

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

Gilson Campani Junior

REATOR AIRLIFT OPERADO EM SOBREPRESSÃO: CONSTRUÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO E APLICAÇÃO EM  
CULTIVOS DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE

São Carlos - 2014

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

Gilson Campani Junior

REATOR AIRLIFT OPERADO EM SOBREPRESSÃO: CONSTRUÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO E APLICAÇÃO EM  
CULTIVOS DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE

Dissertação 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 Mestre em Engenharia Química, sob orientação do Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano (DEQ-UFSCar) e co-orientação da Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (DEQ-UFCar).

São Carlos - 2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C186ra

Campani Junior, Gilson.

Reator airlift operado em sobrepressão : construção, caracterização da transferência de oxigênio e aplicação em cultivos de *Escherichia coli* recombinante / Gilson Campani Junior. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

101 f.

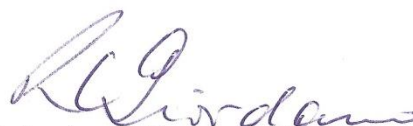
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Engenharia química. 2. Produção de PspA. 3. Operação em sobrepressão. I. Título.

CDD: 660 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**GILSON CAMPANI JUNIOR** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 26 DE FEVEREIRO DE 2014.


BANCA EXAMINADORA:



Roberto de Campos Giordano  
**Orientador, UFSCar**



Teresa Cristina Zangirolami  
**Coorientadora, UFSCar**



Marcel Otavio Cerri  
**UFSJ**



Alberto Colli Badino Junior  
**UFSCar**



Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro  
**UFSCar**

Dedico este trabalho à minha família e à minha noiva pelo imenso suporte, amparo e incentivo recebidos, nos bons e maus momentos, me ajudando a chegar onde estou.

## 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 noiva Carol, que, desde o aparecimento em minha vida, preenche um espaço cada vez mais importante em mim.

À Profa. Dra. Teresa Zangirolami, exemplo de profissionalismo, cuja orientação foi e será de extrema valia para a minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Alberto Badino e Prof. Dr. Roberto Giordano pela confiança depositada em meu trabalho. A orientação de vocês foi essencial para a realização desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ribeiro e ao Prof. Dr. Marcel Cerri pelas importantes sugestões que, com certeza, enriqueceram muito este trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Horta (“KK”) pelos conhecimentos de instrumentação e controle transmitidos, aprendi imensamente acompanhando o seu trabalho.

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: CAPES e FAPESP.

*"Na vida, não vale tanto o que temos,  
nem tanto importa o que somos. Vale o  
que realizamos com aquilo que  
possuímos e, acima de tudo, importa o  
que fazemos de nós!"*

*(Chico Xavier)*

## RESUMO

Devido à ampla caracterização bioquímica, fisiológica e genética e à facilidade de manipulação e de cultivo, diversas proteínas com aplicação industrial e terapêutica são produzidas por *Escherichia coli* geneticamente modificada. Há informações abundantes na literatura sobre estratégias para aumentar a produção de biomassa e de proteínas recombinantes por meio de cultivos de *E. coli* empregando biorreator tipo tanque agitado e aerado (convencional). Por outro lado, apesar de bastante empregado em cultivos de microrganismos filamentosos, poucos trabalhos envolvendo cultivo de *E. coli* em reator pneumático tipo *airlift* são encontrados. Este biorreator apresenta vantagens frente ao convencional, 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  $O_2$  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  $O_2$  no controle adequado da concentração de  $O_2$  dissolvido (COD), evitando quedas de produtividade de biomassa e de proteína recombinante. Nesse contexto, este trabalho objetivou: (i) determinar a influência da pressão interna sobre a retenção gasosa ( $\epsilon$ ), o coeficiente volumétrico de transferência de  $O_2$  ( $k_La$ ) e a velocidade volumétrica de transferência de  $O_2$  ( $NO_2$ ) em biorreator *airlift* de 5 L de volume útil; (ii) avaliar o desempenho das variáveis manipuladas selecionadas (vazões de ar e de  $O_2$  puro, sobrepressão e temperatura) no controle da COD no *airlift*; (iii) verificar a influência das diferentes condições de operação sobre a formação de biomassa, a estabilidade plasmidial e a produção da proteína recombinante em *E. coli* no *airlift*. Os experimentos foram conduzidos em biorreator *airlift* de 5 L equipado com sistema de supervisão e controle automático de pressão, pH, temperatura e COD. A caracterização da transferência de  $O_2$  no biorreator mostrou que a sobrepressão, embora não afete o  $k_La$ , tem efeito positivo sobre  $NO_2$ , com um aumento previsto de até 3,7 vezes (pressão de 3 bar). Os resultados obtidos através dos cultivos realizados com e sem pressurização mostraram que as variáveis vazão de ar e de  $O_2$ , temperatura e pressão são eficazes no controle da COD durante os cultivos. A pressurização do reator possibilitou uma menor redução da temperatura (mínima de 26°C), o que acarretou em aumentos de produtividade em biomassa e proteína recombinante de 2,2 e 9,6 vezes, respectivamente, em relação ao cultivo sem sobrepressão, no qual foi necessário reduzir a temperatura para até 15°C a fim de controlar a COD. As conclusões obtidas através do presente trabalho contribuem para a área de desenvolvimento de reatores não convencionais e de controladores da COD, especialmente para os biorreatores pneumáticos, que são amplamente utilizados em bioprocessos aeróbios.

Palavras-chave: *Airlift*; *Escherichia coli*; PspA; Cultivo Celular; Controle; Transferência de Oxigênio; Operação em Sobrepressão.



## ABSTRACT

Owing to the broad biochemical, physiological and genetic characterization and the ease of manipulation and cultivation, several proteins with therapeutic and industrial applications are produced by genetically modified *Escherichia coli*. There is abundant information in the literature about strategies to increase biomass and recombinant protein production by cultivation of *E. coli* employing stirred and aerated tank bioreactor (conventional type). In contrast, although quite employed in cultivation of filamentous microorganisms, there are just a few studies involving cultivation of *E. coli* in airlift bioreactor. This reactor offers advantages over conventional one, such as simplicity of construction, reduced risk of contamination and efficient gas-liquid dispersion with low power consumption. However, the lower O<sub>2</sub> transfer in airlift bioreactor (bench scale), compared to that achieved in conventional one, justifies the manipulation of temperature, pressure and flow rates of air and O<sub>2</sub> in the dissolved oxygen concentration (DOC) control, avoiding decreases in biomass and recombinant protein productivities. In this context, this study aimed to: (i) determine the influence of internal pressure on the gas holdup ( $\epsilon$ ), volumetric O<sub>2</sub> transfer coefficient ( $k_{L,a}$ ) and volumetric O<sub>2</sub> transfer rate ( $NO_2$ ) in an airlift bioreactor with 5 L of usable volume; (ii) evaluate the performance of the selected manipulated variables (flow rates of air and O<sub>2</sub>, pressure and temperature) for DOC control in airlift, (iii) investigate the influence of different operating conditions on the biomass formation, plasmid stability and recombinant protein production in *E. coli* in airlift. The experiments were carried out in an airlift bioreactor (5 L) equipped with monitoring and automatic control of pressure, pH, temperature and DOC. The characterization of oxygen transfer in the bioreactor showed that, although overpressure does not affect the  $k_{L,a}$ , it has a positive effect on  $NO_2$ , with a predicted increase of up to 3.7 times (pressure of 3 bar). The results obtained from the cultivations performed with and without pressurization showed that the flow of air and O<sub>2</sub>, temperature and pressure are effective in the DOC control. Increased pressure in the reactor allowed a lower temperature reduction (at a minimum of 26°C), which resulted in increases of biomass and recombinant protein productivities of 2.2 and 9.6-fold, respectively, regarding the cultivation without overpressure, in which it was necessary to reduce the temperature to 15°C in order to control the DOC. The conclusions obtained from this study contribute to the field of development of non-conventional reactors and DOC controllers, especially for pneumatic bioreactors, which are widely used in aerobic bioprocesses.

**Keywords:** *Airlift*; *Escherichia coli*; PspA; Cell Cultivation; Control; Oxygen Transfer; Overpressure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de <i>Escherichia coli</i> .....	24
Figura 2. (a) Esquema de um biorreator tipo tanque agitado e aerado e (b) de uma turbina tipo Rushton. ....	25
Figura 3. (a) Biorreator pneumático tipo <i>airlift</i> e (b) aspensor de gás tipo “cruzeta”.....	27
Figura 4. Etapas do processo de transferência de O <sub>2</sub> da fase gasosa para o seu sítio de reação no interior da célula.....	31
Figura 5. Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para fluidos Newtonianos e não Newtonianos. ....	36
Figura 6. Configurações básicas de sistemas de controle.....	41
Figura 7. Esquema do aparato experimental utilizado nos cultivos composto por biorreator, linhas de gás e <i>hardware</i> de aquisição e controle das variáveis do processo. ....	45
Figura 8. Exemplo de ajuste do modelo (Eq. 17) aos dados da COD em função do tempo após aumento da pressão em, aproximadamente, 20%. ....	50
Figura 9. Biorreator <i>airlift</i> (a) com tubo superior em vidro e (b) em inox 316L. ....	57
Figura 10. Tampa adaptada para o biorreator <i>airlift</i> . Destaque para: (a) entrada de base; (b) condensador do gás de saída; (c) poço para termopar; (d) conexões para os sensores de oxigênio dissolvido e pH; (e) válvula para transferência de meio; (f) válvula para amostragem.....	57
Figura 11. Sistema de filtração do gás de entrada do biorreator <i>airlift</i> . ....	58
Figura 12. Sistema de controle de pressão para o biorreator <i>airlift</i> . Destaque para: (a) eliminador de condensado; (b) transmissor de pressão; (c) válvula pneumática proporcional.....	58
Figura 13. Medidas em triplicata de $k_{La}$ e $\epsilon$ em função da pressão em biorreator <i>airlift</i> (5 L) operado com água destilada. As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas de $\epsilon$ e ao erro padrão das estimativas de $k_{La}$ . ....	59
Figura 14. Medidas em triplicata de $k_{La}$ e $\epsilon$ em função da pressão em biorreator <i>airlift</i> (5 L) operado com meio de cultivo. As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas de $\epsilon$ e ao erro padrão das estimativas de $k_{La}$ . ....	60
Figura 15. <i>NO2c</i> predito em função da concentração celular (reator convencional) e da pressão ( <i>airlift</i> ) com vazão de gás de 4 vvm. Em ambos os reatores, água pura foi adotada como fase líquida. ....	65

Figura 16. Interface ao usuário em LabVIEW para as configurações e para a ativação (ou desativação) do controle automático da COD no software SuperSys_HCDC®.....	67
Figura 17. Curva de crescimento celular ( $DO_{600nm}$ ) de <i>S. cerevisiae</i> em cultivo batelada em biorreator <i>airlift</i> (5 L) com as seguintes condições: pH de 4,6, COD entre 30 e 50% de saturação e temperatura de 35 °C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata. ....	68
Figura 18. Perfil de resposta da COD com respeito à variação de QAR durante o cultivo em batelada de <i>S. cerevisiae</i> e $DO_{600nm}$ em função do tempo. As condições do cultivo foram: pH de 4,6, COD entre 30 e 50% de saturação e temperatura de 35 °C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.....	69
Figura 19. Concentrações de biomassa ( $Cx$ ), glicose, glicerol e lactose ao longo do cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> . A fase de indução teve início em 18 h de cultivo. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de $Cx$ em triplicata. ....	71
Figura 20. Concentrações dos ácidos acético, fórmico e láctico ao longo do cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> . As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C. ....	72
Figura 21. $Cx$ e o perfil de resposta da COD com respeito à manipulação de $QO_2$ no cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> . As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata. ....	73
Figura 22. $Cx$ e o perfil de resposta da COD com respeito à manipulação da temperatura no cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> . As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.....	74
Figura 23. COD e concentrações celular ( $Cx$ ) e de metabólitos (ácidos acético, fórmico e láctico) no cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator convencional. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), temperatura de	

31°C e COD controlada em diferentes valores, 30, 20 e 10% de saturação. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas $Cx$ em triplicata.....	77
Figura 24. Concentrações de biomassa ( $Cx$ ), glicose, glicerol e lactose ao longo do cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> pressurizado. A fase de indução teve início em 9,5 h de cultivo. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas $Cx$ em triplicata. ....	79
Figura 25. Concentrações dos ácidos acético, fórmico e láctico ao longo do cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> pressurizado. A fase de indução teve início em 9,5 h de cultivo. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C. ....	80
Figura 26. $Cx$ e perfil de resposta da COD com respeito à manipulação das vazões de ar (1ª Fase) e de $O_2$ (3ª Fase), da pressão (2ª Fase) e da temperatura (4ª Fase) no cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> pressurizado. O pH foi controlado em 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução). Os valores de QAR e $QO_2$ apresentados são relativos à condição padrão de 1 atm e 21,1°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata. ....	83
Figura 27. $Cx$ e acompanhamento reológico ( $n$ , $K$ e $\mu_{ap}$ ) do caldo durante a fase de indução do cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> pressurizado. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C. A vazão volumétrica de gás empregada durante a fase de indução foi de 20 L/min (4 vvm). As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas em triplicata de $Cx$ e ao erro padrão das estimativas de $n$ , $K$ e $\mu_{ap}$ . ....	85
Figura 28. Imagens de microscopia ótica (ampliação de 400x) de amostras retiradas em 0 e 14 h de indução do cultivo em batelada de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> pressurizado. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e <i>set point</i> da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C. ....	85
Figura 29. Simulação de $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função de $\rho g$ para diferentes reatores pneumáticos com $Ur$ distintos.....	97

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Pseudocódigo do controle automático da COD através da manipulação de QAR e QO2. ....	66
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de cultivos de <i>E. coli</i> em biorreator <i>airlift</i> relatados na literatura. ....	29
Tabela 2. Composição dos meios de cultivo complexos para os ensaios com <i>E. coli</i> em câmara incubadora e em biorreator. ....	44
Tabela 3. Composição do meio de cultura utilizado para o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> . ....	44
Tabela 4. Condições experimentais empregadas nos experimentos de caracterização da transferência de oxigênio em biorreator <i>airlift</i> de (5 L). A temperatura foi controlada em 30°C em todos os experimentos. ....	52
Tabela 5. Resumo dos principais resultados obtidos nos cultivos em batelada de <i>E. coli</i> no biorreator <i>airlift</i> com e sem pressurização e no reator convencional (ensaio de referência). ....	81

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a: área interfacial específica de troca de massa	( $m^{-1}$ )
b: constante empírica	( $s^{c-1} \cdot m^{-3 \cdot c} \cdot Pa^{-d}$ )
c: constante empírica	
C: concentração do oxigênio no seio do líquido	( $mmol/m^3$ )
C*: concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa	( $mmol/m^3$ )
C <sub>e</sub> : concentração de oxigênio dissolvido medida pelo sensor	(% saturação)
C <sub>e0</sub> : concentração de oxigênio dissolvido medida pelo sensor no instante inicial	(% saturação)
C <sub>es</sub> : concentração final de saturação de oxigênio dissolvido medida pelo sensor	(% saturação)
C <sub>0</sub> : concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial inicial de oxigênio na fase gasosa	( $mmol/m^3$ )
C <sub>S</sub> : concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial final de oxigênio na fase gasosa	( $mmol/m^3$ )
C <sub>P</sub> : concentração de proteínas totais solúveis	( $mg/L$ )
C <sub>PspA</sub> : concentração de PspA	( $mgPspA/L$ )
C <sub>x</sub> : concentração celular	( $gMS/L$ )
CO <sub>2</sub> : gás carbônico	
COD: concentração de oxigênio dissolvido	(% saturação)
COD <sub>max</sub> : concentração de oxigênio dissolvido máxima	(% saturação)
COD <sub>min</sub> : concentração de oxigênio dissolvido mínima	(% saturação)
d: constante empírica	
d <sub>B</sub> : diâmetro médio das bolhas de gás	( $m$ )
D <sub>O<sub>2</sub>/L</sub> : difusividade molecular do oxigênio no líquido	( $m^2/s$ )
D <sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O</sub> : difusividade molecular do oxigênio em água	( $m^2/s$ )
DO <sub>600nm</sub> : densidade ótica em 600nm	
e: diferença entre o valor medido e a referência estabelecida para a variável controlada	
g: aceleração gravitacional	( $m/s^2$ )
gMS: grama de massa (celular) seca	
H <sub>O<sub>2</sub>/água</sub> : constante da Lei de Henry para o sistema oxigênio-água	( $m^3 \cdot bar/mmol$ )

$H_{O_2/meio}$ : constante da Lei de Henry para o sistema oxigênio-meio de cultivo	( $m^3 \cdot \text{bar}/\text{mmol}$ )
$I_{PspA}$ : intensidade de pixels da banda de PspA no gel de poliacrilamida	
IPTG: Isopropil $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	
K: índice de consistência	( $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ )
$K_C$ : ganho proporcional	
$k_e$ : constante de atraso do sensor de oxigênio dissolvido	( $\text{s}^{-1}$ )
$k_L$ : coeficiente de transferência de massa	( $\text{m}/\text{s}$ )
$k_{La}$ : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	( $\text{s}^{-1}$ )
$m$ : sinal do controlador	
$\dot{m}$ : vazão mássica	( $\text{mol}/\text{min}$ )
MM: massa molar do gás	( $\text{g}/\text{mol}$ )
$n$ : índice de comportamento de escoamento	
N: frequência de rotação dos impelidores	( $\text{s}^{-1}$ )
$n_{O_2}$ : fluxo de oxigênio	( $\text{mmol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )
$NO_2$ : velocidade volumétrica de transferência de oxigênio	( $\text{mmol}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$ )
$NO_2^c$ : velocidade volumétrica de transferência de oxigênio para a condição de cultivo	( $\text{mmol}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$ )
$\langle NO_2 \rangle$ : velocidade volumétrica média de transferência de oxigênio	( $\text{mmol}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$ )
$N_2$ : nitrogênio (gás)	
$O_2$ : oxigênio (gás)	
P: pressão	(bar ou Pa)
$P_{PspA}$ : produtividade de PspA	( $\text{mgPspA}/\text{L} \cdot \text{h}$ )
$P_X$ : produtividade de biomassa	( $\text{gMS}/\text{L} \cdot \text{h}$ )
$p\text{CO}_2$ : pressão parcial de gás carbônico	(bar)
$p\text{O}_2$ : pressão parcial de oxigênio	(bar)
PID: proporcional, integral e derivativo	
PI: proporcional e integral	
$p\text{O}_2$ : pressão parcial de oxigênio	(bar)
PspA: proteína de superfície do pneumococo	
PspA4Pro: proteína de superfície do pneumococo do clado 4	
Q: vazão volumétrica de gás	( $\text{L}/\text{min}$ ou $\text{m}^3/\text{s}$ )
QAR: vazão volumétrica de ar	( $\text{L}/\text{min}$ )



QGAS_max: vazão volumétrica máxima de gás	(L/min)
QO2: vazão volumétrica de oxigênio puro	(L/min)
QO2_max: vazão máxima de oxigênio puro	(L/min)
R: constante universal dos gases ideais	(L·bar/K·mol)
t: tempo	(s)
T: temperatura	(K ou °C)
$t_0$ : tempo inicial	(s)
$T_d$ : ganho derivativo	(s)
$1/T_i$ : ganho integral	(s <sup>-1</sup> )
$U_{GS}$ : velocidade superficial de gás na região de subida	(m/s)
$U_\infty$ : velocidade terminal de ascensão das bolhas de gás	(m/s)
$U_r$ : velocidade relativa interfacial gás-líquido	(m/s)
$V_G$ : volume de gás no biorreator	(m <sup>3</sup> )
$V_L$ : volume de líquido no biorreator	(m <sup>3</sup> )
vvm: volume por volume útil do reator por minuto	(m <sup>-1</sup> )
$y_{O_2}$ : fração molar de O <sub>2</sub> no gás	
$Y_{PspA/X}$ : produção específica de PspA	(mgPspA/gMS)
$\alpha$ : constante de proporcionalidade entre densidade ótica em 600nm e concentração celular	(gMS/L)
$\Delta AR$ : incremento na vazão volumétrica de ar	(L/min)
$\Delta O_2$ : incremento na vazão volumétrica de oxigênio	(L/min)
$\Delta x_L$ : espessura da camada de líquido estagnada na superfície da bolha de gás	(m)
$\Delta t_{total}$ : tempo de cultivo	(h)
$\epsilon$ : retenção gasosa global no líquido	
$\sum_j I_j$ : soma das intensidades das bandas no gel de poliacrilamida referentes às proteínas de uma amostra	
$\phi$ : vazão volumétrica específica de gás	(vvm)
$\lambda_{m\acute{a}x}$ : máximo comprimento de onda de uma perturbação interfacial estável	(m)
$\mu$ : viscosidade dinâmica	(Pa.s)
$\mu_{ap}$ : viscosidade aparente	(Pa.s)
$\rho_L$ : densidade da fase líquida	(kg/m <sup>3</sup> )
$\rho_g$ : densidade da fase gasosa	(kg/m <sup>3</sup> )
$\sigma$ : tensão interfacial do sistema gás-líquido	(N/m)

$\tau$ : tensão de cisalhamento	(Pa)
$\tau_0$ : tensão de cisalhamento inicial	(Pa)
$\dot{\gamma}$ : velocidade de cisalhamento	(s <sup>-1</sup> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.2. Biorreator tipo tanque agitado e aerado e sua aplicação em cultivos de alta densidade de <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.3. Biorreator pneumático tipo <i>airlift</i> e sua aplicação em cultivos de <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.4. Transferência de oxigênio em biorreatores aerados.....	29
2.4.1. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.....	31
2.4.2. Retenção gasosa .....	32
2.4.3. Estratégias para aumento da transferência de O <sub>2</sub> em caldos de cultivo .....	32
2.4.4. Reologia de caldos de cultivo e sua influência sobre a transferência de oxigênio.....	34
2.5. Cultivos de células em biorreatores pressurizados .....	37
2.6. Controle da concentração de oxigênio dissolvido em cultivos de <i>E. coli</i> .....	39
2.7. Considerações finais .....	42
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Materiais .....	43
3.1.1. Microrganismo .....	43
3.1.2. Meios de cultura .....	43
3.1.3. Aparato experimental .....	45
3.2. Métodos analíticos .....	46
3.2.1. Acompanhamento do crescimento celular .....	46
3.2.2. Concentração de açúcares e ácidos orgânicos.....	47
3.2.3. Determinação da estabilidade do plasmídeo .....	47
3.2.4. Quantificação da produção de PspA .....	48
3.2.5. Determinação da retenção gasosa .....	49
3.2.6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	49
3.2.7. Acompanhamento do comportamento reológico do caldo de cultivo.....	50
3.2.8. Acompanhamento da morfologia celular .....	51
3.3. Procedimento experimental .....	51
3.3.1. Caracterização da transferência de oxigênio em sobrepessão .....	51

3.3.2. Cultivos em batelada de <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i> .....	53
3.3.2.1. Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
3.3.2.2. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	53
<b>3.3.2.2.1. Semeadura em meio sólido</b> .....	53
<b>3.3.2.2.2. Preparação das pré-culturas (inóculo e pré-inóculo)</b> .....	53
<b>3.3.2.2.3. Cultivos em biorreator</b> .....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
4.1. Adequação do biorreator <i>airlift</i> .....	56
4.2. Caracterização da transferência de oxigênio em biorreator <i>airlift</i> com sobrepressão .....	59
4.3. Adequação do <i>software</i> para controle da concentração de oxigênio dissolvido .....	65
4.4. Ensaio em biorreator <i>airlift</i> sem sobrepressão.....	67
4.4.1. Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	68
4.4.2. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	70
4.5. Efeito da redução da concentração de oxigênio dissolvido sobre o cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	75
4.6. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> em biorreator <i>airlift</i> pressurizado .....	78
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>
<b>APÊNDICE A – Fragmentação de bolhas de gás em sistema gás-líquido em reator pneumático</b> .....	<b>96</b>
<b>APÊNDICE B – Modelo para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio</b> .....	<b>98</b>
<b>APÊNDICE C – Projeto do tubo superior do biorreator <i>airlift</i></b> .....	<b>100</b>
<b>APÊNDICE D – Projeto da tampa do biorreator <i>airlift</i></b> .....	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Avanços nas áreas de microbiologia e biologia molecular trouxeram, nas últimas quatro décadas, grandes melhorias nos bioprocessos, em especial nas indústrias de biotecnologia, acarretando em aumentos de produtividade e de qualidade dos produtos (WANG et al., 2009; VOJINOVIC et al., 2006). Como consequência, desde então, há um crescente número de produtos biotecnológicos sendo lançados e comercializados como, por exemplo, nas áreas farmacêutica, de alimentos e de energia (VOJINOVIC et al., 2006). Nesse contexto, a *Escherichia coli* foi e continua sendo um dos microrganismos mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas, uma vez que há ampla caracterização metabólica e genética deste organismo e métodos precisos e rápidos para a modificação de seu genoma (TERPE, 2006; DEMAINE e VAISHNAV, 2009). Vetores (plasmídeos) de expressão muito difundidos para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* são baseados no operon *lac*, onde lactose e/ou seu análogo, o Isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), são utilizados para a indução da produção da proteína de interesse (SORENSEN e MORTENSEN, 2005).

Meios de cultivo estão bem estabelecidos na literatura. Há formulações para meios de cultivo definidos (KORZ et al., 1995; SEEGER et al., 1995) e complexos (STUDIER, 2005; SILVA et al., 2013a; SANTOS, 2012), tendo tanto glicose como glicerol como fontes de carbono, que permitem alcançar altas concentrações de biomassa e elevada produção de proteína.

Com relação aos tipos de reatores utilizados em cultivos de *E. coli*, os estudos encontrados na literatura empregam, quase que exclusivamente, biorreatores tipo tanque agitado e aerado (SHILOACH e FASS, 2005; SHOJAOSADATI et al., 2008; KHALILZADEH et al., 2004; KORZ et al., 1995; SEEGER et al., 1995; SILVA et al., 2013a; SARGO, 2011; HORTA, 2011; SANTOS, 2012). Mais recentemente, alguns estudos têm abordado o desenvolvimento de reatores não convencionais, tal como do tipo *rocking motion* (GLAZYRINA et al., 2010). Porém, cultivos de *E. coli* em reatores pneumáticos, em especial o tipo *airlift*, que encontram grande aplicação industrial, têm sido pouco estudados (BRANDES et al., 1993a,b,c; KRACKEHELMET et al., 1991; JANARDHAN et al., 2007), evidenciando um amplo campo de pesquisa a ser explorado.

Dentre os diferentes clones de *E. coli* sendo atualmente estudados no LaDABio (Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos - Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos), foram selecionados os organismos geneticamente modificados *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+/PspA4Pro e pET37b+/PspA94/HisTag, que expressam fragmentos das proteínas imunogênicas PspA (PspA4Pro e PspA94, respectivamente) presentes na parede celular do procarionto *Streptococcus pneumoniae*. Devido às suas características imunogênicas, as PspAs foram escolhidas para o desenvolvimento de uma nova vacina antipneumocócica conjugada no Projeto Temático FAPESP “Vacina conjugada antipneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo-proteína de superfície de pneumococo A” (Processo nº 08/05207-4), coordenado pela pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Martha Massako Tanizaki do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan. Mais especificamente, o presente trabalho de Mestrado se insere no subprojeto “Automação e Otimização de Bioprocessos em Cultivos de *rE. coli* para produção de PspA”, que, por sua vez, integra o referido projeto temático.

