

Organizador deste volume
Willibaldo Schmidell

COLEÇÃO
BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL

Volume 2 _____
ENGENHARIA BIOQUÍMICA

COORDENADORES DA COLEÇÃO

Flávio Alterthum
Willibaldo Schmidell
Urgel de Almeida Lima
Iracema de Oliveira Moraes

Blucher

2^a
edição

Coordenadores da coleção

Flávio Alterthum

Willibaldo Schmidell

Urgel de Almeida Lima

Iracema Moraes

COLEÇÃO BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

VOLUME 2

ENGENHARIA BIOQUÍMICA

2ª edição

Organizador deste volume

Willibaldo Schmidell

Coleção Biotecnologia Industrial, Volume 2 – Engenharia bioquímica, 2ª edição

© 2021 Willibaldo Schmidell (organizador do volume)

Flávio Alterthum, Willibaldo Schmidell, Urgel de Almeida Lima e Iracema de Oliveira Moraes
(coordenadores da coleção)

Editora Edgard Blücher Ltda.

Imagem da capa: iStockphoto

Publisher Edgard Blücher

Editor Eduardo Blücher

Coordenação editorial Jonas Eliakim

Produção editorial Isabel Silva, Luana Negraes

Preparação de texto Maurício Katayama, Cátia de Almeida

Diagramação Roberta Pereira de Paula

Revisão de texto Bárbara Waida

Capa Leandro Cunha

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel.: 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme 5. ed.
do *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*,
Academia Brasileira de Letras, março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios sem autorização escrita da editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Schmidell, Willibaldo

Engenharia bioquímica / organização de Willibaldo
Schmidell. – 2. ed. – São Paulo : Blucher, 2021.
(Coleção Biotecnologia Industrial – v. 2)

748 p. il. (Coleção biotecnologia industrial,
coordenada por Flávio Alterthum, Willibaldo Schmidell,
Urgel de Almeida Lima, Iracema de Oliveira Moraes)

Bibliografia

ISBN 978-65-5506-018-8 (impresso)

ISBN 978-65-5506-019-5 (eletrônico)

1. Biotecnologia - Industriais. 2. Microbiologia
industrial. I. Alterthum, Flávio. II. Schmidell, Willibaldo.
III. Lima, Urgel de Almeida. IV. Moraes, Iracema de
Oliveira. V. Série.

20-0385

CDD 606.6

Índices para catálogo sistemático:

1. Biotecnologia

CONTEÚDO

1. ENGENHARIA BIOQUÍMICA: UMA APLICAÇÃO <i>SUI GENERIS</i> DA ENGENHARIA QUÍMICA	17
Referências	20
2. MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL	21
2.1 Introdução	21
2.2 Fontes de microrganismos de interesse	23
2.3 Características desejáveis de microrganismos e meios de cultura para aplicação industrial	26
2.4 Considerações finais	34
Referências	34
3. ESTERILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS	37
3.1 Introdução	37
3.2 Métodos de desinfecção	38
3.3 Uso de agentes químicos	39

3.4	Uso de métodos físicos	42
3.5	Sistemas de bioprocessamento de descartáveis (<i>disposable bioprocessing systems</i>)	50
	Referências	51
4.	ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS DE FERMENTAÇÃO POR AQUECIMENTO COM VAPOR	53
4.1	Introdução	53
4.2	Descrição sumária dos processos de esterilização por calor úmido	54
4.3	Cinética da destruição térmica de microrganismos	59
4.4	Destruição de nutrientes do meio como consequência da esterilização	65
4.5	Considerações gerais a respeito do cálculo do tempo de esterilização	68
4.6	Cálculo do tempo de esterilização por processo descontínuo	70
4.7	Cálculo do tempo de esterilização por processo contínuo	76
	Referências	78
5.	ESTERILIZAÇÃO POR FILTRAÇÃO	79
5.1	Introdução	79
5.2	Esterilização de soluções e meios de cultura	82
5.3	Esterilização de ar e gases	88
5.4	Considerações finais	104
	Referências	105
6.	TIPOS DE BIORREADORES E FORMAS DE OPERAÇÃO	109
6.1	Introdução	109
6.2	Tipos de biorreatores	111
6.3	Formas de operação	118
	Referências	124

