

# **Meios de cultura utilizados na fermentação industrial**

## Nutrientes utilizados nas fermentações Industriais

### FONTE DE CARBONO

Melaços

Amido

Celulose

Extracto de Malte

Metanol

Resíduos de indústrias

### FONTE DE AZOTO

Sais de amónio

Nitrato

Licor de milho

Extracto de levedura

Peptonas

Vitaminas

Oligoelementos

Oxigénio

Soluções Tampão

### FONTE DE FÓSFORO

Fosfato

**Fatores que influenciam a escolha da fonte de carbono e de azoto nas fermentações industriais**

## Meios de Fermentação Industrial

- Percussores (por ex ácido fenilacético)
- Indutores (por ex celulose)
- Inibidores (por ex bisulfito de sódio)
- Modificadores da permeabilidade da membrana  
(por ex surfactantes)
- Oxigénio / arejamento
- Anti-espumas (por ex óleos vegetais)

# **Sistemas de Fermentação**

# SCALE UP

**Escala laboratorial** – Podem ser utilizados balões Erlenmeyer de 1 a 10 Litros (culturas descontínuas, fechadas ou “batch”) como também culturas contínuas.

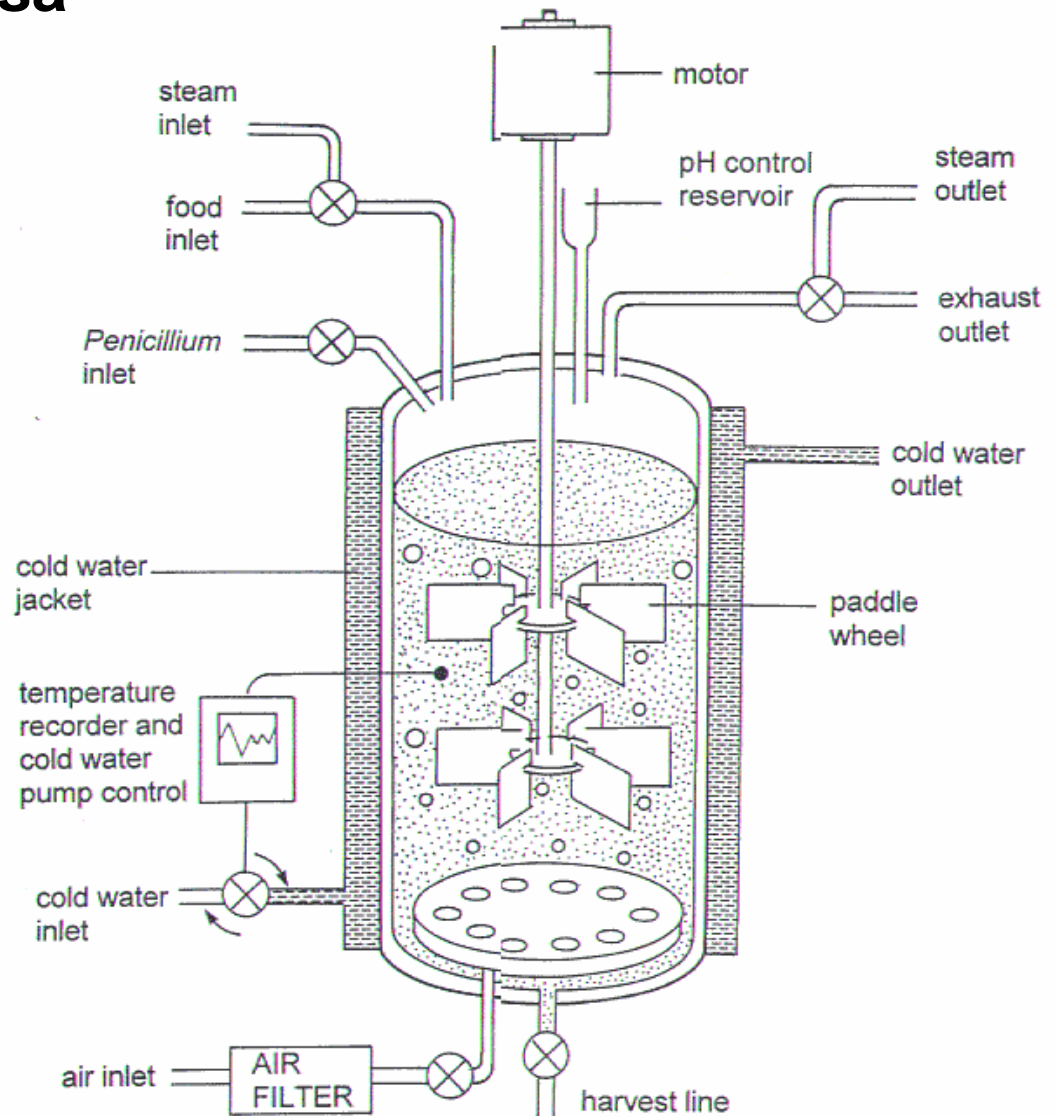
Nesta escala são testados e otimizados os parâmetros que mais influenciam a produção do produto.

**Escala piloto** – Fermentadores de 300 a 3.000 Litros (tamanho intermédio). À medida que a dimensão do biorreactor aumenta, o controlo da concentração de oxigénio torna-se um factor importante. Muitas vezes esta escala é utilizada para produzir biomassa suficiente para servir de inóculo aos fermentadores de grandes dimensões.

**Escala industrial** (larga escala) – Fermentadores de 10.000 a 500.000 Litros, monitorizados ao longo do tempo e em que são feitos pequenos ajustamentos, nomeadamente de pH e de concentração de oxigénio, para obter o rendimento normal do processo.

# Fermentação submersa

REACTOR PERFEITAMENTE  
AGITADO E AREJADO



“Stirred-tank” reactor- com agitação mecânica

# Fermentação em substrato sólido



g252125 [RM] © www.visualphotos.com



drterrywillard.com



Formação de produtos num substrato sólido

Cultura de cogumelos

Produção de enzimas

Crescimento de organismos micelianos que conseguem crescer com elevadas concentrações de nutrientes