Nesse contexto, a presente Dissertação teve como objetivos gerais estudar o cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator pneumático tipo *airlift* adaptado para operação em sobrepressão e desenvolver estratégias de cultivo para otimização da produção de biomassa. Como a obtenção de maiores concentrações celulares depende, essencialmente, da manutenção de boas condições de transferência de O<sub>2</sub>, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) determinar a influência da pressão interna sobre a retenção gasosa, o coeficiente volumétrico de transferência de O<sub>2</sub> e a velocidade de transferência de O<sub>2</sub> em biorreator *airlift* em escala de bancada (5 L);
- b) avaliar o desempenho das variáveis manipuladas selecionadas (vazões de ar e de O<sub>2</sub> puro, sobrepressão e temperatura) no controle da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido;
- c) verificar a influência das diferentes condições de operação sobre a formação de biomassa, a estabilidade plasmidial e a produção da proteína recombinante em *E. coli*.

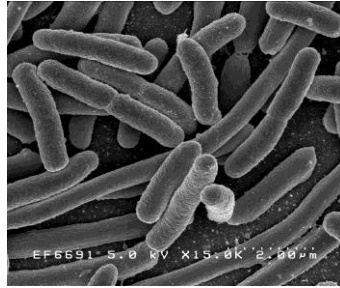
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nessa seção, será apresentado um panorama atual dos resultados mais relevantes encontrados na literatura envolvendo cultivos de *E. coli* em biorreatores tipo tanque agitado e aerado e tipo *airlift* (seções 2.2 e 2.3). Posteriormente, aspectos relacionados à transferência de O<sub>2</sub> em bioprocessos também serão abordados (seções 2.4 e 2.5). Por fim, serão revisados conceitos de controle de processos aplicados a biorreatores (seção 2.6).

### 2.1. *Escherichia coli*

O bacilo Gram-negativo *Escherichia coli* (Figura 1) foi o primeiro e, desde a década de 60, continua sendo o principal microrganismo empregado em pesquisas de engenharia genética para a produção de proteínas recombinantes, especialmente monômeros que não exigem modificações pós-traducionais complexas (ALTENBUCHNER e MATTES, 2005). Nos últimos 50 anos, a *E. coli* foi amplamente caracterizada em termos de vias metabólicas e biologia molecular, estando disponíveis diferentes métodos para modificação de seu genoma (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). Outra grande vantagem da *E. coli* é a facilidade do seu cultivo, com rápido crescimento e alta produção da proteína heteróloga, proporcionando elevadas produtividades (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). Atualmente, diversas cepas estão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes, tanto no citoplasma quanto no periplasma, através de centenas de vetores de expressão com diferentes promotores regulatórios e sequências peptídicas que facilitam o processo de purificação (ALTENBUCHNER e MATTES, 2005). Construções muito empregadas para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* são os vetores de expressão baseados no operon *lac*, onde lactose e/ou IPTG são responsáveis por induzir a transcrição do gene de interesse (SORENSEN e MORTENSEN, 2004). Os protocolos de cultivo para produção de proteínas recombinantes sob controle do operador *lac* são bem conhecidos e vêm sendo aplicados em vários estudos (SHILOACH e FASS, 2005; SHOJAOSADATI et al., 2008; KHALILZADEH et al., 2004). Dessa forma, em virtude das vantagens acima descritas para a *E. coli*, opta-se, preferencialmente, dependendo da natureza da proteína a ser expressa, pela utilização desse microrganismo como sistema de expressão.

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de *Escherichia coli*.



Fonte:

[http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e\\_coli.jpg](http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e_coli.jpg)

## **2.2. Biorreator tipo tanque agitado e aerado e sua aplicação em cultivos de alta densidade de *Escherichia coli***

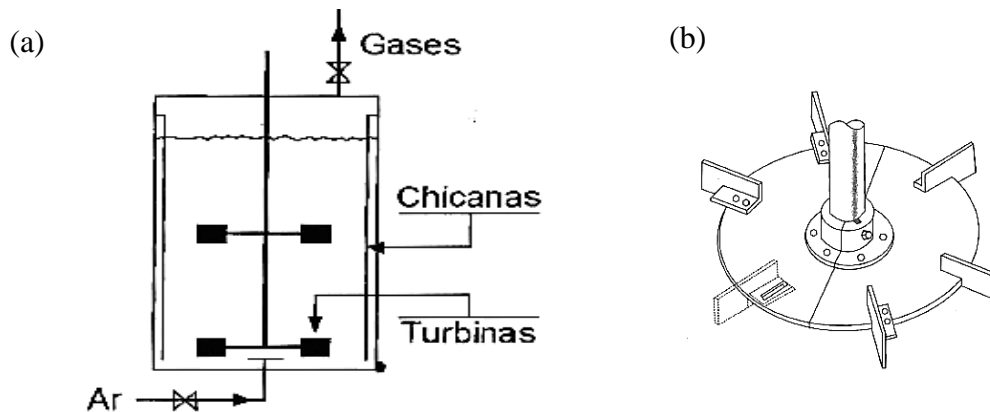
Na descrição padrão (SCHMIDELL et al., 2001), o reator tipo tanque agitado e aerado - Figura 2 (a) - consiste em um tanque cilíndrico com altura do líquido igual ao diâmetro do recipiente, possuindo, disposta no seu eixo central, uma série de impelidores tipo “turbina com 6 pás planas” (tipo Rushton) - Figura 2 (b) - com diâmetro igual a 1/3 do diâmetro do tanque. Com o intuito de evitar a formação de vórtice, são utilizadas internamente no reator 4 chicanas, diametralmente opostas, cada uma com largura de 1/10 ou 1/12 do diâmetro do tanque. Entretanto, a fim de alcançar uma melhor homogeneização do conteúdo do reator, assim como uma transferência de O<sub>2</sub> mais efetiva, comumente são empregados reatores com dimensões não obedecendo, a rigor, todas as relações geométricas padrões.

Esses reatores apresentam vantagens que fazem deles os mais frequentemente empregados nas indústrias (SCHMIDELL et al., 2001): ampla descrição na literatura no que diz respeito à sua operação e construção, eficiente homogeneização do caldo e alta transferência de O<sub>2</sub>. Como consequência dessas características, cultivos de *E. coli* nesses reatores vêm sendo estudados desde 1970 (SHILOACH e FASS, 2005) com significativos avanços desde então. Concentrações de biomassa da ordem de 110-150 gMS/L são relatadas para cultivos conduzidos em batelada alimentada nesse tipo de biorreator, após períodos variando entre 16 e 40 h de operação (KORZ et al., 1995; SHOJAOSADATI et al., 2008; SARGO, 2011). Com a aplicação da técnica de perfusão associada à operação em batelada alimentada, Markl et al. (1993) conseguiram obter



valores ainda maiores de concentração celular (174 gMS/L) e produtividade (7,3 gMS/L.h).

Figura 2. (a) Esquema de um biorreator tipo tanque agitado e aerado e (b) de uma turbina tipo Rushton.



Fonte: Adaptado de Schmidell et al. (2001).

Uma grande diversidade de proteínas recombinantes, abrangendo desde enzimas, como lipases, penicilina G acilase e celulasas (VÉLEZ et al., 2013; VÉLEZ et al., 2014; DEMAIN e VAISHNAV, 2009) até fragmentos de proteínas imunogênicas (SARGO, 2011; CAMPANI et al., 2012; SILVA et al., 2013a) e outras proteínas de uso farmacológico, como interferon humano, fatores de crescimento humanos e estimuladores de linfócitos (KHALILZADEH et al., 2004; SEEGER et al., 1995, LI et al., 2006; SHOJAOSADATI et al., 2008), vêm sendo produzidas em cultivos de *E. coli* geneticamente modificada conduzidos em biorreatores tipo tanque agitado. As concentrações de proteína recombinante obtidas ao final da fase de indução alcançam até 6 g/L, com produtividades variando entre 0,1 e 2,5 g/L.h, dependendo da complexidade da proteína expressa e da estratégia empregada.

Os excelentes resultados em produção de biomassa e proteína heteróloga mencionados anteriormente foram alcançados graças, em grande parte, às soluções encontradas para os principais desafios enfrentados durante a realização de um cultivo de alta densidade celular em batelada alimentada: fornecimento de O<sub>2</sub> e fonte de carbono em quantidade e velocidade compatíveis com a intensa atividade metabólica das células. A referida atividade metabólica é resultado das inúmeras reações intracelulares que acontecem simultaneamente envolvendo a produção de energia, a

formação de macromoléculas e de novas células, a manutenção das estruturas celulares e a síntese da proteína recombinante, cujos efeitos são amplificados pela alta densidade populacional presente.

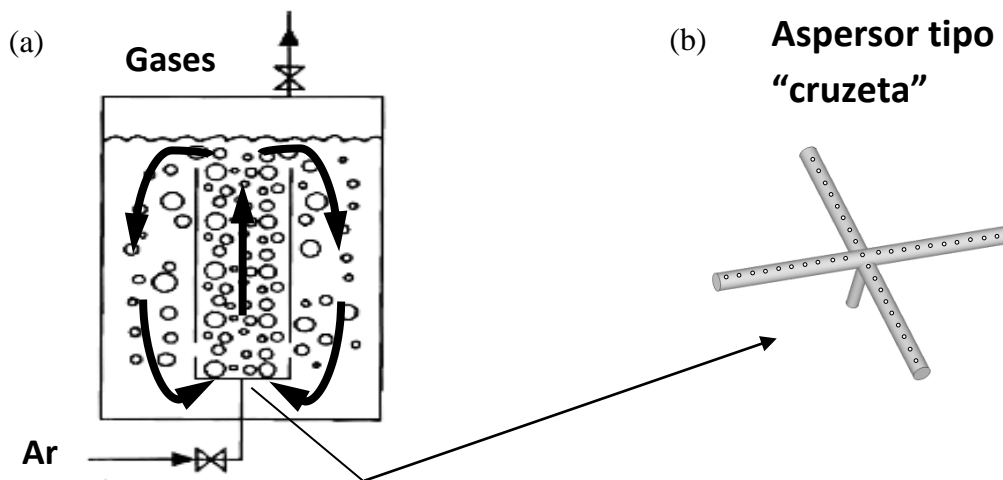
Por isso, há muito investimento em pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de sistemas de supervisão e controle de culturas de *E. coli* em batelada e batelada alimentada. O problema de garantir a manutenção da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido (COD) nos níveis desejados é abordado pela implementação de diferentes estratégias de controle baseadas na manipulação da vazão de ar, da frequência de rotação dos impelidores e do enriquecimento do ar com O<sub>2</sub> (DIAZ et al., 1996; HORTA, 2011). Já para o fornecimento do substrato limitante, principalmente quando a fonte de carbono é a glicose, a estratégia de controle da vazão de alimentação precisa ser cuidadosamente planejada para garantir o suprimento adequado para atender à demanda celular, porém sem acúmulo da fonte de carbono no meio de cultivo. Manutenção de velocidades de crescimento abaixo de um valor crítico (SEEGER et al., 1995; KORZ et al., 1995; KHALILZADEH et al., 2004; LI et al., 2006), monitoramento *on-line* da concentração de glicose e ácidos orgânicos (SHOJAOSADATI et al., 2008) e uso de *softsensors* para estimar a velocidade específica de crescimento (DABROS et al., 2010; HORTA, 2011) são os recursos empregados nas principais estratégias de controle citadas na literatura.

### **2.3. Biorreator pneumático tipo *airlift* e sua aplicação em cultivos de *Escherichia coli***

Dentre os diversos reatores utilizados em bioprocessos, o biorreator *airlift* é um exemplo de reator não convencional que apresenta características instrumentais e de operação bastante interessantes. Existem variantes desses reatores que podem ser classificadas em dois grupos (CHISTI, 1989): *airlift* de circulação externa e o de circulação interna. Na Figura 3 (a), é apresentado o esquema de um biorreator *airlift* de circulação interna de cilíndricos concêntricos. Basicamente, esse reator é composto por um tanque cilíndrico contendo, em seu interior, um tubo concêntrico através do qual, em sua parte inferior, gás é injetado por meio de um aspersor do tipo, por exemplo, “cruzeta”, que pode ser visualizado na Figura 3 (b). A injeção de gás, além de ser responsável pelo fornecimento de O<sub>2</sub> para o bioprocessos,

também gera uma diminuição da densidade da mistura gás-líquido no interior do tubo concêntrico - região de subida (*riser*). Com isso, a maior densidade da mistura gás-líquido na região externa ou anular - região de descida (*downcomer*) - impulsiona o caldo para baixo, promovendo a recirculação do meio reacional, como destacado na Figura 3 (a), fazendo com que haja a mistura e a circulação da suspensão dentro do biorreator.

Figura 3. (a) Biorreator pneumático tipo *airlift* e (b) aspersor de gás tipo “cruzeta”.



Fonte: (a) Adaptado de Schmidell et al. (2001) e (b) elaboração própria.

De forma geral, a menor complexidade de construção devido à ausência de partes móveis, o menor risco de contaminação decorrente da inexistência do selo mecânico (presente no tanque agitado) e a eficiente dispersão gás-líquido realizada pelo próprio gás de entrada com baixo consumo de energia (ONKEN e WEILAND, 1983), fazem do biorreator *airlift* uma alternativa interessante frente aos reatores convencionais (tipo tanque agitado e aerado).

Diversos cultivos em biorreatores *airlift* de diferentes microrganismos aeróbios, como *Bacillus licheniformis*, *Cephalosporium acremonium*, *Streptomyces nousei*, *Streptomyces clavuligerus*, *Aspergillus niger*, dentre outros, são relatados na literatura (KIM et al., 1997; GAVRILESCU e ROMAN, 1998; CERRI, 2005; THOMASI, 2010). De maneira geral, esses autores constataram que a eficiência da transferência de  $O_2$  (quantidade de  $O_2$  transferido em relação à potência aplicada) nos biorreatores *airlift* é superior à obtida com o tanque agitado e aerado, com significativa

economia de energia. Outra vantagem comumente relacionada ao biorreator *airlift* são as menores tensões de cisalhamento alcançadas no mesmo, dependendo da faixa de operação na vazão de gás, tornando-o altamente recomendado para cultivos de microrganismos mais sensíveis ao cisalhamento (TRAGER et al., 1989; KIM et al., 1997).

Apesar dos aspectos vantajosos mencionados anteriormente em relação ao biorreator *airlift*, poucos estudos sobre a utilização destes reatores em cultivos de *E. coli* são descritos na literatura. Kracke-Helmet et al. (1991) compararam cultivos em batelada alimentada de *E. coli* em biorreator *airlift* de 60 L e em biorreator convencional de 1 L para a produção da proteína cro- $\beta$ -galactosidase. A maior concentração celular obtida no reator *airlift* foi de 6,7 gMS/L (em meio Luria Bertani contendo 65 g/L de glicose) após 60 h de cultivo. Com relação aos dois diferentes biorreatores empregados, os autores verificaram que ambos apresentaram praticamente o mesmo desempenho, exceto pela eficiência da transferência de O<sub>2</sub> em relação à potência fornecida, que foi consideravelmente maior no biorreator *airlift*, de até 35 kgO<sub>2</sub>/kW.h, do que no biorreator convencional, de apenas 2,5 kgO<sub>2</sub>/kW.h.

Janardhan et al. (2007) utilizaram meio complexo M9 modificado nos estudos em biorreatores *airlift* de 3 e 30 L para cultivo de *E. coli* expressando uma proteína recombinante para kit de diagnóstico de filariose linfática. Os cultivos foram realizados em batelada, obtendo-se, após 10 h de cultivo, uma concentração celular de 36,8 gMS/L e uma produção específica de proteína de 8 mg/gMS. A COD foi mantida entre 30 e 80% de saturação por meio da variação da vazão de ar entre 0,5 e 1 vvm. Os demais trabalhos encontrados na literatura envolvendo cultivo de *E. coli* em *airlift*, cujos principais resultados estão descritos na Tabela 1, relatam concentrações celulares máximas de até 19 gMS/L sem o controle da COD.

A pequena quantidade de pesquisas 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, a dificuldade de implementar o modo de operação em batelada alimentada em reatores com volume de 5 L ou menos e a dificuldade de promover a mistura e fornecer O<sub>2</sub> em suspensões com altas concentrações celulares, características de cultivos de *E. coli* expressando proteínas recombinantes. Para minimizar o problema do baixo fornecimento de O<sub>2</sub>, a mesma abordagem atualmente empregada nos cultivos em reator tipo tanque agitado e aerado, o

enriquecimento do ar com  $O_2$ , pode ser facilmente implementada. Outros recursos disponíveis e ainda pouco explorados, como a operação do reator em sobrepressão e a manipulação da temperatura, podem ser incorporados à estratégia de controle da COD.

Tabela 1. Dados de cultivos de *E. coli* em biorreator *airlift* relatados na literatura.

Linagem	Modo de operação	Volume (L)	Controle da COD	Concentração celular máxima (gMS/L)	Produtividade de biomassa (gMS/L.h)	Referência
<i>E. coli</i> K-12 MF	batelada-alimentada	60	ausente	6,7	0,11	Kracke-Helmet et al. (1991)
<i>E. coli</i> JM103	batelada-alimentada	60	ausente	19	0,83	Brandes et al. (1993a)
<i>E. coli</i> JM103	batelada	60	ausente	4	0,18	Brandes et al. (1993b)
<i>E. coli</i> JM103	batelada	60	ausente	11	0,29	Brandes et al. (1993c)
<i>E. coli</i> GJ1158	batelada	3 e 30	30-80% de saturação através da vazão de ar	36,8	3,68	Janardhan et al. (2007)

#### 2.4. Transferência de oxigênio em biorreatores aerados

Do ponto de vista bioquímico, o  $O_2$  é, através da sua redução à água, o último elemento receptor de elétrons ao final da cadeia respiratória, sendo responsável pela oxidação das coenzimas NADH e  $FADH_2$  da glicólise e do ciclo de Krebs. Esse mecanismo possibilita o armazenamento de energia nas células através da conversão de moléculas de ADP em ATP que, por sua vez, suprem energeticamente as reações de síntese de biomoléculas, o que é essencial para a proliferação celular e a geração dos produtos de interesse (SCHMIDELL et al., 2001; BERG et al., 2007). Por outro lado, o fornecimento insuficiente de  $O_2$  para as células direciona parte do fluxo de carbono para o metabolismo fermentativo, causando, no caso da *E. coli*, a produção de acetato, que, em concentrações acima de 5 g/L, diminui a produção de biomassa e da proteína

recombinante (LULI e STROHL, 1990). Com base nessas informações, pode-se afirmar que a disponibilização adequada de O<sub>2</sub> dissolvido para as células durante o cultivo é fundamental para o sucesso de um bioprocessamento aeróbio.

Entretanto, como relatado na seção 2.3, a baixa transferência de O<sub>2</sub> em biorreatores, especialmente nos pneumáticos, é um grande desafio. Esse problema ocorre basicamente por duas razões: a baixa solubilidade do O<sub>2</sub> em água (7 mg/L em ar atmosférico a 1 atm e 35 °C) e a limitação da transferência de massa por difusão devido à heterogeneidade do sistema formado por gás, líquido (meio de cultivo) e sólido (células). A Figura 4 traz um esquema do trajeto percorrido pelo O<sub>2</sub> da fase gasosa até o seu sítio de reação na célula.

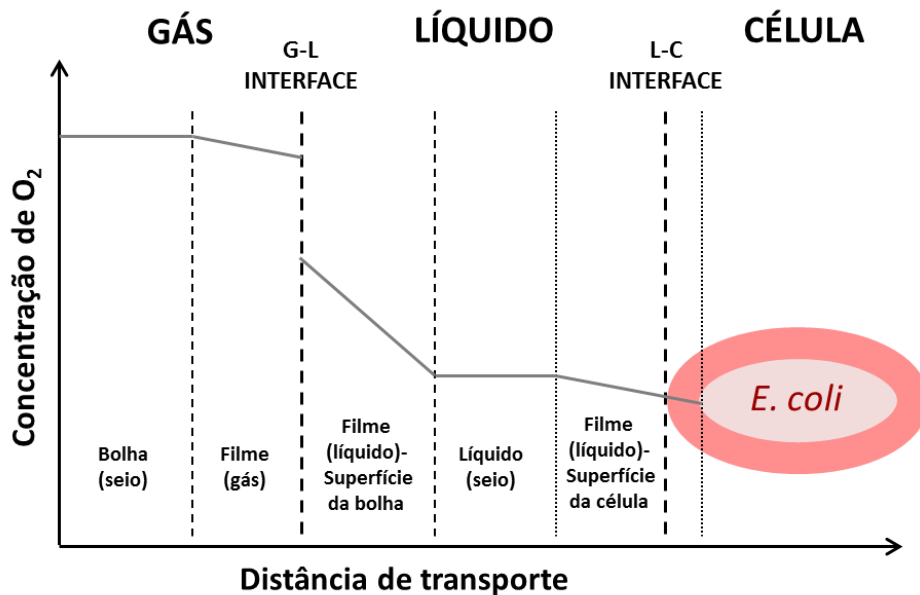
Com boa aproximação, pode-se supor que a etapa limitante no processo de transferência de O<sub>2</sub> ocorre no filme líquido estagnado ao redor da superfície da bolha de gás. Como consequência, a velocidade volumétrica de transferência de O<sub>2</sub> -  $NO_2$  (mmol/m<sup>3</sup>.s) - pode ser descrita matematicamente através da Equação 1 abaixo (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009).

$$NO_2 = n_{O_2} \cdot a = k_L a \cdot (C^* - C) \quad (1)$$

onde  $n_{O_2}$  é fluxo de O<sub>2</sub> (mmol/m<sup>2</sup>.s),  $k_L a$  o coeficiente volumétrico de transferência de O<sub>2</sub> (s<sup>-1</sup>),  $a$  a área interfacial específica de troca de massa (m<sup>-1</sup>),  $C^*$  a concentração de O<sub>2</sub> na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de O<sub>2</sub> da fase gasosa e  $C$  a concentração de O<sub>2</sub> no seio do líquido.

A Equação 1, embora uma aproximação extremamente simples do fenômeno de transferência de massa, permite uma exata compreensão das alternativas de que se dispõe para o controle da COD no caldo de cultura (SCHMIDELL et al., 2001).

Figura 4. Etapas do processo de transferência de O<sub>2</sub> da fase gasosa para o seu sítio de reação no interior da célula.



Fonte: Elaboração própria.

#### 2.4.1. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de O<sub>2</sub> ( $k_L a$ ) é um parâmetro importante que reflete a capacidade de transferência de O<sub>2</sub> da fase gasosa para o líquido. Segundo a teoria do filme estagnado, o termo  $k_L$ , conhecido como coeficiente de transferência de massa, dado pela Equação 2, é função da espessura da camada de líquido estagnado na superfície da bolha de gás ( $\Delta x_L$ ) e da difusividade molecular do O<sub>2</sub> no líquido ( $D_{O_2/L}$ ) (COULSON e RICHARDSON, 1977). Por outro lado, o fator  $a$  representa a área interfacial específica de troca de massa entre as bolhas de gás e o líquido, dependendo da retenção gasosa global ( $\epsilon$ ) (seção 2.4.2) e do diâmetro médio das bolhas no líquido ( $d_B$ ), de acordo com a Equação 3 (CHISTI, 1989).

$$k_L = \frac{D_{O_2/L}}{\Delta x_L} \quad (2)$$

$$a = \frac{6\epsilon}{d_B(1-\epsilon)} \quad (3)$$

Em vista disso, verifica-se que o produto entre  $k_L$  e  $a$  ( $k_L a$ ) depende do sistema (i. e., propriedades dos fluidos envolvidos), do projeto do biorreator (i. e., tipo de biorreator e sua geometria) e das condições de operação (i. e., agitação e vazão de gás). Logo, estudos sobre a influência dessas variáveis de projeto, operação e sistema sobre o  $k_L a$  são fundamentais no desenvolvimento de estratégias que intensifiquem  $NO_2$  (Equação 1).

#### 2.4.2. Retenção gasosa

A retenção gasosa global ( $\varepsilon$ ) é definida como a fração em volume da fase gasosa na dispersão gás-líquido presente no biorreator (Equação 4). Esse parâmetro é fundamental no processo, pois, em combinação com o diâmetro médio das bolhas, determina a área interfacial de troca de massa entre as fases gasosa e líquida (Equação 3) (CHISTI, 1989). Outro fator importante relacionado à  $\varepsilon$  se refere ao projeto do reator, pois o volume total do vaso deve ser baseado no maior valor de  $\varepsilon$  alcançado na faixa de operação a ser empregada no biorreator.

$$\varepsilon = \frac{V_G}{V_G + V_L} \quad (4)$$

onde  $V_G$  e  $V_L$  são, respectivamente, os volumes de gás e líquido no biorreator.

Entretanto, na prática,  $\varepsilon$  não ultrapassa 0,3 em virtude da coalescência das bolhas à medida que  $\varepsilon$  e, conseqüentemente, a frequência de colisão entre as bolhas aumentam (CHISTI, 1989). Logo, há um limite máximo para  $\varepsilon$ , mesmo empregando estratégias de otimização de geometria e operação do reator.

#### 2.4.3. Estratégias para aumento da transferência de $O_2$ em caldos de cultivo

São relatadas na literatura estratégias para o aumento de  $NO_2$ , como: (i) aumento da vazão de gás, (ii) da frequência de rotação dos impelidores e (iii) da pressão interna do reator e (iv) enriquecimento do gás de entrada com  $O_2$  (DIAZ et al., 1996; HORTA, 2011; KNOLL et al., 2007; LETZEL e STANKIEWICZ, 1999; LETZEL et al., 1999; MATSUI et al., 2006). As variáveis vazão de gás, frequência de rotação dos



impelidores e pressão interna elevam  $k_L a$  tanto pelo aumento de  $k_L$  quanto de  $a$ . A elevação de  $k_L$  é devida à diminuição da espessura do filme de líquido estagnado na superfície das bolhas de gás ocasionada pelo aumento da frequência de agitação e, conseqüentemente, da velocidade de cisalhamento no líquido. Já o aumento de  $a$  é decorrente da maior retenção gasosa e do menor diâmetro médio das bolhas proporcionados pelo aumento da frequência de agitação, da vazão de gás e da pressão interna, de acordo com Letzel e Stankiewicz (1999) e Letzel et al. (1999). A solubilidade do  $O_2$  no líquido ( $C^*$ ), por sua vez, pode ser elevada por meio do aumento da pressão interna do reator ou do enriquecimento do gás de entrada com  $O_2$  puro, que influenciam na pressão parcial de  $O_2$  ( $pO_2$ ) no gás. Portanto, resumindo, verifica-se que existem variáveis do processo que influenciam diretamente os parâmetros  $k_L a$  e  $C^*$  presentes na Equação 1 e, conseqüentemente, que podem elevar a  $NO_2$  no bioprocessamento.

Entretanto, ao se utilizar um reator pneumático, as estratégias mencionadas acima para o aumento da transferência de  $O_2$  podem não ser suficientes para atender à sua alta demanda em bioprocessos aeróbios, especialmente em cultivos de *E. coli*, já que o consumo de  $O_2$  é proporcional à concentração de biomassa presente e à sua velocidade de crescimento. Em vista disso, em condições onde  $NO_2$  alcance um limite operacional, tem-se a possibilidade de manipular outra variável do processo, a temperatura. A diminuição da temperatura, abaixo daquela ótima para o microrganismo, desacelera o metabolismo celular, diminuindo a velocidade específica de crescimento das células (SHULER e KARGI, 2002; SARGO, 2011) e, conseqüentemente, o consumo de  $O_2$ . Em cultivos de alta densidade celular de *E. coli* conduzidos por Sargo (2011), observou-se uma diminuição próxima de 40% na velocidade específica de crescimento através do decréscimo da temperatura de 37 para 30°C.

