



**Universidade Federal de São Carlos - UFSCar**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – CCET  
Departamento de Engenharia Química – DEQ  
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química – PPGEQ  
Centro de Processos Catalíticos e Biotecnológicos – CPCB

Laboratório de Desenvolvimento e Automação em Bioprocessos 2 – LaDABio2  
Laboratório de Fábricas Celulares – LaFaC

## **Otimização da Produção de Goma Xantana: cultivo em biorreator, modelagem e análise de operabilidade**

**Doutorando:** Davi Benedito Oliveira

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta

**Coorientador:** Prof. Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP  
2025



**DAVI BENEDITO OLIVEIRA**

**Otimização da Produção de Goma Xantana: cultivo em biorreator,  
modelagem e análise de operabilidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta

**Coorientador:** Prof. Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP  
2025





**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 Davi Benedito Oliveira, realizada em 25/04/2025.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Vines Faria de Lima (WVU)

Prof. Dr. Gilson Campani Júnior (UFLA)

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (UFSCar)

Profa. Dra. Inti Doraci Cavalcanti Montano (UFG)

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



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, José e Lázara, e meus irmãos Luana e André. Muito obrigado por todos os conselhos, apoio, amizade, carinho e atenção que me deram. Amo vocês.

Aos demais familiares e amigos que se fizeram presentes durante minha trajetória.

Aos meus amigos de laboratório e departamento, LaFaC, LaDABio 2, e CODES Group, em especial José Davi e Vitor Pantaleão. Obrigado pelas experiências.

A todos que de alguma forma participaram e contribuíram com o projeto. Com destaque para os alunos de iniciação científica Guilherme e João Victor.

Ao DEQ, PPGEQ, UFSCar, WVU e todos seus integrantes e funcionários, que proporcionaram as condições necessárias para o bom desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do DEQ que foram fonte de muito conhecimento e aprendizado.

Aos professores Dr. Gilson Campani Junior e Dr.<sup>a</sup> Inti Doraci Cavalcanti Montano, pelas contribuições como membros da banca de defesa da tese aqui apresentada.

Ao Prof.<sup>a</sup> Ao Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro, pelas contribuições, como professor e membro de todas as bancas de avaliação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Vines Lima, por me receber em seu grupo de pesquisa, pelas contribuições nas bancas de avaliação, pela orientação e conhecimento transmitido.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (KK) e Prof. Dr. Adilson José da Silva, pelo impecável trabalho de orientação, exemplo, pelos ensinamentos, apoio, diálogo e amizade. Muito obrigado.

À FAPESP pelo apoio financeiro indireto.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto através da bolsa, processo 141073/2021-7.

Ao amor da minha vida, que chegou ao final do trajeto, mas foi fundamental na minha estabilidade, me deu amor, apoio e tive nela minha verdadeira companhia.

Pretendo para sempre caminhar ao seu lado. Eu te amo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e CAPES Print processo 88887.717050/2022-00.



*Sempre inicie pelo simples, mas não pare ali. No final vai dar tudo certo!*

(Livre do Autor)



## RESUMO

*Xanthomonas* é um gênero de bactérias fitopatogênicas muito conhecido pela síntese de um biopolímero altamente viscoso e com diversas aplicações na indústria, chamado de goma xantana. Recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma linhagem para produção desse composto com produtividade superior a 50% comparada com a sua linhagem parental. Diante de uma produção com características de alta viscosidade do caldo, problemas de transferência de massa e fornecimento de oxigênio podem ocorrer, o que para um cultivo aeróbio se torna um grande desafio tecnológico. Apesar de esforços já terem sido reportados na literatura focando nessa problemática, este trabalho vem apresentar uma nova abordagem como solução a esse problema. A hipótese levantada consiste na aplicação de um sistema de cultivo contínuo controlado capaz de realizar a manutenção da viscosidade em uma região ótima, ou seja, que não interfira na correta mistura do meio e mantenha condições viáveis para transferência de oxigênio. A estratégia se baseia no desenvolvimento de um modelo cinético que descreva a formação de biomassa e produto, e o consumo de substrato e oxigênio, usando como apoio uma rede neural treinada para prever a evolução da viscosidade em função do produto acumulado. O modelo elaborado foi desenvolvido a partir da adaptação de modelos pré-existentes na literatura focando em descrever os dados coletados experimentalmente em diferentes biorreatores de bancada. Além disso, o modelo permite que sejam feitas simulações de cultivos em batelada, batelada alimentada e contínuo. O levantamento de dados se deu através de cultivos em batelada realizados em biorreatores de 1,5 e 6 L. Estudos de “Operabilidade” do sistema sugerido foram realizados e indicaram com sucesso as condições operacionais para a processo. Os resultados experimentais ultrapassaram as expectativas, atingindo um aumento de 220% em produtividade quando comparado às bateladas padrões.

**Palavras-Chave:** *Xanthomonas*; Cinética; Bioprocessos; Biopolímero; Alta viscosidade.



## ABSTRACT

*Xanthomonas*, a genus of phytopathogenic bacteria, is renowned for producing xanthan gum, a highly viscous biopolymer with diverse industrial applications. Our research group recently engineered a strain that boosts xanthan gum productivity by 50% compared to the wild type. High-viscosity broths often hinder mass transfer and oxygen supply in aerobic cultures. While previous studies have tackled these challenges through advanced aeration and mixing strategies, our approach takes a different path. The hypothesis proposes that the implementation of a controlled continuous cultivation system designed to keep viscosity within an optimal range would ensure unobstructed medium mixing and maintain adequate oxygen transfer. To realize this strategy, a kinetic model was developed capturing biomass growth, product formation, and substrate and oxygen consumption. Existing models from the literature were adapted to fit our experimental data from bench-scale bioreactors. The final model is supported by a neural network trained on our viscosity measurements to predict how viscosity evolves as xanthan gum accumulates. This combined framework supports simulations of batch, fed-batch, and continuous processes, offering versatile tools for process design and optimization. The system was validated with batch cultures in 1.5 L and 6 L bioreactors, and an operability study was conducted under continuous conditions. These experiments identified process parameters that sustain optimal viscosity and maximize oxygen transfer. Ultimately, the approach delivered a 220% productivity increase over standard batch processes, far exceeding initial expectations.

**Key-words:** *Xanthomonas*; Kinetics; Bioprocess; Biopolymer; High Viscosity.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1:</b> IMPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE GOMA XANTANA EM MILHÕES DE DÓLARES (US\$ FOB) ENTRE OS ANOS DE 1997 A 2024. FONTE: DADOS DA PLATAFORMA COMEX STAT (MDIC, 2025). .....                                       | 24 |
| <b>FIGURA 2:</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DOS AÇÚCARES PRECURSORES. ....  | 32 |
| <b>FIGURA 3:</b> UNIDADE DE REPETIÇÃO ESTRUTURAL DA GOMA XANTANA. ....  | 33 |
| <b>FIGURA 4:</b> FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE GOMA XANTANA UTILIZANDO UM REATOR DE TANQUE AGITADO CONVENCIONAL. ....  | 39 |
| <b>FIGURA 5:</b> ESQUEMA METABÓLICO SIMPLIFICADO.....   | 45 |
| <b>FIGURA 6:</b> ILUSTRAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DE UMA ANÁLISE DE OPERABILIDADE P .....  | 49 |
| <b>FIGURA 7:</b> FLUXOGRAMA EM ORDEM CRONOLÓGICA ILUSTRANDO AS ETAPAS PRINCIPAIS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO .....   | 52 |
| <b>FIGURA 8:</b> IMAGENS MOSTRANDO COM DETALHES O ANEL DE ROLAMENTO UTILIZADO PARA LIBERAÇÃO DA ROTAÇÃO DO CORPO DO MOTOR .....   | 56 |
| <b>FIGURA 9:</b> IMAGENS CONTENDO OS ITENS ENUMERADOS QUE COMPÕEM O SISTEMA PARA MONITORAMENTO DE TORQUE EM CULTIVOS DE PRODUÇÃO DE GOMA. ....  | 57 |
| <b>FIGURA 10:</b> ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA RNA UTILIZADA PARA DESCREVER OS PARÂMETROS K (ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA) E N (TAXA DE CISALHAMENTO) DA REOLOGIA DO MEIO. ....  | 59 |
| <b>FIGURA 11:</b> ORDEM DE PROCEDIMENTOS APLICADOS PARA RESOLUÇÃO DE UM PROBLEMA DE OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO SIMULATED ANNEALING .....  | 64 |
| <b>FIGURA 12:</b> CONFIGURAÇÕES APLICADAS AO OPERABILITY APP PARA ESTUDO DE OPERABILIDADE UTILIZANDO A ABORDAGEM NLP .....  | 73 |
| <b>FIGURA 13:</b> FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS DE PRODUTO PRÓXIMOS ÀS SUPERFÍCIES ESTÁTICAS COMO CHICANAS E PAREDES DO VASO DO REATOR.....   | 76 |
| <b>FIGURA 14:</b> CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR AO LONGO DOS CULTIVOS REALIZADOS NOS BIORREATORES MINIFORS2.....   | 77 |
| <b>FIGURA 15:</b> CURVAS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA E CONSUMO DE SACAROSE AO LONGO DOS CULTIVOS REALIZADOS NOS BIORREATORES MINIFORS2. ....  | 78 |
| <b>FIGURA 16:</b> COMPORTAMENTO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS AO LONGO DO CULTIVO EM BATELADA .....   | 79 |
| <b>FIGURA 17:</b> CURVAS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA E CONSUMO DE SACAROSE.....   | 81 |
| <b>FIGURA 18:</b> COMPORTAMENTO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS AO LONGO DO CULTIVO EM BATELADA DA LINHAGEM XCC_DEH UTILIZANDO BIORREATOR DE 6 L. ....  | 83 |
| <b>FIGURA 19:</b> CURVAS DE AJUSTE LINEAR AO LOGARITMO NATURAL DO CRESCIMENTO CELULAR PELO TEMPO NA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO, PARA OBTENÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{MAX}$ ) ..... | 85 |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 20:</b> CURVAS DE AJUSTE AO MODELO DE POTÊNCIAS, POSICIONADAS EM ORDEM CRESCENTE, APÓS ANÁLISES DE AMOSTRAS RETIRADAS DO CULTIVO DA LINHAGEM XCC_DEH NO BIORREATOR DE 6 L..... | 86 |
| <b>FIGURA 21:</b> CONJUNTO DE DADOS BRUTOS, CONTENDO RUÍDOS DEVIDO ÀS LIMITAÇÕES DE LEITURA DOS SENSORES, E OS MESMOS DADOS PÓS “LIMPEZA”.....   | 87 |
| <b>FIGURA 22:</b> DADOS EXPERIMENTAIS DOS 7 CULTIVOS REALIZADOS APÓS TRATAMENTO. ....  | 88 |
| <b>FIGURA 23:</b> CURVAS DO PROCESSO DE AJUSTE DA RNA. ....  | 90 |
| <b>FIGURA 24:</b> AJUSTE DAS CURVAS DE DADOS EXPERIMENTAIS AO MODELO CINÉTICO DESENVOLVIDO PARA OS CULTIVOS EM BATELADA. ....  | 92 |
| <b>FIGURA 25:</b> SIMULAÇÃO DA OPERAÇÃO NO PONTO ÓTIMO PARA O CULTIVO EM CSTR. ....  | 93 |
| <b>FIGURA 26:</b> RESULTADO DA ANÁLISE DE OPERABILIDADE DO SISTEMA. ....   | 96 |
| <b>FIGURA 27:</b> CURVAS DE EVOLUÇÃO DE BIOMASSA, PRODUTO E SUBSTRATO DURANTE CULTIVO CONTÍNUO EM CSTR. ....   | 87 |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABELA 1:</b> COMPOSIÇÕES PARA MEIOS DE CULTURA VISANDO A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA<br>OBTIDAS POR DIFERENTES ESTUDOS E TRABALHOS.....   | 35 |
| <b>TABELA 2:</b> ALGUNS DOS PRINCIPAIS MODELOS CINÉTICOS PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA<br>ABORDADOS NESSE TRABALHO EM SUA FORMA DIFERENCIAL. ....  | 42 |
| <b>TABELA 3:</b> VARIÁVEIS PARA O ESTUDO DE OPERABILIDADE. ....  | 71 |
| <b>TABELA 4:</b> ALGUNS PARÂMETROS OBTIDOS A PARTIR DOS CULTIVOS, .....  | 84 |
| <b>TABELA 5:</b> PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS APÓS AJUSTE DO MODELO. ....  | 91 |
| <b>TABELA 6:</b> SOLUÇÃO ÓTIMA (FMINCON NON-LINEAR SOLVER – MATLAB®):.....   | 93 |
| <b>TABELA 7:</b> DADOS COLETADOS DE PARÂMETROS DURANTE CULTIVO CONTÍNUO EXPERIMENTAL.....  | 98 |
| <br>   |    |
| <b>QUADRO 1:</b> CÓDIGO EM MATLAB® UTILIZADO PARA SIMULAÇÃO DO SISTEMA PARTINDO DE<br>UM CULTIVO EM BATELADA PARA UM CULTIVO EM CSTR .....   | 67 |
| <b>QUADRO 2:</b> CÓDIGO EM MATLAB® PARA CHAMADA DA FUNÇÃO DO SISTEMA 4X4<br>(ENTRADAS X SAÍDAS) RESPONSÁVEL POR SIMULAR O PROCESSO EM CSTR,<br>UTILIZADO NO ESTUDO DE OPERABILIDADE NO APLICATIVO OPERABILITY APP..... | 71 |



## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>A</b>                     | Parameter of Metzner-Otto's Equation (Eq.31)  |
| <b>AIS</b>                   | Available Input Set   |
| <b>AOS</b>                   | Available Output Set  |
| <b>b, f</b>                  | $K_{ia}$ Angular Constant (-)   |
| <b>C</b>                     | Constante de Inibição por Produto ( $L \cdot gP^{-1}$ )   |
| <b><math>C^*_{AL}</math></b> | Conc. de Gás em Equilíbrio na Interface Gás-Líquido ( $Mol \cdot L^{-1}$ )                        |
| <b>c, d, e</b>               | Constantes Padrão para Cálculo Do $K_{ia}$  |
| <b>g, h, i, j</b>            | Constantes Não-Newtonianas para Cálculo Do $K_{ia}$   |
| <b>D</b>                     | Taxa de Diluição ( $h^{-1}$ )   |
| <b>DIS</b>                   | Grupo de Entradas Desejado  |
| <b>DIS*</b>                  | Grupo de Entradas Desejado Factível   |
| <b>DOS</b>                   | Grupo de Saídas Desejado  |
| <b>DOS*</b>                  | Grupo de Saídas Desejado Factível   |
| <b><math>h_0</math></b>      | Hipótese Nula   |
| <b>H</b>                     | Constante de Henry ( $atm \cdot m^3 \cdot Kg^{-1}$ )  |
| <b>k</b>                     | Índice de Consistência ( $N \cdot s \cdot m^{-2}$ )   |
| <b><math>k_{La}</math></b>   | Coefficiente de Transferência de Massa ( $h^{-1}$ )   |
| <b><math>k_X</math></b>      | Taxa Máxima de Crescimento Específico ( $gN_2^{-1} \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ )                  |
| <b><math>k_P</math></b>      | Taxa Máxima Específica de Produção ( $gP \cdot gS^{-1} \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$ ) |
| <b><math>K_S</math></b>      | Constante de Saturação ( $g \cdot L^{-1}$ )   |
| <b><math>m_{O_2}</math></b>  | Coefficiente de Consumo de $O_2$ . ( $mol O_2 \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ )                       |
| <b><math>m_S</math></b>      | Coefficinete de Manutenção de Biomassa ( $gS \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$ )                        |
| <b>N</b>                     | Agitação ( $s^{-1}$ ) (rpm)   |
| <b><math>N_2</math></b>      | Concentração de Nitrogênio ( $g \cdot L^{-1}$ )   |
| <b><math>N_0</math></b>      | Concentração Inicial de Nitrogênio ( $g \cdot L^{-1}$ )   |
| <b>n</b>                     | Índice de Comportamento De Fluxo (-)  |
| <b>o</b>                     | Constante de Ajuste do Fator de Conversão de $O_2$ em Células (-)                                 |
| <b><math>O_2</math></b>      | Concentração de Oxigênio Dissolvido ( $mol \cdot L^{-1}$ ) (%)                                    |
| <b><math>O_2^*</math></b>    | Concentração de $O_2$ em Equilíbrio na Interface Gás-Líquido ( $mol \cdot L^{-1}$ )               |
| <b><math>P_{AG}</math></b>   | Pressão Parcial no Gás do Componente A (atm)  |
| <b><math>P_T</math></b>      | Pressão Total do Gás (atm)  |
| <b>P</b>                     | Concentração de Produto ( $g \cdot L^{-1}$ )  |
| <b>R</b>                     | Resistência a Transferência de Oxigênio ( $mol O_2 \cdot L^{-1} \cdot H^{-1}$ )                   |
| <b>S</b>                     | Concentração de Substrato ( $g \cdot L^{-1}$ )  |
| <b>T</b>                     | Temperatura ( $^{\circ}C$ )   |
| <b>t</b>                     | Tempo (h)   |
| <b>UDPG-deH</b>              | Difosfato de Uridina Glicose Desidrogenase  |
| <b>UDPG-PP</b>               | Difosfato de Uridina Glicose Pirofosforilase  |
| <b>V</b>                     | Volume (L)  |
| <b>X</b>                     | Concentração de Células ( $g \cdot L^{-1}$ )  |
| <b><math>X_0</math></b>      | Concentração Inicial de Células ( $g \cdot L^{-1}$ )  |
| <b>XCC</b>                   | <i>Xhantomonas Campestris</i> pv. <i>Campestris</i>   |
| <b><math>y_{AG}</math></b>   | Fração do Gás Referente ao Componente A ( - )   |

|               |  |
|---------------|--|
| $Y_{ij}$      | Fator de Conversão de 'j' em 'i' ( $g_i \cdot g_j^{-1}$ ) ( $mol_i \cdot g_j^{-1}$ ) |
| $\gamma$      | Taxa de Cisalhamento ( $s^{-1}$ )  |
| $\gamma_{av}$ | Taxa de Cisalhamento Efetiva ( $s^{-1}$ )  |
| $\mu$         | Taxa Específica de Crescimento ( $h^{-1}$ )  |
| $\mu_i$       | Taxa Específica de Evolução do Componente I ( $g_i \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$ )    |
| $\tau$        | Tensão de Cisalhamento ( $N \cdot m^{-2}$ )  |

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                      | <b>23</b> |
| 1.1. O problema da Viscosidade .....            | 25        |
| A Proposta.....                                 | 27        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                       | <b>29</b> |
| 2.1. Geral .....                                | 29        |
| 2.2. Específicos.....                           | 29        |
| <b>3. ESTADO DA ARTE .....</b>                  | <b>31</b> |
| 3.1. A Goma Xantana .....                       | 31        |
| 3.2. Melhoramento Genético .....                | 33        |
| 3.3. Produção da Goma Xantana .....             | 34        |
| 3.4. Modelagem Cinética.....                    | 39        |
| 3.5. Cultivo Contínuo .....                     | 45        |
| 3.6. Operabilidade .....                        | 47        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>             | <b>51</b> |
| 4.1. Cultivos .....                             | 52        |
| 4.2. Métodos analíticos .....                   | 53        |
| 4.2.1. Acompanhamento da reologia do meio ..... | 55        |
| 4.3. Desenvolvimento do Modelo Cinético .....   | 59        |
| 4.3.1. Batelada .....                           | 59        |
| 4.3.2. Ajuste dos parâmetros ao modelo .....    | 63        |
| 4.3.3. CSTR .....                               | 65        |
| 4.4. Análises de Operabilidade .....            | 70        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>           | <b>75</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5.1. Cultivos em reator de 1 L</b> .....  | <b>76</b>  |
| <b>5.2. Cultivos no reator de 6 L</b> .....  | <b>80</b>  |
| <b>5.3. Modelagem Cinética</b> .....   | <b>83</b>  |
| 5.3.1. Parâmetros Gerais: $\mu_{\text{máx}}$ , fatores de conversão, entre outros ... .. | 84         |
| 5.3.2. Tratamento dos Dados .....  | 86         |
| 5.3.3. Ajuste do Modelo .....  | 88         |
| <b>5.4. Análise do Sistema Proposto</b> .....  | <b>93</b>  |
| 5.4.1. Simulação CSTR .....  | 93         |
| 5.4.2. Resultados de Operabilidade .....   | 94         |
| 5.4.3. Cultivo Contínuo de Validação .....   | 97         |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....   | <b>99</b>  |
| <b>7. TRABALHOS FUTUROS</b> .....  | <b>101</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>103</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

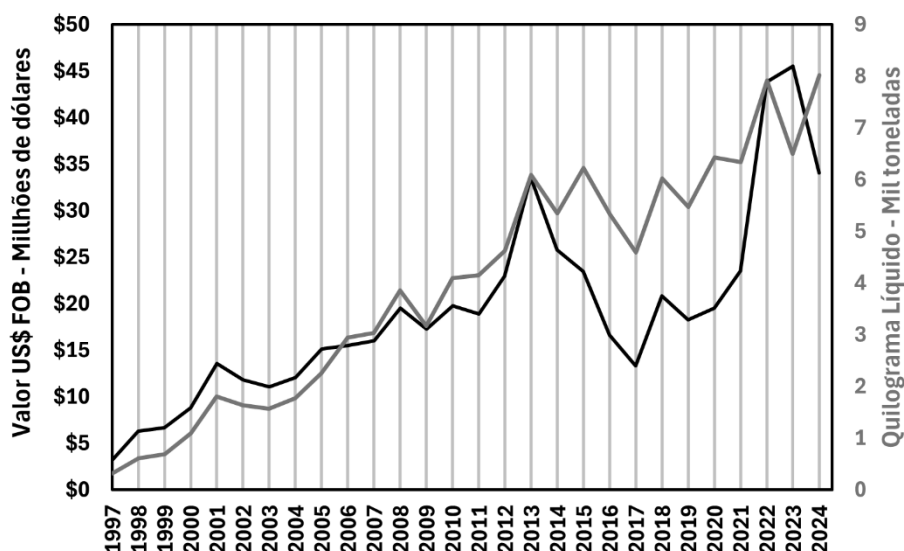
O uso de proteobactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas* para produção de biopolímeros para uso industrial data dos anos sessenta quando seu bioproduto natural, um exopolissacarídeo chamado goma xantana, foi aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011). A preocupação com a biossegurança da goma vem do fato desse gênero de bactéria composto por 20 espécies, ser patógeno a diversos grupos de plantas (fitopatogênico), sendo um problema em plantações como de arroz e plantas cítricas. Informações obtidas de uma ampla gama de dados genômicos disponíveis sugerem que a produção de goma provavelmente é realizada por todas suas espécies. A comparação entre diferentes linhagens de *Xanthomonas campestris* e diferentes espécies de *Xanthomonas* realizada por Vorhölter *et al.* (2008), demonstrou conservação dos genes da síntese da goma xantana. Recentemente, uma reavaliação positiva da goma xantana como aditivo alimentar foi relatada no *Panel about Food Additives and Nutrient Sources added to Food* (ANS) pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (MORTENSEN *et al.*, 2017).

A goma xantana, que possui a função de retenção de nutrientes e de movimentação das bactérias pelas folhas das plantas (OTOBONI, 2007), se tornou um produto cobiçado devido às propriedades reológicas que conferem às soluções aquosas, como alta viscosidade e estabilidade mesmo em uma larga faixa de temperatura e pH (GARCÍA-OCHOA, SANTOS e ALCÓN, 1995; GHOURASSI-BARR e ALIOUCHE, 2016; ROSALAM e ENGLAND, 2006). Esse biopolímero, além da sua utilização na indústria alimentícia, possui outros diversos usos. Na indústria farmacêutica é utilizado como agente suspensor, estabilizante e/ou emulsificante (JANI *et al.*, 2009). Na indústria petrolífera, é empregado especialmente em reservatórios que apresentam lençóis freáticos com altas concentrações de cloreto de sódio e íons divalentes (GHOURASSI-BARR e ALIOUCHE, 2016). Em produtos agropecuários é empregado para uniformizar a suspensão de fungicidas, herbicidas e inseticidas. Sua utilização é de especial importância em formulações baseadas em água, mais seguras e limpas que composições granuladas (ELSHAFEI *et al.*, 2010).

É também empregado como espessante em diversos produtos, incluindo produtos de limpeza e ácidos para remoção de ferrugem e tintas (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

No mercado mundial, a goma xantana movimentava centenas de milhões de dólares anuais de acordo com relatórios de diferentes empresas de consultoria, e as previsões de mercado são promissoras, com crescimento por volta dos 5% CAGR (*Compound annual growth rate*) e atingindo a casa dos bilhões de dólares nos próximos anos, sendo a principal fatia desse mercado pertencente a Ásia-Pacífico, e com um crescimento emergente nos últimos anos pela América do Norte (SPHERICAL INSIGHTS, 2023; VERIFIED MARKET REPORTS, 2025; DATA BRIDGE, 2024; MORDOR INTELLIGENCE, 2024).

O Brasil, por sua vez, enfrenta uma balança comercial totalmente desfavorável em relação a este item, uma vez que não produz o polímero comercialmente, mas somente para fins de pesquisa. Segundo dados disponibilizados pela plataforma *Online Comex Stat*, fornecida pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços (MDIC, 2025), desde o ano de 2008 as importações desse produto estão em torno dos 20 milhões de dólares anuais, sendo que esse valor mais do que dobrou em 2022 (Figura 1).



**Figura 1:** Importações brasileiras de goma xantana em milhões de dólares (US\$ FOB) e em massa quilograma líquido entre os anos de 1997 e 2024. Apesar da queda observada dos valores de importação em dólar entre os anos de 2014 e 2021, isso se refletiu da mesma forma nas quantidades reais importadas, vide valores em massa, se tratando apenas de uma leve desaceleração e a uma momentânea queda no valor internacional de mercado do produto. Fonte: Dados da plataforma COMEX STAT (MDIC, 2025).

Com o intuito de contribuir com a melhora do atual cenário nacional, células de *Xanthomonas campestris pv. campestris* (chamada aqui de Xcc) foram modificadas geneticamente em trabalho anterior do grupo de pesquisa no DEQ/UFSCar (OLIVEIRA et al., 2025), buscando a obtenção de linhagens aprimoradas para a produção da goma. Após resultados obtidos de produtividade volumétrica (Pr) atingirem aumento aproximado de 50% em relação à linhagem parental, a modificação rendeu o depósito de Patente de Inovação com número de registro BR10202200773 no INPI. A citada invenção apresentada para proteção da propriedade intelectual se difere das outras 24 patentes encontradas no levantamento realizado na plataforma *Online* do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI, 2025) que envolvem o bioproduto, onde o foco eram métodos produtivos, principalmente levando em consideração diferentes fontes de carbono, e não linhagens otimizadas para produção.

### **1.1. O problema da Viscosidade**

Um dos grandes percalços enfrentados na produção da goma xantana é a alta viscosidade atingida pelo caldo de cultivo, e conseqüentemente a grande dificuldade de aeração (FARIA et al., 2010; GARCÍA-OCHOA et al., 2000b; LETISSE; LINDLEY; ROUX, 2003; SERRANO-CARREÓN et al., 1998; ZABOT et al., 2011). Esses desafios são intensificados em cultivos em batelada e batelada alimentada, pois o aumento da viscosidade do meio diminui a turbulência dentro da dorna e aumenta a energia gasta na agitação do sistema. A viscosidade oferece resistência ao fluxo, e seu aumento favorece o escoamento laminar em detrimento ao turbulento - que seria ideal para melhor homogeneizar o meio (BIRD, 2002). Dessa forma, torna-se necessária uma agitação mais vigorosa para gerar a turbulência requerida e promover a transferência de massa das moléculas de oxigênio pela interface gás-líquido da bolha de ar para as células (BAILEY, 1986).

O estudo de Amanullah; Tuttiett; Nienow (1998) mostrou que a oxigenação está diretamente ligada à produção de goma. Deste modo, pesquisas sobre a taxa de transferência de oxigênio (OTR) nesse processo são de grande interesse. Resultados de produção variam largamente de acordo com condições e parâmetros de cultivo.

Sendo assim, autores geralmente tem como objetivo avaliar tipos de agitadores, impelidores, taxas de aeração, oxigênio dissolvido e velocidades de agitação (AMANULLAH; SATTI; NIENOW, 1998; AMANULLAH; TUTTIETT; NIENOW, 1998). Segundo Amanullah *et al.* (1996), a aeração deve estar entre 10 e 15% da saturação.

A estratégia convencional de controle do fornecimento de oxigênio em reatores do tipo tanque agitado é baseada na medida da concentração do oxigênio dissolvido (COD), na manipulação da velocidade de rotação do impelidor e da vazão de ar e/ou oxigênio. Normalmente, os sistemas de monitoramento de biorreatores já vêm equipados com um controlador PID (Proporcional-Integral-Derivativo), com parâmetros ajustáveis para essa finalidade (ALFORD, 2006; DIAZ *et al.*, 1995). Entretanto, existe uma limitação inerente a esse método que está relacionada às condições biológicas e reológicas da operação que podem afetar a dinâmica do processo e, em determinados casos, mesmo em condições máximas de aeração e agitação o sistema pode não suprir a demanda de oxigênio ou apresentar instabilidade nas variáveis, tanto nas manipuladas quanto na controlada (KUPRIJANOV *et al.*, 2009).

Embora a questão do controle da COD em cultivos aeróbios esteja bem estabelecida, à medida que as limitações dos controladores convencionais vêm sendo destacadas em condições mais extremas, novas estratégias são necessárias para apoiar a capacidade do sistema de cumprir com as condições propostas. O modelo tradicional de produção de goma xantana por cultivos em batelada tende a atingir altas concentrações de produto dentro da dorna, elevando a viscosidade e o problema de oxigenação, expondo assim, as limitações do sistema para esse processo. No sentido de avançar esta fronteira tecnológica, se faz necessário o estudo de estratégias alternativas para contornar o problema sem perder produtividade.

Após o trabalho de melhoria da linhagem de XCC desenvolvido anteriormente em Oliveira, *et al.* (2025) voltado para o aumento metabólico da taxa de produção de goma xantana, o próximo passo de otimização deste bioprocessos é encontrar um sistema produtivo capaz de contornar mais eficientemente a dificuldade de oxigenação do caldo de cultivo. Alguns poucos estudos foram publicados avaliando a produção em modo contínuo (discutidos mais à frente), que demonstraram a possibilidade da manutenção da concentração de produto durante o processo, logo

mantendo fixa a viscosidade, uma estratégia ainda pouco explorada com baixo número de estudos publicados. Com o controle da viscosidade é possível evitar a formação das indesejadas regiões de aglomeração de goma e baixa transferência de massa, permitindo uma melhor homogeneização do meio. E na direção de um processo produtivo eficiente, considerando já a utilização de uma linhagem de *Xanthomonas* de produtividade biológica aumentada, o aproveitamento dessa taxa produtiva, removendo de modo constante o produto gerado, se torna uma hipótese promissora.

### *A Proposta*

Nesse enfoque, este trabalho desenvolve um modelo cinético híbrido, com apoio de uma rede neural para acompanhamento da reologia do meio, que suporta um sistema produtivo com controle de viscosidade pela manutenção da concentração de produto. O sistema se dá através do controle das taxas de entrada e saída de um CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*), onde as variáveis manipuladas são taxa de diluição, porcentagem de oxigênio na vazão de gases de entrada (através da mistura de ar atmosférico e oxigênio puro), velocidade de agitação e concentração de substrato na alimentação, focando no controle das concentrações de biomassa, produto, e substrato, além do oxigênio dissolvido. Para validação do sistema, o trabalho conta com estudo para a avaliação da capacidade de operá-lo (Operabilidade) dentro da região definida pelos limites disponíveis de atuação das variáveis manipuladas, indicando a viabilidade prática do sistema. O conceito de otimização de “Operabilidade do Processo” se refere a uma ferramenta computacional de análise que visa trazer uma melhor compreensão das regiões operacionais viáveis de um processo durante a fase de projeto (CARRASCO e LIMA, 2017; GAZZANEO et al., 2020). Tais regiões circundam um ponto ótimo de operação encontrado após uma otimização do sistema não linear de equações, e obedecem às definições de limites operacionais para as variáveis controladas. Ter um panorama geral de limites de operação viáveis e otimizados para obedecer a um conjunto de parâmetros de saída constitui uma vantagem tecnológica para aumento da eficiência da produção. Por fim, os resultados experimentais em conjunto com estudos de operabilidade norteiam as

simulações *in silico* do modelo desenvolvido para o processo, para que pontos ótimos das variáveis passíveis de controle sejam encontrados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Otimizar a produção de goma xantana por *Xanthomonas* ssp. a partir do desenvolvimento de um sistema de cultivo via CSTR, visando aprimorar a transferência de oxigênio com base em ferramentas computacionais e modelagem do processo, utilizando como estudo de caso a produção de goma xantana por linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris*.