Aplicação comercial - Japão

# Fermentações assépticas e não assépticas

Table 6.1 Examples of aseptic and non-aseptic fermentations

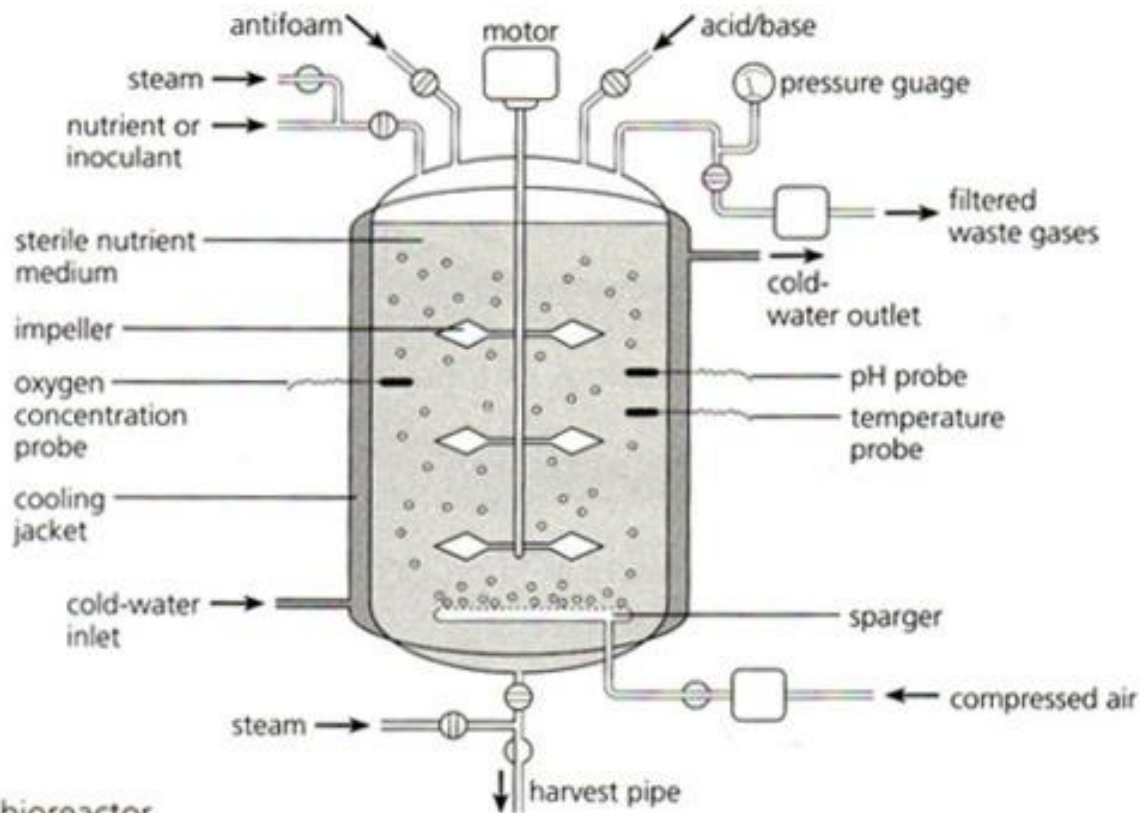
Aseptic		Non-aseptic	
Aerobic	Anaerobic	Aerobic	Anaerobic
Animal and plant cell cultures	Acetone	Acetification of ethanol in vinegar production*	Alcoholic beverages; beer, wine, etc.*
Alkaloids	Butanol	Ripening of some cheeses	Primary dairy fermentations*
Amino acids	Ethanol	Mushroom production	Silage production
Most antibiotics	Glycerol	Aerobic waste-water treatment	Anaerobic waste-water treatment
Most biomass (SCP) production	Lactic acid		
Most enzymes	Some toxins		
Most organic acids			
rDNA proteins			
Steroid biotransformations			
Some toxins			
Most vaccines			
Most vitamins			
Xanthan gum			

\* Usually a clean operation often referred to as 'commercially sterile'.

# **Modos de operação de reatores biológicos**

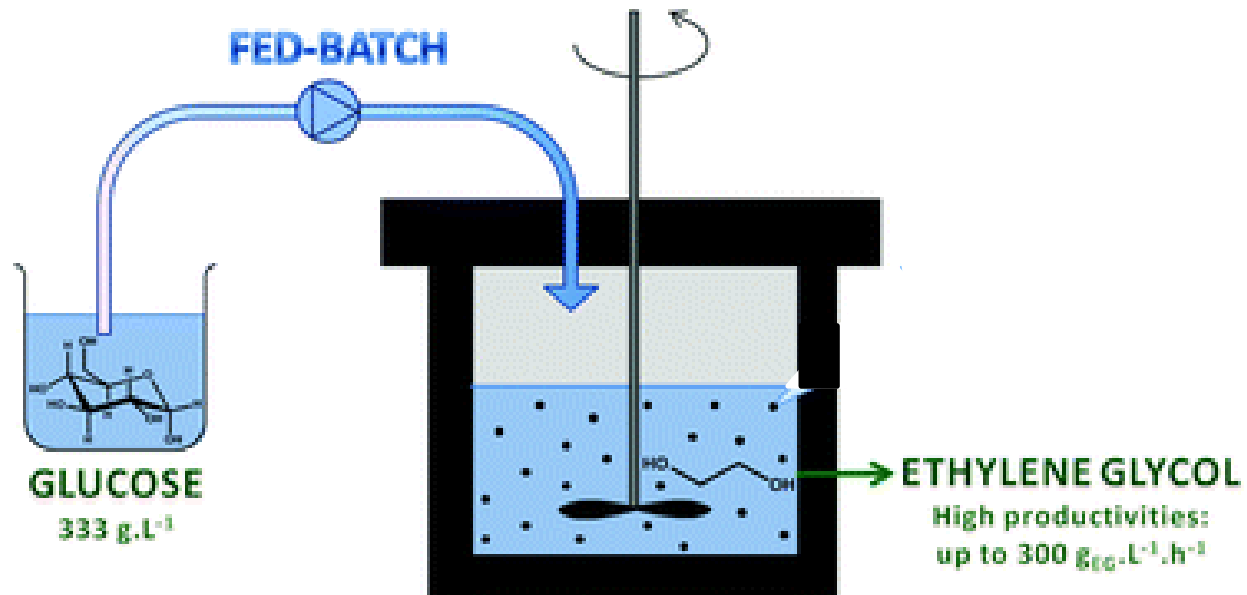
# OPERAÇÃO DESCONTÍNUA; sistema fechado ou batch

