

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

Gilson Campani Junior

OTIMIZAÇÃO DO CONTROLE DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM BIORREATOR  
AIRLIFT PRESSURIZADO: APLICAÇÃO EM CULTIVOS DE *Escherichia coli*  
RECOMBINANTE

São Carlos – 2018

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

Gilson Campani Junior

OTIMIZAÇÃO DO CONTROLE DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM BIORREATOR  
AIRLIFT PRESSURIZADO: APLICAÇÃO EM CULTIVOS DE *Escherichia coli*  
RECOMBINANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, sob orientação da Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (DEQ-UFSCar) e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (DEQ-UFCar).

São Carlos – 2018

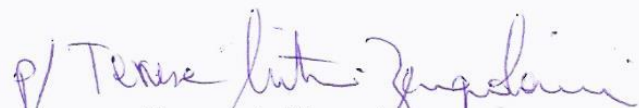
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE GILSON CAMPANI JÚNIOR APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 12 DE JANEIRO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:

  
Teresa Cristina Zangirolami  
**Orientadora, UFSCar**

  
Felipe Fernando Furlan  
**UFSCar**

  
Alice Medeiros de Lima  
**UFSCar**

  
Fernando Vines Lima  
**West Virginia University**

  
Marcel Otávio Cerri  
**UNESP**

Dedico este trabalho à minha família e à minha amada Carol, por todo o suporte, amparo e incentivo recebidos, nos bons e maus momentos, me ajudando a galgar mais esse degrau.

## AGRADECIMENTOS

À vida, escola e fonte inesgotável de oportunidades de crescimento moral e intelectual.

À minha família, por ser o alicerce de tudo o que construí até hoje.

À minha amada noiva Carol, que, desde o aparecimento em minha vida há 11 anos, preenche um espaço cada vez mais importante em mim.

À Profa. Dra. Teresa Zangirolami, exemplo profissional e pessoal que levarei para sempre em minha vida. Palavras não descrevem a gratidão que sinto pela relação orientador-orientando desenvolvida ao longo de 7 anos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ribeiro pela confiança depositada em meu trabalho. A sua orientação foi essencial para a realização desta Tese.

Ao Prof. Dr. Fernando Lima, que orientou com tanto profissionalismo meus estudos durante estágio de pesquisa na West Virginia University, EUA.

Aos técnicos do DEQ-UFSCar, especialmente o Oscar e o Amadeus, cujo suporte e comprometimento foram sempre exemplares.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e trocas de conhecimento e pelo companheirismo.

Às amigas, cujo sentimento, mesmo à distância, continua o mesmo.

Enfim, o meu “Muito Obrigado” a todos aqueles, anônimos ou não, que, de alguma forma, contribuíram para que mais essa etapa fosse cumprida em minha vida.

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: CNPq, FAPESP e CAPES.

*"Todo o poder da alma resume-se em três  
palavras: - Querer, saber, amar!"  
(Léon Denis)*

# RESUMO

Devido à ampla caracterização e à facilidade de manipulação e de cultivo, diversas proteínas com aplicação industrial e terapêutica são produzidas por *Escherichia coli* geneticamente modificada. No entanto, poucos trabalhos envolvendo cultivo de *E. coli* em reator pneumático tipo airlift são encontrados. Este biorreator apresenta vantagens frente ao tanque agitado, como simplicidade de construção, menor risco de contaminação e eficiente dispersão gás-líquido com baixo consumo de energia. Entretanto, a menor capacidade de transferência de oxigênio no biorreator airlift em escala de bancada, em relação à alcançada em reator convencional, justifica a manipulação de variáveis como temperatura, pressão e vazões de ar e oxigênio no controle do oxigênio dissolvido (OD). Nesse contexto, a presente tese tem como objetivos: (i) desenvolver modelo matemático que descreva o processo de produção da Proteína A de Superfície do Pneumococo (PspA) por *E. coli* recombinante em reator airlift pressurizado, considerando o consumo e a transferência de oxigênio no processo; (ii) otimizar economicamente o controle do OD; (iii) desenvolver controlador avançado para o OD integrado a estimadores de estados. Foram utilizados dados de cultivos de *E. coli* em reatores convencional e airlift para a identificação e validação dos modelos propostos. A otimização dinâmica foi feita empregando método do gradiente baseado no Princípio do Mínimo de Pontryagin. Os modelos matemáticos desenvolvidos foram capazes de descrever o processo em condições variadas de temperatura e pressão. A otimização dinâmica do controle do OD resultou em uma heurística simples e sequencial de atuação: manipulação da vazão de ar, seguida pela pressurização do sistema e, finalmente, enriquecimento do gás de entrada com oxigênio puro. A temperatura ótima para o processo foi de 27 °C. Foi proposto então um sistema de controle preditivo para o OD, associado a dois estimadores de estado, o *extended Kalman filter* (EKF) e o *moving horizon estimator* (MHE), capazes de estimar satisfatoriamente quatro variáveis de estado (concentrações celular, de substrato, de PspA e de OD) com base apenas na medida de OD. O sistema de controle se mostrou robusto em simulações do processo. As conclusões obtidas a partir desta tese contribuem para a área de desenvolvimento de reatores não convencionais e de controladores do OD, especialmente para os biorreatores pneumáticos, que são amplamente utilizados em bioprocessos aeróbios.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*; PspA; Cultivo celular; Airlift; Sobrepressão; Oxigênio dissolvido; Controle ótimo; Controle preditivo; Estimador de estado.

# ABSTRACT

A wide variety of industrial and therapeutic proteins is synthesized by genetically modified *Escherichia coli*, which is easy to cultivate and manipulate and also well characterized. However, there are only few studies regarding *E. coli* cultivation in the pneumatic airlift bioreactor. This reactor presents some advantages over the stirred tank, such as simpler construction, lower risk of contamination, and efficient gas-liquid dispersion with reduced power consumption. However, the lower oxygen transfer capacity in the bench-scale airlift bioreactor, in comparison to the stirred tank, justifies the use of temperature, pressure, and gas and oxygen flow rates as manipulated variables for the dissolved oxygen (DO) control. In this context, this thesis aims: (i) to develop a mathematical model that describes the production of the Pneumococcal Surface Protein A (PspA) by recombinant *E. coli* in a pressurized airlift reactor, taking into account oxygen transfer and uptake in the process; (ii) to perform economic optimization of the DO control; (iii) to develop an advanced DO controller integrated to state estimators. Data of *E. coli* cultivation in conventional and airlift reactors were used to identify and validate the models. The dynamic optimization was performed using a gradient method based on the Pontryagin's minimum principle. The developed mathematical models were able to describe the process under varying conditions of temperature and pressure. The dynamic optimization of the DO control resulted in a simple and sequential way of handling the inputs: manipulation of air flow rate, followed by system pressurization, and then air enrichment with pure oxygen. The optimum process temperature was 27 °C. A model predictive DO control was then proposed, associated to two state estimators, the extended Kalman filter (EKF) and the moving horizon estimator (MHE). They were both able to estimate satisfactorily four state variables (cell, substrate, PspA, and DO concentrations) based only on DO measurements. The control system proved to be robust in process simulations. The conclusions that arise from this thesis contribute to the area of development of non-conventional reactors and DO controllers, especially for pneumatic bioreactors, which are widely used in aerobic bioprocesses.

**Keywords:** *Escherichia coli*; PspA; Cell culture; Airlift; Overpressure; Dissolved oxygen; Optimal control; Predictive control; State estimator.



# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 3

- Fig. 3.1.** Experimental setup: (1) gas mass flow controllers (model GFC, Aalborg); (2) carbon dioxide (non-dispersive infrared absorption, model S710, Sick/Maihak) and oxygen (amperometric probe, model InPro 6830, Mettler Toledo) analyzers; (3) analog-to-digital converter; (4) temperature, pressure, dissolved oxygen tension, and pH sensors; (5) peristaltic pump for pH control (model C/L, Masterflex); (6) gas valve actuator (model VY1100, SMC). ..... 35
- Fig. 3.2.** Cellular growth, substrate consumption, and recombinant protein (PspA) formation during cultivation of *E. coli* in the 5-L STB at (a) 27 °C, (b) 32 °C, and (c) 37 °C, and (d) in the ALB pressurized at up to 0.4 MPa with variable temperature (37 °C during the growth phase and 32 °C during the induction phase). Glycerol pulses were added when the residual concentration of glycerol was close to 20 g·L<sup>-1</sup>. The induction phase started after addition of 1 mM of IPTG, as indicated by the dashed lines. The error bars are standard deviations from triplicates. .... 43
- Fig. 3.3.** Cellular growth and substrate consumption formation during non-induced cultivation of *E. coli* in the 5-L STB at (a) 27 °C and (b) 37 °C in the STB. The error bars are standard deviations from triplicates. .... 44
- Fig. 3.4.** (a) Fitted  $q_{O_2}$  model and (b) its agreement with the experimental data ( $q_{O_2exp}$ ) during five cultivations of *E. coli* in the 5-L STB at 27, 32, and 37 °C. Closed symbols correspond to the non-induced condition (growth phase). The error bars are standard deviations derived from triplicates of  $C_x$  and the root mean square of the *OUR* measurement noise. The solid line is the model prediction and the dotted lines indicate its deviation interval within -10% and 10%..... 46
- Fig. 3.5.** Agreement between  $q_{O_2}$  (calculated using Eq. 3.19) and the experimental data, as a function of  $q_p$ , during the induction phase of *E. coli* cultivations in the 5-L STB at 27, 32, and 37 °C. .... 47
- Fig. 3.6.** (a) Fitted  $k_La$  model and (b) its agreement with the experimental data ( $k_{Laexp}$ ) for the 5-L ALB operated at different temperatures (27, 32, and 37 °C) and specific air flow rates ( $\phi$ ) from 1 to 4 min<sup>-1</sup>. The error bars are standard errors from triplicates. The solid line is the model prediction and the dotted lines indicate its deviation interval within -10% and 10%..... 48

- Fig. 3.7.** Experimental  $\mu_{max}$  data and fitted model for five cultivations of *E. coli* in the 5-L STB at 27, 32, and 37 °C. The error bars are standard errors estimated from the linear regression of Eq. 3.2. Closed symbols refer to the cultivations without an induction phase. .... 50
- Fig. 3.8.** Prediction of  $q_{O_2}$  and *OTR* for the ALB at variable temperature (27-37 °C), using Eqs. 3.13-3.15, 3.19, and 3.20. The following assumptions were made:  $\mu = \mu_{max}(T)$  (Eq. 3.23),  $\phi = 4 \text{ min}^{-1}$ , and dissolved oxygen concentration of 30% of saturation (at the cultivation temperature and relative to saturation in the calibration procedure with air at 0.1 MPa). .... 51
- Fig. 3.9.** Prediction of the maximum cell concentration ( $C_{xmax}$ ) supported by the oxygen transfer system in the ALB, and the biomass productivity at variable temperature (27-37 °C) and pressure (0.1-0.4 MPa) (Eqs. 3.16 and 3.18). The following assumptions were made:  $\mu = \mu_{max}(T)$  (Eq. 3.23),  $C_{x0} = 0.1 \text{ g}_{DCW} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\phi = 4 \text{ min}^{-1}$ , and dissolved oxygen concentration of 30% of saturation (at the cultivation temperature and relative to saturation in the calibration procedure with air at 0.1 MPa). .... 52
- Fig. 3.10.** Agreement of the  $C_{xmax}$  model (Eq. 3.16) with the experimental data for the *E. coli* cultivation in the ALB pressurized at 0.4 MPa, using different specific gas flow rates (1.2-4  $\text{min}^{-1}$ ) and temperatures (32-37 °C). The error bars correspond to the 95% confidence interval based on standard errors from triplicates. The solid line is the model prediction of  $C_{xmax}$  (Eq. 3.16) and the dotted lines indicate its confidence interval (95% level) based on the standard error of the model output. The closed symbols correspond to the non-induced condition (growth phase). .... 54

## Capítulo 4

- Figura 4.1.** Modelos matemáticos ajustados aos dados experimentais de crescimento celular, consumo de substrato e produção de PspA para cultivos em batelada de *E. coli* recombinante em tanque agitado não pressurizado (5 L) com indução – (a) 27 °C, (b) 32 °C, (c) 37 °C – e sem indução – (d) 37 °C. O experimento de validação (e) foi realizado em reator airlift (5 L) pressurizado (até 4 bar). As barras de desvio padrão se referem a medidas em triplicatas e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança da estimativa do modelo (95 %). .... 64

## Capítulo 5

**Figura 5.1.** Crescimento celular ( $C_x$ ) e os perfis ótimos de atuação nas variáveis de controle do OD ( $Q_{ar}, Q_{O_2}, p$  e  $T$ ), bem como seu custo operacional ( $COP$ ) cumulativo, no decorrer da fase de crescimento simulada do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L.  $H(t)$  é a função Hamiltoniana proveniente do problema de otimização. Etapa 1: aumento de  $Q_{ar}$ ; Etapa 2: pressurização do sistema; Etapa 3: enriquecimento do ar de entrada com oxigênio puro..... 81

**Figura 5.2.** Comportamento da função objetivo (Equação 5.27) no decorrer da otimização dinâmica do controle do OD para a fase de crescimento de celular de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L..... 82

**Figura 5.3.** Variáveis de estado ( $C_x$  e  $C_p$ ) e os perfis ótimos de atuação nas variáveis de controle do OD ( $Q_{ar}, Q_{O_2}, p$  e  $T$ ), bem como seu custo operacional ( $COP$ ) cumulativo, no decorrer da fase de indução simulada do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L.  $H(t)$  é a função Hamiltoniana proveniente do problema de otimização. Etapa 1: pressurização do sistema; Etapa 2: enriquecimento do ar de entrada com  $O_2$  puro..... 84

**Figura 5.4.** Comportamento da função objetivo (Equação 5.38) no decorrer da otimização dinâmica do controle do OD para a fase de indução do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L..... 85

## Capítulo 6

**Figura 6.1.** Diagrama esquemático do método hierárquico EKF/MHE-DMC proposto para o processo de cultivo de *E. coli*.  $\kappa$  é o número de intervalos de amostragem ( $\Delta t$ ) entre ativações do MHE e  $z \in [0,1,2,3,...]$  determina os tempos de ativação do MHE.  $t$  é o tempo do processo. .... 95

**Figura 6.2.** Resultados (a) das saídas e (b) das entradas decorrentes da simulação da estratégia de referência EKF-DMC implementada para o controle do OD durante o cultivo de *E. coli* no biorreator airlift pressurizado frente aos cenários de (i) mudança do *set point* (indicado como variações degrau na concentração de OD), (ii) perturbações na entrada, (iii) incerteza no modelo implementada durante toda a simulação e (iv) ruído elevado na medida. Linhas sólidas se referem ao valor real das variáveis de estado simuladas e as linhas pontilhadas

representam as estimativas pelo EKF.  $t_{ind}$  é o instante do início da fase de indução e da adição de substrato (glicerol). A temperatura foi mantida em 32 °C na simulação..... 99

**Figura 6.3.** Resultados (a) das saídas e (b) das entradas decorrentes da simulação da estratégia de referência EKF/MHE-DMC implementada para o controle do OD durante o cultivo de *E. coli* no biorreator airlift pressurizado frente aos cenários de (i) mudança do *set point* (indicado como variações degrau na concentração de OD), (ii) perturbações na entrada, (iii) incerteza no modelo implementada durante toda a simulação e (iv) ruído elevado na medida. Linhas sólidas se referem ao valor real das variáveis de estado simuladas e as linhas pontilhadas representam as estimativas pelo EKF/MHE.  $t_{ind}$  é o instante do início da fase de indução e da adição de substrato (glicerol). A temperatura foi mantida em 32 °C na simulação..... 100

# LISTA DE QUADROS

## Capítulo 4

<b>Quadro 4.1.</b> Características principais dos modelos matemáticos do tipo caixa-branca (fenomenológico), caixa-cinza e caixa-preta (empírico).....	57
--	----

## Capítulo 5

<b>Quadro 5.1.</b> Principais métodos numéricos para solução de problemas de otimização dinâmica.....	67
---	----

# LISTA DE TABELAS

## Capítulo 4

**Tabela 4.1.** Valores estimados dos parâmetros das Equações 4.4-4.7..... 63

## Capítulo 6

**Tabela 6.1.** Medidas de desempenho IEQ e SQR para os métodos EKF-DMC e EKF/MHE-DMC..... 98

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$a$	área interfacial gás-líquido por unidade de volume de líquido	$(m^{-1})$
$A$	matriz de sensibilidade	
$a_k$	parâmetro da Equação 3.12	$(h^{-1})$
$a_q$	parâmetro da Equação 3.7	$(^{\circ}C^{-3} \cdot h^{-1})$
$a_{\mu}$	parâmetro das Equações 3.3 e 4.5	$(^{\circ}C^{-1} \cdot h^{-1})$
$a_{\mu m}$	parâmetro da Equação 4.5	$(^{\circ}C^{-1} \cdot h^{-1})$
ALB	biorreator airlift	
$b_k$	parâmetro da Equação 3.12	$(min)$
$b_q$	parâmetro da Equação 3.7	$(h^{-1})$
$b_{\mu}$	parâmetro das Equações 3.3 e 4.5	$(h^{-1})$
$b_{\mu m}$	parâmetro da Equação 4.5	$(h^{-1})$
$C$	concentração de oxigênio dissolvido no seio do líquido	$(g \cdot L^{-1})$
$c_j$	concentração de não eletrólitos $j$	$(g \cdot L^{-1})$
$c_k$	parâmetro da Equação 3.12	$(min^{-1})$
$C^*$	solubilidade do oxigênio no meio de cultura	$(g \cdot L^{-1})$
$C_0^*$	solubilidade do oxigênio em água	$(g \cdot L^{-1})$
$C_x$	concentração celular	$(g \cdot L^{-1})$
$C_{O_2}$	concentração de oxigênio dissolvido	$(g \cdot L^{-1})$
$C_{O_2}^*$	solubilidade do oxigênio no meio de cultivo	$(g \cdot L^{-1})$
$C_p$	concentração de proteína recombinante (PspA)	$(g \cdot L^{-1})$
$C_s$	concentração de substrato (glicerol)	$(g \cdot L^{-1})$
$C_{x0}$	concentração celular no início da fase exponencial de crescimento	$(g \cdot L^{-1})$
$C_{x \max}$	concentração celular máxima	$(g \cdot L^{-1})$
$COP$	custo operacional para controle do oxigênio dissolvido	$(US\$)$
$D$	coeficiente de difusão do oxigênio	$(m^2 \cdot h^{-1})$
$d_b$	diâmetro das bolhas	$(m)$
DMC	<i>dynamic matrix control</i>	
DO	oxigênio dissolvido	$(\% \text{ sat}, mg \cdot L^{-1})$
DOT	tensão de oxigênio dissolvido	$(\% \text{ sat})$
EKF	<i>extended Kalman filter</i>	

$E$	erro predito	
$E_l$	erro da resposta livre	
$E_{VC}$	energia do sistema	(J)
$\underline{f}$	vetor das equações fenomenológicas do sistema	
$\underline{g}$	vetor das restrições de igualdade	
$g$	aceleração gravitacional	(m·s <sup>-2</sup> )
IEQ	integral do erro quadrático	
$H_i$	parâmetro de <i>salting-out</i> do íon $i$ na Equação 3.15	(L·mol <sup>-1</sup> )
$H(t)$	função Hamiltoniana	
$h_{G,e}$	entalpias do ar nas correntes de entrada	(kJ·kg <sup>-1</sup> )
$h_{G,s}$	entalpias do ar nas correntes de saída	(kJ·kg <sup>-1</sup> )
$h_{LV}$	entalpia de vaporização do líquido	(kJ·kg <sup>-1</sup> )
$h_D$	altura do líquido aerado	(cm)
$h_L$	altura do líquido não aerado	(cm)
$I_i$	força iônica do íon $i$	(mol·L <sup>-1</sup> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside	
$J$	função objetivo do problema de otimização	
$K$	constante de proporcionalidade	(J·mmol <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>-1</sup> )
$K_j$	parâmetro de solubilidade para o não eletrólito $j$	(L·g <sup>-1</sup> )
$k_e$	sensibilidade do eletrodo	(h <sup>-1</sup> )
$k_L$	coeficiente de transferência de massa	(m·h <sup>-1</sup> )
$k_{La}$	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	(h <sup>-1</sup> )
$k_m$	parâmetro da Equações 4.3 e 4.7	(g <sub>P</sub> ·g <sub>M</sub> <sup>-1</sup> )
$k_\mu$	parâmetro da Equação 4.3	(h <sup>-1</sup> )
$k_T$	constante de tempo determinada	(h <sup>-1</sup> )
$k_{i\mu}$	parâmetro da Equação 4.3	(h <sup>-1</sup> )
$K_s$	constante de Monod	(g·L <sup>-1</sup> )
$L$	ganho de Kalman	
$M$	massa molar do gás	(kg·mol <sup>-1</sup> )
$m_{O_2}$	coeficiente de consumo de oxigênio para manutenção	(h <sup>-1</sup> )
$M_{O_2}$	massa molar do oxigênio molecular	(g·mol <sup>-1</sup> )
$m_s$	coeficiente de consumo de substrato para manutenção	(h <sup>-1</sup> )



MHE	<i>moving horizon estimator</i>	
MPC	controlador preditivo baseado em modelo	
$\dot{m}_G$	vazão mássica de gás	(kg·s <sup>-1</sup> )
$\dot{m}_{G,e}$	vazão mássica do gás de entrada	(kg·s <sup>-1</sup> )
$\dot{m}_{G,s}$	vazão mássica do gás de saída	(kg·s <sup>-1</sup> )
$\dot{m}_{V,s}$	vazão mássica de vapor de água saturado na corrente de saída	(kg·s <sup>-1</sup> )
$n_m$	parâmetros do modelo	
$n_e$	número de pontos experimentais	
$\dot{n}_{in}$	fluxo molar de gás na linha de entrada	(mol·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
$\dot{n}_{out}$	fluxo molar de gás na linha de saída	(mol·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
$n$	dimensão do vetor de estados	
$N$	tamanho do horizonte do estimador de estados	
OTR	taxa de transferência de oxigênio	(g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
OUR	taxa de consumo de oxigênio	(g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
OD	oxigênio dissolvido	(% sat, mg·L <sup>-1</sup> )
PID	proporcional-integral-derivativo	
PNL	problema de otimização não-linear	
PspA	proteína A de superfície do pneumococo	
PMP	princípio de mínimo de Pontryagin	
PHJB	princípio de otimalidade de Hamilton-Jacobi-Bellman	
$P$	matriz de covariância das variáveis de estado	
$P_0$	chute inicial para a matriz de covariância das variáveis de estado	
$P_I$	potência devido à expansão isotérmica do gás	(W)
$P_C$	potência devido à energia cinética das bolhas	(W)
$p_2^{min}$	pressão mínima no biorreator	(bar)
$p_2^{max}$	pressão máxima no biorreator	(bar)
$P_x$	produtividade de biomassa	(g <sub>MS</sub> ·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
$p$	pressão absoluta	(bar, MPa)
$p_2$	pressão do biorreator	(bar, MPa)
$p_1$	pressão fora do biorreator	(bar, MPa)
$p_{O_2}$	pressão absoluta parcial de oxigênio	(MPa)
$p_e$	pressão na saída do aspensor	(Pa)
$p_s$	pressão na superfície do líquido	(Pa)

$Q$	matriz de covariância do ruído do processo	
$Q_G$	vazão volumétrica de gás	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$Q_{ar}$	vazão volumétrica de ar	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$Q_{O_2}$	vazão volumétrica de oxigênio puro	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$Q_{ar/O_2}^{(1)}$	vazões volumétricas dos gases no fluxômetro	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$Q_{ar/O_2}^{(2)}$	vazões volumétricas dos gases no biorreator	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$Q_{mín}^{(2)}$	vazão mínima de gás permitida no biorreator	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$Q_{máx}^{(2)}$	vazão máxima de gás permitida no biorreator	$(\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1})$
$\dot{Q}_M$	taxa de calor gerado no sistema devido ao metabolismo celular	$(\text{W}, \text{J} \cdot \text{s}^{-1})$
$q_{O_2}$	velocidade específica de consume de oxigênio	$(\text{g}_{O_2} \cdot \text{g}_{DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$
$q_p$	velocidade específica de produção de PspA	$(\text{h}^{-1})$
$q$	dimensão do vetor de medidas	
$R$	matriz de covariância do ruído da medida	
$R_c$	constante dos gases ideais	$(\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$
$S$	matriz dinâmica do modelo de resposta ao degrau	
$\underline{S}$	vetor das restrições de desigualdade	
SRQ	soma dos resíduos quadráticos	
STB	biorreator tipo tanque agitado	
$\underline{T}$	vetor das restrições de desigualdade no estado final	
$T_{sp}$	<i>set-point</i>	$(^\circ\text{C})$
$t$	tempo	$(\text{h})$
$t_k$	tempo no passo $k$	$(\text{h})$
$t_0$	tempo inicial	$(\text{h})$
$t_e$	tempo de exposição	$(\text{h})$
$t_f$	tempo final	$(\text{h})$
$t_{95\%;(n-m)}$	variável da distribuição de Student	
$T$	temperatura	$(^\circ\text{C}, \text{K})$
$T_{px}$	parâmetro da Equação 4.3 e 4.7	$(\text{h})$
$T_{ref}$	parâmetro da Equação 4.5	$(^\circ\text{C})$
$\underline{u}$	vetor das variáveis de controle	
$u$	variável de controle	
$U_0$	velocidade do gás através dos orifícios do aspersor	$(\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$

$V$	volume de trabalho do biorreator	(L)
$V_L$	volume de líquido no reator	(L)
$\underline{\nu}$	vetor dos multiplicadores de Lagrange	
$v_{G,e}$	velocidade do ar nas correntes de entrada	(m·s <sup>-1</sup> )
$v_{G,s}$	velocidade do ar nas correntes de saída	(m·s <sup>-1</sup> )
$v_{V,s}$	velocidade do vapor de água na corrente saída	(m·s <sup>-1</sup> )
$\underline{\underline{X}}$	matriz de regressão	
$\underline{x}_0$	vetor de variáveis de estado na condição inicial	
$x_0$	chute inicial para a variável de estado	
$\underline{x}$	vetor de variáveis de estado	
$x(t)$	variável de estado	
$\hat{x}$	variável de estado estimada	
$\tilde{x}$	variável de estado real simulada	
$w$	ruído do processo	
$W$	matriz de ponderação do controlador preditivo	
$\dot{W}$	taxa de trabalho realizado sobre o sistema	(W)
$y_{CO_2}$	fração molar de dióxido de carbono	
$y_{O_2}$	fração molar de oxigênio	
$\hat{Y}$	resposta forçada	
$\hat{Y}_l$	resposta livre	
$Y_{sp}$	trajetória de <i>set point</i>	
$Y_{x/O_2}$	coeficiente de rendimento de biomassa a partir de oxigênio	(g <sub>MS</sub> ·g <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
$Y_{x/s}$	coeficiente de rendimento de biomassa a partir de substrato	(g <sub>DCW</sub> ·g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
$\underline{\hat{y}}_{i,c}$	intervalo de confiança dos valores preditivos	
$\underline{\hat{y}}$	valores preditos pelo modelo	
$y$	variável medida	
$y_{sp}$	valor de <i>set point</i>	
$z$	número inteiro que determina os tempos de ativação do MHE	

**Letras gregas:**

$\beta$	parâmetro da Equação 4.5	(°C <sup>-1</sup> )
$\gamma$	expoente isentrópico	

$\Delta t$	tempo de amostragem	(h)
$\Delta u$	variação na variável de controle	
$\varepsilon$	retenção gasosa	
$\sigma_{K_S}$	erro padrão da estimativa do parâmetro $K_S$	(g·L <sup>-1</sup> )
$v$	ruído da medida	
$\Phi$	vazão específica de gás	(min <sup>-1</sup> )
$\varphi$	função objetivo do controlador preditivo	
$\kappa$	número de intervalos de amostragens entre ativações do MHE	
$\underline{\lambda}$	vetor das variáveis adjuntas	
$\mu$	velocidade específica de crescimento	(h <sup>-1</sup> )
$\mu_{max}$	velocidade específica máxima de crescimento	(h <sup>-1</sup> )
$\mu_p$	velocidade específica de produção de PspA	(h <sup>-1</sup> )
$\mu_m$	velocidade específica de perda de viabilidade celular	(h <sup>-1</sup> )
$\eta$	horizonte do modelo do controlador preditivo	
$\eta_c$	eficiência do compressor	
$\theta$	parâmetro da Equação 3.12	(adimensional)
$\underline{\hat{\theta}}$	vetor dos parâmetros do modelo	
$\underline{\xi}$	multiplicadores de Lagrange	
$\underline{\delta x}_f$	variação de $\underline{x}$ no tempo final	
$\rho$	horizonte de predição do controlador preditivo	
$\rho_G$	densidade do gás	(kg·m <sup>-3</sup> )
$\rho_V$	densidade do vapor de água saturado	(kg·m <sup>-3</sup> )
$O$	matriz de observabilidade	
$\omega$	horizonte de controle do controlador preditivo	

# SUMÁRIO

<b>Capítulo 1: Introdução</b> .....	24
<b>Capítulo 2: Abordagem para o Desenvolvimento do Trabalho</b> .....	28
<b>2.1 Modelagem do processo de produção de PspA por <i>Escherichia coli</i></b> .....	28
2.1.1 Obtenção de dados experimentais em biorreatores tipo tanque agitado e airlift	29
2.1.2 Transferência e consumo de oxigênio em biorreator airlift .....	29
2.1.3 Cinética de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto	29
<b>2.2 Controle do fornecimento de oxigênio em biorreatores airlift</b> .....	30
2.2.1 Otimização dinâmica do controle do oxigênio dissolvido .....	30
2.2.2 Controle preditivo do oxigênio dissolvido .....	30
<b>Capítulo 3: Modelagem do Consumo e da Transferência de Oxigênio</b> .....	32
<b>3.1 Introduction</b> .....	32
<b>3.2 Materials and methods</b> .....	34
3.2.1 Microorganism and culture medium .....	34
3.2.2 Bioreactors .....	34
3.2.3 Experimental procedure for the cultivations .....	35
3.2.4 Analytical methods .....	36
3.2.5 Determination of the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) .....	36
3.2.6 Determination of the specific production rate of PspA ( $\mu_p$ ) .....	37
3.2.7 Determination of the oxygen uptake rate ( <i>OUR</i> ) .....	37
3.2.8 Determination of the overall gas hold-up ( $\varepsilon$ ), volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ), and oxygen transfer rate ( <i>OTR</i> ) .....	39
3.2.9 Model predictions for maximum biomass concentration and productivity .....	41
<b>3.3 Results and discussion</b> .....	42
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> cultivation and protein expression .....	42
3.3.2 $q_{O_2}$ modeling .....	44

3.3.3 $k_L a$ modeling.....	47
3.3.4 Joint analysis of $q_{O_2}$ and <i>OTR</i> simulations.....	49
<b>3.3 Conclusions.....</b>	<b>54</b>
<b>Capítulo 4: Modelagem da Cinética do Cultivo Celular.....</b>	<b>56</b>
4.1 Modelos matemáticos e sua relevância em bioprocessos.....	56
4.2 Modelagem matemática de cultivos de <i>Escherichia coli</i> recombinante.....	57
4.3 Construção do modelo matemático do processo de produção da PspA por <i>Escherichia coli</i> recombinante.....	60
4.4 Conclusões.....	65
<b>Capítulo 5: Otimização Dinâmica do Controle do Oxigênio Dissolvido.....</b>	<b>66</b>
5.1 Otimização dinâmica: teoria e métodos numéricos.....	66
5.1.1 Formulação direta.....	68
5.1.2 Formulação indireta: PHJB e PMP.....	69
5.2 Controle ótimo do oxigênio dissolvido.....	71
5.3 Ensaios de otimização dinâmica em malha aberta.....	72
5.3.1 Hipóteses assumidas e simplificação dos modelos.....	72
5.3.2 Desenvolvimento matemático.....	75
5.3.2.1 Fase de crescimento.....	75
5.3.2.2 Fase de indução.....	77
5.3.3 Algoritmo de otimização.....	79
5.3.4 Resultados e discussão.....	80
5.3.4.1 Fase de crescimento.....	80
5.3.4.2 Fase de indução.....	83
5.4 Conclusões.....	85
<b>Capítulo 6: Controle Preditivo do Oxigênio Dissolvido Integrado a Estimadores de Estado.....</b>	<b>87</b>
6.1 Introdução.....	87

<b>6.2 Estimadores de estado</b> .....	89
6.2.1 Teste de observabilidade .....	89
6.2.2 Filtro de Kalman estendido.....	89
6.2.3 Estimador de horizonte móvel.....	91
<b>6.3 Estratégia hierárquica EKF/MHE-DMC</b> .....	92
6.3.1 Controlador preditivo por matriz dinâmica.....	92
6.3.2 Formulação EKF/MHE-DMC.....	94
<b>6.4 Resultados de implementação</b> .....	95
<b>6.5 Conclusões</b> .....	101
<b>Capítulo 7: Considerações Finais</b> .....	102
<b>Referências</b> .....	104
<b>Apêndice A: Cálculo Analítico das Derivadas Parciais do Problema de Otimização Dinâmica</b> .....	115
<b>Apêndice B: Balanço de Energia para o Biorreator Airlift Pressurizado durante Cultivo de <i>E. coli</i></b> .....	119

## Capítulo 1: Introdução

Nas últimas décadas, os avanços nas áreas de microbiologia e biologia molecular trouxeram grandes melhorias para os bioprocessos, acarretando em aumentos de produtividade e de qualidade dos produtos (VOJINOVIĆ; CABRAL; FONSECA, 2006; WANG et al., 2009). Atualmente, as indústrias de biotecnologia apresentam elevada participação na economia mundial. Estima-se um aumento anual de 11,4% no mercado de produtos biotecnológicos, de US\$ 216,5 bilhões em 2012 para US\$ 414,5 bilhões em 2017 (“Transparency Market Research”, 2016).

Nesse contexto, a bactéria *Escherichia coli* é, desde a década de 1960, o principal microrganismo empregado para a produção de proteínas recombinantes, especialmente monômeros que não exigem modificações pós-traducionais complexas (WAEGEMAN; SOETAERT, 2011). As vantagens do emprego desse microrganismo em bioprocessos são sua ampla caracterização metabólica e genética e a facilidade de cultivo, com rápido crescimento e alta produção da proteína heteróloga, proporcionando elevadas produtividades (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Em 2011, estavam disponíveis no mercado mais de 150 biofármacos baseados em proteínas recombinantes licenciados pela *European Medicines Agency* (EMA) e pela *Federal Drugs Agency* (FDA), correspondendo a um mercado global de €50–60 bilhões, com crescimento previsto de 9% ao ano (WAEGEMAN; SOETAERT, 2011). Desse total de biofármacos, 30% são obtidos a partir de *Escherichia coli* geneticamente modificada (WAEGEMAN; SOETAERT, 2011).