7. ANÁLISE DE BIORREATORES	127
7.1 Introdução	127
7.2 Equação geral de balanço de massa	128
7.3 Cultivo descontínuo ou em batelada	130
7.4 Cultivo descontínuo alimentado ou em batelada alimentada	135
7.5 Cultivo contínuo sem reciclo de células	143
7.6 Cultivo contínuo com reciclo externo de células	151
7.7 Cultivo contínuo com reciclo interno de células	155
7.8 Cultivo contínuo com tanques em série	158
7.9 Associação de cultivos em batelada e contínuo	160
Referências	168
8. MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS	171
8.1 Introdução	171
8.2 Formulação dos modelos matemáticos de bioprocessos	172
8.3 Ajuste de parâmetros do modelo formulado	199
8.4 Simulação computacional de bioprocessos	234
Referências	235
9. AGITAÇÃO E AERAÇÃO EM BIOPROCESSOS	241
9.1 A importância da transferência de oxigênio	241
9.2 Sistemas para a transferência de oxigênio	243
9.3 Concentração de oxigênio dissolvido em soluções saturadas	245
9.4 Demanda de oxigênio em bioprocessos: respiração microbiana	248
9.5 Transferência de oxigênio	251
9.6 Consumo de potência na agitação e na aeração de fluidos newtonianos e não newtonianos	276
9.7 Correlações para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)	290

9.8	Cisalhamento celular em bioprocessos	300
9.9	Considerações finais	305
	Referências	306
10.	VARIAÇÃO DE ESCALA	311
10.1	Introdução	311
10.2	Critérios para a ampliação de escala	315
10.3	Critérios de aeração	327
10.4	Comparações entre critérios para a ampliação de escala	329
10.5	Redução de escala	332
10.6	Considerações finais	333
	Referências	334
11.	INSTRUMENTAÇÃO, CONTROLE E AUTOMAÇÃO DE BIOPROCESSOS	337
11.1	Introdução	337
11.2	Sensores em bioprocessos	342
11.3	Controle automático aplicado a bioprocessos	370
11.4	Automação de bioprocessos	383
	Referências	391
12.	RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS OBTIDOS EM BIOPROCESSOS (<i>DOWNSTREAM PROCESSING</i>)	395
12.1	Introdução	395
12.2	Separação células-líquido	398
12.3	Rompimento celular	412
12.4	Concentração	419
12.5	Processos cromatográficos	425
12.6	Novas tecnologias para purificação	442
12.7	Tratamentos finais	444
12.8	Integração de etapas na obtenção de produtos biotecnológicos	446

12.9	Monitoramento do processo de purificação	449
12.10	Considerações finais	452
	Referências	453
13.	USO DE ENZIMAS EM REATORES	455
13.1	Introdução	455
13.2	Enzimas solúveis	456
13.3	Imobilização de enzimas: aspectos fundamentais	457
13.4	Reatores enzimáticos	465
13.5	Exemplos de processos enzimáticos	477
	Referências	487
14.	REATORES COM CÉLULAS IMOBILIZADAS	491
14.1	Introdução	491
14.2	Técnicas de imobilização	495
14.3	Tipos de reatores e características do suporte	503
14.4	Aplicações industriais de sistemas com células imobilizadas	512
	Referências	514
15.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	519
15.1	Introdução	519
15.2	Histórico do processo da FES	521
15.3	Microrganismos comumente utilizados	522
15.4	Substratos: características e composição	523
15.5	Sistemas e reatores para a fermentação em estado sólido	525
15.6	Controles e monitoramento do processo	531
15.7	Extração de produtos	536
15.8	Vantagens e desvantagens do processo em estado sólido	537
15.9	Exemplos de casos	538
	Referências	543

