário na fermentação em batelada. Para verificar a aplicabilidade dessa abordagem em um

bioprocesso real, o controle proposto está sendo implementado no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos do DEQ/UFSCar.

Este capítulo contribui para o controle e monitoramento de uma classe particular de bioprocessos, a fermentação micro-aerada, incorporando características de modularidade, automação de processos e indústria 4.0. A estrutura de controle proposta é um MIMO (2x2) que pode ser ainda expandida para outros esquemas de operação de biorreatores com mais ou menos variáveis, microrganismos e diferentes restrições.

7 CONCLUSÃO GERAL

Por fim é possível analisar os resultados alcançados com base nos objetivos visados nessa Tese, tais como as etapas de caracterização de cepas industriais, mapeamento operacional a nível metabólico e de processo, avaliação da aplicação da estratégia de controle com redes neurais e uso de algoritmos biomiméticos.

A etapa de caracterização das cepas usando a metodologia de acompanhamento da liberação da massa de CO₂ foi essencial para a tomada de decisão das etapas de cultivo em biorreator, de forma que o perfil de crescimento das células foi elucidado frente às condições estudadas. Como consequência também foi desenvolvido um modelo cinético que descrevesse a influência da composição do meio de cultivo no crescimento microbiano.

Em relação à estrutura de controle, o uso das ferramentas usadas no campo da Biologia de Sistemas permitiu uma previsão da região operacional ideal do biorreator ao nível metabólico. A associação desses dados de simulação *in silico* com uma rede neural foi a chave para o sucesso para operacionalizar os cultivos em condição de limitação pelo oxigênio. O uso da rede neural como modelo substituto para inferir os *setpoints* associado a leis simples de controle permitiram um bom compromisso entre rapidez e robustez. Não obstante, como já mencionado neste capítulo, as estratégias propostas FM-RNA foram as que tiveram melhor desempenho em termo de produtividade, viabilidade e rendimento final do produto.

Portanto, graças ao uso das redes neurais como modelo substituto, foi possível a geração e validação de uma nova rotina de controle de biorreator que incorpora um meta-modelo na forma de rede neural para manutenção do fluxo metabólico de oxigênio em condições nas quais esse substrato é o limitante. A modificação da fase gasosa através da manipulação da vazão de ar modulou o metabolismo celular de forma que a nova estratégia apresentou um melhor desempenho na produção de etanol comparada às outras estratégias de micro-aeração.

Seguindo a proposta de manipulação da fase gasosa, foi possível a formulação de um modelo matemático que descreveu a influência da fase gasosa no crescimento celular em condições micro-aeradas. Os dados experimentais obtidos para ambos os cultivos FM-RNA permitiram a validação da dinâmica proposta.

O modelo cinético obtido na etapa de caracterização serviu como limite de validade da dinâmica de crescimento para levedura. O modelo cinético tipo Monod definiu o limite para o qual os efeitos da limitação da fonte de carbono e inibição pelo etanol seriam proeminentes. Dessa forma, a ferramenta de operabilidade mostrou efetivamente as regiões factíveis de

operação do biorreator ao nível de processo. Ou seja, a operabilidade permitiu visualizar uma região operacional em que as vazões de ar e nitrogênio deveriam ser manipuladas e que garantiriam alta concentração final de etanol.

Portanto, o uso de um controlador semelhantes aos baseados em modelo preditivo foi essencial. No caso dessa tese, o uso do BIO-CS mostrou alta capacidade das ações de controle para uma condição de cultivo específica. O algoritmo de controle biomimético se mostrou imprescindível para manutenção das condições de micro-aeração, mantendo as condições de operação nos limites previstos pela operabilidade e abaixo da condição de crescimento limite descrito pelo modelo cinético. A aplicação desse controlador em um caso real é uma oportunidade de consolidar uma nova estratégia de cultivo em micro-aeração.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A principal perspectiva para trabalhos futuros e continuidade da linha de pesquisa é a aplicação *in loco* da estratégia de controle usando o BIO-CS. O estudo de caso irá servir para avaliar se, em um processo real, o controlador será robusto o suficiente para manter a condição de operação ao redor da região ideal, e se a comunicação do MATLAB com o sistema supervisorio (LabView) é eficiente. Um primeiro cultivo pode ser realizado usando a lógica do BIO-CS diretamente no LabView. A ideia inicial é usar a função de propriedade MATLAB (Ferramenta própria do LabView) para transcrição do código e realizar modificações necessárias. Após o cultivo realizado com essa estrutura inicial, se propõe uma revisão da estrutura do controlador para resolver problemas técnicos encontrados e incorporação de controladores secundários (controlador PI) caso necessário. Com a revisão do código feita, um novo cultivo será realizado. Com dados de ambos os cultivos, se propõe uma comparação do desempenho deles com as outras estruturas de micro-aeração já estudadas e redação de novo artigo. É interessante também avaliar o desempenho prático da cepa usando meio de cultivo contendo o melão.

Também é possível avaliar a incorporação de uma corrente de alimentação de meio fresco. Será necessária uma reavaliação dos modelos propostos para inserção desse novo termo, bem como reaplicação da operabilidade do processo e do controlador biomimético. A longo prazo, fermentações em condições de micro-aeração também podem ser estudadas para a produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de hemicelulose, empregando cepas geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*.

9 REFERÊNCIAS

- ACEVES-LARA, C. A. et al. **Comparison of two Model Predictive Control for the ethanol production optimization of a two-stage bioreactor with cellular recycling.** [s.l.] IFAC, 2010. v. 43
- AGREN, R.; OTERO, J. M.; NIELSEN, J. Genome-scale modeling enables metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 735–747, 2013.
- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845–864, 1968.
- ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. **Renewable Energy Focus**, v. 28, p. 127–139, mar. 2019.
- ALEXANDRE, H. et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, n. 1, p. 98–103, 1 jun. 2001.
- ALFENORE, S. et al. Aeration strategy: A need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 537–542, 1 maio 2004.
- ALFORD, J. S. Bioprocess control: Advances and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, v. 30, n. 10–12, p. 1464–1475, 2006.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. **Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*** *Biotechnology Journal* WILEY-VCH Verlag, , 1 mar. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201000301>>.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 7 set. 2011.
- ANGERMAYR, S. A.; PASZOTA, M.; HELLINGWERF, K. J. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 19, p. 7098–106, 1 out. 2012.
- ARANDA, A.; DEL OLMO, M. LÍ. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. **Yeast**, v. 20, n. 8, p. 747–759, 2003.
- BARBOSA, A. H.; FREITAS, M. S. DA R.; NEVES, F. DE A. DAS. Confiabilidade estrutural utilizando o método de Monte Carlo e redes neurais. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 58, n. 3, p. 247–255, set. 2005.
- BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836–845, fev. 2007.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects.** [s.l.] InTech, 2011.

- BEIROTI, A. et al. Application of recurrent neural network for online prediction of cell density of recombinant *Pichia pastoris* producing HBsAg. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 352–359, 21 abr. 2019.
- BENBADIS, L. et al. Isolation of two cell populations from yeast during high-level alcoholic fermentation that resemble quiescent and nonquiescent cells from the stationary phase on glucose. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1172–1186, 2009.
- BERGDAHL, B. et al. Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 34, 15 maio 2012.
- BIDEAUX, C. et al. Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1489–1499, 5 fev. 2016.
- BISHOP, B. A.; LIMA, F. V. Modeling, simulation, and operability analysis of a nonisothermal, countercurrent, polymer membrane reactor. **Processes**, v. 8, n. 1, p. 78, 2020.
- BOUDREAU, M. A.; MCMILLAN, G. K. **New directions in bioprocess modeling and control : maximizing process analytical technology benefits**. [s.l.] ISA, 2007.
- BOUKOUVALA, F.; MUZZIO, F. J.; IERAPETRITOU, M. G. Design space of pharmaceutical processes using data-driven-based methods. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 5, n. 3, p. 119–137, 2010.
- BRIGGS, D. E. et al. **Brewing : science and practice**. 1. ed. Florida: Woodhead Publishing, 2004.
- BRO, C. et al. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 2, p. 102–111, mar. 2006.
- BUNGAY, H. R. Introduction to Artificial Intelligence. In: **Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996. p. 67–75.
- BURPHAN, T. et al. Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13069, 30 dez. 2018.
- BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92–100, 2013.
- CAMACHO, E. F.; BORDONS, C. **Model Predictive control**. London: Springer London, 2007.
- CAMPANI, G. et al. Recombinant *Escherichia coli* cultivation in a pressurized airlift bioreactor: assessment of the influence of temperature on oxygen transfer and uptake rates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1–13, 27 nov. 2017.
- CAMPANI, G. et al. A hierarchical state estimation and control framework for monitoring and dissolved oxygen regulation in bioprocesses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 9, p. 1467–1481, 2019.
- CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J.; GUTIERREZ, L. F. **Process synthesis for fuel ethanol production**. [s.l.] CRC Press, 2010.