### 2.2. Específicos

- Avaliar experimentalmente o comportamento e produtividade de goma xantana em cultivos em batelada em biorreator da linhagem otimizada de Xcc obtida por Oliveira, *et al.* (2025);
- Realizar a modelagem cinética do processo de produção da goma xantana em batelada e ajustar o modelo aos dados experimentais; depois de validado, adaptar o modelo para simular um processo de cultivo contínuo;
- Desenvolver a ferramenta computacional de Análise de Operabilidade, e com ela produzir uma avaliação de operabilidade do processo para encontrar um modelo de controle capaz de manter o *setpoint* desejado para a concentração de oxigênio dissolvido (COD);
- Realizar as validações experimentais do processo adquirido para confirmação do efeito positivo da otimização na produtividade e eficiência na produção de goma xantana.

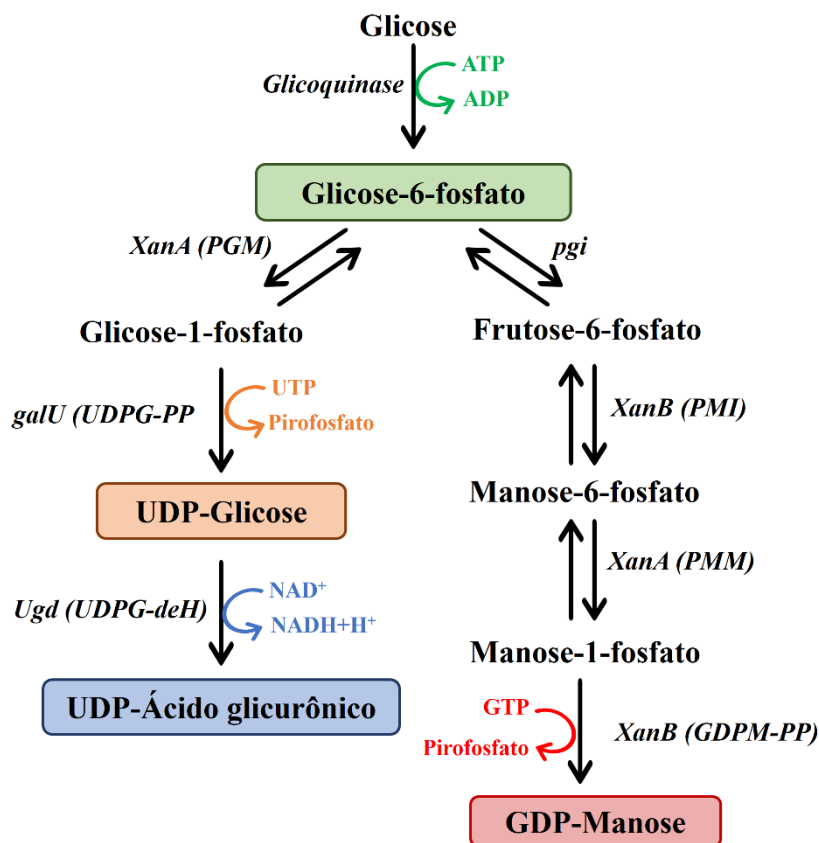


### 3. ESTADO DA ARTE

#### 3.1. A Goma Xantana

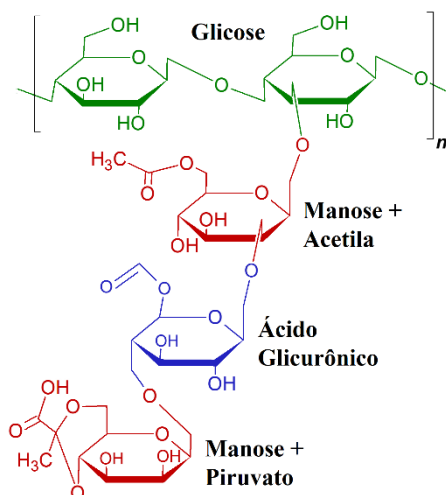
A goma xantana, ou polissacarídeo B-1459, foi descoberta no final dos anos 1950 por cientistas do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) nos Estados Unidos da América (ROSALAM e ENGLAND, 2006; BORGES; VENDRUSCOLO, 2008). Foi extraída pela primeira vez a partir da bactéria do repolho, ou *Xanthomonas campestris*, cujas colônias são geralmente lisas, viscosas e amareladas, devido ao pigmento xantomonadinas (BRADBURY, 1984). Ela forma soluções pseudoplásticas, com alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento, se mantendo estável em pH variando de 2 a 11, em altas concentrações de sais, como até 150 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, e em temperaturas até 90°C. Para uso em alimentos, não é necessário o uso de altas concentrações do produto para se atingir as propriedades desejadas, característica importante para não afetar o sabor final. A goma possui boa reprodutibilidade química e é de fácil produção, todas essas características somadas a permitiu se tornar um dos produtos mais desejados dentre as gomas naturais (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000b; ROSALAM e ENGLAND, 2006, BORGES; VENDRUSCOLO, 2008).

A goma é sintetizada com base em nucleotídeos de açúcar citoplasmático, acetil-CoA e fosfoenolpiruvato através de uma membrana de poliisopropenol fosfato como acceptor (LELPI *et al.*, 1983, p. 145apud BECKER *et al.*, 1998). A síntese dos açúcares precursores Difosfato de uridina-Glicose (UDP-Glc), UDP-Ácido Glicurônico (UDP-GlcA) e Difosfato de guanossina-Manose (GDP- Man) ocorre a partir de uma via alternativa de metabolismo da Glicose-6-Fosfato através de reações catalisadas por cinco enzimas (BECKER *et al.*, 1998). Duas delas, XanA e XanB, apresentam atividade bifuncional e são transcritas conjuntamente (KOPLIN *et al.*, 1992). A Figura 2 esquematiza os passos da via.



**Figura 2:** Representação esquemática da síntese dos açúcares precursores. PGI: Fosfoglicose isomerase; PMI: Fosfomanose isomerase; PMM: Fosfomanose mutase; PGM: Fosfoglicose mutase; UDPG-PP: UDP-Glicose pirofosforilase; UDPG-deH: UDP-Glicose desidrogenase; GDPM-PP: GDP-Manose pirofosforilase. Os três precursores são sintetizados a partir de Glicose-6-fosfato. Os cofatores UTP, GTP e  $NAD^+$  são necessários. Das sete reações enzimáticas, quatro são controladas pelas enzimas bifuncionais XanA e XanB (Fonte: KUNDLATSCH 2017).

A goma xantana possui uma estrutura pentassacarídica composta pelos açúcares precursores sintetizados na via ilustrada na Figura 2. É formada por uma cadeia de  $\beta$ -D-Glicose ligada a ramificações compostas de três moléculas, uma  $\alpha$ -D-Manose, seguida de um  $\beta$ -D-Ácido Glicurônico, terminando em uma  $\beta$ -D-Manose, intermitentemente ligadas a um Grupo Acetil e um Ácido Pirúvico, como mostra a Figura 3 abaixo:



**Figura 3:** Unidade de repetição estrutural da goma xantana. Fonte: Acervo pessoal.

### 3.2. Melhoramento Genético

Existem poucos estudos relatando os efeitos dos genes envolvidos na biossíntese dos monômeros da goma para a produção de goma xantana. Lin *et al.* (1995) e Wei *et al.* (1996) avaliaram cepas mutantes que não expressavam os genes *galU* e *ugd*, respectivamente, e Koplín *et al.* (1992) avaliaram uma cepa mutante superexpressando os genes *xanA* e *xanB*. Por outro lado, treze outros estudos foram relatados envolvendo todos os genes de polimerização da goma para melhoria da produção, dez deles com modificações de cepas (HASSLER; DOHERTY, 1990; KATZEN *et al.*, 1998, 1996; KEMP *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 1998, 1996; KEMP *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2016; TSENG *et al.*, 1992; VOJNOV *et al.*, 2001, 1998) e três usando outros métodos de avaliação (CHOU *et al.*, 1997; HAHN *et al.*, 2022; YOON; CHO, 2007). Há também relatos sobre genes não diretamente relacionados à biossíntese de xantana (EKATERINIADOU *et al.*, 1994; FICARRA *et al.*, 2017; JANG *et al.*, 2012; STEFFENS *et al.*, 2022, 2016). Além disso, estudos usando evolução adaptativa foram relatados para alcançar características físico-químicas desejáveis para a goma (DAI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016 b; YANG *et al.*, 2002).

Um total de cinco patentes sobre cepas modificadas para produção de goma xantana foram relatadas, com nocautes para os genes XC\_1672 e XC\_0819 [respectivos números de patente CN109554378(A) e CN1623998(A)],

superexpressão dos principais genes de goma (EP233019-A2), genoma modificação [KR2010008715(A)], mutação do gene *wxoD* e inserção do gene *rmd* [CN1952155(A)].

Wu *et al.* (2019) alteraram as propriedades físico-químicas da goma através de linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155, buscando uma goma mais viscosa para utilização na indústria de alimentos. Para isso, as terminações das ramificações formadas na estrutura da goma passaram a ter ligações apenas com piruvato, através da deleção dos genes *gumF* e *gumG* e da superexpressão do gene *gumL*. Os resultados obtidos, segundo os autores, foram satisfatórios, com a nova goma apresentando melhores características que a goma natural. Dai *et al.* (2019) construíram uma linhagem de *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155 deficiente em *xanthomonadin* (pigmento amarelo) capaz de produzir uma goma xantana branca que exige menor volume de álcool para sua extração, reduzindo a proporção original de 7:1 para 3:1 (etanol:caldo fermentado). Para isso, o gene *vgb* (de *Vitreoscilla globin*), sob controle do promotor *LacZ*, foi inserido na região do gene *pigA*, inativando-o, e auxiliando, com a expressão da proteína *VHb* (que pode aumentar o metabolismo da *Xanthomonas campestris*) a não haver perda na produção da goma pela inativação do gene *pigA*.

Oliveira, *et al.* (2025) desenvolveram uma linhagem de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* transformada com o vetor de expressão carregando o gene *ugd* para a superexpressão da enzima UDPG-deH. A reação realizada por esta enzima foi considerada como gargalo da via de biossíntese do monômero ácido glicurônico por meio de simulação computacional baseada em um modelo matemático determinístico. Esta superexpressão foi suficiente para que Oliveira, *et al.* (2025) alcançasse por volta de 50% a mais de produtividade de goma xantana. Uma patente de categoria Privilégio de Inovação com número de registro BR10202200773 foi concedida pelo INPI.

### 3.3. Produção da Goma Xantana

Muitos estudos exploram a relação entre a produção do biopolímero com a composição do meio de cultivo. São diversos tipos de fontes de carbono utilizadas, como os mais comuns sendo glicerol, sacarose e glicose, mas em sua maioria os

complexos, podendo citar exemplos de meios alternativos de baixo custo como produtos e resíduos agroindustriais: cana-de-açúcar, mandioca, batata, suco de uva, palha de arroz, proteína Whey (derivado de laticínios), entre outros. No entanto, fontes de nitrogênio e demais sais importantes ao ciclo metabólico são também considerados, como magnésio, cálcio, potássio e ferro. Dentre as fontes de nitrogênio mais comuns provenientes de meios complexos que podemos citar temos extrato de levedura, extrato de malte, peptona, triptona. Alguns estudos chegaram a composições por eles consideradas ideais ao cultivo, como os listados na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1:** Composições para meios de cultura visando a produção de goma xantana obtidas por diferentes estudos e trabalhos

| Reagente   | Concentração (g.L <sup>-1</sup> ) |                             |                 |                     |                      |                            |                           |                        |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|
|  | Haynes et al. (1955) (YM)         | Cadmus et al. (1978) (YM-T) | Davidson (1978) | Sou e Demain (1979) | Peters et al. (1989) | García-Ochoa et al. (1992) | Vendruscolo et al. (2000) | Oliveira et al. (2025) |
| Sacarose   | -                                 | -                           | -               | 40                  | -                    | 40                         | 50                        | 35                     |
| Glicose  | 10                                | 12                          | 20              | -                   | 55                   | -                          | -                         | -                      |
| Ext. Levedura                                    | 3                                 | 1,5                         | -               | -                   | -                    | -                          | -                         | 4                      |
| Ext. Malte                                       | 3                                 | 1,5                         | -               | -                   | -                    | -                          | -                         | 4                      |
| Peptona  | 5                                 | 2,5                         | -               | -                   | -                    | -                          | -                         | 4                      |
| Ácido Cítrico                                    | -                                 | -                           | 2,1             | 2,1                 | 2,3*                 | 2,1                        | -                         | -                      |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                  | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | 1,144                      | -                         | -                      |
| NH <sub>4</sub> Cl                               | -                                 | -                           | 5               | 5                   | 2                    | -                          | -                         | -                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | -                                 | 1,5                         | -               | -                   | -                    | -                          | 1,5                       | -                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | -                          | 2                         | -                      |
| Glutamato  | -                                 | -                           | -               | 2,2                 | -                    | -                          | -                         | -                      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | -                                 | 2,5                         | -               | -                   | -                    | -                          | 2,5                       | 5,27                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                  | -                                 | -                           | -               | -                   | 5                    | 2,866                      | 5                         | 2,81                   |
| MgCl <sub>2</sub>                                | -                                 | -                           | -               | -                   | 0,163*               | 0,507*                     | -                         | -                      |
| MgSO <sub>4</sub>                                | -                                 | 0,05                        | 0,2*            | 0,2*                | -                    | -                          | 0,3                       | 2*                     |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                  | -                                 | -                           | 1,5*            | 1,5*                | 0,114                | 0,089                      | -                         | -                      |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                  | -                                 | -                           | -               | -                   | 0,5                  | -                          | -                         | -                      |
| NaCl   | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | -                          | -                         | 1                      |
| CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O-Ureia           | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | -                          | -                         | 0,4                    |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                   | -                                 | -                           | 0,006           | 0,006               | 0,006                | 0,006                      | 0,006                     | -                      |
| ZnO  | -                                 | -                           | 0,004           | 0,004               | -                    | 0,006                      | -                         | -                      |
| ZnCl <sub>2</sub>                                | -                                 | -                           | -               | -                   | 0,0067               | -                          | -                         | -                      |
| ZnSO <sub>4</sub>                                | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | -                          | 0,002                     | -                      |
| FeCl <sub>3</sub>                                | -                                 | -                           | 0,0024*         | 0,0024*             | 0,0014               | 0,02*                      | 0,0024                    | -                      |
| FeSO <sub>4</sub>                                | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | -                          | -                         | 0,002                  |
| CaCO <sub>3</sub>                                | -                                 | -                           | 0,02            | 0,02                | -                    | 0,02                       | -                         | -                      |
| CaCl <sub>2</sub>                                | -                                 | -                           | -               | -                   | 0,012*               | -                          | 0,002*                    | -                      |
| HCl  | -                                 | -                           | 0,13 mL         | 0,13 mL             | -                    | 0,13 mL                    | -                         | -                      |
| NaOH   | -                                 | -                           | -               | -                   | -                    | Até pH 7,0                 | -                         | -                      |

\* Massa para reagente hidratado.

Um exemplo desses estudos sobre composição do meio de cultivo testou a substituição da fonte de carbono (sacarose) por melaço de cana-de-açúcar, que

obteve os melhores resultados segundo conclusões obtidas por Luvielmo e Scamparini (2009). Estes autores alcançaram concentrações de  $70 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto Brandão *et al.* (2008) obtiveram dez vezes mais produção com caldo de cana ( $33,54 \text{ g.L}^{-1}$ ) em comparação com a sacarose ( $3,45 \text{ g.L}^{-1}$ ). Os valores relatados são superiores à média das produções encontradas na literatura que variam entre 10 e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Outro exemplo, foi o estudo de Savvides *et al.* (2012) utilizando Whey como meio complexo de cultura alcançando o resultado de  $28 \text{ g.L}^{-1}$  com o meio hidrolisado. Estudos como esses visam ao reaproveitamento de resíduos através de uma destinação economicamente viável na produção de outros compostos.

Dentre as fontes de carbono mais comuns a sacarose se destaca, possibilitando alcançar maiores valores de produção de goma quando comparada à glicose e lactose, por exemplo (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Na literatura são relatados normalmente cultivos em biorreator de bancada em modo batelada simples, porém, para Amanullah, Satti e Nienow (1998) a estratégia de produção em batelada alimentada é uma opção que se destaca pela possibilidade de adição intermitente de substrato (mais especificamente fonte de carbono), mantendo a concentração entre 30 e  $40 \text{ g/L}$ , com fluxo de alimentação com concentração de  $10 \text{ g/L}$ , prevenindo a inibição do crescimento e de produção da goma.

Alkhateeb *et al.* (2018); Harding *et al.* (1995); Vojnov *et al.*, (2001), apontaram que o nitrogênio disponível no meio influencia negativamente a produção do exopolissacarídeo, como ocorre em espécies similares de bactérias e leveduras, sendo a maior taxa de produção de goma por células de *Xanthomonas campestris pv. campestris* atingida no momento de baixa desse nutriente, que vem acompanhada da fase estacionária de crescimento celular. Alkhateeb *et al.* (2018) completam que não há na literatura, até a data do estudo, análises detalhadas do mecanismo genético regulatório por trás dessa diferença entre as fases de crescimento na biossíntese da goma. Contudo, como foi descrito acima, a goma xantana possui utilidade na retenção de nutrientes (OTOBONI, 2007), sendo possível que esse seja um dos fatores a contribuir com esse efeito observado.

Outras condições de cultivo também já foram estudadas e avaliadas. Segundo Luvielmo e Scamparini (2009) a temperatura ótima de crescimento de bactérias do

gênero *Xanthomonas* fica entre 28 e 30°C, e o pH entre 6 e 8, tratando-se, portanto, de condições de cultivo facilmente controladas. Estudos de agitação e aeração durante o cultivo em biorreatores demonstram que resultados de produção variam largamente de acordo com essas condições e parâmetros. Nesses casos, os autores geralmente têm como objetivo avaliar tipos de agitadores mecânicos, impelidores, taxas de oxigenação e aeração (0,2 até 2 vvm), oxigênio dissolvido e velocidades de agitação (100 até 800 rpm), sempre buscando condições ótimas de produção (AMANULLAH et al., 1998; AMANULLAH; TUTTIETT; NIENOW, 1998; SRIRAM et al., 1998).

Para Sriram et al. (1998) a agitação deve chegar a valores próximos a 600 rpm no biorreator agitado com turbinas do tipo Rushton. No estudo realizado por Amanullah et al. (1998), o impelidor do tipo Scaba 6SRGT apresentou melhor produtividade e o do tipo Prochem Maxflo T apresentou melhor eficiência energética quando comparados ao Rushton. Quanto aos valores de aeração no biorreator alguns estudos sugerem que devem ser mantidos entre 1 a 1,5 vvm (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008b; DAI et al., 2019), com 10 a 15% de saturação (AMANULLAH et al., 1996). Até estudos envolvendo a adição de oxigênio em fase líquida foram testados, como no trabalho de Rao, Suresh e Suraishkumar (2003) utilizando um pré-tratamento com hidroxila de HOCl seguindo o cultivo com pulsos de adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, onde conseguiu-se alcançar uma correlação entre a suplementação e a produção da goma.

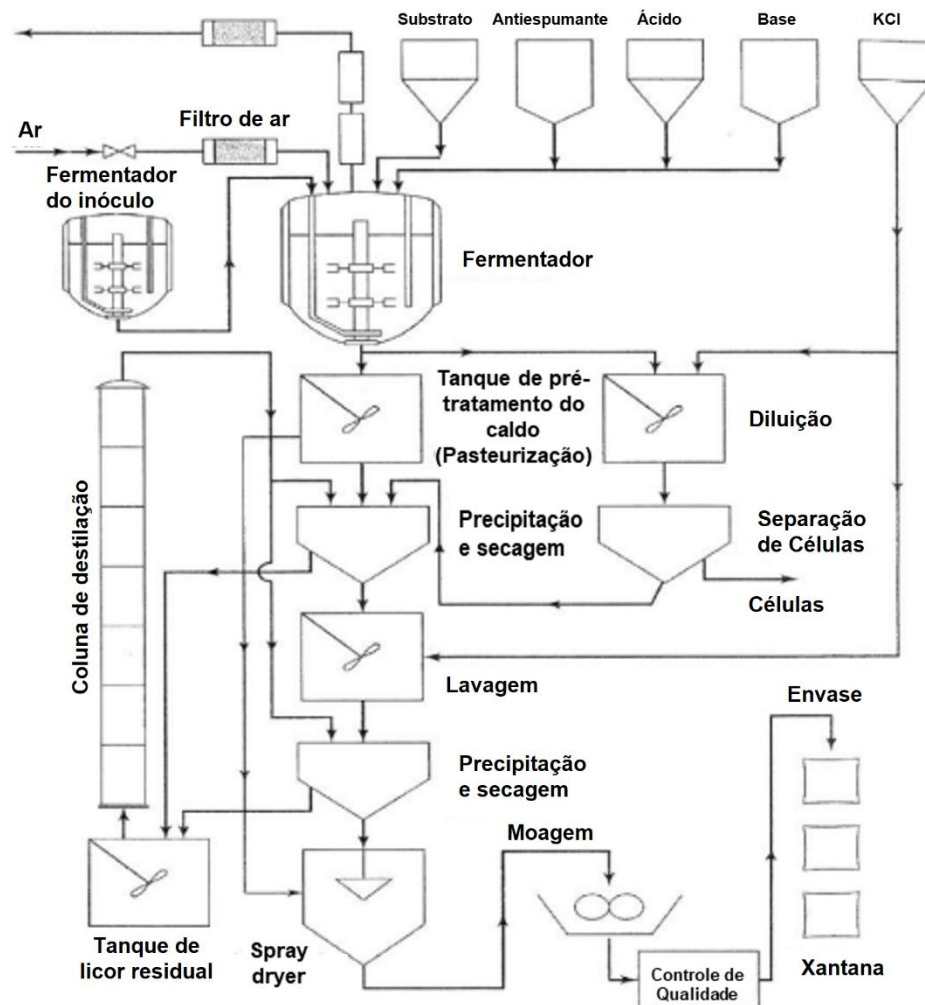
Alguns trabalhos mais recentes focaram na otimização das condições de cultivo da goma xantana. Psomas, Liakopoulou-Kyriakides e Kyriakidis (2007), Ghashghaei, Soudi e Hoseinkhani (2016), Zakeri, Pazouki e Vossoughi (2017), e Mohsin et al. (2018), utilizaram técnicas de otimização estatística como *response surface methodology* (RSM) ou metodologia de superfície de resposta. Ghashghaei, Soudi e Hoseinkhani (2016) utilizaram o método de *Plackett-Burman Design* (PBD), para auxiliar na determinação dos fatores significantes que afetam a produção e viscosidade, além de utilizar concentrado de suco de uva como fonte de carbono. Zakeri, Pazouki e Vossoughi (2017) focaram o estudo na taxa de agitação, fonte de carbono e temperatura. Mohsin et. al (2018), em uma abordagem utilizando um

modelo cinético baseado no modelo de Luedeking-Piret, focaram na produção utilizando a casca de laranja como fonte de carbono.

De acordo com revisão realizada por Rosalam et al. (2006), a maioria das indústrias utilizam glicose ou açúcares invertidos para produção da goma ao invés de polissacarídeos, e possuem preferência pelo cultivo em batelada em relação ao contínuo. Bhat et al. (2022) em sua revisão cita a sacarose como sendo tão utilizada quanto a glicose.

Ainda segundo Rosalam et al. (2006), o processo de produção em geral envolve as etapas listadas abaixo e representadas pela Figura 4:

1. Inóculo é preparado de maneira convencional em reator de tanque agitado, sendo necessário passar por várias etapas para que a partir de 10 L atinja os aproximadamente 100 m<sup>3</sup> do estágio de produção (fase no qual o volume usualmente é aumentado em 10 vezes);
2. O processo fermentativo principal é mantido por aproximadamente 100 horas, convertendo aproximadamente 50% do substrato em produto;
3. O procedimento de *downstream* pode começar com a pasteurização para esterilização e desnaturação de enzimas;
4. A precipitação da goma é realizada com grandes quantidades de álcool (A proporção caldo:álcool e o álcool utilizado são definidos no processo de cada fabricante);
5. Quando a separação das células é necessária, é realizada por centrifugação, que pode ser precedida por um processo de diluição, mas que adiciona um custo elevado. Normalmente é utilizado sal (KCl) para facilitar a precipitação através da criação de um efeito de carga reversa;
6. A goma xantana sólida-úmida passa então por processo de desidratação e lavagens em água/KCl para remoção de partículas e contaminantes. O álcool utilizado nas precipitações é sempre recuperado em uma coluna de destilação para reutilização.
7. O precipitado é seco pelo método de *Spray-dryer* em secadoras em processo de batelada ou contínuo;
8. Por fim, a goma seca é moída para o tamanho de *mesh* desejado.



**Figura 4:** Fluxograma da produção industrial de goma xantana utilizando um reator de tanque agitado convencional. Adaptado de Rosalam e England et al. (2006).

As revisões realizadas nos anos seguintes por Palaniraj e Jayaraman (2011) e por Bhat et al. (2022) não acrescentaram nenhuma nova etapa e/ou procedimento ao já reportado por Rosalam et al. (2006).

### 3.4. Modelagem Cinética

Muitos autores já publicaram trabalhos buscando a modelagem cinética da produção da goma xantana, explorando tanto modelos não estruturados quanto os complexos modelos estruturados (FARIA et al, 2010). Quando tratamos dos modelos mais abundantes, falamos dos modelos não-estruturados, uma vez que conseguem atingir uma boa aproximação com os dados experimentais e de uma forma muito mais simplificada. A abordagem mais comum desses modelos para descrever a dinâmica do comportamento da biomassa em um cultivo batelada emprega o modelo de Monod

ou a equação logística de crescimento populacional (Modelo Verhulst), enquanto para a descrição da produção de goma e do consumo de carbono são utilizadas as relações de Luedeking-Piret por Chen e Hashimoto (1980) (CACIK, DONDO e MARQUÉS, 2001). As equações diferenciais dos principais modelos não-estruturados encontrados na literatura, e citados no texto abaixo, estão dispostas na Tabela 2.

O primeiro modelo cinético não-estruturado encontrado para esta revisão envolvendo o cultivo de *Xanthomonas* visando à produção da goma xantana, foi o de Moraine e Rogovin (1971), porém houve estudos prévios a este, uma vez que Silman e Rogovin (1970) já citam estudos cinéticos que haviam sido realizados na década de 60. Moraine e Rogovin (1971) desenvolveram um modelo com crescimento celular e produção de goma baseado no modelo de Monod, onde são limitados pelas fontes de nitrogênio e carbono respectivamente, e tendo a cinética desses substratos dada por coeficientes estequiométricos. Dentre os modelos não-estruturados, o Modelo de Weiss e Ollis (1980) é o mais amplamente utilizado (FARIA *et al.*, 2010), onde o crescimento celular é expresso pela equação logística, e a formação de produto e consumo de substrato baseadas nas equações de Luedeking-Piret. Weiss e Ollis (1980) mantiveram a relação para o consumo de nitrogênio do trabalho de Moraine e Rogovin (1971) (Tabela 2 – Eq. 4).

Alguns anos seguintes, Quinlan (1986) utilizando das mesmas relações para consumo de nitrogênio e carbono (Tabela 2 – Eq. 2) de Weiss e Ollis (1980), introduziu outras equações para biomassa e produto. Pinches e Pallent (1986) utilizaram do mesmo modelo de Weiss e Ollis (1980), acrescentando agora uma equação para o consumo de oxigênio (Tabela 2 – Eq. 10). Shu e Yang (1991), também se baseando no modelo de Weiss e Ollis (1980), o adaptaram para deixá-lo em função da temperatura. Cacik, Dondo e Marqués (2001), posteriormente utilizaram o modelo adaptado de SHU e YANG (1991) em seu trabalho, que envolvia um modelo de otimização e controle para diminuição do tempo de produção de goma. Porém, Cacik, Dondo e Marqués (2001) também incluíram equações para a propriedade reológica do meio utilizando a correlação de Metzner–Otto (Eq. 44), equações da lei de potência (Eqs. 43), e coeficiente de transferência de massa ( $K_La$ ) (Eq. 52) dado por Herbst *et al.* (1992), e uma nova equação para troca de calor a partir do balanço macroscópico de energia.

Luong et al. (1988) estudaram a possibilidade de uma combinação da equação logística de crescimento e de Monod para a descrição da evolução da biomassa (Tabela 2 – Eq. 11), no entanto segundo os próprios autores a equação logística por si só apresentou melhores resultados. Para carbono, produto e nitrogênio, Luong et al. (1988) utilizaram as equações originadas da literatura anterior ao seu trabalho. Patarinska e Georgieva (1992) utilizaram a equação logística de crescimento modificada para a variação da biomassa com o tempo (Tabela 2 – Eq. 12), e adotaram uma abordagem fenomenológica para introduzir equações que descrevessem a formação de produto e consumo de substrato (Tabela 2 – Eq. 13 e 14). Para seu objetivo de aplicar um controle linear dependente do oxigênio dissolvido, o modelo distinto da literatura, demonstrou resultados satisfatórios segundo dados dos autores. O modelo de García-Ochoa *et al* (1995) por sua vez, após avaliação dos modelos anteriores, trouxe uma representação mais completa que levava em consideração todos os nutrientes necessários, nitrogênio, carbono e oxigênio, sendo eles também considerados no crescimento celular e formação de produto, os autores incluíram novas equações para evolução da biomassa e oxigênio dissolvido (Tabela 2 – Eq. 15 a 16), em conjunto com as equações para produto, carbono e nitrogênio providas da literatura anterior.

Letisse *et al.* (2003) apresentaram um modelo que levou em consideração consumo de cinco substratos, carbono, nitrogênio orgânico, amônia, sais de nitrato e fosfato. Estes substratos são diretamente relacionados ao crescimento celular, assim como a evolução da biomassa com o tempo é uma função baseada em sucessíveis modelos de Monod que descrevem o consumo desses substratos. Faria *et al.* (2010) estudaram uma combinação entre o modelo logístico e equações modificadas de Luedeking-Piret por uma abordagem fenomenológica, comparando-as com o modelo de Weiss e Ollis (1980), no entanto os resultados não foram melhores do que o modelo mais tradicional. Zobot *et al.* (2011) utilizaram equações baseadas no modelo de Contois para descrever biomassa, substrato e produto, onde uma rede neural artificial foi aplicada para determinação dos parâmetros cinéticos, avaliando os efeitos da agitação e velocidade superficial do gás.

**Tabela 2:** Alguns dos principais modelos cinéticos para produção de goma xantana abordados nesse trabalho em sua forma diferencial. Biomassa (X); Fonte de carbono (S); Goma Xantana (P); Nitrogênio (N); Oxigênio dissolvido (O<sub>2</sub>); Temperatura (T); Sais de Nitrato (NO); Fosfato (PO); Nitrogênio orgânico (J).