Com relação aos tipos de reatores utilizados em cultivos de *E. coli* expressando proteínas recombinantes, os estudos encontrados na literatura empregam, quase que exclusivamente, biorreatores convencionais (tanques agitados e aerados). Aplicando técnicas avançadas de controle de biorreatores, especialmente em relação ao fornecimento de nutrientes (batelada-alimentada) e à manutenção adequada do nível de oxigênio dissolvido (OD) no processo, bons resultados em produção de biomassa e proteína heteróloga vêm sendo alcançados (BABAEIPOUR et al., 2007; HORTA et al., 2012, 2014; KHALILZADEH et al., 2004; LI; ZHANG; TAN, 2006; MARÉ et al., 2005; SILVA et al., 2013). Nesses trabalhos, o controle do OD foi feito através da manipulação da agitação, temperatura, vazões de ar e oxigênio puro e alimentação de nutrientes. As lógicas de controle geralmente utilizadas nesses estudos apresentam heurísticas do tipo degrau e PID. Porém, cultivos de *E. coli* em reatores pneumáticos, em especial o tipo airlift, que encontram aplicação em diversos



processos bioquímicos (HEIJNEN et al., 1990; JANARDHAN et al., 2007; KIM; KANG; LEE, 1997; MAFRA et al., 2015), têm sido pouco estudados, evidenciando um amplo campo de pesquisa a ser explorado (CAMPANI et al., 2016).

De forma geral, o biorreator airlift apresenta menor complexidade de construção devido à ausência de partes móveis, menor risco de contaminação decorrente da inexistência do selo mecânico (presente no tanque agitado) e eficiente dispersão gás-líquido realizada pelo próprio gás de entrada com baixo consumo de energia (HUANG; MCDONALD, 2009). Em estudo realizado por Gavrilesco e Roman (1998) foi observada uma economia de energia de até 40%, em comparação ao biorreator convencional, com a utilização de reator airlift para a produção de antibióticos (bacitracina, cefalosporina e nistatina). Essas características, portanto, fazem do reator airlift uma alternativa interessante frente aos reatores convencionais para o cultivo de *E. coli*.

A pequena quantidade de estudos reportados envolvendo cultivo de *E. coli* em reator airlift pode estar relacionada a vários fatores, como a não disponibilidade desses equipamentos em muitos laboratórios de pesquisa e a dificuldade de promover a mistura e fornecer oxigênio em suspensões com altas concentrações celulares (HUANG; MCDONALD, 2009), características de cultivos de *E. coli* expressando proteínas recombinantes. Para minimizar o problema do baixo fornecimento de oxigênio, quatro variáveis podem ser manipuladas para o controle do OD: pressão, temperatura e vazões de ar e oxigênio (CAMPANI et al., 2016; MARÉ et al., 2005). Dessa forma, um controle robusto e eficiente do OD deve ser desenvolvido através da integração dessas variáveis em algoritmos de controle simples (heurístico, *on/off*, PID, etc.) ou mais avançados (preditivo, adaptativo, etc.) empregando, se possível, estimadores de estado, também conhecidos como *soft sensors*, que são ferramentas bastante utilizadas para a filtragem de dados ruidosos e/ou estimativa de variáveis não medidas diretamente durante o processo. Além disso, pode-se também aplicar o controle ótimo visando a algum objetivo específico, como a maximização da eficiência com redução de custo na transferência de oxigênio.

São relatados na literatura vários estudos envolvendo o cultivo de *E. coli* em reator convencional pressurizado, com aumento expressivo da concentração celular máxima e consequente aumento de produtividade (KNABBEN et al., 2010; KNOLL et al., 2007; MA et al., 2010; MATSUI et al., 2006). Os efeitos positivos do emprego de biorreatores convencionais pressurizados também se estendem para bioprocessos envolvendo outros microrganismos bastante utilizados, como *Saccharomyces cerevisiae* (BELO; PINHEIRO; MOTA, 2003) e *Pichia pastoris* (LOPES; MOTA; BELO, 2013). No entanto, o uso de reator

airlift pressurizado (5 L) para cultivo de *E. coli* é avaliado apenas no estudo desenvolvido por Campani et al. (2016).

Finalmente, do ponto de vista econômico, a análise dos custos inerentes à produção de um determinado produto biotecnológico é crucial para a viabilidade de um bioprocessamento industrial. Na produção de vacinas, por exemplo, o custo por dose da mesma pode determinar a viabilidade da adoção de campanhas de imunização em larga escala de populações animais e humanas, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil (CANALES et al., 2010; HO et al., 2011). Neste aspecto, a pressurização de biorreatores é também uma estratégia com grande potencial. A elevação da pressão em um biorreator pode ser realizada de forma simples e relativamente barata, apenas restringindo a linha de saída de gás do sistema com uma válvula (CAMPANI et al., 2016; YANG; WANG, 1992). Esse método, portanto, pode ser aplicado com baixo custo para uma grande variedade de reatores com resistência mecânica adequada à sobrepressão. Já a estratégia de enriquecimento do gás de entrada com oxigênio puro, por outro lado, apresenta um custo relativamente elevado para o processo.

Diante das considerações expostas acima, verifica-se que existe um extenso campo de pesquisa a ser explorado no estudo dos cultivos de *E. coli* em biorreatores airlift operados com e sem sobrepressão. Destaca-se ainda que os benefícios do investimento no desenvolvimento desses sistemas se estendem também a cultivos de outros microrganismos, tais como fungos filamentosos. E, da mesma forma, o desenvolvimento de estratégias de controle do OD incorporando a variável pressão também pode ser estendido para outros tipos de biorreatores operados em sobrepressão.

A presente tese se insere no projeto de pesquisa “Intensificação e integração de processos de produção e purificação de proteína A de superfície de pneumococo” (FAPESP: 2015/10291-8), coordenado pelas pesquisadoras Profa. Dra. Teresa C. Zangirolami e Dra. Viviane M. Gonçalves (Instituto Butantan). As proteínas de superfície A do *Streptococcus pneumoniae* (PspA) apresentam interessantes características antigênicas e são umas das mais promissoras opções como proteínas carreadoras para a produção de novas vacinas pneumocócicas conjugadas (PERCIANI et al., 2013).

Neste contexto, a presente tese tem como objetivo principal otimizar o controle do OD em reator pneumático tipo airlift (5 L) adaptado para operação em sobrepressão e avaliar seu desempenho em cultivos de *Escherichia coli*, que apresentam alta demanda por oxigênio. Com esse intuito, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- desenvolver modelo matemático que descreva satisfatoriamente o processo de cultivo celular e produção da proteína recombinante (PspA) no reator airlift pressurizado, bem como a transferência e o consumo de oxigênio no sistema;
- utilizar os modelos matemáticos desenvolvidos para reduzir os custos de processo através da otimização dinâmica em malha aberta do controle do OD;
- desenvolver e avaliar *in silico* um controlador avançado do OD com base na heurística obtida a partir da otimização dinâmica do processo, integrando o controlador preditivo a observadores de estado capazes de estimar as quatro variáveis de estado do sistema (concentrações celular, de substrato, de PspA e de OD) com base apenas na medida do OD;

# Capítulo 2: Abordagem para o Desenvolvimento do Trabalho

A tese foi desenvolvida em duas etapas principais: modelagem do processo de cultivo de *Escherichia coli* geneticamente modificada para a produção de proteína recombinante (PspA) e o desenvolvimento de controlador avançado para o oxigênio dissolvido (OD). Desta forma, a presente tese está dividido em mais cinco capítulos. O Capítulo 3 aborda a modelagem da transferência e do consumo de oxigênio no reator airlift pressurizado durante as fases de crescimento e indução do cultivo de *E. coli* recombinante. No Capítulo 4, o modelo cinético do processo é desenvolvido, descrevendo as principais variáveis de estado do sistema: concentrações de células, substrato limitante (glicerol) e proteína recombinante produzida (PspA). No Capítulo 5, os modelos desenvolvidos nos capítulos anteriores são empregados para a otimização dinâmica do controle do OD visando à redução de custo da transferência de oxigênio. No Capítulo 6, é proposto e avaliado um controlador avançado do OD integrado a estimadores de estado. Por fim, no Capítulo 7 são feitas as considerações finais sobre os resultados obtidos e também são apresentadas sugestões para trabalhos futuros. Em cada capítulo pode ser encontrada uma revisão bibliográfico dos respectivos temas abordados.

## 2.1 Modelagem do processo de produção de PspA por *Escherichia coli*

A modelagem matemática possibilita um melhor entendimento do processo, através de sua simulação e análise. Além disso, os modelos matemáticos podem ser empregados para a otimização do processo e para o desenvolvimento de controladores e estimadores de estado.

Nesta tese, foram desenvolvidos os modelos matemáticos do processo capazes de descrever a dinâmica dos principais componentes do sistema: concentrações de células ( $C_x$ ), substrato ( $C_s$ ), PspA ( $C_p$ ) e oxigênio dissolvido (OD). Esses modelos são usados posteriormente para o desenvolvimento e a otimização subsequentes do controle do OD no processo (Capítulos 5 e 6).

### 2.1.1 Obtenção de dados experimentais em biorreatores tipo tanque agitado e airlift

Os dados experimentais usados para o ajuste dos modelos matemáticos foram obtidos a partir de cultivos de *E. coli* com e sem a indução da produção da PspA e em condições variadas de temperatura (27, 32 e 37 °C). Os cultivos foram conduzidos em tanque agitado (5 L) para que a estimativa do consumo de oxigênio pelas células através do método de balanço gasoso pudesse ser feita com maior precisão do que no reator airlift, que é operado com vazões de gás mais elevadas. O cultivo para a validação dos modelos, por outro lado, foi realizado no biorreator airlift, bem como os ensaios para a caracterização da transferência de oxigênio. A descrição dos biorreatores, do meio de cultura e da linhagem geneticamente modificada da *E. coli* utilizada pode ser encontrada no Capítulo 3.

### 2.1.2 Transferência e consumo de oxigênio em biorreator airlift

A temperatura influencia as taxas de consumo ( $q_{O_2}$ ) e transferência de oxigênio ( $OTR$ , do inglês *Oxygen Transfer Rate*) em cultivos aeróbios. Portanto, a análise do efeito da temperatura sobre  $q_{O_2}$  e  $OTR$  é essencial para o controle e a otimização de bioprocessos. Semelhante estudo foi então desenvolvido para o cultivo de *Escherichia coli* geneticamente modificada produzindo a proteína recombinante PspA. Foram realizados cultivos de *E. coli* em diferentes temperaturas (27-37°C) no biorreator tipo tanque agitado. O reator airlift foi usado para caracterizar a transferência de oxigênio e validar os modelos de  $q_{O_2}$  e  $OTR$ . Finalmente, as equações foram empregadas para avaliar o processo de cultivo no reator airlift em diferentes pressões (0,1-0,4 MPa) e temperaturas (27-37°C). Os resultados obtidos, bem como a descrição detalhada dos métodos empregados, são apresentados no Capítulo 3.

### 2.1.3 Cinética de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto

Foi proposto um modelo matemático híbrido, baseado em balanço material e em relações empíricas, para representar a dinâmica dos demais componentes do sistema:  $C_x$ ,  $C_s$  e  $C_p$ . Esse modelo foi ajustado primeiramente a dados experimentais provenientes de cultivos em tanque agitado. A validação das equações, por sua vez, foi realizada através de

dados obtidos de cultivo no reator airlift. Assumiu-se que a dinâmica do cultivo celular de *E. coli* é independente do tipo de biorreator quando as condições operacionais são as mesmas (OD, pH e temperatura), uma vez que ambos reatores apresentam boa mistura e tensões de cisalhamento bastante inferiores ao limite adequado ao cultivo de *E. coli*.

As equações do modelo matemático, bem como os valores dos seus parâmetros, são mostradas no Capítulo 4. As curvas ajustadas do modelo e uma análise do mesmo são apresentados no mesmo Capítulo 4.

## 2.2 Controle do fornecimento de oxigênio em biorreatores airlift

De forma geral, o reator airlift apresenta menor capacidade de transferência de oxigênio do que os reatores tipo tanque agitado. Por esse motivo, deve-se empregar variáveis adicionais para o controle do oxigênio dissolvido como: vazões de ar e oxigênio puro, temperatura e pressão do sistema. Dentre essas variáveis, a pressurização do sistema é inédita no contexto de cultivos aeróbios de *E. coli* em reatores airlift.

### 2.2.1 Otimização dinâmica do controle do oxigênio dissolvido

A utilização de quatro variáveis manipuladas (vazões de ar e oxigênio puro, temperatura e pressão) para o controle do oxigênio dissolvido requer um estudo quanto à melhor maneira de atuar nessas variáveis de forma a reduzir os custos operacionais relacionados ao controle do OD, o que foi realizado a partir de técnicas de otimização dinâmica. Para isso, foi utilizado o modelo do processo desenvolvido e validado nos Capítulos 3 e 4. Os resultados da otimização dinâmica, ou seja, os perfis ótimos de atuação nas variáveis manipuladas são apresentados e discutidos no Capítulo 5.

### 2.2.2 Controle preditivo do oxigênio dissolvido

Uma vez que os perfis ótimos de atuação nas variáveis manipuladas são determinados a partir dos ensaios de otimização dinâmica, deve-se desenvolver um controlador avançado capaz de controlar o OD de forma robusta. Uma opção é o controlador preditivo baseado em modelo, que, no entanto, é pouco explorado na literatura para esse fim. Esse tipo de controlador exige conhecimento do modelo do processo, bem como de medidas *online* de variáveis de estado. Se as mesmas não estão disponíveis no processo, ou apresentam ruídos elevados, podem ser implementados estimadores de estado associados ao

controlador, de forma a inferir os valores dessas variáveis em tempo real. Um controlador preditivo linear para o OD foi proposto em associação a dois estimadores de estado (*extended Kalman filter* e *moving horizon estimator*), capazes de estimar  $C_x$ ,  $C_s$  e  $C_p$  com base apenas em medidas de OD. Essa estratégia de controle foi então implementada e testada em simulações do processo a partir dos modelos desenvolvidos nos Capítulos 3 e 4. Os resultados obtidos são descritos no Capítulo 6.

# Capítulo 3: Modelagem do Consumo e da Transferência de Oxigênio

Neste capítulo é apresentada a modelagem do consumo e da transferência de oxigênio em cultivos de *Escherichia coli* geneticamente modificada durante as fases de crescimento e indução da síntese da proteína recombinante (PspA) em biorreator airlift de bancada. O desenvolvimento dos modelos matemáticos, bem como sua validação e análise, é apresentado a seguir na forma do artigo científico intitulado “*Recombinant Escherichia coli cultivation in a pressurized airlift bioreactor: assessment of the influence of temperature on oxygen transfer and uptake*”, publicado em *Bioprocess and Biosystems Engineering* (2017) 40:1621-1633 (DOI 10.1007/s00449-017-1818-7).

## 3.1 Introduction

Microbial growth and product synthesis in bioprocesses are affected by environmental conditions including ion concentrations, substrate, dissolved gases, temperature, pH, and shear stress, among others (ONKEN; LEIFKE, 1989). The level of dissolved oxygen (DO) in the broth is one of the most important variables in aerobic bioprocesses, since molecular oxygen is needed as the final electron acceptor in respiratory metabolism (ONKEN; LEIFKE, 1989). Therefore, adequate control of DO is required in order to ensure high reproducibility and quality of bioprocesses, which are main goals of the United States Food and Drug Administration’s Process Analytical Technology (PAT) initiative (FDA, 2004).

Among the various reactors used in bioprocesses, airlift bioreactors (ALBs) have pros and cons, compared to stirred tank reactors. On one hand, ALBs offer the simplicity of construction, reduced risk of contamination, efficient gas-liquid dispersion, and low power consumption (HUANG; MCDONALD, 2009). On the other hand, this reactor type has a lower oxygen transfer rate (*OTR*), due to the absence of mechanical agitation by impellers (CAMPANI et al., 2016; HUANG; MCDONALD, 2009), so it is less widely used for aerobic microbial processes involving high cell densities. However, this drawback can be overcome by reducing the temperature (to decrease the oxygen uptake rate) and pressurizing the system



(to increase the solubility of oxygen in the liquid phase). These are simple and inexpensive strategies for increasing oxygen transfer capacity (CAMPANI et al., 2016).

Oxygen transfer is influenced by temperature-dependent physical properties of the gas and liquid phases, such as density, viscosity, and oxygen diffusivity and solubility (DANIIL; GULLIVER, 1988). Furthermore, the influence of temperature on *OTR* also depends on the reactor configuration (BEWTRA; NICHOLAS; POLKOWSKI, 1970; BOOGERD et al., 1990; KRAHE; ANTRANIKIAN; MÄRKL, 1996). For instance, Vogelaar et al. (2000) found that a higher temperature proportionally increased the volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ) and decreased the oxygen solubility in water, resulting in a constant *OTR* in a bench-scale bubble column reactor. However, similar studies have not yet been reported for ALBs employing culture media.

The specific oxygen uptake rate ( $q_{O_2}$ ) is influenced by both recombinant protein synthesis and temperature, due to their influence on cell metabolism (GLICK, 1995; MARÉ et al., 2005; NEUBAUER; LIN; MATHISZIK, 2003). Overproduction of foreign proteins is believed to affect  $q_{O_2}$ , due to the drainage of energy and precursors required for recombinant protein synthesis, often termed “metabolic load” (BHATTACHARYA; DUBEY, 1997; GLICK, 1995; NEUBAUER; LIN; MATHISZIK, 2003). On the other hand, a positive effect of temperature (up to ~37 °C in the case of *E. coli*) on  $q_{O_2}$  is due to the increase in specific growth rate ( $\mu$ ) (MARÉ et al., 2005; SHULER; KARGI, 2002).

Considering the complex temperature dependence of several bioprocess variables, the use of mathematical models to assess the effect of temperature on  $q_{O_2}$  and *OTR* is essential for aerobic bioprocess design, optimization, and control. However, to our knowledge, such joint analysis is not available for induced cultures of *Escherichia coli* performed at variable temperature. Therefore, the purpose of the present study is to contribute to this growing area of research by modeling and assessing the influence of temperature on *OTR* and  $q_{O_2}$  for a bench-scale ALB (5 L capacity) during recombinant *E. coli* cultivations carried out between 27 and 37 °C. The *OTR* and  $q_{O_2}$  models developed were used to predict the pressure and temperature required to provide sufficient oxygen transfer for cultures of *E. coli* in the ALB. An innovative strategy for DO control with increased biomass productivity was proposed and evaluated.

## 3.2 Materials and methods

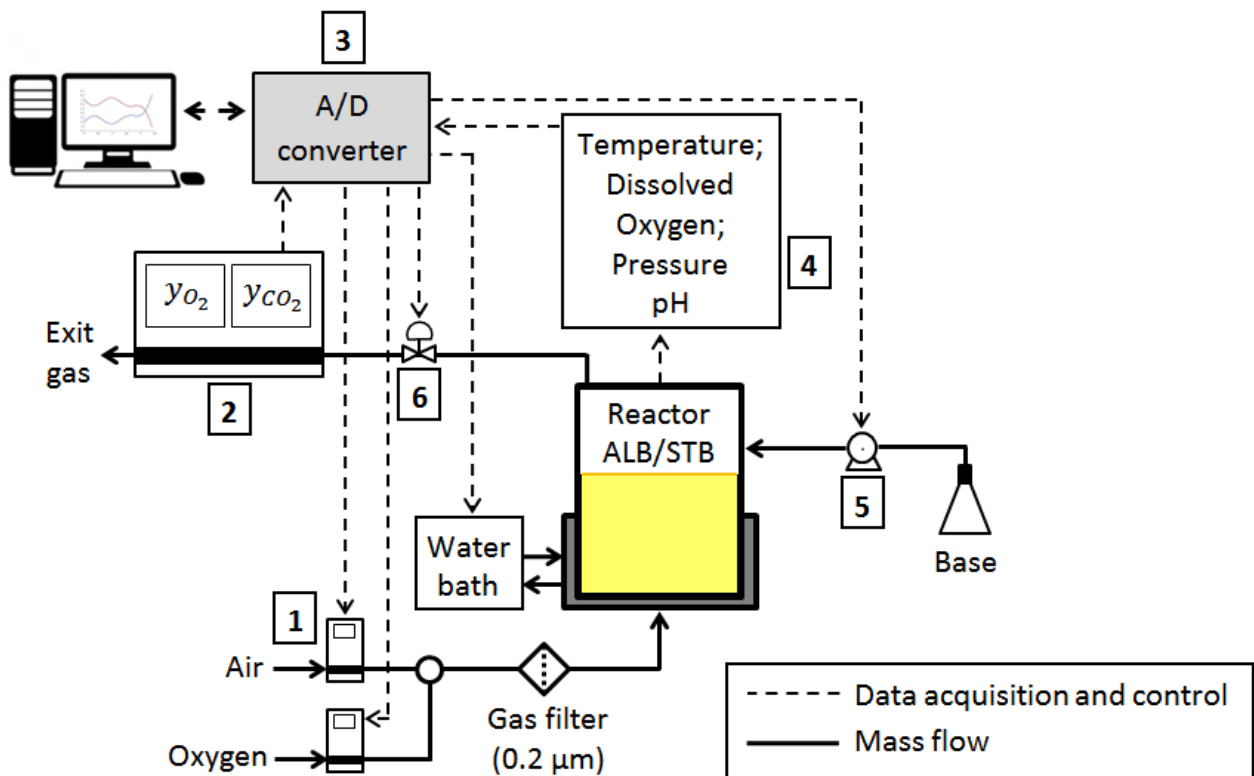
### 3.2.1 Microorganism and culture medium

The microorganism used in the experiments was *Escherichia coli* BL21(DE3) harboring the plasmid pET37b(+) with a fragment of pneumococcal surface protein A (PspA) gene from *Streptococcus pneumoniae* (MORENO et al., 2010). PspA presents interesting immunogenic characteristics and has been proposed as a promising alternative carrier protein (PERCIANI et al., 2013) and as a serotype-independent vaccine against *S. pneumoniae* (MIYAJI et al., 2013). The expression of the PspA gene is controlled by the *lacUV5* and *T7lac* promoters, which are isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) inducible, and the recombinant protein is intracellularly accumulated. This clone was kindly provided by Dr. Eliane Miyaji of the Laboratory of Molecular Biology, Butantan Institute (São Paulo, Brazil).

The defined culture medium (HORTA et al., 2012) employed for the cultivations and the oxygen transfer characterization experiments had the following composition: glycerol ( $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $5.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $17.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), citric acid ( $2.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ferric citrate ( $133.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CoCl}_2$  ( $3.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MnCl}_2$  ( $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CuCl}_2$  ( $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COOH})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $33.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), EDTA ( $18.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $1.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), thiamine ( $45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), kanamycin ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and antifoam PPG ( $0.03\% \text{ v}\cdot\text{v}^{-1}$ ). The induction phase was initiated with the addition of 1 mM of IPTG. During the induction phase, glycerol pulses (300 mL of defined culture medium containing  $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of glycerol) were added when the residual concentration of glycerol fell below  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , in order to prevent protein synthesis being hampered by substrate depletion.

### 3.2.2 Bioreactors

A stirred tank bioreactor (STB) with three Rushton turbine impellers (HORTA et al., 2014) and a concentric-tube airlift bioreactor (ALB) (CAMPANI et al., 2015), both with 5 L working volume, were used for the *E. coli* cultivations and the oxygen transfer characterization experiments, respectively. The bioreactors were controlled and monitored using SuperSys\_HCDC software (HORTA et al., 2014), with the data recorded on-line using an analog-to-digital converter (model cFP2020, National Instruments). In addition, the reactors were equipped for the control of temperature, pH, and dissolved oxygen (HORTA et al., 2014). The dissolved oxygen tension was measured with an amperometric probe (model InPro 6830, Mettler Toledo). The experimental setup is illustrated schematically in Fig. 3.1.



**Fig. 3.1.** Experimental setup: (1) gas mass flow controllers (model GFC, Aalborg); (2) carbon dioxide (non-dispersive infrared absorption, model S710, Sick/Maihak) and oxygen (amperometric probe, model InPro 6830, Mettler Toledo) analyzers; (3) analog-to-digital converter; (4) temperature, pressure, dissolved oxygen tension, and pH sensors; (5) peristaltic pump for pH control (model C/L, Masterflex); (6) gas valve actuator (model VY1100, SMC).

### 3.2.3 Experimental procedure for the cultivations

Three induced cultivations were carried out in the STB, one at each temperature (27, 32, and 37 °C). In addition, two non-induced cultivations were performed in the STB, at 27 and 37 °C. Both non-induced cultures ended when the glycerol was totally consumed, which was detected from the on-line data as a sharp decline in the carbon dioxide evolution rate. All five STB experiments were carried out at atmospheric pressure. A validation experiment was also performed in the pressurized ALB (up to 0.4 MPa), with a temperature shift from 37 °C (growth phase) to 32 °C (induction phase). During the bioreactor cultivations, the pH was maintained (on/off control) at 6.3 and 6.7 during the growth and induction phases, respectively, by automatic addition of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (15%  $\text{w}\cdot\text{w}^{-1}$ ) solution. The induction phase was initiated with a pulse of 1 mM of IPTG and lasted up to 7 h. The

temperature was controlled by adjusting the temperature of the water recirculating in the bioreactor jacket. The dissolved oxygen tension (*DOT*) was kept at 30% of saturation (at the cultivation temperature, and relative to saturation in the calibration procedure performed at 0.1 MPa) by adjusting the stirrer speed and the air and oxygen flow rates (for the STB), as well as the pressure (only for the ALB) (CAMPANI et al., 2016; HORTA et al., 2014). Inocula were prepared as described by Campani et al. (2016).

### 3.2.4 Analytical methods

The cell concentration ( $C_x$ ) was determined by the dry cell weight method, which was correlated with optical density ( $\lambda = 600$  nm) measurements.

The concentrations of byproducts (acetate, lactate, and formate) and the carbon source (glycerol) were determined by HPLC, using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) and 5 mM sulfuric acid solution as the mobile phase (at a flow rate of  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). The column temperature was  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . The carbon source was measured with a refractive index detector (model 410, Waters), and the organic acids were detected at 210 nm (model 486 UV detector, Waters).

Soluble pneumococcal surface protein A (PspA) was obtained by cell disruption via sonication and its concentration was assessed by 12% SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), where the gels were stained with Coomassie brilliant blue R and analyzed by densitometry, as described by Campani et al. (2016).

### 3.2.5 Determination of the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ )

In a typical batch culture, the exponential growth phase can be described by Eq. 3.1, where  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the maximum specific growth rate and  $C_x$  ( $\text{g}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) is the cell concentration (SHULER; KARGI, 2002). In the absence of product inhibition or substrate and oxygen limitation, the cellular metabolic networks operate at the maximum fluxes. Therefore, Eq. 3.1 can be solved for constant  $\mu_{\max}$ , which gives the profile of  $C_x$  according to time (Eq. 3.2), where  $C_{x0}$  ( $\text{g}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) is the cell concentration at the start of the exponential phase. Considering the linear form of Eq. 3.2,  $\mu_{\max}$  can be estimated by linear least squares minimization (HIMMELBLAU, 1970).

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{\max} \cdot C_x \quad (3.1)$$

$$\ln(C_x) = \mu_{\max} \cdot t + \ln(C_{x0}) \quad (3.2)$$

The values of  $\mu_{\max}$  obtained were linearly regressed to find the function  $\mu_{\max}(T)$  (Eq. 3.3) for the strain under investigation. The approximated linear dependence of  $\mu_{\max}$  on temperature has already been reported elsewhere (SAGMEISTER et al., 2013) and is suitable for the narrow range of temperatures employed in the present study, as will be discussed in Section 3.3.4.

$$\mu_{\max} = a_{\mu} \cdot T + b_{\mu} \quad (3.3)$$

Where  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is the temperature, and  $a_{\mu}$  ( $^{\circ}\text{C}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) and  $b_{\mu}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) are constants estimated by linear least squares regression (HIMMELBLAU, 1970).

### 3.2.6 Determination of the specific production rate of PspA ( $\mu_p$ )

The specific production rate of PspA by the cells can be characterized by  $q_p$  (Eq. 3.4), which is valid for batch cultures. The data for the PspA concentration ( $C_p$ ) were interpolated using polynomials in order to calculate the time derivative of  $C_p(t)$ .

$$q_p(t) = \frac{1}{C_x} \frac{dC_p}{dt} \quad (3.4)$$

### 3.2.7 Determination of the oxygen uptake rate ( $OUR$ )

The assessment of  $OUR$  ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) was performed by the gas balancing method (GARCIA-OCHOA et al., 2010), which uses a gas analyzer to measure the mole fractions of oxygen ( $y_{O_2}$ ) and carbon dioxide ( $y_{CO_2}$ ) in the gas stream leaving the bioreactor. The composition of the gas stream entering the bioreactor is known beforehand, since it is composed of a certain mixture of air ( $y_{O_2} = 0.21$  and  $y_{CO_2} \approx 0$ ) and pure oxygen ( $y_{O_2} \approx 1$ ). Thus, assuming constant DO (controlled at 30% of saturation),  $OUR$  can be determined from the oxygen mass balance using Eq. 3.5. The total molar flow rate of the exhaust gas ( $\dot{n}_{out}$ ) was calculated using Eq. 3.6, based on the molar balance of the nitrogen (inert gas).

$$OUR = (\dot{n}_{in} \cdot y_{O2in} - \dot{n}_{out} \cdot y_{O2out}) \cdot \frac{M_{O2}}{V} \quad (3.5)$$

$$\dot{n}_{out} = \dot{n}_{in} \cdot \left( \frac{1 - y_{O2in}}{1 - y_{O2out} - y_{CO2out}} \right) \quad (3.6)$$

where  $y_{O2out}$  and  $y_{CO2out}$  are the mole fractions of oxygen and carbon dioxide, respectively, in the outlet gas stream;  $y_{O2in}$  is the oxygen mole fraction in the inlet gas stream;  $M_{O2}$  ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) is the molar mass of molecular oxygen;  $V$  is the working volume of the bioreactor (L); and  $\dot{n}_{in}$  is the total molar flow rate of the inlet gas stream, which is the sum of the pure oxygen and air volumetric flow rates, given by the mass flow controllers, converted into molar flow rates using the ideal gas law (CAMPANI et al., 2016).

The ratio  $OUR \cdot C_x^{-1}$ , which is the specific oxygen uptake rate,  $q_{O2}$  ( $\text{g}_{O2} \cdot \text{g}_{DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), was correlated with the specific growth rate ( $\mu$ ) ( $\text{h}^{-1}$ ) according to the empirical Eq. 3.7, based on the literature (GARCIA-OCHOA et al., 2010). The biomass yield according to oxygen consumption ( $Y_{x/O2}$ ) ( $\text{g}_{DCW} \cdot \text{g}_{O2}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) and the dissolved oxygen consumption coefficient for maintenance ( $m_{O2}$ ) ( $\text{g}_{O2} \cdot \text{g}_{DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) were estimated using weighted (by error variance) linear least squares regression (HIMMELBLAU, 1970). Calculation of  $\mu$  was carried out using Eq. 3.8 with polynomial interpolated data of  $\ln(C_x)$ .

$$q_{O2} \equiv \frac{OUR}{C_x} = \frac{\mu}{Y_{x/O2}} + \overbrace{\left( a_q \cdot T^3 + b_q \right)}^{m_{O2}(T)} \quad (3.7)$$

$$\mu(t) = \left. \frac{d}{dt} [\ln(C_x)] \right|_t \quad (3.8)$$

where  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is the temperature;  $m_{O2}$  ( $\text{g}_{O2} \cdot \text{g}_{DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) is the oxygen consumption coefficient for maintenance; and  $a_q$  ( $\text{g}_{O2} \cdot \text{g}_{DCW}^{-1} \cdot ^{\circ}\text{C}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ) and  $b_q$  ( $\text{g}_{O2} \cdot \text{g}_{DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) are constant parameters estimated by weighted linear least squares regression (HIMMELBLAU, 1970).

### 3.2.8 Determination of the overall gas hold-up ( $\varepsilon$ ), volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ), and oxygen transfer rate ( $OTR$ )

The  $\varepsilon$  values were determined by the volume expansion method (CHISTI, 1989), based on the height of the non-aerated ( $h_L$ ) and aerated ( $h_D$ ) liquid within the ALB, using Eq. 3.9.

$$\varepsilon = \frac{h_D - h_L}{h_D} \quad (3.9)$$

The parameter  $k_La$  was estimated using the dynamic pressure-step technique (CAMPANI et al., 2015; LINEK; BENES; VACEK, 1989), where the system pressure is increased by 15% and the transient signal provided by the oxygen probe is used to fit Eq. 3.10, according to Cerri et al. (2016). Based on Eq. 3.10,  $k_La$  was determined from the slope of a plot of  $-\ln(100-DOT)$  against time by linear least squares minimization (HIMMELBLAU, 1970). In addition, the sensitivity of the electrode ( $k_e$ ) was calculated using Eq. 3.11 (CERRI et al., 2016), based on the determined  $k_La$  value. It should be noted that these estimates are only valid when  $k_e > k_La$ , which is usually true for any practical measurement, and assuming a first order response of the oxygen probe (CAMPANI et al., 2015; CERRI et al., 2016).

$$-\frac{d}{dt}[\ln(100-DOT)] = k_La \quad (3.10)$$

$$k_e = \frac{k_La}{\left[1 - \left(\frac{100-DOT_0}{100-DOT}\right)e^{-k_La t}\right]} \quad (3.11)$$

where  $DOT$  (% of saturation) is the dissolved oxygen tension measured by the electrode, and  $DOT_0$  (% of saturation) is the dissolved oxygen tension measured by the electrode at  $t = 0$  s (the time at which Eqs. 3.10 and 3.11 are valid).

The  $k_La$  ( $h^{-1}$ ) values were correlated with the specific gas flow rate ( $\phi$ ) ( $min^{-1}$ ) and temperature ( $T$ ) ( $^{\circ}C$ ), according to the empirical Eq. 3.12, based on data-based modifications

of correlations proposed in the literature (CAMPANI et al., 2015; DANIIL; GULLIVER, 1988; LEUNG et al., 2006).

$$k_L a = \frac{a_k}{1 + e^{-b_k(\phi - c_k)}} \cdot \theta^{(T-27)} \quad (3.12)$$

where  $a_k$  ( $\text{h}^{-1}$ ),  $b_k$  (min),  $c_k$  ( $\text{min}^{-1}$ ), and  $\theta$  are constants estimated by nonlinear least squares regression (trust region algorithm) implemented in Matlab<sup>TM</sup> (BRANCH; COLEMAN; LI, 1999). The exponent  $(T-27)$  is dimensionless.