- CARDOSO, V. M. et al. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21(DE3). **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00441, 1 jun. 2020.
- CARIUS, L. et al. Model-based derivation, analysis and control of unstable microaerobic steady-states-Considering *Rhodospirillum rubrum* as an example. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 4, p. 734–747, abr. 2014.
- CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; LLOYD, D. Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 12, p. 2879–2883, 1991.
- CARRASCO, J. C.; LIMA, F. V. Novel operability-based approach for process design and intensification: Application to a membrane reactor for direct methane aromatization. **AIChE Journal**, v. 63, n. 3, p. 975–983, 1 mar. 2017.
- CARRASCO, J. C.; LIMA, F. V. Bilevel and parallel programming-based operability approaches for process intensification and modularity. **AIChE Journal**, v. 64, n. 8, p. 3042–3054, 1 ago. 2018.
- CASCANTE, M.; MARIN, S. Metabolomics and fluxomics approaches. **Essays in Biochemistry**, v. 45, p. 67–82, 2008.
- CHANG, L.; LIU, X.; HENSON, M. A. Nonlinear model predictive control of fed-batch fermentations using dynamic flux balance models. **Journal of Process Control**, v. 42, n. June, p. 137–149, 2016.
- CHARRIER, M.; BRUNE, A. The gut microenvironment of helcid snails (Gastropoda: Pulmonata): In-situ profiles of pH, oxygen, and hydrogen determined by microsensors. **Article in Canadian Journal of Zoology**, 2003.
- CIZNIAR, M. et al. **A MATLAB Package for Orthogonal Collocations on Finite Elements in Dynamic Optimisation**. 15 Int Conference Process Control. **Anais...2005** Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/228769722_A_MATLAB_package_for_orthogonal_collocations_on_finite_elements_in_dynamic_optimisation/file/9fcfd50c0210828c71.pdf>.
- COZAD, A.; SAHINIDIS, N. V.; MILLER, D. C. Learning surrogate models for simulation-based optimization. **AIChE Journal**, v. 60, n. 6, p. 2211–2227, 1 jun. 2014.
- CRAY, J. A. et al. Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, n. Box 1, p. 228–259, 2015.
- CRITTENDEN, J. C. et al. Appendix C. In: **MWH's Water Treatment: Principles and Design, Third Edition: Principles and Design, Third Edition**. [s.l.: s.n.].
- CVIJOVIC, M.; BORDEL, S.; NIELSEN, J. Mathematical models of cell factories: Moving towards the core of industrial biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 572–584, 2011.
- DAVIS, S. E.; CREMASCHI, S.; EDEN, M. R. Efficient Surrogate Model Development: Impact of Sample Size and Underlying Model Dimensions. In: [s.l.: s.n.]. p. 979–984.
- DE ANDRADE, R. R. et al. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 351–359, fev. 2013.

- DEL RIO-CHANONA, E. A. et al. Dynamic modeling and optimization of cyanobacterial C-phycocyanin production process by artificial neural network. **Algal Research**, v. 13, p. 7–15, 2016.
- DEMEKE, M. M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 89, 21 jun. 2013a.
- DEMEKE, M. M. et al. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 120, 26 ago. 2013b.
- DEMEKE, M. M. et al. Rapid Evolution of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Fermentation through Formation of Extra-chromosomal Circular DNA. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 3, p. e1005010, 4 mar. 2015.
- DEMIREL, S. E.; LI, J.; HASAN, M. F. Systematic process intensification. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 25, p. 108–113, 2019.
- DENIZ, I.; IMAMOGLU, E.; VARDAR-SUKAN, F. Aeration-enhanced bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 41–46, 2014.
- DEWASME, L. et al. **Extended Kalman Filter design for acetate estimation in E. coli cultures**. IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline). **Anais...IFAC Secretariat**, 1 jan. 2011
- DEWASME, L.; WOUWER, A. VANDE. Adaptive extremum-seeking control applied to productivity optimization in yeast fed-batch cultures. **IFAC Proceedings Volumes**, v. 41, n. 2, p. 9713–9718, 1 jan. 2008.
- DIAZ, C. et al. Adaptive predictive control of dissolved oxygen concentration in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 21–32, nov. 1995.
- DOBSON, P. D. et al. Further developments towards a genome-scale metabolic model of yeast. **BMC systems biology**, v. 4, n. 1, p. 145, 2010.
- DOCHAIN, D. What are the Challenges for the Control of Bioprocesses? In: **Bioprocess Control**. London, UK: ISTE, 2010. p. 11–16.
- DORF, R. C.; BISHOP, R. H. **Modern control systems**. [s.l.] Pearson Prentice Hall, 2011.
- DUARTE, N. C.; HERRGÅRD, M. J.; PALSSON, B. Ø. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. **Genome research**, v. 14, n. 7, p. 1298–309, jul. 2004.
- DUNLOP, M. J. et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 487–487, 16 abr. 2014.
- EASON, J.; CREMASCHI, S. Adaptive sequential sampling for surrogate model generation with artificial neural networks. **Computers & Chemical Engineering**, v. 68, p. 220–232, set. 2014.
- FAIRLEY, P. Introduction: Next generation biofuels. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. S2–S5, 22 jun. 2011.
- FARRELL, A. E. et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**

(New York, N.Y.), v. 311, n. 5760, p. 506–8, 27 jan. 2006.

FERMENTEC. **Leveduras Personalizadas**. Disponível em:
<<https://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259>>.

FONSECA, R. R. et al. An Adaptive Fuzzy Feedforward-Feedback Control System Applied to a Saccharification Process. **Chemical Product and Process Modeling**, v. 13, n. 4, 19 dez. 2018.

FORNAIRON-BONNEFOND, C. et al. Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 496–503, 2003.

FORSTER, J. et al. Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. **Genome Research**, v. 13, n. 2, p. 244–253, 1 fev. 2003.

FRANCKE, C.; SIEZEN, R. J.; TEUSINK, B. Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 550–558, nov. 2005.

FRANZÉN, C. J. Metabolic flux analysis of RQ-controlled microaerobic ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 2, p. 117–132, 30 jan. 2003.

FRANZÉN, C. J.; ALBERS, E.; NIKLASSON, C. Use of the inlet gas composition to control the respiratory quotient in microaerobic bioprocesses. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 13, p. 3391–3402, jul. 1996.

FROMANGER, R. et al. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 437–445, 12 maio 2010.

GAO, J. et al. Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2015.

GARCIA-ALBORNOZ, M. A.; NIELSEN, J. Application of Genome-Scale Metabolic Models in Metabolic Engineering. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 203–214, 2013.

GARCIA-OCHOA, F. et al. **Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview** *Biochemical Engineering Journal* Elsevier, , 15 maio 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009.

GAZZANEO, V. et al. Process Operability Algorithms: Past, Present, and Future Developments. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2020.

GAZZANEO, V.; LIMA, F. V. Multilayer Operability Framework for Process Design, Intensification, and Modularization of Nonlinear Energy Systems. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 15, p. 6069–6079, 2019.

GEORGAKIS, C. et al. On the operability of continuous processes. **Control Engineering Practice**, v. 11, n. 8, p. 859–869, 1 ago. 2003.

GOLDEMBERG, J. The Role of Biomass in the World's Energy System. In: **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 3–14.

GOMES, J.; MENAWAT, A. S. Precise control of dissolved oxygen in bioreactors – a model-

- based geometric algorithm. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 1, p. 67–78, 2000.
- GOYAL, V.; IERAPETRITOU, M. G. Determination of operability limits using simplicial approximation. **AIChE Journal**, v. 48, n. 12, p. 2902–2909, dez. 2002.
- GUDMUNDSSON, S.; NOGALES, J. Cyanobacteria as photosynthetic biocatalysts: a systems biology perspective. **Mol. BioSyst.**, v. 11, n. 1, p. 60–70, 2 dez. 2015.
- HEIDER, D.; PIOVOSO, M. J.; GILLESPIE, J. W. Application of a neural network to improve an automated thermoplastic tow-placement process. **Journal of Process Control**, v. 12, n. 1, p. 101–111, 1 jan. 2002.
- HEIRENDT, L. et al. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0. **Nature Protocols**, v. 14, n. 3, p. 639–702, 2019.
- HENAO, C. A.; MARAVELIAS, C. T. Surrogate-Based Process Synthesis. In: [s.l.: s.n.]. p. 1129–1134.
- HERRERO, E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1217–1235, nov. 2008.
- HERRGÅRD, M. J. et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1155–1160, 2008.
- HJERSTED, J. L.; HENSON, M. A.; MAHADEVAN, R. Genome-scale analysis of *Saccharomyces cerevisiae* metabolism and ethanol production in fed-batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1190–1204, 1 ago. 2007.
- HORTA, A. C. L. et al. **An empirical investigation of the use of a neural network committee for identifying the streptococcus pneumoniae growth phases in batch cultivations**. Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics). **Anais...Springer**, Berlin, Heidelberg, 2008Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69052-8_23>.
- HORTA, A. C. L. et al. Robust artificial intelligence tool for automatic start-up of the supplementary medium feeding in recombinant *E. coli* cultivations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 7, p. 891–901, 9 set. 2011.
- HORTA, A. C. L. et al. Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1269–1280, 2012.
- HORTA, A. C. L. et al. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 457–468, 2014.
- HORTA, A. C. L. et al. On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: Assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 4, p. 821–829, dez. 2015.
- IBRAHIM, M. et al. Impact of Sampling Technique on the Performance of Surrogate Models Generated with Artificial Neural Network (ANN): A Case Study for a Natural Gas Stabilization Unit. **Energies**, v. 12, n. 10, p. 1906, 18 maio 2019.
- JABARIVELISDEH, B. et al. Adaptive predictive control of bioprocesses with constraint-