16. OPERAÇÃO DE INSTALAÇÕES INDUSTRIAIS	547
16.1 Introdução	547
16.2 Condições gerais para execução de bioprocessos	548
16.3 Operação de uma indústria bioprocessadora	552
16.4 Operação de um bioprocessos asséptico	557
16.5 Exemplo de operação em indústria de bioprocessamento	559
Referências	564
17. CONSTRUÇÃO DE EQUIPAMENTOS PARA BIOPROCESSOS	567
17.1 Introdução	567
17.2 Características básicas de reatores para bioprocessos	569
17.3 Construção do biorreator	576
17.4 Obtenção e manutenção das condições de esterilidade e biossegurança	593
17.5 Válvulas e purgadores de vapor	599
17.6 Biorreatores sem agitação mecânica	604
17.7 Considerações de sanitização e limpeza para construção dos equipamentos de bioprocessos	607
17.8 Biorreatores <i>single-use</i>	609
17.9 Cultivo de células animais	609
Referências	612
18. TRATAMENTO BIOLÓGICO DE RESÍDUOS	615
18.1 Introdução	615
18.2 Caracterização de efluentes domésticos e industriais e variáveis de processo	617
18.3 Processos biológicos de remoção de matéria orgânica	624
18.4 Interações microbianas nos processos de tratamento biológico	628
18.5 Sistemas de tratamento	635
18.6 Remoção de nitrogênio	649
Referências	658

19. AVALIAÇÃO ECONÔMICA DE BIOPROCESSOS	661
19.1 Introdução	661
19.2 Fundamentos da avaliação de viabilidade econômica	662
19.3 Análise de fluxo de caixa	671
19.4 Análise de risco	678
19.5 Estudo de caso: viabilidade econômica de destilarias	680
19.6 Considerações finais	686
Referências	687
20. ANÁLISE E CONTROLE DE FLUXOS METABÓLICOS	689
20.1 Introdução	689
20.2 Elementos de engenharia metabólica	690
20.3 Marcação isotópica	704
20.4 Análise matemática de redes metabólicas alternativas	709
20.5 Análise de fluxo metabólico (AFM)	718
20.6 Análise de balanço de fluxo (ABF)	719
20.7 Análise de controle metabólico (ACM)	721
20.8 Ferramentas computacionais	730
Referências	730
SOBRE OS AUTORES	733

CAPÍTULO 1

Engenharia bioquímica: uma aplicação *sui generis* da engenharia química

Walter Borzani

Durante a Segunda Grande Guerra (1939-1945), os chamados “aliados” concentraram esforços consideráveis na consecução de um objetivo muito específico: transferir para escala industrial o processo de laboratório então conhecido de produção de penicilina por fermentação. Ao lado de profissionais já de longa data envolvidos no estudo de atividades microbianas, passaram a atuar engenheiros químicos, com vistas à solução de questões bastante complexas inerentes à desejada ampliação de escala.

Foi nesse período que nasceu o ramo da engenharia química que, mais tarde, por suas peculiaridades, receberia o nome de engenharia bioquímica. Nestes quase 80 anos, esse novo ramo da engenharia química progrediu rapidamente, conduzindo a muitos resultados de indiscutível importância prática.

O objetivo da engenharia bioquímica é a aplicação dos conhecimentos da engenharia química na solução de problemas que se apresentam na implantação de processos biotecnológicos em larga escala e em sua otimização. Segundo Aiba, Humphrey e Millis (1973):

Biochemical engineering is concerned with conducting biological processes on an industrial scale, providing the links between biology and chemical engineering. The authors believe, moreover, that the heart of biochemical engineering lies in the scale-up and management of cellular processes.

Bailey e Ollis (1986), por sua vez, dizem:

Processing of biological materials and processing using biological agents such as cells, enzymes or antibodies are the central domain of biochemical engineering. Success in biochemical engineering requires integrated knowledge of governing biological properties and principles of chemical engineering methodology and strategy. [...] Reaching this objective clearly requires years of careful study and practice.

Convém ainda citar que o primeiro livro dedicado à engenharia bioquímica foi publicado em 1958, por Robert Steel.

Os problemas que se apresentam no âmbito da engenharia bioquímica são, com alguma frequência, de difícil solução, dadas as peculiaridades e a complexidade dos sistemas em que se desenvolvem os processos biotecnológicos. O estudo de vários desses problemas constitui o principal objetivo deste volume, mas parece-nos aconselhável, neste primeiro capítulo, comentar alguns deles, com a única finalidade de dar aos alunos uma ideia das questões que serão examinadas.