The influence of the operating conditions on  $OTR$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) for the ALB was evaluated based on the two-film model (Eq. 3.13), assuming Henry's law for the gas-liquid equilibrium of the solute  $\text{O}_2$  (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). This model is valid up to 1 bar of oxygen partial pressure (POLING et al., 2007) or a total pressure of 4.8 bar (assuming that the gas phase is air, so  $y_{\text{O}_2} = 0.21$ ). The value of  $k_L a$  was obtained using Eq. 3.12 with the identified parameters. In addition, the dependence of the oxygen solubility on temperature and the composition of the medium was estimated by a combination of the empirical correlation fitted by Hitchman (1978) for water (Eq. 3.14) and the salting-out model proposed by Quicker et al. (1981) (Eq. 3.15). The latter model (Eq. 3.15) is analogous to the well-known Sechenov equation, which assumes log-additivity behavior for mixed solutions of electrolytes (ions) and organic compounds (such as glycerol). To this end, knowledge of the culture medium composition (Section 3.2.1) was used in addition to the solubility parameters ( $H$  and  $K$ ) of the individual substances presented by Schumpe, Chumpe, and Deckwer (1982). Furthermore, the presence of micronutrients and  $\text{H}^+$  and  $\text{OH}^-$  ions was neglected due to their very low combined concentration (0.16% of the total molarity of the electrolytes and non-electrolytes), compared to the macronutrients (glycerol,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , citric acid, and  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

$$OTR = k_L a \cdot (C^* - C) \quad (3.13)$$

$$C_0^* = 14.69 - 4.002 \times 10^{-1} \cdot T + 8.272 \times 10^{-3} \cdot T^2 - 9.699 \times 10^{-5} \cdot T^3 + 4.839 \times 10^{-7} \cdot T^4 \quad (3.14)$$



$$\log_{10}\left(\frac{C_0^*}{C^*}\right) = \sum_i H_i I_i + \sum_j K_j c_j \quad (3.15)$$

where  $C$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) is the dissolved oxygen concentration in the bulk liquid;  $C_0^*$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $C^*$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) are the solubilities of oxygen in water and in the culture medium, respectively, with air ( $y_{O_2} = 0.21$ ) at 0.1 MPa;  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is the temperature;  $H_i$  ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) is the salting-out parameter of ion  $i$ ;  $K_j$  ( $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ ) is the solubility parameter for non-electrolyte (organic compound)  $j$ ;  $I_i$  ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) is the ionic strength of ion  $i$ ; and  $c_j$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) is the concentration of non-electrolyte  $j$ .

### 3.2.9 Model predictions for maximum biomass concentration and productivity

The mathematical models for  $q_{O_2}$  (Eq. 3.19) and  $OTR$  (Eq. 3.13) were used to predict the maximum cell concentration ( $C_{x\max}$ ) supported by the oxygen transfer system in the ALB at variable temperature and pressure (Eq. 3.16). In turn, the biomass productivity ( $P_x$ ) was estimated according to Eq. 3.18, which is based on Eq. 3.16 and Eq. 3.2, assuming an initial cell concentration ( $C_{x0}$ ) of  $0.1 \text{ g}_{\text{DCW}}\cdot\text{L}^{-1}$ . The following assumptions were made:  $\phi = 4 \text{ min}^{-1}$ ; dissolved oxygen concentration ( $C$ ) of 30% of saturation (at the cultivation temperature, relative to saturation in the calibration procedure with air at 0.1 MPa);  $k_L a$  given by Eq. 3.20; and Henry's law ( $C^* \propto p_{O_2}$ ) (Eq. 3.17).

$$C_{x\max}(p, T) = \frac{OTR(p, T)}{q_{O_2}(T)} = \frac{k_L a (C^* - C)}{Y_{x/O_2}} + m_{O_2} \quad (3.16)$$

$$C^*(p) = \frac{p}{0.1} C^*(p = 0.1 \text{ MPa}) \quad (3.17)$$

$$P_x(p, T) = \frac{(C_{x\max}(p, T) - C_{x0})}{\Delta t(p, T)} = \frac{\mu(C_{x\max} - C_{x0})}{\ln\left(\frac{C_{x\max}}{C_{x0}}\right)} \quad (3.18)$$

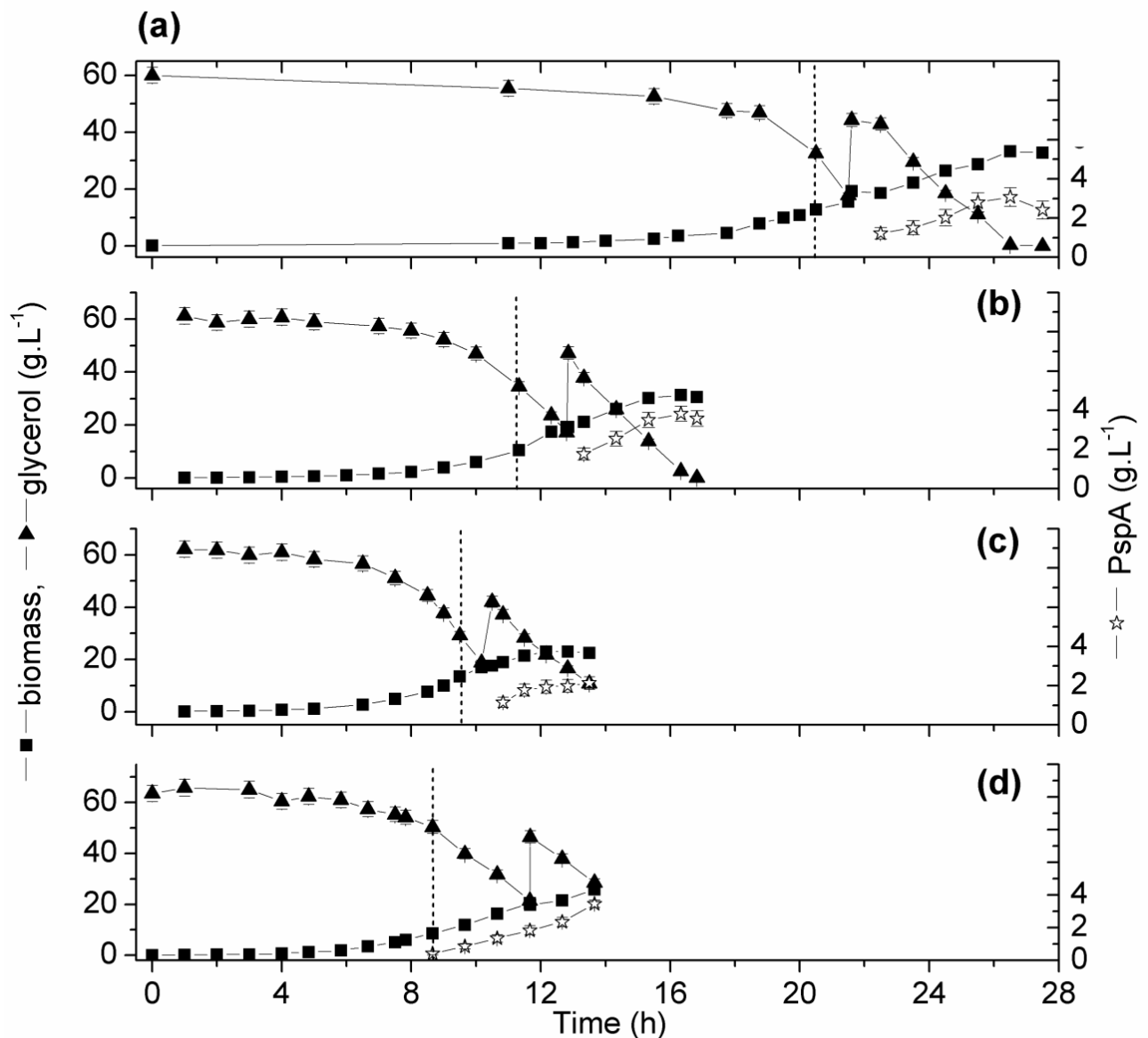
where  $C^*$  ( $p = 0.1$  MPa) and  $C^*(p)$  are the oxygen solubilities in the culture medium with air at 0.1 MPa and at a system pressure  $p$  (MPa), respectively, and  $\Delta t$  (h) is the time of cultivation.

### 3.3 Results and discussion

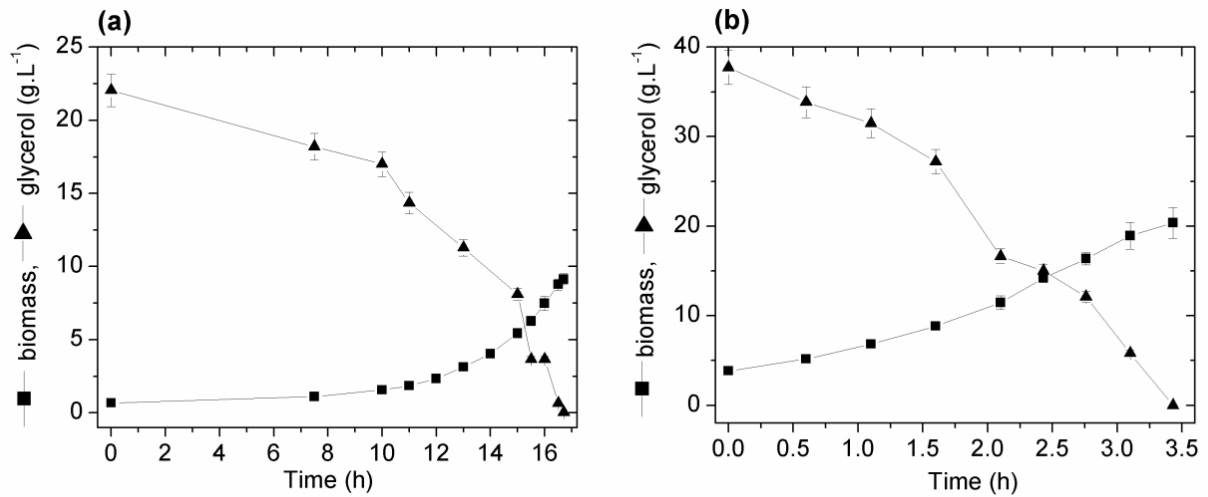
#### 3.3.1 *Escherichia coli* cultivation and protein expression

In order to assess the effect of temperature on biomass and recombinant protein (PspA) production, three *Escherichia coli* cultivations were carried out in the STB at 27, 32, and 37 °C, under non-pressurized conditions, and one validation experiment was performed in the pressurized ALB at variable temperature (37 °C during the growth phase and 32 °C during the induction phase). Two additional cultures were performed in the STB, at 27 °C and 37 °C, but without induction. These two non-induced experiments were carried out using reduced initial glycerol concentrations in order to evaluate  $q_{O_2}$  during the growth phase under substrate limitation, which led to lower biomass production. Cultivations were performed in the STB in order to increase the precision of the  $q_{O_2}$  measurement, since the operating gas flow rate was much higher in the ALB than in the STB, which reduced the signal-to-noise ratio and hindered the gas analysis in the ALB cultivations.

It is expected that under similar environmental conditions (in terms of DO, pH, and  $T$ ) and with moderate shear stress, the growth kinetics of suspended cells should be independent of the type of bioreactor used (STB or ALB). Under standard operating conditions, the average shear stress is similar for the two types of bioreactor used in the present work, with values up to 12 Pa (ALB) (CERRI et al., 2008) and up to 10 Pa (STB) (BUSTAMANTE; CERRI; BADINO, 2013), which are much lower than the damage threshold for *E. coli* (450 Pa) (LANGE; TAILLANDIER; RIBA, 2001). The other operating conditions (such as pH and DO) employed during the cultivations have already been described in Section 3.2.3. The results obtained for each experiment are shown in Figs. 3.2 and 3.3 for induced and non-induced cultures, respectively.



**Fig. 3.2.** Cellular growth, substrate consumption, and recombinant protein (PspA) formation during cultivation of *E. coli* in the 5-L STB at (a) 27 °C, (b) 32 °C, and (c) 37 °C, and (d) in the ALB pressurized at up to 0.4 MPa with variable temperature (37 °C during the growth phase and 32 °C during the induction phase). Glycerol pulses were added when the residual concentration of glycerol was close to 20 g·L<sup>-1</sup>. The induction phase started after addition of 1 mM of IPTG, as indicated by the dashed lines. The error bars are standard deviations from triplicates.



**Fig. 3.3.** Cellular growth and substrate consumption formation during non-induced cultivation of *E. coli* in the 5-L STB at (a) 27 °C and (b) 37 °C in the STB. The error bars are standard deviations from triplicates.

Recombinant protein formation was highest at 32 °C. Use of the lower temperature (27 °C) slowed the metabolism and hence decreased the production of PspA, while at the higher temperature (37 °C), a significant metabolic load was imposed on the cells (as already mentioned), which limited PspA synthesis. Therefore, the temperature of 32 °C provided a good trade-off between the production rate of PspA and the associated metabolic load, resulting in maximum formation of the recombinant protein of  $3.8 \pm 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $0.23 \pm 0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), which is similar to the value of  $4.1 \pm 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $0.20 \pm 0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) reported in the literature using complex medium (CAMPANI et al., 2016). It is important to point out that low levels of protein production were also detected in the non-induced cultures, corresponding to concentrations of  $0.05$  and  $0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of PspA at the end of the experiments carried out at 27 and 37 °C, respectively. Basal expression of the target protein is expected in cultures carried out with glycerol as sole carbon source, since this substrate does not act as a repressor of the *lac* operon, unlike glucose (STUDIER, 2005).

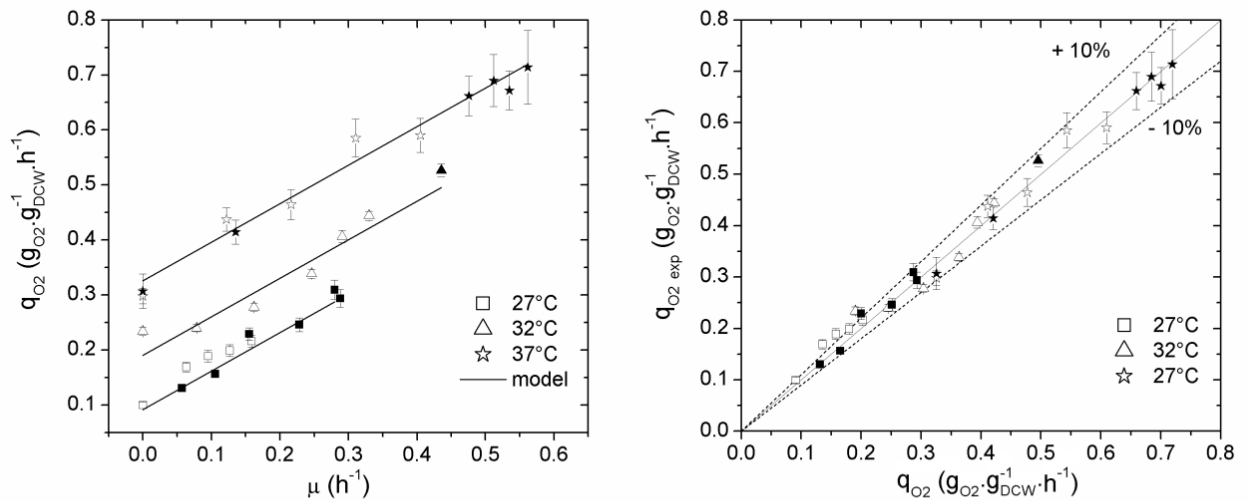
### 3.3.2 $q_{O_2}$ modeling

$OUR$  was measured during cultivations carried out at different temperatures (27, 32, and 37 °C), with and without induction of recombinant protein synthesis, as described in Section 3.2.7. The corresponding model was then satisfactorily fitted to the experimental data of  $OUR\cdot C_x^{-1}$  ( $q_{O_2}$ ) and  $\mu$  (Eq. 3.19). This can be seen from the good agreement between the

model output and the experimental data (Fig. 3.4), and was confirmed by the high coefficient of determination ( $R^2 = 0.98$ ). The measured values of  $q_{O_2}$  (up to  $0.71 \pm 0.07 \text{ g}_{O_2} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) were consistent with the respiration rate of  $0.68 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$  reported in the literature for *E. coli* grown under similar conditions ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , with minimal salt medium and glycerol as carbon source) (MEYENBURG; ANDERSEN, 1980). Furthermore, the estimated  $Y_{x/O_2}$  of  $1.43 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{g}_{O_2}^{-1}$  was consistent with the value of  $1.3 \pm 0.2 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{g}_{O_2}^{-1}$  reported previously (MEYENBURG; ANDERSEN, 1980).

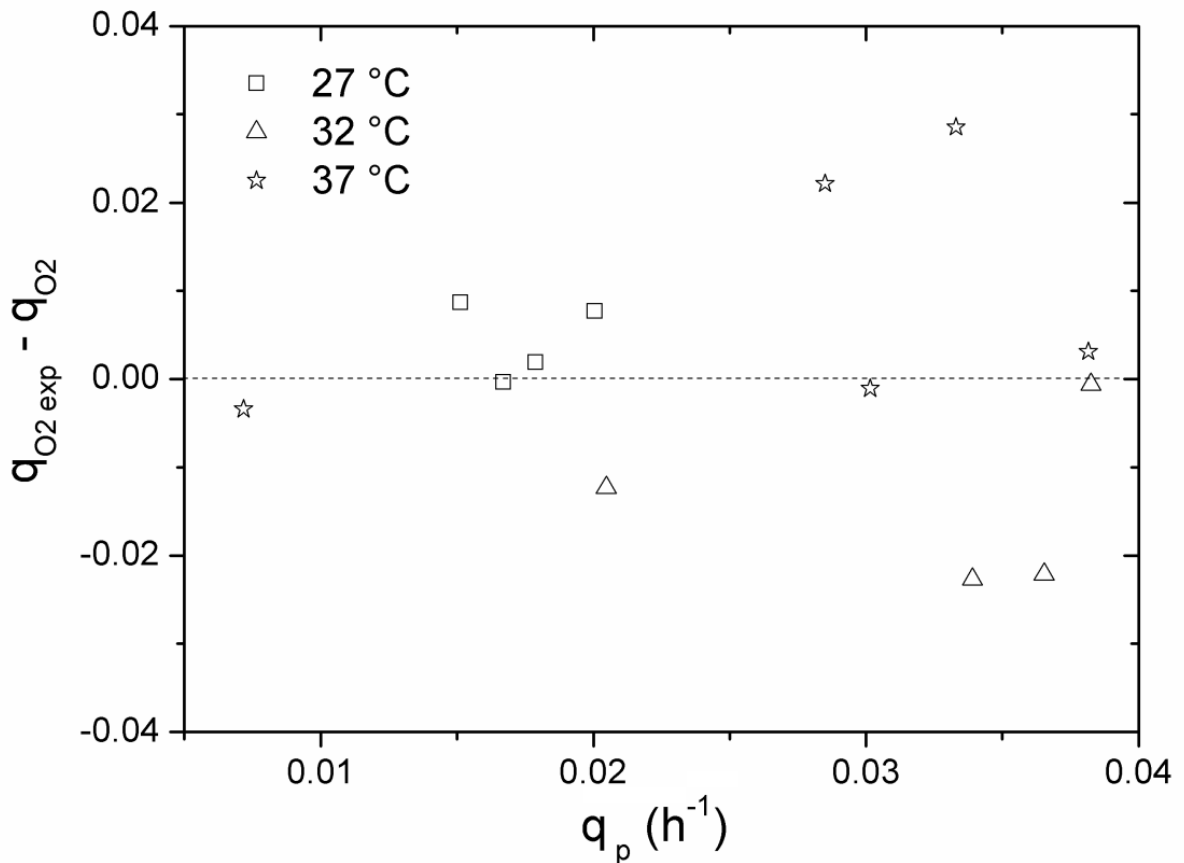
$$\frac{OUR}{C_x} = q_{O_2} = \frac{\mu}{(1.43 \pm 0.03)} + \overbrace{\left[ (7.6 \pm 0.9) \times 10^{-6} T^3 - (0.06 \pm 0.03) \right]}^{m_{O_2}(T)} \quad (R^2 = 0.98) \quad (3.19)$$

The effect of recombinant protein biosynthesis on  $q_{O_2}$  for *E. coli* has been a controversial subject. Neubauer, Lin, and Mathiszik (2003) found that the expression of recombinant protein decreased  $q_{O_2}$  as a result of the metabolic burden imposed on *E. coli*. In contrast, Bhattacharya and Dubey (1997) reported an increase of  $q_{O_2}$  during the induction phase of *E. coli* cultivations, which would be required in order to meet the oxygen demand during expression of the foreign protein in large quantities. In the present study, however,  $q_{O_2}$  was demonstrated to be exclusively dependent only on  $\mu$  and temperature (Eq. 3.19), regardless of the level of recombinant protein synthesis. Although  $\mu$  was affected by both substrate concentration and PspA synthesis, the observed changes in  $q_{O_2}$  could be modeled considering only the influence of the specific growth rate. The results shown in Fig. 3.5 confirmed that the deviation of the model from the experimental data ( $q_{O_2exp} - q_{O_2}$ ) did not depend on the specific production rate of PspA ( $q_p$ ). Therefore, a single expression could be used to represent the function  $q_{O_2}(\mu, T)$  during the growth and production phases, providing an application-friendly formula with only three parameters to be identified.



**Fig. 3.4.** (a) Fitted  $q_{O_2}$  model and (b) its agreement with the experimental data ( $q_{O_2 exp}$ ) during five cultivations of *E. coli* in the 5-L STB at 27, 32, and 37 °C. Closed symbols correspond to the non-induced condition (growth phase). The error bars are standard deviations derived from triplicates of  $C_x$  and the root mean square of the *OUR* measurement noise. The solid line is the model prediction and the dotted lines indicate its deviation interval within -10% and 10%.

Finally, the impact of temperature on  $q_{O_2}$  was positive, due to the increase of both  $m_{O_2}$  and  $\mu$ . In general, cell metabolism is more intense at higher temperature, which increases  $\mu$  and the amount of oxygen required for biomass maintenance ( $m_{O_2}$ ).

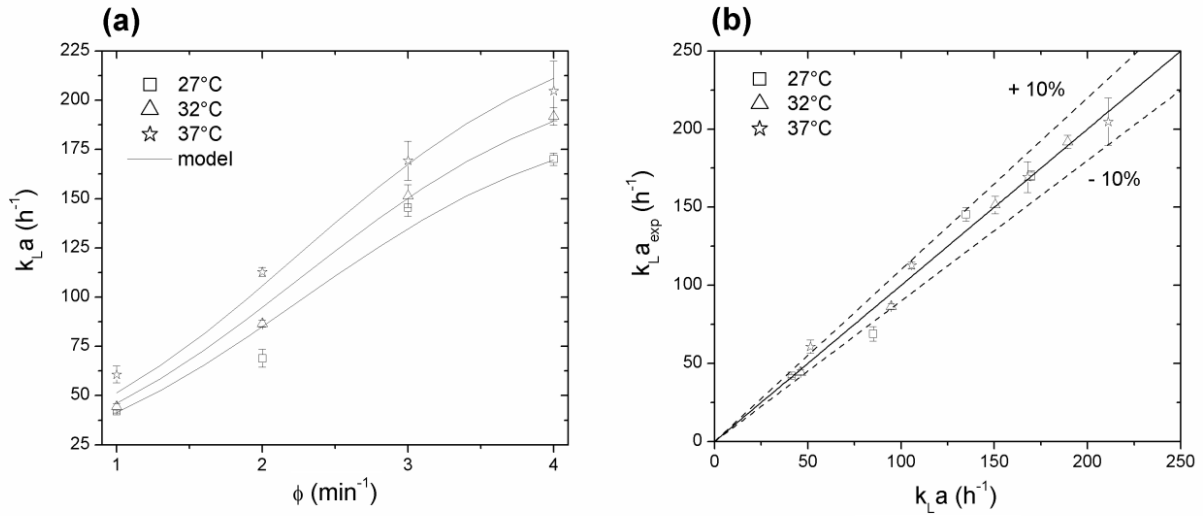


**Fig. 3.5.** Agreement between  $q_{O_2}$  (calculated using Eq. 3.19) and the experimental data, as a function of  $q_p$ , during the induction phase of *E. coli* cultivations in the 5-L STB at 27, 32, and 37 °C.

### 3.3.3 $k_L a$ modeling

Characterization of oxygen transfer in the 5-L ALB at different temperatures (27, 32, and 37 °C) and with specific air flow rates ( $\phi$ ) from 1 to 4  $\text{min}^{-1}$  was performed with culture medium as the liquid phase. The experimental  $k_L a$  data (varying from 42 to 200  $\text{h}^{-1}$ ) and the fitted  $k_L a$  model (Eq. 3.20) are shown in Fig. 3.6(a). The agreement of the model with the experimental values indicated that Eq. 3.20 provided a satisfactory description of  $k_L a$ , with differences mostly smaller than 10%, as shown in Fig. 3.6(b). Similarly, the estimated values of  $k_e$  varied in a wide range (from 244 to 1403  $\text{h}^{-1}$ ), depending on the operating conditions (on average, higher temperature and increased air flow rate resulted in a faster response of the oxygen sensor probe).

$$k_L a = \frac{(200 \pm 20)}{1 + e^{-(1.0 \pm 0.1)[\phi - (2.3 \pm 0.2)]}} \cdot (1.022 \pm 0.005)^{(T-27)} \quad (R^2 = 0.98) \quad (20)$$



**Fig. 3.6.** (a) Fitted  $k_L a$  model and (b) its agreement with the experimental data ( $k_L a_{\text{exp}}$ ) for the 5-L ALB operated at different temperatures (27, 32, and 37 °C) and specific air flow rates ( $\phi$ ) from 1 to 4  $\text{min}^{-1}$ . The error bars are standard errors from triplicates. The solid line is the model prediction and the dotted lines indicate its deviation interval within -10% and 10%.

According to Eq. 3.20,  $k_L a$  is positively affected by both  $\phi$  and temperature, as expected. The gas-liquid interfacial area per unit of liquid volume ( $a$ ) increases with  $\phi$  (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009), in agreement with the positive effect of the latter on the gas hold-up ( $\varepsilon$ ) (0.03-0.10 with  $\Phi$  ranging from 1 to 4  $\text{min}^{-1}$ ), according to Eq. 3.21 (CHISTI, 1989). The temperature does not affect  $\varepsilon$ , but increases the oxygen diffusivity ( $D$ ) in water, consequently increasing the mass transfer coefficient ( $k_L$ ), according to Higbie's penetration theory (Eq. 3.22), which is widely accepted for the description of gas-liquid transfer (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

$$a = \frac{6 \cdot \varepsilon}{d_b (1 - \varepsilon)} \quad (3.21)$$

$$k_L = 2 \sqrt{\frac{D}{\pi \cdot t_e}} \quad (3.22)$$



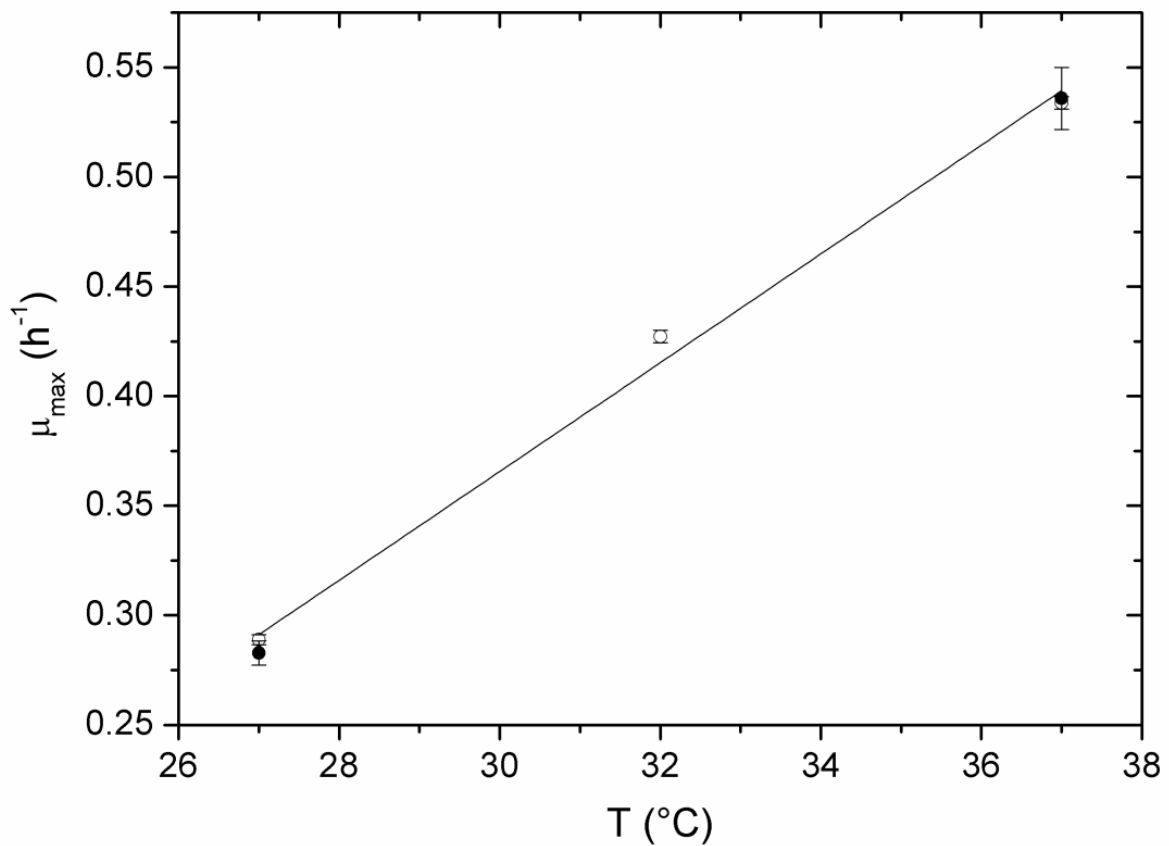
where  $d_b$  is the bubble diameter, and  $t_e$  is the exposure time of micro-eddies at the gas-liquid interface.

### 3.3.4 Joint analysis of $q_{O_2}$ and $OTR$ simulations

The overall influence of temperature on  $OTR$  was calculated from Eq. 3.13, assuming  $k_{LA}$  given by Eq 3.20 and  $\phi$  of  $4 \text{ min}^{-1}$  (maximum value). The dissolved oxygen concentration in the liquid phase ( $C$ ) during the cultivations was considered as 30% of saturation (at the cultivation temperature and relative to saturation in the calibration procedure with air at 0.1 MPa). The effect of temperature on oxygen solubility ( $C^*$ ) was predicted using Eq. 3.14. In addition, the salting-out effect was estimated from Eq. 3.15, where the ionic strength and mass concentration of the main culture medium components (glycerol, citric acid,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Section 3.2.1) were multiplied by their respective solubility parameters ( $H$  and  $K$ ) (SCHUMPE; QUICKER; DECKWER, 1982). The estimated values of  $C^*$  ranged from  $7.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (at  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ) to  $6.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

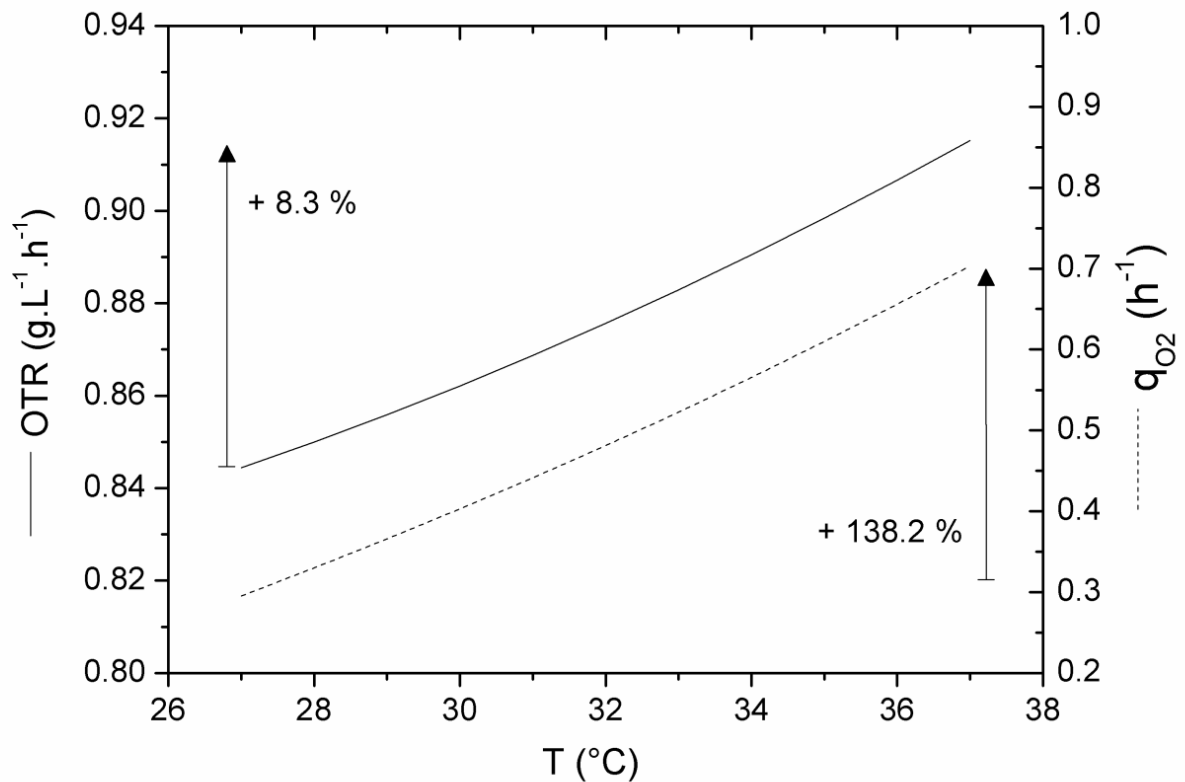
The effect of temperature on  $q_{O_2}$  can be described by Eq. 3.19, assuming the maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) and hence the highest  $q_{O_2}$  achieved at each cultivation temperature. Cell growth, which showed an almost linear relation with temperature (between  $27$  and  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), could be described by Eq. 3.23. The linear relation between  $\mu_{max}$  and temperature proved satisfactory ( $R^2 = 0.99$ ), as shown in Fig. 3.7.

$$\mu_{\max} = (0.0248 \pm 0.0003) \cdot T - (0.38 \pm 0.01) \quad (R^2 = 0.99) \quad (3.23)$$



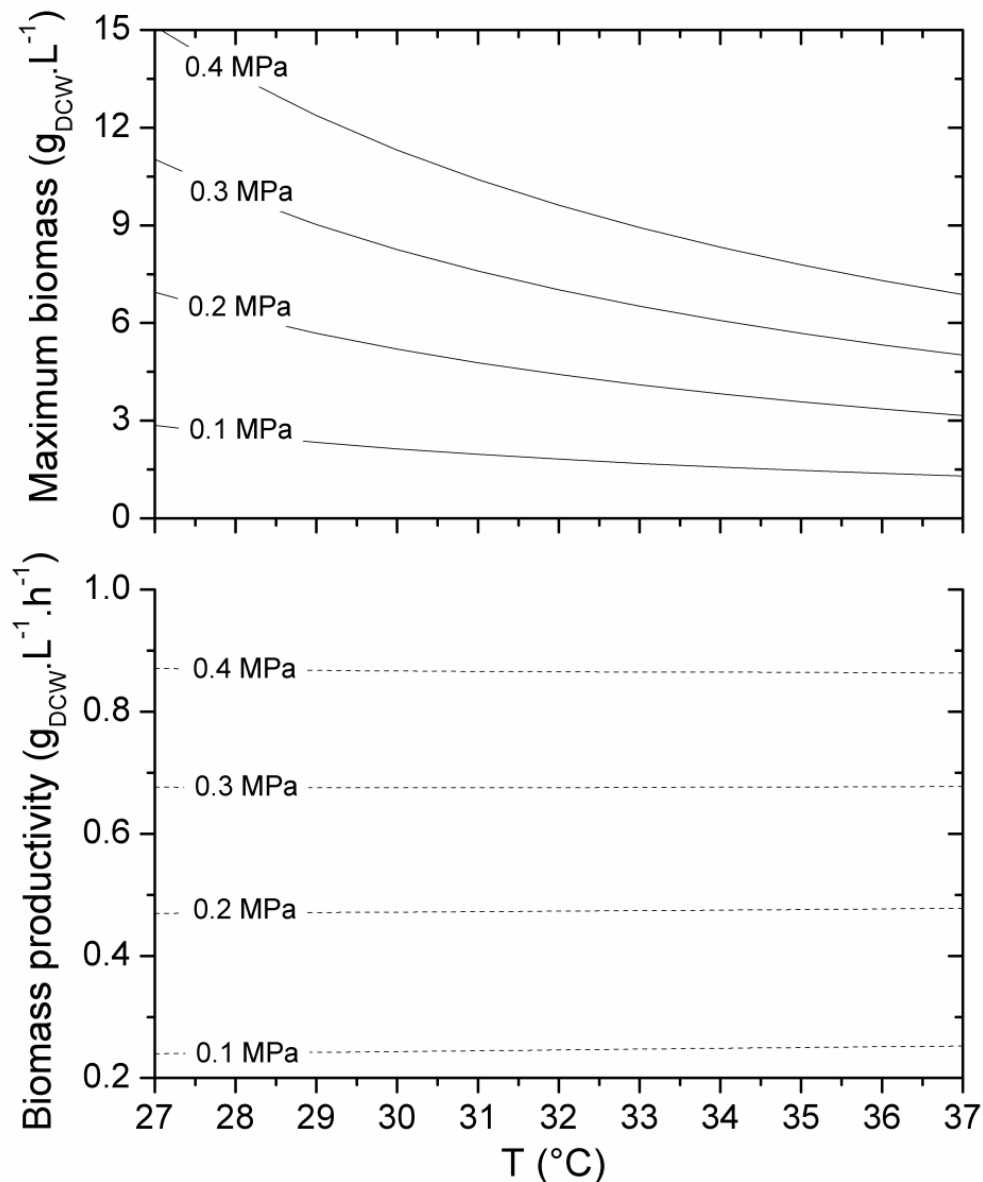
**Fig. 3.7.** Experimental  $\mu_{max}$  data and fitted model for five cultivations of *E. coli* in the 5-L STB at 27, 32, and 37 °C. The error bars are standard errors estimated from the linear regression of Eq. 3.2. Closed symbols refer to the cultivations without an induction phase.