Por outro lado, a manipulação da temperatura também interfere em  $D_{O_2/L}$  e na solubilidade do  $O_2$  no líquido. No caso da água submetida à pressão atmosférica, a redução da temperatura de 30 para 20°C aumenta a solubilidade do  $O_2$  de 7,56 para 9,09 mg/L, mas reduz a difusividade molecular do  $O_2$  em água -  $D_{O_2/H_2O}$  ( $m^2/s$ ) - e, conseqüentemente,  $k_L$  (Equação 2) em 23%, de acordo com a correlação desenvolvida por Wilke e Chang (1955) (Equação 5). Com isso, a variação predita em  $NO_2$  (Equação 1) se torna praticamente nula. Cálculos realizados para outras faixas de temperatura (entre 40 e 10°C) também indicam a influência desprezível da temperatura sobre  $NO_2$  em água.

$$D_{O_2/H_2O} = 6,74 \cdot 10^{-15} \cdot \frac{T}{\mu} \quad (5)$$

onde T é a temperatura (K) e  $\mu$  a viscosidade dinâmica (Pa.s).

Portanto, pode-se afirmar que a influência da temperatura sobre o consumo celular de  $O_2$  é predominante. Desse modo, com a redução da temperatura associada à manipulação das outras variáveis mencionadas anteriormente, é possível, em princípio, controlar a COD do sistema em um nível ótimo para o bioprocessamento.

#### 2.4.4. Reologia de caldos de cultivo e sua influência sobre a transferência de oxigênio

Para analisar a questão da mistura e da transferência de massa em caldos com média e alta concentração celular, é preciso conhecer o comportamento reológico dessas suspensões ao longo do tempo de cultivo. Isso é fundamental, principalmente, para o projeto de biorreatores e de sistemas de aeração e agitação.

Os caldos de cultura podem ser classificados em duas categorias: (i) fluidos Newtonianos, como água, mel e a maioria dos caldos de bactérias e fungos não filamentosos; (ii) não Newtonianos, como soluções de polissacarídeos e caldos de organismos filamentosos (*Streptomyces*, *Aspergilli* e *Penicillia*).

Os fluidos Newtonianos são caracterizados por apresentar viscosidade dinâmica -  $\mu$  (Pa.s) - constante para uma determinada pressão e temperatura. Com isso, a relação entre a tensão de cisalhamento -  $\tau$  (Pa) - e a velocidade de cisalhamento -  $\dot{\gamma}$  ( $s^{-1}$ ) - é linear, de acordo com a Equação 6.

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (6)$$

Os fluidos não Newtonianos, por outro lado, apresentam a viscosidade dependente de  $\dot{\gamma}$ . Dentre os modelos que descrevem o comportamento dessa classe de fluidos, o de *Herschel-Bulkley* (Equação 7) é o mais geral.

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (7)$$

onde  $\tau_0$  (Pa) é a tensão de cisalhamento inicial,  $K$  (Pa.s<sup>n</sup>) o índice de consistência e  $n$  o índice de comportamento de escoamento.

Em caldos de cultivo, os parâmetros reológicos  $\tau_0$ ,  $K$  e  $n$  do modelo de *Herschel-Bulkley* dependem, essencialmente, da concentração celular, da morfologia das células, da condição de crescimento (e. g., flexibilidade da parede celular), da composição do meio, dentre outros fatores (CHISTI, 1989).

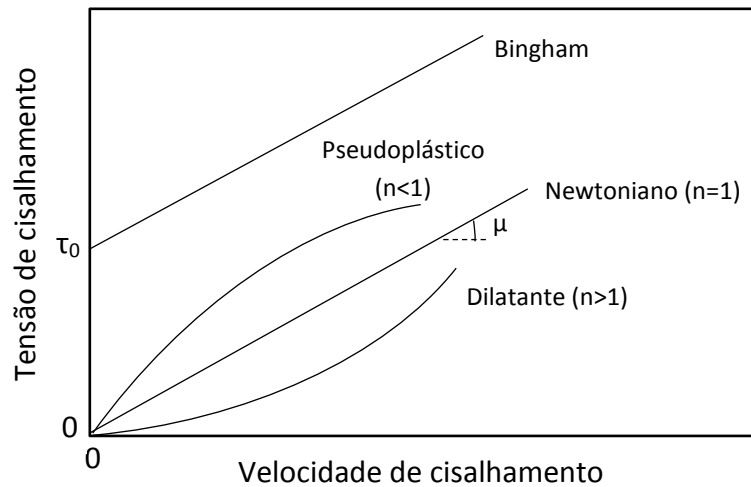
Na Figura 5, estão resumidos os principais comportamentos reológicos observados para fluidos Newtonianos e não Newtonianos.

Para fluidos não Newtonianos, pode-se definir outro parâmetro, a viscosidade aparente -  $\mu_{ap}$  (Pa.s) -, de acordo com a Equação 8. O  $\mu_{ap}$  reflete a relação direta entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento, tendo um sentido físico claro. Entretanto, esse parâmetro depende da velocidade de cisalhamento e, portanto, da condição de operação do biorreator (agitação, vazão de gás etc.). Isso torna o  $\mu_{ap}$  um parâmetro não específico do fluido, mas sim deste associado com o biorreator e as condições de operação empregadas. Com isso,  $\mu_{ap}$  pode variar, em geral, para cada condição de operação do biorreator.

$$\mu_{ap} = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (8)$$

onde  $\tau_0$  (Pa) é a tensão de cisalhamento inicial,  $K$  (Pa.s<sup>n</sup>) o índice de consistência e  $n$  o índice de comportamento de escoamento. Quando  $n$  e  $\tau_0$  são 1 e 0, respectivamente,  $K$  representa o próprio  $\mu$ , recaindo no caso de fluidos Newtonianos (Equação 6).

Figura 5. Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para fluidos Newtonianos e não Newtonianos.



Fonte: Adaptado de Chisti (1989).

Com o intuito de analisar a influência da viscosidade do caldo na transferência de  $O_2$  em biorreator *airlift*, Cerri et al. (2008) ajustaram valores experimentais de  $k_L a$  obtidos para diversas vazões de gás empregando diferentes fluidos Newtonianos, com viscosidades distintas, em modelo proposto por Mehrnia et al. (2005). A correlação encontrada para o *airlift* de cilindros concêntricos de 5 L está descrita na Equação 9 abaixo.

$$k_L a = 0,0013 \cdot U_{GS}^{0,803} \cdot \mu^{-0,492} \quad (9)$$

onde  $U_{GS}$  (m/s) é a velocidade superficial de gás na região de subida.

Como pode ser observado na Equação 9, o  $k_L a$  é proporcional ao  $U_{GS}$  e, conseqüentemente, à vazão de gás, mas inversamente proporcional ao  $\mu$ . Portanto, o aumento da vazão de gás e a diminuição de  $\mu$  favorecem a transferência de  $O_2$  no sistema.

O acompanhamento da reologia durante cultivos de *E. coli* em biorreator tipo tanque agitado e aerado realizados no LaDABio/DEQ-UFSCar mostraram que o caldo de cultura apresenta comportamento Newtoniano, com  $\mu$  abaixo de 2,1 mPa.s, até concentração celular de 59 gMS/L (SILVA et al., 2013b). Esse comportamento

reológico é previsto pela equação de Einstein para suspensões constituídas por partículas esféricas (LOZANO, 1982). Já para concentrações celulares superiores a 60 gMS/L, durante a fase de indução, na qual a proteína de interesse é sintetizada pela célula, a reologia do caldo apresenta comportamento não-Newtoniano descrito pelo modelo de *Herschel-Bulkley* e  $\mu_{ap}$  pode atingir valores de até 45 mPa.s (SILVA et al., 2013b). Portanto, para caldos de cultivo de *rE. coli*, verifica-se que a reologia é influenciada tanto pela concentração como pelo estado fisiológico da célula.

## 2.5. Cultivos de células em biorreatores pressurizados

Dentre as variáveis mencionadas para o controle da COD no meio de cultivo (seção 2.4.3), a manipulação da pressão interna do biorreator merece destaque. De acordo com Letzel et al. (1999), o aumento da pressão interna em um biorreator pneumático tipo coluna de bolhas proporciona, além da elevação de  $pO_2$ , aumento da retenção gasosa na coluna d'água. Essa elevação da retenção gasosa se deve ao aumento do tempo de residência do gás no líquido em virtude da diminuição da velocidade terminal de ascensão das bolhas ( $U_\infty$ ) como consequência da redução do seu diâmetro médio, conforme predito pelo modelo (Equação 10) proposto por Talaia (2008). A redução do diâmetro médio das bolhas, por sua vez, ocorre em razão da elevação da densidade do gás decorrente do aumento da pressão, o que desestabiliza as bolhas com maiores diâmetros (15 a 50 mm), fazendo com que as mesmas se fragmentem em diâmetros menores (WILKINSON e DIERENDONCK, 1990; LETZEL et al., 1999). Segundo Kitscha e Kocamustafaogullari (1989), esse efeito pode ser explicado através da instabilidade hidrodinâmica de Kelvin-Helmholtz, conforme descrito no Apêndice A.

$$U_\infty = 0,694 \cdot \sqrt{\frac{g \cdot d_B \cdot (\rho_L - \rho_g)}{\rho_l}} \quad (10)$$

onde  $d_B$  é o diâmetro médio das bolhas de gás,  $\rho_L$  a densidade da fase líquida e  $\rho_g$  a densidade da fase gasosa.

Tem-se, com isso, a elevação da área interfacial específica de troca de massa, facilitando a transferência de massa entre as fases gasosa e líquida. Ademais, outra grande vantagem é que essa estratégia é de fácil implementação em um reator

apropriado e, ao contrário das demais, acarreta em poucos custos adicionais no processo.

Na literatura, existem alguns trabalhos acerca do cultivo de *E. coli* em biorreatores pressurizados com o propósito de aumentar a transferência de  $O_2$  no bioprocesso. As pressões empregadas nesses trabalhos estão na faixa de 0-10 bar, o que, segundo ZoBell e Johnson (1949), não afeta diretamente o crescimento celular da *E. coli*, cujo metabolismo é insensível a pressões de até ~ 300 bar. Por outro lado, pressões superiores podem afetar reações metabólicas devido à dissociação ou mudança de conformação de enzimas presentes nas células (ZOBELL e JOHNSON, 1949). Outro problema associado com a operação de biorreatores em sobrepressão é o aumento da solubilidade do  $CO_2$  no líquido. Concentrações de  $CO_2$  dissolvido acima de certo nível podem afetar o bioprocesso em vários aspectos, entre eles: (i) efeito sobre a membrana celular do microrganismo, interferindo na divisão celular e em transportes transmembrana; (ii) acidificação do caldo de cultivo; (iii) efeito sobre as reações celulares de carboxilação/descarboxilação; (iv) alteração de propriedades físico-químicas de enzimas celulares, afetando suas funções (DIXON e KELL, 1989).

Knoll et al. (2007) estudaram o efeito da sobrepressão em cultivo de *E. coli* em tanque agitado e aerado de 50 L operado em batelada alimentada utilizando meio definido contendo glicerol como fonte de carbono. Os autores alcançaram 40 gMS/L de *E. coli* utilizando o sistema não pressurizado, havendo, além dessa concentração celular, restrição do crescimento por insuficiência na transferência de  $O_2$ . Já no reator operado com pressão de até 11 bar, houve o fornecimento adequado de  $O_2$  durante todo o cultivo e, como consequência, os autores atingiram 110 gMS/L de *E. coli*. Finalmente, foi relatado que o aumento de  $pCO_2$ , decorrente da sobrepressão no reator, não inibiu perceptivelmente o crescimento celular. Segundo os mesmos autores, os elevados valores de  $pCO_2$  obtidos (0,8 bar) não afetaram visivelmente o crescimento celular devido à manutenção da velocidade específica máxima de crescimento celular em um valor baixo, de até  $0,112\ h^{-1}$ , através da estratégia de alimentação empregada da fonte de carbono.

Matsui et al. (2006) cultivaram *E. coli* no modo batelada alimentada em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 2,6 L utilizando meio definido contendo glicose como fonte de carbono. Entretanto, os autores observaram uma limitação do crescimento celular devido ao aumento de  $pCO_2$  decorrente da sobrepressão no reator.

A solução proposta pelos autores para esse problema foi a de elevar a vazão de gás no reator (de 1 para 6 L/min) concomitantemente ao aumento da pressão (de 1 até 6 bar), a fim de manter a vazão volumétrica de gás constante, evitando o acúmulo de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo. Com isso, foi possível elevar a concentração máxima celular de 80 para 133 gMS/L.

Os mesmos efeitos positivos do emprego de biorreatores pressurizados também se estendem para bioprocessos envolvendo outros microrganismos, como: *Saccharomyces cerevisiae* (BELO et al., 2003), *Yarrowia lipolytica* (LOPES et al., 2009) e *Aureobasidium pullulans* (DUFRESNE et al., 1990). Nesses trabalhos, os autores relatam aumentos de produtividade de biomassa e de produtos de interesse como consequência da utilização de pressões de até 10 bar.

Em suma, verifica-se na literatura, em especial nos trabalhos de Knoll et al. (2007) e Matsui et al. (2006), que o emprego de sobrepressão é uma estratégia válida para a maximização da transferência de O<sub>2</sub> em cultivos de alta densidade celular de *E. coli*. Além disso, também se constatou que o problema do aumento de pCO<sub>2</sub> devido à sobrepressão no reator pode ser solucionado através da elevação concomitante da vazão de gás, de modo a manter a vazão volumétrica de gás constante dentro do reator, o que é suficiente para evitar o acúmulo do CO<sub>2</sub> produzido pelas células no caldo de cultivo.

## **2.6. Controle da concentração de oxigênio dissolvido em cultivos de *E. coli***

A obtenção de processos de alto desempenho depende, essencialmente, do controle adequado das variáveis de processo (BAILEY e OLLIS, 1986). Para isso, são utilizados sistemas de controle automático capazes de processar grandes quantidades de informação com reduzido tempo de atuação, garantindo processos estáveis, seguros, mais econômicos e com alta reprodutibilidade (STEPHANOPOULOS, 1984). No caso específico do controle da COD, a manutenção dessa variável nos valores desejados é essencial para garantir o fornecimento de O<sub>2</sub> necessário para o metabolismo aeróbio da célula.

De maneira geral, um sistema de controle é constituído por quatro elementos: (i) variável(is) a ser(em) controlada(s); (ii) sensores, responsáveis por aferir variáveis (de saída e/ou de entrada) características do processo; (iii) atuadores, que operam nas variáveis manipuladas; (iv) controlador, responsável pela lei de controle que

rege as alterações nas variáveis manipuladas (SCHMIDELL et al., 2001). Dependendo da integração desses elementos, são possíveis três configurações básicas de controle (Figura 6) (STEPHANOPOULOS, 1984):

- a) controle *feedback*: regula a variável controlada com base em sua própria medida, mantendo-a em um valor desejado (*set point*);
- b) controle inferencial: ajusta a variável controlada com base, diferentemente do controle *feedback*, em medidas indiretas dessa variável, a fim de mantê-la em um valor desejado. Essa estrutura de controle é útil em casos onde o sensoriamento da variável controlada é impraticável ou muito custoso, sendo possível inferi-la através de outra medida do processo;
- c) controle *feedforward*: utiliza medidas de variáveis de entrada do processo para regular a variável controlada em um valor desejado com base em um modelo.

Quanto ao controlador, são utilizados, geralmente, duas configurações: *on-off* e PID (proporcional, integral e derivativo). O controlador *on-off* é caracterizado por enviar sinal simples, do tipo liga-desliga, para o atuador, sem valores intermediários. Por outro lado, o controlador PID pode enviar sinais intermediários dentro de uma faixa de valores admissíveis pelo atuador. A lógica de controle PID é caracterizada pela Equação 10 abaixo (SCHMIDELL et al., 2001).

$$m = K_c \cdot e + \frac{1}{T_i} \int e \, dt + T_d \frac{de}{dt} \quad (10)$$

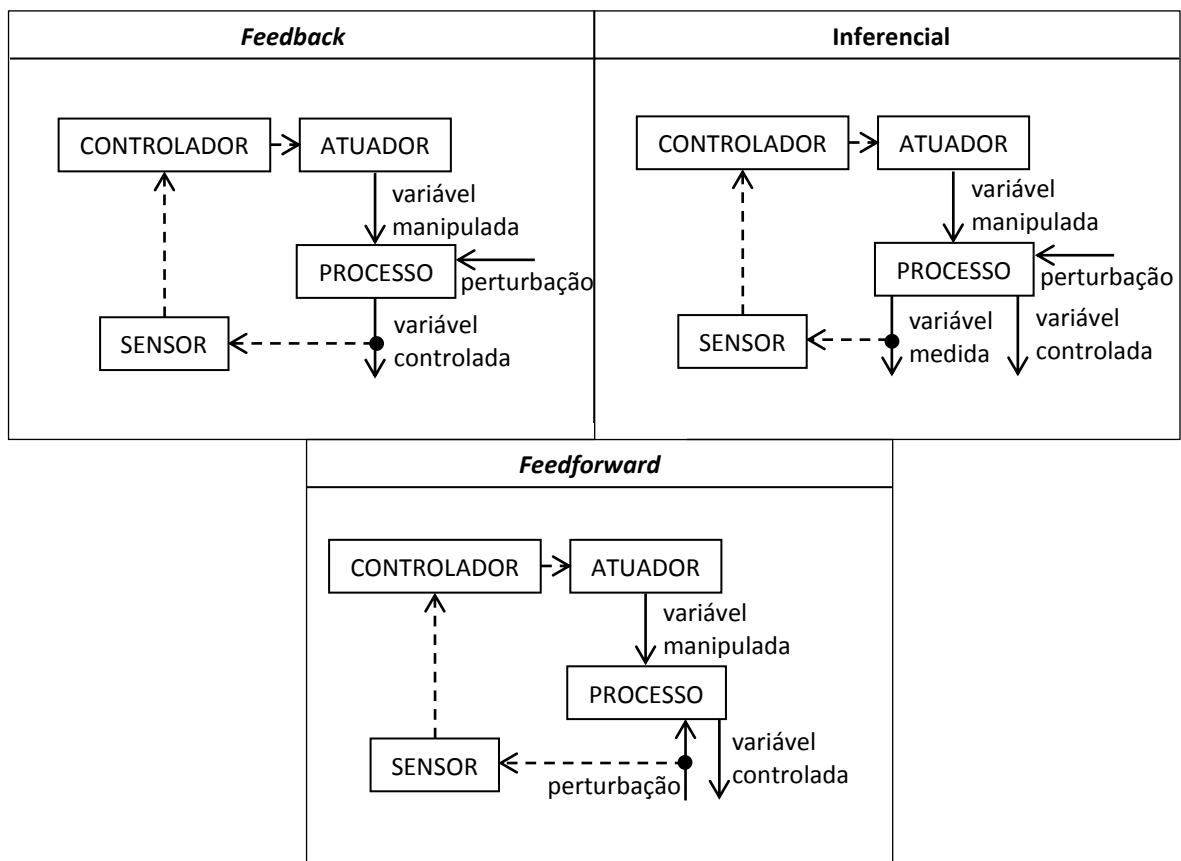
onde  $m$  é o sinal do controlador,  $e$  o erro, ou diferença, entre o valor medido e a referência estabelecida,  $K_c$  o ganho proporcional,  $1/T_i$  o ganho integral e  $T_d$  o ganho derivativo.

O controle PID para a COD emprega, geralmente, as seguintes variáveis manipuladas: frequência de rotação dos impelidores e vazões de ar e de  $O_2$  (DIAZ et al., 1996; HORTA, 2011; JEMAAT et al., 2013; ZWIETERING et al., 1992). Jemaat et al. (2013) empregaram um controlador proporcional e integral (PI) utilizando apenas a vazão de ar como variável manipulada para controlar a COD em processo de tratamento de esgoto em biorreator *airlift* (112 L). Entretanto, duas ou mais variáveis manipuláveis



podem também ser utilizadas conjuntamente em, por exemplo, estrutura do tipo cascata. Esta lógica combina dois controladores individuais, sendo que um, o controlador mestre, é responsável por determinar o valor de referência de outro controlador, o servo (SCHMIDELL et al., 2001). Um exemplo de controlador em cascata para a COD em cultivo de alta densidade de *E. coli* em biorreator convencional (5 L) foi desenvolvido por Horta (2011), onde o controlador mestre foi responsável por alternar a malha interna de controle, possibilitando a manipulação de três variáveis: agitação, vazão de ar e de  $O_2$ . Quando a frequência agitação, regulada por um controlador PID, atingia um valor máximo (ou mínimo), o controlador mestre ativava a malha de controle da vazão de gás (ar e  $O_2$ ), aumentando ou diminuindo o enriquecimento em  $O_2$  do gás de entrada, mas mantendo a vazão total constante.

Figura 6. Configurações básicas de sistemas de controle.



Fonte: Elaboração própria.

Outros controladores mais sofisticados, como os controles preditivo, adaptativo e ótimo são também relatados na literatura para controle de variáveis de bioprocessos. Diaz et al. (1996) desenvolveram um controlador adaptativo-preditivo satisfatório para as concentrações de  $O_2$  e  $CO_2$  dissolvidos durante cultivo de *E. coli* em biorreator convencional (20 L) utilizando como variáveis manipuladas a vazão de ar e a agitação. Zwietering et al. (1992) implementaram um controlador ótimo para a COD em biorreator *airlift* (165 L) empregando as vazões de ar e de  $O_2$  como variáveis manipuladas. Segundo Zwietering et al. (1992), o controlador ótimo desenvolvido apresentou as seguintes vantagens frente à lógica PID: (i) robustez para diferentes condições de operação e geometrias de reator *airlift*; (ii) capacidade de computar ações de controle com base em medidas da COD de diferentes regiões do reator *airlift*, aumentando a homogeneidade da COD em seu interior, especialmente em reatores de grandes dimensões; (iii) presença de função objetivo que possibilita otimizar características econômicas do processo.

## 2.7. Considerações finais

Em síntese, os estudos realizados até o momento mostram que a operação do biorreator em sobrepressão é uma estratégia eficiente para aumentar  $NO_2$ . Porém, em relação aos biorreatores *airlift*, verifica-se a ausência de estudos específicos para a caracterização da transferência de massa nessa condição. Além disso, outro importante apelo para o emprego do reator *airlift* pressurizado é econômico, consistindo numa alternativa de menor custo que o enriquecimento do ar com  $O_2$ , normalmente empregado nos reatores convencionais para garantir o suprimento de  $O_2$  frente ao seu elevado consumo observado, por exemplo, nos cultivos de *E. coli*. Os biorreatores *airlift* são conhecidos pela alta eficiência energética que, aliada à operação em sobrepressão, reduziria ainda mais os custos do processo de produção da biomassa. Outro aspecto ainda pouco explorado na literatura é o controle da COD em reatores *airlift*, que fica restrito à manipulação das vazões de ar e  $O_2$ . A inclusão da pressão e da temperatura como variáveis manipuladas adicionais representa uma ampliação das possibilidades de desenvolvimento de algoritmos para controle integrado da COD em reatores *airlift*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Microrganismo

Para os ensaios em biorreator *airlift*, foram utilizados os seguintes microrganismos: (i) *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®); (ii) *Escherichia coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA4Pro, que expressa um fragmento da proteína imunogênica PspA (PspA4Pro) presente na parede celular do procarioto *Streptococcus pneumoniae*. Esta construção foi obtida no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan pela pesquisadora Dra. Eliane N. Miyaji. O plasmídeo pET37b+ contém o promotor T7 (induzido por IPTG ou lactose) e gene de resistência à canamicina.

Já para o cultivo realizado em biorreator convencional, foi utilizada a *Escherichia coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA94/His-Tag, que expressa outro fragmento da proteína imunogênica PspA, a PspA94, contendo cauda de histidina. Esta construção foi obtida no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan pela aluna de doutorado Cibelly Goulart, sob orientação da pesquisadora Dra. Luciana C. C. Leite.

##### 3.1.2. Meios de cultura

Para os ensaios com *Escherichia coli*, foram utilizados meios de cultivo complexos (STUDIER, 2005) adaptados por Santos (2012). As composições dos meios de cultivo para frasco agitado e biorreator estão apresentadas na Tabela 2. No cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, foi empregado o meio complexo descrito por Badino e Hokka (1999) (Tabela 3).

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo complexos para os ensaios com *E. coli* em câmara incubadora e em biorreator.

Componente	Câmara incubadora	Autoindução (biorreator)
Glicose	0,5 g/L	10 g/L
Glicerol	5 g/L	60 g/L
Lactose	--	20 g/L*
Triptona/Phytone	10 g/L	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L	5 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 g/L	9 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4 g/L	3,4 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	2,7 g/L	2,7 g/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7 g/L	0,7 g/L
Fe(III)citrato	100,8 mg/L	100,8 mg/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,5 mg/L	2,5 mg/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	15 mg/L	15 mg/L
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5 mg/L	1,5 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg/L	3 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,1 mg/L	2,1 mg/L
Zn(CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	33,8 mg/L	33,8 mg/L
EDTA	14,1 mg/L	14,1 mg/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L	0,5 g/L
Tiamina	45 mg/L	45 mg/L
Canamicina	100 mg/L	100 mg/L
Polipropilenoglicol (30% v/v)	1 mL/L	1 mL/L
pH	6,7	6,7

\* Ausente no ensaio em biorreator convencional, cuja indução foi realizada através de dois pulsos de IPTG, um de 1mM e outro de 0,5mM, espaçados em 1h.

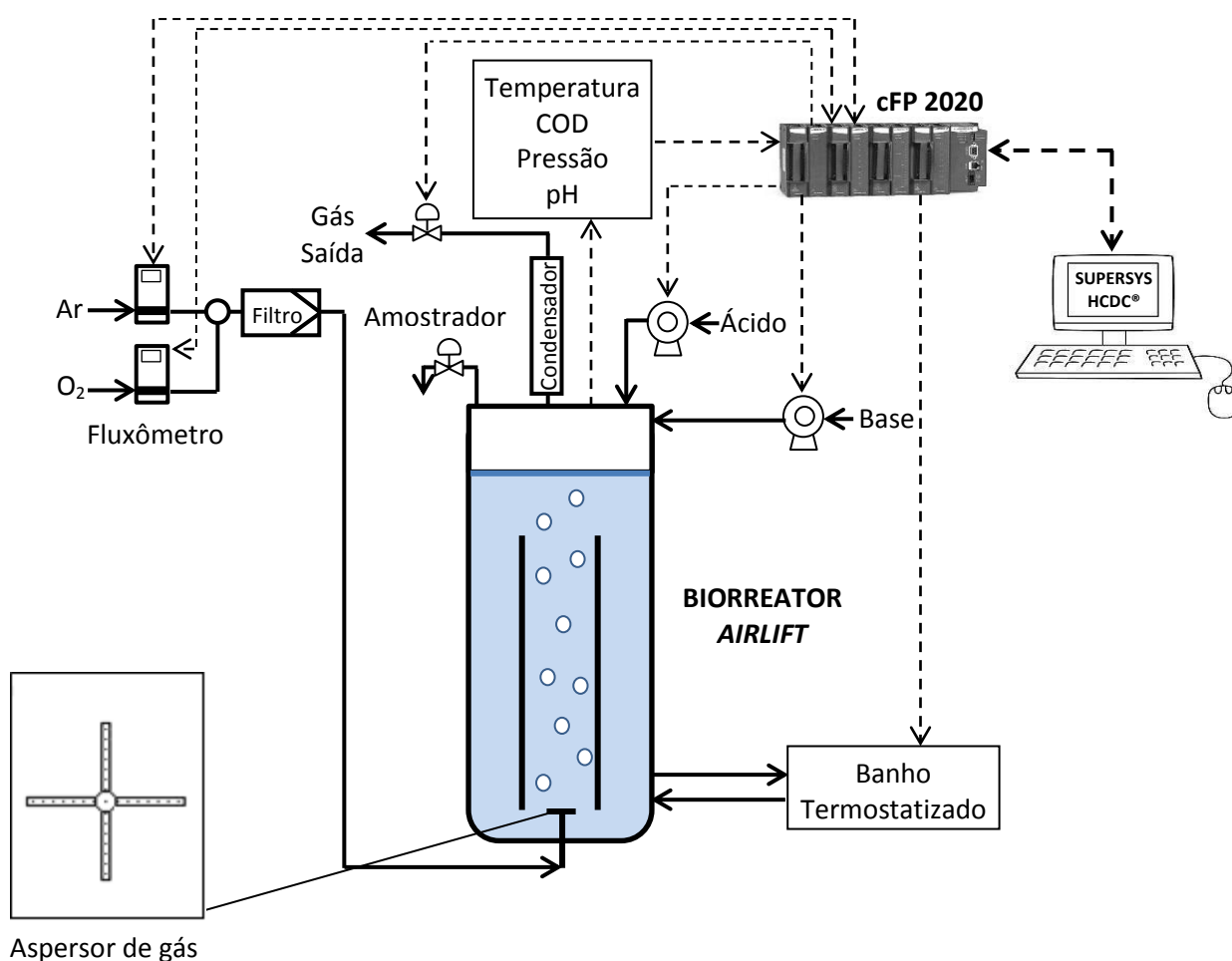
Tabela 3. Composição do meio de cultura utilizado para o cultivo de *S. cerevisiae*.