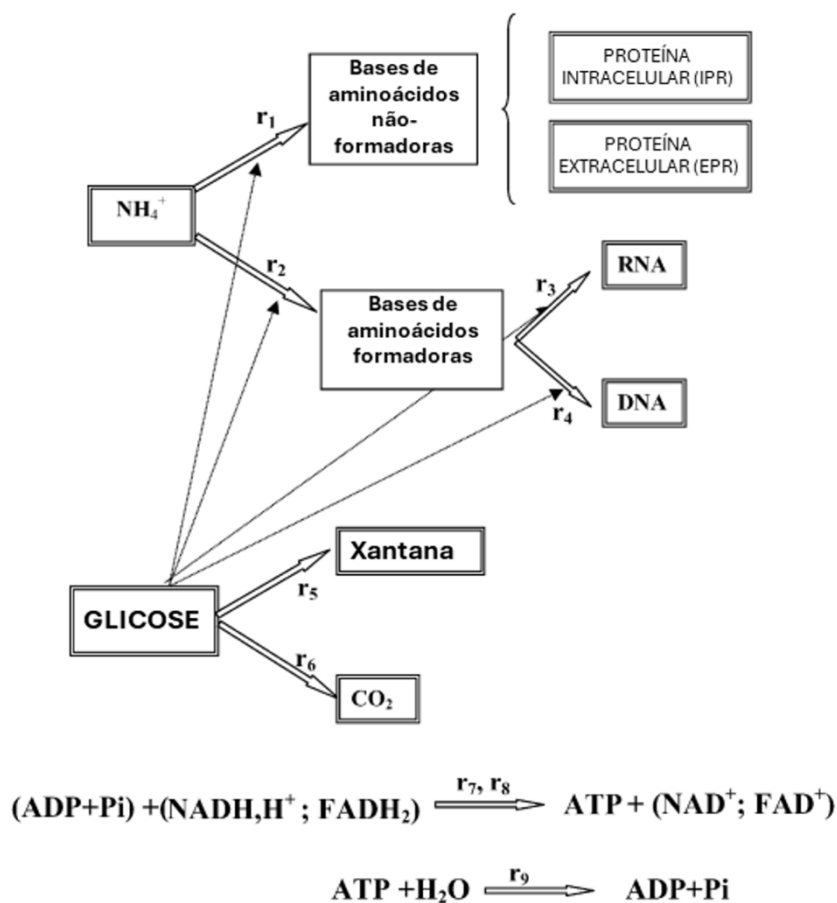
| Referências                                      | X  | S  | P  | N   | O <sub>2</sub>  | T  | PO / NO / J (i)   |
|--|--|--|--|---|---|--|---|
| Moraine & Rogovin (1971)                         | $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_N NX}{K_N + N}$ 1   | $-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt}$ 2                 | $\frac{dP}{dt} = \frac{k_P S}{K_S + S} X$ 3  | $-\frac{dN}{dt} = \frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$ 4      |   |  |   |
| Quinlan (1986)                                   | $\frac{dx}{dt} = k_X NX$ 5   | $-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt}$ 2                 | $\frac{dP}{dt} = k_P SX$ 6   | $-\frac{dN}{dt} = \frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$ 4      |   |  |   |
| Weiss & Ollis (1980) e Pinches & Pallent (1986)* | $\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$ 7   | $-\frac{dS}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \delta X$ 8                 | $\frac{dP}{dt} = \lambda \frac{dX}{dt} + \gamma X$ 9   | $-\frac{dN}{dt} = \frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$ 4      | $\frac{dO_2}{dt} = B \frac{dX}{dt} + AX$ * 10   |  |   |
| Luong et al. (1988)                              | $\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_S + S} X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$ 11                          | $-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt}$ 2                 | $\frac{dP}{dt} = k_P SX$ 6   | $-\frac{dN}{dt} = \frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$ 4      |   |  |   |
| Patarinska et al. (1992)                         | $\frac{dX}{dt} = \mu_0 X \left[1 - \left(\frac{X}{X_m}\right)^\alpha\right]$ 12                        | $\frac{dS}{dt} = -\epsilon_0 [1 - (c_1 z + d_1) p] X$ 13             | $\frac{dP}{dt} = \eta_0 [1 - (az + b_1) p] X$ 14   |   |   |  |   |
| García- Ochoa et al. (1995)                      | $\frac{dX}{dt} = k_X \left(\frac{X_0}{Y_X} + N_0\right) X \left(1 - \frac{X}{X_0 + Y_X N_0}\right)$ 15 | $-\frac{dS}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \delta X$ 8                 | $\frac{dP}{dt} = k_P SX$ 6   | $-\frac{dN}{dt} = \frac{1}{Y_{X/N}} \frac{dX}{dt}$ 4      | $\frac{dO_2}{dt} = k_L a (O_2^* - O_2) - \left(m_{O_2} X + \frac{1}{Y_{O_2/X}} \frac{dX}{dt}\right)$ 16 |  |   |
| Shu & Yang (1991) e Cacik (2001) *               | $\frac{dX}{dt} = k(T) X \left(1 - \frac{X}{X_s(T)}\right)$ 17  | $-\frac{dS_c}{dt} = \alpha(T) \frac{dX}{dt} + \beta(T) X$ 18         | $\frac{dP}{dt} = a(T) \frac{dX}{dt} + b(T) X$ 19   |   | $\frac{dO_2}{dt} = \chi(T) \frac{dX}{dt} + \delta(T) X$ 20  | $\rho V c_p \frac{dT}{dt} = Q_{exch} + Q_{ferm} + Q_{agit}$ 21 |   |
| Letisse et al. (2003)                            | $\frac{dX}{dt} = \mu(S, PO, J, N, NO) X$ 22  | $-\frac{dS}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \delta X$ 8                 | $\frac{dP}{dt} = \lambda \frac{dX}{dt} + \gamma X$ 9   | $-\frac{dN}{dt} = \frac{1}{Y_X} \frac{dX}{dt} + A_1 X$ 23 |   |  | $\frac{di}{dt} = \frac{1}{Y_X} \frac{dX}{dt} + A_i X;$ 24 |
| Faria et al. (2010)                              | $\frac{dX}{dt} = \mu_{mA} X \left(1 - \frac{x}{x_{mA}}\right)$ 25                                      | $-\frac{dS}{dt} = \alpha_A \frac{dx}{dt} + \beta_A \frac{dp}{dt}$ 26 | $\frac{dP}{dt} = \lambda_A \frac{dx}{dt} + \frac{\mu_{PA} S p}{(k'_{SA} + s)(k'_{PA} + p)} X$ 27 |   |   |  |   |
| Zabot et al. (2011)                              | $\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_S X + S} X$ 28   | $-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu_m \frac{S}{K_S X + S} X$ 29  | $\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{\mu_m S}{K_S X + S} X + \beta X$ 30                                |   |   |  |   |

$\alpha = 1/Y_{XS}; \delta = m_s$

Com relação aos modelos estruturados, apenas Pons, Dussap e Gros (1989) e García-Ochoa Santos e Alcón, (1996; 1998; 2004a; 2004b) apresentaram modelos cinéticos estruturados para produção de goma xantana. De acordo com García-Ochoa, Santos e Alcón, (1995) modelos não-estruturados não são capazes de descrever algumas das tendências observadas nos dados experimentais quando algumas variáveis operacionais são alteradas. Para Pons, Dussap e Gros (1989) a construção de modelos menos empíricos para produção da goma xantana, requer um conhecimento mais aprofundado sobre o metabolismo das células de *Xanthomonas*. García-Ochoa, Santos e Alcón (1996) também citaram os principais passos para construção desse modelo, começando pelo estudo estequiométrico, seguindo para a formulação de um esquema simplificado de reação, determinação de equações cinéticas para cada reação e finalizando com a formulação do modelo cinético baseado em um grupo de equações diferenciais. Ainda segundo os autores a ordem pode ser alterada de acordo com as particularidades do sistema.

Segundo Pons, Dussap e Gros (1989) uma grande vantagem das equações dos modelos Logístico e de Luedeking-Piret é a fácil determinação dos parâmetros, porém, para o modelo de Luedeking-Piret, os parâmetros não-associados ao crescimento são dependentes da concentração inicial de nitrogênio que pode variar, o que já havia sido demonstrado por Pinches e Pallent (1988) que sugeriram uma relação empírica para correção de tais parâmetros, levando os autores a recomendarem certo cuidado na aplicação do modelo aos cultivos. Outro ponto levantado foi que os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos dados experimentais de seu trabalho demonstraram uma queda durante a síntese de goma, o que não é consistente com o modelo de Luedeking-Piret, que por sua vez, mantém parâmetros constantes. O objetivo do trabalho de Pons, Dussap e Gros (1989) foi então estabelecer um modelo que fizesse a leitura dessas diferenciações, levando em consideração o consumo de oxigênio e a reologia do meio. Seu modelo, no entanto, foi pensado para um reator de coluna de bolhas, e necessita que o  $k_L a$  seja constante em toda região do meio para uma melhor aproximação dos dados, o que é mais difícil de se atingir em um reator de tanque agitado convencional, onde regiões “mortas” podem se formar em locais mais distantes dos impelidores no caso de meios mais viscosos.

García-Ochoa, Santos e Alcón. (1998), apontaram a divisão em três grandes grupos para os modelos estruturados, sendo eles por compartimentados, metabólicos ou químicos. No primeiro tipo, a biomassa é considerada como um grupo de compartimentos de componentes como DNA, RNA, proteínas, etc. No segundo, a biomassa ainda é considerada como nos modelos não-estruturados, porém o metabolismo da fonte de carbono é considerado na formação do produto. E por fim, o terceiro tipo, leva em consideração principalmente para o crescimento celular o metabolismo das fontes de carbono e nitrogênio. Em seu trabalho anterior (GARCÍA-OCHOA, SANTOS e ALCÓN, 1996), já haviam construído um modelo quimicamente estruturado, e neste trabalho de 1998 desenvolveram o modelo metabolicamente estruturado. Posteriormente em 2004, os mesmos autores viriam a publicar mais dois artigos remodelando seu modelo quimicamente estruturado (GARCIA-OCHOA, SANTOS e ALCON, 2004a; 2004b), mas agora já levando em consideração todo seu material prévio, e também o trabalho de Pons, Dussap e Gros (1998). O modelo final quimicamente estruturado proposto pelos autores está baseado nas reações apresentadas no esquema simplificado construído pelos autores apresentado da Figura 5.



**Figura 5:** Esquema metabólico simplificado assumido por García-Ochoa et al. (2004a). Adaptado de García-Ochoa et al. (2004a).

### 3.5. Cultivo Contínuo

Silvan e Rogovin (1970) considerando a possibilidade de um cultivo contínuo para goma xantana trazer vantagens produtivas, principalmente econômicas, publicaram o primeiro estudo envolvendo esse método de cultura em escala laboratorial. Como modelo cinético apenas para crescimento celular, os autores utilizaram uma equação derivada de Monod em estado estacionário  $\mu = D$  (sendo D a taxa de diluição).

$$X = Y_{X/S} \left( S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D} \right) \quad (31)$$

O cultivo teve duração de 244 horas e Silvan e Rogovin (1970) acompanharam o crescimento celular, consumo de glicose, viscosidade do meio e produção de goma. Utilizando taxas de diluição (D) entre 0,02 e 0,0285 h<sup>-1</sup>, eles conseguiram manter um

estado estacionário, tanto para produção quanto para viscosidade do meio. As conclusões do estudo mostraram que não houve deterioração da cultura, e que o consumo de substrato e a produção de goma foram funções do pH e da taxa de diluição. Porém, o pH utilizado foi abaixo da faixa ideal demonstrada em estudos posteriores, como mostrado pelo trabalho de revisão de Bhat *et al.* (2022), que encontrou estudos demonstrando que o pH ideal para produção de goma situa-se entre 7 e 8.

Zabot *et al.* (2012), trouxeram um estudo voltado para a modelagem do processo produtivo contínuo de goma utilizando lactose de soro de queijo como fonte de carbono. Os autores levaram em consideração o não-reciclo e reciclo interno e externo de células. A conclusão destacada de sua simulação foi a produtividade ao menos dez vezes maior nos cultivos com reciclo, e que é possível otimizar a produção de goma utilizando esse modelo de processo. Segundo os autores, sistemas com reciclo de células são comuns na indústria, e a sua principal função é aumentar a concentração celular para aumentar a taxa de conversão de substrato. Ainda segundo os autores, usualmente a separação das células é realizada utilizando uma centrífuga, e em caso de reatores em série, a operação pode ser realizada retornando o microrganismo para o reator mais apropriado. Seu modelo usou como base equações de balanço de massa e a equação do modelo de Contois, para biomassa, substrato e produto, em estado estacionário, porém não levou em consideração o consumo de oxigênio e a reologia do meio.

Vignesh, Arumugam e Ponnusami (2015) mais recentemente também trouxeram um estudo sobre produção de goma utilizando cultivo contínuo e caldo-de-cana como fonte de carbono. Os autores citaram que há formação de zonas mortas, o que acarreta o esgotamento localizado de nutrientes e de oxigênio, e leva à perda da atividade metabólica das células. O aumento demasiado da taxa de fluxo de oxigênio e agitação para aumento do  $k_{La}$  também podem causar a morte celular, devido à liberação de calor e cisalhamento. Em seu trabalho, o foco dos autores foi desenvolver um modelo que descrevesse o processo, buscando encontrar a taxa de diluição ótima para o desenvolvimento do biorreator. Foi levado em conta o reciclo e o não-reciclo de células, onde para os dados cinéticos utilizados no trabalho, a taxa de diluição ótima foi de 0,205 e 0,350 h<sup>-1</sup>, respectivamente.

O modelo de Vignesh, Arumugam e Ponnusami (2015) foi baseado na equação logística do crescimento, e segundo os próprios autores é um refinamento do modelo produzido por Zobot *et al.* (2012). Os autores apontam que o objetivo é sempre manter as células em fase exponencial de crescimento, uma vez que para os autores a goma é um produto associado ao crescimento. E por fim, ressaltam que para se obter a performance predita, se fazem necessários sistemas eficientes de mistura e controle de temperatura. As equações de balanço e cinéticas do modelo estão listadas abaixo, equações 32 a 34.

$$X = Y_{X/S} S_0 \left(1 - \frac{D}{\mu_m}\right) \quad (32)$$

$$S = \left(S_0 - \frac{X}{Y_{X/S}}\right) \quad (33)$$

$$P = Y_{X/S} X \quad (34)$$

Sendo as produtividades de biomassa e produto dadas pelas equações:  $P_x = DX$ ;  $P_p = DX$ . Essas mesmas equações foram recalculadas levando em consideração o reciclo de células, o que levou a uma simulação com ganho de 72% em produtividade quando comparado com a simulação sem reciclo.

### 3.6. Operabilidade

De maneira geral, a análise de operabilidade é um método direcionado ao projeto e controle de processos químicos, para avaliação da capacidade de um conjunto disponível de entradas (*Available Input Set - AIS*) para atingir um conjunto de saídas (*Achievable Output Set - AOS*) no qual metas de produção são consideradas, através de um mapeamento linear e não linear (GEORGAKIS *et al.*, 2003). Uma aplicação está devidamente descrita no trabalho de Carrasco e Lima (2017) e Gazzaneo *et al.* (2020). A análise necessita de modelos que representem o processo, podendo ser usados modelos fenomenológicos ou modelos caixa preta como redes neurais. Esse modelo ( $M$ ) descreve a relação entre as entradas e as saídas da seguinte forma:

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

Nos quais  $x$  são variáveis de estado e  $u$  é o vetor de variáveis manipuláveis de entrada. As derivadas pelo tempo de  $x$  e  $u$  são  $\dot{x}$ ,  $\dot{u}$ , respectivamente;  $d$  e  $y$  são os vetores de perturbações ou desvios e variáveis de saída, respectivamente;  $f$  e  $g$  são representações dos mapas não-lineares. Por fim,  $h1$  e  $h2$  incluem os limites das restrições do processo associados à produtividade e especificações de segurança.

O *AIS* (eq. 35) é baseado na estrutura e limites do processo e o *AOS* (eq. 36) é calculado pelos modelos:

$$AIS = \{u | u_i^{min} \leq u_i \leq u_i^{max}; 1 \leq i \leq m\} \quad (35)$$

$$AOS = \{y | y = M(u, d); u \in AIS, d \text{ fixo}\} \quad (36)$$

Em alguns casos, *AOS* não é suficiente para satisfazer alguns indicadores. A associação com esses indicadores gera um vetor denominado de conjunto de saídas desejadas (*Desired Output Set – DOS*). *DOS* conectam os vértices dados por  $y^{min}$  e  $y^{max}$ , sendo o *DOS* definido como o espaço de saída onde o processo deve operar. Já este espaço para entradas pode ser denominado como conjunto de entradas desejadas (*Desired Input Set - DIS*). *DOS* (eq. 37) e *DIS* (eq. 38) são definidos como:

$$DOS = \{y | y_j^{min} \leq y_j \leq y_j^{max}; 1 \leq j \leq n\} \quad (37)$$

$$DIS = \{u | u = M^{-1}y; y \in DOS\} \quad (38)$$

A determinação do *DIS* se dá por um algoritmo de otimização não linear (NLP) que minimiza uma função objetivo ( $\emptyset$ ). A solução de P1 (eq. 39) pode ser obtida mediante algoritmos de otimização no MATLAB.

$$P1 = \emptyset_K = \min_{u_k^*} \sum_{j=1}^n \left( \frac{y_{j,k} - y_{j,k}^*}{y_{j,k}} \right)^2; u_k^{min} \leq u_k^* \leq u_k^{max}; c1(u_k^*) \leq 0 \quad (39)$$

Cada  $y_{j,k}$  corresponde a um ponto do *DOS* (eq. 40) de acordo com um agrupamento específico, onde “ $j$ ” representa o índice da variável de saída, e “ $k$ ” o índice de um ponto no agrupamento. Dessa forma:

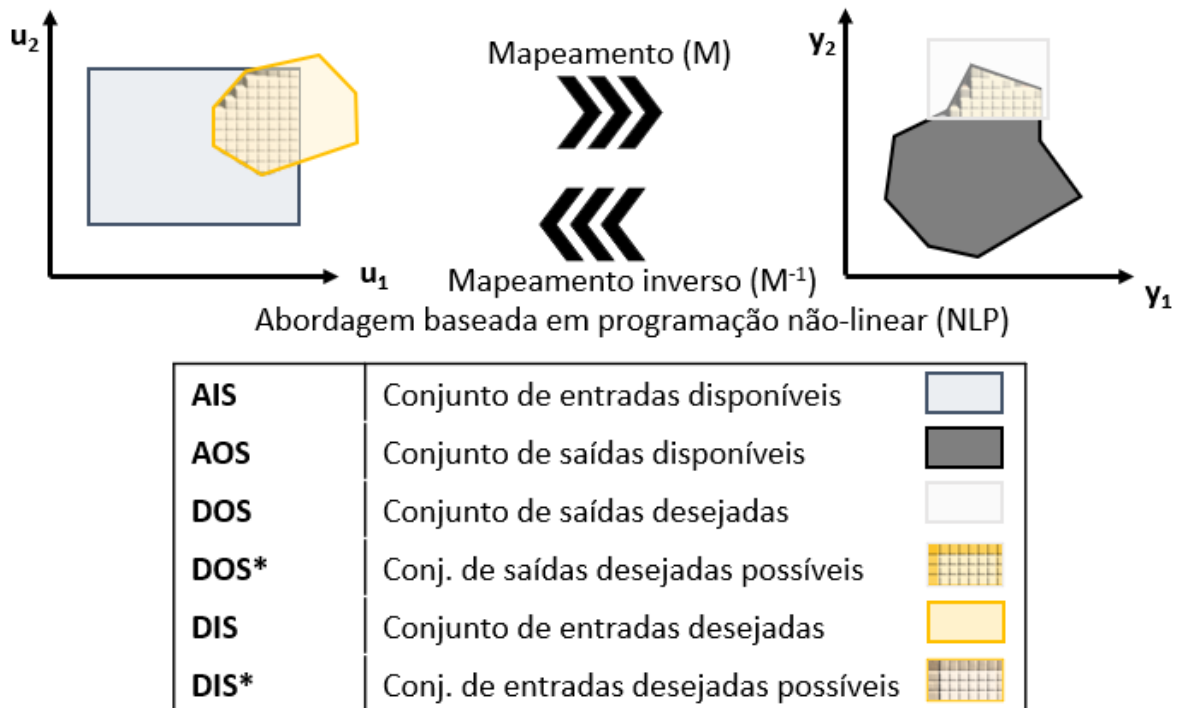
$$DOS = \{y | y = (y_1, y_2, \dots, y_p)\} \quad (40)$$

As respostas do otimizador consistem em um conjunto de pontos calculados para cada ponto do *DOS*,  $\mathbf{u}_k^* = (\mathbf{u}_1^*, \mathbf{u}_2^*, \dots, \mathbf{u}_p^*)$ .  $c1$  representa uma restrição não linear no mapa de dados associado a um alvo específico. Os pontos em  $\mathbf{u}_k^*$  definem um *DIS\**, e este conjunto é denominado de *DIS* factível (eq. 41), e pode ser usado para recalculer o conjunto de saída *DOS* factível, *DOS\** (eq. 42). Ambos ficam:

$$DIS^* = \{\mathbf{u}^* | \mathbf{u}^* = (\mathbf{u}_1^*, \mathbf{u}_2^*, \dots, \mathbf{u}_p^*)\} \quad (41)$$

$$DOS^* = \{\mathbf{y}^* | \mathbf{y}^* = \mathbf{M}(\mathbf{u}^*); \mathbf{u}^* \in DIS^*\} \quad (42)$$

O modelo de processo  $\mathbf{M}$  é aplicado aos dados de entrada inseridos no *DIS\**. Todos os conjuntos estão visualmente representados na Figura 11 abaixo:

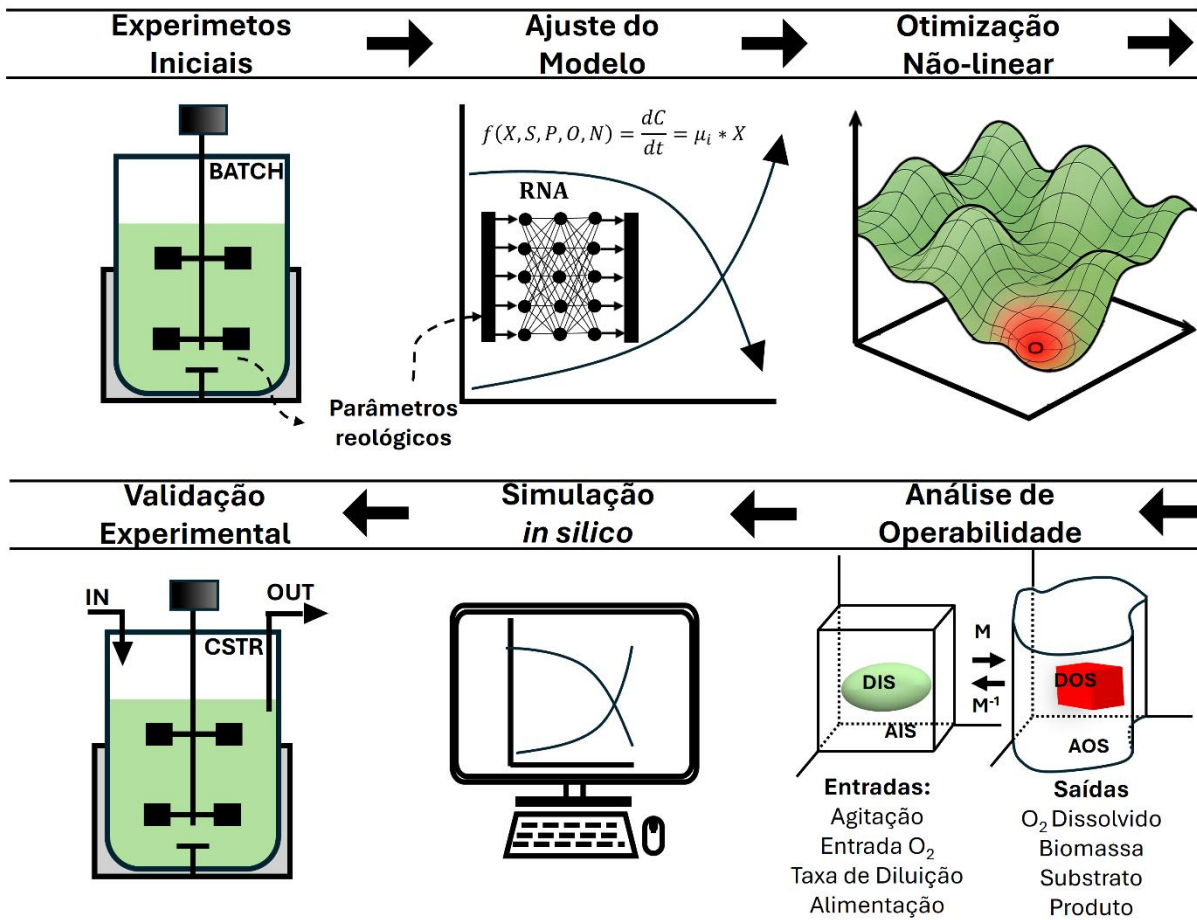


**Figura 6:** Ilustração do funcionamento de uma análise de operabilidade para um sistema 2x2 genérico, indicando as regiões provenientes do estudo, em especial a região operável do sistema (*DIS\**). Fonte: Acervo pessoal.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira fase deste projeto foi composta pelo planejamento, desenvolvimento e condução de diferentes cultivos em biorreator de bancada nas condições de batelada, seguido de análise de dados, objetivando a obtenção dos dados experimentais necessários para desenvolvimento de um modelo cinético que descrevesse o comportamento do crescimento celular, consumo de substratos e produção do bioproduto pelas linhagens aqui utilizadas. A partir deste conjunto de dados, uma segunda fase teve início com a construção do modelo cinético híbrido juntando modelagem baseada em equações fenomenológicas não estruturadas com redes neurais artificiais. Esse modelo híbrido foi utilizado como ferramenta principal para a otimização do sistema e análise de operabilidade do processo visando controle e aumento da produtividade da goma. A segunda fase contou com a supervisão do Prof. Dr. Fernando V. Lima do *Department of Chemical and Biochemical Engineering* da *West Virginia University* (WVU) durante período de estágio no *Control, Optimization and Design for Energy and Sustainability (CODES) Group*. Por fim, a fase final tratou da realização da validação experimental em modo contínuo em reator CSTR, aplicando as condições otimizadas anteriormente. A Figura 7 abaixo apresenta de forma ilustrativa e em ordem cronológica as principais etapas de todo trabalho.



**Figura 7:** Fluxograma em ordem cronológica, seguindo sentido orientado por setas, ilustrando as etapas principais durante o desenvolvimento do projeto. Cada imagem corresponde ao título logo acima. Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.1. Cultivos

Os primeiros cultivos foram conduzidos utilizando variações do meio SYMP (em g.L<sup>-1</sup>: Sacarose, 35; Extrato de levedura, 4; Extrato de malte, 4; Peptona, 4; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,27; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,81; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2; NaCl, 1; Ureia, 0,4; e FeSO<sub>4</sub>, 0,002), de acordo com OLIVEIRA, *et al.* (2025). As linhagens utilizadas nesse trabalho de otimização de produção de goma foram as mesmas geneticamente modificadas e utilizadas no trabalho de OLIVEIRA, *et al.* (2025), onde foi necessária a realização de indução da expressão gênica com L-arabinose (0,005% m/v) ao final da fase exponencial de crescimento celular. As células de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, cuja linhagem parental identificada por ATCC 33913 e código nº CCT 5268, foram adquiridas da Fundação André Tosello.

Foram utilizadas três linhagens, incluindo a linhagem parental identificada como XCC, uma abreviação para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. As demais receberam um complemento no nome de acordo com a proteína que superexpressam, XCC\_deH (proteína UDPG-deH) e XCC\_PP (proteína UDPG-PP).

Os cultivos foram realizados em biorreatores de bancada do tipo tanque agitado, primeiramente em modo batelada, e ao final em modo contínuo. Os dados em batelada foram coletados de cultivos que foram realizados utilizando um biorreator de 6 L com volume de trabalho de 4 L, de fabricação e uso do grupo de pesquisa da instituição nacional DEQ/UFSCar (software de supervisão: SUPERSYS\_HCDC® por Horta, 2008), e em biorreatores Minifors2 de 1,5 L com volume de trabalho de 900 mL, de fabricação Infors HT®. O cultivo em modo contínuo foi realizado utilizando o mesmo biorreator de 6 L, mantendo o volume de trabalho de 4 L. Ambos os reatores estavam equipados com dois impelidores do tipo Rushton, separados por uma distância de 1,5 diâmetro do impelidor. A temperatura foi mantida entre 28 e 30°C, e o pH mantido entre 6,5 e 7,5 por meio do tampão fosfato contido no meio, com pequenas correções, quase que irrisórias, utilizando NaOH 1M e HCl 5M. Para os cultivos em batelada, o fluxo de entrada de ar foi mantido em 2 vvm variando a porcentagem de oxigênio entre 21% e 100%, buscando sempre manter a saturação de oxigênio dissolvido acima de 30 %, e o controle foi feito automaticamente via controlador PID convencional. A agitação foi mantida na faixa entre 400 e 900 rpm. No modo contínuo, as condições de agitação e aeração seguiram as discutidas na seção de resultados.

#### 4.2. Métodos analíticos

Os dados obtidos nos diferentes cultivos tiveram a quantidade e periodicidade dos pontos padronizadas. Para isso, técnicas de interpolação, linear e *Cubic Spline*, foram utilizadas. Para eliminação dos ruídos, foram utilizados os métodos de média e mediana móvel, com *threshold factor* de 1 e *Smoothing factor* de 0,025.

A quantificação de biomassa das células seguiu procedimento adaptado ao descrito por Savvides et al. (2012), que visa separar as células da goma xantana para correta medição da formação de biomassa. O procedimento consiste em três lavagens consecutivas da biomassa em solução salina, utilizando-se de centrifugações para

separação da biomassa do meio, seguida de quantificação por gravimetria (massa seca) e leituras de absorvância ( $DO_{600nm}$ ). Mais especificamente, a amostra de caldo é previamente diluída na solução para a primeira lavagem na proporção 7:1 (Salina:Caldo), e após centrifugação a 18.000 g por 10 min, o sobrenadante contendo praticamente toda goma xantana é separado e levado para quantificação do produto, e o *pellet* contendo a biomassa é novamente lavado sendo ressuspendido mais uma vez em solução salina, mantendo o volume do sobrenadante retirado. A centrifugação é repetida, mas dessa vez o sobrenadante é descartado e a terceira e última lavagem é repetida igualmente à segunda. Para as análises em massa seca, as células separadas por centrifugação, foram secas a 55°C por 72 horas.

A concentração de goma produzida foi mensurada por método gravimétrico (massa seca), adaptado dos procedimentos descritos por Savvides *et al.* (2012) e Subhash *et al.* (2015). O sobrenadante em solução salina, pós centrifugação (livre de células), foi adicionado, para precipitação da goma, em mistura com isopropanol nas proporções 2:1 ou 5:1 (Isopropanol:Amostra diluída) (a depender da concentração de goma, se fez necessário a ampliação da proporção do álcool). O precipitado formado (goma xantana) foi removido mecanicamente com o auxílio de espátulas e bastões de vidro, após ser resfriada a -20°C por 20 minutos. Por fim a mistura restante passou por centrifugação a 30.000 g para remoção de qualquer precipitado ainda remanescente no recipiente.

Para a avaliação do consumo da fonte de carbono, foram coletadas amostras da mistura final com isopropanol após a remoção da goma. A sacarose presente na solução não precipita junto da goma xantana na presença do isopropanol. As análises foram realizadas utilizando um equipamento de HPLC (*Waters, Milford, MA, USA*), equipado com um detector de índice de refração (modelo 2414, *Waters*) e uma coluna Sugar-Pak™ I (modelo WAT085188, *Waters*) aquecida a 80°C. A fase móvel foi  $Ca^{2+}$ -EDTA (50 mg/L) a um fluxo de 0,5 mL/min. Por requisitos do equipamento, as amostras passaram por secagem em estufa para evaporar todo conteúdo alcoólico presente. Quando em solução com isopropanol essa amostra já está em diluição de 24 vezes, deste modo, para aumentar a concentração, o açúcar seco é ressuspendido em água Milli-Q em um terço do volume, reduzindo a diluição para apenas 8 vezes.