Acerto de pH, arejamento e anti-espumas

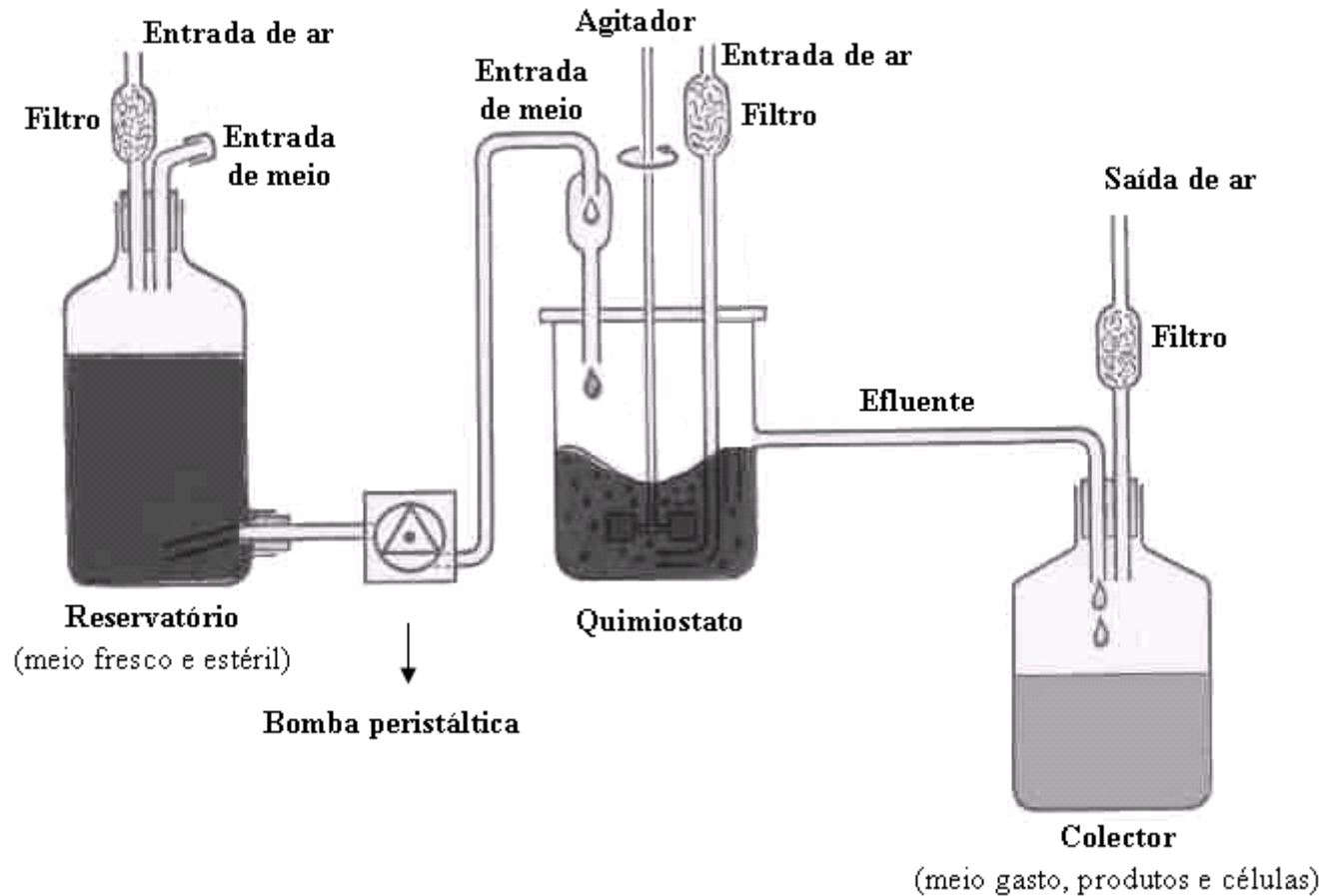


A bioreactor

# OPERAÇÃO SEMICONTÍNUA

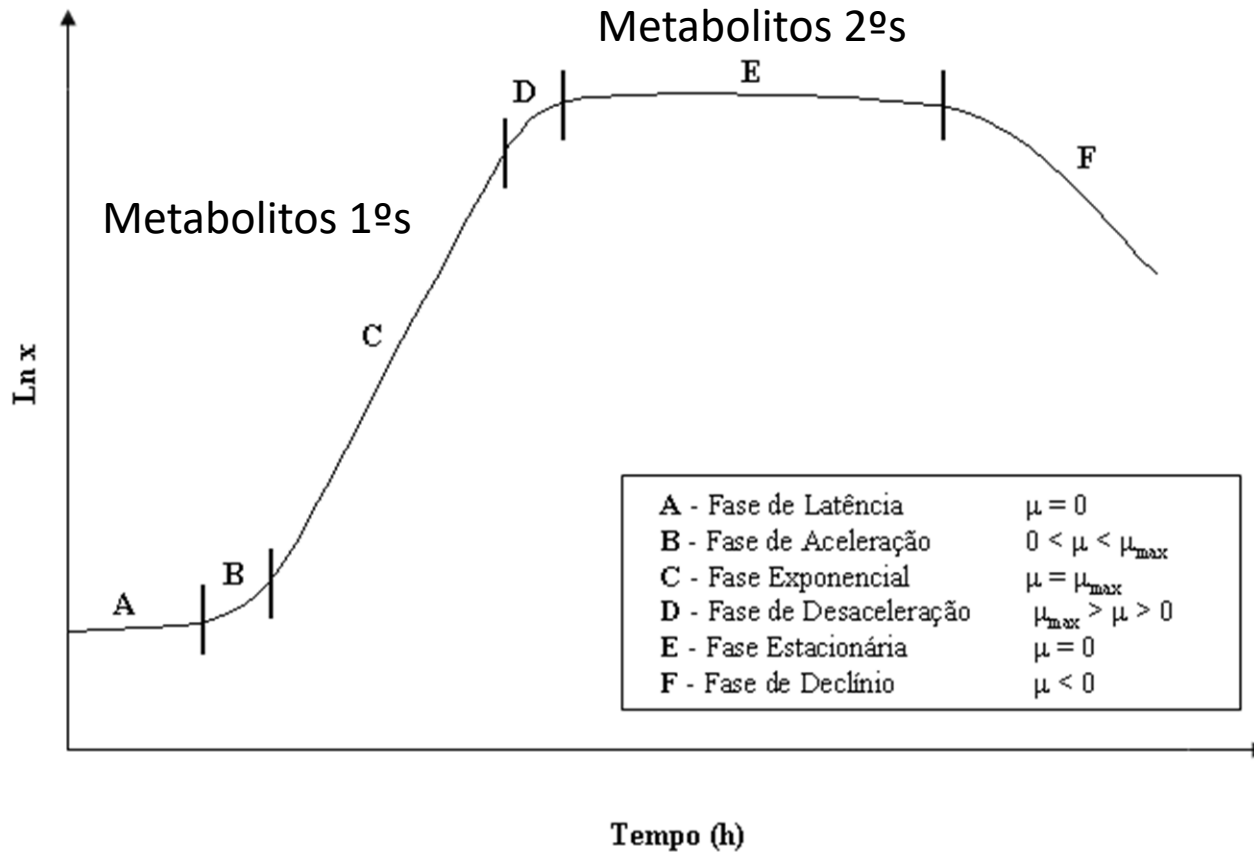


# Operação contínua – Sistema Quimiostato

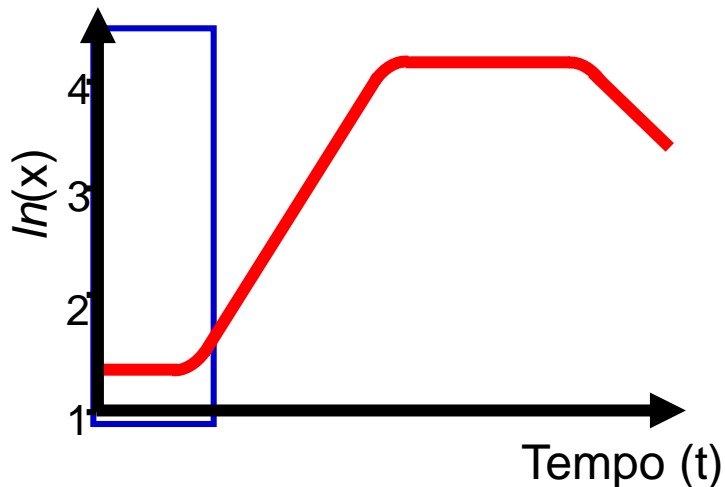


# **Cinética de crescimento**

# Cinética de crescimento em sistema fechado



## Fase de latência do crescimento microbiano

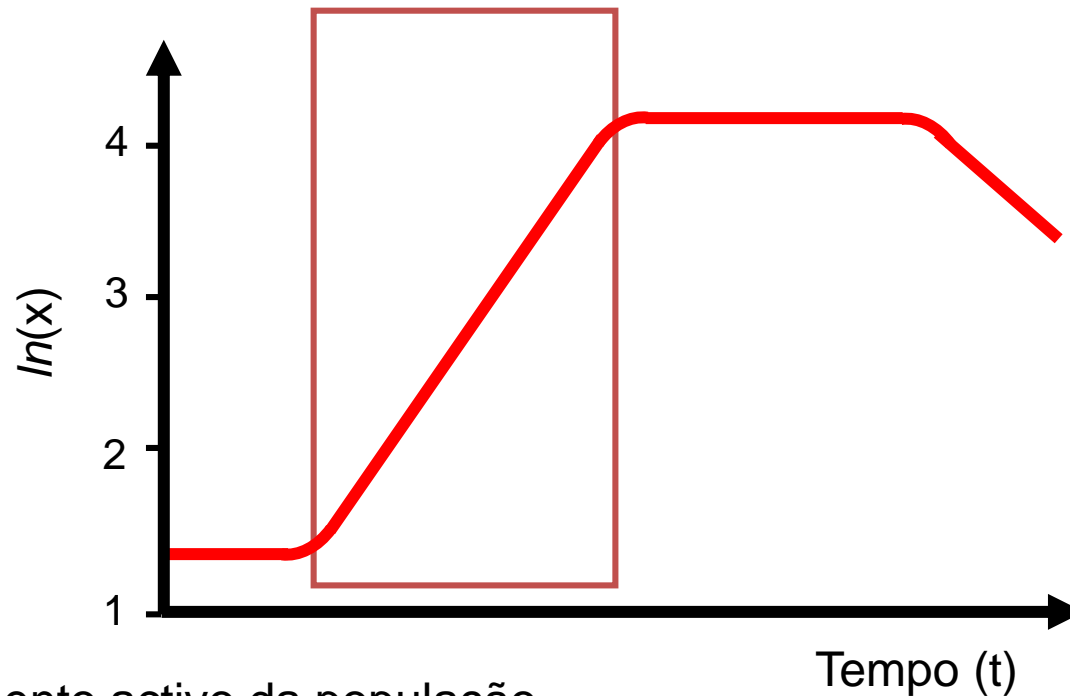


Fase em que não se observa crescimento e que antecede a fase exponencial (adaptação às novas condições, síntese de enzimas, etc)