- based modeling and estimation. **Computers and Chemical Engineering**, p. 106744, 2020.
- JAMES, G. L. An Introduction to Sugarcane. In: **Sugarcane**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 1–19.
- JOANNIS-CASSAN, C. et al. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 165–173, 2014.
- JOBÉ, A. M. et al. Generally applicable fed-batch culture concept based on the detection of metabolic state by on-line balancing. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 627–639, 2003.
- JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Ethanol Fermentation of Blackstrap Molasses and Sugarcane Juice Using Very High Gravity Technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1242–1246, 1994.
- KHODAYARI, A.; CHOWDHURY, A.; MARANAS, C. D. Succinate Overproduction: A Case Study of Computational Strain Design Using a Comprehensive Escherichia coli Kinetic Model. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, p. 76, 5 jan. 2015.
- KIM, I. K. et al. A systems-level approach for metabolic engineering of yeast cell factories. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 228–248, 2012.
- KIM, S. H.; BOUKOUVALA, F. Machine learning-based surrogate modeling for data-driven optimization: a comparison of subset selection for regression techniques. **Optimization Letters**, 9 maio 2019.
- KOUTINAS, M. et al. Bioprocess systems engineering: Transferring traditional process engineering principles to industrial biotechnology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. e201210022, 2012.
- KÜHL, M.; RICKELT, L. F.; THAR, R. Combined imaging of bacteria and oxygen in biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6289–95, 1 out. 2007.
- KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 792–797, 1 set. 2013.
- KUNZE, W.; MANGER, H.-J.; PRATT, S. **Technology Brewing and Malting**. 5. ed. Berlin: VLB, 2014.
- KUPRIJANOV, A. et al. Advanced control of dissolved oxygen concentration in fed batch cultures during recombinant protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 221–229, 2009.
- KUZMA, M. M.; HUNT, S.; LAYZELL, D. B. Role of Oxygen in the Limitation and Inhibition of Nitrogenase Activity and Respiration Rate in Individual Soybean Nodules. **Plant physiology**, v. 101, n. 1, p. 161–169, 1 jan. 1993.
- LAI, L.-C. et al. Metabolic-State-Dependent Remodeling of the Transcriptome in Response to Anoxia and Subsequent Reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 9, p. 1468–1489, 1 set. 2006.
- LAM, F. H. et al. Engineering alcohol tolerance in yeast. **Science**, 2014.
- LANTZ, A. E. et al. Online monitoring of fermentation processes in lignocelluloses-to-bioalcohol production. In: **Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of**

- Lignocellulosic Biomass.** [s.l.] Woodhead Publishing, 2010. p. 315–339.
- LASI, H. et al. Industry 4.0. **Business & Information Systems Engineering**, v. 6, n. 4, p. 239–242, 19 ago. 2014.
- LEAO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 11, p. 2601–2604, nov. 1982.
- LEE, J. W. et al. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 370–378, 2011.
- LEE, R. A.; LAVOIE, J.-M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 2, p. 6–11, 1 abr. 2013.
- LEMOS, D. A. et al. In situ extractive ethanol fermentation in a drop column bioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1381–1387, 2018.
- LEWIS, N. E. et al. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. **Molecular Systems Biology**, v. 6, p. 390, 27 jul. 2010.
- LIMA, F. V. et al. Similarities and differences between the concepts of operability and flexibility: The steady-state case. **AIChE Journal**, v. 56, n. 3, p. NA-NA, mar. 2009.
- LIMA, F. V.; GEORGAKIS, C. Dynamic Operability for the Calculation of Transient Output Constraints for Non-Square Linear Model Predictive Controllers. **IFAC Proceedings Volumes**, v. 42, n. 11, p. 231–236, 2009.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627–642, 6 fev. 2006.
- LIU, C. G. et al. Redox potential driven aeration during very-high-gravity ethanol fermentation by using flocculating yeast. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25763, 10 maio 2016.
- LOPES, D. D. et al. Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 11, p. 1575–1588, 2017.
- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 1 dez. 2016.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M. et al. Operational strategies for producing bioethanol in a continuous single-stage reactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 12, p. 1929–1937, 18 dez. 2013.
- MARTHOS, B. V. et al. Capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1: from strain selection to fed-batch cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 24, p. 10447–10456, 23 dez. 2015.
- MAY, A. et al. A modified pathway for the production of acetone in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 218–225, 2013.
- MAYNE, D. Q. et al. Constrained model predictive control: Stability and optimality. **Automatica**, v. 36, n. 6, p. 789–814, jun. 2000.

- MESQUITA, T. J. B. **Controle de biorreator com base em modelo de fluxos metabólicos: sintonia das condições de microaeração para maximização da produção de etanol por *S. cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 2017.
- MESQUITA, T. J. B. et al. Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: A novel approach to tune micro-Aeration and substrate feeding in fermentations. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 150, 4 dez. 2019.
- MESQUITA, T. J. B. et al. In silico Metabolic Flux Data Flexibilization for Advanced Bioreactor Control Applications. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 61–66, 1 abr. 2020.
- MESQUITA, T. J. B. et al. A High-Throughput Approach for Modeling and Simulation of Homofermentative Microorganisms Applied to Ethanol Fermentation by *S. cerevisiae*. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 13–26, 1 fev. 2021a.
- MESQUITA, T. J. B. et al. Machine learning applied for metabolic flux-based control of micro-aerated fermentations in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 5, p. 2076–2091, 17 maio 2021b.
- METE, T. et al. Control of dissolved oxygen concentration using neural network in a batch bioreactor. **Computer Applications in Engineering Education**, v. 20, n. 4, p. 619–628, dez. 2012.
- MILESSI, T. S. et al. Continuous 2G ethanol production from xylose in a fixed-bed reactor by native *Saccharomyces cerevisiae* strain through simultaneous isomerization and fermentation. **Cellulose**, v. 27, n. 8, p. 4429–4442, 27 mar. 2020a.
- MILESSI, T. S. et al. Bioethanol Production from Xylose-Rich Hydrolysate by Immobilized Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in Fixed-Bed Reactor. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 75–80, 1 abr. 2020b.
- MILESSI, T. S. et al. Repeated batches as a strategy for high 2G ethanol production from undetoxified hemicellulose hydrolysate using immobilized cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a fixed-bed reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 85, 11 maio 2020c.
- MIRLEKAR, G. et al. A biologically-inspired approach for adaptive control of advanced energy systems. **Computers & Chemical Engineering**, v. 117, p. 378–390, 2 set. 2018a.
- MIRLEKAR, G. et al. Biomimetic model-based advanced control strategy integrated with multi-agent optimization for nonlinear chemical processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 140, p. 229–240, 1 dez. 2018b.
- MIRLEKAR, G. et al. Biomimetic model-based advanced control strategy integrated with multi-agent optimization for nonlinear chemical processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 140, p. 229–240, 1 dez. 2018c.
- MIRLEKAR, G.; LI, S.; LIMA, F. V. Design and Implementation of a Biologically Inspired Optimal Control Strategy for Chemical Process Control. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 22, p. 6468–6479, 7 jun. 2017.
- MISKOVIC, L. et al. A design-build-test cycle using modeling and experiments reveals interdependencies between upper glycolysis and xylose uptake in recombinant *S. cerevisiae* and improves predictive capabilities of large-scale kinetic models. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 166, 26 dez. 2017.

- MO, M. L.; PALSSON, B. Ø.; HERRGARD, M. J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. **BMC systems biology**, v. 3, p. 37, 2009.
- MORRIS, R. L.; SCHMIDT, T. M. Shallow breathing: bacterial life at low O₂. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 205–212, 15 mar. 2013.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1433–1439, 2004.
- NANDIKOLLA, S. K. et al. Emerging Trends in Various Fields with Systems Biology Approach. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, v. 4, n. 2, 2011.
- NELLES, O. **Nonlinear system identification : from classical approaches to neural networks and fuzzy models**. [s.l.] Springer, 2001.
- NICOLETTI, M. C. et al. On-line prediction of the feeding phase in high-cell density cultivation of *E. coli* using constructive neural networks. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 111, n. 1, p. 228–248, 2013.
- NICOLETTI, M. C.; JAIN, L. C.; GIORDANO, R. C. Computational Intelligence Techniques as Tools for Bioprocess Modelling, Optimization, Supervision and Control. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 1–23.
- NIEBEL, B.; LEUPOLD, S.; HEINEMANN, M. An upper limit on Gibbs energy dissipation governs cellular metabolism. **NatuRe MetABoLiSM** |, v. 1, 2019.
- NIEVES, I. U. et al. Injection of air into the headspace improves fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by *Escherichia coli* MM170. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 13, p. 6959–6965, 2011.
- NILSSON, A.; TAHERZADEH, M. J.; LIDÉN, G. Use of dynamic step response for control of fed-batch conversion of lignocellulosic hydrolyzates to ethanol. **Journal of biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 41–53, 26 jul. 2001.
- NISSEN, T. L. et al. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. **Yeast**, v. 18, n. 1, p. 19–32, 15 jan. 2001.
- OCHOA-ESTOPIER, A. et al. Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1521–1527, 2011.
- OGATA, K. **Modern Control Engineering**. 5. ed. New Jersey: Pearson, 2010.
- OKUDA, N. et al. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 350–357, abr. 2007.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517–522, dez. 1997.
- ORTIZ-MUÑIZ, B. et al. Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar canemolasses. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1361–1367, 2010.
- PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **2011**, v. 1, p. 6, 2011.

- PAPADOPOULOU, M. P.; NIKOLOS, I. K.; KARATZAS, G. P. Computational benefits using artificial intelligent methodologies for the solution of an environmental design problem: Saltwater intrusion. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 7, p. 1479–1490, 1 out. 2010.
- PIRES, E.; BRÁNYIK, T. **Biochemistry of Beer Fermentation**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- QIU, X. et al. Stress tolerance phenotype of industrial yeast: industrial cases, cellular changes, and improvement strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6449–6462, 2019.
- RIVERA, E. C. et al. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 2, p. 157–166, 2007.
- RIVERA, E. C. et al. Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 42–51, 2017.
- ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC systems biology**, v. 4, n. 1, p. 45, 2010.
- ROLFE, M. D. et al. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.
- ROYCE, P. N. C.; THORNHILL, N. F. Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. **AIChE Journal**, v. 37, n. 11, p. 1680–1686, 1 nov. 1991.
- RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BETTIGA, M. Increased expression of the oxidative pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in anaerobically growing xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 49, 24 set. 2009.
- RUYTERS, S. et al. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. p. 39–48, 2015.
- SALADINI, F. et al. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 221–227, dez. 2016.
- SANDER, R. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 8, p. 4399–4981, 2015.
- SANDOVAL-NUÑEZ, D. et al. A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, n. 7, p. 1491–1499, 2018.
- SCHEIBLAUER, J. et al. Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* – Combining kinetic modeling and optimization techniques points out avenues to effective process design. **Journal of Theoretical Biology**, v. 453, p. 125–135, 14 set. 2018.
- SCHMIDT, S. A.; HENSCHKE, P. A. Production, reactivation and nutrient requirements of active dried yeast in winemaking: Theory and practice. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, p. 651–662, 1 dez. 2015.
- SCHOBERT, H. H. **Chemistry of fossil fuels and biofuels**. [s.l.] Cambridge University Press, 2013.