The simulated  $OTR$  and  $q_{O_2}$  data for the ALB, as a function of temperature, are shown in Fig. 3.8. An increase in temperature from 27 to 37 °C resulted in a 138.2% increase in  $q_{O_2}$ . However, the increase in  $OTR$  was more moderate (8.3%), showing that the positive influence of the temperature increase (from 27 to 37 °C) on  $k_{La}$  was only slightly higher than its negative effect on oxygen solubility in the ALB.



**Fig. 3.8.** Prediction of  $q_{O_2}$  and  $OTR$  for the ALB at variable temperature (27-37 °C), using Eqs. 3.13-3.15, 3.19, and 3.20. The following assumptions were made:  $\mu = \mu_{max}(T)$  (Eq. 3.23),  $\phi = 4 \text{ min}^{-1}$ , and dissolved oxygen concentration of 30% of saturation (at the cultivation temperature and relative to saturation in the calibration procedure with air at 0.1 MPa).

Therefore, at higher temperatures,  $OTR$  has to be increased further by the manipulation of other variables, such as pressure and the enrichment of air with oxygen, in order to transfer the greater amount of oxygen required by the cells. Pressurization of the system is a promising approach, since it can improve the energy and cost efficiencies of dissolved oxygen control (CAMPANI et al., 2016; KNOLL et al., 2005). In view of this, simulations were performed of the maximum sustained cell concentration ( $C_{xmax}$ ) and biomass productivity ( $P_x$ ), as a function of temperature and pressure (Eqs. 3.16 and 3.18). The results are presented in Fig. 3.9. In this simulation,  $\mu$  was set to  $\mu_{max}(T)$  (Eq. 3.23), reflecting the upper limit of the oxygen demand. It should be noted that in a real situation, the oxygen demand would be likely to be lower than this, since  $\mu \leq \mu_{max}(T)$  for the entire cultivation, especially during the induction phase (Fig. 3.4).



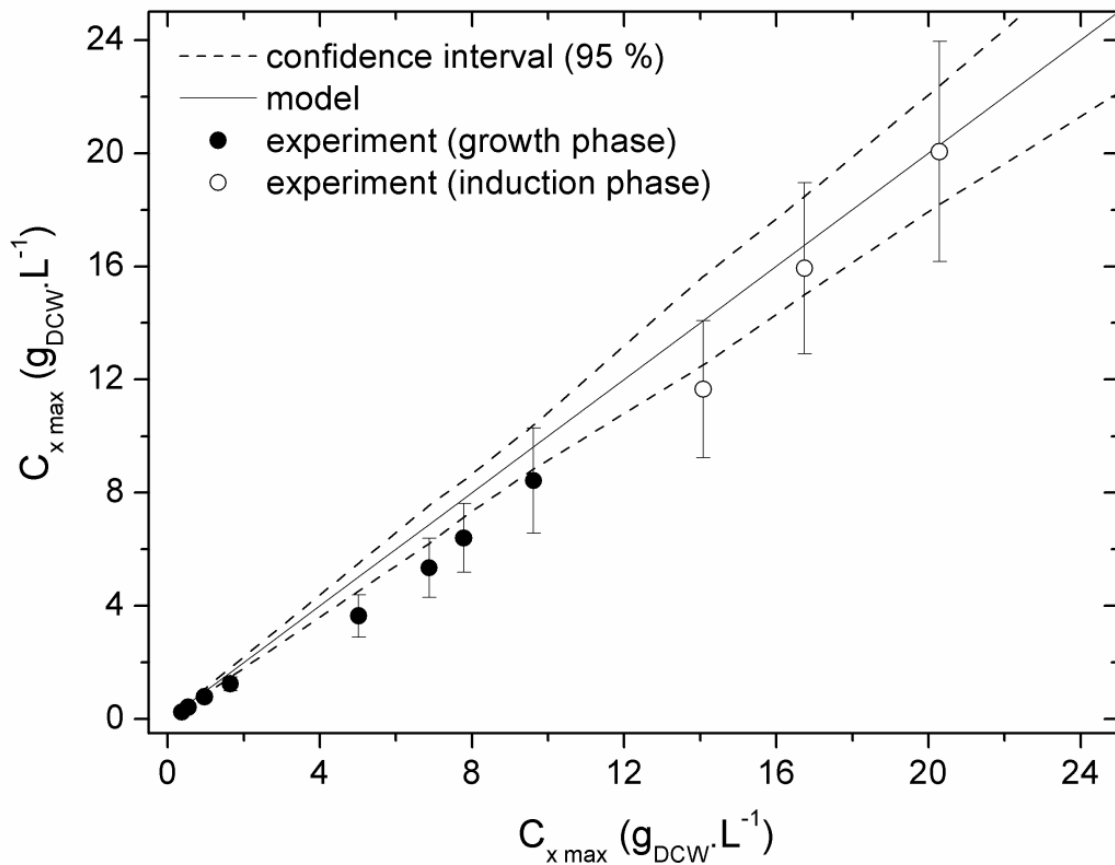
**Fig. 3.9.** Prediction of the maximum cell concentration ( $C_{xmax}$ ) supported by the oxygen transfer system in the ALB, and the biomass productivity at variable temperature (27-37 °C) and pressure (0.1-0.4 MPa) (Eqs. 3.16 and 3.18). The following assumptions were made:  $\mu = \mu_{max}(T)$  (Eq. 3.23),  $C_{x0} = 0.1 \text{ g}_{DCW} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\phi = 4 \text{ min}^{-1}$ , and dissolved oxygen concentration of 30% of saturation (at the cultivation temperature and relative to saturation in the calibration procedure with air at 0.1 MPa).

The mathematical modeling of  $C_{xmax}$  (Eq. 3.16) was validated using the experimental values obtained during *E. coli* cultivation in the ALB pressurized at up to 0.4 MPa with different specific gas flow rates (1.2-4 min<sup>-1</sup>) and temperatures (32-37 °C). As

shown in Fig. 3.10, the majority of the predicted and experimental values of  $C_{xmax}$  were not significantly different (at the 95% confidence level). Hence, these results validated the models developed for  $q_{O2}$  and  $k_{La}$  (Eqs. 3.19 and 3.20), since estimated  $C_{xmax}$  was obtained as the ratio between oxygen transfer and demand ( $OTR/q_{O2}$ ), giving  $C_{xmax} = k_{La}(C^* - C)/(q_{O2})$ . In fact, the  $C_{xmax}$  values were slightly overestimated by the model. This could have been due to the models proposed by Hitchman (1978) (Eq. 3.14) and Quicker et al. (1981) (Eq. 3.15), which were adapted to describe the culture medium used in the experiments and could have overestimated the oxygen solubility in the liquid phase.

Information concerning two important bioprocess goals, namely intensification and productivity, can be obtained from Fig. 3.9. On one hand, system pressurization had a substantial positive impact on  $C_{xmax}$ , resulting in improvement of  $P_x$  and intensification of the process. On the other hand, a lower temperature led to an increase of  $C_{xmax}$ , but with a negligible effect on  $P_x$ , since the cultivation time increased proportionally. Therefore, based on the graph shown in Fig. 3.9, a strategy could be proposed to improve *E. coli* cultivation in the ALB. In this strategy, the bioreactor should firstly be operated at 37 °C and with overpressure, in order to produce cells at the highest productivity. Once the oxygen transfer capability has been achieved, the temperature should be gradually decreased to 32 °C, which is the best condition for recombinant protein synthesis (as discussed in Section 3.3.1). In doing so, a promising trade-off between productivity and intensification is obtained, resulting in an estimated  $P_x$  increase of 29% (to 1.11 g<sub>DCW</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>), compared to the maximum simulated value (0.86 g<sub>DCW</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>), keeping the temperature constant at 37 °C.

The predicted  $P_x$  value was validated experimentally, with a value of  $1.05 \pm 0.05$  g<sub>DCW</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> obtained in the *E. coli* cultivation in the pressurized ALB, employing the strategy described above. Other strategies could also be proposed, depending on the specific purpose. It should be noted that the graph shown in Fig. 3.9 is simple and was developed for *E. coli* cultivation in the bench-scale ALB. Nonetheless, this graph provides insights into bioprocess optimization for other aerobic cultivations in pneumatic bioreactors, especially concerning the multivariate control of dissolved oxygen (using adjustment of pressure, temperature, and gas flow rates).



**Fig. 3.10.** Agreement of the  $C_{x\max}$  model (Eq. 3.16) with the experimental data for the *E. coli* cultivation in the ALB pressurized at 0.4 MPa, using different specific gas flow rates (1.2-4  $\text{min}^{-1}$ ) and temperatures (32-37 °C). The error bars correspond to the 95% confidence interval based on standard errors from triplicates. The solid line is the model prediction of  $C_{x\max}$  (Eq. 3.16) and the dotted lines indicate its confidence interval (95% level) based on the standard error of the model output. The closed symbols correspond to the non-induced condition (growth phase).

### 3.4 Conclusions

In this investigation, the influence of temperature (27-37 °C) on oxygen uptake and transfer rates was modeled and evaluated for the culture of recombinant *Escherichia coli* producing the heterologous protein PspA in a 5-L airlift bioreactor (ALB).

In contrast to previously published studies, the oxygen uptake rate ( $q_{O_2}$ ) was shown to be affected only by temperature and  $\mu$ , irrespective of the cultivation phase

(exponential growth or induction), resulting in an application-friendly mathematical model. The model was validated and could be used in further simulations of the operation of a pressurized ALB. An innovative cultivation strategy was identified, simulated, and validated, leading to an estimated  $P_x$  increase of 29% (from 0.86 to 1.11  $\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) just by manipulating the temperature and increasing the pressure to 0.4 MPa, without any enrichment with pure oxygen.

Therefore, bioreactor pressurization and temperature decrease are promising approaches that can lead to improved process performance. The model developed here could be employed in the development of optimized procedures based on the multivariate control of dissolved oxygen (using adjustment of pressure, temperature, and gas flow rates) in pneumatic bioreactors. The development of cost-effective strategies to control dissolved oxygen in aerobic bioprocesses, especially focusing on system pressurization, could be extended to other relevant industrial processes.

# Capítulo 4: Modelagem da Cinética do Cultivo Celular

O modelo matemático referente à dinâmica do OD, descrevendo a transferência e o consumo celular de oxigênio, foi desenvolvido no Capítulo 3. Dando sequência ao trabalho, no presente capítulo é apresentada a modelagem dos demais componentes do sistema de cultivo de *Escherichia coli* geneticamente modificada – concentrações de células, substrato e produto (PspA).

Este capítulo é dividido em quatro seções: (seção 4.1) classificação dos modelos matemáticos e sua importância em bioprocessos; (seção 4.2) resumo dos modelos já desenvolvidos na literatura para cultivos de *E. coli* com produção de proteínas recombinantes; (4.3 e 4.4) apresentação e análise dos modelos cinéticos desenvolvidos no presente estudo para o consumo de substrato (glicerol) e a produção de células e de proteína recombinante (PspA).

## 4.1 Modelos matemáticos e sua relevância em bioprocessos

Modelos matemáticos estão presentes em diversas áreas do conhecimento (ciências naturais, sociais e engenharias) e têm como finalidade a descrição de sistemas em linguagem matemática. Em Engenharia Química, especificamente, os modelos matemáticos são utilizados para previsão e análise do comportamento de processos em determinadas condições, bem como para o desenvolvimento e otimização de novos sistemas. Além disso, modelos podem ser empregados na detecção de falhas e na implementação de estimadores de estado e controladores baseados em modelo.

No contexto de bioprocessos, a modelagem matemática é igualmente muito importante, especialmente no âmbito de otimização e controle (GNOTH et al., 2008). O desenvolvimento de modelos matemáticos pode levar também a um melhor entendimento do processo e das possíveis causas de sua variabilidade, aumentando a qualidade e reprodutibilidade dos produtos obtidos (FDA, 2004).

Quanto à sua classificação, os modelos matemáticos podem ser puramente empíricos, baseados em princípios fenomenológicos ou, mais frequentemente, apresentar ambas as características. Dessa forma, podemos distingui-los em três categorias principais:



modelos caixa-branca (fenomenológico), caixa-cinza e caixa-preta (empírico). O Quadro 4.1 apresenta as principais características de cada abordagem.

**Quadro 4.1.** Características principais dos modelos matemáticos do tipo caixa-branca (fenomenológico), caixa-cinza e caixa-preta (empírico).

	CAIXA-BRANCA	CAIXA-CINZA	CAIXA-PRETA
FONTE DE INFORMAÇÃO:	- princípios básicos	- conhecimento qualitativo, princípios básicos e dados experimentais	- dados experimentais
VANTAGENS:	- extrapolação - significado físico - confiabilidade - escalonável		- desenvolvimento rápido - usado como complemento - desconhecimento do processo
DESvantagens:	- desenvolvimento lento - conhecimento do processo - conhecimento restringe acurácia		- extrapolação não confiável - não escalonável - sem significado físico - dados restringem acurácia

Fonte: Adaptado de Nelles (2001).

Na prática, modelos puramente caixa-preta ou caixa-branca são bastante raros. Tipicamente, os modelos apresentam pelo menos algumas características empíricas ou fenomenológicas, de sorte que devem ser classificados, a rigor, como caixa-cinza. O motivo para a preferência por modelos caixa-cinza é que esses proporcionam as vantagens características das abordagens puras (caixa-branca e preta) e, ao mesmo tempo, contornam muitos dos seus inconvenientes. Por isso, os modelos desenvolvidos na presente tese foram do tipo caixa-cinza, conforme detalhado na Seção 4.3.

## 4.2 Modelagem matemática de cultivos de *Escherichia coli* recombinante

A produção de proteínas recombinantes por *Escherichia coli* é dependente de diversas condições, tais como: concentração de nutrientes, indutor, temperatura, pH, entre outras variáveis de processo. Assim sendo, existe, para cada processo, um conjunto de variáveis operacionais que precisam ser definidas, controladas e monitoradas de forma a garantir a qualidade e reprodutibilidade do processo, bem como maximizar/minimizar um

determinado índice de desempenho. Nesse contexto, o desenvolvimento de modelos matemáticos é pré-requisito, pois eles são empregados tanto no controle e na otimização do processo como na implementação de estimadores de estado (GALVANAUSKAS et al., 2004; KOMIVES; PARKER, 2003).

Grande diversidade de modelos matemáticos é proposta na literatura para descrever cultivos de *E. coli* recombinante. De forma geral, a população de células cultivada pode ser descrita desde um nível puramente empírico (caixa-preta), utilizando, por exemplo, redes neurais artificiais (THOLUDUR; RAMIREZ, 1999; TIAN et al., 2013), até um nível mais detalhado fazendo uso de equações baseadas em princípios fenomenológicos, como balanços de massa e fluxos metabólicos intracelulares (BENTLEY; DAVIS; KOMPALA, 1991; CHAE et al., 2000; GALVANAUSKAS et al., 2004; KOMIVES; PARKER, 2003; LEVISAUSKAS et al., 2003; RUIZ et al., 2011; SOMMER; VOLK; PIETZSCH, 2011; THOLUDUR; RAMIREZ, 1999). Dentre os modelos que mais se aproximam da abordagem caixa-branca, encontramos aqueles que consideram ainda a segregação das células detentoras do plasmídeo (produtoras da proteína recombinante) daquelas que não o possuem e, portanto, não sintetizam o produto de interesse (MIAO; KOMPALA, 1992; NEUBAUER; LIN; MATHISZIK, 2003). Isso pode ser necessário em casos onde a retenção plasmidial é baixa.

Embora as abordagens com maior estruturação possibilitem uma descrição mais detalhada do processo, elas se baseiam em muitos parâmetros e medidas experimentais que dificultam, na prática, a sua utilização. Modelos mais simples do tipo caixa-cinza, por sua vez, podem igualmente representar os dados experimentais de maneira satisfatória (CHAE et al., 2000; LEVISAUSKAS et al., 2003; RUIZ et al., 2011; SOMMER; VOLK; PIETZSCH, 2011), além de serem preferíveis, em muitos casos, por permitirem maior exatidão na identificação paramétrica e praticidade em sua utilização. Esses modelos caixa-cinza têm em comum a estrutura baseada nas equações de balanço material dos principais componentes do sistema na fase líquida (células, substrato e proteína de interesse), conforme segue exemplo a seguir para um processo em batelada (Equação 4.1).

$$\begin{cases} \frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \\ \frac{dC_p}{dt} = \mu_p \cdot C_x \\ \frac{dC_s}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s\right) C_x \end{cases} \quad (4.1)$$

onde  $C_x$ ,  $C_p$  e  $C_s$  são as concentrações celular, da proteína recombinante e do substrato limitante (fonte de carbono);  $Y_{x/s}$  é o coeficiente de conversão de substrato em biomassa;  $m_s$  é o consumo específico de substrato para a manutenção das células;  $\mu$  é a velocidades específica de crescimento celular;  $\mu_p$  é a velocidade específica de produção da proteína recombinante.

A velocidade específica de crescimento  $\mu$  pode ser descrita por modelos simples (Monod, por exemplo) ou mais complexos, envolvendo modulação pela concentração de oxigênio dissolvido ( $C_{O_2}$ ) e inibição por substrato, produto e/ou concentração celular (BASTIN; DOCHAIN, 1990). Além disso, observa-se acentuada mudança no metabolismo celular após a indução por IPTG, sendo necessária também a descrição matemática de tal fenômeno. Estudos relatados na literatura propõem modelos distintos para  $\mu$  antes e durante a fase de indução, que dependem, em geral, do acúmulo intracelular da proteína recombinante para uma determinada concentração de indutor (IPTG) (CHAE et al., 2000; LEVISAUSKAS et al., 2003; RUIZ et al., 2011; SOMMER; VOLK; PIETZSCH, 2011). Finalmente, o efeito da temperatura sobre  $\mu$  pode ser considerado através da sua modulação por um termo baseado na Lei de Arrhenius ou uma linearização da mesma, dependendo da faixa de temperatura analisada (LEVISAUSKAS et al., 2003; SAGMEISTER et al., 2013). Levando em conta todos esses efeitos, o modelo para  $\mu$  apresenta a estrutura geral representada pela Equação 4.2.

$$\mu = \begin{cases} f_{O_2}(C_{O_2}) \cdot f_s(C_s) \cdot f_T(T), & t < t_{ind} \\ f_{O_2}^{ind}(C_{O_2}) \cdot f_s^{ind}(C_s) \cdot f_T^{ind}(T) \cdot f_p^{ind}(C_p, C_x, T), & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (4.2)$$

onde  $T$  é a temperatura do cultivo.

Com relação à velocidade específica de produção de PspA  $\mu_p$ , observa-se que ela depende explicitamente de  $\mu$ ,  $C_x$  e  $C_p$ , para uma dada concentração de indutor (IPTG), conforme demonstrado por Levisauskas et al. (2003) e proposto na Equação 4.3. Nesse modelo,  $\mu_p$  é modulado pela velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e pelo acúmulo da proteína recombinante no citoplasma ( $C_p/C_x$ ). Uma vez que  $\mu$  é função da temperatura e da concentração da fonte de carbono,  $\mu_p$  depende implicitamente dessas variáveis de processo. A pressurização do sistema não tem influência sobre o metabolismo celular da *E. coli* até uma pressão de aproximadamente 300 bar (ZOBELL; JOHNSON, 1949). Portanto, o efeito da

pressão (de até 4 bar) sobre o crescimento celular e a produção de PspA não precisa ser incorporado no modelo.

$$\mu_p = \mu \frac{c_p}{c_x} + \frac{1}{T_{px}} \left( \frac{\mu k_m}{k_\mu + \mu + \mu^2 / k_{i\mu}} - \frac{c_p}{c_x} \right) \quad (4.3)$$

onde  $T_{px}$ ,  $k_m$ ,  $k_\mu$  e  $k_{i\mu}$  são parâmetros empíricos do modelo.

### 4.3 Construção do modelo matemático do processo de produção da PspA por *Escherichia coli* recombinante

O processo de produção da proteína recombinante PspA adotado no presente trabalho é do tipo batelada, utilizando meio quimicamente definido (glicerol como única fonte de carbono) e com indução química por IPTG (1 mM). A composição do meio de cultivo e as condições do cultivo (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, tempo de cultivo e indução) são apresentadas no Capítulo 3. Adotou-se o reator convencional (tanque agitado) não pressurizado de 5 L para a obtenção dos dados experimentais utilizados no ajuste dos modelos. O cultivo no reator airlift pressurizado de 5 L foi realizado apenas para a validação do modelo.

O modelo matemático desenvolvido para o processo foi do tipo caixa-cinza, baseado no balanço material dos principais componentes do sistema (Equação 4.4) e em relações empíricas para as velocidades específicas de produção de célula ( $\mu$ ) e de proteína recombinante (PspA) ( $\mu_p$ ) (Equações 4.5-4.7) adaptadas da literatura (CHAE et al., 2000; LEVISAUSKAS et al., 2003; RUIZ et al., 2011; SAGMEISTER et al., 2013; SOMMER; VOLK; PIETZSCH, 2011). O modelo para  $\mu$  (Equação 4.5) levou em consideração a desaceleração da velocidade específica de crescimento devido ao acúmulo intracelular de PspA. Além disso, verificou-se que essa desaceleração é proporcional à temperatura, o que foi incluído também no modelo. A perda de viabilidade celular é outro fenômeno comum durante a fase de indução, sendo descrita pelo termo  $\mu_m$  proporcional à temperatura. Tanto no caso da desaceleração como da perda de viabilidade, os termos introduzidos no modelo tentam reproduzir o efeito do estresse metabólico causado pela síntese de proteína recombinante sobre o metabolismo celular. Conforme explicado no Capítulo 3, quando a síntese de proteína recombinante é ativada pela adição do indutor, precursores e energia são direcionados para essa finalidade, afetando o metabolismo voltado para o crescimento. Além

disso, a velocidade de duplicação do plasmídeo pode não acompanhar a velocidade de crescimento, resultando em células-filhas que não apresentam resistência ao antibiótico de seleção. O aumento da temperatura intensifica esses fenômenos. Finalmente, a velocidade de síntese da PspA ( $\mu_p$ ) é afetada positivamente pela velocidade do metabolismo celular, representada por  $\mu$ , mas tendendo a um valor limite à medida em que ocorre o acúmulo intracelular de PspA. Em outras palavras,  $\mu_p$  apresenta dois termos: o primeiro deles leva em consideração a produção de PspA decorrente da multiplicação celular e o segundo representa o acúmulo intracelular do produto, que, por sua vez, apresenta um limite máximo dado por  $k_m \mu$ .

$$\begin{cases} \frac{dC_x}{dt} = (\mu - \mu_m) \cdot C_x \\ \frac{dC_p}{dt} = \mu_p \cdot C_x \\ \frac{dC_s}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{x/s}} C_x \end{cases} \quad (4.4)$$

$$\mu = \begin{cases} (a_\mu T + b_\mu) \frac{S}{K_s + S}, & t < t_{ind} \\ (a_\mu T + b_\mu) \frac{S}{K_s + S} \exp\left[-\beta \frac{C_p}{C_x} (T - T_{ref})\right], & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (4.5)$$

$$\mu_m = \begin{cases} 0, & t < t_{ind} \\ a_{\mu m} T + b_{\mu m}, & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (4.6)$$

$$\mu_p = \begin{cases} 0, & t < t_{ind} \\ \mu \frac{C_p}{C_x} + \frac{1}{T_{px}} \left(k_m \mu - \frac{C_p}{C_x}\right), & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (4.7)$$

onde  $T$  é a temperatura em °C;  $a_\mu$ ,  $b_\mu$ ,  $a_{\mu m}$ ,  $b_{\mu m}$ ,  $k_m$ ,  $T_{px}$ ,  $\beta$  e  $T_{ref}$  são parâmetros empíricos do modelo;  $K_s$  é a constante de Monod;  $Y_{x/s}$  é o coeficiente de rendimento de produção de biomassa;  $t_{ind}$  é o tempo no qual se inicia a fase de indução.

As curvas ajustadas aos pontos experimentais de crescimento celular, produção de PspA e consumo de substrato (glicerol) obtidos na etapa anterior (Capítulo 3) são apresentadas na Figura 4.1. Os valores estimados dos parâmetros dos modelos (Equações 4.4–4.7) são apresentados na Tabela 4.1. O ajuste paramétrico foi efetuado por regressão não linear implementada em Matlab™. Os intervalos de confiança do modelo apresentados na Figura 4.1 foram estimados a partir da matriz de covariância dos parâmetros estimados

( $cov\{\hat{\theta}\}$ ), conforme Equação 4.8 (NELLES, 2001). A matriz de regressão  $\underline{\underline{X}}$  (Equação 4.9) foi calculada por diferenças finitas no ponto de ótimo (HIMMELBLAU, 1970).

$$\hat{y}_{i.c.} = \hat{y} \pm t_{95\%;(n_e-n_m)} \sqrt{\text{diag}(\underline{\underline{X}} \text{cov}\{\hat{\theta}\} \underline{\underline{X}}^T)}$$

(4.8)

$$\underline{\underline{X}} = \frac{\partial \hat{y}}{\partial \hat{\theta}} = \begin{bmatrix} \frac{\partial \hat{y}_1}{\partial \theta_1} & \dots & \frac{\partial \hat{y}_1}{\partial \theta_{n_m}} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial \hat{y}_{n_e}}{\partial \theta_1} & \dots & \frac{\partial \hat{y}_{n_e}}{\partial \theta_{n_m}} \end{bmatrix}$$

(4.9)

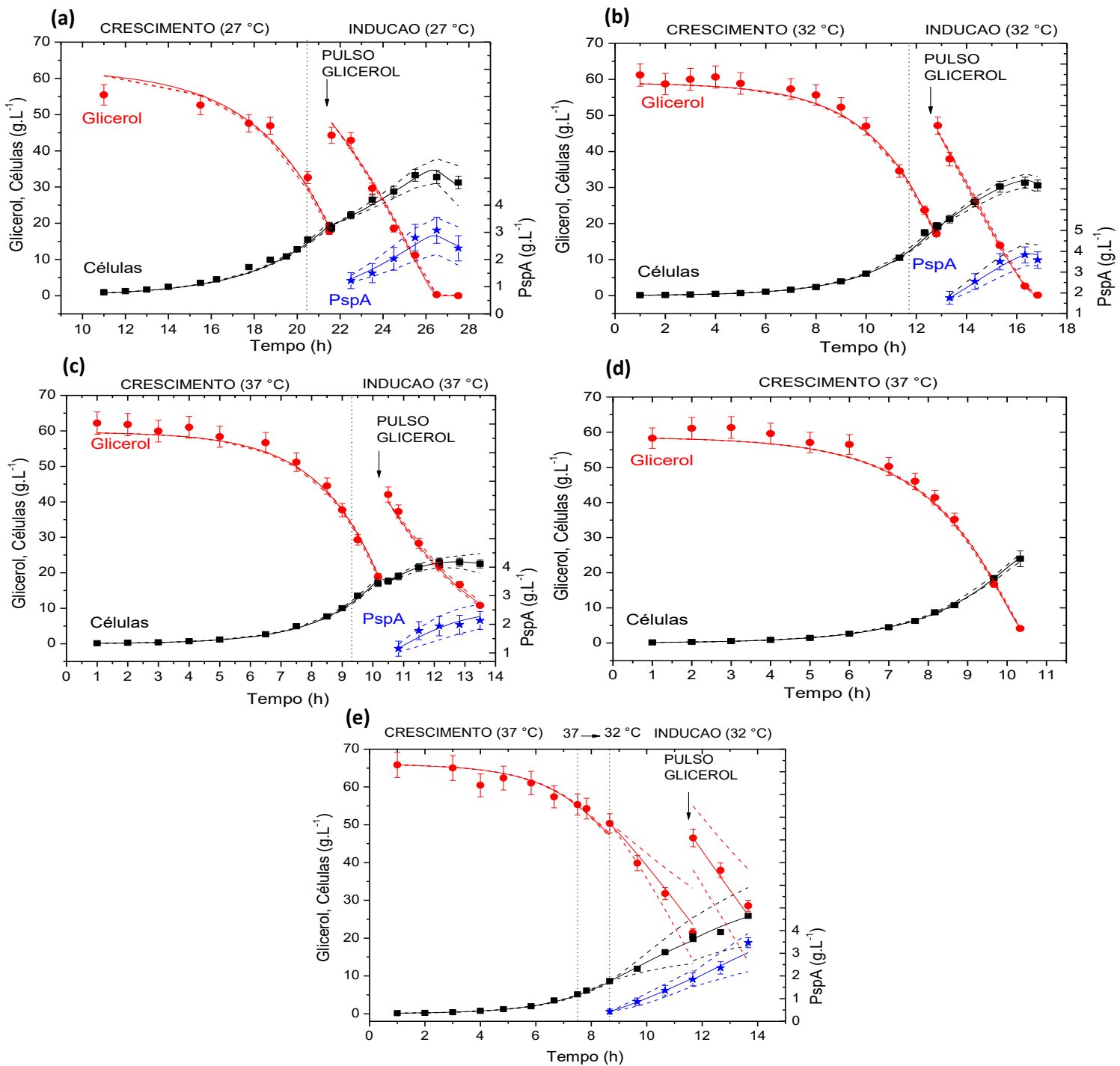
onde  $\hat{y}_{i.c.}$  é o intervalo de confiança dos valores preditos pelo modelo ( $\hat{y}$ );  $\hat{\theta}$  é o vetor dos parâmetros estimados do modelo;  $n_e$  e  $n_m$  são os números de pontos experimentais e de parâmetros do modelo, respectivamente;  $t_{95\%;(n_e-n_m)}$  é a variável da distribuição de Student com  $(n_e - n_m)$  graus de liberdade no nível de 95% de confiança.

Como é possível observar na Figura 4.1, o modelo descreveu adequadamente tanto os dados de ajuste quanto os de validação, com um número mínimo de 4 e 10 parâmetros para as fases de crescimento e indução (Tabela 4.1), respectivamente, confirmando as hipóteses assumidas para a sua formulação. No entanto, devido ao aumento do número de parâmetros para a fase de indução e, conseqüentemente, da imprecisão na estimativa paramétrica, o intervalo de confiança apresentou dispersão consideravelmente maior nessa fase (Tabela 4.1 e Figura 4.1). Vale ressaltar que a descrição matemática da síntese da proteína recombinante em diferentes temperaturas, bem como a sua ação inibitória sobre o crescimento celular, é um fenômeno complexo que exige modelo com maior número de parâmetros em relação à fase de crescimento.

**Tabela 4.1.** Valores estimados dos parâmetros das Equações 4.4-4.7.

	Fase de crescimento		Fase de indução	
	Valor	Erro padrão	Valor	Erro padrão
$a_{\mu}$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ )	0,0256	0,0003	0,17	0,07
$b_{\mu}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	-0,359	0,006	-4	2
$K_s$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	3,9	0,3	1,2	0,2
$Y_{x/s}$ ()	0,45	0,01	0,7	0,2
$a_{\mu m}$ ( $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ )	---	---	0,009	0,004
$b_{\mu m}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	---	---	-0,1	0,1
$\beta$ ( $^{\circ}\text{C}^{-1}$ )	---	---	2,3	0,6
$T_{px}$ (h)	---	---	7	4
$k_m$ (h)	---	---	0,2	0,2
$T_{ref}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	---	---	26,8	0,8

Dentre todos os 10 parâmetros do modelo, apenas o coeficiente de rendimento  $Y_{x/s}$  e a constante de Monod  $K_s$  apresentam algum significado físico.  $Y_{x/s}$  representa quanto do substrato (glicerol) é convertido em biomassa (células) e seu valor estimado para as fases de indução ( $0,45 \pm 0,01$ ) e crescimento ( $0,7 \pm 0,2$ ) estão de acordo com a literatura ( $0,39 - 0,5$ ) (GARCÍA-ARRAZOLA et al., 2005; HORTA et al., 2012; KORZ et al., 1995; VÉLEZ et al., 2014). Já  $K_s$  reflete a facilidade com que as células transportam o glicerol através da parede e membrana celular (transporte passivo e facilitado) (ARRANZ; PEINADO, 2017; WEINER et al., 2014). O valor estimado de  $K_s$  foi  $3,9 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (fase de crescimento) e  $1,2 \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (fase de indução), enquanto que na literatura seu valor é um pouco inferior, igual a  $0,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (POCCIA; BECCARIA; DONDO, 2014). É esperado que o valor de  $K_s$ , ou a facilidade de assimilação de glicerol, seja diferente dependendo da composição do meio de cultivo e das demais condições de cultivo.