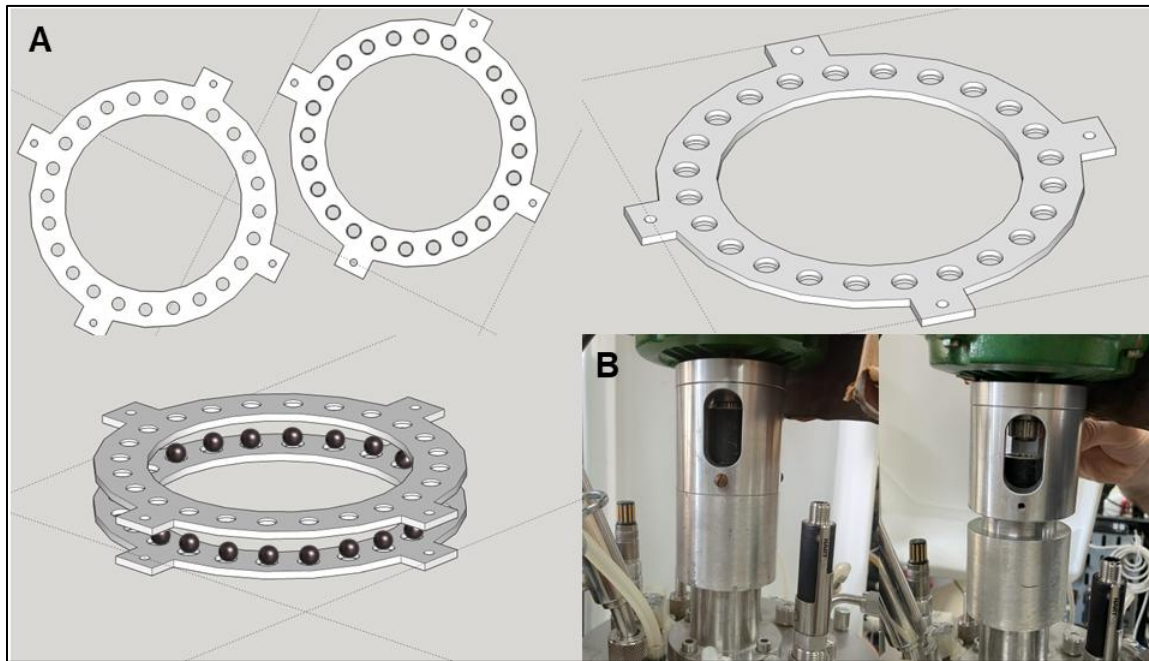
Antes da injeção da amostra no equipamento, ela ainda passa por filtração em filtro PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.1. Acompanhamento da reologia do meio

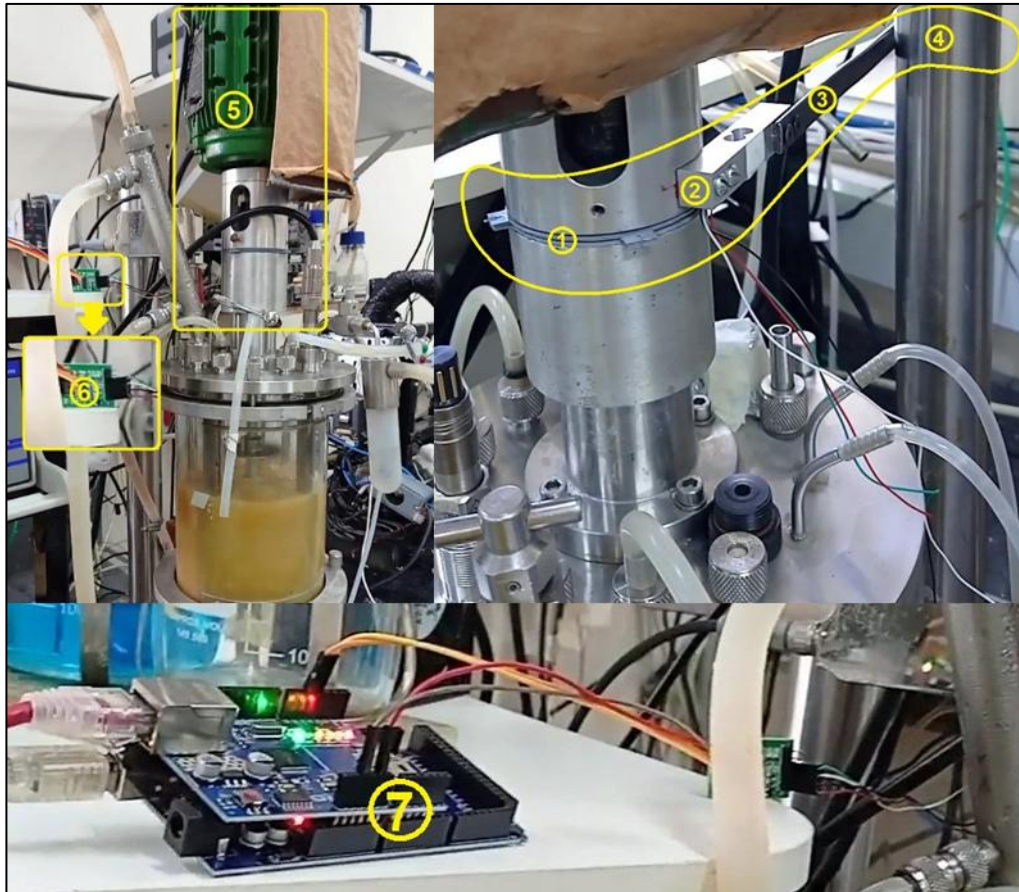
Para o monitoramento da viscosidade do caldo de cultivo em tempo real no biorreator de 6 L, foi testado um sistema para medição do torque aplicado no eixo dos impelidores. Este se baseia na ideia de acompanhamento do torque através da utilização de um dinamômetro. Além da viscosidade, outras informações podem ser obtidas, como consumo energético e o efeito de diferentes arquiteturas de reator e de impelidores.

Segundo a terceira lei de Newton, toda ação gera uma reação. O motor elétrico utilizado nesse experimento aplica uma força de rotação no sentido axial sobre o eixo, fazendo-o rotacionar no sentido horário, e a mesma força de igual magnitude é aplicada na direção oposta pelo conjunto eixo-rotor na carcaça do motor, que por sua vez não rotaciona no sentido anti-horário por estar ancorado em todo sistema que constitui o biorreator. Ao aferir essa força aplicada pelo motor ao sistema, concentrando toda essa energia em um único ponto de ancoragem para medição, isso permitiria a quantificação da força necessária para a manutenção da agitação definida pelos controles do sistema. A hipótese levantada foi a possibilidade de relacionar a variação da viscosidade do caldo com a alteração do torque sendo utilizado para movimentar os impelidores.

Para a liberação da rotação angular do corpo do motor sobre a tampa do vaso do biorreator, foi projetado um anel/rolamento (Figuras 8 e 9) que se posiciona exatamente no encaixe entre a tampa e o motor, como mostra a Figura 8-B. O corpo do motor foi então fixado à extremidade de uma célula de carga (Figura 9-2) de 20 kg conectada a um módulo de Arduino® HX711 (Figura 9-6 e 9-7). A outra extremidade da célula foi então fixada a uma barra (Figura 9-3) de metal, que por sua vez apoia-se em uma torre (Figura 9-4) que se localiza atrás do reator. A torção (torque) aplicada à essa célula de carga é transformada pelo módulo em sinais elétricos que podem ser lidos pela porta serial do computador conectado ao Arduino.



**Figura 8:** Imagens mostrando com detalhes o anel de rolamento utilizado para liberação da rotação do corpo do motor (A) e da posição onde ele foi alocado (B). Fonte: Acervo pessoal.



**Figura 9:** Imagens contendo os itens enumerados que compõem o sistema pensado para monitoramento de torque em cultivos de produção de goma. 1. Anel de rolamento; 2. Célula de carga; 3. Barra de suporte; 4. Torre de estabilização/fixação; 5. Motor elétrico; 6. Módulo HX711; 7. Arduino mega. Fonte: Acervo pessoal.

Para construção de uma curva de viscosidade com a concentração de goma durante o cultivo, amostras foram coletadas e tiveram sua viscosidade aparente calculada de acordo a equação da lei de potência e a equação para viscosidade aparente de Metzner-Otto, eq. 43 (DORAN, 2013):

$$\tau = k * \gamma^n; \gamma_{av} = A * N \quad (43)$$

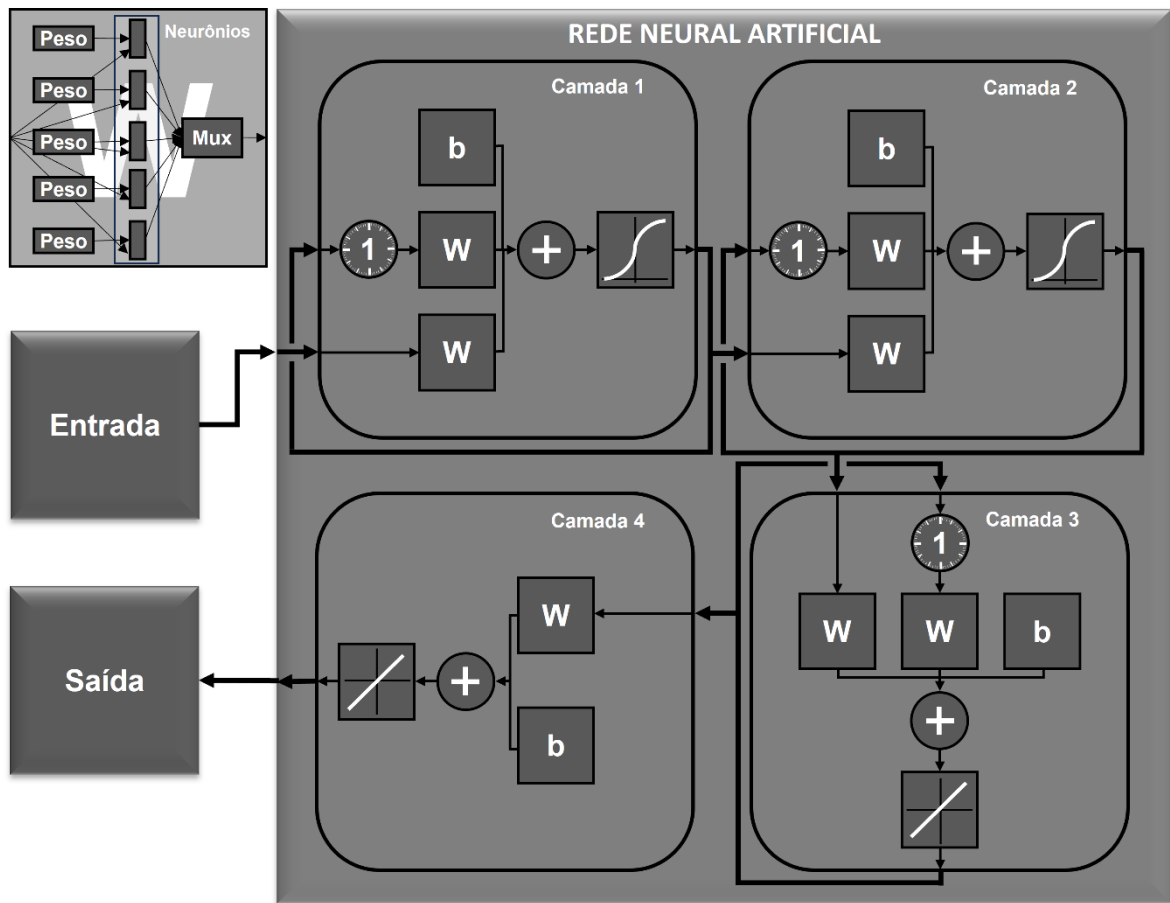
Onde  $\tau$  [N.m<sup>-2</sup>] é a tensão de cisalhamento,  $k$  [N.s.m<sup>-2</sup>] é o índice de consistência,  $\gamma$  [s<sup>-1</sup>] a taxa de cisalhamento,  $n$  [ ] o índice de fluxo,  $N$  [s<sup>-1</sup>] a agitação, e  $A$ , constante de Metzner-Otto relativa ao impelidor. Esses parâmetros foram obtidos através do uso do reômetro *Brookfield DV III Ultra* variando entre *Spindle* 18 e 34, e agitação entre 10 e 250 rpm. A viscosidade aparente foi então calculada através da seguinte expressão, eq. 44:

$$\mu_{ap} = k * \gamma^{n-1} \quad (44)$$

Estes mesmos parâmetros  $k$  e  $n$  obtidos através da análise no reômetro, também foram modelados por uma rede neural artificial customizada (RNA). Esta RNA foi utilizada posteriormente para calcular os respectivos parâmetros reológicos em função da concentração simulada de goma xantana. A rede neural utilizou como entrada para o treinamento os dados de concentração de produto obtidos durante o cultivo. Os dados experimentais obtidos foram interpolados utilizando o método *Cubic Spline* para o parâmetro  $k$  e *Smoothing Spline* para o parâmetro  $n$ .

A rede utilizada foi do tipo Rede de Camada Recorrente (*Layered Recurrent Network*), que se diferencia pela retroalimentação dos dados de saída na mesma camada, permitindo o armazenamento de informações, ideais para dados de evolução com o tempo. A RNA foi treinada individualmente para cada respectivo parâmetro, e o treinamento utilizado foi seguindo o método de *Levenberg-Marquardt*. Três camadas ocultas foram utilizadas com 5 neurônios cada, sendo as duas primeiras com função de transferência do tipo log-sigmoide e linear para terceira e camada de saída. Funções log-sigmoide foram adicionadas ao início para intensificar o efeito exponencial do aumento da viscosidade repentino do fluido, e funções lineares para manterem o comportamento estável.

Quinhentas épocas de treinamento foram utilizadas, limitando o número de tentativas em cima do processo de validação cruzada de 5 grupos realizado, garantindo assim que não ocorresse *overfitting*. Para a validação cruzada, quatro grupos de dados foram utilizados para o treinamento e um para a validação do desempenho da rede, com o processo sendo repetido cinco vezes alternando o grupo de validação. Para isso, os dados de concentração de goma foram organizados em 5 grupos com distribuição igual dos pontos preservando a estrutura da curva de evolução do produto. A Figura 10 abaixo mostra de forma ilustrativa a sequência e configuração do esquema utilizado.



**Figura 10:** Esquema de funcionamento da RNA utilizada para descrever os parâmetros  $k$  (índice de consistência) e  $n$  (taxa de cisalhamento) da reologia do meio. Cada camada contém as caixas ‘W’ para adição dos pesos dados aos neurônios, sendo uma delas referente aos dados retroativos demonstrados com um atraso de 1 período de amostragem. Junto as caixas ‘W’, são adicionados valores constantes representados pelas caixas ‘b’, onde o valor final será transformado pela função de transferência representada pelas caixas com a gravura de representação da função aplicada.

### 4.3. Desenvolvimento do Modelo Cinético

#### 4.3.1. Batelada

Utilizou-se o modelo não-estruturado adaptado de Garcia-Ochoa, Santos e Alcon (1995) e Moraine e Rogovin (1971). A decisão não recaiu sobre um modelo estruturado pois este adicionaria complexidade desnecessária aos objetivos do trabalho. Abaixo, equações 45 a 48, segue modelo original sem modificações de Garcia-Ochoa, Santos e Alcon (1995):

$$\frac{dX}{dt} = r_X = k_X \left( \frac{X_0}{Y_X N} + N_0 \right) X \left( 1 - \frac{X}{X_0 + Y_X N_0} \right) \quad (45)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_S = \frac{1}{Y_{XS}} \frac{dX}{dt} + m_S X \quad (46)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P = k_P S X \quad (47)$$

$$\frac{dO_2}{dt} = k_L a (O_2^* - O_2) - \left( m_{O_2} X + \frac{1}{Y_{OX}} \frac{dX}{dt} \right) \quad (48)$$

A primeira modificação se deu pela substituição da equação original de formação de produto, reescrita abaixo na equação 49, de Moraine e Rogovin (1971), uma vez que nessa há a limitação do quanto o substrato irá influenciar o aumento da taxa de produção, impedindo que o excesso de substrato seja entendido como ganho de produtividade, o que não representa a realidade dada a limitação metabólica das células.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_P S}{K_S + S} X \quad (49)$$

Para este trabalho, foi adicionado o termo  $P^{-P^*C}$  de limitação por concentração de produto, diretamente ligada à viscosidade do meio que limita a produção. O parâmetro “C” [ ] é uma constante empírica de ajuste de proporcionalidade para a parte exponencial do termo adicionado. Outro parâmetro de ajuste adicionado é o “V” [L], representando o volume de trabalho, necessário para diminuir o impacto do aumento em produtividade observado experimentalmente pelo aumento de escala, em cima dos parâmetros. Segue a nova equação que descreve o acúmulo de produto, eq. 50:

$$\frac{dP}{dt} = r_P = k_P V \frac{S}{K_S + S} X P^{-P^*C} \quad (50)$$

Onde ‘ $k_P$ ’ [gP.gS<sup>-1</sup>.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>] é a taxa máxima de crescimento específico, e ‘ $K_S$ ’ [g.L<sup>-1</sup>] é a constante relacionada à redução da produção diante de uma quantidade reduzida de substrato. A segunda modificação foi na Eq. (48), adicionando um parâmetro ‘ $\theta$ ’ [ ] para ajustar a quantidade de oxigênio consumida durante o crescimento celular no termo da Taxa de Captação de Oxigênio (OUR). Esse ajuste afeta diretamente a forma como a taxa de variação das células afeta a demanda por O<sub>2</sub>, respeitando a faixa real conceitual do parâmetro estequiométrico de conversão “ $Y_{OX}$ ”. Além dele, um novo parâmetro empírico ‘ $R$ ’ [molO<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>], entrou como uma resistência constante para a dissolução de oxigênio. A inclusão desse parâmetro como um termo extra na equação e não dentro do termo de transferência de O<sub>2</sub>, traria um

efeito angular indesejável ao comportamento do termo de transferência em caso de modificações no “ $k_La$ ”. Segue a nova equação, eq. 51:

$$\frac{dO_2}{dt} = k_La(O_2^* - O_2) - \left( m_{O_2}X + \frac{o}{Y_{ox}} \frac{dX}{dt} \right) - R \quad (51)$$

Onde a diferença entre o oxigênio na interface gás-líquido ( $O_2^*$ ) e o oxigênio dissolvido no meio ( $O_2$ ) é a força motriz para a Taxa de Transferência de Oxigênio (OTR), o ‘ $m_{O_2}$ ’ [molO<sub>2</sub>.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>] o coeficiente de consumo de O<sub>2</sub>, e ‘ $Y_{ox}$ ’ a conversão de O<sub>2</sub> em células. Ambas as modificações realizadas para as taxas de formação de produto e consumo de O<sub>2</sub> foram baseadas em observações experimentais, e devido ao caráter empírico dos ajustes, limitam o uso das equações – agora semiempíricas – nas regiões fora das faixas avaliadas nesse estudo.

A última modificação feita foi em relação à equação para o Coeficiente Volumétrico de Transferência de Massa ( $k_La$ ), em que seus parâmetros são diretamente dependentes das características físicas do processo, tais como tipo e tamanho dos impelidores, da dorna da vazão de gás, das chicanas, etc. Trabalhos de Garcia-Ochoa, Santos e Alcon (1995, 2000, 2004) utilizaram a seguinte equação (52) para ajuste de parâmetros:

$$k_La = bN^c \phi^d \mu^e \quad (52)$$

Onde o termo  $N$  representa agitação,  $\phi$  representa o efeito da velocidade superficial do gás de entrada para a aeração, e  $\mu$  a viscosidade, dado pela unidade de m.s<sup>-1</sup>. Bustamante (2013) que trabalhou com um sistema (reator) similar ao utilizado neste trabalho, também utilizou a mesma estrutura de equação, porém alterando a unidade do termo  $\phi$  para levar em consideração a relação da velocidade volumétrica de entrada de ar com o volume de meio do reator, dado pela unidade de m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>. Considerando a proximidade dos sistemas, a aproximação de Bustamante (2013) foi a utilizada como base. Entretanto como as concentrações de goma xantana atingidas pelos cultivos experimentais nesse trabalho foram superiores às apresentadas pelos trabalhos de Garcia-Ochoa, Santos e Alcon (1995, 2000, 2004) e Bustamante (2013), foi necessária a suplementação de oxigênio 99% à mistura de gás na entrada do reator, portanto a estrutura da equação para o  $k_La$  precisou ser modificada no termo referente à viscosidade no meio, substituindo o parâmetro  $e$  pela multiplicação da própria viscosidade pelo novo parâmetro  $f$ , intensificando o aumento

exponencial trazido pela viscosidade à aeração do sistema. Segue a nova equação 53:

$$k_L a = f N^g \phi^h k^i \eta^j \quad (53)$$

Neste trabalho, os parâmetros “ $g$ ,  $h$ ,  $i$  e  $j$ ” foram mantidos iguais aos determinados por Bustamente et al. (2013), “1,431, 0,488, 0,131 e 1,193” respectivamente, mas deixando o parâmetro ‘ $f$ ’ para ajuste geral. As leituras de oxigênio dissolvido em porcentagem foram convertidas para mol.L<sup>-1</sup> de acordo com a lei de Henrys (Eq. 54) (DORAN, 2013):

$$P_{AG} = P_T y_{AG} = H * C_{AL}^* \quad (54)$$

Onde  $P_{AG}$  é a pressão parcial do componente A,  $P_T$  a pressão total,  $y_{AG}$  a fração de gás do componente A e  $C_{AL}^*$  a concentração do gás em equilíbrio na interface gás-líquido. Considerando o efeito do soluto na solubilidade do oxigênio, o  $C_{AL}^*$  calculado foi considerado 15% menor do que seria em água pura, com base em valor aproximado ao descrito na literatura para meios de cultura com presença de sais. De acordo com Doran (2013), é possível recalculer o  $C_{AL}^*$  em sistemas onde há um suprimento de oxigênio enriquecido, apenas adotando a abordagem linear quando a temperatura é constante, de modo que o ‘ $H$ ’ permaneça constante (Eq. 55). Este é um passo importante porque o ‘ $C_{AL}^*$ ’ afetar a força motriz da porção OTR da Equação. A Eq. 55 abaixo, denota a relação proporcional entre dois estágios do mesmo gás.

$$\frac{P_{T2} y_{AG2}}{P_{T1} y_{AG1}} = \frac{C_{AL2}^*}{C_{AL1}^*} \quad (55)$$

Entretanto, cada sistema tem suas próprias características, e para este trabalho a correlação linear não foi capaz de representar a concentração real de oxigênio em equilíbrio na interface. Talvez devido às características reológicas que o meio atingiu, que adicionaram mais resistência, e a pressão do gás não foi forte o suficiente para superar completamente. O efeito resultante na resposta do modelo quando o suprimento de oxigênio é ligado, é aumentar o OTR de forma que o OUR não consegue acompanhar, uma vez que o OUR depende apenas da demanda de biomassa e não leva em conta a dificuldade em assimilar esse oxigênio, criando então um valor calculado muito maior para a COD do que o observado em dados experimentais reais. Para corrigir este problema a abordagem adotada foi modificar a

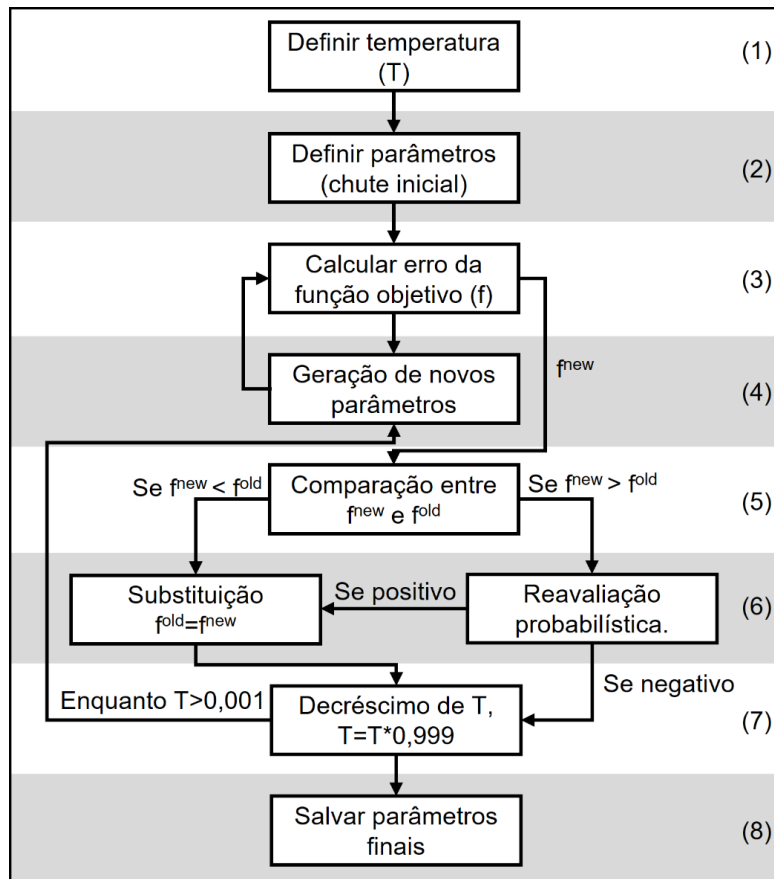
equação  $k_L a$  para compensar este efeito, o que provou ser um desafio, ou adicionar um peso à quantidade de oxigênio extra a ser fornecido, reajustando a maneira como calculamos o novo  $C^*_{AL2}$ . Essa segunda abordagem se mostrou eficaz. A modificação está representada a seguir nos cálculos que levaram a nova equação de proporcionalidade (Eq. 56).

$$\begin{aligned}
 \text{Henry's law}|_{T=cte}: C^*_{AL2} &= \frac{P_{T2}y_{AG2}}{P_{T1}y_{AG1}} * C^*_{AL1} \\
 \text{Concentração adicionada} &= C^*_{AL2} - C^*_{AL1} \\
 \text{Concentração adicionada} &= \frac{P_{T2}y_{AG2}}{P_{T1}y_{AG1}} * C^*_{AL1} - C^*_{AL1} \\
 \text{Concentração adicionada corrigida} &= \left( \frac{P_{T2}y_{AG2}}{P_{T1}y_{AG1}} - 1 \right) * w * C^*_{AL1} \\
 C^*_{AL2} &= \left( \frac{P_{T2}y_{AG2}}{P_{T1}y_{AG1}} - 1 \right) * 0.3C^*_{AL1} + C^*_{AL1} \quad (56)
 \end{aligned}$$

Onde 0,3 é o peso dado ao excedente em concentração de oxigênio a ser adicionado ao sistema. Neste trabalho, o termo  $C^*_{AL}$  é representado pelo termo  $O^*_2$ .

#### 4.3.2. Ajuste dos parâmetros ao modelo

Os parâmetros do modelo cinético para os cultivos em batelada foram ajustados utilizando a técnica probabilística chamada *Simulated annealing*. A ideia por trás do método está relacionada ao aquecimento de um metal que permitirá que as partículas encontrem a conformação de menor energia ao final de um lento esfriamento uma vez que em altas energias as partículas possuem maior probabilidade de escapar dos pontos de mínima energia locais em movimentos aleatórios para migrarem para regiões de mínima energia global. Esse método proposto por Kirkpatrick em 1983 (NELLES, 2020) segue os passos demonstrados na Figura 10 abaixo.



**Figura 11:** Ordem de procedimentos aplicados para resolução de um problema de otimização pelo método *Simulated annealing*, usando como base a ideia de resfriamento de um material.

O primeiro passo é a escolha de uma temperatura suficientemente alta para que seja possível atingir todos os estados de energia do campo potencial. O segundo passo, define os chutes iniciais e a região de busca de cada parâmetro delimitada por limites superiores e inferiores. No passo 3, a função objetivo dada pelas equações 57-60, abaixo, representam a diferença entre os dados experimentais e os encontrados pelo modelo (HORTA, 2008), encontrando o “erro” associado à escolha dos parâmetros. O passo 4, responsável pela geração dos novos parâmetros deve respeitar os limites inferiores e superiores impostos para cada parâmetro, gerando de forma aleatória (estocástica) os novos valores, que serão reenviados ao passo 3 para novo cálculo da função objetivo. Na sequência, passo 5, os novos valores serão comparados aos antigos e poderão seguir dois caminhos distintos, a depender se o valor do erro é menor ou maior do que o atual. No passo 6, em caso de erro menor, os dados de parâmetros atuais serão substituídos pelos novos calculados, e em caso de um maior erro, esse será avaliado segundo uma probabilidade de aceite calculada pela Equação 60, que está em função da temperatura ( $T$ ) e da diferença entre os

valores das funções objetivo dos dois grupos de parâmetros. Esse valor será comparado a um valor randômico, que se menor a probabilidade, permite a atualização dos valores para um estado de maior energia, porém se não, os antigos parâmetros se mantêm. Por fim a temperatura reduz (passo 7) e o processo reinicia do passo 4, ou finaliza (passo 8) em caso de ser atingida a temperatura mínima.

Equações da função objetivo:

$$f(C^{mod}, C^{exp}) = \sum_t \left[ \left( \frac{C_X^{mod}(t) - C_X^{exp}(t)}{w_{C_X}} \right)^2 + \left( \frac{C_S^{mod}(t) - C_S^{exp}(t)}{w_{C_S}} \right)^2 + \left( \frac{C_P^{mod}(t) - C_P^{exp}(t)}{w_{C_P}} \right)^2 + \left( \frac{C_O^{mod}(t) - C_O^{exp}(t)}{w_{C_O}} \right)^2 \right] \quad (57)$$

$$w_{C_i}(C^{exp}) = \sqrt{\frac{\sum_{t_0}^{t_f} (C_i^{exp}(t) - M)^2}{n^\circ Instâncias}} \quad (58)$$

$$M = \frac{\sum_{t_0}^{t_f} C_i^{exp}(t)}{n^\circ Instâncias} \quad (59)$$

$$h = \exp\left(-\frac{\Delta f}{T}\right) > \text{número randômico} \quad (60)$$

Onde  $C_i^{exp}$  e  $C_i^{mod}$  representam respectivamente as variáveis experimentais e as simuladas pelo modelo, com "i"  $\in \{X, S, P \text{ e } O\}$ , "t" correspondendo ao tempo e  $w_{C_i}$  o termo para normalização dos dados.

#### 4.3.3. CSTR

Para obtenção do modelo cinético para operação em um CSTR, foi realizado os balanços de massa para biomassa, produto e substrato. A equação para a concentração de oxigênio no reator já prevê um sistema contínuo. Iniciando para a biomassa temos, eq. 61:

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_X V - FX \quad (61)$$

Onde  $F/V = D$ , sendo  $D$  a taxa de diluição do reator dada por  $s^{-1}$ . O acúmulo de biomassa, eq. 62, fica:

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu_X - D) \quad (62)$$

Para o substrato eq. 63:

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS^{feed} - FS - r_s V \quad (63)$$

Onde a taxa de formação de substrato,  $r_s$ , vem da Eq. (5). Ao final o acúmulo de substrato é descrito na eq. 64:

$$\frac{dS}{dt} = D(S^{feed} - S) - X \left( m_s + \frac{\mu_X}{Y_{XS}} \right) \quad (64)$$

Para o produto, temos a eq. 65:

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_P V - FP \quad (65)$$

Onde  $r_i = \mu_i X$ , de forma que o acúmulo de produto pode ser representado pela eq. 66:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P X - DP \quad (66)$$

$\mu_X$  e  $\mu_P$  foram extraídos das equações 45 e 50, para  $r_X$  e  $r_P$  respectivamente, eq. 67 e 68.

$$\mu_X = k_X \left( \frac{X_0}{Y_X N} + N_0 \right) \left( 1 - \frac{X}{X_0 + Y_X N_0} \right) \quad (67)$$

$$\mu_P = k_P V \frac{S}{K_S + S} P^{-P*C} \quad (68)$$

O ponto ótimo para operação do CSTR, em termos da taxa de diluição, concentrações ótimas de células, substrato, oxigênio dissolvido e produto, buscando um cultivo contínuo em estado estacionário, foi calculado através da resolução do sistema de equações apresentado acima. Para isso, foi utilizado um otimizador computacional através da ferramenta MATLAB®, chamado *fmincon*, onde uma função objetivo foi minimizada seguindo as restrições apresentadas abaixo:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu_P X = DP \\ \frac{dO_2}{dt} = 0 \\ 5.5 \frac{\text{g}}{\text{L}} \leq X \leq 6.5 \frac{\text{g}}{\text{L}} \\ \text{Função objetivo} = \left| \frac{dS}{dt} \right| \end{array} \right.$$

Tais restrições foram definidas seguindo o observado experimentalmente nos cultivos em batelada, buscando manter o cultivo dentro da faixa de maior produtividade e com a variação de produto em zero,  $dP/dt = 0$ , para manter a viscosidade constante. Uma vez definidas as restrições de não variação do oxigênio dissolvido e da concentração de produto, e dada uma faixa aceitável de variação da biomassa, a função objetivo passou a ser a busca em reduzir a queda da concentração de substrato do meio, visando a manutenção do cultivo por longos períodos de tempo sem afetar a produção. Por fim, para a resolução das equações diferenciais foi utilizado o *solver ode45*. O Quadro 1 abaixo apresenta o código para simulação do processo.