**A sua duração depende de:**

- Idade do inóculo
- Estado do inóculo
- Tamanho do inóculo
- Meio de inoculação
- Condições de crescimento (T, etc)

## Fase exponencial do crescimento microbiano (Trofofase)



Fase de crescimento activo da população  
Sem limitação de nutrientes

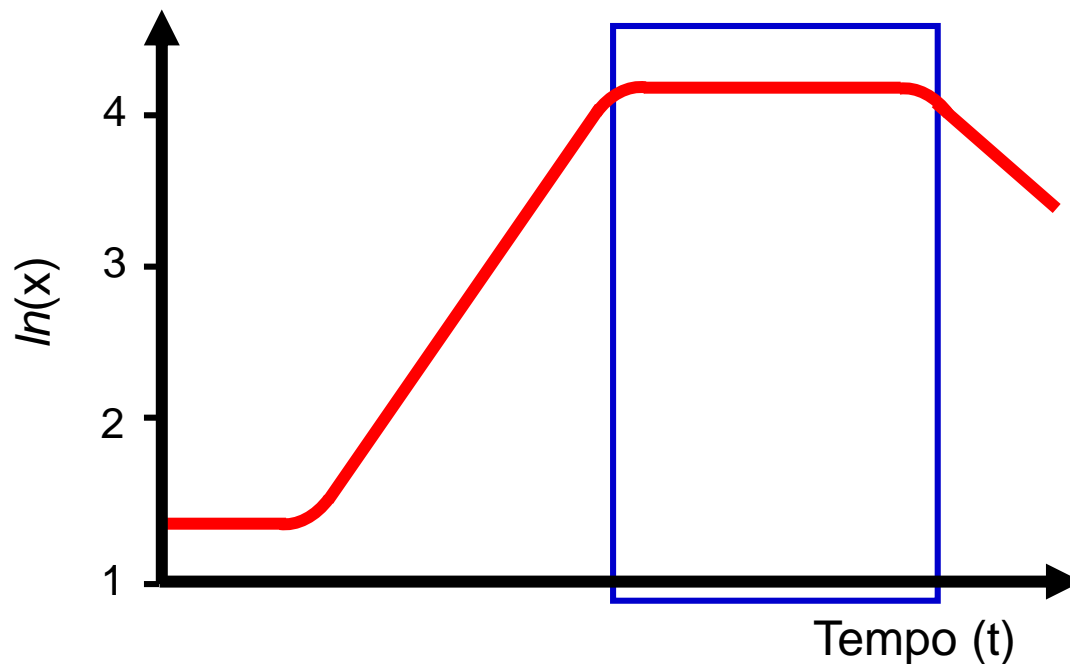
A taxa de crescimento associada a esta fase depende fundamentalmente de :

- Características do microrganismo
- Condições de crescimento

## Fase estacionária do crescimento microbiano (Idiofase)

Fase em que deixa de se observar crescimento do microrganismo.