SEBORG, D. E.; EDGAR, T. F.; MELLICHAMP, D. A. **Process dynamics and control**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.

SHOEMAKER, C. J.; GREEN, R. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 51, 2011.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2nd. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2012a.

SILVA, J. P. A. et al. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 151–156, mar. 2011.

SILVA, J. P. A. et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259–265, 2012b.

SILVA, R. et al. Optimization of fermentation conditions for the production of human soluble catechol-O-methyltransferase by *Escherichia coli* using artificial neural network. **Journal of Biotechnology**, v. 160, n. 3–4, p. 161–168, 31 ago. 2012c.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, mar. 2010.

SIMUTIS, R.; LÜBBERT, A. Bioreactor control improves bioprocess performance. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 8, p. 1115–1130, 1 ago. 2015.

SMUGA-KOGUT, M. et al. Comparison of bioethanol preparation from triticale straw using the ionic liquid and sulfate methods. **Energies**, v. 12, n. 6, p. 1–13, 2019.

SONEGO, J. L. S. et al. Optimization of Fed-Batch Fermentation with in Situ Ethanol Removal by CO₂ Stripping. **Energy & Fuels**, v. 32, n. 1, p. 954–960, 18 jan. 2018.

SONNLEITNER, B. Automated Measurement and Monitoring of Bioprocesses: Key Elements of the M3C Strategy. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. [s.l.: s.n.]. v. 132p. 1–33.

SONNLEITNER, B.; KÄPPELI, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 6, p. 927–937, 1 jun. 1986.

STANKE, M.; HITZMANN, B. Automatic Control of Bioprocesses. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 35–63.

STANKE, M.; HITZMANN, B. Automatic control of bioprocesses. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 132, p. 35–63, 2013.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13–24, 1 jan. 2010.

STEPHANOPOULOS, G. **Chemical process control : an introduction to theory and practice**. [s.l.] Prentice-Hall, 1984.

- STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering: principles and methodologies**. 1. ed. London: Academic Press, 1998.
- STEPHANOPOULOS, G. N. et al. CHAPTER 4 – Material Balances and Data Consistency. In: **Metabolic Engineering**. [s.l: s.n.]. p. 115–146.
- STEYER, J. P.; GÉNOVÉSI, A.; HARMAND, J. Tools for Fault Detection and Diagnosis. In: **Bioprocess Control**. London, UK: ISTE, 2010. p. 211–237.
- SUNDSTRÖM, H.; ENFORS, S. O. Software sensors for fermentation processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 145–152, 2008.
- SVENSSON, E.; ERIKSSON, K.; WIK, T. **Reasons to apply operability analysis in the design of integrated biorefineries Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2015.
- SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 2004.
- TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 69, n. 3, p. 330–8, 5 ago. 2000.
- TAKAHASHI, M. B. et al. Artificial neural network associated to UV/Vis spectroscopy for monitoring bioreactions in biopharmaceutical processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1045–1054, 1 jun. 2015.
- TALEBNIA, F. Bioethanol from Lignocellulosic Wastes: Current Status and Future Prospects. In: KARIMI, K. (Ed.). **Lignocellulose-Based Bioproducts**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. v. 1p. 175–206.
- TAVASOLI, T. et al. A robust feeding control strategy adjusted and optimized by a neural network for enhancing of alpha 1-antitrypsin production in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 18–27, 15 abr. 2019a.
- TAVASOLI, T. et al. A robust feeding control strategy adjusted and optimized by a neural network for enhancing of alpha 1-antitrypsin production in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 18–27, 15 abr. 2019b.
- TEMER, B. et al. Conversion of an inactive xylose isomerase into a functional enzyme by co-expression of GroEL-GroES chaperonins in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 71, 9 dez. 2017.
- TENGE, C. Yeast. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of brewing : processes, technology, markets**. Weiheim: Wiley, 2009. p. 778.
- THUMM, M. Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. **Microscopy Research and Technique**, v. 51, n. 6, p. 563–572, 15 dez. 2000.
- TIAN, H. et al. Optimization of auto-induction medium for G-CSF production by *Escherichia coli* using artificial neural networks coupled with genetic algorithm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 505–513, 7 mar. 2013.
- TIAN, Y. et al. An overview of process systems engineering approaches for process intensification: State of the art. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 133, n. August, p. 160–210, 2018.
- TIAN, Y.; PISTIKOPOULOS, E. N. Synthesis of operable process intensification systems:

advances and challenges. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 25, p. 101–107, 2019a.

TIAN, Y.; PISTIKOPOULOS, E. N. Synthesis of Operable Process Intensification Systems - Steady-State Design with Safety and Operability Considerations. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 15, p. 6049–6068, 2019b.

TIPPMANN, S. et al. Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with *RQ* -controlled feed. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 1, p. 72–81, 1 jan. 2016.

TYAGI, R. D.; GHOSE, T. K. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 4, p. 781–795, 1982.

UEBAYASHI, K.; SHIMIZU, H.; MATSUDA, F. Comparative analysis of fermentation and enzyme expression profiles among industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 16, p. 7071–7081, 2018.

USDA. **Molasses Nutritional Data (SR LEGACY, 168820)**. Disponível em: <<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168820/nutrients>>.

VALENTINOTTI, S. et al. Optimal operation of fed-batch fermentations via adaptive control of overflow metabolite. **Control Engineering Practice**, v. 11, n. 6, p. 665–674, 1 jun. 2003.

VAN DE WATERBEEMD, B. et al. Improved Production Process for Native Outer Membrane Vesicle Vaccine against *Neisseria meningitidis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e65157, 31 maio 2013.

VERBELEN, P. J. et al. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1143–1156, 5 abr. 2009.

VINSON, D. R.; GEORGAKIS, C. New measure of process output controllability. **Journal of Process Control**, v. 10, n. 2, p. 185–194, 2000.

VINSON, D. R.; GEORGAKIS, C. Inventory Control Structure Independence of the Process Operability Index. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 16, p. 3970–3983, ago. 2002.

VOS, T. et al. Maintenance-energy requirements and robustness of *Saccharomyces cerevisiae* at aerobic near-zero specific growth rates. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2016.

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

WASYLENKO, T. M.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolomic and ¹³C-metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 470–83, mar. 2015.

WINTER, G.; KRÖMER, J. O. Fluxomics - connecting ‘omics analysis and phenotypes. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1901–1916, jul. 2013.

WOODLEY, J. M. Bioprocess intensification for the effective production of chemical products. **Computers & Chemical Engineering**, v. 105, p. 297–307, out. 2017.

WU, H. et al. Effects of cascaded vgb promoters on poly(hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10013–10021, 2014.

XIONG, Z.-Q. et al. RQ feedback control for simultaneous improvement of GSH yield and GSH content in *Saccharomyces cerevisiae* T65. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 598–602, 7 jun. 2010.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 1–2, p. 17–34, jul. 2001.

ZENG, A.-P. et al. Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 9, p. 1107–1114, 5 nov. 1994.

ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. Bioreaction techniques under microaerobic conditions: From molecular level to pilot plant reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 10, p. 2305–2314, maio 1996.

ZHANG, F.; RODRIGUEZ, S.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 775–783, dez. 2011.

ZHOU, K.; TAIGANG LIU; LIFENG ZHOU. **Industry 4.0: Towards future industrial opportunities and challenges**. 2015 12th International Conference on Fuzzy Systems and Knowledge Discovery (FSKD). **Anais...IEEE**, ago. 2015Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/7382284/>>.

10 APÊNDICE A

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO CAPÍTULO 4

Figura A-1. (A) Representação esquemática do procedimento experimental para acompanhar o progresso da fermentação usando medições de liberação em massa de CO_2 nos experimentos do mini-reator. (B) Exemplos meramente ilustrativos de mini-reatores usados.