**Quadro 1:** Código em MATLAB® utilizado para simulação do sistema partindo de um cultivo em batelada para um cultivo em CSTR, objetivando encontrar os pontos ótimos de operação através de otimizador não-linear.

#### Obtenção do ponto ótimo de operação – fmincon MATLAB® - Script

```
%Entradas
```

```
input_0 = [D, Cs_feed, Co_feed, N]; %Valores iniciais a serem otimizados, na ordem: taxa de diluição, concentração de substrato na alimentação, concentração de O2 na alimentação, e agitação;
```

```
%Configuração do otimizador
```

```
lb = [0.01, 25, 0.21, 10]; ub = [1.00, 100, 0.7, 14]; %Limites inferiores e superiores;
```

```
A = []; b = []; Aeq = []; beq = []; %Igualdades e desigualdades lineares inexistentes;
```

```
[input_optimal, fval] = fmincon(@f_obj,input_0,A,b,Aeq,beq,lb,ub,@f_constraint) %Chamando a função do otimizador;
```

```
function obj = f_obj(input) %Função objetivo = |rs|;
```

```
[dC_batch,dC_cstr,t,C] = CSTR_xanthan(input); %Resolvendo o modelo; dC: taxas de variação de X, S, P e O. C: perfis de concentrações de X, S, P e O ao longo do tempo "t".
```

```
obj = abs(dC_cstr(2));
```

```
end
```

```
function [cieq, ceq] = f_constraint(input) %Função para limitadores;
```

```
[dC_batch,dC_cstr,t,C] = CSTR_xanthan(input); %Resolvendo o modelo;
```

```
cieq = []; %Nenhuma desigualdade existente;
```

```

ceq(1) = dC_cstr(3); % rp = 0;
ceq(2) = dC_cstr(4); % ro = 0;
end
%FUNÇÃO DO SISTEMA
function [dC_batch, dC_cstr, t_total, C_total, Cb] = CSTR_xanthan(input);

t = 0; step = 1; %Tempo inicial e tamanho do passo em horas;

Cx0 = 0.0412368; Cs0 = 25; Cp0 = 2.6; Co0 = 0.00020705; %Condições iniciais;

Cx = Cx0; Cs = Cs0; Cp = Cp0; Co = Co0;

%Condições para início em batelada

D = 0; %Não há troca de meio de cultivo;

O2_feed = 0.00021; %Concentração de O2 em mol/L quando alimentado apenas com ar;

%Monitoramento para condições de troca de batelada para contínuo

while D == 0

    input_full = [D,Cs_feed,Co_int,N,t1,t2,Cx,Cs,Cp,Co,Cx0]; %Atualização em loop das entradas;

    [t,C_batch,C_endb] = CSTR_solver (input_full); %Resolvendo o Sistema para batelada.
    C_endb: Valores finais de concentração de X, S, P, e O.

    if C_endb(4) <= 0.00013 %Averiguação de nível mínimo de oxigênio dissolvido;

        Co_int = (input(3)+0.49)/3273.628; %Ajuste para nova concentração na alimentação de O2;

    end

    if C_endb(1) >= 5.9 || C_endb(3) >= 45 %Limites determinados para troca de batelada para
    CSTR;

        D = input(1) %Ajuste para nova taxa de diluição;

        Cx = C_endb(1); Cs = C_endb(2); Cp = C_endb(3); Co = C_endb(4); %Atualizando novas
        concentrações;

        Cb = [C_endb(1),C_endb(2),C_endb(3),C_endb(4)]; %Salvando dados finais da batelada;

        t1 = t2; %Início do cstr após término da batelada;

        t2=t2+step;

        input_full = [D,Cs_feed,Co_int,N,t1,t2,Cx,Cs,Cp,Co,Cx0]; %Entradas para início do CSTR;

        break %Finalizando o looping "While" da batelada;

```

```

end

t2 = t2 + step; %Enquanto condição do loop "While" for mantida, aumenta-se o valor de um
passo ao tempo final de simulação;

end

dC_batch = CSTR_ode(0,C_endb,D,Cs_feed,Co_int,N,Cx0); % Cálculo das taxas de evolução
durante o processo batelada;

while t2<=60 %Tempo total de simulação

    [t_cstr,C_cstr,C_endc] = CSTR_solver(input_full); %Simulação CSTR.

    %Aplicação dos limites inferiores e superiores de operação para as variáveis de estado

    Cx = C_endc(1); Cs = C_endc(2); Cp = C_endc(3); Co = C_endc(4);

    if C_endc(1) >= 7 || C_endc(1) <= 5 || C_endc(2) >= 35 || C_endc(2) <= 5 ...

        || C_endc(3) >= 53 || C_endc(3) <= 40 || C_endc(4) >= 0.0007 || C_endc(4) <= 0.00005

            break

    end

    t2 = t2+step

    input_full = [D,Cs_feed,Co_int,N,t1,t2,Cx,Cs,Cp,Co,Cx0];

end

dC_cstr = CSTR_ode(0,C_endc,D,Cs_feed,Co_int,N,Cx0)

t_total = [t_batch;t_cstr];

C_total = [C_batch;C_cstr];

end

%FUNÇÃO PARA RESOLUÇÃO DA EDO

function [t,C_dyn,C_end] = CSTR_solver(input_full)

    D=input_full(1); Cs_feed = input_full(2); Co_int = input_full(3); N = input_full(4); t1 = input_full(5);
t2 = input_full(6); Cx = input_full(7); Cs = input_full(8); Cp = input_full(9); Co = input_full(10); Cx0 =
input_full(11);

    x0 = [Cx, Cs, Cp, Co].'; %Condições iniciais;

    [t,C_dyn] = ode45(@(t,C)CSTR_ode(t,C,D,Cs_feed,Co_int,N,Cx0),[t1 t2],x0); %ode45 solver ;

    C_end = C_dyn(end,:).';

end

```

```

%FUNÇÃO MODELO CINÉTICO
function dCdt = CSTR_ode(t,C,D,Cs_feed,Co_int,N,Cx0)

Cx = C(1); Cs = C(2); Cp = C(3); Co = C(4);

%Parâmetros

kx = 0.40; Yxn = 7.8; ms = 0.1227; Yxs = 0.6507; ks = 4.6396; kp = 1.9315; p = 0.0144; f = 0.8;
g = 1.431; h = 0.488; i = 0.131; j = 1.193; mo = 4.0e-06; Yox = 1.7613e+04; o = 0.1; R = 0.000002;
V = 4; Cn0=0.88; Q = 6.96189715;

%Neural Network – Parâmetros de reologia k e n;
k_NN = load ('NN_k.mat'); k_net=k_NN.BestNet; k = sim(k_net,Cp');
n_NN = load ('NN_n.mat'); n_net=n_NN.BestNet; n = sim(n_net,Cp');

%Viscosidade e coeficiente de transferência de massa
kla = f.*(N.^g).*((Q./60000).^h).*(k.^i).*(n.^j);

%Modelo cinético
ux = kx.*((Cx0./Yxn)+Cn0).*(1-(Cx./(Cx0+(Yxn.*Cn0))));
dxdt = (ux-D).*Cx;
dsdt = D.*(Cs_feed-Cs)-Cx.*(ms + (1./Yxs).*ux);
dpdt = kp.*V.*(Cs./(ks+Cs)).*(Cp.^(-Cp.*C5)).*Cx - D.*Cp;
dodt = kla.*(Co_int-Co)-Cx.*(mo+((o./Yox).*ux))-R;

dCdt = [dxdt, dsdt, dpdt, dodt].';

end

```

#### 4.4. Análises de Operabilidade

Para a definição do grupo DOS foi utilizada a mesma abordagem anterior para a seleção das restrições para resolução do sistema de equações não lineares do modelo do CSTR. Também levou em consideração nessa definição o ponto ótimo de operação encontrado pós otimização com o *fmincon*, de maneira que a região de operação garanta um resultado no entorno desse ponto. As faixas de operação das variáveis manipuladas, AIS, foram determinadas de acordo com as limitações do

sistema. Na Tabela 3 abaixo seguem os grupos de variáveis manipuladas e controladas assim como as suas regiões de operação ou controle.

**Tabela 3:** Variáveis para o estudo de operabilidade.

| <b>Entradas (Manipuladas) - AIS</b>    | <b>Saídas (Controladas) - DOS</b>        |
|--|--|
| D [0,03 – 0,1 h <sup>-1</sup> ]        | P [45 – 51 g/L]                          |
| N [10 – 14 s <sup>-1</sup> ]           | X [5 – 7 g/L]                            |
| S <sup>feed</sup> [25 – 100 g/L]       | S [15 – 25 g/L]                          |
| O <sub>2</sub> [0,0002 – 0,0007 mol/L] | O <sub>2</sub> [0,00005 – 0,00015 mol/L] |

O Quadro 2 abaixo apresenta as adaptações para simulação do processo e análise de Operabilidade em torno do ponto ótimo do processo.

**Quadro 2:** Código em MATLAB® para chamada da função do sistema 4x4 (entradas x saídas) responsável por simular o processo em CSTR, utilizado no estudo de Operabilidade no aplicativo *Operability App*.

### Simulação cultivo contínuo e análise de operabilidade – MATLAB ®

**%Entradas**

u = [D, Cs\_feed, Co\_feed, N]; **%Valores obtidos através do otimizador: D = 0,0704; Cs\_feed = 31,192; Co\_int = 0.00049; N = 13,015. Podem ser inseridos manualmente para simples simulação ou através do aplicativo Operability App.**

**function** [y]=sys4x4(u)

D = u(1); Cs\_feed = u(2); Co\_int = u(3); N = u(4);

Input\_0 = [D, Cs\_feed, Co\_feed, N];

[dC\_batch,dC\_cstr,t,C,k,n,Cb] = CSTR\_xanthan(input\_0); **%Utilizar a FUNÇÃO DO SISTEMA descrita no quadro anterior.**

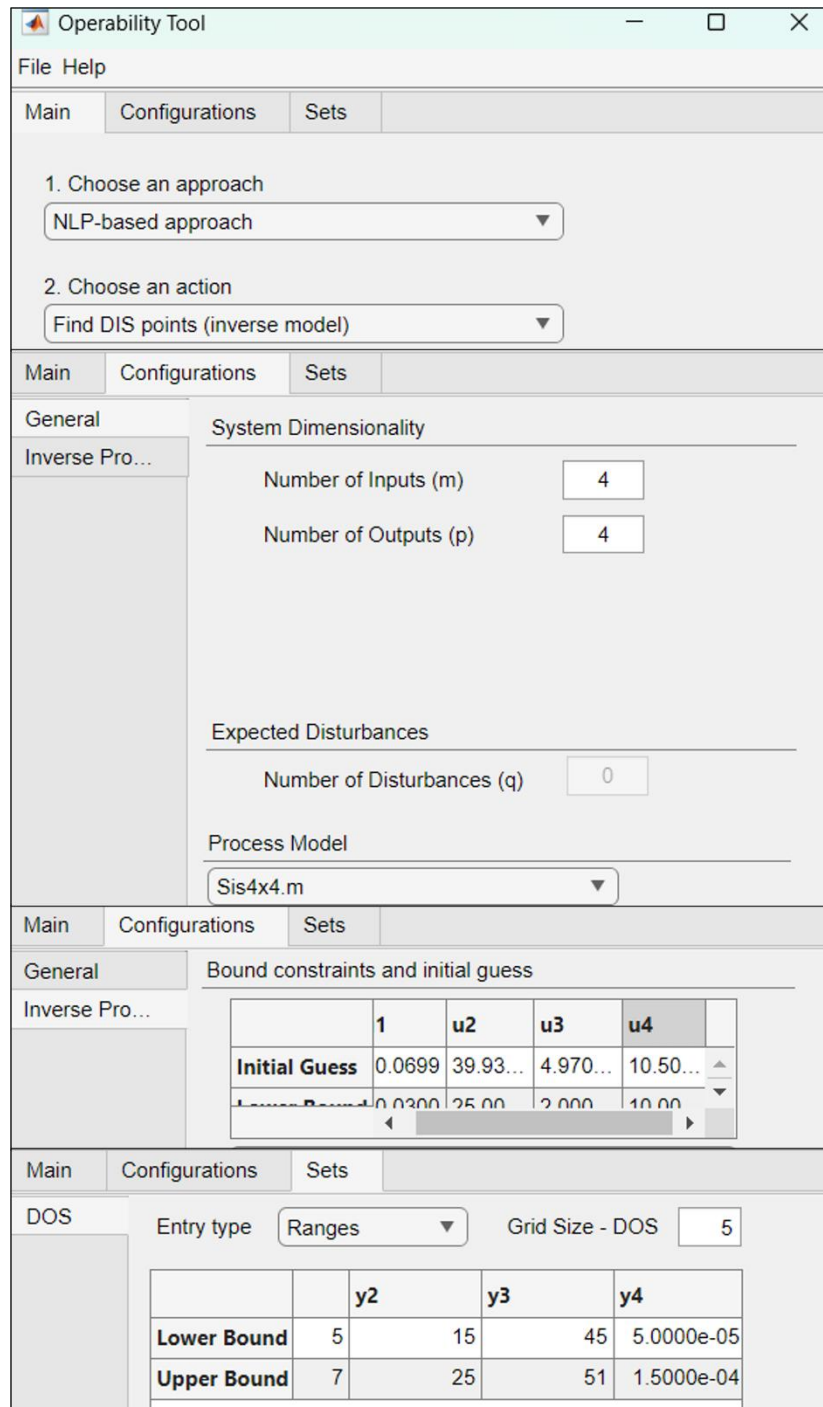
y = [C(end,:)]; **%Objetivo é avaliar a condição final do cultivo;**

**end**

Para aplicação da análise de operabilidade, foi utilizada uma ferramenta computacional desenvolvida em MATLAB® pelo grupo de pesquisa *CODES* do Prof. Dr. Lima, que visa facilitar a integração de design e controle através de análises de operabilidade sendo denominada “*Operability App*”

(<https://fernandolima.faculty.wvu.edu/operability-app>) (GAZZANEO *et al.*, 2020). O manejo e configuração do aplicativo para a aplicação nesse estudo está sendo mostrada na Figura 12.

A análise de operabilidade é útil para nos ajudar a estudar e definir uma região operacional viável (DIS\*) em torno do ponto ótimo para o controle das variáveis manipuladas do nosso sistema CSTR ( $D$ ,  $S^{\text{feed}}$ ,  $Y_{O_2}$ ,  $N$ ) onde podemos manter a saída ( $X$ ,  $S$ ,  $P$ ,  $O$ ) em uma região desejada (DOS), considerando possíveis variações com as quais nosso controle teria que lidar, incluindo o conjunto de perturbações esperadas (EDS) nos parâmetros, dado neste caso pelo desvio padrão (DP) dos parâmetros, obtido pelos ajustes dos parâmetros às diferentes condições de cultivo. Para definir o DOS, a mesma região de restrições para o sistema de equações não lineares foi usada no CSTR. As faixas de operação das variáveis manipuladas, Conjunto de Entrada Disponível (AIS), foram determinadas de acordo com as limitações do sistema. O EDS foi definido como o DP de quatro parâmetros, " $k_X$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $k_P$  e  $f$ ", onde eles foram avaliados como pares para reduzir a quantidade total de pontos da região e conseqüentemente o esforço computacional.  $k_X$  e  $Y_{X/S}$ , relacionados à formação de biomassa, foram definidos como um par, e  $k_P$ , e  $f$ , relacionados à formação de produto e oxigênio dissolvido, como outro. Dessa forma, a região foi formada por 8 pontos, cada par mais e menos seu DP, e o par sem alteração, sendo concatenados entre si. Os pontos foram avaliados após um tempo arbitrário de 60 horas de cultivo simulado.



**Figura 12:** Configurações aplicadas ao *Operability App* para estudo de operabilidade utilizando a abordagem NLP (*Natural Language Processing*), para obtenção das regiões de operação possíveis para os resultados desejados, DIS\* (*Feasible Desired Input Set*). Fonte: Acervo pessoal.



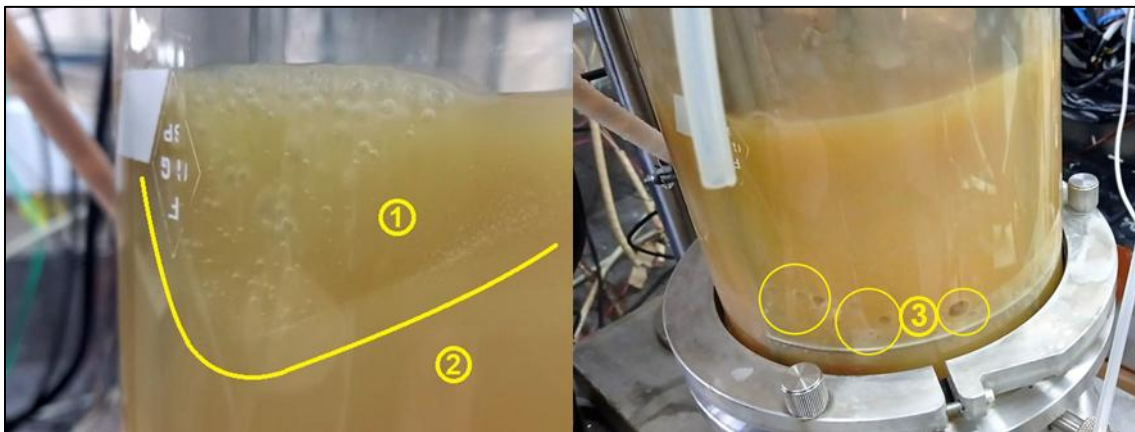
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados cultivos em biorreatores em escala de bancada para obtenção de dados e condução de testes de monitoramento de reologia do caldo de cultivo. Os dados foram tratados e utilizados para a modelagem cinética do processo que envolveu um modelo fenomenológico híbrido com uma RNA. Modelo este, que serviu como base para a simulação da proposta de produção e controle da viscosidade via um cultivo contínuo em CSTR. O sistema de produção foi simulado em diversas condições através um estudo de capacidade de operação (Operabilidade), e foi validado com a realização de um teste final experimental. O objetivo final foi propor, executar e avaliar um sistema operável e eficiente de produção de goma xantana, no qual a viscosidade do caldo de cultivo durante o processo não atingisse níveis inibitórios à própria produção.

Durante a condução dos cultivos experimentais realizados, regiões com alta densidade de goma xantana se formaram, sendo possível o reconhecimento de um meio heterogêneo dentro do vaso do biorreator. É de fácil identificação que há a separação do caldo em duas fases com diferentes mobilidades, e através da Figura 13 é possível notar a diferença entre as regiões 1 e 2. Durante o cultivo a região 2 apresentava uma mobilidade do caldo muito maior, enquanto a região 1 com baixíssima mobilidade se expande constantemente até ocupar as paredes do vaso do biorreator. Esse processo de acúmulo se iniciou por volta de vinte e cinco horas de cultivo. O líquido foi suficientemente viscoso para não se misturar e se manter estático juntamente com as demais regiões estáticas do biorreator, como as paredes e chicanas. As fotos apresentadas na Figura 13 foram retiradas do cultivo realizado utilizando biorreator de 6 L. A região 3 na Figura 13, mostra o momento no qual a região mais densa tomou toda a parede do biorreator, e é possível identificar as bolhas de ar presas, indicando a falta de mobilidade do meio, reduzindo consideravelmente as trocas de massa e transferência de oxigênio para o caldo. Essas bolhas quando se soltam saem do reator carregando boa parte do oxigênio com elas, e muitas vezes o sensor de O<sub>2</sub> dissolvido captura essas bolhas e realiza uma leitura imprecisa.

Apesar da grande quantidade de estudos publicados envolvendo a produção da goma xantana em reatores de tanque agitado, não foram encontrados muitos

relatos sobre esse fenômeno, mesmo nos estudos que tratam da importância da transferência de oxigênio nesse processo. Vignesh, Arumugam e Ponnusami (2015), por sua vez, citou a possível formação dessas zonas se não houvesse uma boa mistura do meio. Considerando que o objetivo principal em uma produção industrial é sempre aumentar a produção por tempo, cultivos em batelada tendem a atingir cada vez maiores concentrações de produto, e para o caso da goma xantana, viscosidades mais elevadas, ultrapassam a capacidade de mistura de impelidores convencionais, como observado nos experimentos realizados.

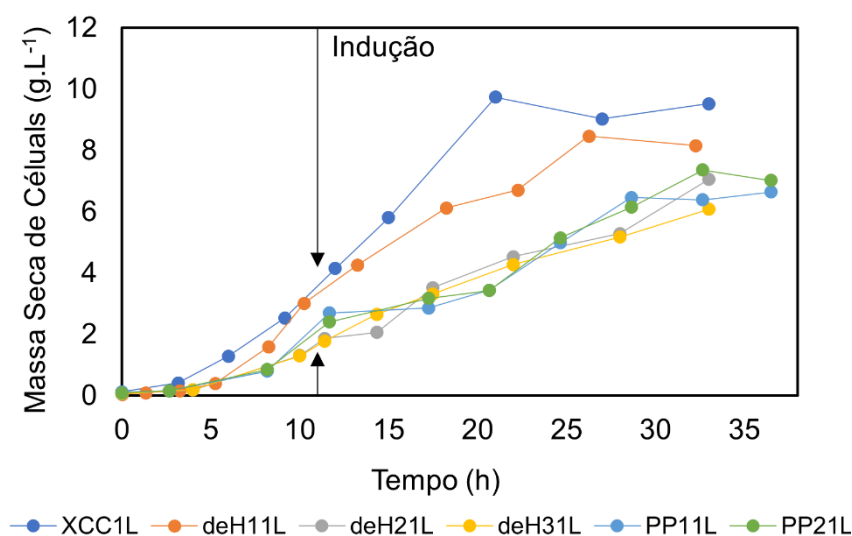


**Figura 13:** Formação de aglomerados de produto próximos às superfícies estáticas como chicanas e paredes do vaso do reator, impedindo uma transferência de massa eficiente. (1) Zona de alta viscosidade e baixa turbulência; (2) Região sem alterações no meio de cultivo com baixa viscosidade; (3) Bolhas de ar presas já em um estágio mais avançado de cultivo.

### 5.1. Cultivos em reator de 1 L

Foram realizados cultivos com as linhagens recombinantes, XCC\_deH e XCC\_PP, e com a linhagem parental, XCC. Os momentos de realização dos experimentos também foram distintos, alterando alguns parâmetros como tempo total de batelada, a quantidade e intervalo entre pontos de amostragem, e lote de reagentes. Porém, a alteração das linhagens e algumas condições, não se configura um problema, uma vez que a reprodutibilidade não é fator de interesse, já que o objetivo do modelo é ser capaz de se adaptar às oscilações de produção, consumo e crescimento que diferentes linhagens de *Xanthomonas* possam apresentar durante a produção da goma.

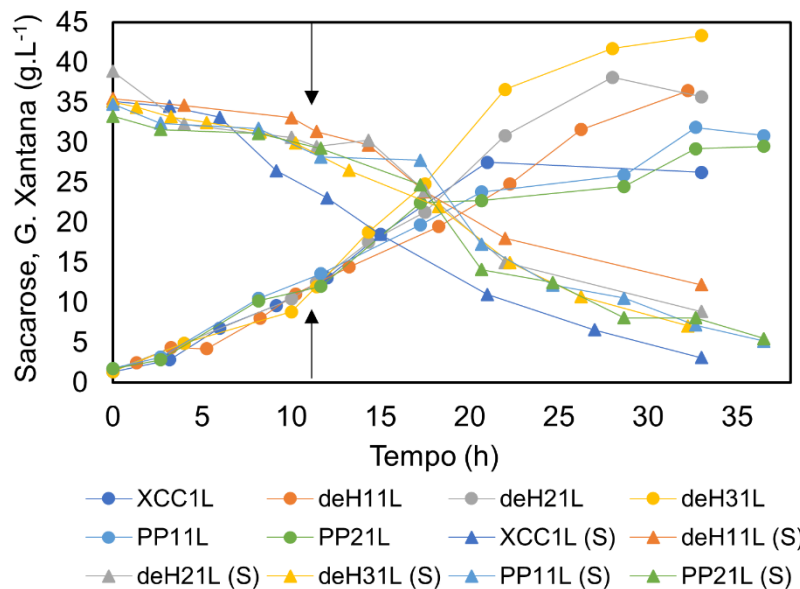
Ao comparar as curvas de crescimento celular, fica claro algumas variações nas taxas de formação da biomassa (Figura 14), o que gera um desvio padrão entre os valores máximos de células próximo a 1,3 g/L, e uma diferença de mais de 3 g/L entre as linhagens que mais e menos cresceram. Essa diferenciação, não coincidentemente, deve principalmente ao desvio das rotas metabólicas sofrido pelas linhagens modificadas, ocasionando um menor crescimento celular em comparação com a linhagem não modificada geneticamente. Entretanto, o principal fator é que o comportamento das curvas se manteve similar.



**Figura 14:** Curva de crescimento celular ao longo dos cultivos realizados nos biorreatores Minifors2. A dupla de setas no gráfico indica o momento da indução por L-arabinose. O primeiro número à frente do nome da linhagem é referente a réplica, e o segundo é referente ao volume nominal (Indicado como sendo 1 L para facilitar apresentação dos dados, porém o volume real é de 900 mL)

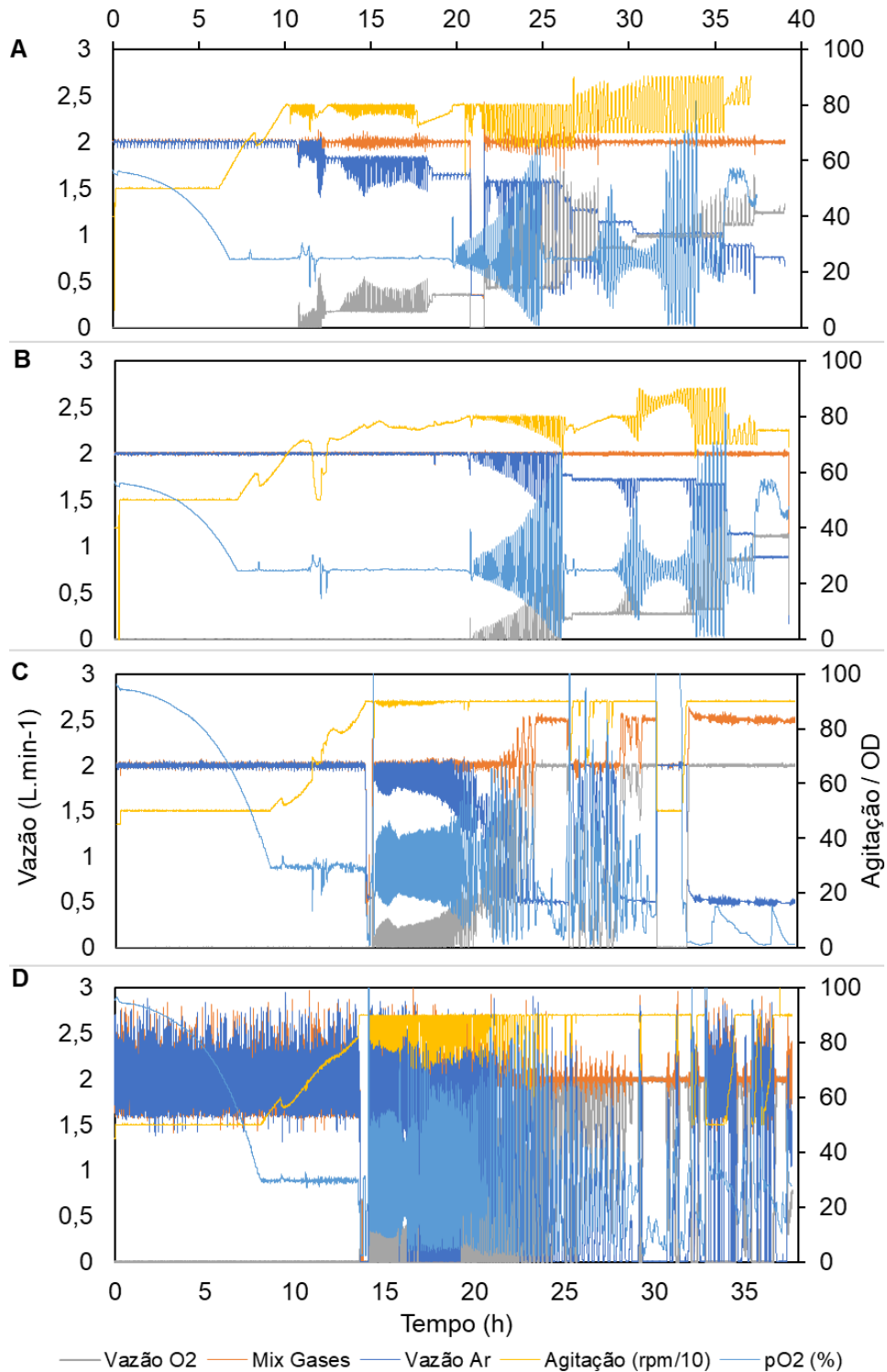
Para o consumo de substrato e a formação de produto (Figura 15), o mesmo comportamento similar nas curvas de evolução ocorreu. A taxa de assimilação de substrato, assim como para a biomassa foi novamente próximo entre todas as linhagens e cultivos, diferenciando um pouco apenas para a linhagem parental, XCC. Ainda com relação às curvas de consumo de substrato, é possível notar um excedente de substrato ao final do cultivo, interrompido pois a transferência de oxigênio se tornou extremamente baixa ou nula e como podemos observar pela curva de goma xantana, não estava mais havendo a formação de produto (onde há margem para aprimoramento), mostrando que o substrato não foi o fator limitante. Porém significantes variações na produção final foram observadas, com destaque de

produção para as linhagens expressando a proteína UDPG-deH, como já havia sido relatado por Oliveira et al. (2025).



**Figura 15:** Curvas de produção de goma xantana e consumo de sacarose ao longo dos cultivos realizados nos biorreatores Minifors2. O símbolo “(S)” indica que se trata da curva de consumo de sacarose. A dupla de setas no gráfico indica o momento da indução por L-arabinose. O primeiro número a frente do nome da linhagem é referente a réplica, e o segundo é referente ao volume.

A Figura 16 traz o comportamento ao longo do tempo de cultivo dos principais parâmetros de controle do biorreator em quatro cultivos, sendo que A e B receberam a mesma linhagem entre eles, assim como C e D. Com exceção do cultivo na Figura 16-D em que houve ruído demasiado nos controles, mas que no geral também manteve o comportamento semelhante, a variação dos parâmetros dos demais apresentaram o mesmo perfil. Os dados ruidosos demonstram a limitação do sistema de controle.



**Figura 16:** Comportamento dos principais parâmetros ao longo do cultivo em batelada das linhagens XCC\_deH e XCC\_PP, em duplicata, utilizando biorreator Minifors2 de 1L. (A) XCC\_PP2; (B) XCC\_PP1; (C) XCC\_deH2; (D) XCC\_deH1.