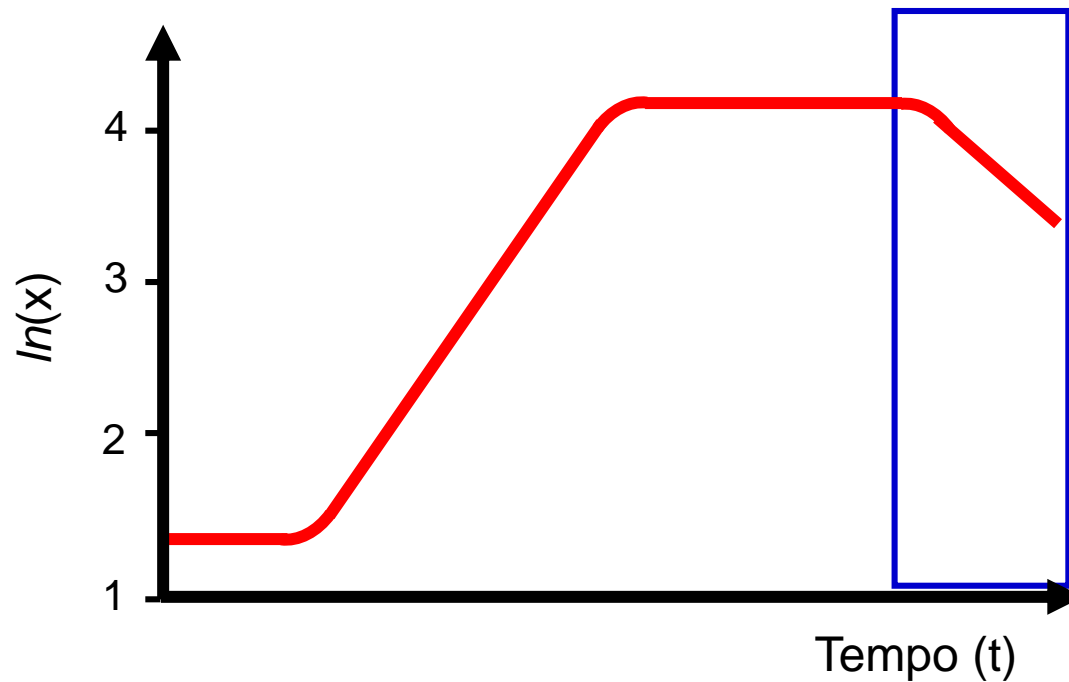
Ocorre, normalmente, por limitação de um nutriente essencial



# Morte celular

Após a fase estacionária, as células podem ou não morrer.

Esta morte pode ser acompanhada pela lise celular.  
(p.e. efeito de metabolitos tóxicos)



## **Parâmetros de crescimento em sistema fechado**

Taxa de crescimento máxima

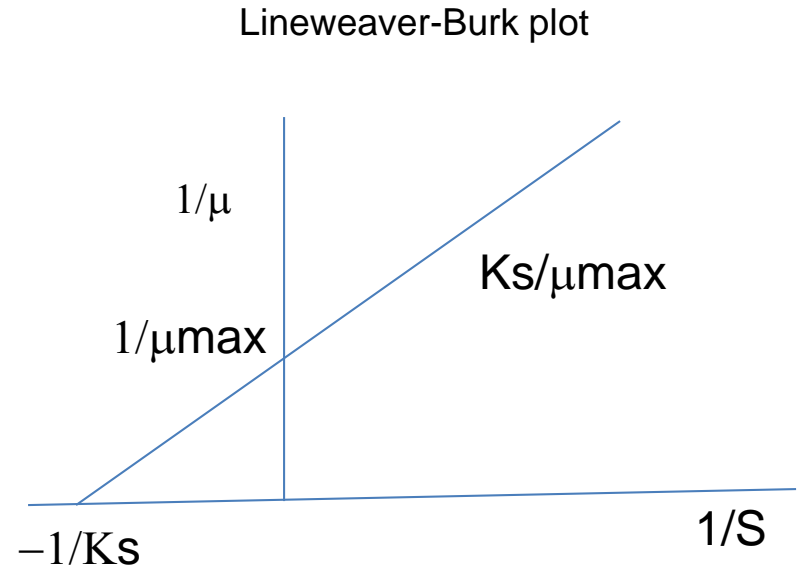
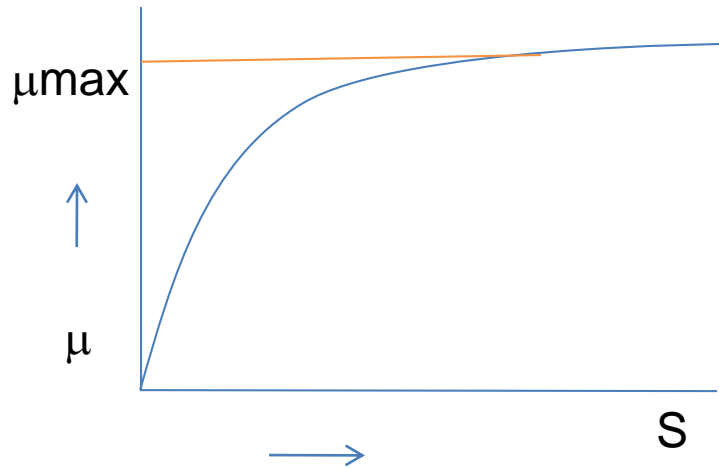
Coeficiente de rendimento