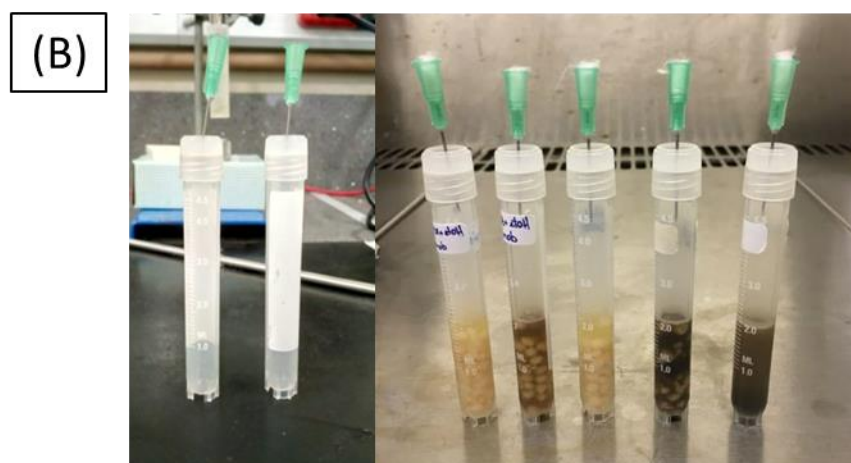
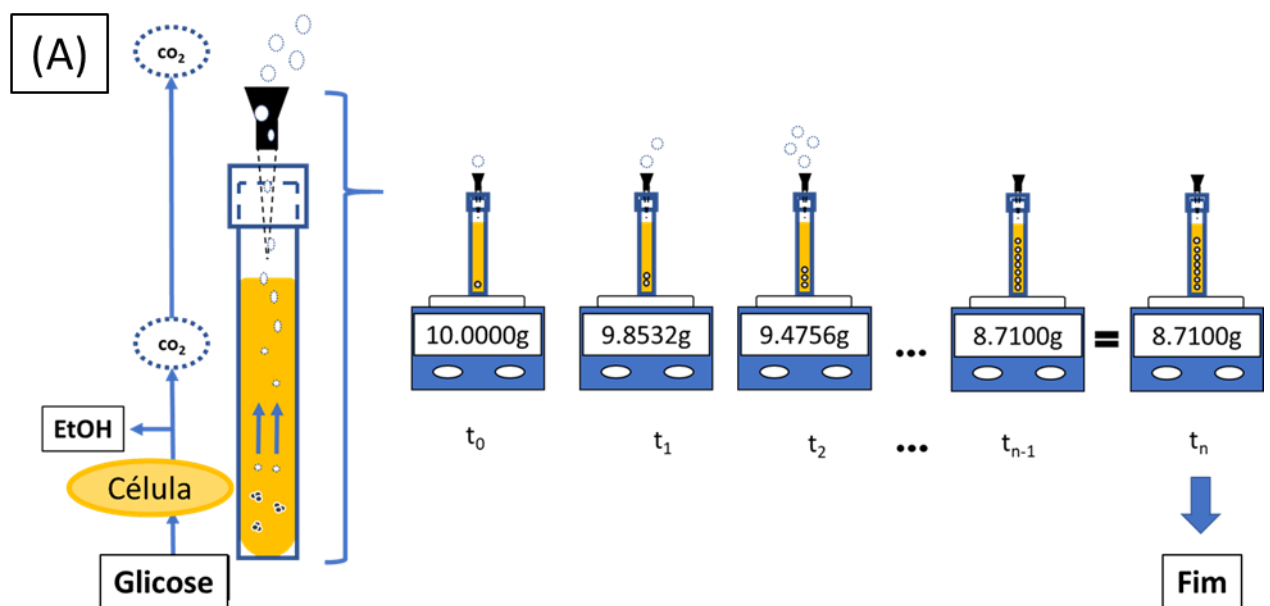


Figura A-2. Dados brutos de massa de CO₂ obtidos utilizando diferentes concentrações iniciais de glicose (30 a 180 g.L⁻¹) para (A) FT858L e (B) FERME_L. Todos os experimentos em mini-reatores, V= 4 mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30°C, DO₀ = 4,5 (C_{x0} = 2,2 g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%.

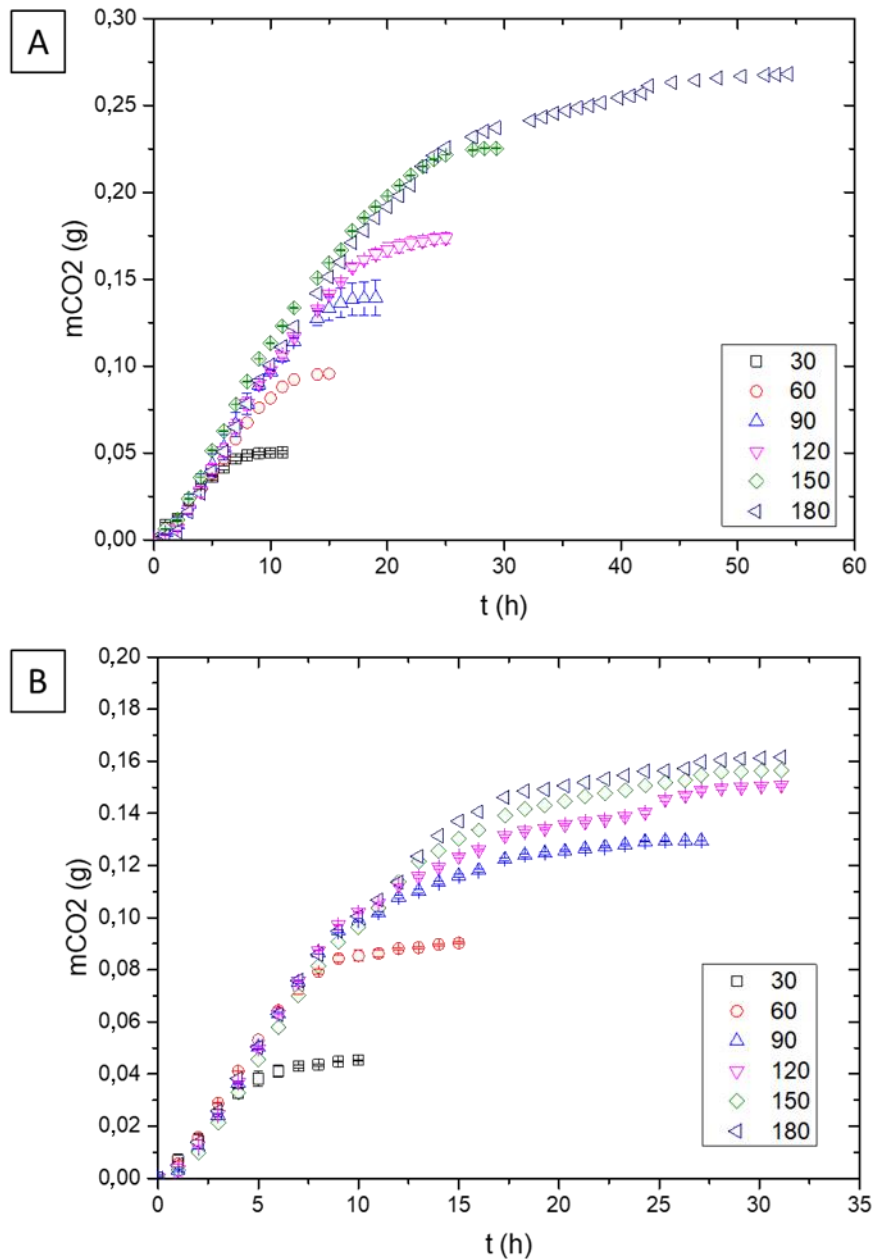


Figura A-3. Dados brutos de massa de CO₂ obtidos utilizando diferentes concentrações iniciais de etanol (0 a 120 g.L⁻¹) para (A) FT858L e (B) FERMEI. Todos os experimentos em mini-reatores, V= 4 mL, meio mínimo, estático, pH 4,5, 30°C, DO₀ = 4,5 (C_{x0} = 2,2 g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%.

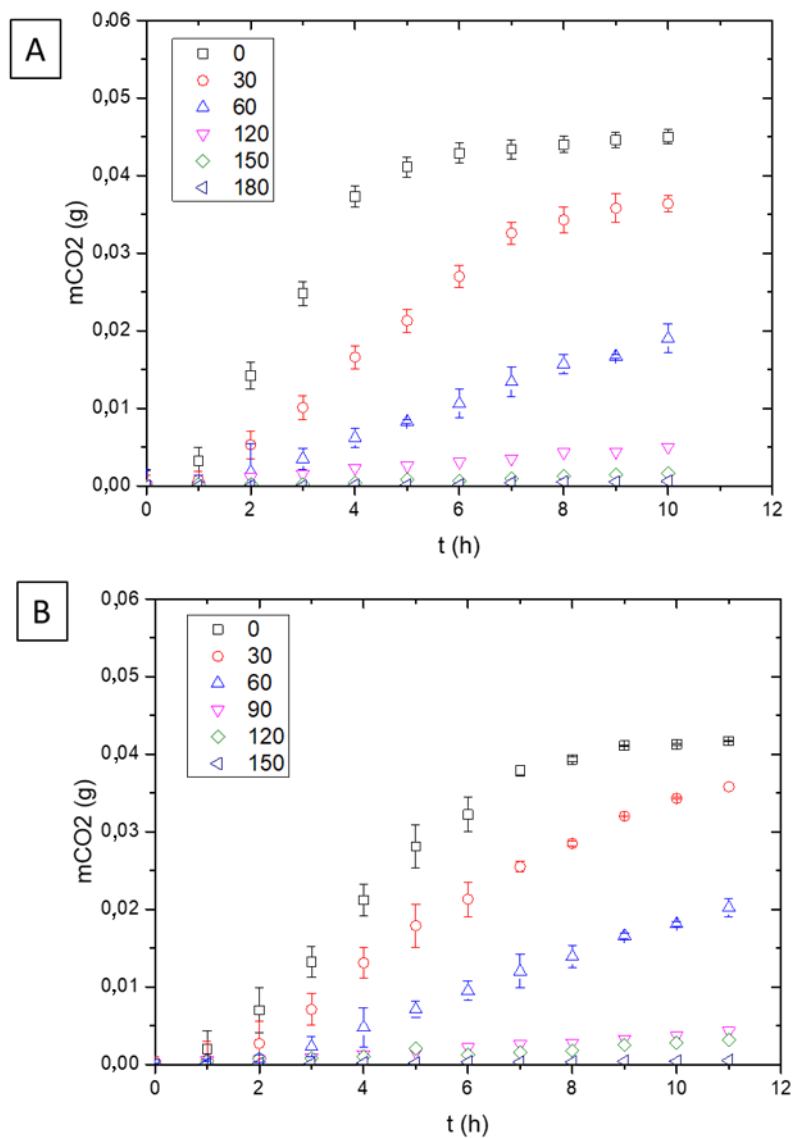
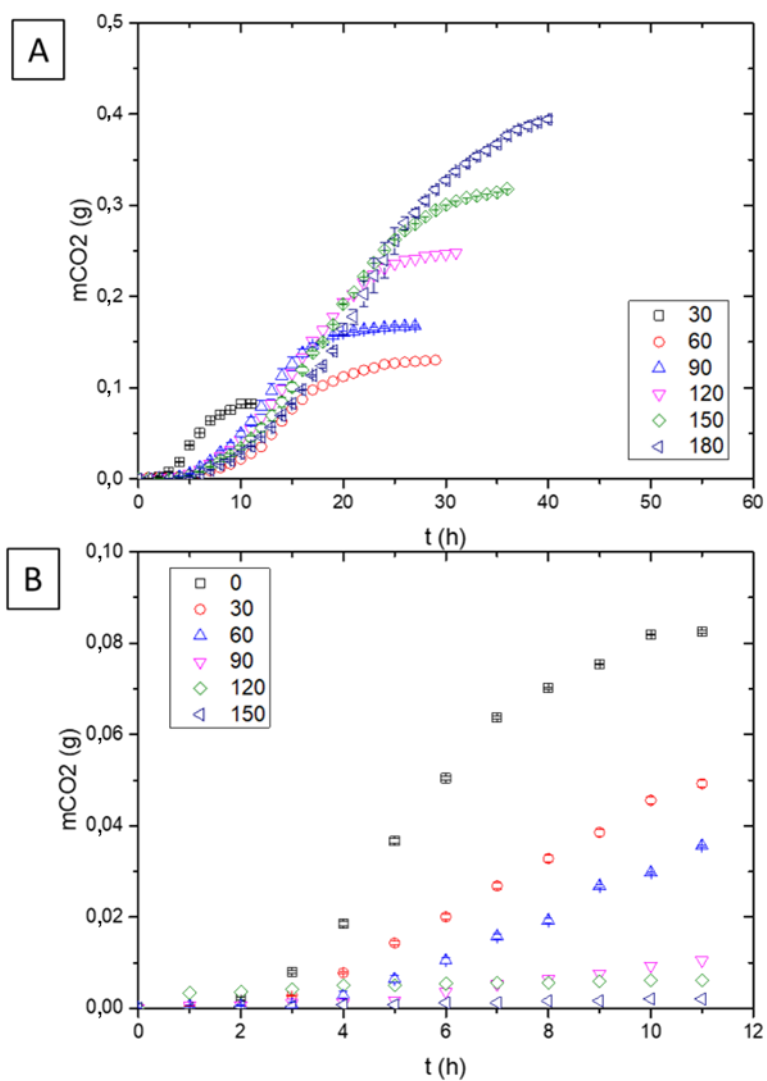