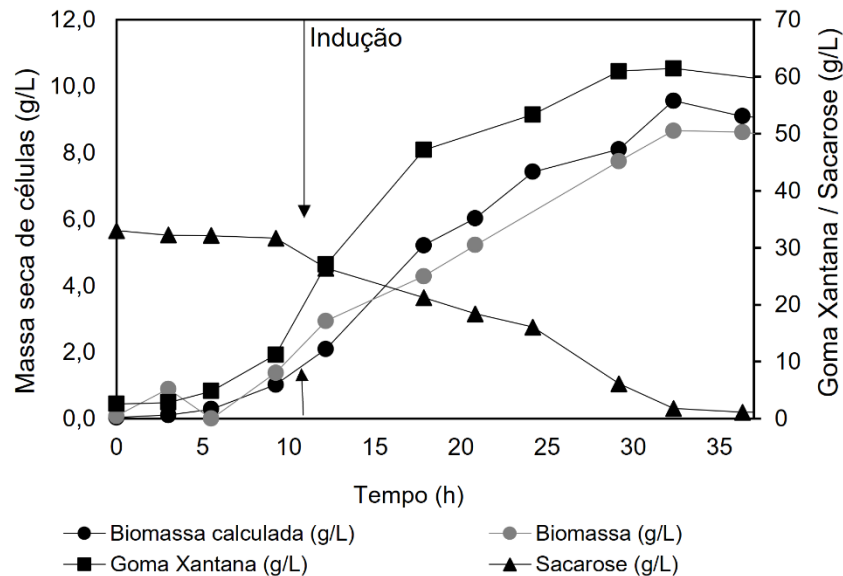
Antes das primeiras 15 horas de cultivo, não se mostrou necessária a suplementação da vazão de ar com O<sub>2</sub> puro, pois somente a variação da agitação foi

o suficiente para manter a porcentagem de oxigênio dissolvido (OD) na faixa desejada. Após aproximadamente 15 horas de cultivo as células começam a entrar na fase estacionária, a concentração de goma acumula de forma significativa, e nesse momento o controle PID eleva a velocidade de agitação para os limites superiores indicando a necessidade de iniciar a entrada de oxigênio puro. Mas a partir desse momento o controle passou a intercalar momentos estáveis e instáveis, deixando o OD muito próximo de zero várias vezes. Esse efeito pode estar relacionado às leituras não precisas do sensor de O<sub>2</sub> dissolvido, como discutido anteriormente.

## 5.2. Cultivos no reator de 6 L

A Figura 17 apresenta os dados experimentais de biomassa (XCC\_deH) medidos em massa seca (g.L<sup>-1</sup>), biomassa calculada a partir das medições de densidade ótica (DO) utilizando a curva de calibração de Oliveira, et al. (2025), e as concentrações de goma xantana e de sacarose. Para esse cultivo foi realizado novamente o acompanhamento da biomassa pelo método de massa seca e pela DO, medidas a 600 nm, e os dados demonstram que a curva de calibração obtida anteriormente chegou a valores próximos ao obtido por massa seca.

A produção da goma é caracterizada como sendo parcialmente associada ao crescimento da massa celular, já tendo sido reportado uma maior produção durante a fase estacionária de crescimento (ALKHATEEB et al., 2018). Entretanto, no experimento conduzido o efeito observado foi de um também estacionamento da produção ao se aproximar dessa fase, o que pode ser caracterizado como uma possível inibição da produção pela presença do próprio produto. Isso poderia ocorrer por um impedimento da correta oxigenação do meio, devido à alta viscosidade, ou por algum fator metabólico das células que passou a direcionar o consumo do substrato para outras vias. Substrato esse, que foi totalmente consumido ao longo de todo o processo, se esgotando apenas nas últimas horas, e coincidindo com o início do comportamento estacionário de crescimento celular e formação de produto.

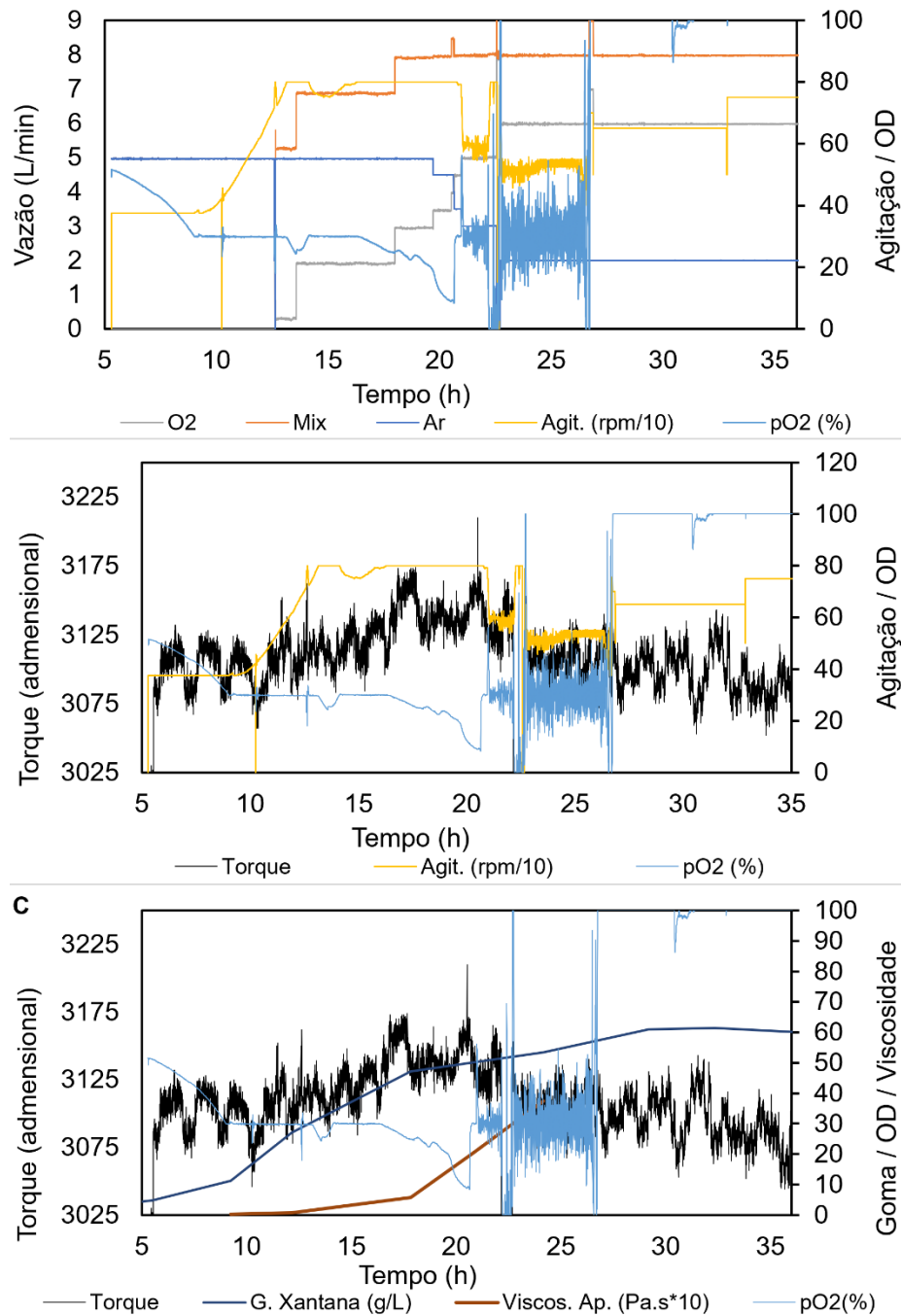


**Figura 17:** Curvas de produção de goma xantana, consumo de sacarose, crescimento celular medido em massa seca (Biomassa), e estimado a partir das medidas de densidade ótica (Biomassa calculada). As setas apontam o momento de indução com L-arabinose.

Assim como ocorreu nos cultivos em biorreator de 1 L, os controles permaneceram estáveis até certo momento, quando o controlador PID passa a não conseguir mais encontrar o ponto de estabilidade. Para esse cultivo, foi aplicado o sistema adaptado para medição de torque. As leituras de dados brutos para o torque estão na cor preta nas Figuras 18 – B e C. É possível observar uma leitura muito ruidosa pelo sistema (Figura 18-C), indicando que a potência necessária para vencer o atrito das peças mecânicas com o selo de vedação do reator impedem a identificação limpa da diferença de torque proporcionada pelo aumento na concentração de goma xantana. Ainda assim, as leituras de torque parecem ter acompanhado o aumento exponencial da viscosidade até certo ponto quando o torque cai, o que pode ser devido a separação de fases onde parte da goma deixou de ser agitada, com isso a viscosidade oscila em função da formação e crescimento dos aglomerados de goma xantana que se acumulam ao redor das partes fixas da dorna. Por essa razão, não foi dado seguimento a essa estratégia de acompanhamento da reologia por torque, levando à estratégia de predição da reologia através de aprendizado por redes neurais artificiais.

A Figura 18-C apresenta a faixa da curva de viscosidade que foi possível ser aferida devido à limitação do reômetro utilizado, mas é possível verificar o momento

de aumento exponencial da curva, atingindo um pico próximo a 25 horas de cultivo. É possível observar que o momento no qual a viscosidade começa a atingir seu pico é quando a produção de goma começa a diminuir e então cessa, e isso pode estar ligado a diversos fatores, podendo ser um sistema autorregulador da célula como um “*quorum sensing*”, evitando que a célula gaste energia produzindo o polissacarídeo que está em sobra (HE e ZHANG, 2008; SAMAL e CHATTERJEE, 2021), ou devido às limitações de oxigênio no meio, já que é diretamente ligado a produção da goma, ressaltando novamente o acúmulo de produto atrás das chicanas e próximo às paredes dos vasos, que começa a acontecer após 20 horas de cultivo, esse acúmulo forma regiões de elevada viscosidade e de baixa mobilidade e transferência de massa, tendo como reflexo a mistura ruim e a baixa oxigenação, e até mesmo pode ter afetado as coletas corretas das amostras para aferir a concentração do produto. Por fim o OD mantido próximo dos 100 % da saturação após aproximadas 27 horas de cultivo está em desacordo com os valores lidos na saída de gases, e corrobora com o fato de que os sensores de oxigênio dissolvido têm dificuldade para fazer uma leitura eficiente em um cultivo tão viscoso e heterogêneo. Portanto, a mudança de cultura em batelada para contínua é proposta aqui como uma estratégia alternativa para contornar esses efeitos provocados pelo acúmulo de produto no desempenho e monitoramento do processo.



**Figura 18:** Comportamento dos principais parâmetros ao longo do cultivo em batelada da linhagem XCC\_deH utilizando biorreator de 6 L.

### 5.3. Modelagem Cinética

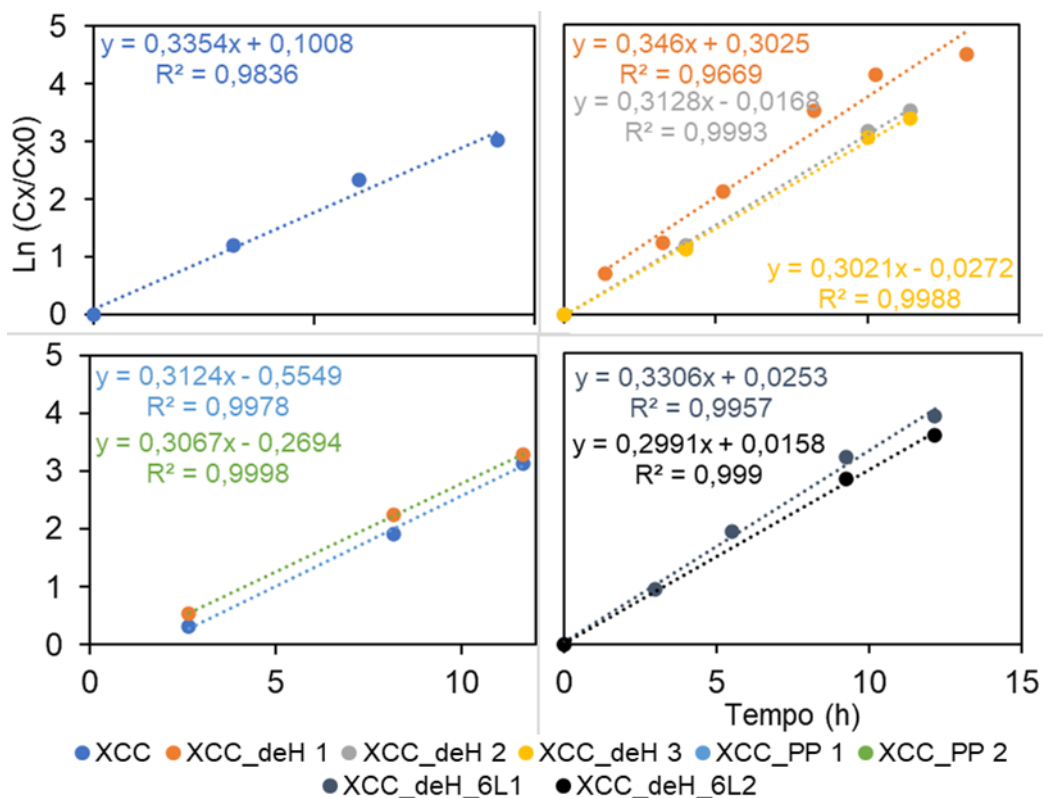
### 5.3.1. Parâmetros Gerais: $\mu_{m\acute{a}x}$ , fatores de conversão, entre outros ...

Apesar de alguns parâmetros não serem utilizados nas equações do modelo cinético, são parâmetros que valem a atenção, por darem uma ideia geral, fenomenológica e comparativa para o comportamento do cultivo de células e produção do produto. Se trata de parâmetros largamente utilizados e abordados na literatura, pois mostram dados importantes para avaliação da eficiência e rendimento do processo e estão presentes nos principais modelos cinéticos desenvolvidos. A Tabela 3 sumariza os valores absolutos dos parâmetros mais comuns e fáceis de se calcular, e servem de base para comparações entre as linhagens e com a própria literatura.

**Tabela 4:** Alguns parâmetros obtidos a partir dos cultivos, incluindo os parâmetros cinéticos,  $\mu_{m\acute{a}x}$ , que é a velocidade específica máxima de crescimento celular,  $Y_{ij}$ , que é o fator de conversão de j em i, e demais parâmetros como, P, representando a concentração máxima de produto, Pr a produtividade, S a concentração inicial de substrato, e X a concentração final de células. Erros determinados via desvio padrão.

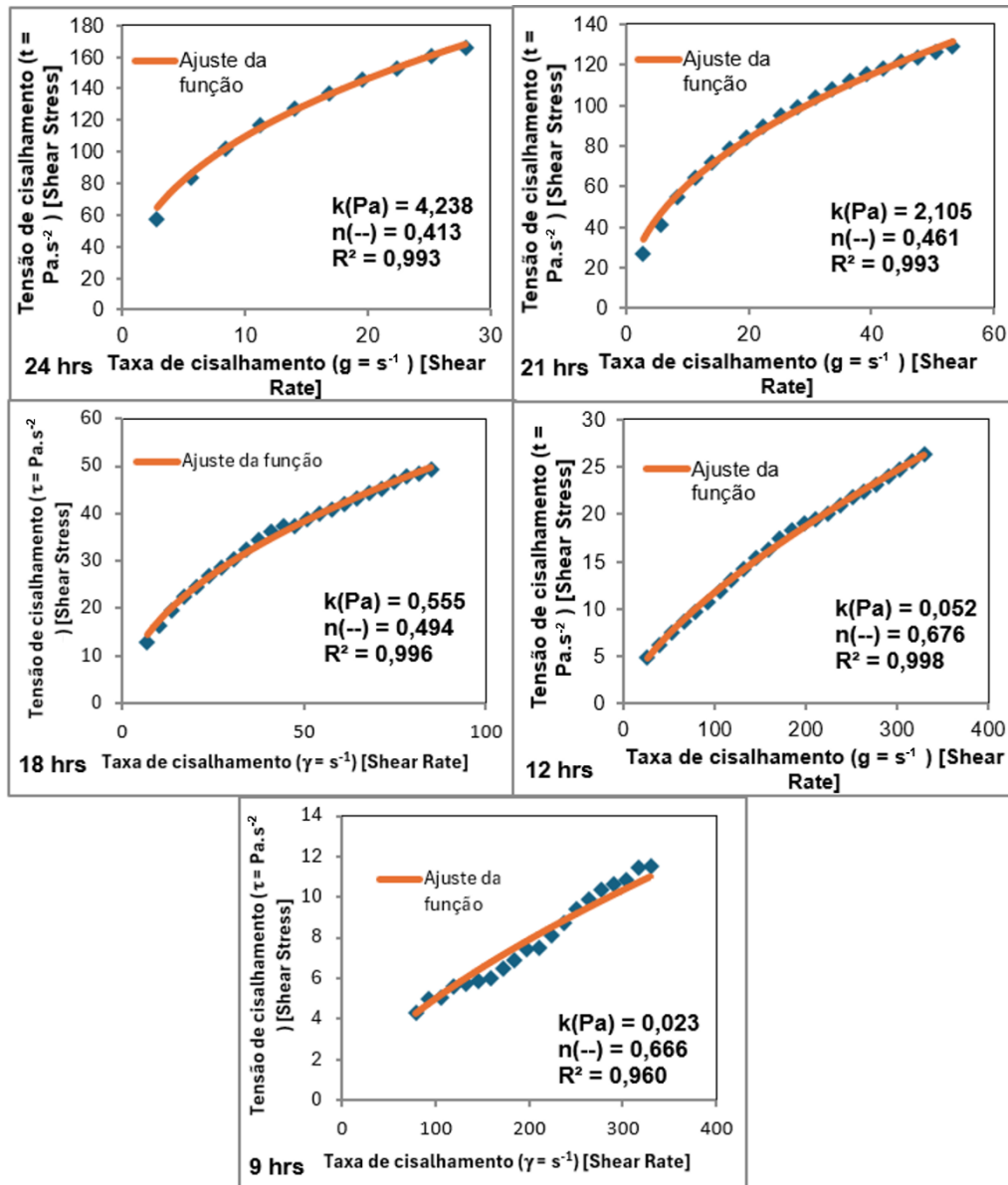
| Parâmetros                       | XCC (1 L) | XCC deH (1 L) | XCC PP (1 L) | XCC deH (4 L) |
|----------------------------------|-----------|---------------|--------------|---------------|
| $\mu_{m\acute{a}x}$ [ $h^{-1}$ ] | 0,33±0,05 | 0,32±0,02     | 0,310±0,003  | 0,31±0,02     |
| $Y_{P/S}$ [gP/gS]                | 0,80±0,03 | 1,43±0,05     | 0,64±0,04    | 3,88±0,05     |
| $Y_{X/P}$ [gX/gP]                | 0,37±0,01 | 0,19±0,05     | 0,24±0,02    | 0,15±0,01     |
| $Y_{X/S}$ [gX/gS]                | 0,29±0,01 | 0,25±0,07     | 0,16 ±0,035  | 0,36±0,04     |
| P [g/L]                          | 26,8±0,9  | 38±4          | 30,2±0,95    | 60±2          |
| Pr [g/L/h]                       | 0,77±0,03 | 1,1±0,1       | 0,87±0,03    | 1,60±0,05     |
| S [g/L]                          | 35        | 35            | 35           | 35            |
| X [g/L]                          | 9,4±0,4   | 7±1           | 6,8±0,4      | 8,8±0,45      |

A Figura 19 mostra as curvas plotadas para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), onde os valores para o coeficiente de determinação  $R^2$  foram satisfatórios, e os valores de ambas as linhagens permaneceram na mesma faixa. De acordo com a média de 0,35  $h^{-1}$  levantada no trabalho de Oliveira, *et al.* (2021), os valores estão próximos do apresentado na literatura.



**Figura 19:** Curvas de ajuste linear ao logaritmo natural do crescimento celular pelo tempo na fase exponencial de crescimento, para obtenção da velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ) para todos os cultivos realizados.

Os parâmetros de viscosidade aparente, encontrados com o auxílio de reômetro a partir de amostras coletadas do cultivo em batelada no reator de 6L, e que foram utilizados para calcular a curva de evolução ao longo do tempo para a viscosidade, que será mostrada na Figura 23-C mais a diante, passaram pelo ajuste ao modelo de potências como mostra a Figura 20. Na figura é possível verificar os valores dos parâmetros reológicos de índice de consistência e taxa de cisalhamento, utilizados para o cálculo da viscosidade. O ajuste apresentou coeficiente de determinação  $R^2$  satisfatório.

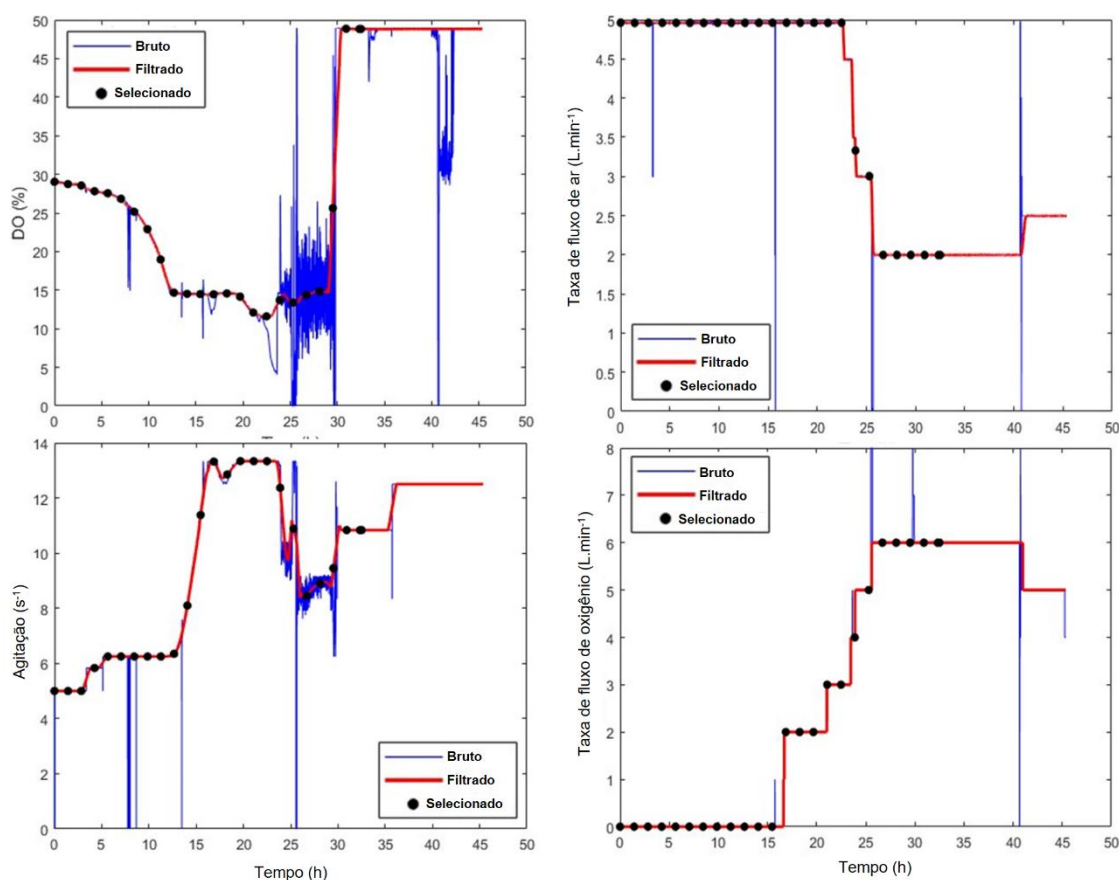


**Figura 20:** Curvas de ajuste ao modelo de Potências dos dados obtidos ao longo de parte do cultivo utilizando o reômetro *Brookfield DV III Ultra*. As amostras foram obtidas do cultivo com a linhagem XCC\_deH no biorreator de 6 L.

### 5.3.2. Tratamento dos Dados

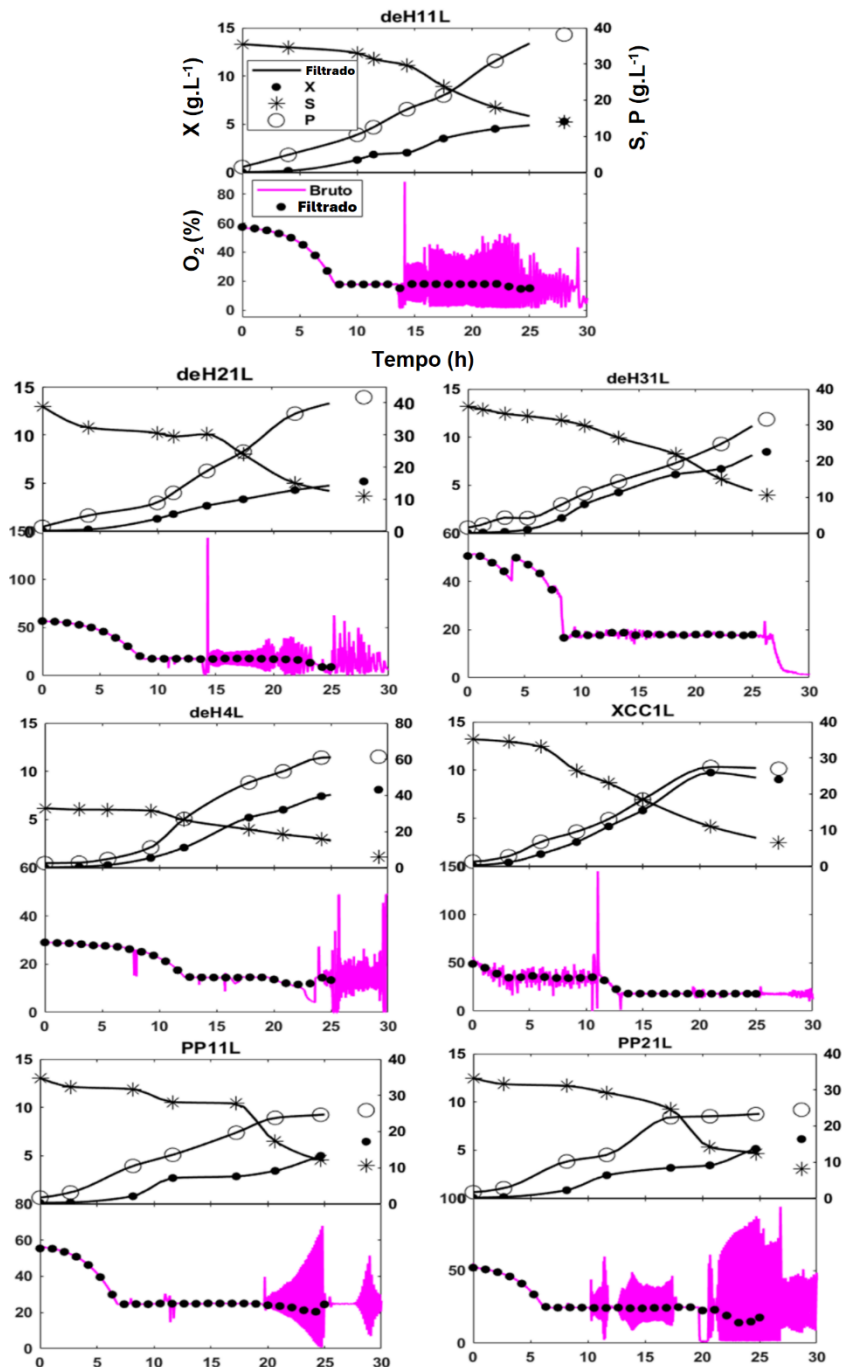
Os dados experimentais coletados apresentaram grande incidência de ruídos devido às limitações físicas do sistema de sensores frente às características reológicas apresentadas pelo caldo de cultivo quando na presença de alta concentração do produto. A Figura 21 apresenta uma mostra dos dados ruidosos e como ficaram após o tratamento desses ruídos. Tais interferências nas leituras representam um problema que vai além da capacidade de monitoramento do

processo. Elas apontam também problemas na correta mistura do caldo de cultura, que a partir de certo ponto do cultivo passa a apresentar uma característica heterogênea, como foi mostrado anteriormente na Figura 16. A má agitação do meio ocasiona uma transferência de massa deficitária em certas regiões dentro do biorreator, criando as chamadas zonas mortas, onde células serão privadas de nutrientes e oxigênio, limitando seu crescimento e produção.



**Figura 21:** Conjunto de dados brutos, contendo ruídos devido às limitações de leitura dos sensores, e os mesmos dados pós “limpeza” utilizando os métodos estatísticos de interpolação como *cubic spline* e média e mediana móvel (*threshold factor* de 1 e *Smoothing factor* de 0,025).

O tratamento dos dados foi importante para o ajuste do modelo cinético livre de interferências. A Figura 22 mostra os dados de X, S, P e O para todos os cultivos realizados após interpolação dos dados amostrais de X, S e P, utilizando o método de *Cubic Spline*, e da limpeza dos ruídos de O, utilizando os métodos de média e mediana móvel. A interpolação linear foi então utilizada para a normalização dos pontos amostrais.

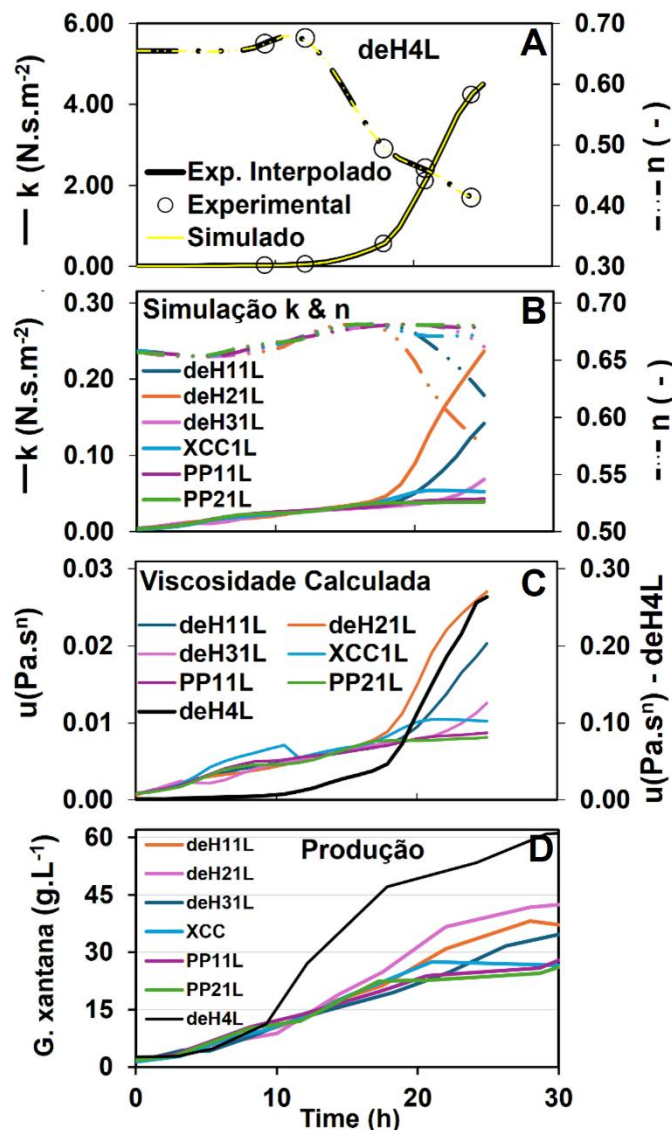


**Figura 22:** Dados experimentais brutos (em azul) dos 7 cultivos realizados e dados após tratamento. Padronização dos pontos amostrais através de métodos estatísticos de interpolação linear e *cubic spline*, e métodos estatísticos para remoção dos ruídos como média e mediana móvel (*threshold factor* de 1 e *Smoothing factor* de 0,025).