Componente	Concentração
sacarose	50 g/L
extrato levedura	4,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5 g/L
propilenoglicol 30% (antiespumante)	5 gotas
pH	4,6

### 3.1.3. Aparato experimental

Os ensaios foram realizados em biorreator encamisado *airlift* de 5 L (BADINO et al., 2004), dotado de controle automático de pH, temperatura, COD (CAMPANI et al., 2013) e pressão, dentre outras funcionalidades. O sistema composto por biorreator *airlift*, linhas de gás e *hardware* de aquisição e controle das variáveis do processo é apresentado na Figura 7 abaixo.

Figura 7. Esquema do aparato experimental utilizado nos cultivos composto por biorreator, linhas de gás e *hardware* de aquisição e controle das variáveis do processo.



Fonte: Elaboração própria.

O aparato experimental esquematizado na Figura 7 é composto por: computador, *software* SUPERSYS HCDC®, desenvolvido em LabVIEW e MATLAB pela equipe de pesquisadores do LADABio/DEQ-UFSCar (HORTA, 2011); compact FieldPoint (cFP 2020 / National Instruments) como conversor A/D e D/A; transmissor de pH (GLI Pro) com aquisição analógica via cFP; pHmetro Redox (3100-32-Pt1000 / Mettler Toledo); transmissor de COD (CE-O2-4050 / Mettler Toledo) com aquisição analógica via cFP; sensor amperométrico de O<sub>2</sub> dissolvido (InPro 6830-12-220 / Mettler Toledo); transmissor de pressão (ISE30A-01-F / SMC) com aquisição analógica via cFP; válvula pneumática proporcional (VY1100-101 / SMC) com aquisição analógica via cFP; banho termostatizado; termopar com aquisição via interface NOVUS®; bombas de ácido (HCl) e base (NH<sub>4</sub>OH) (L/S - Masterflex) com controle *on/off* via computador/cFP; 2 fluxômetros de massa (GFC / AALBORG) empregados para suprir ar e O<sub>2</sub> controlados remotamente via computador/cFP; filtro de ar (Sartofluor 0,2 µm / Sartorius). Os instrumentos listados apresentaram a aquisição de dados em tempo real, com intervalo de salvamento escolhido de 10 segundos.

O ensaio realizado em biorreator convencional contou com sistema similar ao do biorreator *airlift*, como descrito em HORTA (2011) e em SANTOS (2012), com as seguintes diferenças: ausência de controle de pressão e presença de agitação mecânica. O volume útil desse reator convencional é de 5 L (diâmetro de 16 cm e altura de 25 cm) contendo 4 chicanas diametralmente opostas com largura de 1,7 cm. O eixo contém 3 impelidores tipo Rushton com diâmetro de 8 cm e espaçamento entre eles de 9 cm.

## 3.2. Métodos analíticos

### 3.2.1. Acompanhamento do crescimento celular

A avaliação do crescimento celular foi feita através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) utilizando uma pequena alíquota da cultura adequadamente diluída, a fim se obter uma absorbância máxima por volta de 0,8. Para os ensaios em biorreator, foi utilizado também o método da massa seca, onde um volume conhecido do caldo é filtrado em sistema a vácuo através de membrana (poro de 0,22 µm) com massa previamente aferida. A membrana foi então submetida à

secagem a 60°C por 48 h. A diferença entre as massas da membrana antes e depois do procedimento de filtragem foi utilizada para o cálculo da concentração celular -  $C_x$  (gMS/L) - da amostra que, por sua vez, apresenta correlação linear com  $DO_{600nm}$  (Equação 11).

$$C_x = \alpha \cdot (DO_{600nm}) \quad (11)$$

onde  $\alpha$  (gMS/L) é a constante de correlação entre  $DO_{600nm}$  e  $C_x$ . O valor de  $\alpha$  foi determinado para cada cultivo do microrganismo em biorreator.

A partir dos valores de  $C_x$ , foi possível calcular a produtividade de biomassa -  $P_x$  (gMS/L.h) - utilizando a Equação 12.

$$P_x \left( \frac{gMS}{L.h} \right) = \frac{C_x}{\Delta t_{total}} \quad (12)$$

onde  $\Delta t_{total}$  é o tempo total de cultivo.

### 3.2.2. Concentração de açúcares e ácidos orgânicos

As análises de glicerol, glicose, lactose e metabólitos (ácidos acético, fórmico e láctico) foram feitas por HPLC (sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) como fase estacionária e uma solução de  $H_2SO_4$  5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L/min, a 50°C.

### 3.2.3. Determinação da estabilidade do plasmídeo

Amostras de 100  $\mu$ L da suspensão celular retiradas da cultura de forma estéril foram diluídas entre  $10^6$  e  $10^8$  e semeadas em placas de LB-Ágar sem canamicina. Após 24 h de incubação a 37°C, repicou-se 50 ou mais colônias para placas de LB-Ágar contendo 100 mg/L de canamicina. O mesmo também se aplicou para placas idênticas, mas sem o antibiótico (controle). As porcentagens de colônias que cresceram nas placas com o antibiótico em relação às placas controle foram calculadas a

fim de se obter uma estimativa da estabilidade plasmidial. Essa estabilidade, que é essencial para a produção da proteína recombinante, foi determinada ao longo da fase de indução.

### 3.2.4. Quantificação da produção de PspA

Alíquotas retiradas durante os cultivos foram centrifugadas e os corpos de fundo ressuspensos em tampão tris (tris 20 mM, NaCl 250 mM e pH 8,0). Essas suspensões foram submetidas a processo de rompimento celular por sonicação (5 minutos, com pulsos ON/OFF de 30 s, amplitude de 20%, 130 W e 20 kHz). Centrifugaram-se os extratos brutos resultantes a fim de separar os componentes intracelulares solúveis (sobrenadante) dos insolúveis (corpo de fundo). Os sobrenadantes foram submetidos ao procedimento desenvolvido por Bradford (1976) para a determinação da concentração das proteínas totais solúveis ( $C_P$ ).

O próximo passo foi estimar a quantidade de PspA presente no total de proteínas solúveis quantificadas pelo método de Bradford. Para isso, alíquotas dos sobrenadantes quantificados foram analisadas por eletroforese, como descrito por Laemmli et al. (1970), empregando-se gel de poliacrilamida a 12%. Ao final do procedimento de deslocamento das proteínas através do gel, corou-se o mesmo com corante Coomassie Blue. Depois de corado o gel, a imagem do mesmo foi digitalizada e analisada pelo *software* ImageJ. Finalmente, considerou-se que a intensidade da banda de PspA ( $I_{PspA}$ ) em relação à soma das intensidades de todas as bandas da amostra presentes no gel ( $\sum_j I_j$ ) é igual à porcentagem mássica de PspA dentre todas as proteínas intracelulares solúveis presentes na célula. A partir desses dados, foi possível calcular a concentração de PspA solúvel ( $C_{PspA}$ ) (Equação 13) e, conseqüentemente, a produção específica -  $Y_{PspA/X}$  (mgPspA/gMS) - e a produtividade -  $P_{PspA}$  (mgPspA/L.h) -, ambas de PspA solúvel, através das Equações 14 e 15, respectivamente.

$$C_{PspA} = \frac{I_{PspA}}{\sum_j I_j} \cdot C_P \quad (13)$$

$$Y_{PspA/X} \left( \frac{mg \text{ PspA}}{g \text{ DCW}} \right) = \frac{C_{PspA}}{C_X} \quad (14)$$



$$P_{PspA} \left( \frac{mg \text{ PspA}}{L.h} \right) = \frac{Y_{PspA/X} \cdot C_x}{\Delta t_{total}} \quad (15)$$

### 3.2.5. Determinação da retenção gasosa

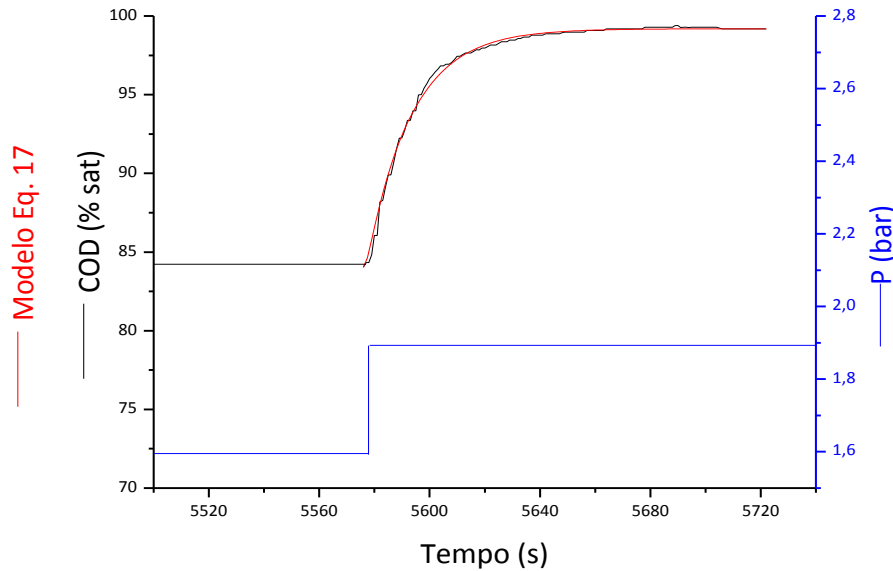
Para a determinação da retenção gasosa global ( $\varepsilon$ ), foi empregado o método de expansão volumétrica, onde foram realizadas medidas da altura do líquido aerado ( $h_D$ ) e não aerado ( $h_L$ ) dentro do biorreator. A partir desses valores, determinou-se  $\varepsilon$  através da Equação 16.

$$\varepsilon = \frac{h_D - h_L}{h_D} \quad (16)$$

### 3.2.6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Uma vez que há um sistema de controle de pressão no biorreator, o método aplicado para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de  $O_2$  ( $k_L a$ ) foi o dinâmico por degrau de pressão (LINEK et al., 1989), onde se promove um aumento da COD através da elevação da pressão em, aproximadamente, 15%. Através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963), o valor de  $k_L a$  foi obtido ajustando a Equação 17 aos dados da COD medida pelo sensor em função do tempo após o aumento abrupto da pressão, como exemplificado na Figura 8. A Equação 17 foi obtida através da normalização da Equação 32 (Apêndice B), ou seja, da divisão da Equação 32 pelo seu valor máximo,  $C_{eS}$ .

Figura 8. Exemplo de ajuste do modelo (Eq. 17) aos dados da COD em função do tempo após aumento da pressão em, aproximadamente, 20%.



$$COD = \frac{C_{e0}}{C_{eS}} \cdot e^{-k_e \cdot (t-t_0)} + (1 - e^{-k_e \cdot (t-t_0)}) + \frac{k_e \cdot (1 - \frac{C_{e0}}{C_{eS}})}{k_e - k_{La}} \cdot (e^{-k_e \cdot (t-t_0)} - e^{-k_{La} \cdot (t-t_0)}) \quad (17)$$

onde  $C_e$  é a concentração de  $O_2$  dissolvido medida pelo sensor,  $C_{e0}$  a concentração de  $O_2$  dissolvido medida pelo sensor no instante inicial,  $C_{eS}$  a concentração final de saturação de  $O_2$  dissolvido medida pelo sensor,  $k_e$  a constante de atraso do sensor estimada juntamente com o  $k_{La}$  pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963) e  $(t - t_0)$  o intervalo de tempo transcorrido para a realização da medida.

### 3.2.7. Acompanhamento do comportamento reológico do caldo de cultivo

Para avaliação do comportamento reológico do caldo de cultivo durante a fase de indução, utilizou-se um reômetro de cilindros concêntricos (DC-III+/Brookfield). Através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963), o modelo de *Herschel-Bulkley* (Equação 7) (seção 2.4.4) foi ajustado aos dados de  $\dot{\gamma}$  e  $\tau$  medidos. Com isso, foram obtidos os valores dos

parâmetros  $n$ ,  $K$  e  $\tau_0$  para cada amostra. Finalmente, através da Equação 8 e com base nesses parâmetros, foi calculado  $\mu_{ap}$  adotando  $\dot{\gamma}$  correspondente à condição de operação do *airlift*.

### 3.2.8. Acompanhamento da morfologia celular

A fim de complementar a análise da reologia do caldo de cultivo de *E. coli* no *airlift* pressurizado, foi realizado o acompanhamento da morfologia celular em microscópio ótico das suspensões retiradas no decorrer do cultivo e tratadas pelo método de Gram (KYLE et al., 2012). As lâminas bacteriológicas foram então examinadas usando um microscópio ótico (Olympus BX50), sob uma ampliação de 400 vezes com sistema acoplado de aquisição digital de imagens.

## 3.3. Procedimento experimental

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida em etapas sucessivas. Iniciou-se com o projeto e construção do biorreator *airlift* para operação em sobrepressão, incluindo também a adequação dos equipamentos periféricos e do *software* de monitoramento (1ª etapa do projeto). De posse do equipamento, foram iniciados os experimentos de caracterização da transferência de  $O_2$  em sobrepressão (2ª etapa do projeto). Finalmente, na 3ª etapa do projeto, o reator foi inicialmente testado em cultivo de *S. cerevisiae* e, posteriormente, o mesmo foi empregado em cultivos de *E. coli* a fim de avaliar o seu desempenho.

### 3.3.1. Caracterização da transferência de oxigênio em sobrepressão

Foram realizados 22 experimentos em triplicata empregando o biorreator *airlift* adaptado para operação em sobrepressão, sob diferentes condições de aeração no reator (2, 3 e 4 vvm) e de pressão interna (1, 2, 3 e 4 bar), utilizando água destilada e meio de cultivo complexo de autoindução como fase líquida (Tabela 2), conforme detalhado na Tabela 4. A transferência de  $O_2$  foi caracterizada por meio da determinação de  $k_{La}$  (seção 3.2.6) e de  $\varepsilon$  (seção 3.2.5). Como o sensor de  $O_2$  dissolvido utilizado é incapaz de aferir adequadamente a COD para valores acima da saturação

com ar à pressão atmosférica ( $p_{O_2}$  de 0,21 bar), para a determinação de  $k_La$  nas pressões de 2, 3 e 4 bar foram empregadas misturas de  $N_2$  e ar como gás de entrada, a fim de limitar a pressão parcial de  $O_2$  ( $p_{O_2}$ ) em 0,21 bar. Da mesma forma, para os experimentos realizados nas pressões de 2, 3 e 4 bar, a vazão volumétrica de gás foi mantida constante dentro do reator alterando a vazão mássica em função da pressão empregada de acordo com a equação de estado para gases ideais (Equação 18).

Tabela 4. Condições experimentais empregadas nos experimentos de caracterização da transferência de oxigênio em biorreator *airlift* de (5 L). A temperatura foi controlada em 30°C em todos os experimentos.

Vazão de Gás (vvm)	Pressão (bar)	Fase Líquida	pH
2	1, 2, 3 e 4	água	7,0
3	1, 2, 3 e 4	água	7,0
4	1, 2 e 3	água	7,0
2	1, 2, 3 e 4	meio de cultivo*	6,7
3	1, 2, 3 e 4	meio de cultivo*	6,7
4	1, 2 e 3	meio de cultivo*	6,7

\* Meio de cultivo complexo de autoindução (Tabela 2).

$$Q = \frac{\dot{m}}{P} \cdot \frac{R \cdot T}{MM} \quad (18)$$

onde P (bar) é a pressão absoluta, Q (L/min) a vazão volumétrica de gás,  $\dot{m}$  a vazão mássica de gás (g/min), T (K) a temperatura, MM (g/mol) a massa molar do gás e R (L·bar/K·mol) a constante universal dos gases ideais.

Para avaliar a influência da pressão sobre a transferência de  $O_2$ , ajustou-se a correlação empírica generalizada, representada na Equação 19, aos dados experimentais de  $k_La$  obtidos para as diferentes condições de operação estudadas.

$$k_La = b \cdot Q^c \cdot P^d \quad (19)$$

onde Q ( $m^3/s$ ) é a vazão volumétrica de gás, P (Pa) a pressão absoluta interna do biorreator e  $k_La$  é dado em  $s^{-1}$ . As constantes b ( $s^{c-1} \cdot m^{-3 \cdot c} \cdot Pa^{-d}$ ), c e d foram

determinadas através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963).

### **3.3.2. Cultivos em batelada de *S. cerevisiae* e *E. coli***

A seguir, é descrita a metodologia empregada para a realização dos cultivos em batelada de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*.

#### **3.3.2.1. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae***

O cultivo com *S. cerevisiae* foi realizado para testar o biorreator e o sistema de controle SUPERSYS\_HCDC adaptado para o monitoramento do mesmo. O experimento foi efetuado em biorreator *airlift* de bancada de 5 L, dotado de controle automático de pH, temperatura, COD, pressão, dentre outras funcionalidades (seção 3.1.3). As condições do cultivo em batelada empregadas foram: pH de 4,6, COD entre 30 e 50% de saturação (ar à pressão atmosférica e 35°C), temperatura de 35 °C e pressão atmosférica. A inoculação do meio foi realizada através da adição de 5 g/L de fermento biológico fresco (Fleischmann®), acarretando em uma DO<sub>600nm</sub> inicial do caldo de cultura de, aproximadamente, 1.

#### **3.3.2.2. Cultivo de *Escherichia coli***

##### **3.3.2.2.1. Semeadura em meio sólido**

Uma suspensão de células de *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA4Pro (ou PspA94/HisTag) estocadas a -80 °C com 10% v/v de glicerol foi estriada em placa de Petri com LB-Ágar e 100 mg/L de canamicina. Em seguida, a placa foi incubada por 24 h a 37 °C.

##### **3.3.2.2.2. Preparação das pré-culturas (inóculo e pré-inóculo)**

O pré-inóculo foi preparado em erlenmeyer estéril de 500 mL contendo 30 mL de meio complexo para ensaio em câmara incubadora (Tabela 2). Com uma alça

de platina, uma colônia da placa LB-Ágar/canamicina, preparada 24 h antes (seção 3.3.2.2.1), foi transferida para o frasco. Este foi incubado em câmara rotativa a 270 rpm e 37°C por cerca de 5 h. A densidade ótica foi aferida e, com um valor próximo de 2,5, teve início o preparo do inóculo.

O cultivo do inóculo foi iniciado com a adição de 5 mL do pré-inóculo em cada um dos três erlenmeyers estéreis de 500 mL contendo 100 mL de meio complexo para ensaio em câmara incubadora (Tabela 2). A suspensão foi incubada a 270 rpm e 37°C até uma densidade ótica próxima de 2,5, quando foi transferido todo o volume do inóculo para o biorreator.

### 3.3.2.2.3. Cultivos em biorreator

Foram realizados cultivos em batelada, utilizando biorreatores *airlift* ou convencional, ambos de bancada, com 5 L de volume nominal, dotados de controle automático de pH, temperatura, COD, pressão, dentre outras funcionalidades (seção 3.1.3).

O experimento no reator convencional teve como finalidade verificar a influência do valor escolhido como *set point* da COD (30, 20 e 10% de saturação - ar à pressão atmosférica e 31 °C) no crescimento e na formação de produtos e assim identificar a faixa de valores da COD para operação em condições aeróbias. Esta faixa de variação foi então adotada no controle da COD dos cultivos no reator *airlift*. Dois cultivos de *E. coli* foram realizados no reator *airlift*, sendo o primeiro um experimento de referência, conduzido sob pressão atmosférica, e o outro em sobrepressão. Em relação aos organismos, enquanto no biorreator *airlift* cultivou-se o clone PspA4Pro, o reator convencional foi utilizado para cultivo do clone PspA94/HisTag. Ambos os clones foram construídos utilizando a mesma cepa, a *Escherichia coli* BL21(DE3) e, portanto, são fisiologicamente idênticos.

Todos os cultivos foram realizados com volume inicial de 4,7 L de meio complexo de autoindução (Tabela 2), acrescidos de 0,3 L de inóculo com  $DO \cong 2,5$ , cultivado conforme descrito no seção 3.3.2.2.2. As condições de cultivo empregadas foram: temperatura de 31°C (reduzida progressivamente nos ensaios em *airlift*), pH de 6,7 (fase crescimento) e 6,9 (fase de indução), pressão atmosférica (com exceção de um cultivo em *airlift*, seção 4.6, onde foi empregada pressão de até 2,5 bar), COD entre 20

e 50% de saturação (ar à pressão atmosférica e 31°C) para o ensaio em *airlift* e COD de 10, 20 ou 30% no cultivo em biorreator convencional. Para a produção da proteína recombinante, foram empregados como indutores a lactose originalmente presente no meio de autoindução (biorreator *airlift*) e IPTG (biorreator convencional). A fase de indução foi conduzida nas mesmas condições de temperatura adotadas para a fase de crescimento.

Amostras foram retiradas ao longo dos experimentos para a determinação da densidade ótica, da estabilidade do plasmídeo e das concentrações de biomassa, metabólitos, açúcares e da proteína de interesse, conforme as metodologias descritas na seção 3.2.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, nas seções 4.1 e 4.2, são apresentados o projeto do biorreator *airlift* para operação em sobrepressão e a sua caracterização em termos de transferência de O<sub>2</sub>. Ademais, é descrita, na seção 4.3, a adequação do *software* SuperSys\_HCDC® (HORTA, 2011), desenvolvido para reator convencional, a fim de realizar o controle e o monitoramento dos cultivos em reator *airlift*. Na seção 4.4, são apresentados os resultados dos cultivos preliminares realizados em biorreator *airlift* sem sobrepressão, um de *Saccharomyces cerevisiae* e outro de *Escherichia coli*, dedicados ao teste e à avaliação das funcionalidades introduzidas no *software*, bem como à determinação de parâmetros importantes do controle da COD. Posteriormente, na seção 4.5, são relatados os efeitos da redução da COD sobre as células de *E. coli* durante cultivo em biorreator convencional sem sobrepressão. Finalmente, na seção 4.6, são apresentados os resultados do cultivo de *E. coli* realizado em biorreator *airlift* pressurizado.

### 4.1. Adequação do biorreator *airlift*

A operação de um biorreator em sobrepressão exige do mesmo uma resistência mecânica superior à que o vidro pode oferecer. Como o tubo superior do biorreator *airlift* disponível no Departamento de Engenharia Química (UFSCar) foi confeccionado em vidro, foi necessária a adequação do mesmo para inox 316L, mantendo em vidro apenas um visor para a observação do caldo durante os cultivos (cor, formação de espuma etc.). O biorreator *airlift* antes e depois da adequação é apresentado na Figura 9. O vaso foi dimensionado de acordo com o projeto concebido por Badino et al. (2004), com adaptações nas conexões da tampa do biorreator requeridas para operação em sobrepressão, conforme exibido na Figura 10.



Figura 9. Biorreator *airlift* (a) com tubo superior em vidro e (b) em inox 316L.

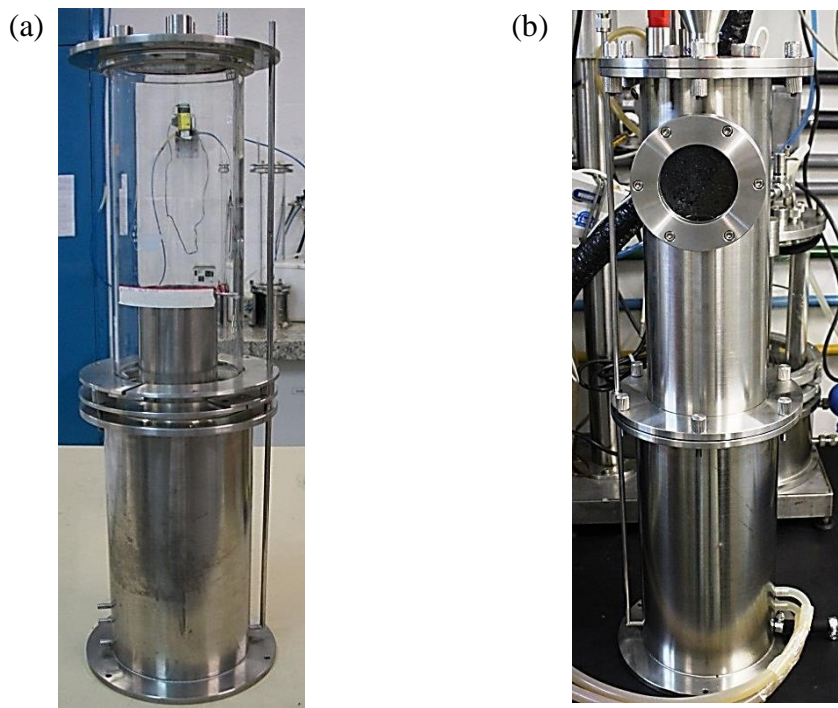
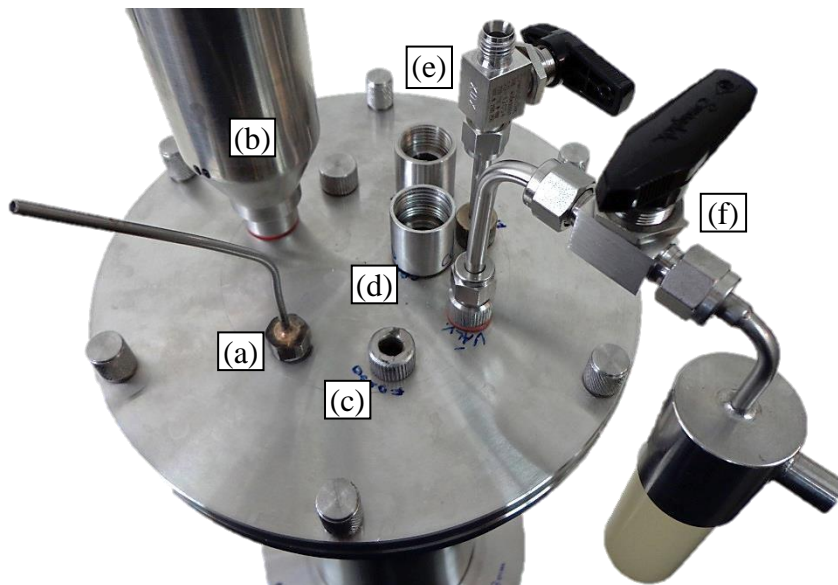


Figura 10. Tampa adaptada para o biorreator *airlift*. Destaque para: (a) entrada de base; (b) condensador do gás de saída; (c) poço para termopar; (d) conexões para os sensores de oxigênio dissolvido e pH; (e) válvula para transferência de meio; (f) válvula para amostragem.