Figura A-4. Dados brutos de massa de CO₂ para FT858L com melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. (A) Diferentes concentrações iniciais de melaço (ART de 30 a 180 g.L⁻¹) e (B) concentrações iniciais de etanol (0 a 120 g.L⁻¹). Todos os experimentos em mini-reactors, V= 4 mL, melaço como fonte de carbono, estático, pH 4,5, 30 °C, DO₀ = 4,5 (Cx₀ = 2,2 g.L⁻¹), viabilidade inicial=75%.



11 APÊNDICE B

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO CAPÍTULO 5

Dedução da Lei de Controle

Em relação às equações da fase gasosa, os procedimentos de dedução são descritos a seguir. Essa dedução segue os mesmos procedimentos encontrados na literatura (MESQUITA et al., 2019).

É possível estimar a velocidade de consumo de oxigênio (r_{O_2} , em $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pela Eq. I. A concentração celular é estimada pela densidade ótica medida *at-line*.

$$r_{O_2} = J_{O_2} * C_X \quad (\text{I})$$

A vazão de oxigênio de entrada ($Q_{O_2}^e$) foi calculado pela combinação da lei dos gases ideais (Eq. II e Eq. III) e do balanço de massa molar r_{O_2} (Eq. IV) para a fase gasosa.

$$Q_{O_2}^e = \frac{\dot{n}_{O_2}^e * R * T_e}{P_e} \quad (\text{II})$$

$$Q_{O_2}^e = y_{O_2, N_2} * Q_{N_2} + y_{O_2, Ar} * Q_{Ar} \quad (\text{III})$$

$$r_{O_2} = \frac{\dot{n}_{O_2}^e - \dot{n}_{O_2}^s}{V} \quad (\text{IV})$$

Em que, T_e é a temperatura da fase gasosa na entrada (K); P_e é a pressão da fase gasosa na entrada (atm); R é a constante de gás ideal ($\text{atm.L.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$); y_{O_2, N_2} é a fração de oxigênio no gás N_2 ; $y_{O_2, Ar}$ é a fração de oxigênio no ar; Q_{N_2} é a vazão volumétrica do gás N_2 industrial (L.h^{-1}); Q_{Ar} é a vazão volumétrica de ar (L.h^{-1}); $\dot{n}_{O_2}^e$ é a vazão molar de entrada de oxigênio (mol.h^{-1}); $\dot{n}_{O_2}^s$ é a vazão molar de saída de oxigênio (mol.h^{-1}); e V é o volume médio (L).

As equações I, II, III e IV foram combinadas para obter a equação inicial usada para atualizar o fornecimento de oxigênio ($Q_{O_2}^e$) (L.h^{-1}) pela Eq. V e a fração de entrada de oxigênio ($y_{O_2}^e$) pela Eq. VI. Ambos serão usados para definir o Q_{Ar} . Na Eq. V, T_s é a temperatura da fase gasosa na saída (K) e P_s é a pressão da fase gasosa na saída (atm).

$$J_{O_2} * C_X * V = \frac{Q_{O_2}^e * P_e}{R * T_e} - \frac{y_{O_2}^s * Q_{gas}^s * P_s}{R * T_s} \quad (\text{V})$$

$$y_{O_2}^e = \frac{y_{O_2,Ar} Q_{Ar} + y_{O_2,N_2} Q_{N_2}}{Q_{Ar} + Q_{N_2}} \quad (VI)$$

Alguns termos da Eq. V foram combinados, formando as expressões α , β_e e β_s , que são definidas pelas Eqs. (VII), (VIII) e (IX) respectivamente, e facilitam as manipulações algébricas.

$$\alpha = J_{O_2} * C_X * V \quad (VII)$$

$$\beta_e = \frac{P_e}{R * T_e} \quad (VIII)$$

$$\beta_s = \frac{P_s}{R * T_s} \quad (IX)$$

Aplicando Eq. III em Eq. V, a Eq. X é obtida após o agrupamento anterior e a manipulação algébrica

$$\alpha = (y_{O_2,N_2} * Q_{N_2} + y_{O_2,Ar} * Q_{Ar}) * \beta_e - y_{O_2}^s * Q_{gas}^s * \beta_s \quad (X)$$

O balanço molar para o nitrogênio permite o cálculo da vazão da fase gasosa na saída do biorreator (Q_{gas}^s) pela Eq. XI.

$$Q_{gas}^s = \frac{Q_{N_2} + y_{N_2,Ar} * Q_{Ar}}{y_{N_2}^s} \quad (XI)$$

$$y_{N_2}^s = (1 - y_{O_2}^s - y_{CO_2}^s) \quad (XII)$$

Em relação ao Eq. XII, $y_{N_2}^s$ é a fração molar de nitrogênio no gás de saída; $y_{O_2}^s$ é a fração molar de oxigênio no gás de saída; e $y_{CO_2}^s$ é a fração de dióxido de carbono no gás de saída.

Aplicando as Eqs. XI e XII na Eq. X, é possível isolar e obter a equação final de vazão de entrada de ar (Eq. XIII).

$$\alpha = (y_{O_2,N_2} * Q_{N_2} + y_{O_2,Ar} * Q_{Ar}) * \beta_e - y_{O_2}^s * \frac{Q_{N_2} + y_{N_2,Ar} * Q_{Ar}}{y_{N_2}^s} * \beta_s$$

$$\gamma_s = \frac{y_{O_2}^s}{y_{N_2}^s} * \beta_s$$

$$\alpha = (y_{O_2,N_2} * Q_{N_2} + y_{O_2,Ar} * Q_{Ar}) * \beta_e - (Q_{N_2} + y_{N_2,Ar} * Q_{Ar}) * \gamma_s$$

$$\frac{\alpha}{\gamma_s} = (y_{O_2,N_2} * Q_{N_2} + y_{O_2,Ar} * Q_{Ar}) * \frac{\beta_e}{\gamma_s} - Q_{N_2} - y_{N_2,Ar} * Q_{Ar}$$

$$Q_{Ar} = \frac{\left(\frac{\alpha}{\gamma_s} + Q_{N_2} - y_{O_2,N_2} * Q_{N_2} * \frac{\beta_e}{\gamma_s}\right)}{\left(\frac{\beta_e}{\gamma_s} * y_{O_2,Ar} - y_{N_2,Ar}\right)}$$

$$Q_{Ar} = \frac{(\alpha + Q_{N_2} * \gamma_s - y_{O_2,N_2} * Q_{N_2} * \beta_e)}{(y_{O_2,Ar} * \beta_e - y_{N_2,Ar} * \gamma_s)} \quad (XIII)$$

A Eq. XIII pode ser simplificada assumindo a fração molar de oxigênio no gás nitrogênio de entrada (y_{O_2,N_2}) como zero (y_{O_2,N_2} está abaixo de 0,01% para N_2 industrial). Assim, obtém-se a equação XIV.

$$Q_{Ar} = \frac{(Cx * J_{O_2} * V * R) + Q_{N_2} * \left(\frac{y_{O_2}^s * P_s}{y_{N_2}^s * T_s}\right)}{\left(\frac{y_{O_2,Ar} * P_e}{T_e}\right) - y_{N_2,Ar} * \left(\frac{y_{O_2}^s * P_s}{y_{N_2}^s * T_s}\right)} \quad (XIV)$$

O J_{O_2} usado na Eq. XIV é o resultado da desnormalização da saída da Rede Neural Artificial.

Figura B-1 – Perfis de concentração para cultivos em biorreator (A) HC-RQ e (B) PID-RQ. (□) Concentração de células (C_X), (○) Concentração de etanol (C_{EtOH}), (△) Concentração de glicerol (C_{Glyc}), e (▽) Concentração de substrato (C_S). Condições experimentais: $V=4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, $OD_0=6$ ($C_{X0}=3\text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial =75% . Concentrações de glicose, etanol e glicerol medidas em HPLC. C_X medido por leituras de densidade ótica.