Produtividade

# Optimization of Batch Fermentation

Growth as a function of substrate concentration

$$\mu = f(S)$$



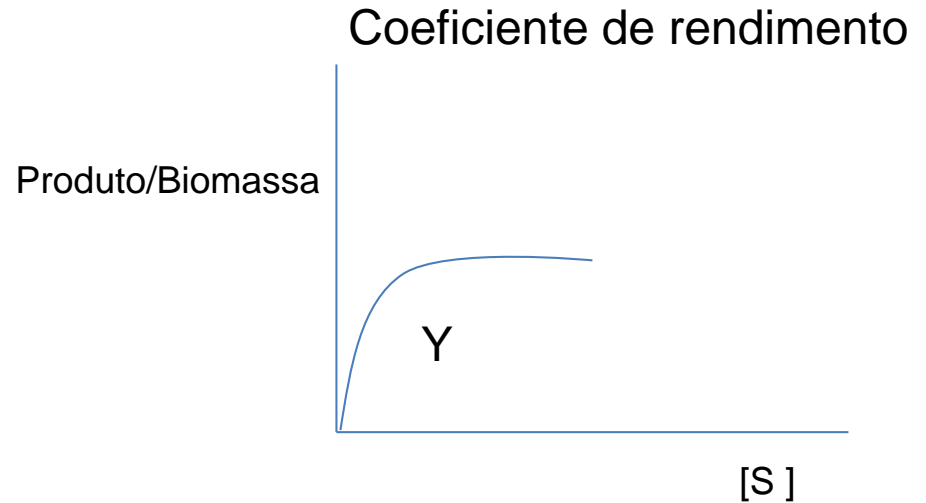
$K_s$  – Saturation constant

$K_s = S$  at  $\mu = \mu_{\max}/2$

# Optimization of Batch FERMENTATIONS

## Rendimento relativo ao produto

$$Y_{P/S} = \frac{\text{g produto produzido}}{\text{g substrato utilizado}}$$



## Rendimento relativo ao crescimento :

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S - S_r}$$

X - Biomassa total formada (fase estacionária) g/L

S - Concentração substrato inicial

S<sub>r</sub> - Concentração de substrato residual

## **Y coeficiente de rendimento – (g biomassa/g de substrato utilizado)**

Y depende de dois processos metabólicos básicos:

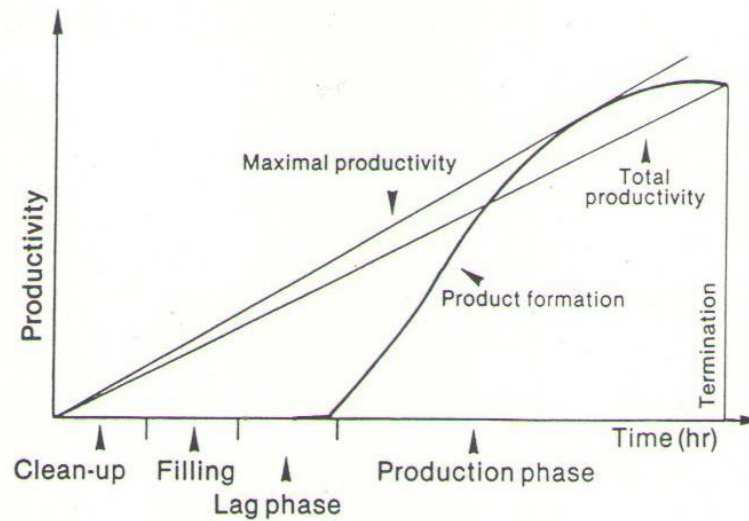
1. Quanto substrato é utilizado para produzir nova biomassa
2. Quanto substrato é consumido pelas células para energia de manutenção:
  - Gastos em renovação de macromoléculas (proteínas, RNA)
  - Mobilidade
  - Expulsão activa de metabolitos tóxicos,
  - Manutenção de gradientes electroquímicos de iões
  - Manutenção do pH intracelular

Quanto mais afastadas das condições óptimas maiores são os gastos de energia para manutenção.

## Custo – Eficácia do Processo Industrial

**Produtividade (P)** = Quantidade de Produto Formado / Tempo de Fermentação  
Unidades / hora litro<sup>-1</sup>

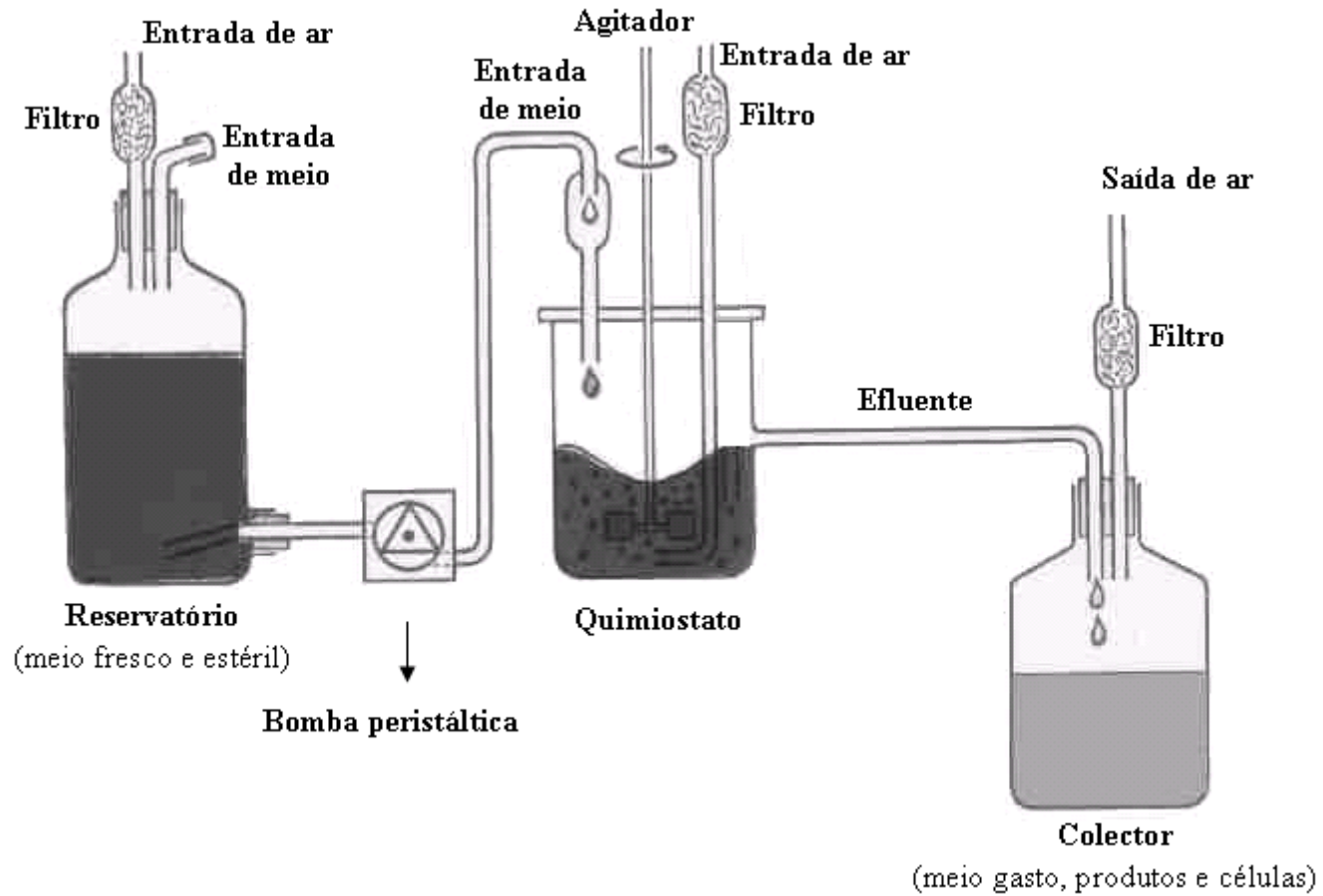
Produtividade total e Produtividade máxima