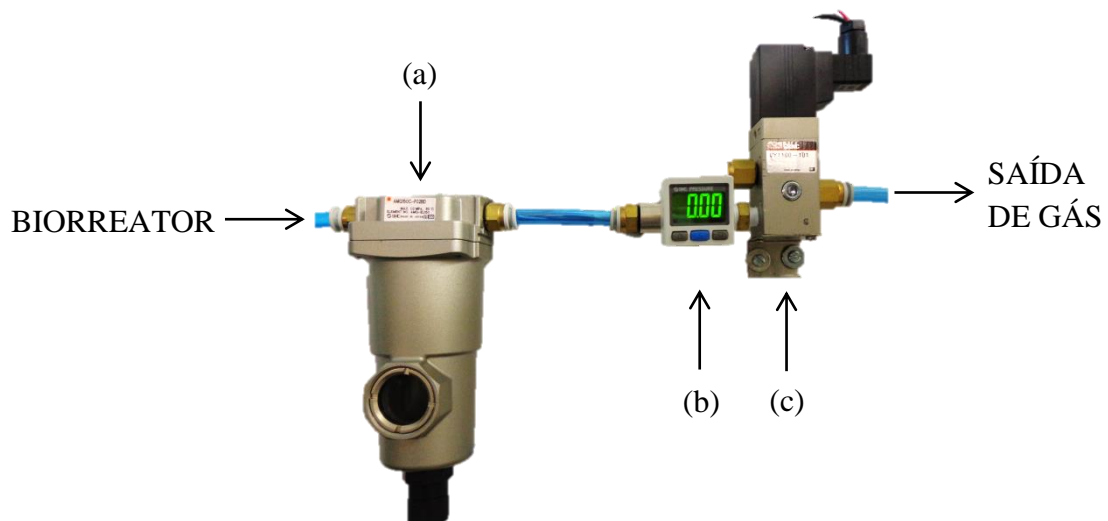
Devido à sobrepressão, o sistema de filtração do gás de entrada foi também modificado. O filtro de ar (Sartofluor 0,2  $\mu\text{m}$  / Sartorius), ilustrado na Figura 11, resistente à pressão de até 5 bar, foi conectado à entrada do biorreator através de conexões do tipo sanitária, “espigão” e baseada em anilha.

Figura 11. Sistema de filtração do gás de entrada do biorreator *airlift*.



O sistema desenvolvido para o controle da pressão apresentado na Figura 12 foi instalado na linha de saída de gás do biorreator. Esse sistema é composto por transmissor de pressão (ISE30A-01-F / SMC), válvula pneumática proporcional (VY1100-101 / SMC) e eliminador de condensado (AMG150C-F02BD / SMC), a fim de evitar que algum líquido atinja a válvula pneumática. A lógica de controle adotada foi a PI.

Figura 12. Sistema de controle de pressão para o biorreator *airlift*. Destaque para: (a) eliminador de condensado; (b) transmissor de pressão; (c) válvula pneumática proporcional.



## 4.2. Caracterização da transferência de oxigênio em biorreator *airlift* com sobrepressão

A partir das Equações 16 e 17, foram estimados os valores de  $\varepsilon$  e de  $k_{La}$  utilizando os dados experimentais obtidos para vazões específicas de gás no biorreator *airlift* de 2, 3 e 4 vvm e de pressão interna de 1, 2 e 3 bar. Para a pressão de 4 bar, as vazões específicas empregadas foram de 2 e 3 vvm. Não foi possível obter os valores de  $\varepsilon$  e de  $k_{La}$  para a vazão de gás de 4 vvm e pressão de 4 bar, uma vez que seria necessário empregar uma vazão mássica superior ao limite de operação dos fluxômetros disponíveis.

Os resultados obtidos para  $k_{La}$  e  $\varepsilon$  em função da pressão, empregando água e meio de cultivo de autoindução (Tabela 2), são apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13. Medidas em triplicata de  $k_{La}$  e  $\varepsilon$  em função da pressão em biorreator *airlift* (5 L) operado com água destilada. As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas de  $\varepsilon$  e ao erro padrão das estimativas de  $k_{La}$ .

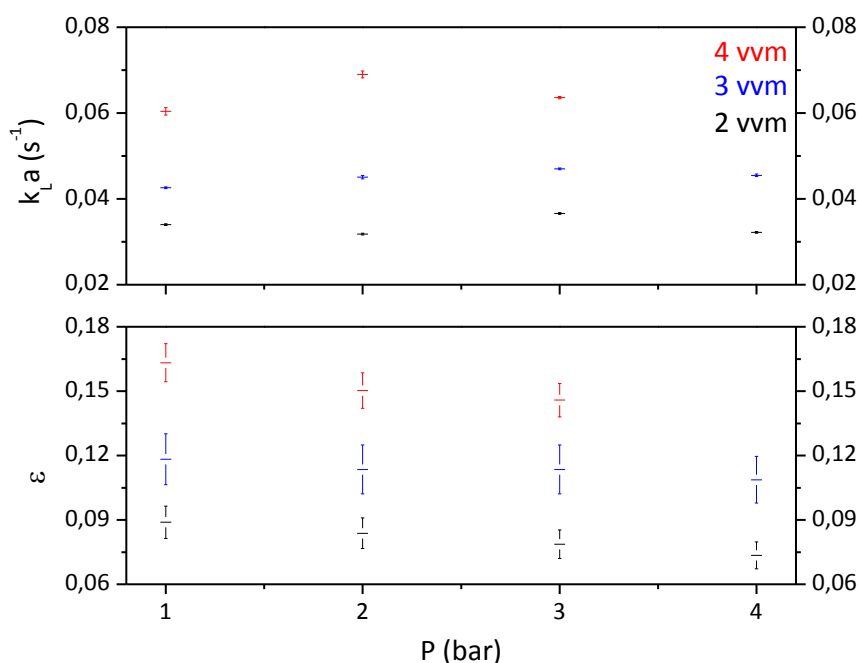
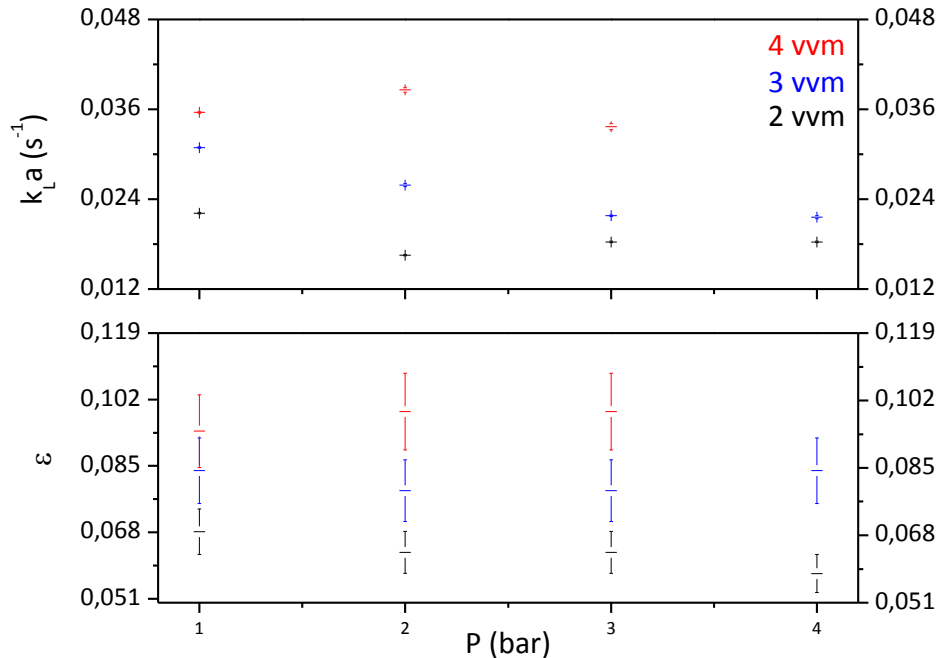


Figura 14. Medidas em triplicata de  $k_{La}$  e  $\epsilon$  em função da pressão em biorreator *airlift* (5 L) operado com meio de cultivo. As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas de  $\epsilon$  e ao erro padrão das estimativas de  $k_{La}$ .



Os dados de  $k_{La}$  apresentados nas Figuras 13 e 14 foram correlacionados com a vazão volumétrica de gás ( $Q$ ) e com a pressão absoluta interna do biorreator ( $P$ ), de acordo com a Equação 19.

Através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963), foram obtidas as seguintes correlações de  $k_{La}$  para o biorreator *airlift* operado com água (Equação 20) e com meio de cultivo (Equação 21).

$$\text{ÁGUA: } k_{La} = 105. Q^{(0,98 \pm 0,09)}. P^{(0,04 \pm 0,04)} \quad (R^2 = 0,93) \quad (20)$$

MEIO DE

$$\text{CULTIVO: } k_{La} = 338. Q^{(0,9 \pm 0,1)}. P^{(-0,15 \pm 0,06)} \quad (R^2 = 0,89) \quad (21)$$

onde as unidades são:  $s^{-1}$  ( $k_{La}$ ),  $m^3/s$  ( $Q$ ) e Pa ( $P$ ).

Analisando as correlações obtidas (Equações 20 e 21), o valor da constante “c” indica que o aumento da vazão de gás atua positivamente no  $k_{La}$ , devido ao aumento de  $\epsilon$ , conforme já relatado em estudo realizado por Cerri (2009). Já o valor

pouco significativo da constante “d”, mostra que a pressão interna do biorreator *airlift* praticamente não afeta o  $k_{La}$ . Na Equação 20 (*airlift* operado com água), o expoente de P é estatisticamente insignificante, uma vez que o seu valor médio é igual ao seu respectivo erro padrão, indicando a irrelevância do efeito da pressão sobre o  $k_{La}$ . Quanto à Equação 21 (*airlift* operado com meio de cultivo), pode-se afirmar, com base na distribuição estatística de Student, que, com 97% de confiança, a média do expoente de P está contida no intervalo [-0,01; 0,31]. Logo, como esse intervalo contém o valor nulo, se constata novamente a insignificância estatística do expoente de P e, conseqüentemente, da influência da pressão sobre o  $k_{La}$ . Os menores valores de  $k_{La}$  e  $\epsilon$  obtidos para o meio de cultivo, em comparação aos determinados em água, devem-se à presença de polipropilenoglicol no meio de cultivo, que aumenta a tensão interfacial do sistema gás-líquido e, conseqüentemente, a coalescência das bolhas de gás.

O fato dos parâmetros  $\epsilon$  e  $k_{La}$  não serem afetados pela sobrepressão no biorreator *airlift* de tubos concêntricos contraria os resultados obtidos em reator tipo coluna de bolhas (LETZEL et al., 1999) e em *airlift* de circulação externa (LETZEL e STANKIEWICS, 1999), onde  $\epsilon$  e  $k_{La}$  aumentaram com a elevação da pressão interna do biorreator.

Conforme descrito na seção 2.5 e no Apêndice A, a elevação da pressão acarreta no aumento da densidade do gás ( $\rho_g$ ) que, por sua vez, desestabiliza as bolhas com maiores diâmetros (15 a 50 mm), fazendo com que as mesmas se fragmentem em diâmetros menores (WILKINSON e DIERENDONCK, 1990). Com isso, há, além do aumento da área interfacial específica de troca de massa, uma diminuição da velocidade terminal de ascensão das bolhas ( $U_\infty$ ), de acordo com a Equação 10 (seção 2.5), e, conseqüentemente, elevação do tempo de residência do gás no líquido, o que eleva  $\epsilon$  e  $k_{La}$ .

Entretanto, esse efeito é considerável apenas para sistemas com elevada velocidade relativa entre as bolhas de gás e a fase líquida ( $U_r$ ), como a alcançada, por exemplo, em reatores tipo coluna de bolhas, próxima de 1,3 m/s (LETZEL et al., 1999). Isso fica evidenciado no trabalho de Letzel e Stankiewicz (1999), no qual é relatado um menor aumento de  $\epsilon$  e  $k_{La}$  com a sobrepressão em *airlift* de circulação externa, onde  $U_r$  é menor (da ordem de 0,4 m/s), em relação ao aumento observado em reator tipo coluna de bolhas. Logo, possivelmente, devido ao baixo  $U_r$  alcançado no biorreator *airlift* de circulação interna (por volta de 0,17 m/s), o efeito da sobrepressão sobre a redução do

diâmetro médio das bolhas e, conseqüentemente, sobre  $\varepsilon$  e  $k_{La}$  é desprezível nesse reator, como evidenciado nas Equações 20 e 21. A estimativa de  $U_r$  para o biorreator *airlift* de circulação interna foi feita através da Equação 22 (JONES, 1985) utilizando os seguintes dados para o *airlift* de 5 L operado com água: velocidade superficial do gás na região de subida ( $U_{GS}$ ) de 0,079 m/s ( $Q=20$  L/min),  $\varepsilon=0,16$  (Figura 13) e velocidade média de circulação do líquido ( $U_L$ ) de 0,27 m/s, obtida por Cerri (2009) para semelhante condição de operação no mesmo reator. Utilizando ainda a Equação 22, os valores de  $U_r$  apresentados para o reator tipo coluna de bolhas e para o *airlift* de circulação externa foram estimados com base nos dados de  $U_{GS}$ ,  $U_L$  e  $\varepsilon$  apresentados por Letzel et al (1999) e Letzel e Stankiewics (1999), respectivamente.

$$U_r = \frac{U_{GS}}{\varepsilon} - U_L \quad (22)$$

A partir do ajuste não linear da Equação 17 aos dados da COD em função do tempo pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963), os valores da constante de atraso do sensor de oxigênio dissolvido ( $k_e$ ) também foram determinados. Os valores estimados para  $k_e$  variaram de 0,07 a 0,65  $s^{-1}$ , possivelmente devido às mudanças nas condições de operação do sensor de  $O_2$  como, principalmente, a pressão. A variação de  $k_e$  também foi relatada por Letzel et al. (1999), numa faixa de 0,1 a 1,7  $s^{-1}$ , para diferentes condições de pressão (1 a 4 bar) e de  $U_{GS}$  (0,01 a 0,29 m/s).

Embora a pressão não afete o  $k_{La}$ ,  $NO_2$  deve aumentar com a pressão devido à elevação da solubilidade do  $O_2$  no líquido. Para verificar isso, foi deduzida, através das Equações 1 (seção 2.4) e 23, a Equação 24 para o valor médio de  $NO_2$  ( $\langle NO_2 \rangle$ ), considerando a variação da COD de 0 a 100% de saturação à pressão de análise.

$$\langle NO_2 \rangle = \frac{\int_0^{C^*} k_L a \cdot (C^* - C) dC}{(C^* - 0)} \quad (23)$$

$$\langle NO_2 \rangle = \frac{\int_0^{C^*} k_L a \cdot (C^* - C) dC}{(C^* - 0)} = \frac{k_L a}{C^*} \cdot \left( C^* \cdot C - \frac{C^2}{2} \right) \Big|_0^{C^*} = \frac{k_L a \cdot C^*}{2} = \left( \frac{k_L a \cdot y_{O_2}}{2 \cdot H_{O_2/\text{água}}} \right) \cdot P \quad (24)$$

onde  $\langle NO_2 \rangle$  é a velocidade volumétrica média de transferência de  $O_2$  ( $\text{mmol/m}^3 \cdot \text{s}$ ),  $C^*$  a concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa ( $\text{mmol/m}^3$ ),  $C$  a concentração de  $O_2$  no seio do líquido ( $\text{mmol/m}^3$ ),  $H_{O_2/\text{água}}$  a constante da Lei de Henry para o sistema oxigênio-água ( $\text{m}^3 \cdot \text{bar}/\text{mmol}$ ),  $y_{O_2}$  a fração molar de  $O_2$  no gás da linha de entrada e  $P$  a pressão absoluta do gás (bar).

Assumindo a independência de  $k_L a$  em relação à pressão, verifica-se, a partir da Equação 24, que  $\langle NO_2 \rangle$  é diretamente proporcional à pressão. Logo, espera-se que a atuação na pressão do biorreator proporcione uma resposta acentuada na transferência de  $O_2$  no processo. A título de exemplo, com uma vazão de gás de 4 vvm, a elevação da pressão de 1 para 3 bar acarreta em um aumento de  $\langle NO_2 \rangle$  de, aproximadamente, 3,2 vezes (de 7,1 para 22,5  $\text{mmol/m}^3 \cdot \text{s}$ ) no *airlift* operado com água. Para a realização desse cálculo, foram utilizados valores de  $k_L a$  determinados no biorreator *airlift* operado com água (Figura 13).

Outra análise realizada foi o cálculo de  $NO_2$  para a condição de cultivo ( $NO_2^c$ ), onde a COD é controlada em 30% de saturação (calibração a 30°C com ar à pressão atmosférica). Diretamente a partir da Equação 1, chegou-se à Equação 25, onde se verifica a proporcionalidade direta entre  $NO_2^c$  e a pressão do biorreator. Nesta equação, considerou-se que o  $k_L a$  não depende da pressão e que a fração molar de  $O_2$  no gás é constante dentro do biorreator e igual à do gás utilizado na calibração do sensor de  $O_2$ . Por exemplo, no caso do biorreator *airlift* operado com vazão de 4 vvm de gás, prevê-se um aumento próximo de 3,7 vezes para  $NO_2^c$  com a elevação da pressão de 1 para 3 bar. Para a realização dessa estimativa, foram utilizados valores de  $k_L a$  obtidos no *airlift* operado com meio de cultivo (Figura 14).

$$NO_2^c = k_L a. (C^* - C) = k_L a. \left[ \left( \frac{y_{O_2}}{H_{O_2/meio}} \cdot P \right) - 0,3 \cdot \left( \frac{y_{O_2}}{H_{O_2/meio}} \cdot 1 \right) \right] = \frac{k_L a \cdot y_{O_2}}{H_{O_2/meio}} \cdot (P - 0,3) \quad (25)$$

onde  $NO_2^c$  é a velocidade volumétrica de transferência de  $O_2$  para a condição de cultivo ( $\text{mmol/m}^3 \cdot \text{s}$ ),  $C^*$  a concentração de  $O_2$  na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa ( $\text{mmol/m}^3$ ),  $C$  a concentração de  $O_2$  no seio do líquido ( $\text{mmol/m}^3$ ),  $H_{O_2/meio}$  a constante da Lei de Henry para o sistema oxigênio-meio de cultivo ( $\text{m}^3 \cdot \text{bar}/\text{mmol}$ ),  $y_{O_2}$  a fração molar de  $O_2$  no gás da linha de entrada e  $P$  a pressão absoluta do gás (bar).

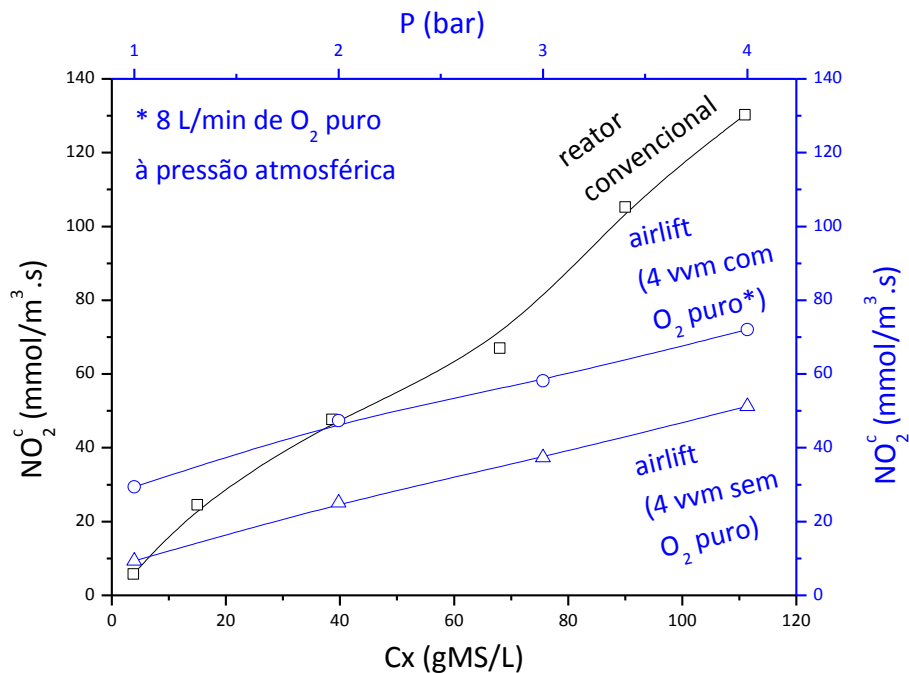
Finalmente, com o intuito de prever a concentração celular ( $C_x$ ) máxima de *E. coli* durante o cultivo na qual a demanda por  $O_2$  seria suprida pela sua transferência ( $NO_2^c$ ) no *airlift*, foram estimados os valores de  $NO_2^c$  em função de  $C_x$  (reator convencional) e de  $P$  (*airlift*), conforme apresentado na Figura 15. Os cálculos de  $NO_2^c$  foram realizados através da Equação 25, considerando a solubilidade do  $O_2$  em água pura a  $30^\circ\text{C}$  ( $H_{O_2/meio}$  de  $0,889 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{bar}/\text{mmol}$ ), com base em dados pré-definidos para o *airlift* ( $NO_2^c$  vs  $P$ ) e dados reais para o reator convencional ( $NO_2^c$  vs  $C_x$ ), obtidos de cultivo de *E. coli* em reator convencional de 5 L operado a  $30^\circ\text{C}$  com meio de cultura quimicamente definido (CAMPANI et al., 2012). Os dados de  $k_L a$  para o reator convencional foram estimados a partir de correlação proposta por Bustamante et al. (2013) (Equação 26) adotando a viscosidade do caldo de cultivo igual à da água ( $\sim 0,001 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ) e as condições de operação (frequência de rotação dos impelidores, QAR e QO2) empregadas para cada  $C_x$ . Já os valores de  $k_L a$  para o biorreator *airlift* foram baseados nos dados aferidos no reator operado com água (Figura 13 e Equação 20). Para fins de comparação,  $NO_2^c$  foi calculado considerando a água pura como fase líquida em ambos os reatores.

$$k_L a = 5,154 \cdot 10^{-3} \cdot N^{0,778} \cdot Q^{0,688} \quad (26)$$

onde  $N$  é a frequência de rotação dos impelidores ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $Q$  a vazão volumétrica de gás ( $\text{m}^3/\text{s}$ ).



Figura 15.  $NO_2^c$  predito em função da concentração celular (reator convencional) e da pressão (*airlift*) com vazão de gás de 4 vvm. Em ambos os reatores, água pura foi adotada como fase líquida.



Analisando a Figura 15, pode-se prever que, operando o reator *airlift* em até 4 bar, é possível alcançar concentrações celulares de *E. coli* de até, aproximadamente, 40 e 60 gMS/L, sem e com enriquecimento do gás de entrada com O<sub>2</sub> puro, respectivamente. Esses valores de  $C_x$  são próximos aos alcançados nos cultivos batelada de *E. coli* em reator convencional (SANTOS, 2012).

De forma geral, os dados obtidos sugerem que a pressurização do biorreator *airlift* durante os cultivos de *E. coli* possibilitará a transferência de O<sub>2</sub> requerida para obtenção de densidades celulares intermediárias, com um menor custo operacional em relação àquele associado ao enriquecimento do gás de entrada com O<sub>2</sub> puro.

#### 4.3. Adequação do *software* para controle da concentração de oxigênio dissolvido

O *software* SuperSys\_HCDC® de controle e monitoramento de cultivos em biorreator convencional, já existente, conta com controle automático da COD através da manipulação das vazões de ar e de O<sub>2</sub> puro e da frequência de rotação dos impelidores (HORTA, 2011). Devido às maiores vazões de gás e à ausência de agitação

mecânica no biorreator *airlift*, foi necessário adequar a lógica de controle da COD no *software*. O algoritmo simplificado (pseudocódigo) para o novo controle automático da COD é apresentado no Quadro 1 abaixo, onde COD\_min e COD\_max correspondem aos limites inferior e superior para a COD, QAR à vazão de ar, QO2 à vazão de O<sub>2</sub>, QGAS\_max e QO2\_max às vazões máximas de gás e de O<sub>2</sub> puro permitidas e ΔAR e ΔO2 aos incrementos nas vazões de ar e de O<sub>2</sub> em cada atuação comandada pelo controlador.

Quadro 1. Pseudocódigo do controle automático da COD através da manipulação de QAR e QO2.

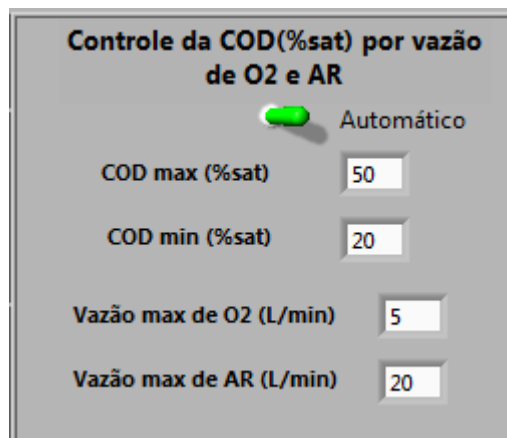
<p><b>Procedimento:</b> Controle concentração de O<sub>2</sub> dissolvido (COD)</p> <p><b>Início</b></p> <p><b>Se</b> COD &lt; COD_min</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>Se</b> (QAR+QO2)=QGAS_max e QO2 &lt;=(QO2_max-ΔO2)</p> <p style="padding-left: 40px;">QO2=QO2+ΔO2</p> <p style="padding-left: 40px;">QAR=QAR-ΔO2</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>Se</b> (QAR+QO2) &lt;=(QGAS_max-ΔAR)</p> <p style="padding-left: 40px;">QAR=QAR+ΔAR</p> <p><b>Se</b> COD &gt; COD_max</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>Se</b> QO2=0</p> <p style="padding-left: 40px;">QAR=QAR-ΔAR</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>Se</b> QO2 &gt;= ΔO2</p> <p style="padding-left: 40px;">QO2=QO2-ΔO2</p> <p style="padding-left: 40px;">QAR=QAR+ΔO2</p>
--

O controle *feedback* descrito acima (Quadro 1) foi implementado em LabVIEW (versão 8.0). A variável controlada é a COD e as variáveis manipuladas são QAR e QO2. O procedimento (*loop*) de controle é efetuado a cada período de tempo fixo, de acordo com o tempo de resposta do sistema determinado em cultivo (seção 4.4). O valor de QO2\_max foi fixado em 8 L/min, devido à limitação da capacidade máxima do fluxômetro utilizado. Os valores para COD\_min e COD\_max adotados foram 20 e 50% de saturação, respectivamente. Os demais parâmetros (QGAS\_max, ΔAR e ΔO2) do controle foram determinados em cultivo (seção 4.4).

A interface em LabVIEW na qual o usuário ativa (ou desativa) o controle automático da COD e acessa as configurações de COD\_max, COD\_min, QGAS\_max e QO2\_max são intuitivas e de fácil acesso, como se pode observar na Figura 16. Vale

ressaltar que o usuário não tem acesso aos demais parâmetros do controle ( $\Delta AR$ ,  $\Delta O_2$  e tempo de atuação) pelo fato de, uma vez determinados os seus valores, não haver necessidade, em princípio, de alterá-los para outros cultivos de *E. coli*.

Figura 16. Interface ao usuário em LabVIEW para as configurações e para a ativação (ou desativação) do controle automático da COD no software SuperSys\_HCDC®.



Embora o *software* SuperSys\_HCDC® possibilitar também o controle automático da pressão e da temperatura no interior do biorreator, a manipulação do *set point* de ambas as variáveis para o controle da COD deve ser feita manualmente.