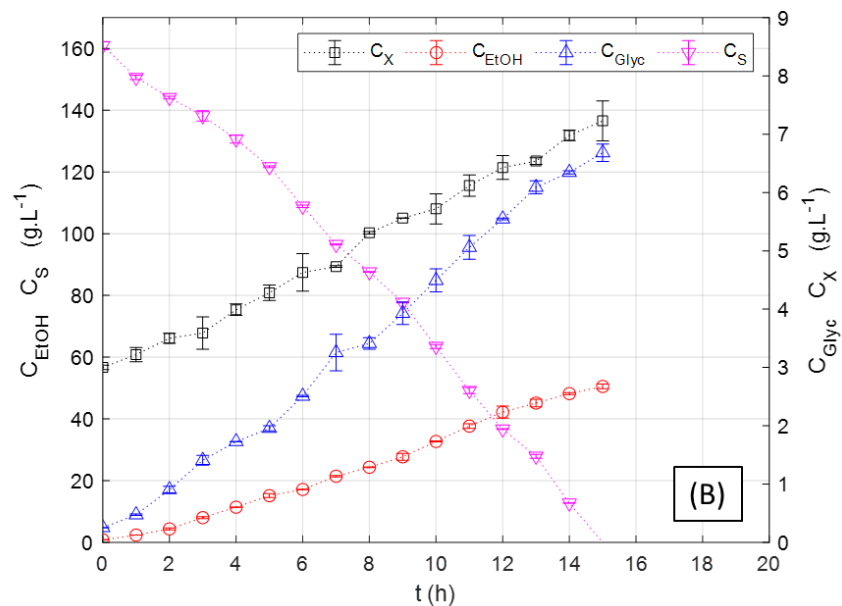
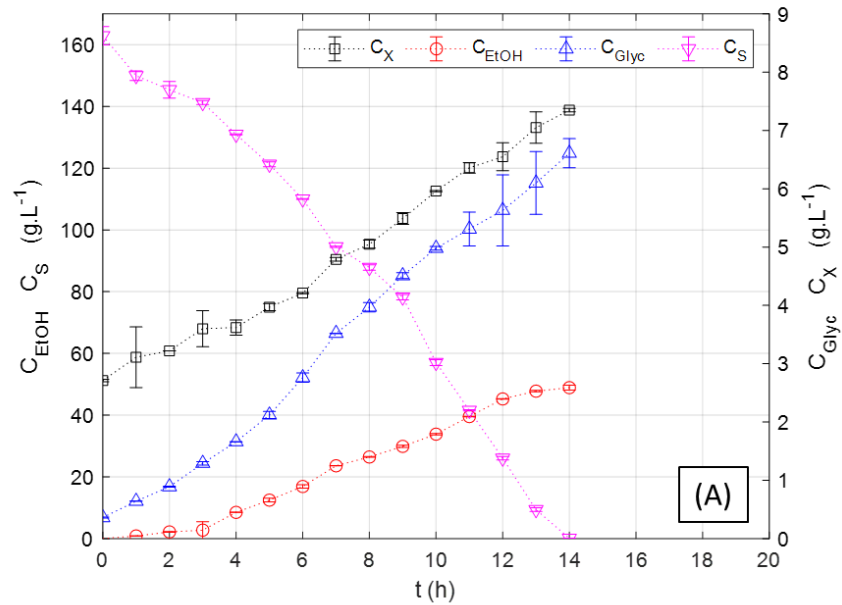
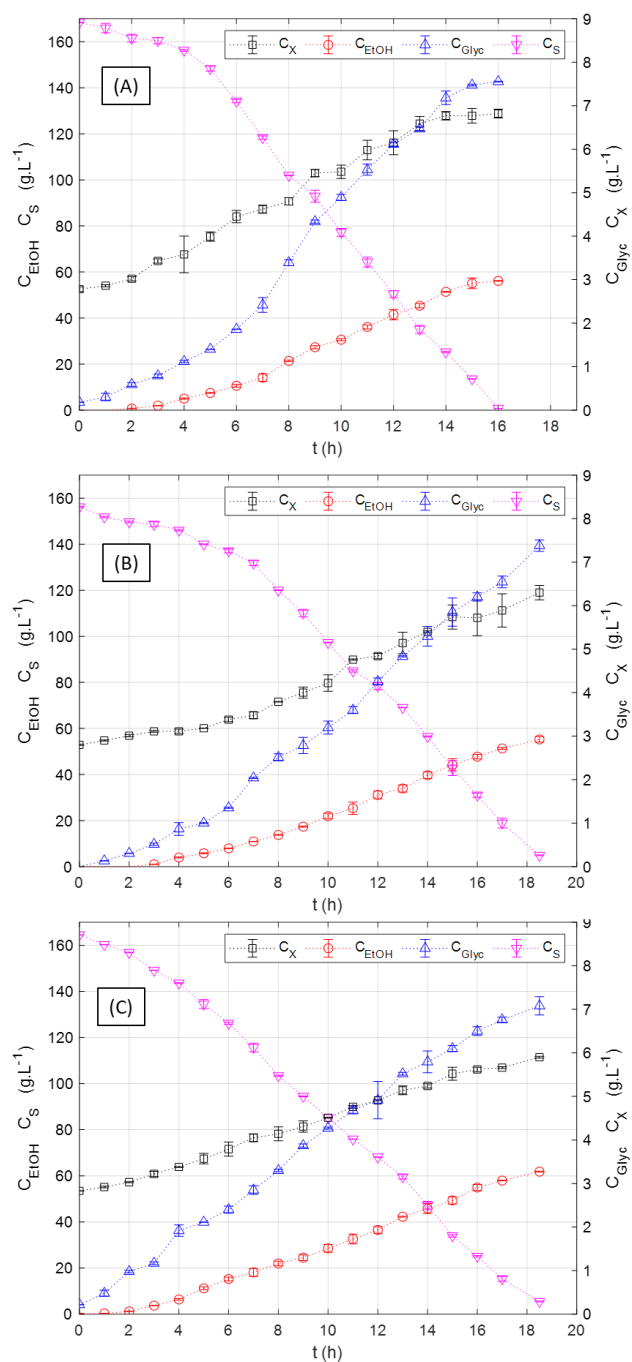
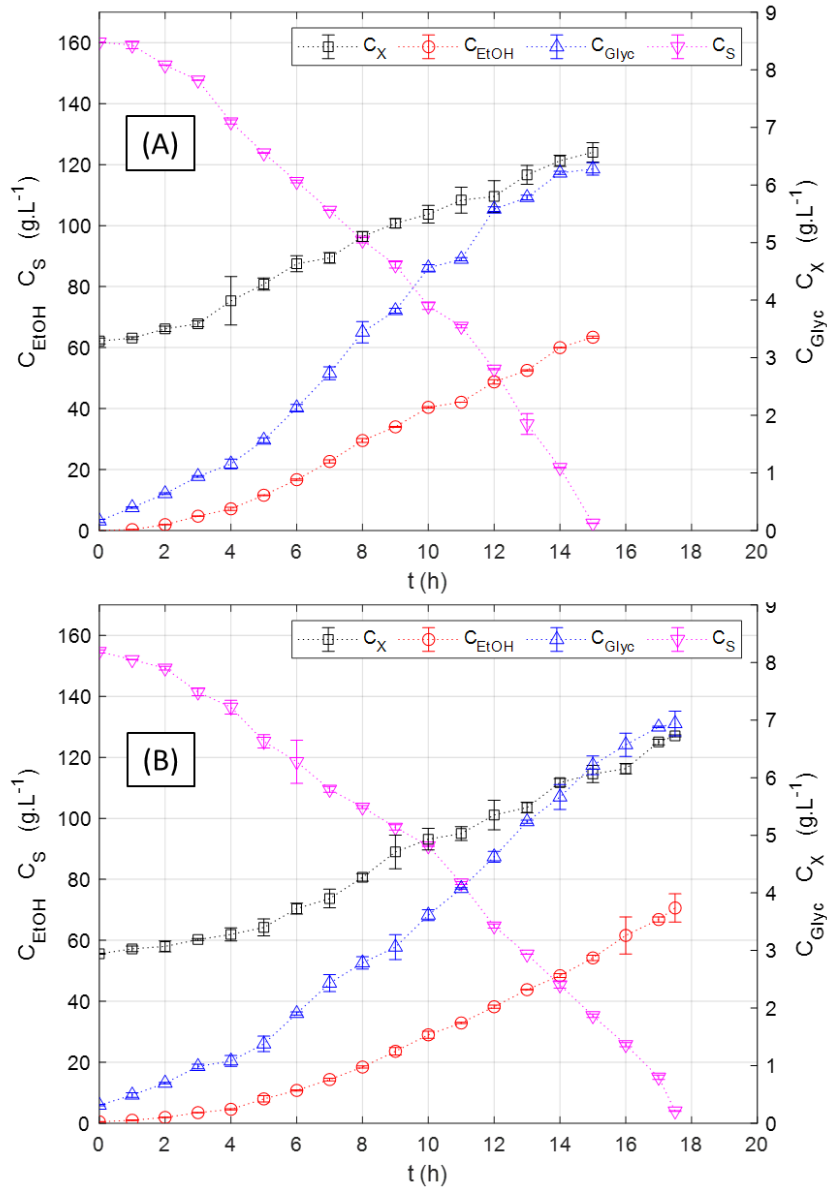


Figura B-2 - Perfis de concentração para os cultivos em biorreator (A) Qfix-B, (B) Qfix-MB e (C) PBB. (□) Concentração de células (C_X), (○) Concentração de etanol (C_{EtOH}), (△) Concentração de glicerol (C_{Glyc}) e (▽) Concentração de substrato (C_S). Condições experimentais: $V=4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, $OD_0=6$ ($C_{X0}=3\text{ g.L}^{-1}$), viabilidade inicial =75%. Concentrações de glicose, etanol e glicerol medidas no HPLC. C_X medido por leituras de densidade ótica.