Começemos tecendo alguns comentários a respeito dos balanços materiais em processos fermentativos. A célula microbiana responsável pela transformação que nos interessa em um dado processo realiza, além dessa transformação, um grande número de outras reações com o objetivo, para ela absolutamente primordial, de manter-se viva e multiplicar-se. Isso pode dificultar o estabelecimento de balanços materiais, além de afetar o rendimento do processo considerado. O conhecimento das prováveis vias metabólicas que se desenvolvem nas células é, neste particular, de grande auxílio, fornecendo muitas vezes informações que indicam a maneira mais adequada de conduzir o processo que nos interessa.

O fato inevitável, apontado há pouco, de a célula ter a única “preocupação” de manter-se viva e multiplicar-se também pode acarretar sérios problemas no estudo da cinética da transformação que se tem em vista, uma vez que a velocidade de formação do produto que nos interessa pode ser profundamente afetada pelas velocidades de outras reações integrantes do metabolismo do microrganismo. Isso pode dificultar o estabelecimento de modelos matemáticos, cuja importância na otimização e no controle de processos já foi constatada muitas vezes.

A manutenção de um razoável grau de “homogeneidade” no reator, para que todos os agentes da transformação se encontrem, pelo menos aproximadamente, nas mesmas condições (temperatura, pH, concentrações de substâncias do meio), é outro problema a ser considerado, principalmente em reatores industriais.

Consideremos, agora, a operação de esterilização de grandes volumes de meio, muito frequente em indústrias de fermentação. Como proceder: eliminar os microrganismos por filtração do meio ou destruí-los por aquecimento? Se a esterilização por aquecimento tiver sido escolhida, que processo será utilizado: o descontínuo ou o contínuo? Que temperatura de esterilização será adotada e qual o correspondente

tempo do tratamento térmico? Quais serão as dimensões dos equipamentos e os controles necessários em cada caso?

O meio, uma vez esterilizado, será encaminhado ao fermentador, onde será transformado pela ação das células microbianas. Aqui depararemos com muitas alternativas. Serão utilizados microrganismos em suspensão no meio ou células imobilizadas em suportes inertes? Que processo de fermentação será utilizado: o descontínuo, o semicontínuo ou o contínuo? Com ou sem recirculação do microrganismo? Se for escolhido o processo descontínuo, será o descontínuo simples ou o descontínuo alimentado? Se o processo adotado for o semicontínuo, que fração de meio fermentado será periodicamente retirada do reator e substituída por igual volume de meio novo? No caso de se ter optado pelo processo contínuo, será adotado um único reator de mistura, vários reatores de mistura ligados em série ou um reator pistonado? Quais serão as dimensões e o formato do reator? Como controlar as condições de fermentação? Como adicionar alguns nutrientes: todos de uma só vez no preparo do meio, ou de maneira programada durante o andamento do processo?

No caso de se tratar de um processo enzimático contínuo com enzimas imobilizadas, será usado um reator de leito fixo ou de leito fluidizado?

Outro tópico a ser lembrado é o da ampliação da escala de trabalho (*scale-up*): se bons resultados foram obtidos em certas condições em um reator de pequena capacidade, como operar um reator industrial para que os mesmos resultados sejam alcançados?

Finalmente, para não alongarmos demasiadamente estes comentários, nunca será demais ressaltar a importância da escolha dos processos que serão utilizados, tanto na separação de produtos e subprodutos como no tratamento, ou no aproveitamento, dos resíduos.

A solução adequada de muitas das questões com que se defronta a engenharia bioquímica passa, necessariamente, pelo estabelecimento de modelos matemáticos, como se constatará ao longo deste volume. Parece-nos oportuno, por esse motivo, ressaltar a utilidade desses modelos, valendo-nos de um artigo publicado por Fredrickson et al. (1970):

1. Models serve to correlate data and to provide a concise way of thinking about a system or process.
2. Models allow one – within limits – to predict quantitatively the performance of a system or process. Thus, they can reduce the amount of experimental labor necessary to design and/or optimize a process.
3. Models help to sharpen thinking about a system or process and can be used to guide one's reasoning in the design of experiments, to isolate important parameters and elucidate the nature of the system or process. That is to say, the combinations of mathematical modelling and experimental research often suggests new experiments that need to be done.