#### 4.4. Ensaios em biorreator *airlift* sem sobrepressão

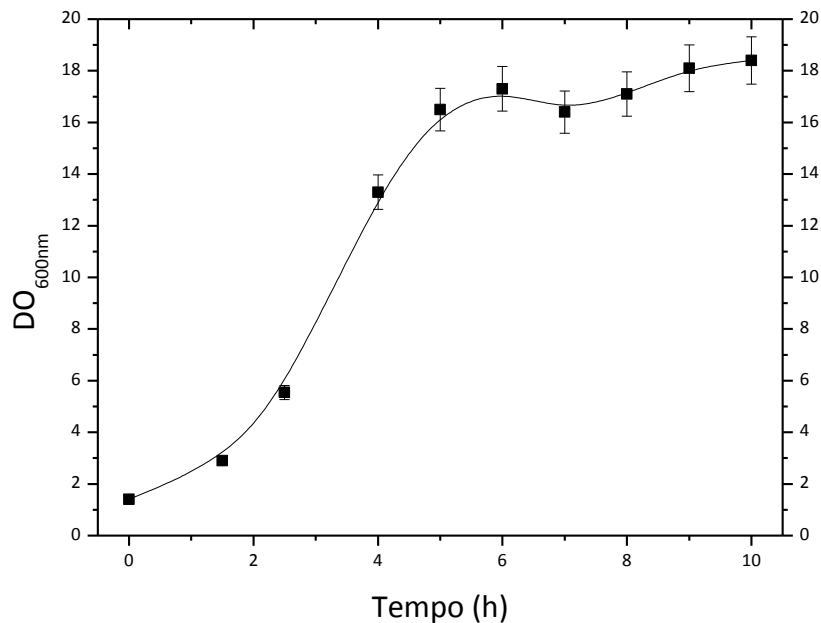
Dois ensaios preliminares foram conduzidos no biorreator *airlift* sem sobrepressão, um com *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação) e outro com *Escherichia coli* (PspA4Pro). O cultivo de *S. cerevisiae*, devido à sua facilidade de execução (sem necessidade de preparo de inóculo e de operação em condições assépticas), teve como objetivos: treinamento na montagem e operação do reator e determinação de parâmetros do controle automático da COD (seção 4.3). Já o cultivo de *E. coli* possibilitou verificar a influência das condições de operação do biorreator *airlift* sobre o crescimento celular e a produção da proteína recombinante (PspA4Pro) pela *E. coli* e determinar os demais parâmetros do controle da COD.

#### 4.4.1. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

O cultivo de *S. cerevisiae* foi conduzido sob as seguintes condições: controle de pH em 4,6 através da adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ou  $\text{HCl}$ ; controle da COD entre 30 e 50% de saturação (ar à pressão atmosférica e  $35\text{ }^\circ\text{C}$ ); controle da temperatura em  $35\text{ }^\circ\text{C}$ . As concentrações iniciais dos componentes utilizados no meio de cultivo estão relacionadas na Tabela 3, seção 3.1.2. O volume da batelada foi de 5 L.

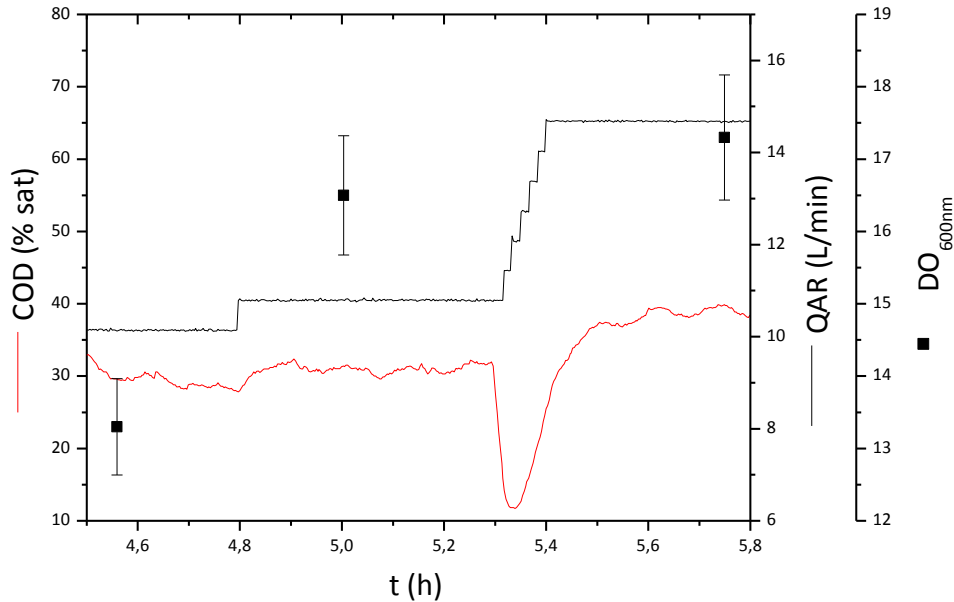
A  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial do caldo de cultura foi de  $1,40 \pm 0,07$  (Figura 17). O crescimento se estabilizou em uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  média de 17 após, aproximadamente, 6 h de cultivo. Em 10 h de cultivo, o ensaio foi finalizado.

Figura 17. Curva de crescimento celular ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de *S. cerevisiae* em cultivo batelada em biorreator *airlift* (5 L) com as seguintes condições: pH de 4,6, COD entre 30 e 50% de saturação e temperatura de  $35\text{ }^\circ\text{C}$ . As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.



Utilizando  $\Delta\text{AR}$  e frequência de atuação iguais a  $0,5\text{ L/min}$  e  $1\text{ iteração}/120\text{ s}$ , respectivamente, obteve-se o perfil apresentado na Figura 18 para a variável controlada (COD) em função da variável manipulada (QAR).

Figura 18. Perfil de resposta da COD com respeito à variação de QAR durante o cultivo em batelada de *S. cerevisiae* e  $DO_{600nm}$  em função do tempo. As condições do cultivo foram: pH de 4,6, COD entre 30 e 50% de saturação e temperatura de 35 °C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.



Na Figura 18, observa-se um trecho do cultivo de *S. cerevisiae* no qual a diminuição da COD, decorrente do maior consumo de  $O_2$  pelas células, acionou o controle de vazão. Este, por sua vez, atuou a cada 120 s, aumentando QAR em intervalos ( $\Delta AR$ ) preestabelecidos de 0,5 L/min. A resposta da COD se mostrou satisfatória com respeito ao tempo de atuação e ao  $\Delta AR$  escolhidos, uma vez que foi possível manter a COD dentro dos limites de 30 a 50% de saturação, exceto em 5,3 h de cultivo, onde a COD ficou momentaneamente abaixo dos 30% de saturação, condição essa necessária para que o sistema de controle atuasse com base no desvio observado.

Em um momento posterior, determinou-se o tempo de resposta da COD, de  $100 \pm 20$  s, resultante da manipulação de QAR. O tempo de resposta adotado foi aquele transcorrido para a COD atingir 95% da variação máxima observada após uma perturbação degrau em QAR. O tempo de resposta da COD é da mesma ordem de grandeza do inverso da frequência de atuação adotada, de 1 iteração/120 s, justificando a sua escolha.

De forma geral, esse cultivo preliminar de *S. cerevisiae* foi útil para testar as metodologias de operação do biorreator *airlift* e a sua compatibilidade com o *software* e toda a instrumentação antes utilizada para o reator convencional, tipo tanque

agitado e aerado. Verificou-se ainda que o novo *loop* implementado para o controle de COD funcionou satisfatoriamente.

#### 4.4.2. Cultivo de *Escherichia coli*

Após o teste de operação do biorreator *airlift* e do sistema de controle da COD no ensaio preliminar com *S. cerevisiae*, foi realizado o primeiro cultivo de *E. coli*. As condições do cultivo foram: controle de pH em 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução) através da adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ou  $\text{HCl}$ ; controle da COD entre 30 e 50% de saturação (ar à pressão atmosférica e  $31^\circ\text{C}$ ) através da manipulação da temperatura e das vazões de ar e de  $\text{O}_2$ ; *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e  $15^\circ\text{C}$ . O meio de cultivo complexo empregado foi o de autoindução, apresentado na Tabela 2, seção 3.1.2. Esse meio de cultivo é capaz de induzir automaticamente a produção da proteína recombinante, no caso a PspA, a partir do instante em que a glicose, fonte de carbono primária para a *E. coli* e repressora da síntese da proteína recombinante, se esgota. Desse momento em diante, a lactose, fonte de carbono secundária para a *E. coli*, é consumida juntamente com o glicerol, induzindo a síntese da proteína. Essa formulação de meio dispensa, portanto, a necessidade de aplicação de pulso do indutor, diminuindo o risco de contaminação e facilitando o processo de cultivo. O volume de trabalho foi de 5 L.

A concentração celular inicial do caldo do cultivo foi de  $0,16 \pm 0,01$  gMS/L, alcançando o valor de  $20 \pm 1$  gMS/L após 35 h (Figura 19), quando o cultivo foi interrompido. A produtividade final de biomassa ( $P_x$ ) foi de  $0,57 \pm 0,03$  gMS/L.h, que é bastante inferior à alcançada em biorreator convencional, de  $2,3 \pm 0,1$  gMS/L.h (SANTOS, 2012). A explicação para o baixo valor de  $P_x$  obtido no biorreator *airlift* é o maior tempo necessário de cultivo em virtude das baixas temperaturas empregadas (mínima de  $15^\circ\text{C}$ ). A redução gradual de temperatura até  $15^\circ\text{C}$  foi um recurso adicional empregado nesse experimento na tentativa de manter a COD nos níveis desejados, conforme detalhado a seguir. O cultivo foi encerrado após 35 h devido à insuficiência do fornecimento de  $\text{O}_2$  para o líquido frente à alta demanda celular, o que acarretou na diminuição da COD mesmo operando nos limites de aeração (QAR de 15 L/min), enriquecimento com  $\text{O}_2$  (QO2 de 5 L/min) e temperatura ( $15^\circ\text{C}$ ). A fase de indução, com duração de 17 h, teve início com o esgotamento da glicose em 18 h de cultivo,

quando começou o consumo mais intenso da lactose e do glicerol. Os resultados apresentados na Figura 20 mostram que não houve formação expressiva de ácidos orgânicos (ácidos láctico, fórmico e acético), em especial de ácido acético, cuja concentração não ultrapassou 1,5 g/L, valor este abaixo do máximo (5 g/L) recomendado na literatura para não haver inibição do metabolismo celular (LULI e STROHL, 1990). A retenção plasmidial se manteve elevada durante a fase de indução, sendo superior a 90%, indicando um baixo estresse metabólico nas células.

Figura 19. Concentrações de biomassa ( $C_x$ ), glicose, glicerol e lactose ao longo do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift*. A fase de indução teve início em 18 h de cultivo. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de  $C_x$  em triplicata.

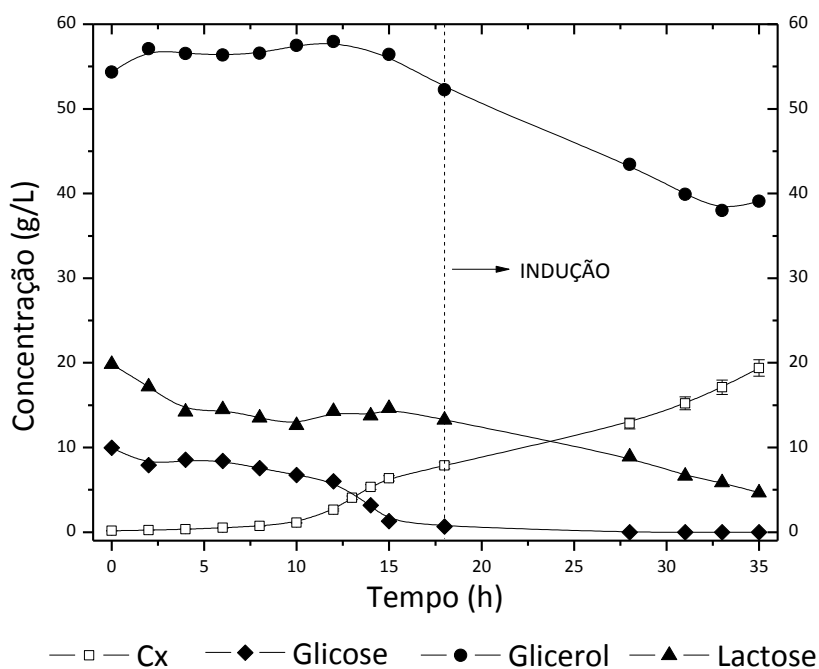
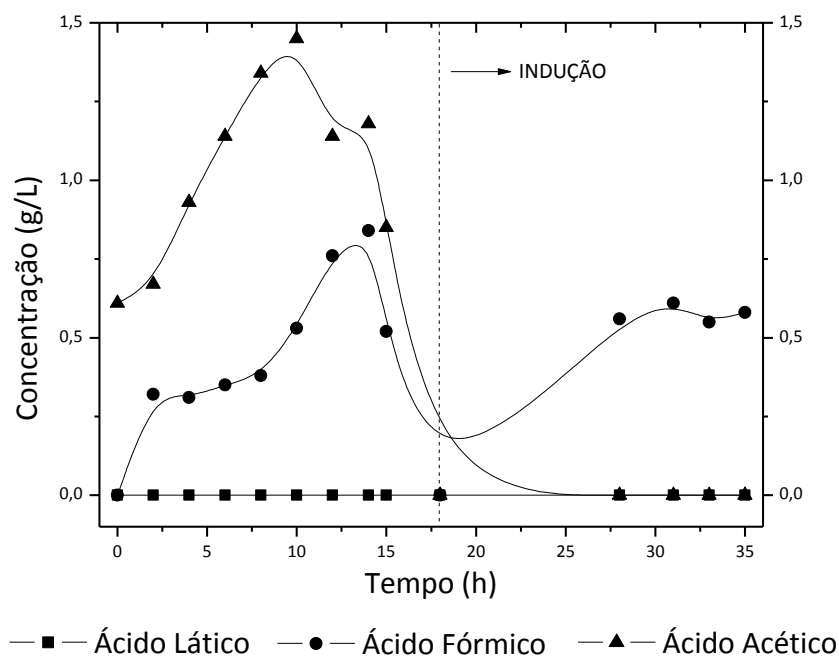


Figura 20. Concentrações dos ácidos acético, fórmico e láctico ao longo do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift*. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C.



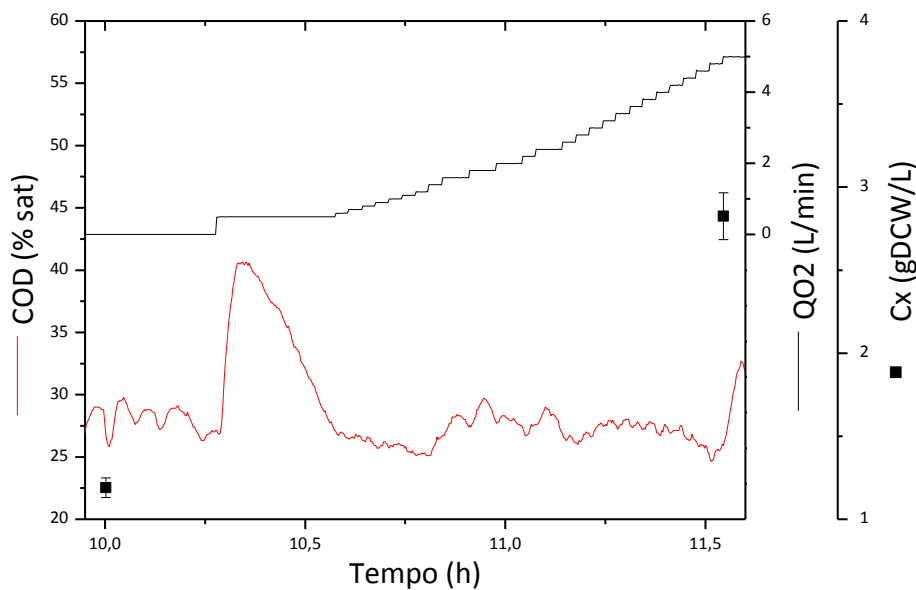
A produção específica máxima de PspA solúvel ( $Y_{PspA/X}$ ) foi de  $47 \pm 1$  mgPspA/gMS, sendo bastante inferior àquela alcançada em biorreator convencional (tipo tanque agitado e aerado) (SANTOS, 2012), de  $239 \pm 7$  mgPspA/gMS. Possivelmente, essa baixa produção de PspA solúvel se deve à reduzida atividade metabólica das células nas baixas temperaturas empregadas durante a indução (inferiores a 20°C), o que naturalmente também resulta em menor velocidade de síntese da proteína recombinante. Esse fato já havia sido constatado por Santos (2012) em cultivo conduzido a 25°C, no qual o  $Y_{PspA/X}$  foi 50% inferior ao observado a 31°C. Como consequência, o  $P_{PspA}$  obtido ( $27 \pm 2$  mgPspA/L.h) foi bastante inferior ao alcançado em biorreator convencional ( $550 \pm 40$  mgPspA/L.h) em vista do elevado tempo total de cultivo (35 h, ao invés das 17 h necessárias em biorreator convencional) e do baixo  $Y_{PspA/X}$  alcançado.

Adotando os mesmos valores de  $\Delta AR$  (0,5 L/min) e frequência de atuação do controlador (1 iteração/120 s) já empregados (seção 4.4.1), o perfil de resposta da COD em função da manipulação de QAR foi semelhante ao observado no cultivo de *S. cerevisiae* (dados não mostrados). O  $\Delta O_2$  utilizado foi de 0,2 L/min, com o



qual foi observado o perfil de resposta da COD da Figura 21. Nesse perfil, verificou-se que o  $\Delta O_2$  adotado é adequado, pois manteve a COD dentro dos limites de 25 a 50% de saturação, faixa essa muito próxima da referência adotada (de 30 a 50% de saturação). O fato de a COD ter ficado ligeiramente abaixo de 30% saturação entre 10 e 12 h de cultivo se deve ao crescimento rápido da demanda de  $O_2$  pelas células nesse período de crescimento exponencial. Além disso, o desvio observado da COD é necessário para que haja atuação do sistema de controle.

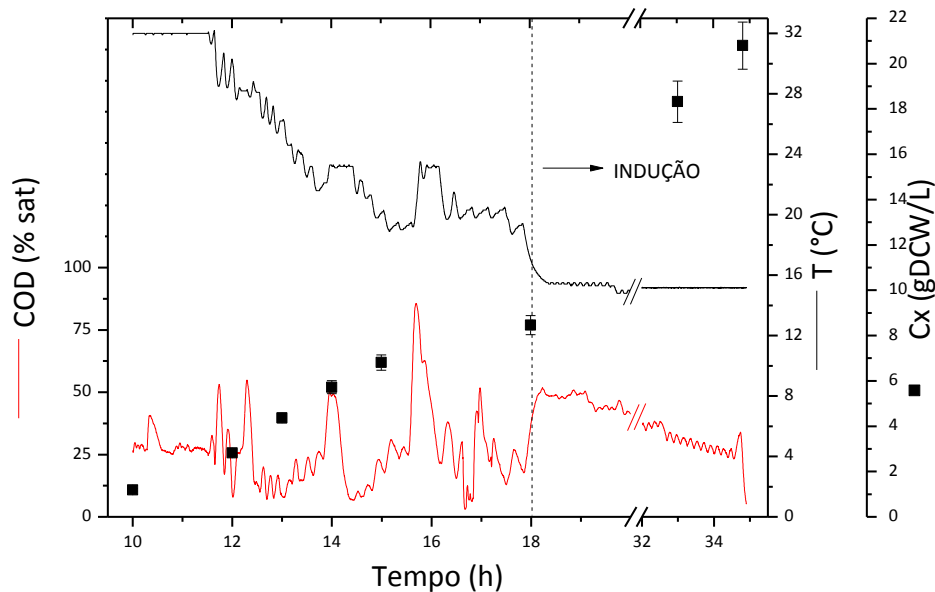
Figura 21.  $C_x$  e o perfil de resposta da COD com respeito à manipulação de  $QO_2$  no cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift*. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 15°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.



Contudo, a partir de, aproximadamente, 12 h de cultivo, a transferência de  $O_2$  para o líquido ficou inferior à demanda, mesmo empregando a  $QO_2$  máxima (5 L/min). Desse momento em diante, foi necessário reduzir manualmente a temperatura, de 31 até 15°C, em uma velocidade média de 1 °C/h, a fim de controlar a COD (Figura 22). O tempo de resposta da COD (alcance de 95% da variação máxima) com respeito à variação da temperatura foi de  $400 \pm 200$  s, calculado em três diferentes momentos do cultivo. Esse elevado desvio de 200 s é proveniente de dois fatores: (i) a variação na temperatura, ao contrário do que idealmente deveria ser, não é do tipo “degrau”,

apresentando perfis não reprodutíveis; (ii) a variação na temperatura atua no metabolismo celular, que varia ao longo do cultivo, de modo que o tempo de resposta depende da fase do cultivo. Com base na velocidade média de redução da temperatura ( $1\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ ) e no tempo de resposta da COD com respeito à variação da temperatura ( $400 \pm 200\text{ s}$ ), pode-se estabelecer uma frequência de atuação na temperatura de 1 iteração/360 s com uma variação ( $\Delta T$ ) de  $0,1^{\circ}\text{C}$ .

Figura 22.  $C_x$  e o perfil de resposta da COD com respeito à manipulação da temperatura no cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift*. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 30 e 50% de saturação e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e  $15^{\circ}\text{C}$ . As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.



Entretanto, como se pode observar na Figura 22, a resposta da COD com a variação da temperatura apresentou flutuações elevadas, da ordem da própria COD média no líquido (30% de saturação). Essa resposta ruidosa era esperada, uma vez que o decréscimo da temperatura não age diretamente na COD, mas na velocidade do metabolismo celular, reduzindo-a. Com essa redução, a demanda de  $\text{O}_2$  pelas células diminui e, conseqüentemente, a COD aumenta, considerando  $\text{NO}_2$  constante, uma vez que a temperatura praticamente não interfere na transferência de  $\text{O}_2$ , conforme explicado na seção 2.4.3. Logo, pode-se adotar a temperatura como uma variável manipulada alternativa para controle da COD. Vale ressaltar que essa modulação do metabolismo celular já foi observada em cultivos de alta densidade celular de *E. coli*

empregando meio definido e glicerol como fonte de carbono (SARGO, 2011), que apresentaram uma diminuição de, aproximadamente, 40% na velocidade específica de crescimento devido ao decréscimo da temperatura de 37 para 30°C. Porém, a diminuição da temperatura impacta na produtividade do processo, por isso, deve ser usada como último recurso para manutenção da COD nos níveis desejados.

Outro teste realizado foi a determinação da vazão máxima de gás efetiva (QGAS\_max) para o controle da COD. Para tal, a reposta do sistema foi analisada após aumento de QAR de 20 L/min para 25 L/min, com QO2 nulo. Com esse aumento de vazão, a COD se manteve praticamente constante. A explicação para esse fenômeno está relacionada com a tendência à estabilização de  $\epsilon$  com o aumento da vazão de gás, o que estabiliza também a área interfacial de troca de massa entre as fases gasosa (bolhas de ar) e líquida, uma vez que o diâmetro médio das bolhas é praticamente invariável nessa faixa de vazão de gás (CERRI, 2009). Isso, portanto, reflete no  $k_L a$ , que também tende a um valor máximo, juntamente com  $NO_2$ . Como consequência desses resultados, adotou-se uma QGAS\_max de 20 L/min para operação em pressão atmosférica.

Em suma, através desse cultivo de *E. coli*, foi possível determinar valores adequados para os parâmetros QGAS\_max (20 L/min) e  $\Delta O_2$  (0,2 L/min). Outro resultado importante foi a determinação da frequência de atuação na temperatura (1 iteração/360 s) com base no tempo de resposta da COD com respeito a essa variável ( $400 \pm 200$  s). Por fim, verificou-se que a manipulação das variáveis QAR e QO2 não é suficiente para proporcionar a transferência de  $O_2$  demandada pelas células de *E. coli* em concentrações superiores a 20 gMS/L em crescimento exponencial, mesmo com a velocidade específica de crescimento modulada pela redução da temperatura até 15°C. Nesse contexto, justifica-se o emprego de sobrepressão em biorreator *airlift* adaptado a fim de aumentar  $NO_2$ .

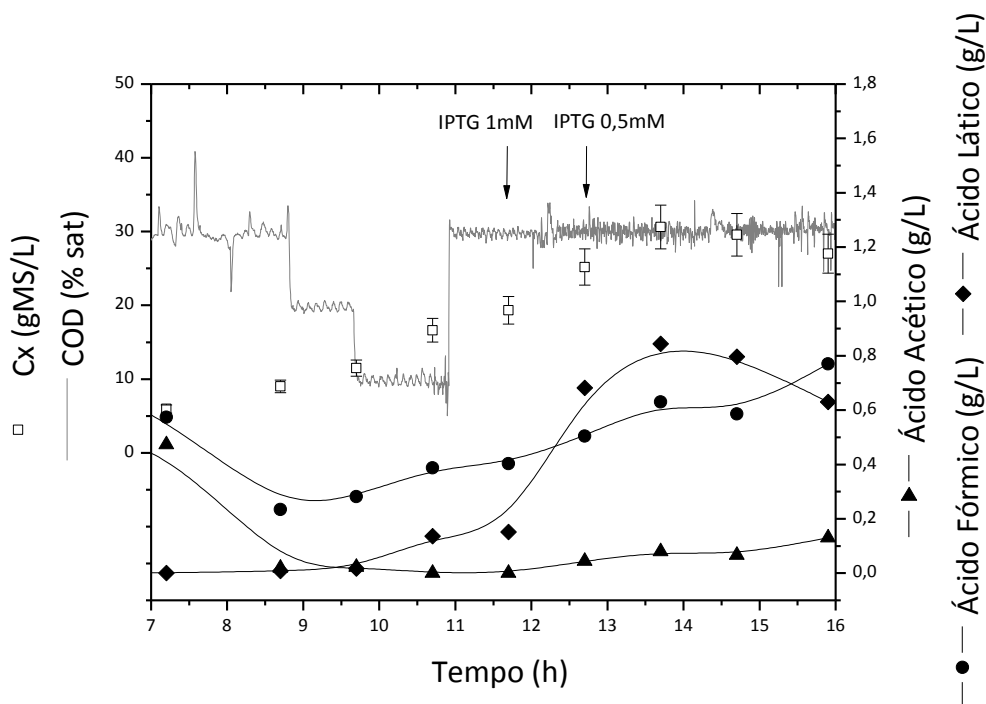
#### **4.5. Efeito da redução da concentração de oxigênio dissolvido sobre o cultivo de *Escherichia coli***

Nos cultivos de *rE. coli*, assim como na maioria dos cultivos conduzidos em aerobiose para uma grande variedade de organismos, o valor de 30% da saturação do meio com ar é adotado como *set point* da COD. Esse valor garante que, com larga margem de segurança, o metabolismo celular não será limitado pelo fornecimento de

oxigênio, situação que corresponderia a uma leitura de 0% pelo sensor de oxigênio dissolvido, para diferentes níveis de limitação. Por outro lado, gastos adicionais de energia, ar e oxigênio são necessários para manter a COD em 30% da saturação.