### 5.3.3. Ajuste do Modelo

Primeiramente, o treinamento da RNA para acompanhamento da reologia do meio através da concentração de produto apresentou, após ajuste aos dados do cultivo no biorreator de 6L (Figura 23-deH4L), erros quadráticos de apenas 0,18 e 0,09

para os parâmetros  $k$  e  $n$  respectivamente. A Figura 23 mostra os resultados das simulações feitas pela RNA para todos os cultivos, e a provável viscosidade aparente calculada a partir dos dados simulados. Para os cultivos da linhagem 'deH', observamos um aumento exponencial da viscosidade ao longo do tempo, como ocorreu nos dados utilizados para o treinamento. Porém o mesmo comportamento não foi observado para as demais linhagens, uma vez que a concentração de produto foi um pouco inferior. Para tentar explicar melhor esse comportamento, há de se pontuar novamente que não há uma correlação linear entre a concentração de produto e a viscosidade do meio por se tratar de uma solução com comportamento não-newtoniano. Por esse motivo, efeitos como o observado experimentalmente podem ocorrer. Uma curva exponencial de viscosidade se inicia quando a concentração de goma ultrapassa o valor de 25 g/L. Esse comportamento foi observado, aprendido e replicado pela RNA aos demais dados, seguindo um comportamento linear até que esse montante de produto seja alcançado para então iniciar a curva exponencial de aumento de viscosidade.



**Figura 23:** Curvas do processo de ajuste da RNA. O gráfico A mostra a interpolação realizada nos dados experimentais de  $k$  e  $n$  utilizados para treinar a RNA, juntamente com a curva simulada gerada.

O gráfico B descreve as curvas simuladas para os cultivos restantes, e o C ilustra a viscosidade calculada. O gráfico D mostra os dados de produção utilizados como entrada para a RNA.

Por fim, o modelo cinético desenvolvido utilizando a RNA, foi capaz de se ajustar aos dados experimentais tratados com o auxílio do método de otimização *Simulated annealing*, e conseguiu os representar com baixo erro avaliado por mínimos quadrados médios, e bons resultados de ANOVA (Tabela 5). Os valores de P na última linha da tabela, referentes a análise de variância (ANOVA), indicam que a hipótese nula,  $h_0$ , de que o grupo de valores simulados e o grupo de dados experimentais são diferentes, foi rejeitada com, em torno de, 90% de confiança para todos os ajustes.

Para os objetivos desse trabalho e objetivos de controle de processo, essa aproximação é suficiente e adequada. As curvas ajustadas do modelo cinético estão apresentadas na Figura 24, as imagens estão nomeadas de acordo com a linhagem utilizada, número da réplica e o volume do biorreator. Os valores encontrados para cada parâmetro estão apresentados na Tabela 5. Cada imagem apresenta as curvas de formação de biomassa e produto e consumo de substrato, com exceção da última, que também traz o ajuste à curva de oxigênio para o reator de 4 L.

**Tabela 5:** Parâmetros cinéticos obtidos após ajuste do modelo.

| Parâmetros                       | 900 mL               |                      |                      |                      |                      |                      | 4 L                  | Desvio Padrão      |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
|                                  | deH1                 | deH2                 | deH3                 | Xcc                  | PP1                  | PP2                  | deH4                 |                    |
| k <sub>x</sub>                   | 0,402                | 0,355                | 0,537                | 0,410                | 0,332                | 0,371                | 0,400                | 0,07               |
| Y <sub>XN</sub>                  | 5,065                | 5,006                | 5,809                | 8,334                | 4,917                | 4,917                | 7,800                | 1,34               |
| m <sub>s</sub>                   | 0,034                | 0,143                | 0,081                | 0,055                | 0,093                | 0,075                | 0,123                | 0,04               |
| Y <sub>XS</sub>                  | 0,331                | 0,257                | 0,492                | 0,412                | 0,387                | 0,398                | 0,651                | 0,08               |
| k <sub>P</sub>                   | 6,553                | 2,912                | 3,569                | 5,137                | 1,848                | 4,941                | 6,640                | 1,70               |
| K <sub>S</sub>                   | 2,521                | 2,707                | 1,228                | 1,801                | 2,045                | 2,374                | 1,931                | 0,54               |
| p                                | 0,019                | 0,017                | 0,027                | 0,034                | 0,031                | 0,032                | 0,014                | 0,01               |
| f                                | 1,820                | 1,413                | 2,358                | 2,581                | 2,326                | 2,289                | 0,800                | 0,43               |
| m <sub>o</sub>                   | 3,8.10 <sup>-6</sup> | 3,1.10 <sup>-6</sup> | 3,3.10 <sup>-6</sup> | 1,6.10 <sup>-6</sup> | 2,3.10 <sup>-6</sup> | 3,6.10 <sup>-6</sup> | 4,0.10 <sup>-6</sup> | 9.10 <sup>-7</sup> |
| Y <sub>XO</sub>                  | 6541                 | 6027                 | 7455                 | 7828                 | 5012                 | 4719                 | 17613                | 1261               |
| o                                | 0,1                  | 0,1                  | 0,1                  | 0,1                  | 0,1                  | 0,1                  | 0,1                  | 0,1                |
| R                                | 1,5.10 <sup>-5</sup> | 1,3.10 <sup>-5</sup> | 1,4.10 <sup>-5</sup> | 3,6.10 <sup>-6</sup> | 1,5.10 <sup>-5</sup> | 1,5.10 <sup>-5</sup> | 2,0.10 <sup>-6</sup> | 4.10 <sup>-6</sup> |
| <b>P<sub>valor</sub> - ANOVA</b> | 0,929                | 0,856                | 0,893                | 0,987                | 0,903                | 0,859                | 0,865                | 0,865              |

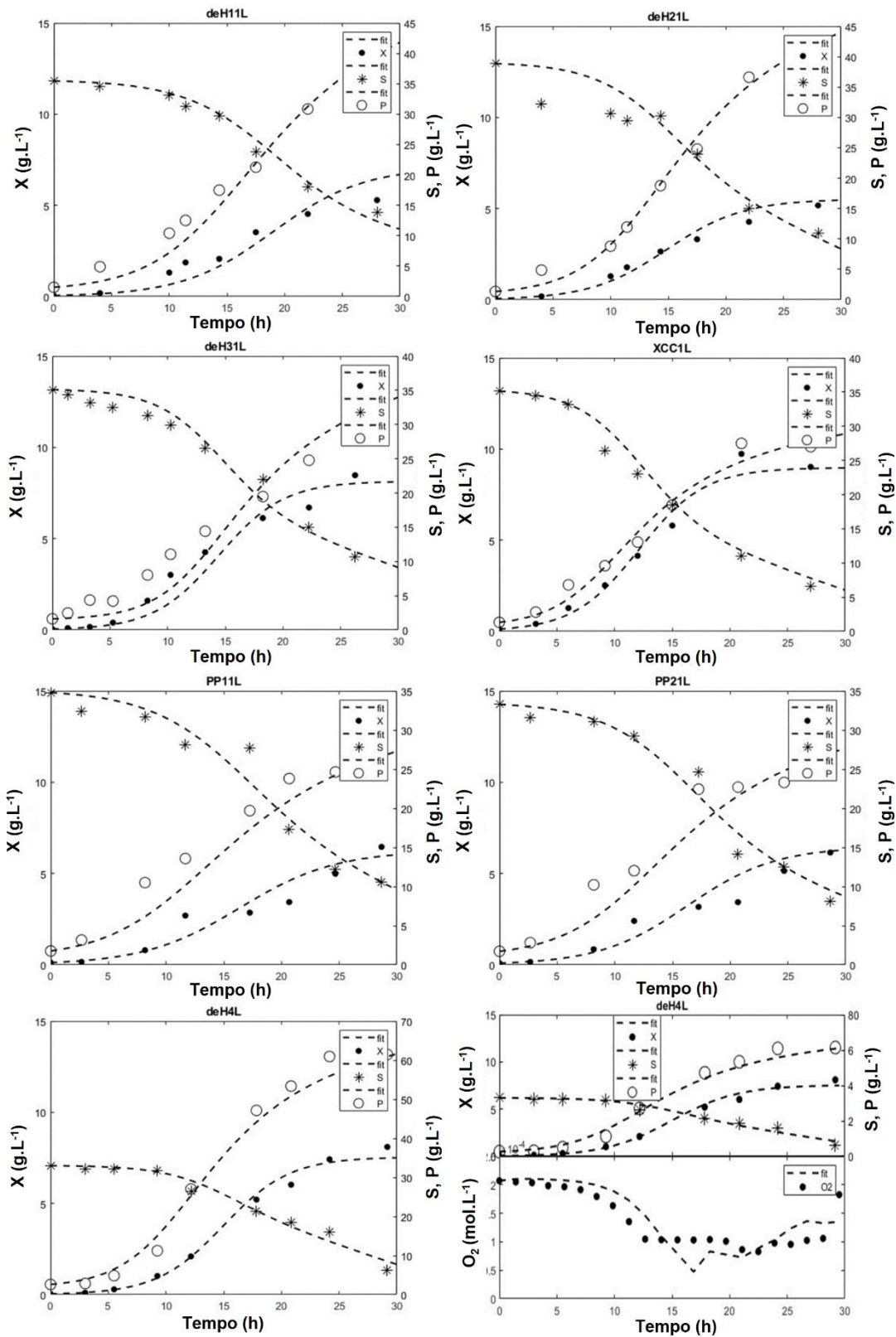


Figura 24: Ajuste das curvas de dados experimentais ao modelo cinético desenvolvido para os cultivos em batelada.

## 5.4. Análise do Sistema Proposto

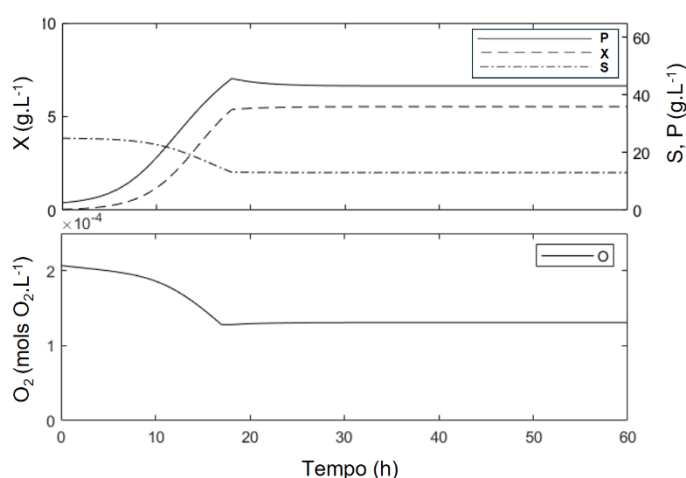
### 5.4.1. Simulação CSTR

As condições encontradas para o ponto ótimo de condução do processo estão listadas na Tabela 6. Para  $D = 0,0704 \text{ h}^{-1}$  e  $P = 43,1512 \text{ g.L}^{-1}$ , é atingida uma produtividade de aproximadamente  $3,04 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  dado o tempo de residência de 14 h, contra uma produtividade de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$  no cultivo em batelada convencional, um aumento de aproximadamente 21,6%.

A conversão do modo de cultivo batelada para o cultivo CSTR após o acionamento das bombas, ocorre no momento que um dos parâmetros de produto ou biomassa atingirem a faixa de operação. Como é demonstrado na Figura 25, o produto atinge o limite estipulado e então todos os outros se ajustam dentro das suas faixas de operação. Mas para isso, o fluxo  $F$  deve ser ajustado para atingir a correta taxa de diluição calculada. Vale a pena ressaltar que não necessariamente o cultivo se caracterizará como um cultivo contínuo em estado estacionário, uma vez que as taxas de acúmulo de biomassa e de substrato não são exatamente zero, mesmo que se aproximem, já que essa não foi uma restrição imposta ao sistema, visando a não o deixar excessivamente rígido.

**Tabela 6:** Solução ótima (fmincon non-linear solver – MATLAB®):

| D (h <sup>-1</sup> ) | X (g/L) | S <sup>feed</sup> (g/L) | S (g/L) | P (g/L) | O <sub>2</sub> (mol/L) | Y <sub>O2</sub> (%) | N (s <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|---------|-------------------------|---------|---------|------------------------|---------------------|----------------------|
| 0,0704               | 5,532   | 31,192                  | 13,0552 | 43,1512 | 0,0016                 | 45,394              | 13,015               |



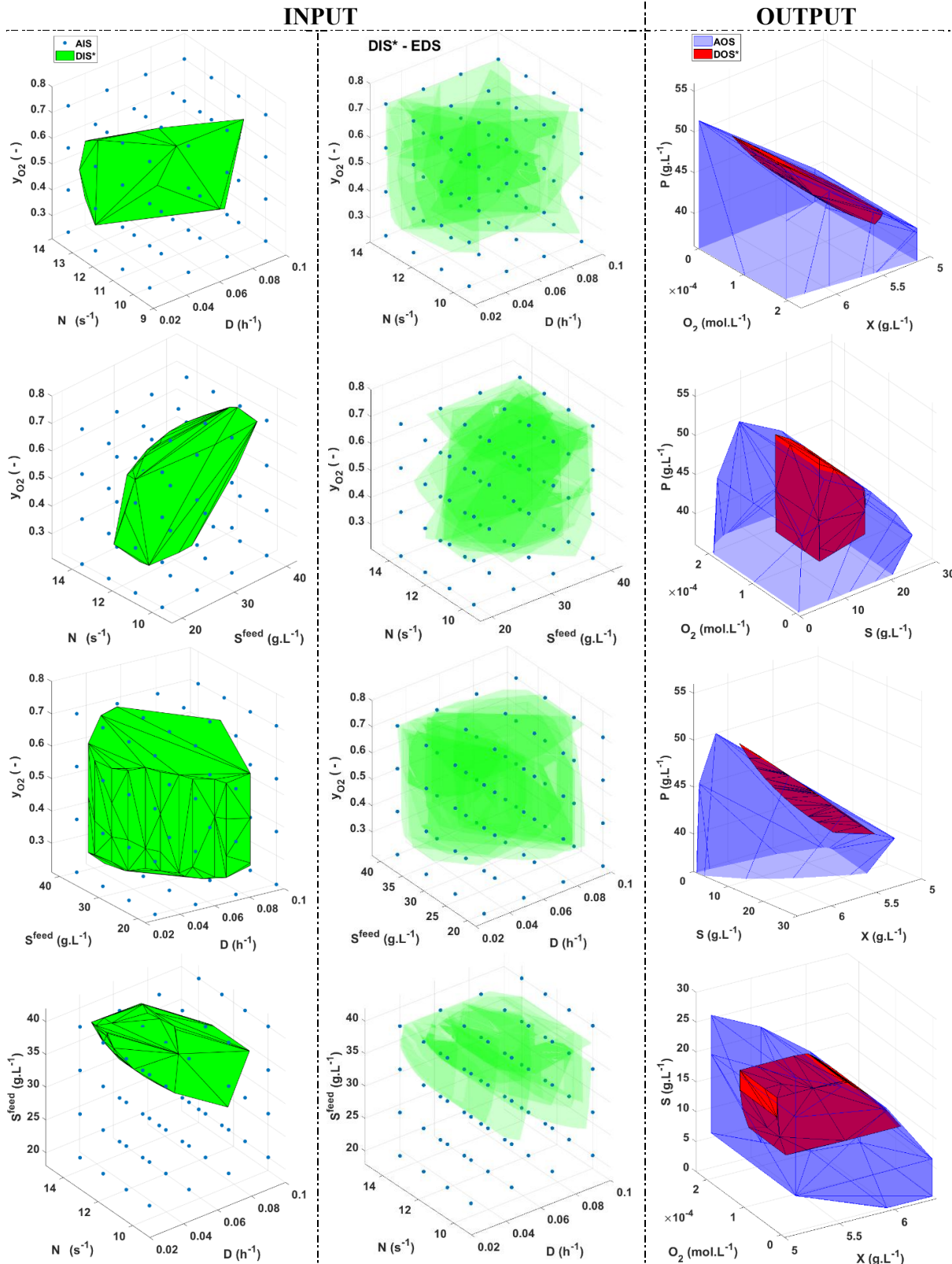
**Figura 25:** Simulação da operação no ponto ótimo para o cultivo em CSTR.

#### 5.4.2. Resultados de Operabilidade

Por fim a análise de operabilidade nos trouxe a confirmação necessária sobre a viabilidade do sistema. A interseção entre a região desejada para os parâmetros na saída, DOS, e a região possível de ser atingida pelo sistema, AOS, gerou a região de resultados desejados e possíveis, DOS\*. E através da DOS\*, foi possível encontrar a região factível de operação, DIS\*, que por sua vez se posicionou em interseção com a AIS, mostrando que seria possível operar o processo de forma a manter os resultados dentro das faixas desejadas após o período estipulado para a simulação, que neste caso foi de 60 horas. Embora se trate de um sistema de quatro dimensões (4x4), com quatro variáveis manipuladas (D, N, S<sup>feed</sup>, YO<sub>2</sub>) e quatro variáveis controladas (X, S, P, O<sub>2</sub>), é possível correlacionar as variáveis e encontrar conjuntos operacionais de pontos que ficarão dentro da faixa de saída desejada. A Figura 26 ilustra graficamente em 3D as regiões aqui mencionadas, onde mais à esquerda temos as regiões referentes às variáveis de entrada (manipuladas) e à direita as regiões referentes às variáveis de saída (controladas). Cada ilustração em três dimensões correlaciona um conjunto diferente de variáveis, abrangendo todas as combinações para que se chegue nas condições ótimas de operação.

Considerando a variação do desvio padrão dos parâmetros apresentados na Tabela 5, foi possível calcular oito novas regiões DIS\* baseadas em algumas dessas variações relacionadas às formações de biomassa, produto, e ao O<sub>2</sub> dissolvido, determinadas como possíveis perturbações esperadas, EDS (*Expected Disturbance Set*). A intersecção destas regiões fornece um DIS\* robusto e viável. É importante observar que a interseção entre todas as regiões está contida dentro da região AIS (Figura 26 – DIS\* - EDS). Uma consideração a ser feita é que seria ideal realizar simulações de perturbação para todos os 13 parâmetros em vez de apenas quatro, no entanto, o número de simulações cresceria exponencialmente com cada parâmetro adicionado, gerando um alto custo computacional. Portanto, uma solução seria estimar experimentalmente alguns deles, como os fatores de conversão Y. No entanto, a seleção para os quatro parâmetros seguiu um caminho lógico, levando em consideração sua influência no modelo, dada a alta probabilidade de sucesso do DIS\* obtido em manter o processo estável, e ajuda a mostrar a capacidade e robustez do

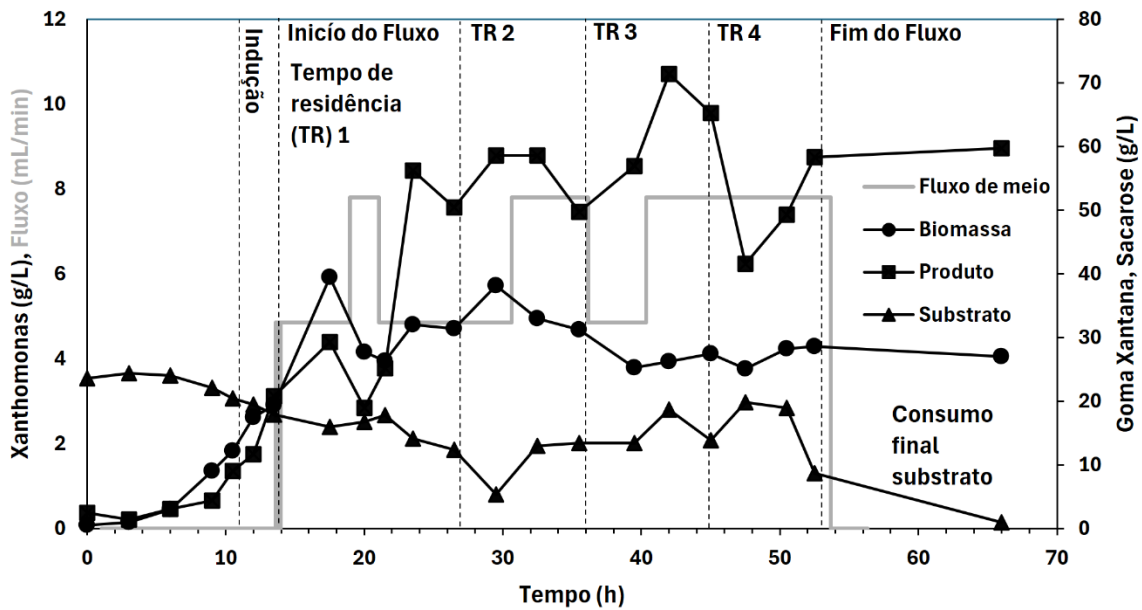
sistema CSTR diante de um alto número de perturbações aplicadas, uma situação comum quando se trata de bioprocessos.



**Figura 26:** Resultados da análise de operabilidade do sistema. Na coluna da esquerda, estão presentes as regiões de entrada 3D do DIS\* em interseção com o AIS. Na coluna do centro estão as mesmas regiões, porém após terem sido simulados distúrbios para o processo. E à direita, temos as regiões de saída 3D, mostrando a interseção entre DOS e AOS. Cada linha representa uma combinação das variáveis manipuladas e controladas, integrando todas as possibilidades que cercam as 4 dimensões.

### 5.4.3. Cultivo Contínuo de Validação

Um cultivo contínuo foi executado para validar as condições operacionais otimizadas definidas computacionalmente. O experimento, Figura 27, obteve quase 70 horas de duração, somando as duas fases de batelada (início e fim do experimento) e a fase de cultivo contínuo, rendendo um total de 20 litros de volume de caldo produzidos com uma concentração média de aproximadamente  $71 \text{ g.L}^{-1}$  de goma xantana. Apesar de não atingir um estado de quimiostato, levando em conta o tempo de residência de aproximadamente 9 h, o resultado ao final foi de elevada produtividade, em torno de  $8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . O volume removido de caldo de cultura, por ainda conter fonte residual de carbono e nitrogênio, permitiu a continuidade da produção de goma por algum tempo até a morte de todas as células, o que contribuiu ainda mais para o ótimo resultado de produção. Durante o cultivo, dentro da dorna a concentração de produto se manteve mais baixa, próxima de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ . O experimento não teve seu término ligado à incapacidade técnica para manutenção do estado contínuo de produção, mas sim devido ao tempo pré-estipulado para a avaliação do processo, de acordo com o tempo de 60 horas simulado computacionalmente. Foi possível a condução do cultivo por todo período do experimento sem perder o controle da viscosidade, evitando a formação de zonas mortas dentro da dorna. Assim como, também foi possível manter a concentração de células dentro de uma faixa pequena de variação, sem haver consumo total ou acúmulo excessivo de substrato além da faixa desejada.



**Figura 27:** Curvas de evolução de biomassa, produto e substrato durante cultivo contínuo em CSTR, tendo como balizador o fluxo aplicado ao longo do tempo.

Em comparação com os dados simulados houve algumas diferenças com relação à velocidade de crescimento celular e na taxa de conversão  $Y_{X/P}$  durante o período de batelada. Tais diferenças podem ser observadas na Tabela 7. Estas mudanças no decorrer da execução dos experimentos geraram a necessidade de alguns ajustes na taxa de diluição durante o cultivo, alternando entre  $0,117 \text{ h}^{-1}$  e a taxa pré-definida de  $0,0704 \text{ h}^{-1}$  por certo período, e finalizando a cultura com a nova taxa, tendo ela sido a mais aplicada ao longo de todo o processo. Por fim, não houve a necessidade de suplementação de oxigênio puro, diferentemente do apresentado pelos dados simulados. A não utilização de gases industriais representa uma grande economia ao processo, sendo então um resultado importante e de grande impacto positivo a avaliação do sistema como um todo.

**Tabela 7:** Dados coletados de parâmetros durante cultivo contínuo experimental.

| D ( $\text{h}^{-1}$ ) | X (g/L) | $S^{\text{feed}}$ (g/L) | S (g/L) | P (g/L) | $\text{O}_2$ (mol/L) | $y_{\text{O}_2}$ (%) | N ( $\text{s}^{-1}$ ) |
|-----------------------|---------|-------------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 0,117                 | ~4      | 31,192                  | ~11     | ~50     | 0,0001               | ~21                  | 13,015                |

## 6. CONCLUSÕES

De forma geral, todos os objetivos propostos nesta tese foram atingidos. Um novo modelo cinético que leva em conta o aumento da viscosidade em um biorreator foi desenvolvido e testado. Este modelo híbrido inclui uma RNA para correlacionar a concentração de goma xantana com sua viscosidade aparente ao longo do tempo, superando correlações lineares simples e descrevendo a influência do acúmulo de produto na própria concentração de oxigênio dissolvido no meio. O modelo se ajustou com precisão aos dados experimentais. A partir do mesmo, a produtividade do cultivo contínuo pôde ser prevista, *in-silico*, e otimizada, eliminando todos os custos relacionados aos exaustivos e custosos testes experimentais. A otimização usando *fmincon* identificou um ponto ótimo de estado estacionário, e as análises de operabilidade confirmaram um sistema robusto e operável, mesmo com a presença de perturbações.

Este trabalho apresenta uma solução viável para modelar os efeitos da variação da viscosidade no meio de cultura e suas consequências na solubilidade e disponibilidade de oxigênio dissolvido no biorreator. Empregando uma abordagem híbrida, as redes neurais artificiais foram capazes de complementar os valores dos parâmetros fundamentais da modelagem fenomenológica, permitindo assim a utilização desta modelagem para fins de extrapolação e busca por condições ótimas para o processo. O modelo foi empregado com sucesso para mapear o crescimento de três cepas distintas de *Xanthomonas* em dois biorreatores diferentes operados nas mesmas condições de temperatura e pH.

Além da modelagem apresentada, este trabalho propõe uma solução viável para otimizar a produção de goma xantana por meio de vias fermentativas com base em ferramentas de análise de operabilidade. As condições otimizadas *in-silico* e validadas experimentalmente, exibiram um ganho de produtividade de mais de 200% em comparação ao processo padrão. Além de aumentar a produtividade, as condições operacionais otimizadas mitigam os desafios operacionais intrínsecos ao processo padrão, evitando o acúmulo de produto e a aglomeração inerente da goma xantana, bem como a formação de fases heterogêneas dentro do biorreator.



## 7. TRABALHOS FUTUROS

O processo, como resolvido na atual tese está bem definido e poderia servir como base para um escalonamento industrial. No entanto, novas investigações poderiam torná-lo ainda mais competitivo. Uma abordagem possível seria a utilização de um controlador de oxigênio dissolvido preditivo para o sistema. A aplicação de um modelo preditivo de controle (MPC) se apresenta como uma possível solução promissora para um controle avançado em frente ao convencional PID, uma vez que atua baseado em previsões do modelo, tomando ações antes dos eventos ocorrerem. O MPC é um controlador de alta-performance para lidar com bioprocessos de dinâmica não-linear, uma vez que é capaz de lidar com problemas multivariáveis (CAMPANI et al., 2019; DIAZ et al., 1995; SIMUTIS; LÜBBERT, 2015). O controle poderá contar com um monitoramento em tempo real do cultivo utilizando os dados coletados para aplicação de feedback atuando na minimização contínua de erros de predição. A integração das plataformas de modelagem, simulação, aquisição e controle, permite a inferência de dados e tomada de decisões de forma integral, independente do operador, com base nas informações em tempo real adquiridas automaticamente.



## REFERÊNCIAS

- AKISUE, Rafael Akira; HARTH, Matheus Lopes; HORTA, Antonio Carlos Luperni; DE SOUSA JUNIOR, Ruy. Optimized dissolved oxygen fuzzy control for recombinant *Escherichia coli* cultivations. **Algorithms**, vol. 14, no. 11, p. 1–22, 2021. <https://doi.org/10.3390/a14110326>.
- ALFORD, Joseph S. Bioprocess control: Advances and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 30, no. 10–12, p. 1464–1475, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2006.05.039>.
- ALKHATEEB, Rabeaa S.; VORHÖLTER, Frank Jörg; STEFFENS, Tim; RÜCKERT, Christian; ORTSEIFEN, Vera; HUBLIK, Gerd; NIEHAUS, Karsten; PÜHLER, Alfred. Comparative transcription profiling of two fermentation cultures of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 sampled in the growth and in the stationary phase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 102, no. 15, p. 6613–6625, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9106-2>.
- ALLIED MARKET RESEARCH. Xanthan Gum Market Size, Share Industry Analysis, 2023. 2017. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/xanthan-gum-market>>. Acesso em: nov/2019.
- AMANULLAH, A.; SATTI, S.; NIENOW, A. W. Enhancing Xanthan fermentations by different modes of glucose feeding. **Biotechnology Progress**, vol. 14, no. 2, p. 265–269, 1998. <https://doi.org/10.1021/bp9800079>.
- AMANULLAH, A.; SERRANO-CARREON, L.; CASTRO, B.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. The influence of impeller type in pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 57, no. 1, p. 95–108, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980105\)57:1<95::AID-BIT12>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980105)57:1<95::AID-BIT12>3.0.CO;2-7).
- AMANULLAH, A.; TUTTIETT, B.; NIENOW, A. W. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 57, no. 2, p. 198–210, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<198::AID-BIT8>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<198::AID-BIT8>3.0.CO;2-I).
- AMANULLAH, Ashraf; SERRANO, Leobardo Carreon; GALINDO, Enrique; NIENOW, Alvin W. Reproducibility of pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, vol. 12, no. 4, p. 466–473, 1996. <https://doi.org/10.1021/bp960042k>.
- BAILEY, J.E., OLLIS D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2nd ed., New York: McGraw Hill, 1986.
- BANERJEE, Nupur; BHATTACHARYYA, Debasish. UDP-glucose dehydrogenase from *Capra hircus* liver: Purification, partial characterization and evaluation as a coupling enzyme in UDP-galactose 4-epimerase assay. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 68, no. 1, p. 37–43, 2011. DOI 10.1016/j.molcatb.2010.09.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.09.007>.
- BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 50, no. 2, p. 145–152, 1998. <https://doi.org/10.1007/s002530051269>.
- BIRD, R.B., STEWART, W.E., LIGHTFOOT, E.N. **Transport Phenomena**. 2nd ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- BHAT, Iqra Mohiuddin; WANI, Shoib Mohmad; MIR, Sajad Ahmad; MASOODI, F. A. Advances in xanthan gum production, modifications and its applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 42, no. October 2021, p. 102328, 2022. DOI 10.1016/j.bcab.2022.102328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102328>.
- BLANCH, María; LEGAZ, María Estrella; VICENTE, C. Purification and properties of an unusual UDP-glucose dehydrogenase, NADPH-dependent, from *Xanthomonas albilineans*. **Microbiological Research**, vol. 163, no. 3, p. 362–371, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.011>.

- BORGES, Caroline Dellinghausen; VENDRUSCOLO, Claire Tondo. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, vol. 29, no. 2, p. 171, 2008a. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2008v29n2p171>.
- BORGES, Caroline Dellinghausen; VENDRUSCOLO, Claire Tondo. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 40, n. 2, p. 81–85, 2008b.
- BOURGUIGNON, Lilly Y.W.; GILAD, Eli; PEYROLLIER, Karine. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 282, no. 27, p. 19426–19441, 2007. DOI 10.1074/jbc.M610054200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610054200>.
- BRADBURY, J. F.. Genus II: XANTHOMONAS. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 1, p. 199-210, 1984.
- BRANDÃO, Lillian Vasconcellos; NERY, Tatiana Barreto Rocha; MACHADO, Bruna Aparecida Souza; ESPERIDIÃO, Maria Cecília Azevedo; DRUZIAN, Janice Izabel. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, vol. 28, no. SUPPL., p. 217–222, 2008. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000500033>.
- BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BALDINO, 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.
- CACIK, Francisco; DONDO, Rodolfo G.; MARQUÉS, Dardo. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 25, no. 2–3, p. 409–418, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(00\)00662-1](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(00)00662-1).
- CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermenters. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 20, p. 1003-1014, 1977. <https://doi.org/10.1002/bit.260200703>
- CAMPANI, Gilson; RIBEIRO, Marcelo P.A.; ZANGIROLAMI, Teresa C.; LIMA, Fernando V. A hierarchical state estimation and control framework for monitoring and dissolved oxygen regulation in bioprocesses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 42, no. 9, p. 1467–1481, 2019. DOI 10.1007/s00449-019-02143-4. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02143-4>.
- CARRASCO, Juan C.; LIMA, Fernando V. An optimization-based operability framework for process design and intensification of modular natural gas utilization systems. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 105, p. 246–258, 2017. DOI 10.1016/j.compchemeng.2016.12.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compchemeng.2016.12.010>.
- CARRASCO, Juan C.; LIMA, Fernando V. Bilevel and parallel programming-based operability approaches for process intensification and modularity. **AIChE Journal**, vol. 64, no. 8, p. 3042–3054, 2018. <https://doi.org/10.1002/aic.16113>.
- CHEN, Y. R.; HASHIMOTO, A. G. Substrate utilization kinetic model for biological treatment process. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 22, no. 10, p. 2081–2095, 1980. <https://doi.org/10.1002/bit.260221008>.
- CHONG, Barrie Fong; BLANK, Lars M.; MCLAUGHLIN, Richard; NIELSEN, Lars K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 66, no. 4, p. 341–351, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>.
- CHOU, Fang-li; CHOU, Huei-Chi; LIN, Yen-Shin; YANG, Bih-Ying; LIN, Nien-Tsung; WENG, Shu-Fen; TSENG, Yi-Hsiung. The *xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. **Biochemical and Biophysical Research communications**, vol. 233, p. 265–269, 1997. .
- CUTLER, C. R.; RAMAKER, B. L. Dynamic matrix control - a computer algorithm. 1., 1980. **Joint Automatic Control Conference** [...]. San Francisco, California: [s. n.], 1980. vol. 1, .
- DAI, Xiaohui; GAO, Ge; WU, Mengmeng; WEI, Weiyong; QU, Jianmei; LI, Guoqiang; MA, Ting. Construction and application of a *Xanthomonas campestris* CGMCC15155 strain that produces white xanthan gum. **MicrobiologyOpen**, vol. 8, no. 2, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1002/mbo3.631>.