REFERÊNCIAS

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

BAILEY, J. E.; OLLIS, D F. *Biochemical engineering fundamentals*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986.

SIMON, P; MEUNIER, R. *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Paris: Masson et Cie., 1970.

CAPÍTULO 2

Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial

Willibaldo Schmidell

Kellen Zanfonato

2.1 INTRODUÇÃO

O objetivo central do presente capítulo é a descrição das características gerais que microrganismos e meios de cultura devem apresentar para que seja possível utilizá-los em uma operação industrial, ou seja, executada em biorreatores com volumes de dezenas de milhares de litros. Apesar de se procurar mencionar ao longo do texto alguns exemplos, não há a preocupação em descrever características particularmente importantes para um determinado bioprocessos, pois isso tornaria o tema extremamente longo, além de sua importância ser questionável, tendo em vista o escopo geral deste capítulo.

Na Figura 2.1 encontra-se um esquema geral de um bioprocessos, no qual se buscou ressaltar alguns pontos essenciais que permitem um início de discussão dentro do objetivo acima traçado. Conforme se pode observar na figura, o sucesso de um dado bioprocessos depende da definição adequada de quatro pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas envolvidas na recuperação do produto.

Na verdade, esses quatro pilares de um bioprocessos interagem enormemente, sendo necessário defini-los de forma conjunta, levando em consideração aspectos biológicos e econômicos, o que torna bastante complexa a adequada definição. Para tornar clara essa ideia, pode-se mencionar que, apesar de sempre se pretender empregar meios

de cultura baratos, o microrganismo deve encontrar nesse meio condições adequadas para realizar a conversão pretendida.

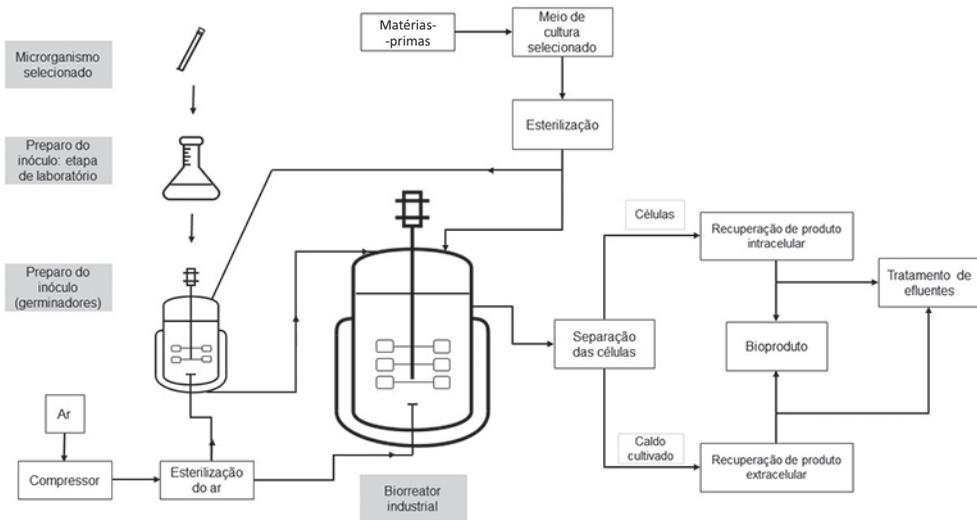


Figura 2.1 Esquema geral de um bioprocessamento.

Em termos de formas de condução de processo, seria difícil imaginar a produção de etanol no Brasil (algo em torno de 35 bilhões de litros por ano) caso não se operassem os biorreatores em sistema descontínuo alimentado, ou mesmo contínuo, porém com o reciclo das células. Da mesma forma, os avanços alcançados pela digestão anaeróbia no tratamento biológico de águas residuais deveu-se especialmente ao surgimento dos reatores contínuos operados com fluxo ascendente e reciclo interno de células.