Com o intuito de estabelecer a faixa de variação da COD que favoreça o metabolismo aeróbio nos cultivos de *rE. coli* BL21(DE3) produzindo fragmento imunogênico da proteína PspA, a influência da redução da COD sobre o cultivo de *E. coli*, mais especificamente sobre a produção celular de metabólitos (ácidos acético, fórmico e lático), foi realizado um cultivo de *E. coli* em biorreator convencional com a COD controlada em diferentes valores, 30, 20 e 10% de saturação (ar à pressão atmosférica e 31°C). O controle da COD nos valores de 10 e 20% foi realizado por 1 h em cada condição. No restante do cultivo, a COD foi mantida em 30% de saturação. A escolha do biorreator convencional para esse teste é justificada pelo fato de não ser possível controlar a COD em um valor pontual no biorreator *airlift*, mas apenas em uma faixa, o que não permitiria o teste proposto. As demais condições do cultivo foram: controle de pH em 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução) através da adição de NH<sub>4</sub>OH ou HCl e temperatura de 31°C. O meio de cultivo complexo empregado foi o de autoindução, apresentado na Tabela 2 (seção 3.1.2), sem lactose. A indução foi realizada através de dois pulsos de IPTG, conforme indicado no gráfico dos resultados obtidos (Figura 23).

Figura 23. COD e concentrações celular ( $C_x$ ) e de metabólitos (ácidos acético, fórmico e láctico) no cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator convencional. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), temperatura de 31°C e COD controlada em diferentes valores, 30, 20 e 10% de saturação. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas  $C_x$  em triplicata.



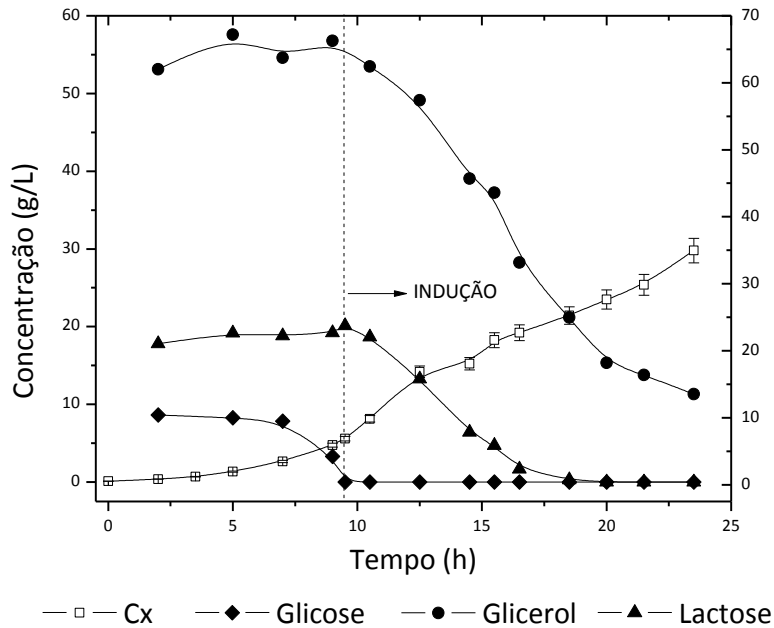
Com base nos resultados obtidos (Figura 23), pode-se afirmar que a redução da COD (de 30 até 10% de saturação) não afetou a produção de metabólitos. Com a redução da COD, observou-se que os perfis de produção de ácido fórmico e acético não foram alterados, alcançando baixas concentrações finais, 0,77 e 0,13 g/L, respectivamente. Concentrações finais próximas a estas também foram constatadas no cultivo com a COD mantida acima de 30% de saturação em biorreator *airlift* (seção 4.4.2). A produção de ácido láctico teve um discreto aumento (até 0,15 g/L) durante o período de tempo em que a COD esteve abaixo de 30%, não sendo possível afirmar que haja relação direta entre os fatos. Entretanto, um aumento apreciável da concentração de ácido láctico foi observado após 12 h (de 0,15 para 0,84 g/L), o que pode ser decorrente da indução por IPTG. Raj et al. (2009) também relataram um significativo aumento da concentração de ácido láctico, de 0 para 1,6 g/L, na fase final do cultivo de *E. coli* com indução por IPTG, em meio de cultura complexo. Esse fenômeno é, possivelmente, devido à toxicidade do IPTG para as células e/ou ao estresse metabólico causado pelo tipo de indução promovida pelo IPTG.

#### 4.6. Cultivo de *Escherichia coli* em biorreator *airlift* pressurizado

Finalmente, após a realização da caracterização da transferência de O<sub>2</sub> na condição de pressurização (seção 4.2) e dos cultivos preliminares de *E. coli* e *S. cerevisiae* sem sobrepressão (seção 4.4), ambos no biorreator *airlift*, foi efetuado outro cultivo de *E. coli* no *airlift* a fim de ser verificada a influência da pressão sobre o processo de cultivo. As condições empregadas foram: controle de pH em 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução) através da adição de NH<sub>4</sub>OH ou HCl; *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C; pressão máxima de 2,5 bar; controle da COD entre 20 e 50% de saturação (ar à pressão atmosférica e 31°C). A redução da COD mínima de 30 (seção 4.4.2) para 20% de saturação aumenta a transferência de O<sub>2</sub> para o caldo, de acordo com a Equação 1, sem afetar o metabolismo celular, conforme descrito na seção 4.5. O meio de cultivo complexo utilizado foi o de autoindução (Tabela 2). O volume de trabalho foi de 5 L.

A concentração celular inicial do caldo de cultivo foi de  $0,106 \pm 0,006$  gMS/L e final de  $30 \pm 2$  gMS/L, após 23,5 h de cultivo (Figura 24). O valor final de P<sub>x</sub> foi de  $1,27 \pm 0,07$  gMS/L.h, que é superior ao alcançado no *airlift* sem pressurização ( $0,57 \pm 0,03$  gMS/L.h), mas inferior ao obtido no biorreator convencional ( $2,3 \pm 0,1$  gMS/L.h) (SANTOS, 2012). A explicação para isso se deve à temperatura mínima empregada durante o cultivo no biorreator *airlift* pressurizado, de 26°C. Essa redução na temperatura acarretou em menor P<sub>x</sub> em relação ao cultivo controle em reator convencional à 31°C (SANTOS, 2012). Entretanto, em relação ao ensaio em biorreator *airlift* sem pressurização (seção 4.4.2), a maior P<sub>x</sub> se deve à menor redução da temperatura, de 31 para 26°C no *airlift* pressurizado, ao invés da redução de 31 para 15°C no ensaio sem pressurização.

Figura 24. Concentrações de biomassa ( $C_x$ ), glicose, glicerol e lactose ao longo do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift* pressurizado. A fase de indução teve início em 9,5 h de cultivo. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas  $C_x$  em triplicata.



Como apresentado na Figura 25, não houve produção acentuada de metabólitos (ácidos láctico, fórmico e acético), com concentrações máximas inferiores a 0,7 g/L. Por outro lado, a retenção plasmidial caiu de 87% no tempo 0 h de indução para um mínimo de 41% após 9 h. Essa menor retenção do plasmídeo, em relação à alcançada no cultivo em *airlift* sem sobrepressão (superior a 90%), reflete o estresse metabólico celular decorrente da superexpressão da proteína recombinante (PspA) pelas células. De fato, o valor de  $Y_{PspA/X}$  no biorreator *airlift* pressurizado foi bastante superior, de  $201 \pm 8$  mgPspA/gMS contra  $47 \pm 1$  mgPspA/gMS alcançado no biorreator *airlift* sem pressurização (seção 4.4.2), ou seja, um aumento de 4,3 vezes. Esse valor de  $201 \pm 8$  mgPspA/gMS está próximo ao obtido no ensaio controle em reator convencional à 31°C ( $239 \pm 7$  mgPspA/gMS) (SANTOS, 2012). Novamente, como ocorrido com  $P_x$ , a redução da temperatura para um valor intermediário (26°C) entre a redução efetuada no biorreator *airlift* sem pressurização (para 15°C) e a temperatura empregada no reator convencional (31°C) explicam esses resultados de  $Y_{PspA/X}$ . Esses valores observados de  $P_x$  e  $Y_{PspA/X}$  comprovam o efeito negativo da redução da

temperatura sobre a velocidade do metabolismo celular e, principalmente, sobre a formação de biomassa. Como consequência dos valores de  $P_x$  e  $Y_{P_{spA}/X}$  alcançados no biorreator *airlift* pressurizado, obteve-se um  $P_{P_{spA}}$  máximo ( $260 \pm 20$  mgPspA/L.h) intermediário entre ao alcançada no *airlift* sem pressurização ( $27 \pm 2$  mgPspA/L.h) e no reator convencional ( $550 \pm 40$  mgPspA/L.h). A Tabela 5 resume os principais resultados obtidos no biorreator *airlift* com e sem pressurização e no ensaio de referência em reator convencional.

Figura 25. Concentrações dos ácidos acético, fórmico e lático ao longo do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift* pressurizado. A fase de indução teve início em 9,5 h de cultivo. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C.

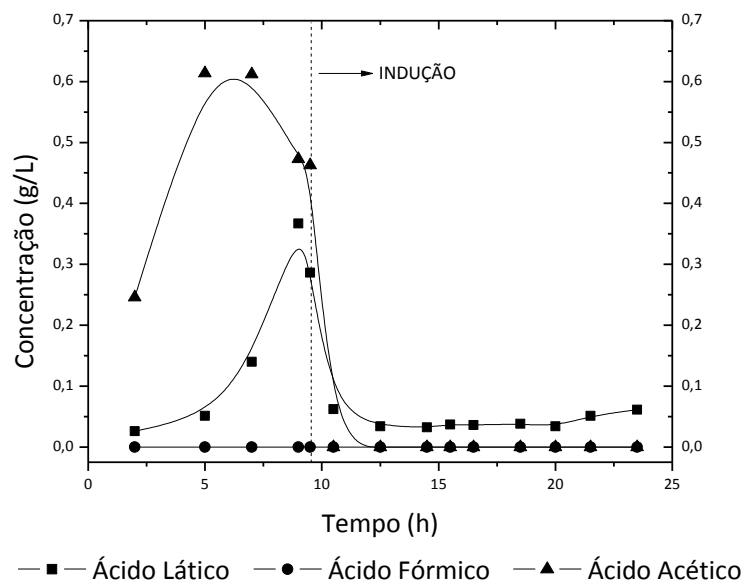




Tabela 5. Resumo dos principais resultados obtidos nos cultivos em batelada de *E. coli* no biorreator *airlift* com e sem pressurização e no reator convencional (ensaio de referência).

	<i>Airlift</i>	<i>Airlift</i> pressurizado	Reator convencional*
<b>P máxima (bar)</b>	1	2,5	1
<b>T mínima (°C)</b>	15	26	31
<b>P<sub>x</sub> (gMS/L.h)</b>	0,57 ± 0,03	1,27 ± 0,07	2,3 ± 0,1
<b>Y<sub>PspA/x</sub> (mgPspA/gMS.h)</b>	47 ± 1	201 ± 8	239 ± 7
<b>P<sub>PspA</sub> (mgPspA/L.h)</b>	27 ± 2	260 ± 40	550 ± 40
<b>[metabólitos] (g/L)</b>	baixa**	baixa**	baixa**
<b>Estabilidade plasmidial</b>	> 90%	> 40%	> 70%

\* Santos (2012).

\*\* Abaixo de 1,5 g/L.

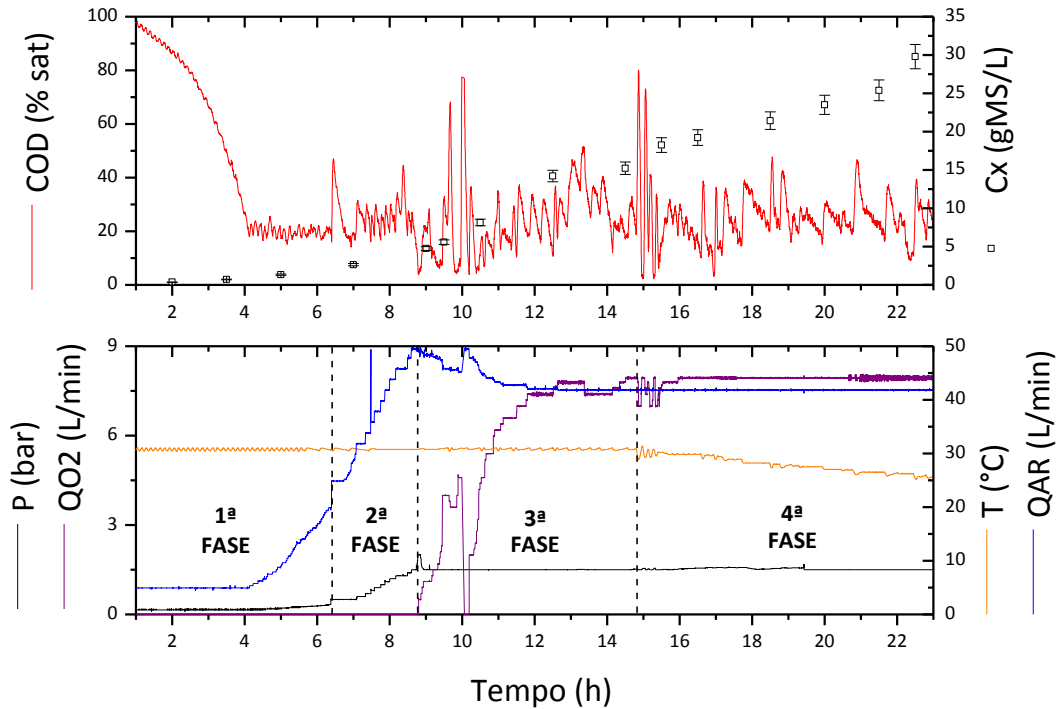
Em relação ao controle da COD, adotou-se uma estratégia sequencial. Primeiramente, a COD foi controlada somente através da manipulação de QAR, de acordo com a lógica descrita na seção 4.3. Após QAR atingir o valor máximo (20 L/min), a pressão foi elevada gradualmente até atingir 2,5 bar. Com o aumento da pressão, foi preciso elevar a vazão mássica de ar, de acordo com a Equação 18, a fim de manter a vazão volumétrica do gás constante dentro do biorreator. Por isso, devido ao limite máximo de operação do fluxômetro empregado, não foi possível alcançar pressões maiores. Na próxima etapa, foi manipulada QO2, enriquecendo o gás de entrada em até 16% (v/v) de O<sub>2</sub> puro, conforme a lógica apresentada na seção 4.3. Finalmente, alcançado o enriquecimento máximo com O<sub>2</sub> puro, foi reduzida a temperatura gradualmente até 26°C. Essa estratégia de controle permitiu uma menor utilização de O<sub>2</sub> puro, bem como uma redução menos drástica da temperatura, como a adotada no cultivo no biorreator *airlift* sem pressurização (seção 4.4.2).

A manipulação de QAR e QO2 foram feitas adotando os mesmos valores de  $\Delta AR$  (0,5 L/min),  $\Delta O_2$  (0,2 L/min) e frequência de atuação do controlador (1 iteração/120 s) empregados no ensaio no *airlift* sem pressurização (seção 4.4.2). Os perfis de resposta da COD com respeito à manipulação de QAR e QO2 foram

semelhantes aos obtidos no cultivo em *airlift* sem pressurização (seção 4.4.2), mantendo a COD, em média, dentro da faixa de referência (20 a 50% de saturação) (Figura 26). Já a resposta da COD decorrente da manipulação da pressão, apresentada na Figura 26, evidenciou o grande potencial dessa variável no controle da COD. Elevando manualmente o *set point* da pressão em incrementos ( $\Delta P$ ) de 0,1 bar, foi possível manter a COD média acima de 20% de saturação. Entre 8,7 e 8,8 h de cultivo, a pressão foi elevada sem a correção da vazão mássica de gás, acarretando na redução da COD. Esse fato comprova que o aumento da pressão sem a elevação concomitante da vazão mássica, de acordo com a Equação 18, tem efeito negativo sobre  $NO_2$ .

Contudo, depois de alcançada a pressão máxima (2,5 bar) e o maior enriquecimento do ar com  $O_2$ , de 16% (v/v), foi necessário reduzir a temperatura a partir de, aproximadamente, 15 h de cultivo (5,5 h de indução), a fim de manter a COD acima de 20% de saturação. Neste momento,  $C_x$  estava em torno de  $18 \pm 1$  gMS/L. Esse  $C_x$  máximo alcançado à 31°C é inferior ao previsto na seção 4.2 (Figura 15), de 40 gMS/L. Isso se deve ao fato de essa previsão ter sido feita tendo como referência dados de cultivo de *E. coli* em meio definido, onde a velocidade específica de crescimento celular e, conseqüentemente, a demanda por  $O_2$  são menores do que no cultivo em meio complexo. Logo, em meio definido, um  $C_x$  maior requer a mesma quantidade de  $O_2$  que uma concentração menor de células consome quando se desenvolve em meio complexo. Da mesma forma que no ensaio em biorreator *airlift* sem sobrepressão (seção 4.4.2), o *set point* da temperatura foi reduzido manualmente, mas em uma velocidade média menor, de 0,6 °C/h. O tempo de resposta da COD com respeito à variação da temperatura foi de  $360 \pm 40$  s. Este valor foi calculado em três diferentes momentos dentro de um espaço de tempo menor de cultivo, de 8,5 h, em comparação ao intervalo de análise utilizado no ensaio no *airlift* sem pressurização, de 23 h. Por esse motivo, as medidas realizadas no *airlift* pressurizado foram repetidas em intervalos menores de tempo, havendo, possivelmente, menor variação do metabolismo celular entre uma medida e outra. Com isso, o tempo de resposta da COD com a temperatura, que atua no metabolismo celular, apresentou menor variação entre as medidas realizadas e, conseqüentemente, menor variância.

Figura 26.  $C_x$  e perfil de resposta da COD com respeito à manipulação das vazões de ar (1ª Fase) e de  $O_2$  (3ª Fase), da pressão (2ª Fase) e da temperatura (4ª Fase) no cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift* pressurizado. O pH foi controlado em 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução). Os valores de QAR e QO2 apresentados são relativos à condição padrão de 1 atm e 21,1°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.



Com base na velocidade média de redução da temperatura ( $0,6\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ ) e no tempo de resposta da COD com respeito à variação da temperatura ( $360 \pm 40\text{ s}$ ), pode-se estabelecer uma frequência de atuação na temperatura de 1 iteração/360 s com uma variação ( $\Delta T$ ) de  $0,06^{\circ}\text{C}$ . Esse menor valor de  $\Delta T$ , em relação ao empregado no ensaio em *airlift* sem pressurização ( $0,1^{\circ}\text{C}$ ), deve-se ao fato de, no *airlift* pressurizado, a redução da temperatura ter sido efetuada apenas na fase final da indução, onde a velocidade específica de crescimento e, portanto, a elevação da demanda celular por  $O_2$  são menores. No ensaio no biorreator *airlift* sem sobrepressão, a temperatura começou a ser reduzida a partir de, aproximadamente, 2 h antes da fase de indução, quando o aumento da demanda celular por  $O_2$  é mais intenso devido à fase exponencial de crescimento das células.

Ainda neste ensaio, foi feito um acompanhamento reológico do caldo de cultivo ao longo da fase de indução. O fluido apresentou comportamento não Newtoniano do tipo pseudoplástico ( $n < 1$ ), com os valores de  $n$  e  $K$  relatados na Figura 27. Possivelmente, esse comportamento não Newtoniano se deve à filamentação das

células, uma vez que soluções de polímeros ou de outras grandes moléculas alongadas também apresentam a característica reológica de pseudoplasticidade (BENNETT e MYERS, 1978). Segundo Jeong e Lee (2003), o alongamento celular da *E. coli* está relacionado à superexpressão de proteínas recombinantes, quando pode haver um desequilíbrio na síntese de duas proteínas essenciais no processo de divisão celular, a FtsA e a FtsZ. Com isso, a fissão binária fica comprometida, acarretando em um maior número de células filamentosas. Nas imagens de microscopia ótica obtidas a partir de amostras do cultivo (Figura 28), verifica-se uma elevada quantidade de células com comprimento alongado, principalmente ao fim da fase de indução (14 h).

Com base nos dados de  $n$  e  $K$  e considerando  $\dot{\gamma}$  médio de  $4000 \text{ s}^{-1}$ , valor alcançado no biorreator *airlift* de cilindros concêntricos (5 L) operado com fluido não Newtoniano ( $K=0,180 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  e  $n=0,461$ ) e  $U_{GS}$  de  $0,08 \text{ m/s}$  ( $Q=4,2 \text{ vvm}$ ) (CERRI et al., 2008), os valores de  $\mu_{ap}$  foram estimados ao longo do tempo de cultivo através da Equação 8 (Figura 27).

Considerando o erro padrão associado às estimativas de  $\mu_{ap}$  (Figura 27), verifica-se que este parâmetro não sofre alteração no decorrer da fase de indução. Portanto, pode-se afirmar que o crescimento celular e a síntese da proteína recombinante durante a fase de indução não afetam a viscosidade do caldo e, de acordo com a Equação 9, o  $k_L a$ .

Em linhas gerais, através da realização do cultivo de *E. coli* em biorreator *airlift* pressurizado, comprovou-se a possibilidade de controle da COD manipulando a pressão, além das outras variáveis já empregadas (QAR, QO2 e T). Constatou-se ainda que a elevação de  $NO_2$ , decorrente do aumento da pressão, permitiu uma menor redução da temperatura, em relação ao cultivo sem pressurização, o que proporcionou maiores produtividades de biomassa e de PspA. Finalmente, foi possível verificar que a reologia do caldo de cultivo permaneceu praticamente inalterada durante a fase de indução, para a faixa de concentrações celulares estudadas e nas condições de indução empregadas. Isso significa que o aumento na concentração celular da suspensão não acarreta significativas alterações na viscosidade do caldo e, em princípio, o  $k_L a$  não se altera.

Figura 27.  $C_x$  e acompanhamento reológico ( $n$ ,  $K$  e  $\mu_{ap}$ ) do caldo durante a fase de indução do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift* pressurizado. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C. A vazão volumétrica de gás empregada durante a fase de indução foi de 20 L/min (4 vvm). As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas em triplicata de  $C_x$  e ao erro padrão das estimativas de  $n$ ,  $K$  e  $\mu_{ap}$ .

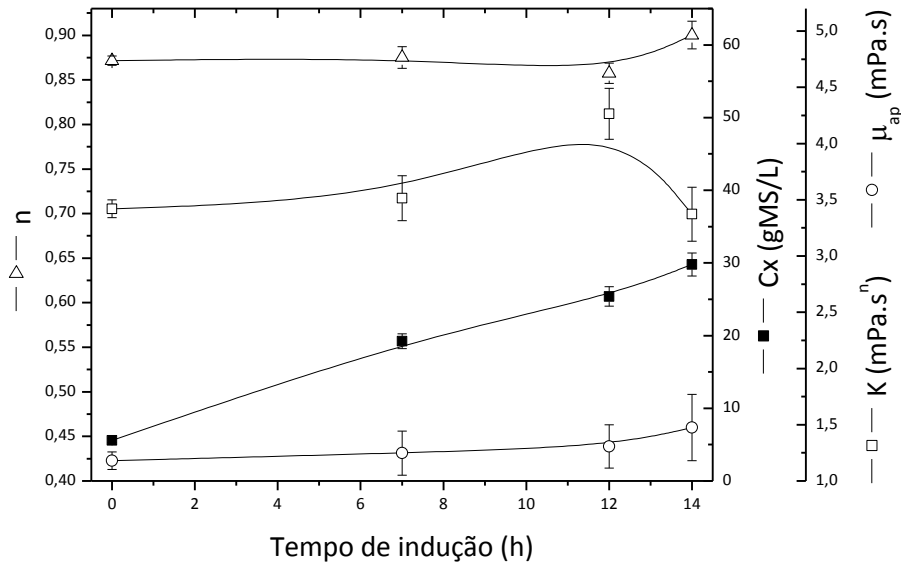
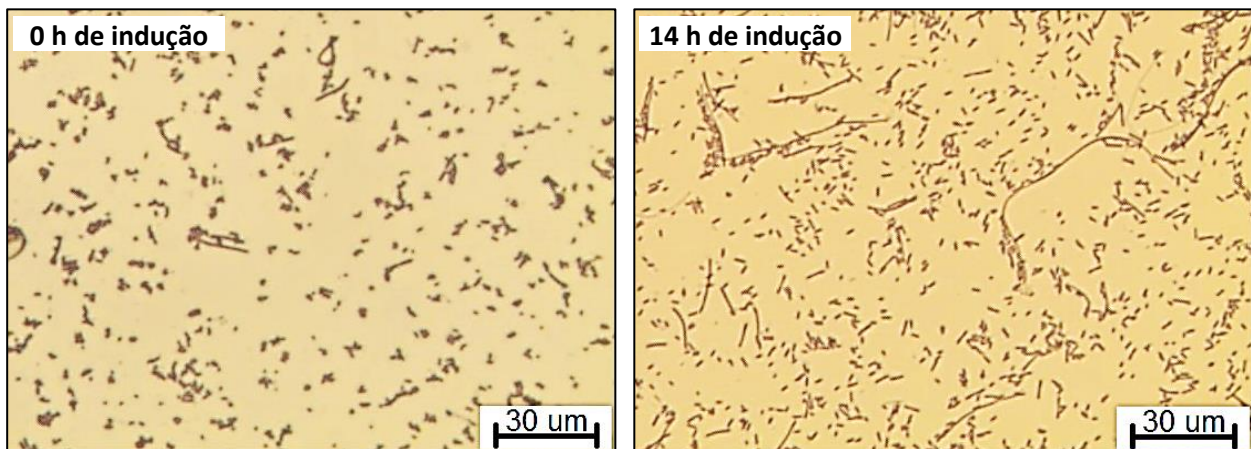


Figura 28. Imagens de microscopia ótica (ampliação de 400x) de amostras retiradas em 0 e 14 h de indução do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator *airlift* pressurizado. As condições do cultivo foram: pH de 6,7 (antes da indução) e 6,9 (durante a indução), COD entre 20 e 50% de saturação, pressão de até 2,5 bar e *set point* da temperatura ajustado manualmente entre 31 e 26°C.



## 5. CONCLUSÕES

A produção de vacinas, e de fármacos em geral, a preços acessíveis é fundamental para viabilizar políticas públicas voltadas à prevenção de doenças infecciosas. Os avanços nas técnicas de Biologia Molecular permitem transformar células de *E. coli* e de outros organismos em fábricas celulares altamente produtivas, com significativo impacto no custo do produto. Em termos de processos produtivos, a maioria das pesquisas com recombinantes se concentra no desenvolvimento de estratégias para aumentar a produtividade em biomassa. Estudos sobre a otimização do modo de operação do reator ou da composição do meio de cultivo são os encontrados com mais frequência na literatura para alcançar ganhos em produtividade. Dentre estes, destacam-se os trabalhos que estabelecem o protocolo de operação de biorreatores tipo tanque agitado e aerado para conduzir os chamados “cultivos de alta densidade celular”.

No presente trabalho, a utilização do biorreator pneumático tipo *airlift* adaptado para operação em sobrepressão para o cultivo em batelada de *E. coli* é abordada.

Experimentos de caracterização da transferência de  $O_2$  em sobrepressão mostraram que, ao contrário do que está relatado na literatura para reator pneumático tipo coluna de bolhas e *airlift* de circulação externa, onde a retenção gasosa ( $\epsilon$ ) e o coeficiente volumétrico de transferência de  $O_2$  ( $k_{La}$ ) aumentam com a pressão (LETZEL et al., 1999; LETZEL e STANKIEWICZ, 1999),  $\epsilon$  e  $k_{La}$  praticamente não são afetados pela pressão (de até 4 bar) no *airlift* de circulação interna.

Constatou-se ainda que a velocidade volumétrica de transferência de  $O_2$  ( $NO_2$ ), por outro lado, é efetivamente afetada pela pressão no *airlift*. Com o aumento da solubilidade do  $O_2$  na fase líquida devido ao aumento da pressão, previu-se uma elevação de  $NO_2$  de até 3,7 vezes com uma pressão de 3 bar, considerando as condições de cultivo.