# Continuous Culture

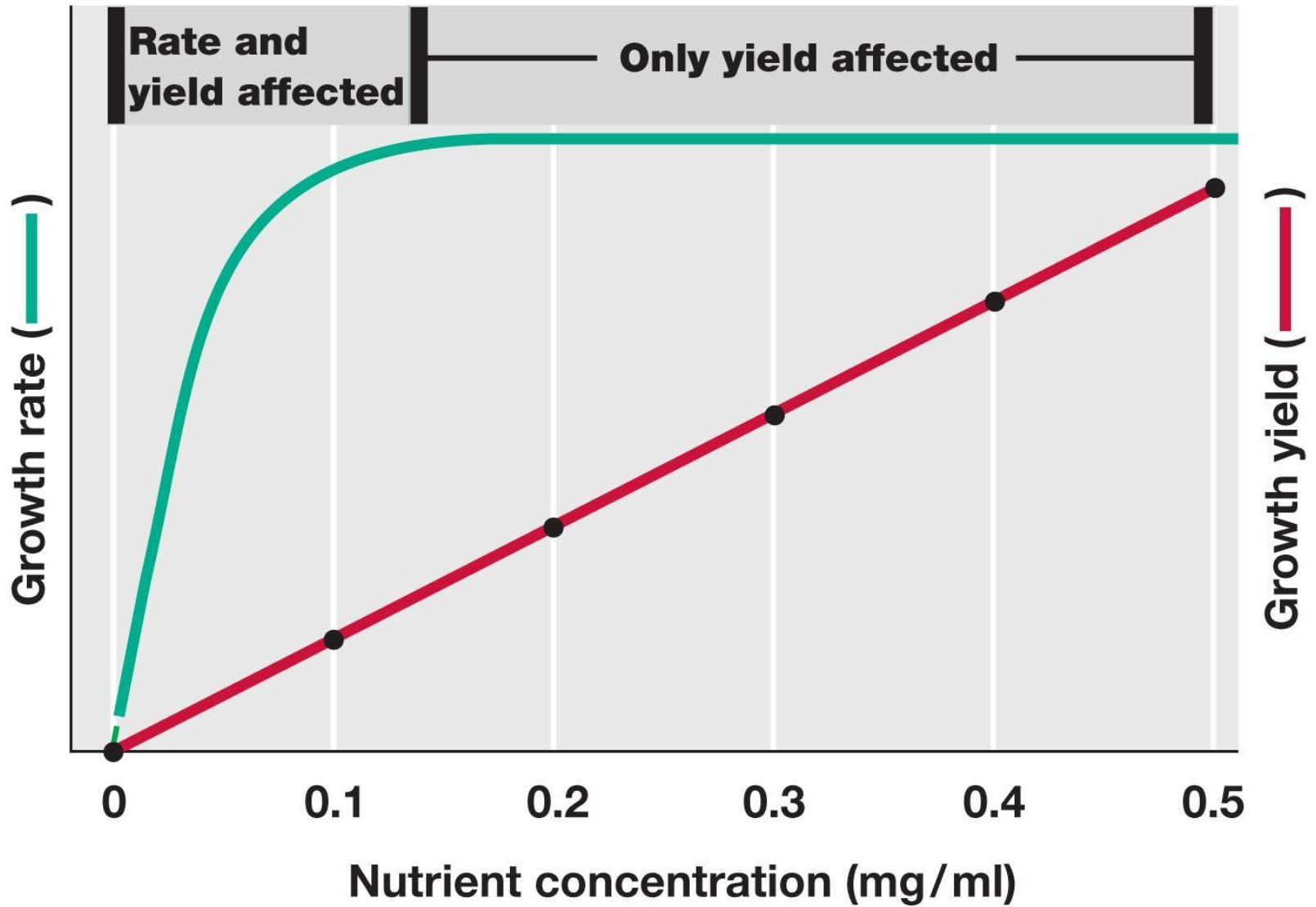
- Continuous culture: an open-system microbial culture of fixed volume
- Chemostat: most common type of continuous culture device
  - Both growth rate and population density of culture can be controlled independently and simultaneously
    - Dilution rate: rate at which fresh medium is pumped in and spent medium is pumped out
    - Concentration of a limiting nutrient