As operações finais para a recuperação do produto (operações de *downstream*) são igualmente de alta importância. Sabe-se que a melhor maneira para a recuperação do etanol, após a fermentação alcoólica, é a operação de destilação, mas ela incide significativamente no custo do produto final, em virtude da energia necessária para a sua execução. No entanto, a importância de uma adequada definição das operações de recuperação do produto fica mais clara quando se aborda a produção de produtos de alto valor agregado, como antibióticos, enzimas ou outras proteínas; nesses casos, as operações de recuperação do produto podem ser responsáveis por 40% a 70% do custo do produto final, indicando claramente a sua importância em termos de uma adequada definição.

Os aspectos relacionados com a forma de condução de biorreatores, bem como as operações de recuperação de produtos, serão abordados em vários capítulos do presente volume. Cabe, portanto, conforme salientado anteriormente, alguma reflexão sobre microrganismos e meios de cultura que podem ser eventualmente empregados em um bioprocessamento.

2.2 FONTES DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE

Microrganismos de possível interesse industrial podem ser obtidos das seguintes formas:

- isolamento a partir de recursos naturais;
- aquisição em coleções de culturas;
- obtenção de mutantes naturais;
- obtenção de mutantes induzidos;
- obtenção de microrganismos recombinantes com uso de ferramentas de engenharia genética.

O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais, como solo, água, plantas etc., é uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens. Trata-se de uma atividade que envolve muito trabalho experimental, significando um custo relativamente elevado, porém pode conduzir ao isolamento de linhagens mais eficientes na produção de um dado produto e, mais importante que isso, à descoberta de novos produtos, o que lhe confere uma relevância inquestionável.

Cumprе lembrar que empresas produtoras de bioprodutos com alto valor agregado mantêm programas de isolamento de linhagens de recursos naturais, justamente com o objetivo de incrementar a produção de certos produtos ou de encontrar linhagens produtoras de novos antibióticos, por exemplo. É claro que esse isolamento deve ter início com certas premissas, definindo-se o que se pretende obter, pois o simples isolamento poderá levar à disponibilidade de um número inimaginável de culturas, o que dificulta a convergência para o processo ou o produto pretendido.

Por sua vez, a compra em coleções de culturas é presentemente bastante viável, tendo em vista a existência de muitas delas, sendo mais de 450 coleções distribuídas em diversos países. Entre as coleções de cultura existentes, podemos destacar: Agricultural Research Service Culture Collection (<https://nrrl.ncaur.usda.gov>); American Type Culture Collection (<https://www.atcc.org>); World Federation for Culture Collections (<http://www.wfcc.info>); Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (<http://bccm.belspo.be>); German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de>) e Coleção de Culturas Tropical (<http://fat.org.br>). O contato com essas coleções é facilitado, podendo-se utilizar a internet para tal tarefa.

Contudo, é de se esperar que o microrganismo utilizado para a produção de um dado químico ou medicamento não estará disponível em uma coleção de culturas, sendo, com muita frequência, oriundo de melhoramento genético.

Quanto à obtenção de mutantes, como se sabe, quando uma dada célula prolifera, há sempre uma pequena possibilidade de surgimento de mutantes naturais, os quais podem ser isolados e cultivados com o objetivo de verificar sua potencialidade de produção. Conforme se verá adiante, essas alterações naturais não são interessantes do

ponto de vista de um processo, mas eventualmente podem gerar novas linhagens que apresentem interesse prático.

No entanto, aguardar o surgimento de mutantes naturais de interesse prático poderá significar o dispêndio de muito tempo, razão pela qual se prefere utilizar métodos que forcem o aparecimento de células mutadas, como é o caso de submeter suspensões de células ou esporos a radiações ultravioleta ou a substâncias químicas mutagênicas, como a nitrosoguanidina, por exemplo. Ao se permitir essa exposição ou contato, ocorre uma drástica destruição da maioria das células, recuperando-se a seguir aquelas que sobreviveram e verificando se mutaram na direção desejada. Essa técnica para a obtenção de mutantes é aleatória, tratando-se de recuperar as células sobreviventes em meios ou condições específicos, de forma a dirigir esse isolamento para as células pretendidas.