**Figura 4.1.** Modelos matemáticos ajustados aos dados experimentais de crescimento celular, consumo de substrato e produção de PspA para cultivos em batelada de *E. coli* recombinante em tanque agitado não pressurizado (5 L) com indução – (a) 27 °C, (b) 32 °C, (c) 37 °C – e sem indução – (d) 37 °C. O experimento de validação (e) foi realizado em reator airlift (5 L) pressurizado (até 4 bar). As barras de desvio padrão se referem a medidas em triplicatas e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança da estimativa do modelo (95 %).



## 4.4 Conclusões

A cinética de crescimento celular, produção de PspA e consumo de substrato foi descrita por modelo caixa-cinza baseado em balanço de massa e relações empíricas. O modelo matemático foi capaz de descrever satisfatoriamente os dados experimentais com o ajuste de poucos parâmetros – 4 (fase de crescimento) e 10 (fase de indução). Vale ressaltar que, mesmo com relativamente poucos parâmetros, o modelo desenvolvido foi capaz de descrever um fenômeno complexo envolvendo a síntese de proteína recombinante e seu efeito de desaceleração sobre o crescimento celular. Além disso, as equações foram capazes de representar o processo em diferentes temperaturas.

O modelo matemático desenvolvido foi validado através de ensaio em biorreator airlift pressurizado (5 L), podendo, portanto, ser utilizado para diversos propósitos, como: análise e simulação do processo, otimização e desenvolvimento de controladores e estimadores de estado.

# Capítulo 5: Otimização Dinâmica do Controle do Oxigênio Dissolvido

Nos Capítulos 3 e 4, foram desenvolvidos e validados os modelos matemáticos que representam a dinâmica das principais variáveis do processo de produção de PspA por *Escherichia coli* recombinante ( $C_x$ ,  $C_s$ ,  $C_p$  e OD).

No presente capítulo, portanto, é descrita a otimização dinâmica (controle ótimo) em malha aberta do controle oxigênio dissolvido (OD) para o cultivo de *E. coli* recombinante no biorreator airlift com base nos modelos matemáticos desenvolvidos previamente. Na primeira parte (seção 5.1), é apresentada a teoria de controle ótimo e o estado da arte dos métodos empregados para a resolução dos problemas de otimização dinâmica. Na sequência (seção 5.2), são apresentados trabalhos da literatura que fazem uso dessa teoria para otimizar bioprocessos, inclusive o controle do OD. Mais adiante (seção 5.3), são expostas as hipóteses e simplificações assumidas para resolução do problema proposto de controle ótimo do OD manipulando quatro variáveis operacionais (pressão, temperatura e vazões de ar e oxigênio puro). Finalmente, na última parte (seções 5.3 e 5.4), a resolução do problema de controle ótimo e os resultados obtidos são apresentados e discutidos.

## 5.1 Otimização dinâmica: teoria e métodos numéricos

A otimização dinâmica, também conhecida como controle ótimo, é uma ferramenta matemática que possibilita determinar perfis de atuação das variáveis de controle que maximizem (ou minimizem) uma determinada medida de desempenho (lucro, produtividade, gasto energético, impacto ambiental, etc). Em muitas aplicações, como nas plantas (bio)químicas, as políticas ótimas de controle estão ainda sujeitas a restrições operacionais de segurança, ambientais, qualidade do produto, entre outras (FEEHERY, 1998; SRINIVASAN; PALANKI; BONVIN, 2003).

No caso de processos em batelada e batelada alimentada, que são algumas vezes preferíveis (baixo volume de produção, necessidade de purificação do produto de interesse e por razões de esterilidade e segurança), a otimização dinâmica apresenta importância ainda maior. Ao contrário dos processos contínuos, processos descontínuos são caracterizados pela ausência de estado estacionário. Portanto, nesses casos, a otimização

operacional envolve a determinação de perfis dinâmicos de controle (otimização dinâmica), e não valores de operação fixos no tempo (otimização estacionária), como no caso da otimização de processos contínuos (SRINIVASAN; PALANKI; BONVIN, 2003).

A solução de problemas dinâmicos de otimização têm sido objeto de estudo nos últimos séculos, desde que o matemático suíço Johann Bernoulli propôs, em 1696, o desafio do problema braquistócrono, que era o de demonstrar matematicamente a trajetória de uma partícula que, sujeita a um campo gravitacional constante, sem atrito e com velocidade inicial nula, se desloca entre dois pontos no menor intervalo de tempo. Em 1697, Isaac Newton resolveu o problema, desenvolvendo, por consequência, as bases do cálculo variacional, que apresenta as condições necessárias e suficientes para a otimização de problemas dinâmicos (RAMIREZ, 1994; SAGAN, 1980). No entanto, mesmo atualmente, a solução analítica de tais problemas é restrita a casos mais simples. Na grande maioria dos problemas práticos de Engenharia Química, por outro lado, são necessários métodos numéricos, que só se tornaram amplamente utilizados com o advento dos computadores modernos (FEEHERY, 1998).

No Quadro 5.1 abaixo, apresenta-se um resumo dos principais métodos numéricos empregados para a solução de problemas de otimização dinâmica de acordo com a formulação empregada (direta, PMP e PHJB) e o nível de parametrização das variáveis de estado e controle.

**Quadro 5.1.** Principais métodos numéricos para solução de problemas de otimização dinâmica.

Variáveis		Formulação do Problema		
		Direta	Princípio de Mínimo de Pontryagin (PMP)	Princípio de Otimalidade de Hamilton-Jacobi-Bellman (PHJB)
Estado: parametrizadas	parametrizadas	Abordagem simultânea	<i>Multiple-shooting</i>	Programação dinâmica
Estado: contínuas	parametrizadas	Abordagem sequencial	Método do gradiente	----
Estado: contínuas	contínuas	Abordagem da parametrização analítica	<i>Single-shooting</i>	----

Fonte: Adaptado de Srinivasan, Palanki e Bonvin (2003).

### 5.1.1 Formulação direta

Geralmente, na área de Engenharia Química, os problemas são descritos matematicamente por sistemas de equações diferenciais ordinárias (EDO) com valor inicial. Com isso, a formulação direta do problema de otimização dinâmica pode ser posta da seguinte forma:

$$\min_{\underline{u}(t), t_f} J = \phi(\underline{x}(t_f), t_f) + \int_{t_0}^{t_f} F(\underline{x}, \underline{u}, t) dt \quad (5.10)$$

s. a.:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \quad (5.11)$$

$$\underline{g}(\underline{x}, \underline{u}, t) = \underline{0} \quad (5.12)$$

$$\underline{S}(\underline{x}, \underline{u}, t) \leq \underline{0} \quad (5.13)$$

$$\underline{T}(\underline{x}(t_f)) \leq \underline{0} \quad (5.14)$$

onde  $J$  é um índice de desempenho (valor escalar) composto pela função custo terminal  $\phi$  e pelo custo integral determinado por  $F$ ,  $\underline{x}$  o vetor de variáveis de estado cuja condição inicial ( $t=t_0$ ) é  $\underline{x}_0$ ,  $\underline{u}$  o vetor das variáveis de controle,  $\underline{f}$  o vetor das equações fenomenológicas do sistema,  $\underline{g}$  o vetor das restrições de igualdade,  $\underline{S}$  o vetor das restrições de desigualdade e  $\underline{T}$  o vetor das restrições de desigualdade no estado final. Vale ressaltar que os vetores, ao contrário das grandezas escalares, são assinalados por uma barra inferior.

Exceto em casos muito simples, a abordagem numérica é utilizada para resolver as Equações 5.10-5.14. Neste caso, basicamente o que se faz é transformar o problema original de otimização, de dimensão infinita, na solução de um problema de otimização não-linear (PNL) de dimensão finita. Para tanto, existem dois métodos diretos comumente empregados (VASSILIADIS, 1993): abordagem sequencial e abordagem simultânea. Na abordagem sequencial, apenas o vetor de controle é parametrizado e, a cada iteração do otimizador não-linear, as EDO são integradas e, em seguida, calculada a função objetivo. Já na abordagem simultânea, a diferença é que ambos os vetores, de controle e de estado, são parametrizados, convertendo a Equação 5.11 em um sistema de equações

algébricas não-lineares. Os métodos diretos são os mais utilizados e descritos na literatura, por serem relativamente fáceis de implementar e pela existência de algoritmos robustos para solução de PNL (HIMMELBLAU, 1970). Entretanto, a grande desvantagem desses métodos é que seu desempenho é bastante afetado pela parametrização e inicialização escolhidas para os vetores de controle e/ou estado.

### 5.1.2 Formulação indireta: PHJB e PMP

A colocação direta do problema de otimização dinâmica (Equações 5.10-5.14) pode ser reformulada de duas formas: o Princípio de Otimalidade de Hamilton-Jacobi-Bellman (PHJB) e o Princípio do Mínimo de Pontryagin (PMP) (SRINIVASAN; PALANKI; BONVIN, 2003).

No método PHJB, também conhecido como programação dinâmica, o problema de otimização do funcional  $J$  (Equações 5.10-5.14) é transformado na solução de uma equação diferencial parcial, que, exceto para casos bem particulares, é de muito difícil solução (FEEHERY, 1998). Portanto, esse método é menos empregado na prática.

Mais comumente utilizada, a abordagem PMP é um método indireto que se baseia na teoria clássica de controle ótimo para a solução do problema de otimização dinâmica (RAMIREZ, 1994). Empregando os conceitos de cálculo variacional e com a definição da função Hamiltoniana  $H(t)$ , o problema original (Equações 5.10-5.14), com restrições, é transformado em um sistema de equações algébrico-diferenciais ordinárias (Equações 5.15-5.21), cuja solução é a mesma para ambas as formulações (direta e indireta).

$$\min_{\underline{u}(t), t_f} H(t) = F(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\xi}^T \underline{S}(\underline{x}, \underline{u}, t) \quad (5.15)$$

s. a.:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \quad (5.16)$$

$$\dot{\underline{\lambda}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}} = -\frac{\partial F}{\partial \underline{x}} - \left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{x}}\right)^T \underline{\lambda} - \left(\frac{\partial \underline{S}}{\partial \underline{x}}\right)^T \underline{\xi} \quad (5.17)$$

$$\left[ \left. \frac{\partial \phi}{\partial \underline{x}} \right|_{t_f} + \underline{v}^T \left. \frac{\partial T}{\partial \underline{x}} \right|_{t_f} - \underline{\lambda}(t_f) \right]^T \underline{\delta x}_f + \left[ \left. \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_{t_f} + H(t_f) \right] \delta t_f = 0 \quad (5.18)$$

$$\frac{\partial H}{\partial \underline{u}} = \frac{\partial F}{\partial \underline{u}} + \left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{u}}\right)^T \underline{\lambda} + \left(\frac{\partial \underline{S}}{\partial \underline{u}}\right)^T \underline{\xi} = 0 \quad (5.19)$$

$$\underline{\xi}^T \underline{S}(\underline{x}, \underline{u}, t) = 0 \quad (5.20)$$

$$\underline{v}^T \underline{T}(\underline{x}(t_f)) = 0 \quad (5.21)$$

onde  $\underline{\lambda}(t)$  é o vetor das variáveis adjuntas com a dimensão do vetor  $\underline{x}$ ,  $\underline{\xi}(t) \geq 0$  o vetor dos multiplicadores de Lagrange para as restrições de trajetória com a dimensão do vetor  $\underline{S}$ ,  $\underline{v} \geq 0$  o vetor dos multiplicadores de Lagrange para as restrições terminais com a dimensão do vetor  $\underline{T}$ . Os multiplicadores de Lagrange  $\underline{\xi}$  e  $\underline{v}$  são nulos sempre que as restrições descritas por  $\underline{S}$  e  $\underline{T}$  estão inativas, de tal forma que as Equações 5.20 e 5.21 sejam sempre satisfeitas.

No caso em que o estado final seja livre ( $\delta \underline{x}_f \neq \underline{0}$ ), o valor de  $\underline{\lambda}(t_f)$  é determinado igualando a zero o primeiro parênteses da Equação 5.18. Com isso, recaímos na resolução de um problema de valor de contorno de dois pontos (*two-points boundary value problem*, TPBVP), ou seja, as Equações 5.16 e 5.17 devem integradas com condição inicial para  $\underline{x}(t_0)$  ( $= \underline{x}_0$ ) e final para  $\underline{\lambda}(t_f)$  ( $= \left. \frac{\partial \phi}{\partial \underline{x}} \right|_{t_f} + \underline{v}^T \left. \frac{\partial T}{\partial \underline{x}} \right|_{t_f}$ ). Essa é a principal desvantagem do método, devido à dificuldade numérica de resolução de problemas do tipo TPBVP, especialmente em grande escala (VASSILIADIS, 1993), diminuindo também a velocidade de convergência da otimização (FEEHERY, 1998).

Existem três métodos principais para a solução numérica de problemas com a abordagem PMP: o método do gradiente, *single-shooting* e *multiple-shooting*. O método do gradiente, especificamente, por se tratar de um algoritmo robusto quanto à inicialização das variáveis de decisão (SRINIVASAN; PALANKI; BONVIN, 2003) e também relativamente simples de ser empregado, foi escolhido para a otimização dinâmica empregada neste trabalho. Além disso, este método é bastante promissor, pois apresenta um bom compromisso entre cálculo analítico e numérico (SRINIVASAN; PALANKI; BONVIN, 2003). Basicamente, ele se assemelha ao método direto sequencial (seção 5.1.1), exceto pelo fato de que, no método do gradiente, o vetor de controle  $\underline{u}$  é atualizado a cada iteração a partir da informação de  $\frac{\partial H}{\partial \underline{u}}$  (Equação 5.19).

## 5.2 Controle ótimo do oxigênio dissolvido

No contexto de otimização dinâmica de bioprocessos, a grande maioria dos trabalhos relatados na literatura aplicam o método para determinar perfis de alimentação que maximizem um determinado índice de desempenho, tal como: produtividade, rendimento, conversão, produção final, entre outros. Geralmente, os autores empregam a formulação direta com métodos numéricos de busca local (*Sequential Quadratic Programming*) (CHAE et al., 2000; TEBBANI; DUMUR; HAFIDI, 2008) ou global (*Particle Swarm, Evolutionary Algorithms* e *Simulated Annealing*) (KOOKOS, 2004; LIU et al., 2013; ROCHA et al., 2014). A formulação indireta é menos comum, mas também apresenta resultados satisfatórios para problemas semelhantes (LEVISAUSKAS et al., 2003; RIBEIRO; GIORDANO, 2005).

Embora menos comum, a otimização dinâmica do controle do OD em biorreatores também tem sido relatada na literatura (AKYUREK et al., 2009; ALVES; VASCONCELOS, 1996; KREYENSCHULTE et al., 2016; SHIELDS; KAO, 1994; SINGH et al., 1990; ZWIETERING; VERLAAN; KROLIKOWSKI, 1992). Nesses trabalhos, as principais variáveis de controle são agitação e taxa de aeração, tendo como objetivo a minimização do consumo de potência (ALVES; VASCONCELOS, 1996; SHIELDS; KAO, 1994; SINGH et al., 1990). Kreyenschulte et al. (2016) otimizaram também o perfil de pressurização do sistema como variável de controle do OD e verificaram que ela é indispensável para processos com alta demanda por oxigênio e formação intensa de espuma. Todavia, apenas no estudo desenvolvido por Zwietering, Verlaan e Krolikowski (1992) foi otimizado o controle do OD para um reator pneumático, no caso um biorreator airlift de circulação externa. Para tal, manipularam-se as vazões de alimentação de ar e oxigênio puro a fim de minimizar o desvio e a ação do controle.

Como o airlift apresenta menor transferência de oxigênio quando comparado ao biorreator convencional (agitado mecanicamente) (CAMPANI et al., 2016; HUANG; MCDONALD, 2009), as variáveis adicionais de controle do OD, temperatura e pressão, são necessárias para contornar esse problema (CAMPANI et al., 2016). Contudo, não foram encontrados trabalhos que fizessem a otimização dinâmica do controle do OD manipulando paralelamente essas quatro variáveis de processo: pressão, temperatura e vazões de ar e oxigênio puro.

### 5.3 Ensaios de otimização dinâmica em malha aberta

O controle do OD foi otimizado para as duas fases do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift: crescimento celular e indução da produção da proteína recombinante. A fim de melhorar o desempenho do algoritmo de otimização, algumas hipóteses foram feitas e os modelos matemáticos do processo foram simplificados, como detalhado na seção 5.3.1. Para ambos os problemas de otimização (fase de crescimento e de indução), foi empregada a abordagem PMP com resolução pelo método do gradiente, conforme descrito nas seções 5.3.2 e 3.3.3. Os resultados obtidos são apresentados na seção 5.3.4.

#### 5.3.1 Hipóteses assumidas e simplificação dos modelos

Com o intuito de melhorar o desempenho do algoritmo de otimização e simplificar os modelos do processo – Equações 3.19 e 3.20 (Capítulo 3) e Equações 4.4-4.7 (Capítulo 4) –, foram consideradas as seguintes hipóteses:

- (i) Ausência de limitação por substrato (glicerol) ( $C_S \gg K_S$ ). Com isso, a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) (Equação 4.5) pode ser simplificada para a Equação 5.22:

$$\mu = \begin{cases} (a_\mu T + b_\mu), & t < t_{ind} \\ (a_\mu T + b_\mu) \exp\left[-\beta \frac{c_p}{c_x} (T - T_{ref})\right], & t \geq t_{ind} \end{cases} \quad (5.22)$$

- (ii) As vazões volumétricas dos gases no fluxômetro,  $Q_{ar/O_2}^{(1)}$  ( $T_1 = 294,1$  K e  $p_1 = 1$  bar), e no biorreator,  $Q_{ar/O_2}^{(2)}$  ( $T_2 = 300$  a  $310$  K e  $p_2 = 1$  a  $4$  bar), são relacionadas pela aproximação feita na Equação 5.23, com um erro de até 5% dentro do intervalo de temperatura utilizado. A vazão volumétrica foi escolhida como variável de processo, ao invés da vazão mássica, por estar diretamente relacionada com a hidrodinâmica e a transferência de massa no biorreator.



$$Q_{ar/O_2}^{(1)} = \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{T_1}{T_2}\right)^{\cong 1} Q_{ar/O_2}^{(2)} \cong \left(\frac{p_2}{p_1}\right) Q_{ar/O_2}^{(2)} \quad (5.23)$$

(iii) Controlador ideal do OD, de modo que a concentração de oxigênio dissolvido ( $C_{O_2}$ ) seja constante e igual a 30% de saturação (relativo ao ar à pressão atmosférica e temperatura do cultivo). Com essa restrição de igualdade, a variável de estado  $C_{O_2}$  é eliminada do problema e a pressão do sistema ( $p_2$ ) passa a ser função das demais variáveis de controle e das variáveis de estado (Equação 5.24):

$$\begin{aligned} \frac{dC_{O_2}}{dt} &= \text{transferência de } O_2 - \text{consumo de } O_2 = 0 \\ k_L a \cdot C_{O_2}^* \left[ \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{0,21Q_{ar}^{(2)} + Q_{O_2}^{(2)}}{Q_{ar}^{(2)} + Q_{O_2}^{(2)}}\right) \frac{1}{0,21} - 0,3 \right] &= q_{O_2} \cdot C_x \\ \Rightarrow p_2 &= 0,21p_1 \left(\frac{Q_{ar}^{(2)} + Q_{O_2}^{(2)}}{0,21Q_{ar}^{(2)} + Q_{O_2}^{(2)}}\right) \left[ \frac{q_{O_2} \cdot C_x}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} + 0,3 \right] \quad (5.24) \end{aligned}$$

$$\text{sendo } \begin{cases} q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{x/O_2}} + a_q T^3 + b_q \\ k_L a = \frac{a_k}{1 + e^{-b_k(\Phi - c_k)}} \theta^{(T-27)} \\ \Phi = \frac{Q_{ar}^{(2)} + Q_{O_2}^{(2)}}{V} \end{cases}$$

onde  $C_{O_2}^*$  é a solubilidade do oxigênio no meio de cultivo como função da temperatura Equações 3.14 e 3.15 (Capítulo 3).

(iv) O custo operacional relacionado ao controle do OD levou em consideração o custo do oxigênio puro industrial e o gasto energético de compressão isentrópica do ar (CAMPANI et al., 2016). Além disso, considerou-se uma perda aproximada de carga de 1 bar no sistema de injeção de gás do reator, medida experimentalmente. O custo de refrigeração do reator foi desconsiderado, uma vez que a taxa de produção de calor pelo sistema é aproximadamente igual à de retirada (veja dedução no Apêndice B). Dessa forma, tem-se o seguinte custo operacional por unidade de tempo ( $dCOP/dt$ ) para o controle do OD (Equação 5.25):

$$\frac{dCOP}{dt} = \overbrace{\alpha_{O_2} \left(\frac{p_2}{p_1}\right) Q_{O_2}^{(2)}}^{\text{custo do } O_2} + \overbrace{\alpha_{ar} \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{\gamma}{\gamma-1}\right) \left(\frac{1}{\eta_c}\right) \left[\left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} - 1\right] Q_{ar}^{(2)}}^{\text{custo de compressão do ar}} \quad (5.25)$$

$$\text{sendo}^* \begin{cases} \alpha_{O_2} = 0,032 \left[ \frac{US\$ \cdot \text{min}}{\text{std-L} \cdot \text{h}} \right] \\ \alpha_{ar} = 0,00021 \left[ \frac{US\$ \cdot \text{min}}{\text{std-L} \cdot \text{h}} \right] \end{cases}$$

onde *std* se refere às condições de calibração do fluxômetro (294,1 K e 1 bar),  $\gamma$  é o expoente isentrópico igual a 1,4 (gás ideal),  $\eta_c$  a eficiência do compressor igual a 0,7 (KNOLL et al., 2005) e  $p_1 = 1$  bar.

(v) A resposta da temperatura do sistema ( $T$ ) frente a uma variação do tipo degrau no *set point* ( $T_{sp}$ ) foi aproximada por uma equação de 1ª ordem (Equação 5.26):

$$\frac{dT}{dt} = k_T (T_{sp} - T) \quad (5.26)$$

onde  $k_T$  ( $= 6,49 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ ) é a constante de tempo determinada experimentalmente. Esse modelo empírico foi capaz de descrever satisfatoriamente a dinâmica da temperatura, com a necessidade de apenas um parâmetro ( $k_T$ ). Os modelos fenomenológicos, baseados em balanço de energia, embora geralmente mais precisos, teriam um número maior de parâmetros e demandariam maior esforço na identificação dos mesmos.

(vi) O tempo de cada fase do cultivo foi fixado - crescimento (12 h) e indução (7 h) - com base no conhecimento prévio da dinâmica do processo, de modo que a otimização foi efetuada apenas com o objetivo de obter uma heurística ótima de controle (sequência de atuação das variáveis de controle, por exemplo).

---

\* Os custos do oxigênio industrial e da energia elétrica foram consultados em setembro de 2016 na plataforma COSTDRIVERS® <<https://www.costdrivers.com/>>.

### 5.3.2 Desenvolvimento matemático

Considerando as hipóteses e simplificações apresentadas na seção 5.3.1, os problemas de otimização do controle do OD foram formulados para as duas fases do processo, crescimento (seção 5.3.2.1) e indução (seção 5.3.2.2).

#### 5.3.2.1 Fase de crescimento

A fase de crescimento celular tem como finalidade produzir as células que sintetizarão o produto de interesse (proteína recombinante PspA) durante etapa de indução subsequente. Portanto, é interessante que as células sejam produzidas com o menor custo possível. Com isso, o problema de otimização se resume a minimizar o custo do controle do OD por unidade de massa de células produzida sujeito a restrições operacionais.

Primeiramente, tem-se que o modelo simplificado da fase de crescimento é representado pela Equação 5.26, cujos parâmetros já foram apresentados na Tabela 4.1 (Capítulo 4).

$$\frac{dx}{dt} = \begin{bmatrix} \dot{C}_x \\ \dot{COP} \\ \dot{T} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \\ \dot{x}_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu \cdot x_1 \\ \alpha_{O_2} \left(\frac{p_2}{p_1}\right) u_2 + \alpha_{ar} \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left\{ \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} - 1 \right\} u_1 \\ k_T(u_3 - x_3) \end{bmatrix} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u})$$

(5.26)

$$\text{onde } \begin{cases} \mu = (a_\mu x_3 + b_\mu) \\ \underline{u} = \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Q_{ar}^{(2)} \\ Q_{O_2}^{(2)} \\ T_{sp} \end{bmatrix} \end{cases} \quad \text{e} \quad \underline{x}_0 = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{bmatrix}_{t_0} = \begin{bmatrix} 0,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \\ 0 \text{ US\$} \\ 27 \text{ }^\circ\text{C} \end{bmatrix}$$

Com isso, podemos formular diretamente o problema de otimização como segue:

$$\min_{\underline{u}(t)} J = \phi(\underline{x}(t_f)) = \frac{x_2(t_f)}{V\{x_1(t_f) - x_1(t_0)\}} \quad (\text{função objetivo}) \quad (27)$$

s. a.:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \quad (\text{modelo fenomenológico}) \quad (28)$$

$$\underline{S}(\underline{x}, \underline{u}) = \begin{bmatrix} Q_{\min}^{(2)} - u_1(t) - u_2(t) \\ u_1(t) + u_2(t) - Q_{\max}^{(2)} \\ p_2^{\min} - p_2(t) \\ p_2(t) - p_2^{\max} \end{bmatrix} \leq \underline{0} \quad (\text{restrições}) \quad (29)$$

$$\begin{cases} 0 \leq u_1(t) \\ 0 \leq u_2(t) \\ 27 \leq u_3(t) \leq 37 \text{ }^\circ\text{C} \end{cases} \quad (\text{limites - "bounds"}) \quad (30)$$

onde  $V$  é o volume útil do reator,  $Q_{\min}^{(2)} = 5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $Q_{\max}^{(2)} = 20 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  as vazões mínima e máxima de gás permitidas e  $p_2^{\min} = 1 \text{ bar}$  e  $p_2^{\max} = 4 \text{ bar}$  as pressões mínima e máxima do sistema.

Seguindo a abordagem PMP (Equações 5.15-5.21), o problema de otimização original pode ser reformulado como segue. As derivadas parciais que aparecem nas Equações 5.33 e 5.35 foram calculadas analiticamente e estão apresentadas no Apêndice A.

$$\min_{\underline{u}(t)} H(t) = \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) + \underline{\xi}^T \underline{S}^2(\underline{x}, \underline{u}, t) \quad (5.31)$$

s. a.:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \quad (5.32)$$

$$\dot{\underline{\lambda}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}} = -\left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{x}}\right)^T \underline{\lambda} - \left(\frac{\partial \underline{S}^2}{\partial \underline{x}}\right)^T \underline{\xi} \quad (5.33)$$

$$\underline{\lambda}(t_f) = \left. \frac{\partial \phi}{\partial \underline{x}} \right|_{t_f} = \begin{bmatrix} -\frac{x_2(t_f)}{V\{x_1(t_f) - x_1(t_0)\}^2} \\ \frac{1}{V\{x_1(t_f) - x_1(t_0)\}} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (5.34)$$

$$\frac{\partial H}{\partial \underline{u}} = \left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{u}}\right)^T \underline{\lambda} + \left(\frac{\partial \underline{S}^2}{\partial \underline{u}}\right)^T \underline{\xi} = 0 \quad (5.35)$$

$$\underline{\xi}_i = \begin{cases} \underline{\xi}_i = 0, & S_i < 0 \\ \underline{\xi}_i > 0, & S_i \geq 0 \end{cases} \quad (5.36)$$

Na definição do Hamiltoniano (Equação 5.31), cada componente do vetor  $\underline{S}$  foi elevado ao quadrado ( $\underline{S}^2$ ). Com isso, as restrições de desigualdade foram tratadas usando uma

função penalidade,  $\underline{\xi}^T \underline{S}^2(\underline{x}, \underline{u})$ , com a primeira derivada contínua em  $S_i = 0$ , o que torna a convergência do problema mais estável nas regiões de fronteira (restrições ativas).

### 5.3.2.2 Fase de indução

A principal etapa do cultivo é a fase de indução, durante a qual as células sintetizam a proteína recombinante (PspA). Portanto, uma estratégia de controle do OD que proporcione a melhor relação entre produção da PspA e gasto operacional se torna necessária. Em outras palavras, o problema de otimização aqui é minimizar o custo operacional do controle do OD por unidade de massa de PspA sintetizada.

O modelo simplificado para a fase de indução é descrito pela Equação 5.37. A condição inicial escolhida para a concentração celular foi de  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , que é o valor aproximado habitual para o início da fase de indução (ver Figura 4.1). Os valores dos parâmetros estão listados na Tabela 4.1 (Capítulo 4).

$$\frac{d\underline{x}}{dt} = \begin{bmatrix} \dot{C}_x \\ \dot{C}_p \\ \dot{COP} \\ \dot{T} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \\ \dot{x}_3 \\ \dot{x}_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (\mu - k_d)x_1 \\ \mu_p \cdot x_1 \\ \alpha_{O_2} \left(\frac{p_2}{p_1}\right) u_2 + \alpha_{ar} \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left\{ \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} - 1 \right\} u_1 \\ k_T(u_3 - x_3) \end{bmatrix} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u})$$

(5.37)

$$\text{onde } \begin{cases} \mu = (a_\mu x_3 + b_\mu) \exp \left[ -\beta \frac{x_2}{x_1} (x_3 - T_{ref}) \right] \\ \mu_m = a_{\mu m} x_3 + b_{\mu m} \\ \mu_p = \mu \frac{x_2}{x_1} + \frac{1}{T_{px}} \left( k_m \cdot \mu - \frac{x_2}{x_1} \right) \\ \underline{u} = \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Q_{ar}^{(2)} \\ Q_{O_2}^{(2)} \\ T_{sp} \end{bmatrix} \end{cases}$$

$$\text{e } \underline{x}_0 = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \end{bmatrix}_{t_0} = \begin{bmatrix} 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \\ 0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \\ 0 \text{ US\$} \\ 27 \text{ }^\circ\text{C} \end{bmatrix}$$

Dessa forma, a formulação direta do problema de otimização é da seguinte forma:

$$\min_{\underline{u}(t)} J = \phi(\underline{x}(t_f)) = \frac{x_3(t_f)}{V\{x_2(t_f) - x_2(t_0)\}} \quad (\text{função objetivo}) \quad (5.38)$$

s. a.:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \quad (\text{modelo fenomenológico}) \quad (5.39)$$

$$\underline{S}(\underline{x}, \underline{u}) = \begin{bmatrix} Q_{\min}^{(2)} - u_1(t) - u_2(t) \\ u_1(t) + u_2(t) - Q_{\max}^{(2)} \\ p_2^{\min} - p_2(t) \\ p_2(t) - p_2^{\max} \end{bmatrix} \leq \underline{0} \quad (\text{restrições}) \quad (5.40)$$

$$\begin{cases} 0 \leq u_1(t) \\ 0 \leq u_2(t) \\ 27 \leq u_3(t) \leq 37 \text{ } ^\circ\text{C} \end{cases} \quad (\text{limites - "bounds"}) \quad (5.41)$$

onde  $V$  é o volume útil do reator,  $Q_{\min}^{(2)} = 5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $Q_{\max}^{(2)} = 20 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  as vazões mínima e máxima de gás permitidas e  $p_2^{\min} = 1 \text{ bar}$  e  $p_2^{\max} = 4 \text{ bar}$  as pressões mínima e máxima do sistema.

O problema de otimização original pode, então, ser reformulado de acordo com a abordagem PMP (Equações 5.15-5.21), conforme abaixo. As derivadas parciais presentes nas Equações 5.44 e 5.46 foram determinadas analiticamente (Apêndice A).

$$\min_{\underline{u}(t)} H(t) = \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\xi}^T \underline{S}(\underline{x}, \underline{u}, t) \quad (5.42)$$

s. a.:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}), \quad \underline{x}(t_0) = \underline{x}_0 \quad (5.43)$$

$$\dot{\underline{\lambda}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}} = -\left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{x}}\right)^T \underline{\lambda} - \left(\frac{\partial \underline{S}}{\partial \underline{x}}\right)^T \underline{\xi} \quad (5.44)$$

$$\underline{\lambda}(t_f) = \frac{\partial \phi}{\partial \underline{x}} \Big|_{t_f} = \begin{bmatrix} 0 \\ -\frac{x_3(t_f)}{V\{x_2(t_f) - x_2(t_0)\}^2} \\ \frac{1}{V\{x_2(t_f) - x_2(t_0)\}} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (5.45)$$

$$\frac{\partial H}{\partial \underline{u}} = \left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{u}}\right)^T \underline{\lambda} + \left(\frac{\partial \underline{S}}{\partial \underline{u}}\right)^T \underline{\xi} = 0 \quad (5.46)$$

$$\xi_i = \begin{cases} \xi_i = 0, & S_i < 0 \\ \xi_i > 0, & S_i \geq 0 \end{cases} \quad (5.47)$$

Novamente, assim como para a fase de crescimento (seção 5.3.2.1), o Hamiltoniano (Equação 5.42) foi definido com cada componente do vetor  $\underline{S}$  elevado ao quadrado ( $\underline{S}^2$ ). Desse modo, a função penalidade,  $\underline{\xi}^T \underline{S}^2(\underline{x}, \underline{u})$ , possui a primeira derivada contínua em  $S_i = 0$ , tornando o problema de otimização mais estável.

### 5.3.3 Algoritmo de otimização

Os problemas de otimização representados pelas Equações 5.31-5.36 (fase de crescimento) e Equações 5.42-5.47 (fase de indução) foram resolvidos pelo método do gradiente. Como dito anteriormente, esse método emprega técnicas analíticas e numéricas. Assim como na abordagem direta, o método do gradiente não busca uma solução explícita do tipo  $\underline{u}(t) = \underline{g}(\underline{x}(t), \underline{\lambda}(t))$ , mas se utiliza do equacionamento proveniente da formulação PMP para atualizar a direção de busca do ótimo. Portanto, existe um equilíbrio entre cálculo analítico (solução das equações PMP) e numérico (busca direta baseada em gradiente).

O algoritmo implementado em Matlab<sup>TM</sup> para a otimização dinâmica do controle do OD em malha aberta com base no método do gradiente seguiu os seguintes passos:

**Passo 1:** Escolher política inicial de controle parametrizada no tempo  $\underline{u}^0(t_i)$ ;

**Passo 2:** Integrar o sistema de EDO que descreve as variáveis de estado do processo (Equações 5.32 e 5.43) de  $t_0$  a  $t_f$  com condição inicial  $\underline{x}_0$ , assumindo  $\underline{u}(t) = \underline{u}^k(t_i)$  interpolado por *spline* cúbica.