## Sistema contínuo – Quimiostato



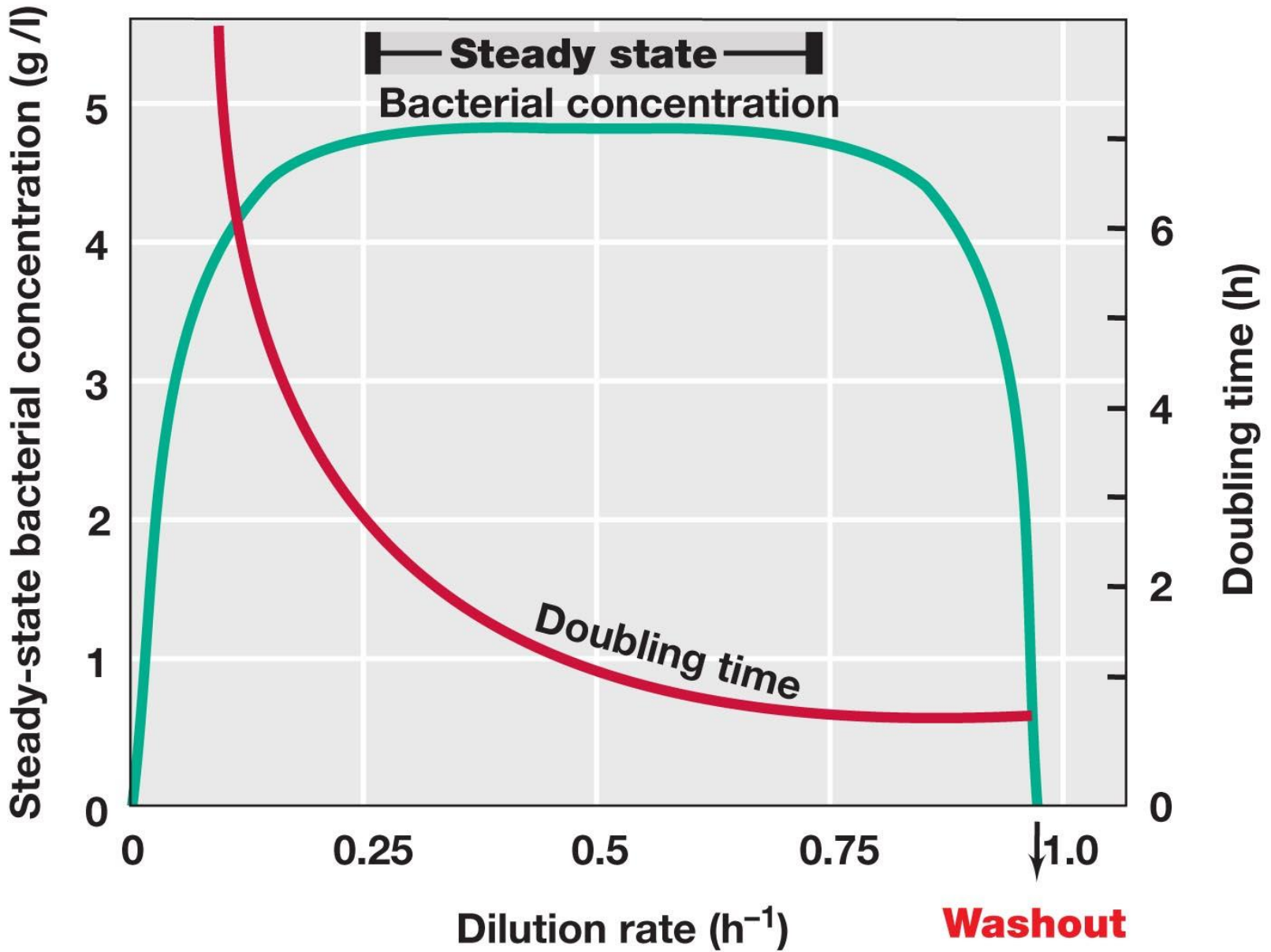
# Continuous Culture

- **In a chemostat** (Continuous Culture)
  - The growth rate is controlled by dilution rate
  - The growth yield (cell number/ml) is controlled by the concentration of the limiting nutrient
- **In a batch culture**, growth conditions are constantly changing; it is impossible to independently control both growth parameters



# Continuous Culture

- Chemostat cultures are sensitive to the dilution rate and limiting nutrient concentration
  - At too high a dilution rate, the organism is washed out
  - At too low a dilution rate, the cells may die from starvation
  - Increasing concentration of a limiting nutrient results in greater biomass but same growth rate



# **PROCESSO BIOTECNOLÓGICO**

**Recuperação/  
Purificação de produtos**

# PROCESSO BIOTECNOLÓGICO



Em processos típicos de fermentação:

Misturas complexas soluções aquosas:

- Células
- Produtos extracelulares solúveis
- Produtos intracelulares
- Substratos convertidos
- Componentes não convertidos
- Água

**Que processo de separação e purificação do produto?**

Qual a localização do produto?

Qual a dimensão?

Qual a carga?

Qual a solubilidade?

Qual o valor no mercado?

**Custos de produção versus custos  
de purificação!!!!**

# Técnicas de separação e purificação e Economia de escala

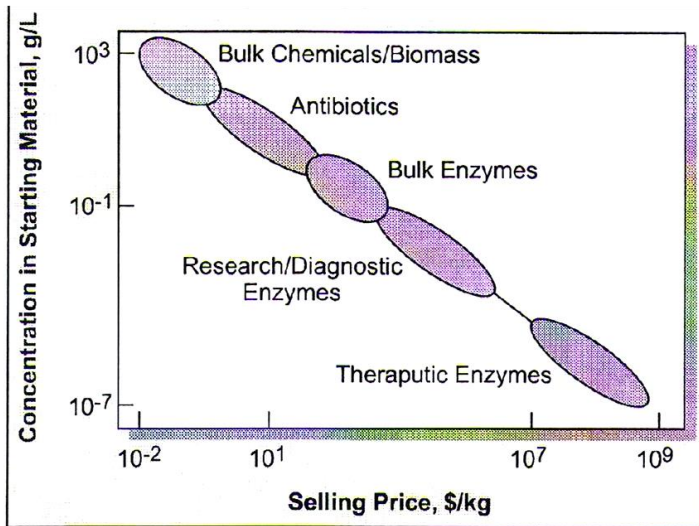


Figure 1. Economy of scale: correlation between achievable product concentration and selling price for common fermentation products.

PIM VAN HOEK.; ARISTOS ARISTIDOU; J. J. H A H N

A N D A L E X PATIST 2003, Fermentation G O E S L A R G E - S C A L E. Biotechnology pp 37s – 42s

## Fatores que justificam elevados custos da recuperação do produto

- Baixa concentração do produto
- Complexidade da mistura com restantes metabolitos
- Múltiplos passos de separação e purificação (elevados custos e significativas perdas de rendimento)

HPLC útil para produtos de elevado valor mas dispendiosa e difícil no “scale up”.

A purificação do produto depende do fim a que se destina p.e.99,999% grau de pureza para proteínas terapêuticas

# **Fermentação limpa: Integração do processo fermentativo com o processo de separação/purificação para redução de “footprint” ambiental**

## **Benefícios da fermentação limpa**

### **Considerações económicas**

#### Minimizar:

- Custos de produção
- Matérias primas
- Desperdícios
- Capital
- Energia

#### Maximizar

- Eficiência
- Rendimento
- Produtividade

# Fermentação limpa

Redução significativa do impacto das matérias primas no processo de separação e purificação do produto

“The bioreactor should be regarded  
as an integrated unit operation  
with both upstream and downstream unit operations.”

# Estratégias de Integração do processo fermentativo

## ❑ SIMPLIFICAR OS CALDOS FERMENTATIVOS

Eliminar componentes desnecessários

## ❑ FACILITAR A PURIFICAÇÃO POR ALTERAÇÃO DA FORMA DO PRODUTO

pH da fermentação de acordo com a facilidade de separação do produto.

## ❑ REUTILIZAÇÃO DE COMPONENTES DO CALDO FERMENTATIVO –

Reciclagem de células e de nutrientes

## ❑ REMOÇÃO DO PRODUTO DURANTE A FERMENTAÇÃO

Evitar inibição pelo produto e diminuição da concentração do produto

## ❑ REDUÇÃO DO CONTEÚDO EM ÁGUA DO CALDO FERMENTATIVO

Aumentar concentração de biomassa; aumentar da concentração do produto