Essa abordagem foi muito popular e extensivamente aplicada a cepas industriais, com uma longa lista de organismos que anunciaram o início da microbiologia industrial, incluindo o exemplo de produção de penicilina em *Penicillium chrysogenum* para 50 g/L, uma melhoria de 4 mil vezes em relação à cepa original (GONZALEZ; FERNANDEZ; TOMASINI, 2003). Assim, progressos significativos podem ser atribuídos a programas de mutação/seleção, mas é conveniente lembrar o necessário trabalho de adaptação do meio de cultivo, da forma de conduzir o processo e das etapas de recuperação do produto, a fim de propiciar o real surgimento das vantagens em nível de produção industrial (SCHMIDELL; FERNANDES, 1993).

Por último, há aproximadamente 20 anos, uma abordagem denominada engenharia do metabolismo inverso ampliou o alcance da engenharia metabólica combinatoria. A engenharia do metabolismo inverso pode ser vista como uma estratégia em que: a) identifica-se ou constrói-se um fenótipo desejado; b) determinam-se os fatores genéticos ou ambientais que conferem esse fenótipo; e c) dota-se com esse fenótipo outra cepa, por manipulação genética. Essa abordagem foi aplicada com sucesso em vários contextos, incluindo culturas de células bacterianas e células animais (BAILEY et al., 2002).

A engenharia metabólica, com o uso de ferramentas da engenharia genética (vide o Capítulo 4 do Volume 1), trouxe um imenso avanço nas possibilidades de obtenção de novas linhagens e de melhoramento das já existentes. A maioria dos esforços iniciais nesse campo baseou-se em análises das vias metabólicas e otimização do fluxo para manipular o metabolismo e mudar o fluxo para o produto desejado.

A manipulação das informações genéticas permite a obtenção de células geneticamente modificadas, porém de forma mais dirigida que as metodologias convencionais, sendo possível executá-la não apenas com microrganismos, mas igualmente com células animais e vegetais. Esta área visa dotar um organismo para percorrer uma nova via metabólica, ampliar uma via já existente, desativar uma indesejada ou ainda alterar a regulação de uma via.

Para se ter uma ideia simples acerca dessas técnicas, imaginemos que se conheça a sequência metabólica que leva ao acúmulo de um dado produto de interesse, por exemplo, o produto *P* na sequência genérica:



Um estudo mais aprofundado dessa sequência, por meio da determinação das concentrações dos compostos intermediários (B, C, D etc.), pode levar à determinação da reação limitante da sequência (aquela que determina a velocidade do fluxo metabólico em estudo, por exemplo, a reação $C \rightarrow D$) e, portanto, da enzima responsável pela reação específica (enzima *c*). As etapas seguintes são a identificação do gene que codifica para a síntese dessa enzima e expressá-lo na célula produtora. Com esse procedimento, aumenta-se o número de cópias do gene responsável pela síntese da enzima, o que permite aumentar a velocidade da reação limitante, pela presença de uma maior concentração da enzima responsável (no caso, a enzima *c*). Pode-se citar como exemplo do emprego dessa estratégia o incremento na produção de lisina por *Corynebacterium glutamicum* (KOFFAS; JUNG; STEPHANOPOULOS, 2003).

Além disso, uma etapa intermediária poderia ser imaginada. Uma vez identificada a enzima responsável pela catálise da reação limitante, esta poderia ser manipulada, por meio do conhecimento de sua estrutura e da alteração de determinados aminoácidos, por técnicas de engenharia de proteínas, objetivando obter uma nova proteína com atividade aumentada. O gene correspondente a essa nova enzima seria, então, introduzido na célula produtora.

A potencialidade dessas técnicas é enorme, pois, uma vez solucionado o problema de uma dada reação limitante, outra reação da sequência metabólica passará a ser limitante, o que permite imaginar a realização de igual estratégia para essa nova reação. Claro está que tais procedimentos não são de simples execução, pois inclusive exigem um amplo conhecimento do metabolismo e das informações genéticas do microrganismo-alvo e o domínio das ferramentas e das técnicas utilizadas, mas apresentam inquestionável interesse prático.