**Passo 3:** Integrar o sistema de EDO dos co-estados ( $\underline{\lambda}$ ) (Equações 5.33 e 5.44) de  $t_f$  a  $t_0$  com condição final  $\underline{\lambda}(t_f)$  dada pelas Equações 5.34 e 5.45. A integração aqui é feita com ambos os vetores  $\underline{u}^k(t_i)$  e  $\underline{x}(t_i)$  interpolados por *spline* cúbica;

**Passo 4:** Calcular o gradiente do Hamiltoniano (Equações 5.35 e 5.46) e verificar a convergência  $\left(\frac{\partial H(t_i)}{\partial \underline{u}} \rightarrow \underline{0}\right)$ ;

**Passo 5:** Atualizar o vetor de controle parametrizado usando o método do gradiente conjugado (HIMMELBLAU, 1970):

$$\underline{u}^{k+1}(t_i) = \underline{u}^k(t_i) + \alpha \cdot \underline{s}^k(t_i), \text{ para } i = 1, 2, \dots, p = \text{pontos de discretização}$$

$$\text{sendo } \underline{s}^{k+1}(t_i) = -\nabla_u H^{k+1}(t_i) + \underline{s}^k \frac{\nabla_u^T H^{k+1}(t_i) \cdot \nabla_u H^{k+1}(t_i)}{\nabla_u^T H^k(t_i) \cdot \nabla_u H^k(t_i)} \quad (5.48)$$

onde a notação  $\nabla_u$  indica o operador gradiente  $\frac{\partial}{\partial \underline{u}}$  e  $\alpha$  é o tamanho do passo dado na direção de  $\underline{s}$ .

**Passo 6:** Repetir os passos 2-5 até que um determinado critério de parada seja satisfeito (número de iterações e/ou convergência do problema).

### 5.3.4 Resultados e discussão

Nesta seção, serão apresentados os resultados da otimização dinâmica (em malha aberta) do controle do OD para o cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L. As variáveis de controle são: pressão, temperatura e vazões de alimentação de ar e oxigênio puro. Foram utilizados os modelos matemáticos simplificados do processo para as duas fases do cultivo, crescimento e indução (seção 5.3.2), e o método do gradiente (seção 5.3.3) para a resolução do problema do controle ótimo a partir da abordagem PMP (seção 5.1.2).

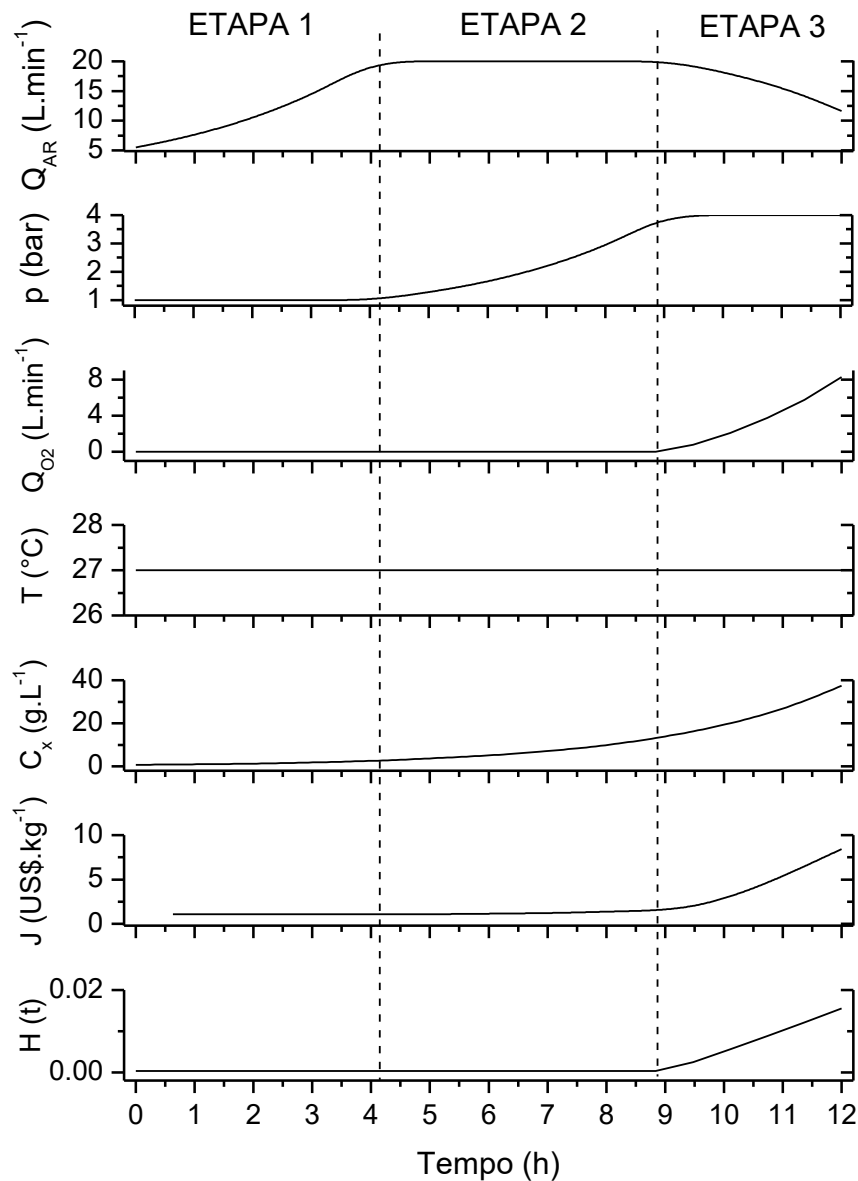
#### 5.3.4.1 Fase de crescimento

Nessa fase do cultivo, foram determinados os perfis ótimos das variáveis de controle do OD (pressão –  $p$  [bar]; temperatura –  $T$  [°C]; vazão de ar –  $Q_{ar}$ ; vazão de oxigênio –  $Q_{O_2}$ ) que minimizam o seu custo operacional ( $COP$ ) por grama de biomassa (células) produzida. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.1.

Pode-se verificar a partir da Figura 5.1 que a heurística ótima de controle do OD pode ser dividida em três etapas: (1) aumento de  $Q_{ar}$ ; (2) pressurização do biorreator; (3) redução de  $Q_{ar}$  e aumento concomitante de  $Q_{O_2}$ , enriquecendo o gás de entrada com oxigênio puro. Em outras palavras, a variável de controle do OD menos dispendiosa para o processo é  $Q_{ar}$ , seguida pela pressurização e  $Q_{O_2}$ . A melhor temperatura teórica de cultivo foi 27°C, pois



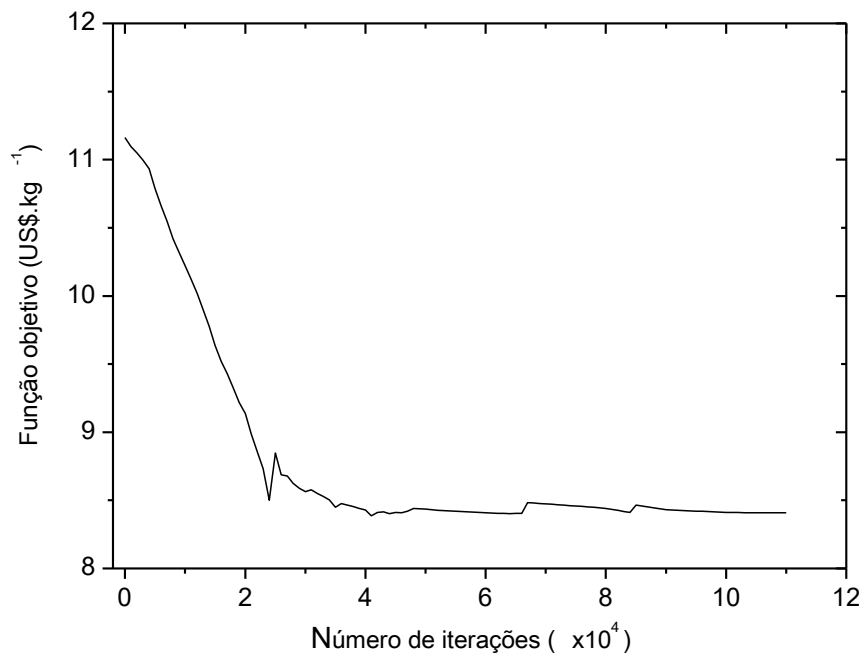
diminui significativamente o consumo de ar e oxigênio puro, embora havendo uma produtividade menor de células.



**Figura 5.1.** Crescimento celular ( $C_x$ ) e os perfis ótimos de atuação nas variáveis de controle do OD ( $Q_{ar}$ ,  $Q_{O_2}$ ,  $p$  e  $T$ ), bem como seu custo operacional ( $COP$ ) cumulativo, no decorrer da fase de crescimento simulada do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L.  $H(t)$  é a função Hamiltoniana proveniente do problema de otimização. Etapa 1: aumento de  $Q_{ar}$ ; Etapa 2: pressurização do sistema; Etapa 3: enriquecimento do ar de entrada com oxigênio puro.

É interessante notar na Figura 5.1 que a partir de  $\sim 8,9$  h, o valor da função Hamiltoniana –  $H(t)$  – aumenta. Ou seja, considerando apenas o custo operacional do processo, a fase de produção da proteína recombinante deveria ser iniciada em 8,9 h, momento a partir do qual começa a haver o enriquecimento do gás de entrada com  $O_2$  puro. Na mesma Figura 5.1, observamos que a concentração celular ( $C_x$ ) em 8,9 h é de  $\sim 13 \text{ g.L}^{-1}$ , o que está de acordo com o valor praticado para início da fase de indução nos experimentos realizados para a etapa de modelagem (Capítulo 4).

A Figura 5.2 mostra a evolução da função objetivo no decorrer da otimização dinâmica. Como pode ser verificado, o procedimento convergiu para um mínimo local com a função objetivo (Equação 5.27) avaliada em  $8,4 \text{ US}\$. \text{kg}^{-1}$ . O tempo total de processamento foi de aproximadamente 7,6 h (Intel® Core™ i7 3.60 GHz). Portanto, o algoritmo de otimização desenvolvido aqui se aplica apenas para uso *off-line*. No entanto, esse fato não inviabilizou atingir o objetivo aqui apresentado, que era o de encontrar uma heurística ótima de atuação nas variáveis de controle previamente à execução do processo real.



**Figura 5.2.** Comportamento da função objetivo (Equação 5.27) no decorrer da otimização dinâmica do controle do OD para a fase de crescimento de celular de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L.

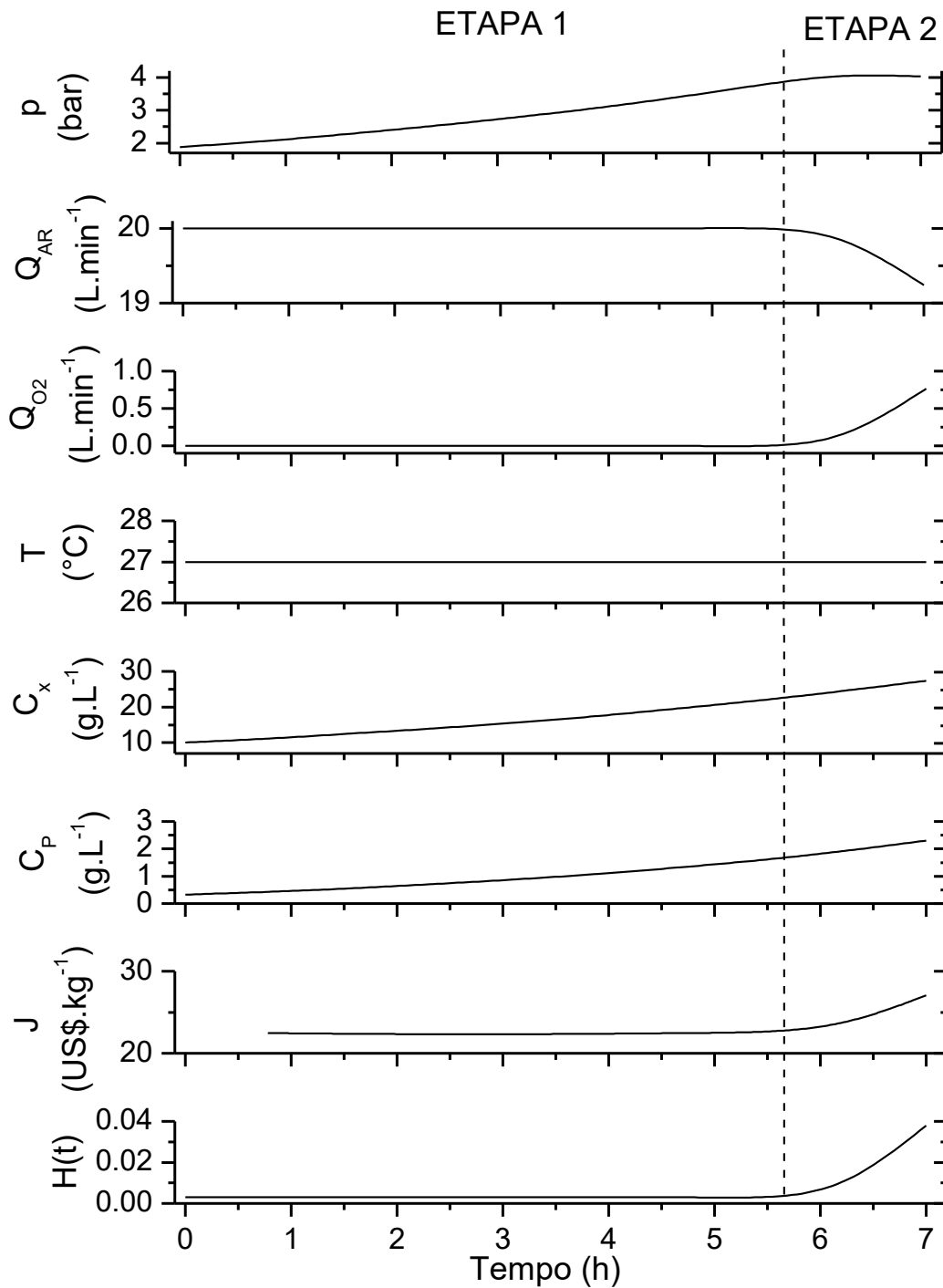
### 5.3.4.2 Fase de indução

Para a fase de produção a proteína recombinante (PspA), os perfis ótimos das variáveis de controle do OD (pressão –  $p$  [bar]; temperatura –  $T$  [°C]; vazão de ar –  $Q_{ar}$ ; vazão de oxigênio –  $Q_{O_2}$ ) apresentados na Figura 5.3 minimizam o custo operacional ( $COP$ ) por grama de PspA produzida.

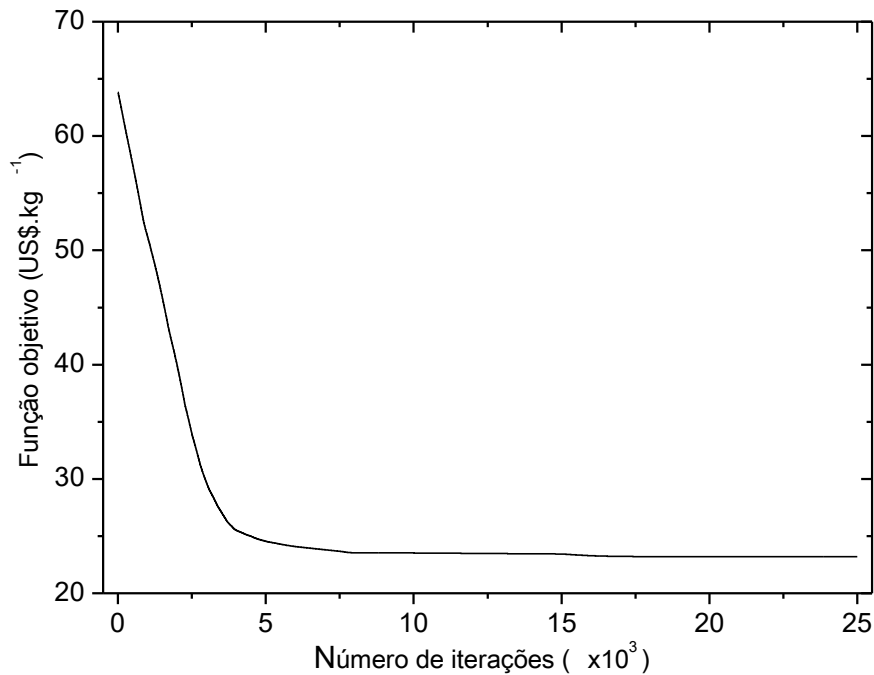
Como observado para a fase de crescimento (seção 5.3.4.1), a heurística ótima de controle do OD para a fase de indução pode também ser dividida em etapas, no caso duas: (1) pressurização do biorreator; (2) enriquecendo o gás de entrada com  $O_2$  puro. Ou seja, confirma-se aqui novamente que a variável de controle do OD mais custosa para o processo é  $Q_{O_2}$ , seguida pela pressão e  $Q_{ar}$ . A temperatura ótima de cultivo, por sua vez, foi de 27 °C.

Analisando a função  $H(t)$  (Figura 5.3), verifica-se que seu valor aumenta acentuadamente por volta de 5,6 h. Isso indica que, levando em conta apenas o custo operacional do processo, o cultivo deveria ser finalizado até 5,6 h, quando começa o enriquecimento do gás de entrada com  $O_2$  puro.

Na Figura 5.4 podemos observar que o valor final da função objetivo (Equação 5.38) foi 23,2 US\$.kg<sup>-1</sup>. Verificou-se ainda que o problema convergiu bem mais rapidamente (1,7 h de processamento) para um mínimo local do que no caso da fase de crescimento (7,6 h de processamento). O comportamento suave da função objetivo para a fase de indução (Figura 5.4), em contraste com as oscilações observadas para a fase de crescimento (Figura 5.2), possibilitaram passos maiores de atualização do vetor  $\underline{u}(t_i)$  (Equação 5.48), o que acarretou, portanto, a convergência mais rápida do problema. Todavia, mesmo para a fase de indução, o emprego do algoritmo de otimização continua sendo para uso *off-line* apenas, o que serve perfeitamente ao objetivo de determinar uma heurística ótima de atuação nas variáveis de controle antes da realização do cultivo em laboratório.



**Figura 5.3.** Variáveis de estado ( $C_x$  e  $C_p$ ) e os perfis ótimos de atuação nas variáveis de controle do OD ( $Q_{ar}$ ,  $Q_{O_2}$ ,  $p$  e  $T$ ), bem como seu custo operacional ( $COP$ ) cumulativo, no decorrer da fase de indução simulada do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L.  $H(t)$  é a função Hamiltoniana proveniente do problema de otimização. Etapa 1: pressurização do sistema; Etapa 2: enriquecimento do ar de entrada com  $O_2$  puro.



**Figura 5.4.** Comportamento da função objetivo (Equação 5.38) no decorrer da otimização dinâmica do controle do OD para a fase de indução do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L.

## 5.4 Conclusões

Nesse capítulo, foi realizada a otimização dinâmica em malha aberta do controle do OD para as duas fases do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift de 5 L, crescimento celular e produção da proteína recombinante (PspA), manipulando quatro variáveis de processo ( $Q_{ar}$ ,  $Q_{O_2}$ ,  $p$  e  $T$ ). Os resultados mostraram que, para ambas as fases, a heurística ótima de controle é bastante simples: atuação sequencial nas variáveis de controle, da menos dispendiosa ( $Q_{ar}$ ) para a mais custosa ( $p$  seguida de  $Q_{O_2}$ ), à medida que as restrições operacionais são atingidas. Foi observado também que a temperatura mais baixa (27°C) minimizou o custo operacional do controle do OD, mesmo com produtividades menores de célula e PspA.

É importante ressaltar que, como as técnicas de controle ótimo são baseadas no modelo do processo, um desacoplamento não pode ser descartado entre o processo simulado

e o real. Por isso, mais importante que os perfis ótimos para as variáveis manipuladas, são as heurísticas de processo e controle resultantes da otimização.

# Capítulo 6: Controle Preditivo do Oxigênio Dissolvido Integrado a Estimadores de Estado

A heurística ótima de atuação nas variáveis manipuladas ( $Q_{ar}$ ,  $Q_{O_2}$ ,  $p$  e  $T$ ) foi determinada no Capítulo 5, através da otimização dinâmica do controle do OD em malha aberta. Essa heurística ótima foi então implementada em simulações do processo usando os modelos matemáticos desenvolvidos nos Capítulos 3 e 4. Para isso, é proposto no presente capítulo um sistema avançado de controle do OD em biorreator airlift (5 L) durante cultivo de *E. coli* para a produção de PspA, integrando o controlador preditivo linear a dois estimadores de estado, o filtro de Kalman estendido e o estimador de horizonte móvel. O desenvolvimento do controlador, bem como o seu teste em simulações do processo, é apresentado a seguir.

## 6.1 Introdução

Controle em malha fechada é uma estratégia empregada para aumentar a robustez e a qualidade dos bioprocessos (SIMUTIS; LÜBBERT, 2015). A implementação de controle com retroalimentação, no entanto, é geralmente dependente de medidas *online* das variáveis de estado, o que pode não estar disponível na prática devido ao alto custo dos sensores ou até a não disponibilidade dos mesmos. Por isso, os estimadores de estado, também conhecidos como *soft sensors*, têm sido desenvolvidos para a reconciliação de dados e para a estimativa de variáveis não medidas (MOHD ALI et al., 2015). Além disso, o monitoramento *online* possibilita a tomada de decisões no processo (transferência de inóculo, alimentação de substrato, duração das fases de crescimento e indução, etc.) com base no estado do sistema, ao invés de baseada no tempo (JUNKER et al., 2006).

O crescimento celular e a síntese de produto são afetados por diversos fatores, incluindo a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no caldo de cultivo (ONKEN; LEIFKE, 1989). No entanto, o controle preciso do OD é um desafio, uma vez que tanto as condições operacionais como as biológicas afetam a sua dinâmica. Portanto, controladores *feedback* clássicos, como o proporcional-integral-derivativo (PID), podem não apresentar boa performance durante todo o cultivo (KUPRIJANOV et al., 2009). Por outro lado, o

controlador preditivo baseado em modelo (MPC do inglês *Model Predictive Control*) é uma abordagem preferida para obter alta performance, uma vez que ele apresenta desempenho superior que os controladores PID adaptativos e é capaz de lidar explicitamente com restrições e problemas de controle multivariável (RAWLINGS; MAYNE, 2013; SIMUTIS; LÜBBERT, 2015). De fato, alguns autores relataram resultados promissores para o controle do OD usando controladores MPC lineares e não lineares para biorreatores pneumáticos e tipo tanque agitado (CHOTKOWSKI; BRDYS; KONARCZAK, 2005; RODRIGUES; MACIEL FILHO, 1999; ZWIETERING; VERLAAN; KROLIKOWSKI, 1992).

A implementação de controladores *feedback* é dependente do monitoramento do processo em tempo real. Esse fato é ainda mais crítico no caso do MPC, que geralmente requer que todos os estados sejam medidos *online*. Nesse contexto, uma abordagem integrando estimadores de estado ao controlador se mostra como uma opção interessante para processos com dados ruidosos ou com falta de sensores adequados. Recente atenção tem sido dada a tal abordagem, usando isoladamente o filtro de Kalman estendido (EKF do inglês *extended Kalman filter*) (CHEN; WANG; SREBRIC, 2015; EL BAHJA; VEGA CRUZ; REVOLLAR, 2012; HABIBULLAH; LU, 2015) ou o estimador de horizonte móvel (MHE do inglês *moving horizon estimation*) (ABDOLLAHI; DUBLJEVIC, 2012; CHEN; KIRKBY; JENA, 2012; QUINTERO; COPP; HESPANHA, 2015) integrados a controladores preditivos em uma ampla variedade de aplicações, incluindo o controle do OD em bioprocessos.

EKF e MHE são estimadores Bayesianos apropriados a sistemas contendo variáveis de estado e medidas com distribuição normal (HASELTINE; RAWLINGS, 2005; MOHD ALI et al., 2015). Por um lado, o EKF é fácil de implementar e fornece estimativas mais rápidas, mas é menos robusto quanto a erros de modelagem e condições iniciais imprecisas (SUI; FENG; HOVD, 2008). Por outro lado, o MHE é capaz de lidar com restrições e fornece estimativas mais precisas (HASELTINE; RAWLINGS, 2005), mas com maior tempo computacional decorrente da necessidade de solucionar problemas de otimização não linear a cada iteração. Por isso, o MHE pode ser inadequado para processos com dinâmica rápida e tempo curto de amostragem. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma abordagem hierárquica EKF/MHE integrada ao MPC linear, mais especificamente o controlador preditivo por matriz dinâmica (DMC do inglês *Dynamic Matrix Control*), pode contornar os problemas associados à robustez e ao tempo computacional. Essa estrutura integrada EKF/MHE-DMC é inédita na literatura e, portanto, foi proposta nesse capítulo para



o monitoramento e o controle do OD, cuja dinâmica é rápida, da ordem de segundos, quando comparada a processos químicos típicos.

## 6.2 Estimadores de estado

### 6.2.1 Teste de observabilidade

Um sistema é dito observável se for possível determinar o estado  $x(t)$  com base em informações das entradas  $u$  e das medidas  $y$  em um horizonte de tempo finito  $[t_0, t]$ . Para sistemas descritos pelas Equações 6.1 e 6.2, pode-se demonstrar que o mesmo é observável se e somente se a matriz de observabilidade  $O$  com dimensão  $nq \times n$  (Equação 6.3) apresentar posto  $n$ , onde  $n$  e  $q$  são as dimensões do vetor de estados e de medidas do sistema, respectivamente (OGATA, 2010). Esse teste de observabilidade pode ser aplicado a aproximações lineares de sistemas não lineares como um indicador de observabilidade local (HENSON; SEBORG, 1996). Nesse caso, a matriz de sensibilidade  $A$  é dada pela Equação 6.4.

$$\dot{x} = f(x, u) = Ax + Bu \quad (6.1)$$

$$y = Cx \quad (6.2)$$

$$O = \begin{bmatrix} C \\ CA \\ \vdots \\ CA^{n-1} \end{bmatrix}_{nq \times n} \quad (6.3)$$

$$A = \frac{\partial f}{\partial x} = \begin{bmatrix} \partial f_1 / \partial x_1 & \cdots & \partial f_1 / \partial x_n \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \partial f_n / \partial x_1 & \cdots & \partial f_n / \partial x_n \end{bmatrix} \quad (6.4)$$

onde  $x \in \mathfrak{R}^n$ ,  $y \in \mathfrak{R}^q$  e  $u \in \mathfrak{R}^m$ .

### 6.2.2 Filtro de Kalman estendido

O EKF é um método recursivo para estimar estados de sistemas não lineares. Essa técnica emprega as equações do filtro de Kalman tradicional para fornecer estimativas para sistemas não lineares usando suas formas linearizadas. Em suma, EKF consiste de duas etapas: etapa de predição no tempo e atualização com base em medidas do processo (Equações 6.5-6.9). Na primeira etapa, o estado anterior  $x_{k-1|k-1} \sim N(\hat{x}_{k-1|k-1}, P_{k-1|k-1})^\dagger$  é propagado um passo a frente no tempo, dando  $x_{k|k-1} \sim N(\hat{x}_{k|k-1}, P_{k|k-1})$ . A informação da medida atual  $y_k = Cx_k + v_k$ , contendo ruído  $v \sim N(0, R)$ , é então usada para melhorar a estimativa de  $\hat{x}_{k|k-1}$  para  $\hat{x}_{k|k} \sim N(\hat{x}_{k|k}, P_{k|k})$ .  $P$  e  $R$  são as matrizes de covariância associadas aos estados e às medidas. Considerou-se que o ruído do processo  $w_k = x_k - f(x_{k-1}, u_{k-1})$  apresenta igualmente distribuição normal com média zero e covariância  $Q_k$ . Rawlings e Mayne (2013) trazem mais detalhes sobre o método EKF.

$$\text{predição pelo modelo} \begin{cases} \hat{x}_{k|k-1} = f(\hat{x}_{k-1|k-1}, u_{k-1}) \\ P_{k|k-1} = A_k P_{k-1|k-1} A_k^T + G_k Q_{k-1} G_k^T \end{cases} \quad (6.5)$$

$$\text{atualização baseada na medida} \begin{cases} \hat{x}_{k|k} = \hat{x}_{k|k-1} + L_k (y_k - C\hat{x}_{k|k-1}) \\ P_{k|k} = P_{k|k-1} - L_k C P_{k|k-1} \end{cases} \quad (6.6)$$

$$\hat{x}_{0|0} = x_0, P_{0|0} = P_0 \quad (6.7)$$

$$L_k = P_{k|k-1} C^T (C P_{k|k-1} C^T + R)^{-1} \quad (6.8)$$

$$A_k = \left. \frac{\partial f}{\partial x} \right|_{\hat{x}_{k|k}}, G_k = \left. \frac{\partial f}{\partial w} \right|_{\hat{x}_{k|k}} \quad (6.9)$$

onde  $x_0$  e  $P_0$  são chutes iniciais para os estados e para a covariância, respectivamente, e  $L_k$  é o ganho de Kalman.

---

<sup>†</sup>  $x \sim N(\hat{x}, P)$  significa que a variável  $x$  é estocástica com distribuição normal, média  $\hat{x}$  e matriz de covariância  $P$ . Definimos  $\hat{x}_{k|k-1}$  como sendo a estimativa de estado no passo  $k$  dada a informação do processo antes de  $k$ , e  $\hat{x}_{k|k}$  como sendo a estimativa em  $k$  dada a medida  $y_k$ .

### 6.2.3 Estimador de horizonte móvel

Diferente do EKF, que se baseia apenas na medida presente ( $y_k$ ), o MHE fornece estimativas dos estados a partir de  $N + 1$  medidas ( $y_{k-m}, y_{k-m+1}, \dots, y_k$ ) e  $N$  predições pelo modelo ( $\hat{x}_{k-m+1|k-m}, \hat{x}_{k-m+2|k-m+1}, \dots, \hat{x}_{k|k-1}$ ), onde  $N$  é chamado de tamanho do horizonte. Portanto, MHE leva a estimativas mais robustas (HASELTINE; RAWLINGS, 2005). Além disso, uma vez que o MHE é um método baseado em otimização, ele é capaz de lidar explicitamente com restrições.

Assumindo que os ruídos do processo e da medida são normalmente distribuídos com média zero e matrizes de covariância  $Q$  e  $R$ , respectivamente, o problema de otimização a ser resolvido a cada instante  $t_k$  tem a forma da Equação 6.10. O custo de chegada aproxima o efeito das medidas prévias ( $y_0, y_1, \dots, y_{k-m-1}$ ) na função objetivo (Equação 6.10). Na prática, o custo de chegada é uma função responsável por comprimir informação de dados do processo que seriam considerados no problema de informação completa, o qual é baseado em todas as medidas (passadas e atuais). Portanto, esse método transforma o problema matemático de dimensão crescente em um equivalente com dimensão fixa (RAO; RAWLINGS, 2002). A matriz de covariância  $P_{k-m}$  utilizada no custo de chegada é estimada recursivamente através das equações de atualização do EKF (RAO; RAWLINGS, 2002).

$$\min_{x_{k-m}, \dots, x_k} \left( \sum_{i=k-m}^{k-1} \|w_i\|_{Q^{-1}}^2 + \sum_{i=k-m}^k \|v_i\|_{R^{-1}}^2 + \overbrace{\|x_{k-m} - \hat{x}_{k-m}\|_{P_{k-m}^{-1}}^2}^{\text{custo de chegada}} \right)^\ddagger \quad (6.10)$$

s.a.

$$w_{i-1} = x_i - f(x_{i-1}, u_{i-1})$$

$$v_i = y_i - Cx_i$$

$$w_i \in W$$

$$x_i \in X$$

---

$\ddagger \|x\|_{A^{-1}}^2$  denota o produto interno ponderado  $x' A^{-1} x$ . A variável  $\hat{x}$  é a estimativa do estado e  $x$  é a variável de decisão do problema de minimização.

### 6.3 Estratégia hierárquica EKF/MHE-DMC

Nesta seção, são descritos os passos para a formulação do estimador de estados hierárquico integrado ao controlador, resumida na Figura 6.1,.

#### 6.3.1 Controlador preditivo por matriz dinâmica

Um controlador preditivo linear baseado em modelo, mais especificamente o DMC, é usado nas simulações para controlar a concentração de oxigênio dissolvido. Esse algoritmo é baseado no modelo de resposta ao degrau do sistema no domínio do tempo, o qual tem a forma da Equação 6.11 (BEQUETTE, 2003):

$$\hat{y}_k = s_1 \Delta u_{k-1} + s_2 \Delta u_{k-2} + \dots + s_{\eta-1} \Delta u_{k-\eta} + s_{\eta} u_{k-\eta} = \sum_{i=1}^{\eta-1} s_i \Delta u_{k-i} + s_{\eta} u_{k-\eta} \quad (6.11)$$

onde  $\hat{y}_k$  é a predição do modelo para o instante  $t_k$ ;  $\Delta u_{k-i}$  são as atuações na variável manipulada em  $i$  passos anteriores; e  $u_{k-\eta}$  é a variável manipulada  $\eta$  passos anteriores.

Assumindo um horizonte do modelo, horizonte de predição e horizonte de controle com  $\eta$ ,  $\rho$  e  $\omega$  passos, respectivamente, a Equação 6.11 pode ser expressa na forma matricial da Equação 6.12. Regras gerais para ajustar os parâmetros do controlador DMC ( $\eta$ ,  $\rho$ ,  $\omega$  e intervalo de amostragem) são descritas na literatura (SEBORG et al., 2011).

$$\begin{bmatrix} \hat{y}_{k+1} \\ \hat{y}_{k+2} \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+j} \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+\rho} \end{bmatrix} = \underbrace{\begin{bmatrix} \hat{y}_{k+1}^l \\ \hat{y}_{k+2}^l \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+j}^l \\ \vdots \\ \hat{y}_{k+\rho}^l \end{bmatrix}}_{\text{resposta livre predita, } \hat{Y}_l} + \underbrace{\begin{bmatrix} s_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ s_2 & s_1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & & & & \\ s_j & s_{j-1} & s_{j-2} & \dots & \dots & s_{j-\omega+1} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & & \vdots \\ s_{\rho} & s_{\rho-1} & s_{\rho-2} & \dots & \dots & s_{\rho-\omega+1} \end{bmatrix}}_{\text{matriz dinâmica, } S} \underbrace{\begin{bmatrix} \Delta u_k \\ \Delta u_{k+1} \\ \vdots \\ \Delta u_{k+\omega-2} \\ \Delta u_{k+\omega-1} \end{bmatrix}}_{\text{variações atual e passadas na variável manipulada, } \Delta u} = \hat{Y}_l + S \Delta u \quad (6.12)$$

Na Equação 6.12,  $\hat{Y}_l$  corresponde à resposta livre, ou seja, sem variações na variável manipulada. Os parâmetros da matriz  $S$  são determinados a cada iteração a partir de simulações de  $\hat{Y}_l$  e  $\hat{Y}$  usando os modelos do processo desenvolvidos nos Capítulos 3 e 4 e assumindo os seguintes valores para  $\Delta u$  (1 L·min<sup>-1</sup> para  $Q_{ar}$ , 0,05 bar para  $p$  e 0,003 para a variação em  $y_{O_2}$  devido ao enriquecimento do gás de entrada com oxigênio puro).