Em relação às quatro variáveis avaliadas (vazão de ar, vazão de oxigênio, pressão e temperatura) para controle da COD no biorreator *airlift*, verificou-se que todas afetam a COD de maneiras diferentes.

A manipulação das vazões de ar e de  $O_2$  no controle *feedback* da COD se mostrou satisfatória, mas é limitada pela vazão específica máxima total de operação. Além disso, a utilização do recurso de enriquecimento do gás de entrada com  $O_2$  precisa

ser avaliado com cuidado para o reator *airlift*, pois tem forte impacto no custo de operação, tendo em vista as altas vazões empregadas.

Sem dúvida, a elevação da pressão é a mais interessante forma de controlar a COD. Ela se mostrou eficaz para promover o aumento de  $NO_2$ , o que acarretou em um aumento de 2,2 vezes na produtividade de biomassa e de 9,6 vezes na de PspA em relação ao cultivo em *airlift* sem sobrepressão. Embora seu custo de implantação seja baixo, seu impacto no custo do processo precisa ser avaliado considerando o aumento da vazão de gás de entrada requerido para operar o *airlift* na faixa de vazão de recirculação recomendada.

A diminuição da temperatura se mostrou efetiva na redução da demanda celular por  $O_2$  durante os cultivos e, conseqüentemente, no controle da COD. Entretanto, o emprego de temperaturas mais baixas afeta a produtividade de biomassa e da proteína recombinante. No ensaio no *airlift* sem sobrepressão, onde a temperatura mínima empregada foi de  $15^\circ C$ , as reduções foram de até 75% na produtividade de biomassa e 95% na de PspA em relação ao ensaio controle em reator convencional a  $31^\circ C$ .

Com certeza, um controle mais robusto e eficiente da COD pode ser implementado se for realizado um investimento na integração das quatro variáveis manipuladas avaliadas, utilizando algoritmos de controle mais avançados. Da mesma forma, é importante investir na adequação dos equipamentos periféricos (fluxômetros, bombas etc), tornando possível a operação em pressões mais elevadas. A combinação dessas duas ações (integração e operação em pressões mais elevadas) pode ter impacto significativo na transferência de  $O_2$  e no custo de operação, tornando-se bastante interessante do ponto de vista econômico.

Finalmente, em termos do desempenho do cultivo conduzido no biorreator *airlift* em sobrepressão, os resultados foram semelhantes aos obtidos no reator convencional. A estabilidade plasmidial se mostrou indiferente às estratégias de controle da COD adotadas. Registrou-se uma significativa redução da retenção do plasmídeo associada ao estresse metabólico decorrente da superexpressão da proteína recombinante pelas células, que também ocorre no reator convencional. Apesar da diminuição da temperatura, a produção específica de proteína atingiu níveis muito próximos aos obtidos em cultivo realizado com o mesmo meio em reator convencional.

A produtividade em proteína, no entanto, foi cerca de 50 % menor, devido ao decréscimo da produtividade em biomassa causado pela diminuição da temperatura.

Convém ainda destacar que os benefícios do investimento no desenvolvimento de um ambiente de cultivo baseado no biorreator *airlift* adaptado para operar em sobrepressão com as características aqui descritas, na adequação do *software* SuperSys\_HCDC® de supervisão e controle e no estudo das estratégias de controle da COD em biorreator *airlift* não se limitam ao cultivo de *E. coli*, uma vez que o mesmo sistema pode ser empregado em cultivos de outros microrganismos.

Devido ao amplo campo de estudo envolvendo cultivos em biorreator *airlift* pressurizado, há diversas sugestões para trabalhos futuros, como:

- integração das variáveis QAR, QO<sub>2</sub>, T e P em sistemas robustos de controle da COD, minimizando as perturbações na variável controlada;
- otimização da estratégia de controle da COD visando algum(ns) objetivo(s) específico(s) como, por exemplo, o econômico, que encontraria grande aplicação industrial;
- investimento na adequação dos equipamentos periféricos ao *airlift* (bombas peristálticas, mangueiras, fluxômetros etc), uma vez que sistemas pressurizados exigem produtos/equipamentos específicos para tal condição.



**REFERÊNCIAS**

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical engineering**. 2. ed. Tokyo: University of Tokyo Press, 1973. 434 p.

ALTENBUCHNER, J.; MATTES, R. *Escherichia coli*. In: GELLISSSEN, G. **Production of recombinant proteins**: novel microbial and eukaryotic expression systems. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 7-43.

BADINO A. C.; HOKKA, C. O. Laboratory experiment in biochemical engineering: ethanol fermentation. **Chemical Engineering Education**, v. 33, n. 1, p. 54-70, 1999.

BADINO, A. C.; HOKKA, C. O.; CERRI, M. O. **Biorreator pneumático de circulação interna e uso do mesmo**. BR n. PI 0404703-6, 2004.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1986. 984 p.

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, 2003.

BENDJABALLAH, N.; DHAOUADI, H.; PONCIN, S.; MIDOUX, N.; HORNUT, J.; WILD, G. Hydrodynamics and flow regimes in external loop airlift reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 5211-5221, 1999.

BENNETT, C. O.; MYERS, J. E. **Fenômenos de transporte: quantidade de movimento, calor e massa**. 1. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1978. 812 p.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007. 1026 p.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDES, L.; WU, X.; BODE, J.; RHEE, J. I.; SHUGERL, K. Fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* JM103 and production of the fusion protein SPA::EcoRI in a 60-L working volume airlift tower loop reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 205-214, 1993a.

BRANDES, L.; WU, X.; MASCHKE, H. E.; JURGENS, H.; REINHARDT, B.; SHUGERL, K. Production of fusion protein SPA::EcoRI in batch culture in a 60-L airlift tower loop reactor. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 122-127, 1993b.

BRANDES, L.; WU, X.; MASCHKE, H. E.; SHUGERL, K. Overproduction of recombinant proteins by *Escherichia coli* – employing the combinations of two and three different types of multicopy plasmids – in a 60-litre working volume airlift tower loop reactor. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 161-169, 1993c.

BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92-100, 2013.

CAMPANI, G.; SANTOS, M. P.; SARGO, C. R.; HORTA, A. C. L.; GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C. Suplementação com aminoácidos chave como estratégia para aumento da produção de proteína recombinante em *Escherichia coli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 19., 2012, Búzios. **Anais...** 1 DVD.

CAMPANI, G.; SILVA, G. G.; BADINO, A. C.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; HORTA, A. C. L. Análise de variáveis para controle da concentração de oxigênio dissolvido em biorreator *airlift*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 19., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** 1 DVD.

CERRI, M. O. **Avaliação das transferências de calor e massa em um biorreator *airlift* de bancada para a produção de ácido clavulânico.** 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Química de São Carlos, São Carlos, 2005.

CERRI, M. O.; FUTIWAKI, L.; JESUS, C. D. F.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 51-57, 2008.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores *airlift* de circulação interna geometricamente semelhantes.** 2009. 157 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CHISTI, M. Y. **Airlift bioreactors.** 1. ed. New York: Elsevier Applied Science, 1989. 345 p.

COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F. Mass Transfer. In: \_\_\_\_ . **Chemical Engineering**. 3. ed. Oxford: Pergamon Press, 1977. p. 268-307.

DABROS, M.; SCHULER, M. M.; MARISON, I.W. Simple control of specific growth rate in biotechnological fed-batch processes based on enhanced online measurements of biomass. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 1109-1118, 2010.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DIAZ, C.; DIEU, P.; FEUILLERAT, C.; LELONG, P.; SALOME, M. Simultaneous adaptive predictive control of the partial pressures of dissolved oxygen (pO<sub>2</sub>) and dissolved carbon dioxide (pCO<sub>2</sub>) in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 52, p. 135-150, 1996.

DIXON, N. M.; KELL, D. B. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 109-136, 1989.

DUFRESNE, R.; THIBAUT, J.; LEDUY, A.; LENCKI, R. The effects of pressure on the growth of *Aureobasidium pullulans* and the synthesis of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 526-532, 1990.

GAVRILESCU, M.; ROMAN, P. V. Performance of air-lift bioreactor in the cultivation of some antibiotic production microorganism. **Acta Biotechnology**, v. 18, p. 201-209, 1998.

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

GLAZYRINA, J.; MATERNE, E. M.; DREHER, T.; STORM, D.; JUNNE, S.; ADAMS, T.; GRELLER, G.; NEUBAUER, P. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 1-11, 2010.

HORTA, A. C. L. H. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante**. 2009. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

JANARDHAN, S.; PANDIARAJA, P.; THIRUGNANAM, S.; BALAMURALI, M. N.; FERNANDO, K.; MODY, H. C.; DESAI, P. K.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; KALIRAJ, P. Production, purification and diagnostic application of filarial recombinant protein WbSXP-1 expressed in salt inducible *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 675-683, 2007.

JEMAAT, Z.; BARTROLÍ, A.; ISANTA, E.; CARRERA, J.; SUÁREZ-OJEDA, M. E.; PÉREZ, J. Closed-loop control of ammonium concentration in nitritation: convenient for reactor operation but also for modeling. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 655-663, 2013.

JEONG, K. J.; LEE, S. Y. Enhanced production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by filamentation suppression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1295-1298, 2003.

JONES, A. G. Liquid circulation in a draft-tube bubble-column. **Chemical Engineering Science**, v. 40, n. 3, p. 449-462, 1985.

KHALILZADEH, R.; SHOJAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N.; MOHAMMADIAN-MOSAABADI, J.; MOHAMMADI, M. R.; BAHRAMI, A.; MALEKSABET, N.; NASSIRI-KHALILLI, M. A.; EBRAHIMI, M.; NADERIMANESH, H. Process development for Production of recombinant human interferon- $\gamma$  expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 63-69, 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, p. 63-67, 1997.

KITSCHA, J.; KOCAMUSTAFAOGULLARI, G. Breakup criteria for fluid particles. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 15, n. 4, p. 573-588, 1989.

KNOLL, A.; BARTSCH, S.; BERNWARD, H.; ENGEL, P.; SCHROER, K.; RIBEIRO, B.; STÖCKMANN, C.; SELETZKY, J.; BÜCHS, J. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 167-179, 2007.

KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A.; DECKWER, W. D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 59-65, 1995.

KRACKE-HELMET, H. A.; RINAS, U.; HITZMANN, B.; SHÜGERL, K. Cultivation of recombinant *Escherichia coli* and production of fusion in 60-L bubble column and airlift tower loop reactors. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.554-564, 1991.

KYLE, S.; JAMES, K. A. R.; MCPHERSON, M. J. Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 28, p. 1-8, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LETZEL, H. M.; SCHOUTEN, J. C.; KRISHNA, R.; VAN DEN BLEEK, C. M. Gas holdup and mass transfer in bubble column reactors operated at elevated pressure. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 2237-2246, 1999.

LETZEL, M.; STANKIEWICZ, A. Gas hold-up and mass transfer in gas-lift reactors operated at elevated pressure. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 5153-5157, 1999.

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, p. 477-483, 2006.

LINEK, V.; BENES, P.; VACEK, V. Dynamic pressure method for  $k_La$  measurement in large-scale bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 1406-1412, 1989.

LOPES, M.; GOMES, N.; MOTA, M.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica* growth under increased air pressure: influence on enzyme production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 46-53, 2009.

LOZANO, D. C. **Estudo da caracterização das propriedades reológicas de caldos de fermentação**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1004-1011, 1990.

MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.

MARKL, H.; ZENNECK, C.; DUBACH, A.; OGBONNA, J. C. Cultivation of *E. coli* to high cell densities in a dialysis reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p.48-52, 1993.

MATSUI, T.; SHINZATO, N.; YOKOTA, H.; TAKAHASHI, J.; SATO, S. High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 920-924, 2006.

MEHRNIA, M. R.; TOWFIGHI, J.; BONAKDARPOUR, B.; AKBARNEJAD, M. M. Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 105-110, 2005.

ONKEN, U.; WEILAND, P. Airlift fermenters: construction, behavior and uses. **Advanced Biotechnology Processes**, p. 67-95, 1983.

RAJ, S. M.; RATHNASINGH, C.; JUNG, W.; PARK, S. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 649-657.

SANTOS, M. P. **Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante.** 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de *rE. coli* utilizando glicerol como fonte de carbono.** 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p.

SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; CARTHY, M. C.; DECKWER, W. D.; RINAS, U. Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 10, p. 947-953, 1995.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *Escherichia coli* to high cell density: a historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 345-357, 2005.

SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEIL, S. M. V.; BABAEIPOUR, V.; FARNOUD, A. M. **Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein.** Iranian Journal of Biotechnology, v. 6, n. 2, p. 63-84, 2008.

SHULER, M.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: basic concepts.** 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002. 553 p.

SILVA, A. J.; HORTA, A. C. L.; VELEZ, A. M.; IEMMA, M. R. C.; SARGO, C. R.; GIORDANO, R. L. C.; NOVO, M. T. M.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C. Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in rE. coli fed-batch cultures. **SpringerPlus**, v. 2, p. 322, 2013a.

SILVA, G. G.; CAMPANI, G.; SANTOS, M. P.; SARGO, C. R.; HORTA, A. C. L.; C. R.; GONÇALVES, V. M.; BADINO, A. C.; ZANGIROLAMI, T. C. Estudo reológico de cultivos de alta densidade celular de *Escherichia coli* recombinante. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2013b, Foz do Iguaçu. **Anais...** 1 DVD.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

STEPHANOPOULOS, G. Incentives for chemical process control. In: \_\_\_\_\_. **Chemical process control: an introduction to theory and practice.** New Jersey: Prentice-Hall, 1984. p. 2 – 11.

STUDIER, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking culture. **Protein Expression and Purification**, v.41, p. 313-322, 2005.

TALAIA, M. A. R. Terminal velocity of a bubble rise in a liquid column. **World Academy of Science Engineering and Technology**, v. 22, p. 264-268, 2008.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211-222, 2006.

THOMASI, S. S. **Avaliação de parâmetros de desempenho de três modelos de biorreatores pneumáticos de bancada.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

TRAGER, M.; QAZI, G. N.; ONKEN, U.; CHOPRA, C. L. Comparison of airlift and stirred reactors for fermentation with *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, p. 112-116, 1989.

VÉLEZ, A. M. ; HORTA, A. C. L.; SILVA, A. J.; IEMMA, M. R. C.; GIORDANO, R. L. C. ; ZANGIROLAMI, T. C. Enhanced production of recombinant thermo-stable lipase in *Escherichia coli* at high induction temperature. **Protein Expression and Purification**, v. 90, p. 96-103, 2013.

VÉLEZ, A. M. ; SILVA, A. J.; HORTA, A. C. L.; SARGO, C. R.; CAMPANI, G.; SILVA, G. G.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 6, 2014.

VOJINOVIC, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Real-time bioprocess monitoring – Part I: In situ sensors. **Sensors and Actuators B**, v. 114, p. 1083-1091, 2006.

WANG, Y.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; WANG, Y.; XIA, J.; ZHANG, S. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 989-995, 2009.

WILKE, C. R.; CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. **A.I.Ch.E. Journal**, v. 1, p. 264-270, 1955.

WILKINSON, P. M.; DIERENDONCK, L. L. V. Pressure and gas density effects on bubble break-up and gas hold-up in bubble columns. **Chemical Engineering Science**, v. 45, n. 8, p. 2309-2315, 1990.

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 and Chemical Engineering**, v. 16, n. 6, p. 563-572, 1992.

**APÊNDICE A – Fragmentação de bolhas de gás em sistema gás-líquido em reator pneumático**

A estabilidade das bolhas de gás em ascensão em uma coluna d'água pode ser analisada através da teoria de instabilidade hidrodinâmica de Kelvin-Helmholtz. Essa teoria é utilizada na determinação da estabilidade de interfaces entre fluidos de densidades distintas se movendo com velocidade relativa diferente de zero. (WILKINSON e DIERENDONCK, 1990; KITSCHA e KOCAMUSTAFAOGULLARI, 1989).

Adotando uma perturbação ondulatória da interface (sem perda de generalidade, uma vez que uma perturbação qualquer pode ser representada como uma superposição de ondas), Wilkinson e Dierendonck (1990) chegaram à seguinte relação aproximada (Equação 27) para o máximo comprimento de onda ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) de uma perturbação estável (no qual não há ruptura da bolha de gás), desprezando os efeitos viscosos e a movimentação do ar dentro das bolhas. Perturbações interfaciais com comprimentos de onda acima de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  podem desestabilizar a interface e, conseqüentemente, ocasionar a fragmentação das bolhas. Portanto, quanto maior o valor de  $\lambda_{\rho_g}^{m\acute{a}x}$ , maior a faixa de frequências perturbatórias estáveis e, conseqüentemente, menos sujeitas à fragmentação estarão as bolha de gás (WILKINSON e DIERENDONCK, 1990; KITSCHA e KOCAMUSTAFAOGULLARI, 1989).

$$\lambda_{m\acute{a}x} = 2\pi \sqrt{\frac{\sigma}{g^*(\rho_l - \rho_g)}} \left/ \left( \frac{\rho_l}{\rho_l + \rho_g} \cdot \frac{\rho_g U_r^2 / 2}{\sqrt{\sigma \cdot g \cdot (\rho_l - \rho_g)}} + \sqrt{1 + \frac{(\rho_l \rho_g U_r^2 / 2)^2}{(\rho_l + \rho_g)^2 \cdot \sigma \cdot g \cdot (\rho_l - \rho_g)}} \right) \right. \quad (27)$$

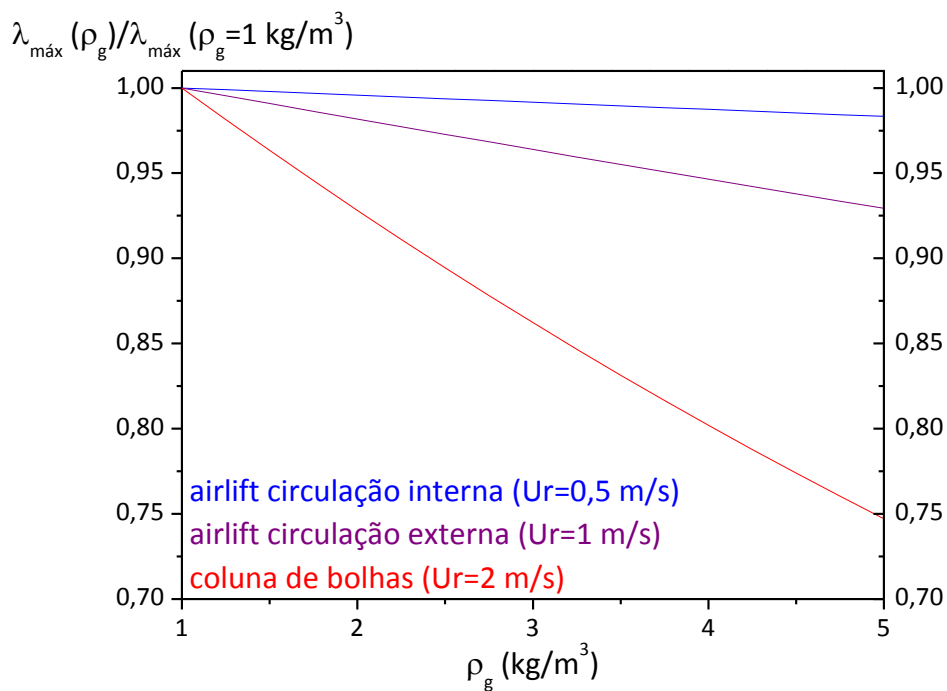
onde  $\sigma$  (N/m) é a tensão interfacial do sistema gás-líquido,  $g$  (m/s<sup>2</sup>) a aceleração gravitacional,  $\rho_l$  (kg/m<sup>3</sup>) a densidade do líquido,  $\rho_g$  (kg/m<sup>3</sup>) a densidade do gás e  $U_r$  (m/s) a velocidade relativa interfacial gás-líquido.

Simulações realizadas a partir da Equação 27 e apresentadas na Figura 29 mostram que  $\lambda_{m\acute{a}x}$  é pouco sensível à variação de  $\rho_g$  em condições próximas à atmosférica ( $\rho_g$  e pressão da ordem de 1 kg/m<sup>3</sup> e 1 bar, respectivamente). Por exemplo, com um valor de  $U_r$  de 1 m/s, típico em coluna de bolhas (WILKINSON e



DIERENDONCK, 1990), a redução de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  foi de apenas 7% para o aumento de  $\rho_g$  de 1 para 5 kg/m<sup>3</sup>. Essa redução é ainda menor, de apenas 1,7%, quando  $U_r$  é de 0,5 m/s, condição aproximada encontrada em *airlift* (BENDJABALLAH et al., 1999). Por outro lado, para  $U_r$  de 2 m/s, observável também em coluna de bolhas (WILKINSON e DIERENDONCK, 1990), a diminuição de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  é bastante superior, de 25,3%, para o mesmo aumento de  $\rho_g$ .

Figura 29. Simulação de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em função de  $\rho_g$  para diferentes reatores pneumáticos com  $U_r$  distintos.



Portanto, pode-se prever que a influência de  $\rho_g$  e, conseqüentemente, da pressão sobre a fragmentação das bolhas de gás é significativa apenas para altos valores de  $U_r$ , encontrados mais comumente em reatores tipo coluna de bolhas.

**APÊNDICE B – Modelo para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio**

Integrando a Equação 28 referente ao balanço material de O<sub>2</sub> no sistema (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009), obtém-se a Equação 29 considerando  $C = C_0$  em  $t = t_0$ .

$$\frac{dC}{dt} = k_L a. (C_S - C) \quad (28)$$

$$C = C_S + (C_0 - C_S). e^{-k_L a.(t-t_0)} \quad (29)$$

onde  $C$  é a concentração de O<sub>2</sub> no seio do líquido,  $C_S$  e  $C_0$  as concentrações de O<sub>2</sub> na fase líquida em equilíbrio com as pressões parciais final e inicial, respectivamente, de O<sub>2</sub> na fase gasosa,  $k_L a$  o coeficiente volumétrico de transferência de O<sub>2</sub> e  $(t - t_0)$  o intervalo de tempo transcorrido até a realização da medida.

Adotando um modelo de primeira ordem para o sensor de O<sub>2</sub> com o intuito de corrigir o seu atraso de resposta (AIBA et al., 1973), têm-se a Equação 30. Substituindo a Equação 30 na 29, obtém-se uma equação diferencial não homogênea de primeira ordem (Equação 31) que, solucionada com a condição inicial  $C_e = C_{e0}$  e adotando  $C_0 = C_{e0}$  e  $C_S = C_{eS}$ , fornece a Equação 32. Essa solução descreve a resposta do sensor frente a um degrau de variação na concentração de saturação do O<sub>2</sub> na fase líquida.

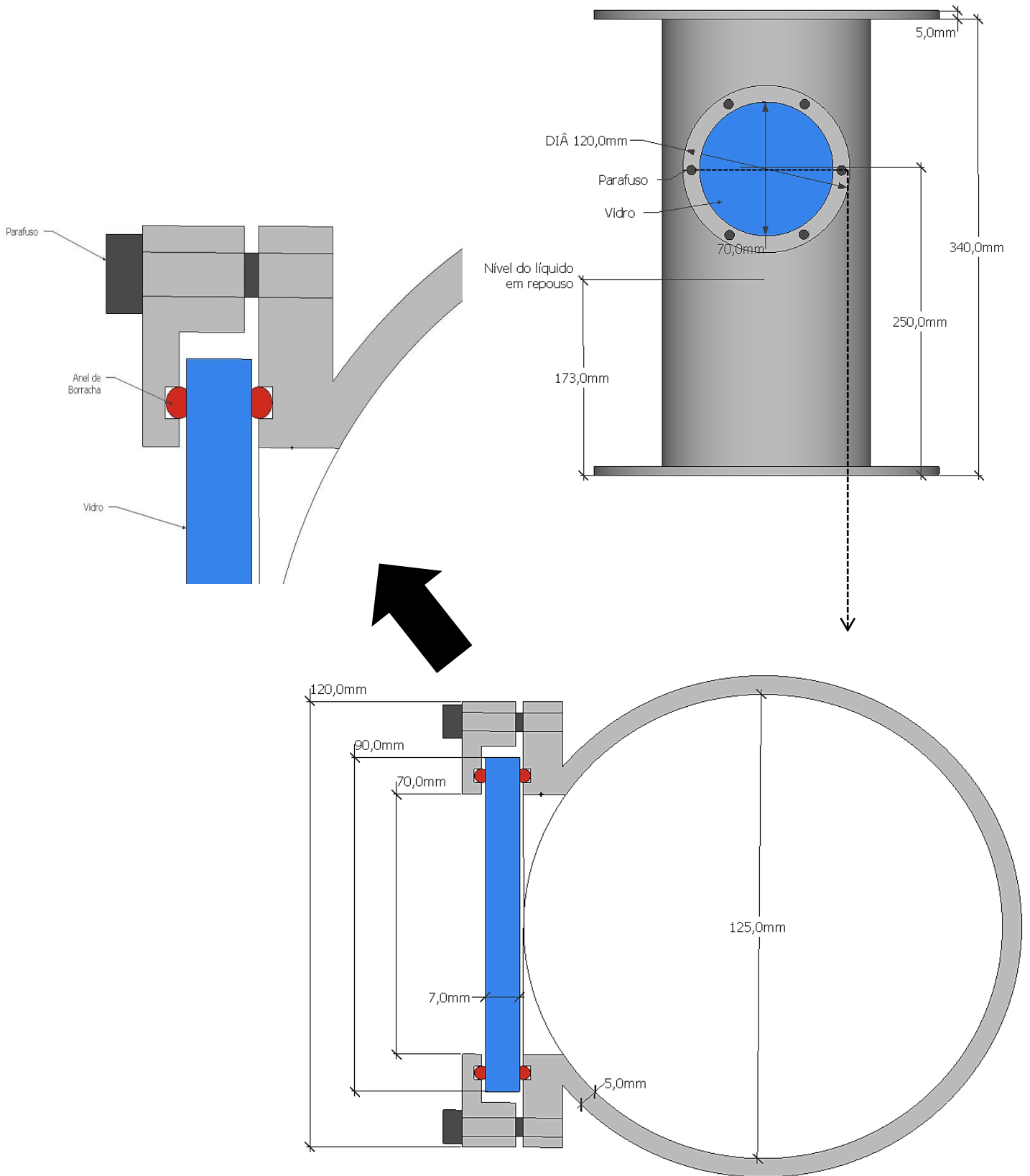
$$\frac{dC_e}{dt} = k_e. (C - C_e) \quad (30)$$

$$\frac{dC_e}{dt} + k_e. C_e = k_e. [C_{eS} + (C_{e0} - C_{eS}). e^{-k_L a.(t-t_0)}] \quad (31)$$

$$C_e = C_{e0}. e^{-k_e.(t-t_0)} + C_{eS}. (1 - e^{-k_e.(t-t_0)}) + \frac{k_e.(C_{eS}-C_{e0})}{k_e-k_L a}. (e^{-k_e.(t-t_0)} - e^{-k_L a.(t-t_0)}) \quad (32)$$

onde  $C_{e0}$  é a concentração de  $O_2$  dissolvido medida pelo sensor no instante inicial,  $C_{eS}$  a concentração final de saturação de  $O_2$  dissolvido medida pelo sensor e  $k_e$  a constante de atraso do sensor determinada experimentalmente pelo método dos mínimos quadrados (MARQUARDT, 1963).

**APÊNDICE C – Projeto do tubo superior do biorreator *airlift***



**APÊNDICE D – Projeto da tampa do biorreator *airlift***

1 – 10,9mm (DIÂ)  
2 – 14,7mm (DIÂ)