- DATA BRIDGE. Global Xanthan Gum Research Market. 2024. Acessado em: março/2025. Disponível em: [https://www.databridgemarketresearch.com/pt/reports/global-xanthan-gum-research-market?srsId=AfmBOoqvXVzeb7WUBJXzshm10XHkSkhlrl8ORlhN-n9vFsKva3\\_JFMqE](https://www.databridgemarketresearch.com/pt/reports/global-xanthan-gum-research-market?srsId=AfmBOoqvXVzeb7WUBJXzshm10XHkSkhlrl8ORlhN-n9vFsKva3_JFMqE).
- DAVIDSON, I. W.. Production of Polysaccharie by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 3, p. 347-349, 1978. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1978.tb01969.x>
- DIAZ, Constantino; DIEU, Pierre; FEUILLERAT, Claude; LELONG, Philippe; SALOME, Marc. Adaptive predictive control of dissolved oxygen concentration in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, vol. 43, no. 1, p. 21–32, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00101-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00101-5).
- DORAN, P. M.. **Bioprocess Engineering Principles**. 2<sup>nd</sup> ed. United Kingdom: British Library, 2013.
- ELSHAFEI, G. M. S., EL-SAID, M. M., ATTIA, H. A. E. & MOHAMMED, T. G. M. Environmentally friendly pesticides: Essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. *Ind. Crops Prod.* **31**, 99–106 (2010).
- EKATERINIADOU, L V; PAPOUTSOPOULOU, S V; KYRIAKIDIS, Doa. **HIGH PRODUCTION of XANTHAN GUM by a STRAIN of Xanthomonas campestris CONJUGATED with Lactococcus lactis**. [S. l.: s. n.], 1994.
- ESENER, A. A.; ROELS, J. A.; KOSSEN, N. W.F. Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 25, no. 12, p. 2803–2841, 1983. <https://doi.org/10.1002/bit.260251202>.
- FARIA, Sandra; VIEIRA, Patrícia Angélica; RESENDE, Miriam Maria; RIBEIRO, Eloízio Júlio; CARDOSO, Vicelma Luiz. Application of a model using the phenomenological approach for prediction of growth and xanthan gum production with sugar cane broth in a batch process. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 43, no. 3, p. 498–506, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.018>.
- FICARRA, Florencia A.; GRANDSELLIS, Carolina; GALVÁN, Estela M.; IELPI, Luis; FEIL, Regina; LUNN, John E.; GOTTIG, Natalia; OTTADO, Jorgelina. *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. **Molecular Plant Pathology**, vol. 18, no. 5, p. 720–733, 1 Jun. 2017. <https://doi.org/10.1111/mpp.12433>.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; FRITSCH, A. P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 14, no. 6, p. 14-991, 1992. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90083-Z](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90083-Z).
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 17, no. 3, p. 206–217, 1995. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00009-G](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00009-G).
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Intracellular compounds quantification by means of flow cytometry in bacteria: Application to Xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 57, no. 1, p. 87–94, 1998a. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980105\)57:1<87::AID-BIT11>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980105)57:1<87::AID-BIT11>3.0.CO;2-5).
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Metabolic structured kinetic model for xanthan production. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 23, no. 1–2, p. 75–82, 1998b. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00014-3).
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Simulation of xanthan gum production by a chemically structured kinetic model. **Mathematics and Computers in Simulation**, vol. 42, no. 2–3, p. 187–195, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4754\(95\)00113-1](https://doi.org/10.1016/0378-4754(95)00113-1).
- GARCÍA-OCHOA, F.; CASTRO, E. Gómez; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 27, no. 9, p. 680–690, 2000a. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00272-6).
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, vol. 18, no. 7, p. 549–579, 2000b. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00050-1).

- GARCÍA-OCHOA, Felix; SANTOS, Victoria E.; ALCON, Almudena. Chemical structured kinetic model for xanthan production. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 35, no. 4, p. 284–292, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004a.11.024>.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. Structured kinetic model for *Xanthomonas campestris* growth. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 34, no. 6, p. 583–594, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004b.01.005>.
- GAZZANEO, Vitor; CARRASCO, Juan C.; VINSON, David R.; LIMA, Fernando V. Process Operability Algorithms: Past, Present, and Future Developments. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 59, no. 6, p. 2457–2470, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05181>.
- GHASHGHAEI, Tahereh; SOUDI, Mohammad Reza; HOSEINKHANI, Saman. Optimization of xanthan gum production from grape juice concentrate using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. **Applied Food Biotechnology**, vol. 3, no. 1, p. 15–23, 2016. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i1.9984>.
- GHOUMRASSI-BARR, Sofia; ALIOUCHE, Djamel. A Rheological Study of Xanthan Polymer for Enhanced Oil Recovery A Rheological Study of Xanthan Polymer for Enhanced. vol. 2348, 2016. DOI 10.1080/00222348.2016.1207544. Available at: <https://doi.org/10.1080/00222348.2016.1207544>.
- GOMES, James; MENAWAT, Anil S. Precise control of dissolved oxygen in bioreactors - a model-based geometric algorithm. **Chemical Engineering Science**, vol. 55, no. 1, p. 67–78, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(99\)00305-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(99)00305-X).
- GUPTA, M. D.; KAMAT, M. Y. Isolation of Wild *Xanthomonas* Strains from Agricultural Produce, Their Characterization and Potential Related to Polysaccharide Production. **Folia Microbiol**, vol. 42, p. 621–628, 1977. <https://doi.org/10.1007/BF02815476>
- HAHN, Julia; KOCH, Daniel; NIEHAUS, Karsten; ORTSEIFEN, Vera. Hahn\_2022\_Analysis of gum proteins involved in xanthan biosynthesis throughout multiple cell fractions in a single-tube. **Journal of Proteomics**, vol. 257, p. 1–8, 2022. .
- HARDING, Nancy E; CLEARY, Joseph M; CABANAS, Debra K; ROSEN, I R A G; KANG, Kenneth S. Genetic and Physical Analyses of a Cluster of Genes Essential for Xanthan Gum Biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. vol. 169, no. 6, p. 2854–2861, 1987. .
- HASSLER, Randal A; DOHERTY, Daniel H. **Genetic Engineering of Polysaccharide Structure: Production of Variants of Xanthan Gum in *Xanthomonas campestris*\***. [S. l.: s. n.], 1990. Available at: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of Culture of Industrially Important Microorganism. **Applied Microbiology**, p. 361–368, 1955. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.3.6.361-368.1955>
- HE, Xin; LIMA, Fernando V. Development and Implementation of Advanced Control Strategies for Power Plant Cycling with Carbon Capture. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 121, p. 497–509, 2019. DOI 10.1016/j.compchemeng.2018.11.004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.11.004>.
- HE, Y.-W.; ZHANG, L.-H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], vol. 32, no 5, p. 842–857, ago. 2008. DOI 10.1111/j.1574-6976.2008.00120.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00120.x>.
- HERBST, Holger; SCHUMPE, Adrian; DECKWER, Wolf-Dieter -D. Xanthan production in stirred tank fermenters: Oxygen transfer and scale-up. **Chemical Engineering & Technology**, vol. 15, no. 6, p. 425–434, 1992. <https://doi.org/10.1002/ceat.270150610>.
- HORTA, Antonio Carlos Luperni. **Técnicas Computacionais Inteligentes para a Inferência de Estado e a Otimização de Cultivos de *Streptococcus pneumoniae***. 2008. 2008.
- HORTA, Antônio Carlos Luperni; DA SILVA, Adilson José; SARGO, Cíntia Regina; GONÇALVES, Viviane Maimoni; ZANGIROLAMI, Teresa Cristina; DE CAMPOS GIORDANO, Roberto. Robust artificial intelligence tool for automatic start-up of the supplementary medium feeding in recombinant *E. coli*

cultivations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 34, no. 7, p. 891–901, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0540-0>.

HORTA, Antonio Carlos Luperni; SARGO, Cíntia Regina; DA SILVA, Adilson José; DE CARVALHO GONZAGA, Marina; DOS SANTOS, Maurício Possedente; GONÇALVES, Viviane Maimoni; ZANGIROLAMI, Teresa Cristina; DE CAMPOS GIORDANO, Roberto. 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**, vol. 35, no. 8, p. 1269–1280, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0714-4>.

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.

INDUSTRY EXPERTS. Xanthan Gum – A Global Market Overview. [s.l.: s.n.];

INPI. **Base de dados.** Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>. Acesso em: 24 nov. 2019.

INPI. **Base de dados.** Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>. Acesso em: 24 nov. 2019.

JANG, Se Gul; LEE, Byoung Moo; CHO, Jae Yong. Effect of modified glucose catabolism on xanthan production in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 39, no. 4, p. 649–654, Apr. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1056-y>.

JANI, Girish K; SHAH, Dhiren P; PRAJAPATI, Vipul D; JAIN, Vineet C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. vol. 4, no. 5, p. 308–322, 2009. .

KATZEN, Federico; BECKER, Anke; ZORREGUIETA, Angeles; PUHLER, Alfred; IELPI, Luis. Promoter analysis of the *xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **Journal of Bacteriology**, vol. 178, p. 4313–4318, 1996. .

KATZEN, Federico; FERREIRO, Diego U; ODDO, Cristian G; VERO'NICAVERO', M; IELMINI, Verónica; BECKER, Anke; PUHLER, Alfred; PUHLER, Pu"; IELPI, Luis. **Xanthomonas campestris pv. campestris gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence**. [S. l.: s. n.], 1998.

KEGG. Biosynthesis of nucleotide sugars - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* A306. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/xct01250>. Acessado em: jul/2022

KEMP, Benjamin P.; HORNE, Jennifer; BRYANT, Alan; COOPER, Richard M. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava *Manihot esculenta*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 64, p. 209–218, 2004. .

KOPLIN, Reinhard; ARNOLD, Walter; HOTTE, Barbara; SIMON, Reinhard; WANG, G E; PUHLER, Alfred. **Genetics of Xanthan Production in Xanthomonas campestris: the xanA and xanB Genes Are Involved in UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis**. [S. l.: s. n.], 1992. Available at: <https://journals.asm.org/journal/jb>.

KUPRIJANOV, A.; GNOTH, S.; SIMUTIS, R.; LÜBBERT, A. Advanced control of dissolved oxygen concentration in fed batch cultures during recombinant protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 82, no. 2, p. 221–229, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1765-y>.

LACERDA, Lilian A.; CAVALCA, Lucia B.; MARTINS, Paula M.M.; GOVONE, José S.; BACCI, Maurício; FERREIRA, Henrique. Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, vol. 90, no. February, p. 44–52, 2017. DOI 10.1016/j.plasmid.2017.03.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.005>.

LEE, Choong Koo; LEE, Byoung Moo; CHO, Jae Yong. Identification of new internal promoters of the *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* gum gene cluster. **Biotechnology Letters**, vol. 30, no. 3, p. 521–527, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9571-7>.

LETISSE, Fabien; LINDLEY, Nic D.; ROUX, Gilles. Development of a phenomenological modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress**, vol. 19, no. 3, p. 822–827, 2003. <https://doi.org/10.1021/bp0257168>.

LI, Shuyun; MIRLEKAR, Gaurav; RUIZ-MERCADO, Gerardo J.; LIMA, Fernando V. Development of chemical process design and control for sustainability. **Processes**, vol. 4, no. 3, p. 1–21, 2016. <https://doi.org/10.3390/pr4030023>.

LIU, L.; WANG, M.; DU, G.; CHEN, J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 46, no. 3, p. 383–388, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02325.x>.

LIU, Long; LIU, Yanfeng; LI, Jianghua; DU, Guocheng; CHEN, Jian. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, vol. 10, no. 1, p. 99, 2011. DOI 10.1186/1475-2859-10-99. Available at: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/99>.

LUONG, J. H.T.; MULCHANDANI, A.; LEDUY, A. Kinetics of biopolymer synthesis: A revisit. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 10, no. 6, p. 326–332, 1988. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90010-5).

LUVIELMO, Márcia; SCAMPARINI, Adilma. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, vol. 5, no. 1, p. 50–67, 2009. <https://doi.org/10.4013/ete.2009.51.04>.

MESQUITA, Thiago J.B.; CAMPANI, Gilson; GIORDANO, Roberto C.; RIBEIRO, Marcelo P.A.; HORTA, Antonio C.L.; ZANGIROLAMI, Teresa C.; LIMA, Fernando V. Operability and biomimetic control of a micro-aerated fermentation process. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 155, p. 107511, 2021. DOI 10.1016/j.compchemeng.2021.107511. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2021.107511>.

MARKET INSIGHTS REPORTS. Xanthan Gum Market Global Demand, Size, Shares, Supply and Key Players 2019 to 2025 – Market Research Journals. 2019.

MDIC. **Comex Vis: Principais Produtos Importados PPI**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/comex-vis/frame-ppi?ppi=3164>>. Acesso em: 23 nov. 2019.

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, Thiago José Barbosa; SARGO, Cíntia Regina; FUZER, José Roberto; PAREDES, Sheyla Alexandra Hidalgo; GIORDANO, Roberto De Campos; HORTA, Antonio Carlos Luperni; ZANGIROLAMI, Teresa Cristina. Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: A novel approach to tune micro-Aeration and substrate feeding in fermentations. **Microbial Cell Factories**, vol. 18, no. 1, p. 1–17, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1198-6>.

MESQUITA, T. J. B. et al. Operability and biomimetic control of a micro-aerated fermentation process. **Computers and Chemical Engineering**, v. 155, p. 107511, 2021.

METE, Tufan; OZKAN, Gulay; HAPOGLU, Hale; ALPBAZ, Mustafa. Control of dissolved oxygen concentration using neural network in a batch bioreactor. **Computer Applications in Engineering Education**, vol. 20, no. 4, p. 619–628, 2012. <https://doi.org/10.1002/cae.20430>.

MIRLEKAR, Gaurav; AL-SINBOL, Ghassan; PERHINSCHI, Mario; LIMA, Fernando V. A biologically-inspired approach for adaptive control of advanced energy systems. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 117, p. 378–390, 2018. DOI 10.1016/j.compchemeng.2018.07.002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.07.002>.

MIRLEKAR, Gaurav; GEBRESLASSIE, Berhane; DIWEKAR, Urmila; LIMA, Fernando V. Biomimetic model-based advanced control strategy integrated with multi-agent optimization for nonlinear chemical processes. **Chemical Engineering Research and Design**, vol. 140, p. 229–240, 2018. DOI 10.1016/j.cherd.2018.10.005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.10.005>.

MIRLEKAR, Gaurav; LI, Shuyun; LIMA, Fernando V. Design and Implementation of a Biologically Inspired Optimal Control Strategy for Chemical Process Control. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 56, no. 22, p. 6468–6479, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04753>.

MIRLEKAR, Gaurav; PEZZINI, Paolo; BRYDEN, Mark; TUCKER, David; LIMA, Fernando V. A Biologically-Inspired Optimal Control Strategy (BIO-CS) for hybrid energy systems. **Proceedings of the American Control Conference**, , p. 4821–4826, 2017. <https://doi.org/10.23919/ACC.2017.7963701>.

MOHAN, Naresh; TADI, Subbi Rami Reddy; PAVAN, Satya Sai; SIVAPRAKASAM, Senthilkumar. Deciphering the role of dissolved oxygen and N-acetyl glucosamine in governing higher molecular weight hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus* cell factory. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 104, no. 8, p. 3349–3365, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10445-x>.

MOHSIN, Ali; AKYLIYAEVNA, Kanagat Akbota; ZAMAN, Waqas Qamar; HUSSAIN, Muhammad Hammad; MOHSIN, Muhammad Zubair; AL-RASHED, Sarah; TAN, Xin; TIAN, Xiwei; AIDA, Kistaubayeva; TARIQ, Muhammad; HAIDER, Muhammad Salman; KHAN, Imran Mahmood; NIAZI, Sobia; ZHUANG, Yingping; GUO, Meijin. Kinetically modelled approach of xanthan production using different carbon sources: A study on molecular weight and rheological properties of xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 193, no. PB, p. 1226–1236, 2021. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.163>.

MOHSIN, Ali; ZHANG, Kuipu; HU, Junlang; SALIM-UR-REHMAN; TARIQ, Muhammad; ZAMAN, Waqas Qamar; KHAN, Imran Mahmood; ZHUANG, Yingping; GUO, Meijin. Optimized biosynthesis of xanthan via effective valorization of orange peels using response surface methodology: A kinetic model approach. **Carbohydrate Polymers**, vol. 181, no. October 2017, p. 793–800, 2018. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.11.076. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.076>.

MORAINE, R. A.; ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increase concentration by pH control. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 13, no. 3, p. 381–391, 1971. <https://doi.org/10.1002/bit.260130305>.

MORDOR INTELLIGENCE. Xanthan Gum Market Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2025 - 2030). 2024. Acessado em: março/2025. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/xanthan-gum-market>.

MORTENSEN, Alicja; AGUILAR, Fernando; CREBELLI, Riccardo; DI DOMENICO, Alessandro; FRUTOS, Maria Jose; GALTIER, Pierre; GOTT, David; GUNDE-REMY, Ursula; LAMBRÉ, Claude; LEBLANC, Jean Charles; LINDTNER, Oliver; MOLDEUS, Peter; MOSESSO, Pasquale; OSKARSSON, Agneta; PARENT-MASSIN, Dominique; STANKOVIC, Ivan; WAALKENS-BERENDSEN, Ine; WOUTERSEN, Rudolf Antonius; WRIGHT, Matthew; ... DUSEMUND, Birgit. Re-evaluation of xanthan gum (E 415) as a food additive. **EFSA Journal**, vol. 15, no. 7, 1 Jul. 2017. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4909>.

OLIVEIRA, Davi B.; KUNDLASTSCH, Guilherme E.; CRUZ, Richard D.; BATISTA, Bruno; RIBEIRO, Marcelo P. A.; NOVO-MANSUR, Maria T. M.; da SILVA, Adilson J.. Xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* is increased by favoring the biosynthesis of its monomers. **Bioresource Technology**. Vol. 416, 1 Jan. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131808>.

OTOBONI, Alda Maria Machado Bueno. Estudo De Exopolissacarídeos De Bactérias Fitopatogénicas. **Revista Científica Eletrônica de Bactérias Fitopatogénicas**, vol. 11, no. 1, 2007. .

PALANIRAJ, Aarthy; JAYARAMAN, Vijayakumar. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, vol. 106, no. 1, p. 1–12, 2011a. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035>.

PATARINSKA, T.; GEORGIEVA, O. Modelling and control of Xanthan gum production. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, vol. 6, no. 4, p. 40–43, 1992. <https://doi.org/10.1080/13102818.1992.10818675>.

PETERS, Hans-Udo; HERBST, Holger; HESSELINK, Paul G. M.; LUNSDORF, Heinrich; SCHUMPE, Adrian; DECKWER, Wolf-Dieter. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 34, p. 1341-1408, 1989. <https://doi.org/10.1002/bit.260341108>

PINCHES, Anthony; PALLENT, Leslie J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 28, no. 10, p. 1484–1496, 1986. <https://doi.org/10.1002/bit.260281006>.

- PIRES, Aline Mara Barbosa; SANTANA, Maria Helena A. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 162, no. 6, p. 1751–1761, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8956-6>.
- PONS, A.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Modelling *Xanthomonas campestris* batch fermentations in a bubble column. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 33, no. 4, p. 394–405, 1989. <https://doi.org/10.1002/bit.260330404>.
- PSOMAS, S K; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M; KYRIAKIDIS, D A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. vol. 35, p. 273–280, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.036>.
- QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, vol. 6, no. 2, p. 242–251, 2011. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>.
- QUINLAN, ALICIAN V. Kinetics of Secondary Metabolite Synthesis in Batch Culture When Two Different Substrates Limit Cell Growth and Metabolite Production: Xanthan Synthesis by *Xanthomonas campestris*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 469, no. 1, p. 259–269, 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb26503.x>.
- RAO, Y. Manjula; SURESH, A. K.; SURAIISKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, vol. 38, no. 9, p. 1301–1310, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00328-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00328-X).
- ROSALAM, S; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. vol. 39, p. 197–207, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2005.10.019>.
- SAMAL, B.; CHATTERJEE, S. Bacterial quorum sensing facilitates *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* invasion of host tissue to maximize disease symptoms. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], vol. 72, no 18, p. 6524–6543, 30 set. 2021. DOI 10.1093/jxb/erab211. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/72/18/6524/6276454>.
- SAVVIDES, A. L.; KATSIFAS, E. A.; HATZINIKOLAOU, D. G.; KARAGOUNI, A. D. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 28, no. 8, p. 2759–2764, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1087-1>.
- SERRANO-CARREÓN, L.; CORONA, R. M.; SÁNCHEZ, A.; GALINDO, E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochemistry**, vol. 33, no. 2, p. 133–146, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00039-3).
- SHU, Chin-Hang -H; YANG, Shang-Tian -T. Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 37, no. 6, p. 567–574, 1991. <https://doi.org/10.1002/bit.260370611>.
- SILMAN, R. W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: Laboratory investigation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 12, no. 1, p. 75–84, 1970. <https://doi.org/10.1002/bit.260120107>.
- SIMUTIS, Rimvydas; LÜBBERT, Andreas. Bioreactor control improves bioprocess performance. **Biotechnology Journal**, vol. 10, no. 8, p. 1115–1130, 2015. <https://doi.org/10.1002/biot.201500016>.
- SOUW, Peter; DEMAIN, Arnold. Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 37, p. 1186–1192, 1979. [https://doi.org/10.1128/aem.37.6.1186-1192.1979open\\_in\\_new](https://doi.org/10.1128/aem.37.6.1186-1192.1979open_in_new)ISSN
- SOUZA, Leonardo C.A.; WULFF, Nelson A.; GAURIVAUD, Patrice; MARIANO, Anelise G.; VIRGÍLIO, Andréa C.D.; AZEVEDO, João L.; MONTEIRO, Patrícia B. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC gumB and gumF genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 257, no. 2, p. 236–242, Apr. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00176.x>.
- SPHERICAL INSIGHTS. Global Xanthan Gum Market Size, Compartilhar, Previsão do relatório-2032. 2023. Acessado em: março/2025. Disponível em: <https://www.sphericalinsights.com/pt/reports/xanthan-gum-market>.

SRIRAM, G.; MANJULA RAO, Y.; SURESH, A. K.; SURESHKUMAR, G. K. Oxygen supply without gas-liquid film resistance to *Xanthomonas campestris* cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 59, no. 6, p. 714–723, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980920\)59:6<714::AID-BIT8>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980920)59:6<714::AID-BIT8>3.0.CO;2-I).

STEFFENS, Tim; VORHOLTER, Frank-Jorg; TECKENTRUP, Julia; HUBLIK, Gerd; WALHORN, Volker; ASELMETTI, Dario; PUHLER, Alfred; NIEHAUS, Karsten; ORTSEIFEN, Vera. Two flagellar mutants of *Xanthomonas campestris* are characterized by enhanced xanthan production and higher xanthan viscosity. **Journal of Biotechnology**, vol. 347, p. 9–17, 2022. .

STEFFENS, Tim; VORHÖLTER, Frank Jörg; GIAMPÀ, Marco; HUBLIK, Gerd; PÜHLER, Alfred; NIEHAUS, Karsten. The influence of a modified lipopolysaccharide O-antigen on the biosynthesis of xanthan in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. **BMC Microbiology**, vol. 16, no. 1, 23 May 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0710-y>.

SUBHASH, Magar; JADHAV, B 1; SUMITKUMAR, Jana; MOHANRAJ, G T. Microbial production of Green polymer Xanthan Gum from *Xanthomonas Campestris*. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, vol. 6, no. 8, p. 1045–1052, 2015. Available at: <http://www.ijser.org>.

SZE, Jun Hui; BROWNLIE, Jeremy C.; LOVE, Christopher A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. **3 Biotech**, vol. 6, no. 1, p. 1–9, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0379-9>.

UCM, Ruschoni; AEM, Mera; LHB, Zamudio; KUMAR, Vinod; TAHERZADEH, Mohammad J.; GARLAPATI, Vijay Kumar; CHANDEL, Anuj Kumar. Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid: status, innovation, market and applications. **Bioengineered**, vol. 13, no. 4, p. 9645–9661, 2022. DOI 10.1080/21655979.2022.2057760. Available at: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2057760>.

VELASCO, Rogério Gonçalves. **16 marcas de Preenchedores de Ácido Hialurônico vendidas no Brasil**. São Paulo, 1 de outubro de 2021. Disponível em: <<https://institutovelasco.com.br/>>. Acesso em: 10/02/2022.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* C24. **Hydrocolloids**, p. 187-191, 2000. <https://doi.org/10.1016/B978-044450178-3/50022-6>.

VERIFIED MARKET RESEARCH. Global Industrial Grade Xanthan Gum Market Size By Product Type (Food Grade Xanthan Gum, Pharmaceutical Grade Xanthan Gum), By Application (Food & Beverage, Pharmaceuticals), By Functionality (Thickening Agent, Stabilizer), By End-User Industry (Food Industry, Cosmetic Industry), By Form (Dry Xanthan Gum, Liquid Xanthan Gum), By Geographic Scope And Forecast. 2025. Acessado em: março/2025. Disponível em: <https://www.verifiedmarketreports.com/product/industrial-grade-xanthan-gum-market/>.

VIGNESH, P.; ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Modeling and steady state simulation: Production of xanthan gum from sugarcane broth. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 38, no. 1, p. 49–56, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1242-1>.

VOJNOV, Adrian A; SLATER, Holly; DANIELS, Michael J; DOW, J Maxwell. Expression of the gum Operon Directing Xanthan Biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and Its Regulation In Planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, vol. 14, no. 6, p. 768–774, 2001. .

VOJNOV, Adrian A; ZORREGUIETA, Angeles; DOW, J Maxwell; DANIELS', Michael J; DANKERT, Marcel0 A. Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, vol. 144, p. 1487–1493, 1998. .

VORHÖLTER, Frank Jörg; SCHNEIKER, Susanne; GOESMANN, Alexander; KRAUSE, Lutz; BEKEL, Thomas; KAISER, Olaf; LINKE, Burkhard; PATSCHKOWSKI, Thomas; RÜCKERT, Christian; SCHMID, Joachim; SIDHU, Vishaldeep Kaur; SIEBER, Volker; TAUCH, Andreas; WATT, Steven Alexander; WEISSHAAR, Bernd; BECKER, Anke; NIEHAUS, Karsten; PÜHLER, Alfred. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. **Journal of Biotechnology**, vol. 134, no. 1–2, p. 33–45, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.013>.

WANG, Xiuli; ZHENG, Daning; LIANG, Rubing. An Efficient Electro-Competent Cells Generation Method of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Its Application for Plasmid Transformation and Gene Replacement. **Advances in Microbiology**, vol. 06, no. 02, p. 79–87, 2016. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.62008>.

WANG, Zichao; WU, Jianrong; ZHU, Li; ZHAN, Xiaobei. Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. **Bioresource Technology**, vol. 211, p. 390–397, 1 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.096>.

WEI, Guohua; KUMAR, Vip; XUE, Jun; LOCKE, Robert D.; MATTA, Khushi L. The first chemical synthesis of novel MeO-3-GlcUA derivative of hyaluronan-based disaccharide to elucidate the catalytic mechanism of hyaluronic acid synthases (HASs). **Tetrahedron Letters**, vol. 50, no. 47, p. 6543–6545, 2009. DOI 10.1016/j.tetlet.2009.09.042. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.042>.

WEISS, Rebecca M.; OLLIS, David F. Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 22, no. 4, p. 859–873, 1980. <https://doi.org/10.1002/bit.260220410>.

WESTBROOK, Adam W.; REN, Xiang; MOO-YOUNG, Murray; CHOU, C. Perry. Application of hydrocarbon and perfluorocarbon oxygen vectors to enhance heterologous production of hyaluronic acid in engineered *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 115, no. 5, p. 1239–1252, 2018. <https://doi.org/10.1002/bit.26551>.

WU, Mengmeng; QU, Jianmei; SHEN, Yaqi; DAI, Xiaohui; WEI, Weiyang; SHI, Zhong; LI, Guoqiang; MA, Ting. Gel properties of xanthan containing a single repeating unit with saturated pyruvate produced by an engineered *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155. **Food Hydrocolloids**, vol. 87, no. August 2018, p. 747–757, 2019. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.09.002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.002>.

XU, Peng; VANSIRI, Amerin; BHAN, Namita; KOFFAS, Mattheos A.G. EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, vol. 1, no. 7, p. 256–266, 20 Jul. 2012. DOI 10.1021/sb300016b. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/sb300016b>.

YANG, T.-C.; WU, G.-H.; TSENG, Y.-H. Isolation of a *Xanthomonas campestris* strain with elevated beta-galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 35, no. 5, p. 375–379, Nov. 2002. DOI 10.1046/j.1472-765X.2002.01202.x. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2002.01202.x>.

YOON, Ki Hoon; CHO, Jae Yong. Transcriptional analysis of the gum gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. **Biotechnology Letters**, vol. 29, no. 1, p. 95–103, Jan. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9217-1>.

ZABOT, Giovanni L.; MECCA, Jaqueline; MESOMO, Michele; SILVA, Marcell F.; PRÁ, Valéria Dal; DE OLIVEIRA, Débora; OLIVEIRA, J. Vladimir; CASTILHOS, Fernanda; TREICHEL, Helen; MAZUTTI, Marcio A. Hybrid modeling of xanthan gum bioproduction in batch bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 34, no. 8, p. 975–986, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0548-5>.

ZABOT, Giovanni L.; SILVA, Marcell F.; TERRA, Lisiane de Marsillac; FOLETTO, Edson L.; JAHN, Sérgio L.; DAL PRÁ, Valéria; OLIVEIRA, J. Vladimir; TREICHEL, Helen; MAZUTTI, Marcio A. Simulation of the xanthan gum production in continuous fermentation systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 1, no. 4, p. 301–308, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.08.002>.

ZAKERI, A.; PAZOUKI, M.; VOSSOUGI, M. Development of Kinetic Model for Xanthan Production in a Laboratory-Scale Batch Fermentor. **Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science**, vol. 42, no. 1, p. 261–266, 2018. DOI 10.1007/s40995-017-0343-5. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0343-5>.

ZAKERI, Ali; PAZOUKI, Mohammad; VOSSOUGH, Manouchehr. Use of Response Surface Methodology analysis for xanthan biopolymer production by *Xanthomonas campestris*: Focus on agitation rate, carbon source, and temperature. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, vol. 36, no. 1, p. 173–183, 2017.