O erro predito  $E$  é definido como a diferença entre a trajetória de *set point* ( $Y_{sp}$ ) a predição do modelo ( $\hat{Y}$ ) (Equação 6.12), de acordo com a Equação 6.13. A função objetivo a ser minimizada ( $\varphi$ ) pelo controlador preditivo é definida na forma quadrática da Equação 6.14.

$$E = (Y_{sp} - \hat{Y}_l) - S\Delta u = E_l - S\Delta u \quad (6.13)$$

$$\min_{\Delta u} \varphi = E^T E + \Delta u^T W \Delta u \quad (6.14)$$

onde  $E_l$  é o erro da resposta livre, assumindo ausência de manipulação nas entradas  $u$  do processo e  $W$  é uma matriz diagonal responsável por ponderar as variações em  $u$ .

A solução do problema de minimização formulado pela Equação 6.14 é dada pela Equação 6.15. O sistema não possui restrições, pois a atuação nas variáveis manipuladas é sequencial, conforme demonstrado pela otimização dinâmica do controle do OD desenvolvida no Capítulo 5. Com isso, uma variável manipulada é substituída por outra à medida que a anterior atinge um valor limite, de forma que os valores das variáveis de controle ( $Q_{ar}$ ,  $p$  e  $Q_{O_2}$ ) estão sempre na região interna do seus respectivos domínios viáveis. A Equação 6.15 é então empregada para calcular as próximas atuações na variável manipulada, onde apenas a primeira delas ( $\Delta u_k$ ) é implementada. Esse procedimento é realizado a cada passo.

$$\Delta u = (S^T S + W)^{-1} S^T E \quad (6.15)$$

### 6.3.2 Formulação EKF/MHE-DMC

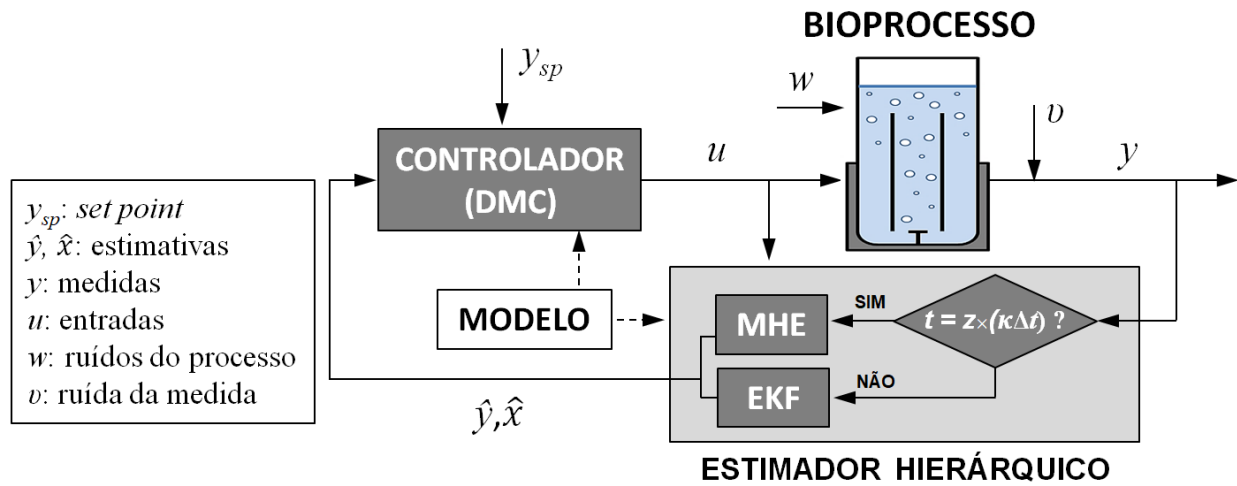
O controle do OD pelo DMC está sujeito a alguns desafios que podem ocorrer durante o cultivo, como medidas ruidosas ou não disponíveis, desvios entre o modelo e o processo e perturbações na entrada. A abordagem integrada estimador-controlador é uma forma de contornar esses problemas e melhorar a robustez do controle. Tem-se uma ampla variedade de estimadores de estado desenvolvidos na literatura, cada um com suas vantagens e desvantagens. Com relação aos estimadores Bayesianos, EKF e MHE são estratégias que se complementam se combinadas. EKF pode apresentar menor robustez a erros de modelagem e ruídos nas medidas, mas com estimativas rápidas (SUI; FENG; HOVD, 2008). MHE, por sua vez, é conhecido por ser mais robusto, mas com um custo computacional maior (HASELTINE; RAWLINGS, 2005).

Motivado por essas observações, foi proposto um método hierárquico EKF/MHE integrado ao DMC, de modo a solucionar os problemas de tempo computacional e robustez. O tempo computacional é um fator crítico para sistemas com dinâmica rápida. No caso dos cultivos de *E. coli*, a dinâmica do OD é da ordem de segundos devido à baixa solubilidade do oxigênio ( $\sim 7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) quando comparada com à sua taxa de consumo ( $\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , para uma concentração celular de  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (CAMPANI et al., 2017). Dessa forma, o atraso de tempos nas estimativas associado ao MHE pode prejudicar o controle do OD. O método EKF/MHE-MPC funciona de maneira hierárquica, no qual o MHE é ativado a cada  $\kappa$  iterações, como mostrado na Figura 6.1, visando à correção de possíveis erros de estimativas provenientes do EKF. Com essa estratégia, tem-se o monitoramento do processo com atraso de tempo menor vindo do EKF, combinado à robustez do MHE. A soma dos resíduos quadráticos (SRQ) (Equação 6.16) e a integral do erro quadrático (IEQ) (Equação 6.17) foram calculadas para avaliar e comparar quantitativamente o desempenho do método proposto com relação ao controle do OD e à estimativa das variáveis de estado, respectivamente.

$$SRQ = \sum \frac{(\hat{x} - \tilde{x})^2}{\tilde{x}} \quad (6.16)$$

$$IEQ = \sum (y - y_{sp})^2 \Delta t \quad (6.17)$$

onde  $\hat{x}$  e  $\tilde{x}$  são as estimativas dos estados e seus valores reais simulados, respectivamente,  $y$  e  $y_{sp}$  são as medidas do OD e os valores de *set point*, respectivamente, e  $\Delta t$  é o intervalo de amostragem.



**Figura 6.1.** Diagrama esquemático do método hierárquico EKF/MHE-DMC proposto para o processo de cultivo de *E. coli*.  $\kappa$  é o número de intervalos de amostragem ( $\Delta t$ ) entre ativações do MHE e  $z \in [0,1,2,3,\dots]$  determina os tempos de ativação do MHE.  $t$  é o tempo do processo.

Uma abordagem análoga foi reportada por Zhang e Liu (2013) a fim de reduzir o esforço computacional combinando o MHE com o controlador MPC baseado em Lyapunov. Além disso, é relatado também na literatura um controlador MPC hierárquico desenvolvido para problemas com dinâmicas lenta e rápida (PICASSO; ZHANG; SCATTOLINI, 2016). Já o trabalho de Farina, Ferrari-Trecate e Scattolini (2012) descreve o desenvolvimento de um estimador MHE distribuído capaz de lidar com informações de uma rede de sensores. No entanto, não há trabalhos envolvendo dois estimadores (EKF e MHE) integrados ao MPC, o que ressalta a novidade e a importância da estratégia EKF/MHE-DMC proposta aqui.

## 6.4 Resultados de implementação

Nesta seção são descritos os resultados da implementação dos estimadores de estado EKF e MHE integrados ao controlador DMC (EKF/MHE-DMC) formulado na seção 6.3 e aplicado em simulações do cultivo em batelada de *E. coli* no biorreator airlift. Para tal

implementação, foi usada a técnica de controle *split-range*, onde as variáveis de entrada são manipuladas sequencialmente para controlar o OD, uma de cada vez ( $\uparrow Q_{AR} \Rightarrow \uparrow P \Rightarrow \uparrow Q_{O_2}$  e  $\downarrow Q_{AR}$ ), de forma a reduzir os custos de operação, conforme o resultado da otimização dinâmica descrito no Capítulo 5. A temperatura do processo foi mantida constante, uma vez que a sua manipulação não propicia um controle preciso do OD na prática (CAMPANI et al., 2016). O valor escolhido para a temperatura foi de 32 °C, na qual houve a maior produção de PspA (veja Capítulo 3). Para o projeto do controlador DMC, foi usado um horizonte do modelo de 30, horizonte de previsão de 40 e horizonte de controle de 10 intervalos de amostragem, com base em regras gerais sugeridas na literatura (SEBORG et al., 2011). O valor dos elementos da diagonal da matriz de peso  $W$  foi de 1000, de forma a reduzir a magnitude da atuação nas variáveis de controle, tornando o DMC mais conservador. O MHE é ativado a cada 50 passos para corrigir a estimativas do EKF. O horizonte do MHE foi de 2, o qual foi capaz de fornecer boas estimativas com um período razoável de tempo (< 1 minuto). Horizontes mais longos aumentaram o tempo computacional, mas não melhoraram as estimativas. O problema de otimização não linear relacionado ao MHE (Equação 6.10) foi resolvido usando o algoritmo *fminsearch* disponível no MATLAB. O chute inicial para o método de otimização foi escolhido com sendo a simulação do modelo sem a adição de ruídos e assumindo conhecimento da condição inicial do processo, que pode ser determinada com maior exatidão à medida que mais medidas analíticas são obtidas no instante inicial.

Para a simulação do processo, foram utilizados os modelos desenvolvidos nos Capítulos 3 (Equações 3.7 e 3.13) e 4 (Equações 4.4-4.7), adicionando ruídos no processo e nas medidas. O ruído simulado do processo, decorrente da incerteza na constante de Monod ( $K_s$ ), possui média zero e covariância  $Q_k$  dada pela Equação 6.24. O ruído nas medidas, por sua vez, foram simulados com média zero e covariância  $R$ , que foi determinada experimentalmente pela dispersão dos dados reais de medidas de OD no processo.

$$Q_k = \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial K_s} \left[ \int_{t_{k-1}}^{t_k} f_1(x_{k-1}, u_{k-1}) dt \right] \\ \vdots \\ \frac{\partial}{\partial K_s} \left[ \int_{t_{k-1}}^{t_k} f_4(x_{k-1}, u_{k-1}) dt \right] \end{bmatrix} \sigma_{K_s}^2 \begin{bmatrix} \frac{\partial}{\partial K_s} \left[ \int_{t_{k-1}}^{t_k} f_1(x_{k-1}, u_{k-1}) dt \right] \\ \vdots \\ \frac{\partial}{\partial K_s} \left[ \int_{t_{k-1}}^{t_k} f_4(x_{k-1}, u_{k-1}) dt \right] \end{bmatrix} \quad (6.24)$$

onde  $f$  é o conjunto de equações diferenciais para os diferentes componentes do sistema ( $C_x, C_s, C_p$  e OD) e  $\sigma_{K_s}^2$  é a variância da estimativa do parâmetro  $K_s$  (veja Tabela 4.1).



Uma vez que o estimador proposto deve fornecer estimativas das quatro variáveis de estado ( $C_x, C_s, C_p$  e OD) a partir apenas da medida de OD, foi efetuado o teste de observabilidade usando aproximações lineares do modelo não linear do processo, como explicado na seção 6.2.1. A matriz de observabilidade  $O$  (Equação 6.3) apresentou posto completo para ambas as fases do cultivo (crescimento e indução), indicando que o sistema é localmente observável nas condições avaliadas. Considerando a natureza transitória dos processos em batelada, foi necessário realizar o teste de observabilidade para diferentes instantes da simulação.

A abordagem proposta (EKF/MHE-DMC) e o caso de referência – EKF combinado ao DMC (EKF-DMC) – foram testados frente a diferentes cenários:

- (i) mudança do *set point*: foram impostas variações degrau no valor de *set point* da concentração de OD, como mostram as Figuras 6.2 e 6.3;
- (ii) perturbação na entrada: variações não medidas de -20% foram adicionadas em  $Q_{ar}$ ,  $p$  e  $Q_{O_2}$  em diferentes momentos, como apontado nas Figuras 6.2 e 6.3. Essas perturbações refletem possíveis variações abruptas de pressão na linha de entrada de gás, por exemplo;
- (iii) desvio do modelo: ruído normal com média zero e variância  $\sigma_{K_s}^2$  foi adicionado à constante de Monod ( $K_s$ ) para a simulação do processo, mas mantendo o modelo do controlador com um valor de  $K_s$  constante;
- (iv) ruído na medida: a variância do ruído da medida foi elevada em 10 vezes durante 20 min em dois momentos do cultivo – ver Figures 6.2 and 6.3 – com um viés de -2% na média da concentração de OD lida pelo sensor.

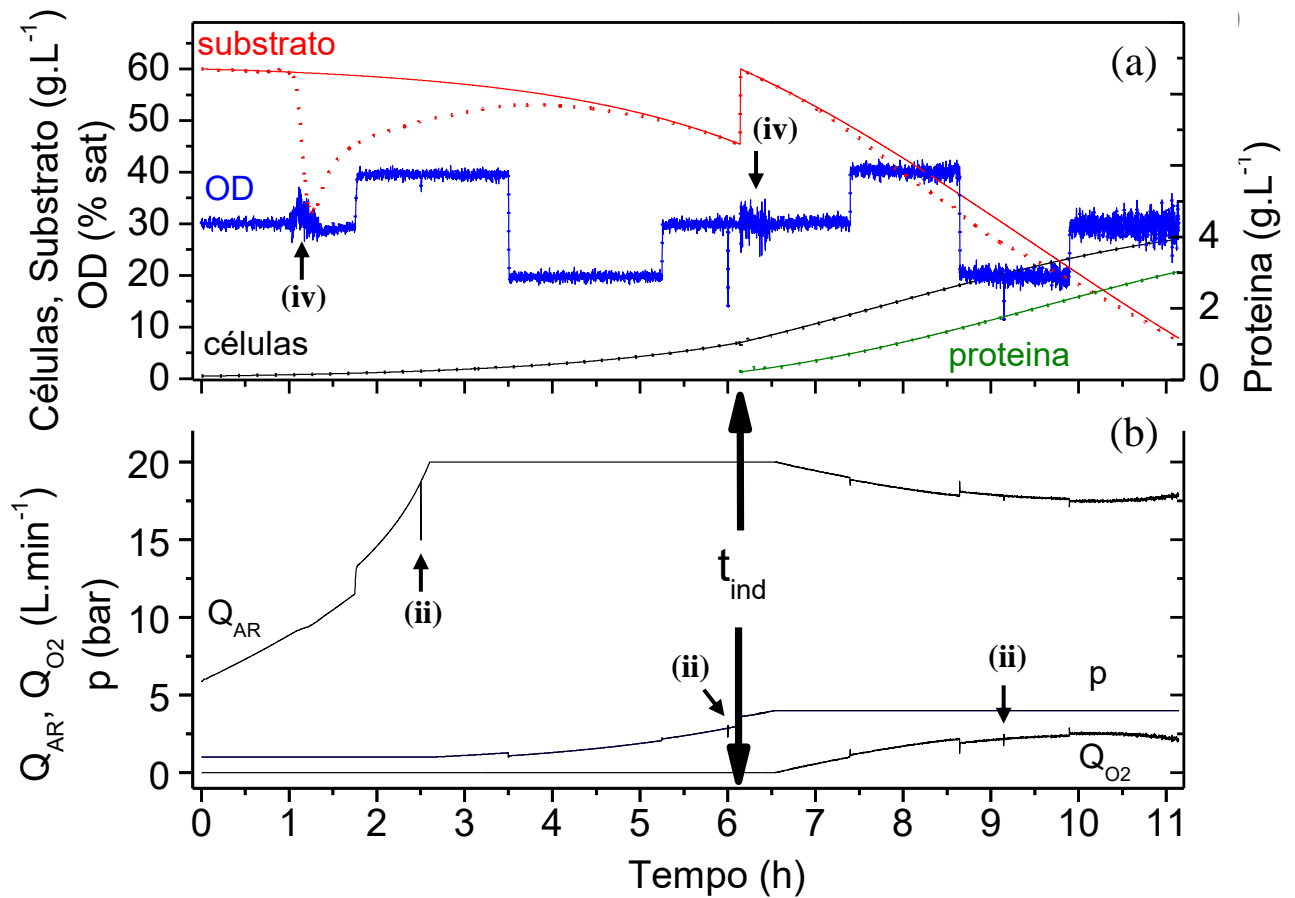
As Figuras 6.2 e 6.3 mostram os resultados da implementação do método de referência EKF-DMC e do método proposto EKF/MHE-DMC. A Tabela 6.2 apresenta os valores dos índices IEQ e SQR para avaliar quantitativamente o desempenho do controlador e do estimador de estados. Comparando os métodos EKF-DMC e EKF/MHE-DMC, pode-se verificar que a combinação do EKF com o MHE melhorou a estimativa dos estados, como mostra o valor significativamente menor de SQR (-84%) em comparação ao obtido para o EKF-DMC. Já a melhora de performance do controlador EKF/MHE-DMC, representada pelo índice IEQ, é menor, de aproximadamente 3%. Esses resultados podem ser explicados pela

pior estimativa de  $C_s$  no método de referência, que refletiu mais no desempenho do estimador do que do controlador. A variável  $C_s$  tem baixo impacto sobre as dinâmicas de  $C_x$  e OD (quando  $C_s \gg K_s$ ) e, portanto, sobre o controle do OD.

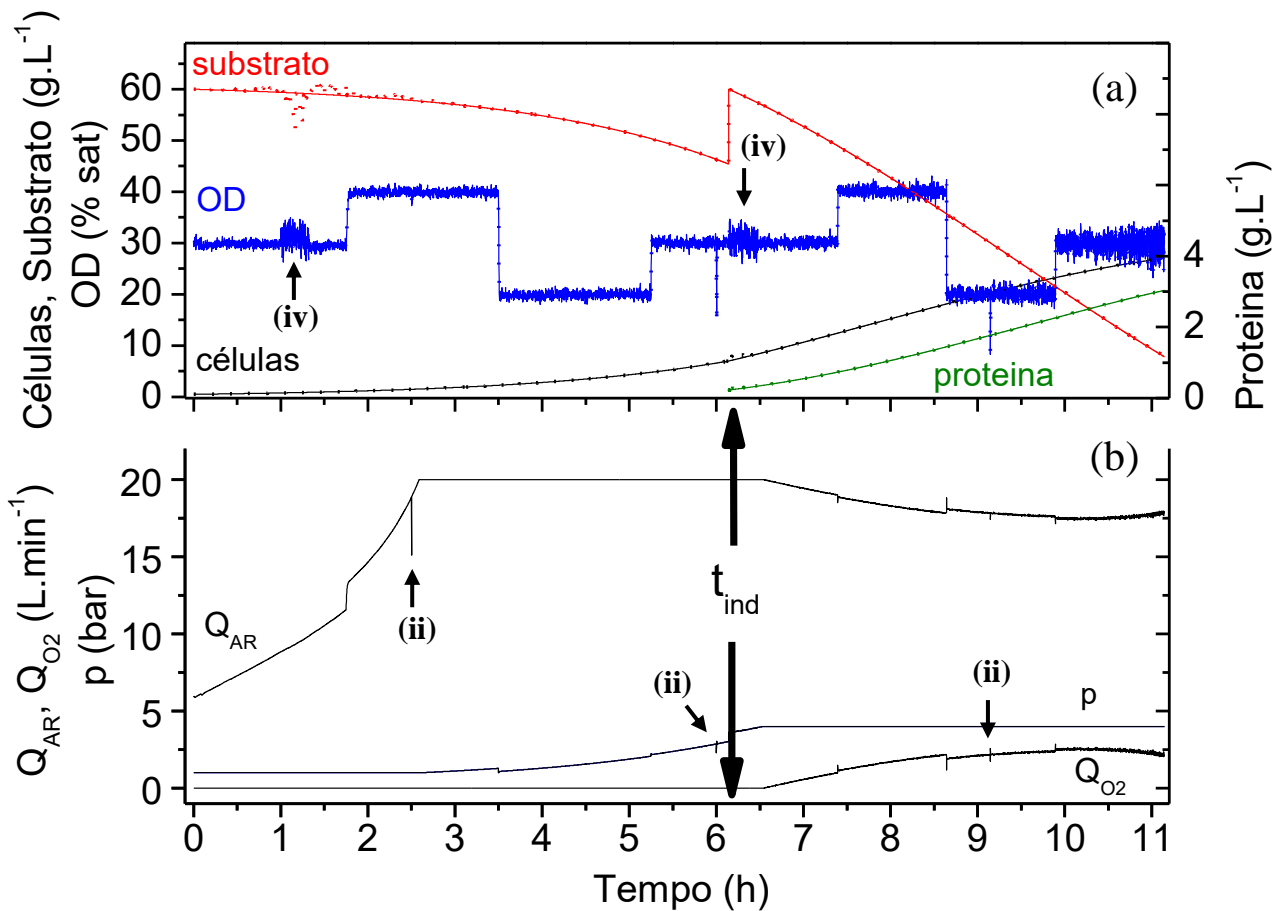
Dentre os cenários testados, o de ruído na medida do OD é o que apresenta maior influência sobre o desempenho do estimador, especialmente quando o método EKF-DMC é empregado. Isso é esperado, uma vez que o OD é a única variável medida que é usada para estimar todas as quatro variáveis de estado ( $C_x, C_s, C_p$ , e OD). Por outro lado, pode-se verificar a partir das Figuras 6.2 and 6.3 que ambos os métodos EKF-DMC e EKF/MHE-DMC são robustos frente a (i) variações no *set point*, (ii) perturbações não medidas na entrada e (iii) desvio do modelo.

**Tabela 6.1.** Medidas de desempenho IEQ e SQR para os métodos EKF-DMC e EKF/MHE-DMC.

Método	IEQ (controlador)				SQR (estimador)					
	Fase Cresc.		Ind.	Total	Total relativo	Fase Cresc.		Ind.	Total	Total relativo
EKF-DMC	7,15	+	8,53	= <b>15,68</b>	(100 %)	51,54	+	17,58	= <b>69,12</b>	(100 %)
EKF/MHE-DMC	6,78	+	8,48	= <b>15,26</b>	(97,3 %)	1,53	+	9,76	= <b>11,29</b>	(16,3 %)



**Figura 6.2.** Resultados (a) das saídas e (b) das entradas decorrentes da simulação da estratégia de referência EKF-DMC implementada para o controle do OD durante o cultivo de *E. coli* no biorreator airlift pressurizado frente aos cenários de (i) mudança do *set point* (indicado como variações degrau na concentração de OD), (ii) perturbações na entrada, (iii) incerteza no modelo implementada durante toda a simulação e (iv) ruído elevado na medida. Linhas sólidas se referem ao valor real das variáveis de estado simuladas e as linhas pontilhadas representam as estimativas pelo EKF.  $t_{ind}$  é o instante do início da fase de indução e da adição de substrato (glicerol). A temperatura foi mantida em 32 °C na simulação.



**Figura 6.3.** Resultados (a) das saídas e (b) das entradas decorrentes da simulação da estratégia de referência EKF/MHE-DMC implementada para o controle do OD durante o cultivo de *E. coli* no biorreator airlift pressurizado frente aos cenários de (i) mudança do *set point* (indicado como variações degrau na concentração de OD), (ii) perturbações na entrada, (iii) incerteza no modelo implementada durante toda a simulação e (iv) ruído elevado na medida. Linhas sólidas se referem ao valor real das variáveis de estado simuladas e as linhas pontilhadas representam as estimativas pelo EKF/MHE.  $t_{ind}$  é o instante do início da fase de indução e da adição de substrato (glicerol). A temperatura foi mantida em 32 °C na simulação.

## 6.5 Conclusões

No presente capítulo foi proposta uma nova estrutura de controle integrada a estimadores de estado para o controle do OD e monitoramento do cultivo de *E. coli* em biorreator airlift de 5 L. Essa estratégia combinou dois estimadores de estado, o EKF e o MHE, com o controlador preditivo DMC. Essa estrutura foi implementada em simulações do processo a partir dos modelos desenvolvidos nos Capítulos 3 e 4.

A estratégia de controle integrada a estimadores de estado (EKF/MHE-DMC) é composta pelo controlador DMC retroalimentado com estimativas das variáveis de estado fornecidas por dois estimadores (EKF e MHE) funcionando de forma hierárquica. O MHE é ativado a cada 50 passos no tempo, de modo a corrigir as estimativas provenientes do EKF. Desse modo, é possível melhorar as estimativas das quatro variáveis de estado ( $C_x$ ,  $C_s$ ,  $C_p$  e OD) a partir da medida apenas do OD, diminuindo o erro em ~84% em comparação ao método de referência – EKF combinado ao DMC (EKF-DMC). Entretanto, o desempenho do controlador foi satisfatório para ambos os métodos EKF-DMC e EKF/MHE-DMC frente os cenários de (i) variação no *set point*, (ii) perturbações não medidas na entrada, (iii) desvio do modelo e (iv) ruído na medida.

A estrutura avançada de controle proposta neste capítulo EKF/MHE-DMC apresenta robustez e baixo esforço computacional, contribuindo para o desenvolvimento da área de controle e monitoramento de processos. Essas características alcançadas através da estrutura EKF/MHE-DMC são essenciais para sistemas de controle com dinâmica rápida, como é o caso do controle do OD em bioprocessos aeróbios em batelada.

## Capítulo 7: Considerações Finais

O objetivo da presente tese foi otimizar o controle do oxigênio dissolvido (OD) em um reator pneumático do tipo airlift de bancada (5 L) pressurizado e avaliar a sua eficácia e eficiência em processo de produção de proteína recombinante (PspA) por *Escherichia coli*, que apresenta elevada demanda por oxigênio. Para tal finalidade, foi feita a otimização dinâmica do controle do OD com base nos modelos matemáticos do processo que, por sua vez, foram desenvolvidos a partir dos dados experimentais obtidos em cultivos em batelada, conduzidos tanto no reator tipo tanque agitado como no reator airlift. Finalmente, foi proposto e testado *in silico* um controlador avançado do OD, integrado a estimadores de estado.

Um modelo matemático caixa-cinza e simples foi desenvolvido para o processo, o qual foi capaz de descrever adequadamente as principais variáveis de estado do sistema (consumo e transferência de oxigênio, concentração celular e de substrato e produção de PspA) em condições diversas de temperatura e pressão. A otimização dinâmica do controle do OD, baseada nos modelos matemáticos do processo, resultaram em uma heurística de controle sequencial e bastante simples, válida para as duas fases do cultivo (crescimento e indução): manipulação da vazão de ar, seguida pela pressurização do sistema e, finalmente, o enriquecimento do gás de entrada com oxigênio puro. A temperatura ótima para o processo foi de 27 °C. Ou seja, mesmo com uma produção mais lenta de biomassa (células) e PspA a 27 °C, o menor gasto com a compressão do ar e com o oxigênio puro compensam, aumentando a eficiência do controlador (custo operacional por quantidade de produto). A heurística ótima foi então implementada *in silico* empregando controlador preditivo, associado a dois estimadores de estado (o filtro de Kalman estendido e o estimador de horizonte móvel). O controlador apresentou robustez frente a cenários de variação no *set point*, perturbações nas variáveis de entrada, imprecisão paramétrica do modelo e ruídos na medida do OD. Os observadores de estado foram capazes ainda de estimar as quatro variáveis de estado (concentrações celular, de substrato, de PspA e de OD) com base apenas na medida de OD, se mostrando uma opção interessante e acessível para monitorar em tempo real as principais variáveis do cultivo celular, contando apenas com um sensor de OD, amplamente difundido nos biorreatores industriais e de laboratório.

Em suma, os resultados obtidos até o momento demonstram a possibilidade de se manipular uma grande diversidade de variáveis operacionais (vazões de ar e oxigênio puro,

temperatura e pressão) para o controle do OD em biorreator airlift. Esse fato contribui, portanto, para a área de desenvolvimento de reatores pneumáticos, propiciando ganho significativo de eficiência na operação de transferência de oxigênio. Além do ganho de eficiência, há também o desenvolvimento de estimadores de estado e controladores robustos, cada vez mais necessários no contexto de produção de proteínas terapêuticas, que possuem elevado valor agregado.

Devido ao amplo de pesquisa envolvendo o desenvolvimento de biorreatores não convencionais e controladores do OD, há algumas sugestões para trabalhos futuros, como:

- otimização global do processo de cultivo de *E. coli* para a produção de proteínas recombinantes, de forma a determinar a melhor estratégia de cultivo (momento de indução, tempo de cultivo, alimentação de substrato, etc.);
- implementação em laboratório do sistema de controle do OD associado aos estimadores de estado, de forma a avaliar sua eficácia em condições reais de processo;
- avaliar o desempenho econômico do reator airlift (pressurizado), em comparação com o reator convencional (sem pressurização), na produção de PspA em batelada.

## Referências

- ABDOLLAHI, J.; DUBLJEVIC, S. Lipid production optimization and optimal control of heterotrophic microalgae fed-batch bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 84, p. 619–627, 2012.
- AKYUREK, E. et al. Comparison of control strategies for dissolved oxygen control in activated sludge wastewater treatment process. In: [s.l: s.n.]. v. 1p. 1197–1201.
- ALVES, S. S.; VASCONCELOS, J. M. T. Optimisation of agitation and aeration in fermenters. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 3, p. 119–123, fev. 1996.
- BABAEIPOUR, V. et al. Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 112–117, jan. 2007.
- BASTIN, D.; DOCHAIN, G. **On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors**. 1. ed. Amsterdam: [s.n.].
- BELO, I.; PINHEIRO, R.; MOTA, M. Fed-batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 665–671, 4 abr. 2003.
- BENTLEY, W. E.; DAVIS, R. H.; KOMPALA, D. S. Dynamics of induced CAT expression in *E. coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 7, p. 749–760, 5 out. 1991.
- BEQUETTE, B. W. **Process Control: Modeling, Design and Simulation**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2003.
- BEWTRA, J. K.; NICHOLAS, W. R.; POLKOWSKI, L. B. Effect of temperature on oxygen transfer in water. **Water Research**, v. 4, n. 1, p. 115–123, jan. 1970.
- BHATTACHARYA, S. K.; DUBEY, A. K. Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 5, p. 355–360, abr. 1997.
- BOOGERD, F. C. et al. Oxygen and carbon dioxide mass transfer and the aerobic, autotrophic cultivation of moderate and extreme thermophiles: A case study related to the microbial desulfurization of coal. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 11, p. 1111–1119, maio 1990.
- BRANCH, M. A.; COLEMAN, T. F.; LI, Y. A subspace, interior, and conjugate gradient



- method for large-scale bound-constrained minimization problems. **SIAM Journal on Scientific Computing**, v. 21, n. 1, p. 1–23, jan. 1999.
- BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92–100, mar. 2013.
- CAMPANI, G. et al. Oxygen transfer in a pressurized airlift bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1559–1567, 23 ago. 2015.
- CAMPANI, G. et al. Recombinant protein production by engineered Escherichia coli in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 103, p. 63–69, maio 2016.
- CAMPANI, G. et al. Recombinant Escherichia coli cultivation in a pressurized airlift bioreactor: assessment of the influence of temperature on oxygen transfer and uptake rates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, 2017.
- CANALES, M. et al. Bioprocess design and economics of recombinant BM86/BM95 antigen production for anti-tick vaccines. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 1, p. 79–90, out. 2010.
- CERRI, M. O. et al. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 51–57, abr. 2008.
- CERRI, M. O. et al. A new approach for kLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 12, p. 3061–3069, dez. 2016.
- CHAE, H. J. et al. Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell-density Escherichia coli cultures using GFP-fusion monitoring. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 3, p. 275–285, 5 ago. 2000.
- CHEN, T.; KIRKBY, N. F.; JENA, R. Optimal dosing of cancer chemotherapy using model predictive control and moving horizon state / parameter estimation. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 8, p. 973–983, 2012.
- CHEN, X.; WANG, Q.; SREBRIC, J. Model predictive control for indoor thermal comfort and energy optimization using occupant feedback. **Energy and Buildings**, v. 102, p. 357–369, set. 2015.

- CHENG, G. et al. Robust Optimal Control of a Microbial Batch Culture Process. **Journal of Optimization Theory and Applications**, p. 342–362, 2015.
- CHISTI, M. Y. **Airlift Bioreactors**. 1. ed. London: Elsevier, 1989.
- CHOTKOWSKI, W.; BRDYS, M. A.; KONARCZAK, K. Dissolved oxygen control for activated sludge processes. **International Journal of Systems Science**, v. 36, n. 12, p. 727–736, 10 out. 2005.
- DANIIL, E. I.; GULLIVER, J. S. Temperature dependence of liquid film coefficient for gas transfer. **Journal of Environmental Engineering**, v. 114, n. 5, p. 1224–1229, out. 1988.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, maio 2009.
- EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 530–536, 2006.
- EL BAHJA, H.; VEGA CRUZ, P. I.; REVOLLAR, S. A closed Loop Paradigm for NLGPC with Constraints on Control Variables. **2012 World Automation Congress (Wac)**, n. I, p. 1–6, 2012.
- FARINA, M.; FERRARI-TRECATE, G.; SCATTOLINI, R. Distributed moving horizon estimation for nonlinear constrained systems. **Int. J. Robust. Nonlinear Control**, v. 22, p. 123–143, 2012.
- FDA. **Guidance for industry PAT - a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance**, 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>>
- FEEHERY, W. F. **Dynamic Optimization with Path Constraints**. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 1998.
- GALVANAUSKAS, V. et al. Design of recombinant protein production processes. **Chemical Engineering Communications**, v. 191, n. 5, p. 732–748, maio 2004.
- GARCÍA-ARRAZOLA, R. et al. Evaluation of a pH-stat feeding strategy on the production and recovery of Fab' fragments from E. coli. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 221–230, maio 2005.

- GARCIA-OCHOA, F. et al. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 289–307, 2010.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009.
- GAVRILESCU, M.; ROMAN, R. V. Performance of airlift bioreactors in the cultivation of some antibiotic producing microorganisms. **Acta Biotechnologica**, v. 18, n. 3, p. 201–229, 1998.
- GLICK, B. R. Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 247–261, jan. 1995.
- GNOTH, S. et al. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 1, p. 21–39, 5 jan. 2008.
- HABIBULLAH, M.; LU, D. D.-C. A Speed-Sensorless FS-PTC of Induction Motors Using Extended Kalman Filters. **IEEE Transactions on Industrial Electronics**, v. 62, n. 11, p. 6765–6778, nov. 2015.
- HASELTINE, E. L.; RAWLINGS, J. B. Critical Evaluation of Extended Kalman Filtering and Moving-Horizon Estimation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 8, p. 2451–2460, abr. 2005.
- HEIJNEN, S. J. et al. Large-scale anaerobic/aerobic treatment of complex industrial wastewater using immobilized biomass in fluidized bed and air-lift suspension reactors. **Chemical Engineering & Technology - CET**, v. 13, n. 1, p. 202–208, 1990.
- HENSON, M. A.; SEBORG, D. E. **Nonlinear Process Control**. 1. ed. UpperSaddle River, NJ: Prentice Hall, 1996.
- HIMMELBLAU, D. M. **Process analysis by statistical methods**. New York: John Wiley & Sons Inc, 1970.
- HITCHMAN, M. L. **Measurement of dissolved oxygen**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1978.
- HO, P. L. et al. Economical value of vaccines for the developing countries — the case of Instituto Butantan, a public institution in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. e1300, 29 nov. 2011.