NOTA: Os perfis de concentração de Qfix-B e PBB podem ser encontrados também no Capítulo 4 (Figura 4.6 e 4.8, respectivamente).

Figura B-3 – Perfil de concentração para (A) FM-RNA e (B) FM-RNA-PI. Em que, (\square) Concentração de Células (C_X), (\circ) Concentração de Etanol (C_{EtOH}), (\triangle) Concentração de Glicerol (C_{Glyc}), e (∇) Concentração de Substrato (C_S). Condições experimentais: $V=4L$, meio mínimo, 500 rpm, pH 4.5, 30°C, $OD_0=6$ ($C_{X0}=3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), viabilidade inicial =75% . Concentrações de glicose, etanol e glicerol são medidos no HPLC. C_X medido por leituras de densidade ótica.



12 APÊNDICE C

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO CAPÍTULO 6

Hyperlink

O hyperlink para baixar o Aplicativo de Operabilidade para Matlab está disponível abaixo:

<https://fernandolima.faculty.wvu.edu/operability-app>

Dedução do modelo de processo

Em primeiro lugar, é importante ressaltar que este trabalho usa o conceito de fluxo metabólico definido como a velocidade específica de produção ou consumo de um componente "i" (Eq. I) (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998). No caso, a velocidade específica de crescimento é igual ao fluxo metabólico de biomassa (Eq. II).

$$\text{Metabolic Flux } (J_i) = \frac{r_i}{c_x} \quad (\text{I})$$

$$J_X = \frac{r_x}{c_x} = \mu \quad (\text{II})$$

O fluxo de substrato consumido (J_S) é a soma de seu componente oxidativo com a parte redutiva (Eq.III). Isso vale para a velocidade específica de crescimento (μ) ou fluxo de biomassa (J_X), que é a soma da parte oxidativa e redutiva dos fluxos de substrato associada aos seus respectivos coeficientes de rendimento (Eq. IV).

$$J_S = (J_S^{\text{Oxidativo}} + J_S^{\text{Redutivo}}) \quad (\text{III})$$

$$\mu = \left(\frac{Y_X}{S} \right)^{\text{Oxidativo}} J_S^{\text{Oxidativo}} + \left(\frac{Y_X}{S} \right)^{\text{Redutivo}} * J_S^{\text{Redutivo}} \quad (\text{IV})$$

Ambos os fluxos de substrato (Eq. III) são determinados por um sistema de equações lineares (Eq. V e VI), em que os fluxos de oxigênio e dióxido de carbono são correlacionados pelo rendimento do componente em relação ao substrato consumido (SHULER E KARGI, 2002; STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998):

$$J_{O_2} = \left(\frac{Y_{O_2}}{S}\right)^{\text{Oxidativo}} * J_S^{\text{Oxidativo}} \quad (\text{V})$$

$$J_{CO_2} = \left(\frac{Y_{CO_2}}{S}\right)^{\text{Oxidativo}} * J_S^{\text{Oxidativo}} + \left(\frac{Y_{CO_2}}{S}\right)^{\text{Redutivo}} * J_S^{\text{Redutivo}} \quad (\text{VI})$$

Em conjunto com solução do sistema anterior, os fluxos de substrato são usados no sistema de equações diferenciais (Eq. VII-IX) para obter os principais componentes do processo: concentração de substrato, C_s ($g.L^{-1}$); biomassa, C_x (em massa seca, $g_{ms}.L^{-1}$); etanol, C_e ($g.L^{-1}$). As equações foram obtidas através do balanço de massa para cada componente para operação em batelada.

$$\frac{dC_s}{dt} = - [(J_S^{\text{Oxidativo}} + J_S^{\text{Redutivo}}) * C_x + m_s * C_x] \quad (\text{VII})$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \left(\left(\frac{Y_x}{S}\right)^{\text{Oxidativo}} * J_S^{\text{Oxidativo}} + \left(\frac{Y_x}{S}\right)^{\text{Redutivo}} * J_S^{\text{Redutivo}} \right) * C_x \quad (\text{VIII})$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \left(\left(\frac{Y_p}{S}\right)^{\text{Micro-aerated}} * J_S \right) * C_x \quad (\text{IX})$$

A dinâmica da assimilação de oxigênio pode ser obtida por um balanço de massa para o oxigênio dissolvido na fase líquida usando os conceitos de taxa de transferência de oxigênio (*oxygen transfer rate*, OTR) e velocidade de consumo de oxigênio (*oxygen uptake rate*, OUR) (Eq. X) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009)

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} = k_L a * (C_{O_2, \text{sat}} - C_{O_2}) - J_{O_2} * C_x \quad (\text{X})$$

$$k_L a = 3600 * 7.65 * 10^{-6} * N^{0.778} * \varphi_{ar}^{0.688} * \mu_{visc}^{-0.620} \quad (XI)$$

$$\varphi_{ar} = \frac{Q_{Ar}^e}{V} \quad (XII)$$

O coeficiente de transferência de oxigênio ($k_L a$) foi obtido pela Eq. XI que pode ser encontrada na literatura (Bustamante *et al.*, 2013). Nessa equação, N é a velocidade do impelidor (rpm), φ_{ar} é a vazão específica de ar (vvm) (Eq. XII), e μ_{visc} é a viscosidade dinâmica (Pa.s). Assumindo a hipótese de que, sob condições micro-aeróbicas, as leituras de concentração de oxigênio dissolvido são pequenas quando comparadas à concentração de oxigênio dissolvido na saturação ($C_{O_2,sat}$), a Eq. X pode ser simplificado e reorganizada (Eq. XIII).

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a * C_{O_2,sat} - J_{O_2} * C_x \quad (XIII)$$

O J_{O_2} (Eq. XIV) é obtido assumindo que o termo derivativo é igual a zero no estado estacionário para a fase gasosa.

$$J_{O_2} = \frac{k_L a * C_{O_2,sat}}{C_x} \quad (XIV)$$

A definição de um sistema de equações diferenciais de primeira ordem (Eq. XVI) (SEBORG; EDGAR; MELLICHAMP, 2011) para a dinâmica de resposta é considerada para levar em conta as condições não modeladas, como atrasos nas atuações da válvula, concentrações não homogêneas de O_2 e CO_2 dentro do vaso. composição do gás na multifase, conforme exposto no capítulo 6, que resulta na Eq. XVII.

$$\tau_i * \frac{dy}{dt} + y = (K * u) \quad (XVI)$$

$$\tau_1 * \frac{dJ_{O_2}}{dt} + J_{O_2} = \left(\frac{k_L a * C_{O_2,sat}}{C_x} \right) \quad (XVII)$$

A dinâmica de J_{CO_2} é análoga à de J_{O_2} , e é baseada no balanço molar para fase gasosa (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; ROYCE; THORNHILL, 1991) (Eq. XVIII).

$$\frac{dC_{CO_2}}{dt} = J_{CO_2} * Cx + \frac{1}{V} * (\dot{n}_{CO_2}^e - \dot{n}_{CO_2}^s) \quad (XVIII)$$

Em que, $\dot{n}_{CO_2}^e$ e $\dot{n}_{CO_2}^s$ representam as vazões molares de CO_2 entrando e saindo pelo biorreator.

J_{CO_2} é obtido quando o termo derivativo é igual a zero em estado estacionário para a fase gasosa (Eq. XIX). Um termo adicional Cf foi incluído para auxiliar no ajuste do modelo.

$$J_{CO_2} = \frac{1}{V * Cx * Cf} * (y_{CO_2}^e * Q_{gas}^e * \gamma_e - y_{CO_2}^s * Q_{gas}^s * \gamma_s) \quad (XIX)$$

A mesma dinâmica de primeira ordem é assumida para J_{CO_2}

$$\tau_2 * \frac{dJ_{CO_2}}{dt} + J_{CO_2} = \left[\frac{1}{V * Cx * Cf} * (y_{CO_2}^e * Q_{gas}^e * \gamma_e - y_{CO_2}^s * Q_{gas}^s * \gamma_s) \right] \quad (XX)$$

Os termos Q_{gas}^e , Q_{gas}^s , γ_e e γ_s são definidos por Eq. XXI, XXII, XXIII e XXIV, respectivamente. A Eq. XXII é uma correlação empírica, obtida a partir das vazões de gás de entrada e saída observadas nos experimentos (dados não apresentados).

$$Q_{gas}^e = Q_{Ar}^e + Q_{N_2}^e \quad (XXI)$$

$$Q_{gas}^s = (1.30 \pm 0.05) * Q_{gas}^e \quad (XXII)$$

$$\gamma_e = \frac{Pe}{Te * R} \quad (XXIII)$$

$$\gamma_s = \frac{Ps}{Ts * R} \quad (XXIV)$$

A dinâmica da fração molar de saída de oxigênio ($y_{O_2}^S$, Eq. XXVI) e o cálculo da vazão molar total (Eq. XXVII) são usados para obter a fração molar de saída de CO_2 , ($y_{CO_2}^S$) (Eq. XXVIII).

$$\frac{dy_{O_2}^S}{dt} = \left(\frac{y_{O_2}^e * Q_{gas}^e * \alpha_e}{\dot{n}_{total}} - \frac{y_{O_2}^S * Q_{gas}^S}{Vr} \right) - \frac{I_{O_2} * Cx * V}{\dot{n}_{total}} \quad (XXVI)$$

$$\dot{n}_{total} = \frac{Ps * Vr}{Ts * R} \quad (XXVII)$$

$$y_{CO_2}^S = 1 - y_{O_2}^S - \frac{(1 - y_{O_2}^e - y_{CO_2}^e) * Q_{gas}^e}{Q_{gas}^S} * \frac{\alpha_e}{\alpha_s} \quad (XXVIII)$$

Nas Eqs. XXVI e XXVII, o termo Vr refere-se ao volume ocupado pelo gás no biorreator.