- HORTA, A. C. L. et al. Intensification of high cell-density cultivations of rE. coli for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1269–1280, 3 out. 2012.
- HORTA, A. C. L. et al. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 457–468, jun. 2014.
- HUANG, T.-K.; MCDONALD, K. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 168–184, ago. 2009.
- JANARDHAN, S. et al. Production, purification and diagnostic application of filarial recombinant protein WbSXP-1 expressed in salt inducible *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 675–683, 10 set. 2007.
- JUNKER, B. et al. Sustainable reduction of bioreactor contamination in an industrial fermentation pilot plant. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 251–268, 2006.
- KHALILZADEH, R. et al. Process development for production of recombinant human interferon-gama expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 63–69, 1 fev. 2004.
- KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 63–67, jan. 1997.
- KNABBEN, I. et al. High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 73–79, 1 out. 2010.
- KNOLL, A. et al. The Oxygen Mass Transfer, Carbon Dioxide Inhibition, Heat Removal, and the Energy and Cost Efficiencies of High Pressure Fermentation. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [s.l: s.n.]. v. 92p. 77–99.
- KNOLL, A. et al. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. **Journal of**

- Biotechnology**, v. 132, n. 2, p. 167–179, out. 2007.
- KOMIVES, C.; PARKER, R. S. Bioreactor state estimation and control. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 468–474, out. 2003.
- KOOKOS, I. K. Optimization of Batch and Fed-Batch Bioreactors using Simulated Annealing. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 4, p. 1285–1288, 6 ago. 2004.
- KORZ, D. J. et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 59–65, fev. 1995.
- KRAHE, M.; ANTRANIKIAN, G.; MÄRKLE, H. Fermentation of extremophilic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2–3, p. 271–285, maio 1996.
- KREYENSCHULTE, D. et al. Computational minimization of the specific energy demand of large-scale aerobic fermentation processes based on small-scale data. **Chemical Engineering Science**, v. 153, p. 270–283, out. 2016.
- KUPRIJANOV, A. et al. Advanced control of dissolved oxygen concentration in fed batch cultures during recombinant protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 221–229, 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LANGE, H.; TAILLANDIER, P.; RIBA, J.-P. Effect of high shear stress on microbial viability. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 501–505, maio 2001.
- LEUNG, S. M. et al. Air/water oxygen transfer in a biological aerated filter. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 2, p. 181–189, 2006.
- LEVISAUSKAS, D. et al. Model-based optimization of viral capsid protein production in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, n. 4, p. 255–262, jan. 2003.
- LI, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lactose-induced Production of Human Soluble B Lymphocyte Stimulator (hsBLyS) in *E. coli* with Different Culture Strategies. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 7, p. 477–483, abr. 2006.
- LINEK, V.; BENES, P.; VACEK, V. Dynamic pressure method for k<sub>La</sub> measurement in

- large-scale bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 11, p. 1406–1412, maio 1989.
- LIU, C. et al. Modelling and optimal control for a fed-batch fermentation process. **Applied Mathematical Modelling**, v. 37, n. 3, p. 695–706, fev. 2013.
- LOPES, M.; MOTA, M.; BELO, I. Oxygen mass transfer rate in a pressurized lab-scale stirred bioreactor. **Chemical Engineering and Technology**, v. 36, n. 10, p. 1779–1784, 2013.
- MA, X. et al. Oxygen transfer rate control in the production of human-like collagen by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 55, n. 4, p. 169–174, 19 mar. 2010.
- MAFRA, A. C. O. et al. Gluconic acid production from sucrose in an airlift reactor using a multi-enzyme system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 4, p. 671–680, 19 abr. 2015.
- MARÉ, L. et al. A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 14, p. 983–990, jul. 2005.
- MATSUI, T. et al. High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 920–924, abr. 2006.
- MEYENBURG, K. V. O. N.; ANDERSEN, K. B. Are Growth Rates of *Escherichia coli* in Batch Cultures Limited by Respiration? **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 1, p. 114–123, 1980.
- MIAO, F.; KOMPALA, D. S. Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 7, p. 787–796, 5 out. 1992.
- MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 18, p. 3303–3326, 2013.
- MOHD ALI, J. et al. Review and classification of recent observers applied in chemical process systems. **Computers & Chemical Engineering**, v. 76, p. 27–41, maio 2015.
- MORENO, A. T. et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and

- cross-protection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 439–446, 2010.
- NELLES, O. **Nonlinear System Identification**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.
- NEUBAUER, P.; LIN, H. Y.; MATHISZIK, B. Metabolic load of recombinant protein production: Inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 53–64, 5 jul. 2003.
- OGATA, K. **Modern Control Engineering**. 5. ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2010.
- ONKEN, U.; LEIFKE, E. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 40, p. 137–169, 1989.
- PERCIANI, C. T. et al. Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 858–866, 1 jun. 2013.
- PICASSO, B.; ZHANG, X.; SCATTOLINI, R. Automatica Hierarchical Model Predictive Control of independent systems with. **Automatica**, v. 74, p. 99–106, 2016.
- POCCIA, M. E.; BECCARIA, A. J.; DONDO, R. G. Modeling the microbial growth of two *Escherichia coli* strains in a multi-substrate environment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 347–354, jun. 2014.
- POLING, B. E. et al. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. [s.l.: s.n.].
- QUICKER, G. et al. Comparison of measured and calculated oxygen solubilities in fermentation media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 3, p. 635–650, mar. 1981.
- QUINTERO, S. A. P.; COPP, D. A.; HESPANHA, J. P. Robust UAV coordination for target tracking using output-feedback model predictive control with moving horizon estimation. **Proceedings of the American Control Conference**, v. 2015–July, p. 3758–3764, 2015.
- RAMIREZ, W. F. **Process control and identification**. Boston: Academic Press, 1994.

- RAO, C. V.; RAWLINGS, J. B. Constrained process monitoring: Moving-horizon approach. **AIChE Journal**, v. 48, n. 1, p. 97–109, 2002.
- RAWLINGS, J. B.; MAYNE, D. Q. **Model Predictive Control: Theory and Design**. Madison: Nob Hill Publishing, LLC, 2013.
- RIBEIRO, M. P. DE A.; GIORDANO, R. D. C. Variational calculus (optimal control) applied to the optimization of the enzymatic synthesis of ampicillin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. spe, p. 19–28, jun. 2005.
- ROCHA, M. et al. Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms. **Expert Systems with Applications**, v. 41, n. 5, p. 2186–2195, abr. 2014.
- RODRIGUES, J. A. D.; MACIEL FILHO, R. Production optimization with operating constraints for a fed-batch reactor with DMC predictive control. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 13–14, p. 2745–2751, 1999.
- RUIZ, J. et al. A semiempirical model to control the production of a recombinant aldolase in high cell density cultures of Escherichia coli. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 2, p. 82–91, jul. 2011.
- SAGAN, C. **Cosmos**. Barcelona: Planeta, 1980.
- SAGMEISTER, P. et al. A dynamic method for the investigation of induced state metabolic capacities as a function of temperature. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 94, 2013.
- SCHUMPE, A.; QUICKER, G.; DECKWER, W.-D. Gas solubilities in microbial culture media. In: **Reaction Engineering, Advances in Biochemical Engineering**. [s.l.: s.n.], v. 24p. 1–38.
- SEBORG, E. D. et al. **Process Dynamics and Control**. 3. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2011.
- SHIELDS, R. W.; KAO, E. I. An energy cost minimizing strategy for fermentation dissolved oxygen control. **Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 2, p. 91–97, fev. 1994.
- SHILOACH, J.; FASS, R. Growing E. coli to high cell density - A historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 5, p. 345–357, 2005.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.



- SILVA, A. et al. Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in rE. coli fed-batch cultures. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 322, 2013.
- SIMUTIS, R.; LÜBBERT, A. Bioreactor control improves bioprocess performance. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 8, p. 1115–1130, 2015.
- SINGH, V. et al. Scaleup and Optimization of Oxygen Transfer in Fermentors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 589, n. 1 Biochemical E, p. 616–641, maio 1990.
- SOMMER, C.; VOLK, N.; PIETZSCH, M. Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 77, n. 1, p. 9–19, maio 2011.
- SRINIVASAN, B.; PALANKI, S.; BONVIN, D. Dynamic optimization of batch processes. **Computers & Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 1–26, jan. 2003.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, maio 2005.
- SUI, D.; FENG, L.; HOVD, M. Robust Output Feedback Model Predictive Control for Linear Systems via Moving Horizon Estimation. **American Control Conference**, n. 978, p. 453–458, 2008.
- TEBBANI, S.; DUMUR, D.; HAFIDI, G. Open-loop optimization and trajectory tracking of a fed-batch bioreactor. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 11, p. 1933–1941, out. 2008.
- THOLUDUR, A.; RAMIREZ, W. F. Neural-network modeling and optimization of induced foreign protein production. **AIChE Journal**, v. 45, n. 8, p. 1660–1670, ago. 1999.
- TIAN, H. et al. Optimization of auto-induction medium for G-CSF production by Escherichia coli using artificial neural networks coupled with genetic algorithm. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 505–513, 7 mar. 2013.
- Transparency Market Research.** Disponível em: <http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/biotechnology-market.htm>. Acesso em: 2 ago. 2016.
- VASSILIADIS, V. **Computational solution of dynamic optimization problems with**

**general differential-algebraic constraints.** [s.l.] Technology Imperial College of Science, Technology and Medicine, 1993.

VÉLEZ, A. M. et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 6, 2014.

VOGELAAR, J. C. T. et al. Research note temperature effects on the oxygen transfer rate between 20 and 55°C. **Water Research**, v. 34, n. 3, p. 1037–1041, 2000.

VOJINOVIĆ, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Real-time bioprocess monitoring. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 2, p. 1083–1091, abr. 2006.

WAEGEMAN, H.; SOETAERT, W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1891–1910, 8 dez. 2011.

WANG, Y. et al. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 989–995, nov. 2009.

WEINER, M. et al. Fed-batch production of l-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 62–69, fev. 2014.

YANG, J. D.; WANG, N. S. Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 3, p. 244–251, maio 1992.

ZHANG, J.; LIU, J. Lyapunov-Based MPC with Robust Moving Horizon Estimation and its Triggered Implementation. **AIChE Journal**, v. 59, n. 11, p. 4273–4286, 2013.

ZOBELL, C. E.; JOHNSON, F. H. The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 179–189, 1949.

ZWIETERING, M. H.; VERLAAN, P.; KROLIKOWSKI, A. K. M. Optimal control of the dissolved oxygen concentration in an airlift-loop reactor. **Computers & Chemical Engineering**, v. 16, n. 6, p. 563–572, jun. 1992.

# Apêndice A: Cálculo Analítico das Derivadas Parciais do Problema de Otimização Dinâmica

A resolução do equacionamento característico do Princípio do Mínimo de Pontryagin (PMP) demanda o cálculo de derivadas parciais com relação ao estado ( $\underline{x}$ ) –  $[C_x; COP; T]$  (fase de crescimento) ou  $[C_x; C_p; COP; T]$  (fase de indução) – e às variáveis de controle ( $\underline{u}$ ) –  $[Q_{ar}^{(2)}; Q_{O_2}^{(2)}; T_{sp}]$ . Na presente tese, optou-se por realizar essa operação analiticamente, a fim de reduzir o esforço computacional durante o procedimento de otimização. Segue abaixo a demonstração dos cálculos realizados com base nos modelos matemáticos das fases de crescimento celular e de indução da produção da proteína recombinante.

## Fase de crescimento

Da formulação PMP (Capítulo 5 – seção 5.3.2.1), faz-se necessário o cálculo das seguintes derivadas parciais:

$$\left(\frac{\partial f}{\partial \underline{x}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_3}{\partial x_1} \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \frac{\partial f_3}{\partial x_2} \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_3} & \frac{\partial f_2}{\partial x_3} & \frac{\partial f_3}{\partial x_3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_\mu x_3 + b_\mu & \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ a_\mu x_1 & \frac{\partial f_2}{\partial x_3} & -k_T \end{bmatrix} \quad (\text{A.1})$$

$$\left(\frac{\partial f}{\partial \underline{u}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial u_1} & \frac{\partial f_2}{\partial u_1} & \frac{\partial f_3}{\partial u_1} \\ \frac{\partial f_1}{\partial u_2} & \frac{\partial f_2}{\partial u_2} & \frac{\partial f_3}{\partial u_2} \\ \frac{\partial f_1}{\partial u_3} & \frac{\partial f_2}{\partial u_3} & \frac{\partial f_3}{\partial u_3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & \frac{\partial f_2}{\partial u_1} & 0 \\ 0 & \frac{\partial f_2}{\partial u_2} & 0 \\ 0 & 0 & k_T \end{bmatrix} \quad (\text{A.2})$$

$$\left(\frac{\partial S^2}{\partial \underline{x}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial S_1^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_1} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_2} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_3} \end{bmatrix} = 2 \begin{bmatrix} 0 & 0 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial x_1} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial x_1} \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial x_3} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial x_3} \end{bmatrix} \quad (\text{A.3})$$

$$\left(\frac{\partial \underline{S}^2}{\partial \underline{u}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial S_1^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_1} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_2} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_3} \end{bmatrix} = 2 \begin{bmatrix} -S_1 & S_2 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial u_1} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial u_1} \\ -S_1 & S_2 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial u_2} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial u_2} \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.4})$$

onde

$$\frac{\partial f_2}{\partial x_1} = \left(\frac{\partial p_2}{\partial x_1}\right) \left\{ \left(\frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1}\right) + \left(\frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1}\right) \left[ \left(\frac{\gamma}{\gamma-1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} \quad (\text{A.5})$$

$$\frac{\partial f_2}{\partial x_3} = \left(\frac{\partial p_2}{\partial x_3}\right) \left\{ \left(\frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1}\right) + \left(\frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1}\right) \left[ \left(\frac{\gamma}{\gamma-1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} \quad (\text{A.6})$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial f_2}{\partial u_1} = & \left(\frac{\partial p_2}{\partial u_1}\right) \left\{ \left(\frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1}\right) + \left(\frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1}\right) \left[ \left(\frac{\gamma}{\gamma-1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} + \\ & \left(\frac{\alpha_{ar} p_2}{\eta_c p_1}\right) \left(\frac{\gamma}{\gamma-1}\right) \left[ \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} - 1 \right] \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

$$\frac{\partial f_2}{\partial u_2} = \left(\frac{\partial p_2}{\partial u_2}\right) \left\{ \left(\frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1}\right) + \left(\frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1}\right) \left[ \left(\frac{\gamma}{\gamma-1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left(\frac{p_2}{p_1}\right) \left(\frac{p_2+1}{p_1}\right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} + \alpha_{O_2} \left(\frac{p_2}{p_1}\right)$$

(A.8)

e

$$\frac{\partial p_2}{\partial x_1} = p_1 0,21 \left(\frac{u_1+u_2}{0,21u_1+u_2}\right) \frac{q_{O_2}}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \quad (\text{A.9})$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial x_3} = \left(\frac{p_1 0,21}{k_L a \cdot C_{O_2}^*}\right) \left(\frac{u_1+u_2}{0,21u_1+u_2}\right) \left\{ \left(\frac{a_\mu}{Y x} + 3a_q x_3^2\right) x_1 - q_{O_2} x_1 \left[ \ln \theta + \frac{0,86(b+2cx_3+3dx_3^2+4ex_3^3)}{10^3 C_{O_2}^*} \right] \right\} \quad (\text{A.10})$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial u_1} = p_1 0,21 \left\{ \left(\frac{u_1+u_2}{0,21u_1+u_2}\right) \left[ \frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \frac{e^{b_k(\Phi-c_k)}}{1+e^{b_k(\Phi-c_k)}} \frac{b_k}{V} \right] + \left(\frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} + 0,3\right) \frac{0,79 u_2}{(0,21u_1+u_2)^2} \right\} \quad (\text{A.11})$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial u_2} = p_1 0,21 \left\{ \left(\frac{u_1+u_2}{0,21u_1+u_2}\right) \left[ \frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \frac{e^{b_k(\Phi-c_k)}}{1+e^{b_k(\Phi-c_k)}} \frac{b_k}{V} \right] - \left(\frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} + 0,3\right) \frac{0,79 u_1}{(0,21u_1+u_2)^2} \right\} \quad (\text{A.12})$$

### Fase de indução

Com base na formulação PMP para a fase de indução (Capítulo 5 – seção 5.3.2.2), temos que avaliar as seguintes derivadas parciais:

$$\left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{x}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_3}{\partial x_1} & \frac{\partial f_4}{\partial x_1} \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \frac{\partial f_3}{\partial x_2} & \frac{\partial f_4}{\partial x_2} \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_3} & \frac{\partial f_2}{\partial x_3} & \frac{\partial f_3}{\partial x_3} & \frac{\partial f_4}{\partial x_3} \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_4} & \frac{\partial f_2}{\partial x_4} & \frac{\partial f_3}{\partial x_4} & \frac{\partial f_4}{\partial x_4} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_3}{\partial x_1} & 0 \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \frac{\partial f_3}{\partial x_2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_4} & \frac{\partial f_2}{\partial x_4} & \frac{\partial f_3}{\partial x_4} & -k_T \end{bmatrix} \quad (\text{A.13})$$

$$\left(\frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{u}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial u_1} & \frac{\partial f_2}{\partial u_1} & \frac{\partial f_3}{\partial u_1} & \frac{\partial f_4}{\partial u_1} \\ \frac{\partial f_1}{\partial u_2} & \frac{\partial f_2}{\partial u_2} & \frac{\partial f_3}{\partial u_2} & \frac{\partial f_4}{\partial u_2} \\ \frac{\partial f_1}{\partial u_3} & \frac{\partial f_2}{\partial u_3} & \frac{\partial f_3}{\partial u_3} & \frac{\partial f_4}{\partial u_3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \frac{\partial f_3}{\partial u_1} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial f_3}{\partial u_2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_T \end{bmatrix} \quad (\text{A.14})$$

$$\left(\frac{\partial S^2}{\partial \underline{x}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial S_1^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_1} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_1} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_2} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_2} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_3} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_3} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial x_4} & \frac{\partial S_2^2}{\partial x_4} & \frac{\partial S_3^2}{\partial x_4} & \frac{\partial S_4^2}{\partial x_4} \end{bmatrix} = 2 \begin{bmatrix} 0 & 0 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial x_1} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial x_1} \\ 0 & 0 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial x_2} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial x_2} \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial x_4} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial x_4} \end{bmatrix} \quad (\text{A.15})$$

$$\left(\frac{\partial S^2}{\partial \underline{u}}\right)^T = \begin{bmatrix} \frac{\partial S_1^2}{\partial u_1} & \frac{\partial S_2^2}{\partial u_1} & \frac{\partial S_3^2}{\partial u_1} & \frac{\partial S_4^2}{\partial u_1} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial u_2} & \frac{\partial S_2^2}{\partial u_2} & \frac{\partial S_3^2}{\partial u_2} & \frac{\partial S_4^2}{\partial u_2} \\ \frac{\partial S_1^2}{\partial u_3} & \frac{\partial S_2^2}{\partial u_3} & \frac{\partial S_3^2}{\partial u_3} & \frac{\partial S_4^2}{\partial u_3} \end{bmatrix} = 2 \begin{bmatrix} -S_1 & S_3 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial u_1} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial u_1} \\ -S_1 & S_3 & -S_3 \frac{\partial p_2}{\partial u_2} & S_4 \frac{\partial p_2}{\partial u_2} \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{A.16})$$

onde

$$\frac{\partial f_1}{\partial x_1} = (\mu - k_d) + x_1 \frac{\partial \mu}{\partial x_1} \quad (\text{A.17})$$

$$\frac{\partial f_1}{\partial x_2} = x_1 \frac{\partial \mu}{\partial x_2} \quad (\text{A.18})$$

$$\frac{\partial f_1}{\partial x_4} = x_1 \left( \frac{\partial \mu}{\partial x_4} - a_{kd} \right) \quad (\text{A.19})$$

$$\frac{\partial f_2}{\partial x_1} = \mu_p + x_1 \frac{\partial \mu_p}{\partial x_1} \quad (\text{A.20})$$

$$\frac{\partial f_2}{\partial x_2} = x_1 \frac{\partial \mu_p}{\partial x_2} \quad (\text{A.21})$$

$$\frac{\partial f_2}{\partial x_4} = x_1 \frac{\partial \mu_p}{\partial x_4} \quad (\text{A.22})$$

$$\frac{\partial f_3}{\partial x_1} = \left( \frac{\partial p_2}{\partial x_1} \right) \left\{ \left( \frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1} \right) + \left( \frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1} \right) \left[ \left( \frac{\gamma}{\gamma-1} \right) \left( \frac{p_2+1}{p_1} \right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left( \frac{p_2}{p_1} \right) \left( \frac{p_2+1}{p_1} \right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} \quad (A.23)$$

$$\frac{\partial f_3}{\partial x_2} = \left( \frac{\partial p_2}{\partial x_2} \right) \left\{ \left( \frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1} \right) + \left( \frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1} \right) \left[ \left( \frac{\gamma}{\gamma-1} \right) \left( \frac{p_2+1}{p_1} \right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left( \frac{p_2}{p_1} \right) \left( \frac{p_2+1}{p_1} \right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} \quad (A.24)$$

$$\frac{\partial f_3}{\partial x_4} = \left( \frac{\partial p_2}{\partial x_4} \right) \left\{ \left( \frac{\alpha_{O_2} u_2}{p_1} \right) + \left( \frac{\alpha_{ar} u_1}{\eta_c p_1} \right) \left[ \left( \frac{\gamma}{-1} \right) \left( \frac{p_2+1}{p_1} \right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} + \left( \frac{p_2}{p_1} \right) \left( \frac{p_2+1}{p_1} \right)^{-\frac{1}{\gamma}} - 1 \right] \right\} \quad (A.24)$$

e

$$\frac{\partial \mu_p}{\partial x_1} = \frac{\partial \mu}{\partial x_1} \left( \frac{x_2}{x_1} \right) - \mu \left( \frac{x_2}{x_1^2} \right) + \frac{1}{T_{px}} \left( k_m \frac{\partial \mu}{\partial x_1} + \frac{x_2}{x_1^2} \right) \quad (A.25)$$

$$\frac{\partial \mu_p}{\partial x_2} = \frac{\partial \mu}{\partial x_2} \left( \frac{x_2}{x_1} \right) + \mu \left( \frac{1}{x_1} \right) + \frac{1}{T_{px}} \left( k_m \frac{\partial \mu}{\partial x_2} - \frac{1}{x_1} \right) \quad (A.26)$$

$$\frac{\partial \mu_p}{\partial x_4} = \frac{\partial \mu}{\partial x_4} \left( \frac{x_2}{x_1} + \frac{k_m}{T_{px}} \right) \quad (A.27)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial x_1} = \mu \cdot \beta \frac{x_2}{x_1^2} (x_4 - T_{ref}) \quad (A.28)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial x_2} = -\mu \frac{\beta}{x_1} (x_4 - T_{ref}) \quad (A.29)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial x_4} = a_\mu \exp \left[ -\beta \frac{x_2}{x_1} (x_4 - T_{ref}) \right] - \mu \cdot \beta \frac{x_2}{x_1} \quad (A.30)$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial x_1} = p_1 0,21 \left( \frac{u_1 + u_2}{0,21 u_1 + u_2} \right) \left[ \frac{q_{O_2} + \left( \frac{x_1}{Y_{x/O_2}} \right) \frac{\partial \mu}{\partial x_1}}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \right] \quad (A.31)$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial x_2} = p_1 0,21 \left( \frac{u_1 + u_2}{0,21 u_1 + u_2} \right) \left[ \frac{\left( \frac{x_1}{Y_{x/O_2}} \right) \frac{\partial \mu}{\partial x_2}}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \right] \quad (A.32)$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial x_4} = \left( \frac{p_1 0,21}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \right) \left( \frac{u_1 + u_2}{0,21 u_1 + u_2} \right) x_1 \left\{ \frac{\left( \frac{\partial \mu}{\partial x_4} - a_{kd} \right)}{Y_{x/O_2}} + 3 a_q T^2 - q_{O_2} \left[ \ln \theta + \frac{0,86(b + 2c x_4 + 3d x_4^2 + 4e x_4^3)}{10^3 C_{O_2}^*} \right] \right\} \quad (A.33)$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial u_1} = p_1 0,21 \left\{ \left( \frac{u_1 + u_2}{0,21 u_1 + u_2} \right) \left[ \frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \frac{e^{b_k(\Phi - c_k)}}{1 + e^{b_k(\Phi - c_k)}} \frac{b_k}{V} \right] + \left( \frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} + 0,3 \right) \frac{0,79 u_2}{(0,21 u_1 + u_2)^2} \right\} \quad (A.34)$$

$$\frac{\partial p_2}{\partial u_2} = p_1 0,21 \left\{ \left( \frac{u_1 + u_2}{0,21 u_1 + u_2} \right) \left[ \frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} \frac{e^{b_k(\Phi - c_k)}}{1 + e^{b_k(\Phi - c_k)}} \frac{b_k}{V} \right] - \left( \frac{q_{O_2} x_1}{k_L a \cdot C_{O_2}^*} + 0,3 \right) \frac{0,79 u_1}{(0,21 u_1 + u_2)^2} \right\} \quad (A.35)$$

## Apêndice B: Balanço de Energia para o Biorreator Airlift Pressurizado durante Cultivo de *E. coli*

O biorreator airlift pode ser considerado um sistema aberto e isolado termicamente, onde as linhas de gás acarretam na entrada e saída de matéria do volume de controle que, por sua vez, é considerado o próprio vaso do reator. O ar que entra no sistema é considerado seco e o gás da saída é considerado saturado de vapor de água. Dessa forma, pode-se construir o seguinte balanço de energia para o sistema.

$$\frac{dE_{VC}}{dt} = \dot{m}_{G,e} \left( gz_{G,e} + \frac{1}{2} v_{G,e}^2 + h_{G,e} \right) - \dot{m}_{G,s} \left( gz_{G,s} + \frac{1}{2} v_{G,s}^2 + h_{G,s} \right) - \dot{m}_{V,s} \left( gz_{V,s} + \frac{1}{2} v_{V,s}^2 + h_{LV} \right) + \dot{Q}_M + \dot{W} \quad (\text{B.1})$$

onde  $E_{VC}$  (J) é a energia do sistema;  $\dot{m}_{G,e}$  e  $\dot{m}_{G,s}$  ( $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$ ) são as vazões mássicas de ar que entram e saem do sistema, respectivamente;  $\dot{m}_{V,s}$  ( $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$ ) é a vazão mássica de vapor de água saturado na corrente de saída de gás do biorreator;  $g$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ) é aceleração gravitacional;  $v_{G,e}$  e  $v_{G,s}$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) são as velocidades do ar nas correntes de entrada e saída de gás do sistema;  $v_{V,s}$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) é a velocidade do vapor de água na corrente saída do sistema;  $h_{G,e}$  e  $h_{G,s}$  são as entalpias do ar nas correntes de entrada e saída de gás do sistema;  $h_{LV}$  é a entalpia de vaporização do líquido;  $\dot{Q}_M$  (W ou  $\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ ) é a taxa de calor gerado no sistema devido ao metabolismo das células;  $\dot{W}$  (W) é a taxa de trabalho realizado sobre o sistema.

Primeiramente, as seguintes hipóteses podem ser assumidas, a fim de simplificar a Equação B.1:

$$\dot{m}_{G,e} \left( gz_{G,e} + \frac{1}{2} v_{G,e}^2 \right) - \dot{m}_{G,s} \left( gz_{G,s} + \frac{1}{2} v_{G,s}^2 \right) - \dot{m}_{V,s} \left( gz_{V,s} + \frac{1}{2} v_{V,s}^2 \right) \cong 0 \quad (\text{B.2})$$

considerando que as energias potenciais ( $\dot{m}gz$ ) e cinéticas ( $\dot{m}v^2$ ) são insignificantes frente às demais grandezas do sistema.

Com isso, chegamos à seguinte equação simplificada:

$$\frac{dE_{VC}}{dt} = \dot{m}_{G,e}h_{G,e} - \dot{m}_{G,s}h_{G,s} - \dot{m}_{V,s}h_{LV} + \dot{Q}_M + \dot{W} \quad (\text{B.3})$$

O calor gerado devido ao metabolismo celular ( $\dot{Q}_M$ ) pode ser correlacionado com a taxa de consumo de oxigênio, de acordo com a Equação B.4 (SHULER; KARGI, 2002).

$$\dot{Q}_M = Kq_{O_2}C_XV_L \quad (\text{B.4})$$

onde  $V_L$  (L) é o volume de líquido no reator;  $C_X$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) é a concentração celular;  $q_{O_2}$  ( $\text{mmol O}_2\cdot\text{g}_x^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) é o consumo específico de oxigênio pelas células;  $K$  ( $\text{J}\cdot\text{mmol O}_2^{-1}$ ) é uma constante geral de proporcionalidade relatada na literatura para microrganismos aeróbios (SHULER; KARGI, 2002).

A taxa de trabalho realizado sobre o sistema ( $\dot{W}$ ) pode ser considerada como sendo a soma das potências relativas à expansão isotérmica do gás desde sua aspensão até a superfície do líquido ( $P_I$ ) e à energia cinética das bolhas transferida ao líquido ( $P_C$ ).

$$\dot{W} = P_I + P_C \quad (\text{B.5})$$

sendo

$$P_I = \frac{\rho_G Q_G R T}{M} \ln\left(\frac{p_e}{p_s}\right) \quad (\text{B.6})$$

$$P_C = \frac{1}{2} \rho_G Q_G U_0^2 \quad (\text{B.7})$$

onde  $\rho_G$  ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) é a densidade do gás;  $Q_G$  ( $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ ) é a vazão volumétrica de gás;  $U_0$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) é a velocidade do gás através dos orifícios do aspersor;  $R_c$  ( $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) é a constante dos gases ideais;  $T$  (K) é a temperatura;  $M$  ( $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) é massa molar do gás;  $p_e$  (bar) e  $p_s$  (bar) são as pressões na saída do aspersor e na superfície do líquido, respectivamente.

No entanto, podemos desconsiderar ambos  $P_I$  e  $P_C$  nos cálculos de energia, pois seus valores são desprezíveis frente às demais grandezas do sistema. No caso de  $P_I$ , a diferença entre as pressões  $p_e$  e  $p_s$  é insignificante, uma vez que a coluna de água no reator é



inferior a 0,4 m, de modo que o termo  $\ln\left(\frac{p_e}{p_s}\right) \cong 0$ . Já a energia cinética transferida ao líquido ( $P_C$ ) pode ser também desprezada, pois ela alcança, no máximo, 1,5% do consumo de potência total (CHISTI, 1989).

A vazão mássica de vapor de água que deixa o sistema –  $\dot{m}_{V,S}$  ( $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}$ ) – pode ser estimada com base na densidade do vapor de água saturado –  $\rho_V$  ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) – e na vazão volumétrica de gás saturado de vapor de água –  $Q_G$  ( $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ ) – que deixa o sistema, conforme segue:

$$\dot{m}_{V,S} = \rho_V Q_G \quad (\text{B.8})$$

As vazões de entrada e saída de gás no sistema  $\dot{m}_{G,e}$  e  $\dot{m}_{G,s}$  ( $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$ ) são consideradas equivalentes e iguais a  $\dot{m}_G$  ( $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$ ), dado por:

$$\dot{m}_G = \rho_G Q_G \frac{p_2}{p_1} \quad (\text{B.9})$$

onde  $p_2$  (bar) é a pressão do sistema e  $p_1=1$  bar é a pressão de calibração do fluxômetro.

Com isso, a Equação B.3 pode ser reescrita como:

$$\frac{dE_{VC}}{dt} = \rho_G Q_G \frac{p_2}{1 \text{ bar}} (h_{G,e} - h_{G,s}) - \rho_V Q_G h_{LV} + K q_{O_2} C_X V_L \quad (\text{B.10})$$

A fim de estimar a variação de energia no sistema em condição de máxima transferência e consumo de oxigênio a 27 °C sem enriquecimento do ar de entrada com oxigênio puro, foram considerados os valores descritos abaixo:

$Q_G = 20 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1} = 3,33\cdot 10^{-4} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$  (vazão volumétrica máxima);

$p_2 = 4$  bar (pressão máxima);

$V_L = 5$  L (volume de caldo de cultivo);

$q_{O_2} = 2,6\cdot 10^{-3} \text{ mmol O}_2\cdot\text{g}_x^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  – valor apresentado na Figura 3.4 (Capítulo 3) para 27 °C e velocidade específica máxima de crescimento celular;

$C_X = 15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  – concentração celular máxima suportada pelo sistema, de acordo com a Figura 3.9 (Capítulo 3);

$K = 500 \text{ J}\cdot\text{mmol O}_2^{-1}$  – valor relatado na literatura (SHULER; KARGI, 2002);

$$h_{G,e} = h_G(21^\circ\text{C}) = 294,4 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ (valor tabelado);}$$

$$h_{G,s} = h_G(27^\circ\text{C}) = 300,4 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ (valor tabelado);}$$

$$h_{LV} = h_{LV}(27^\circ\text{C}) = 2437,57 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ (valor tabelado);}$$

$$\rho_G = \rho_G(27^\circ\text{C}) = 1,16 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \text{ (valor tabelado);}$$

$$\rho_V = \rho_V(27^\circ\text{C}) = 0,0255 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \text{ (valor tabelado);}$$

Substituindo os valores das variáveis na Equação B.10, estima-se que  $\frac{dE_{VC}}{dt} = 67,2 \text{ W}$ . Já a potência requerida para a compressão isentrópica do ar nessas condições de operação é de aproximadamente 400 W, com base em equação apresentada por Campani et al. (2016). Portanto, a taxa de produção de calor é de apenas ~17% da potência gasta para a compressão do ar. Logo, numa primeira aproximação, pode-se desconsiderar o gasto para a refrigeração do sistema. Vale ressaltar que no caso de biorreatores do tipo tanque agitado, tal aproximação não é aconselhável (KNOLL et al., 2005). Nesses reatores, a menor vazão de gás faz com que menos calor seja retirado do sistema por evaporação de líquido e a agitação mecânica, por outro lado, aumenta a geração de calor no sistema.