A engenharia metabólica vem se consolidando nas últimas décadas e possui uma vasta gama de casos bem-sucedidos. Um exemplo, na área dos biocombustíveis, é a *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para o uso de xilose, um substrato que não é naturalmente metabolizado por essa levedura. Isso resultou em cepas bastante eficientes, que convertem xilose em etanol. Para aumentar o uso simultâneo de glicose e xilose, pesquisadores procuraram evitar a repressão catabólica, que faz com que a xilose somente seja assimilada após o esgotamento da glicose. Para esse fim, fez-se uso de um transportador, que levou ao consumo concomitante de glicose e xilose e a um processo global mais rápido (HA et al., 2011). Na mesma área, pode-se mencionar a *Escherichia coli* mais eficiente na conversão de glicose (e xilose) em etanol, com a introdução de enzimas de *Zymomonas mobilis* (OHTA et al., 1991).

É inclusive possível imaginar o emprego de um pequeno número de microrganismos bem conhecidos em termos de necessidades nutricionais e características de crescimento, como é caso de *E. coli* ou *S. cerevisiae*, para a síntese de uma grande variedade de bioprodutos, no lugar de se ter como problema o cultivo de uma linhagem para cada composto a ser produzido. Claramente isso pode contribuir para uma certa simplificação dos processos produtivos, desde que se consiga obter as cepas recombinantes adequadas.

2.3 CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DE MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Conforme já anunciado, na presente seção pretende-se apresentar características gerais que microrganismos e meios devem apresentar a fim de que seja possível o estabelecimento de um processo produtivo industrial. Buscaremos enunciar as características desejáveis de microrganismos e, em seguida, aquelas relacionadas aos meios de cultivo, lembrando, no entanto, que o desempenho de um dado microrganismo depende muito da composição do meio de cultura em que é colocado.

Como se pretende expor características gerais quando da análise de um dado bioprocessos, é possível que algumas dessas características não se apliquem em todos os casos, enquanto outras não abordadas no presente texto poderão ser de grande importância. No entanto, espera-se estabelecer certas reflexões que permitam essa análise crítica.

2.3.1 CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DE MICRORGANISMOS

Para uma aplicação industrial, espera-se que os microrganismos tenham as seguintes características gerais:

- apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;
- permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo cultivado ou elevada concentração celular – para casos de produtos acumulados intracelularmente;
- não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- não ser patogênico;
- não exigir condições de processo muito complexas;
- não exigir meios de cultura dispendiosos;
- permitir a rápida liberação do produto para o meio – salvo no caso de produtos intracelulares.

As duas primeiras características serão discutidas conjuntamente, pois, apesar de distintas, concorrem para o mesmo objetivo geral de extrema importância.

De fato, uma célula deve permitir elevada conversão do substrato em produto, pois, com muita frequência, as matérias-primas incidem pesadamente no custo do produto final, podendo-se mencionar uma incidência de mais de 50% do custo total de produção como devido às matérias-primas, em particular a fonte orgânica de carbono.

Por outro lado, é sempre desejável que o microrganismo permita um elevado acúmulo do produto, sem sofrer inibição mais acentuada em virtude desse acúmulo, pois isso concorre para uma redução nos custos de recuperação, os quais também podem ser muito acentuados.

Tome-se como exemplo o caso da fermentação alcoólica, aqui representada simplificada pela equação química final (glicose em anaerobiose sendo convertida em etanol e dióxido de carbono):



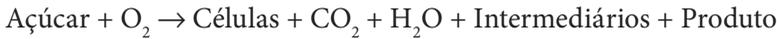
Como se pode observar, o fator estequiométrico é igual a 0,51, ou seja, cada grama de glicose convertido gera 0,51 g de etanol, sendo que *S. cerevisiae*, normalmente empregado nessa fermentação, com frequência permite obter um rendimento da ordem de 90% desse valor estequiométrico, o que torna esse microrganismo o mais importante para realizar essa conversão – lembrando que vários outros também podem acumular etanol a partir da glicose, porém não com esse rendimento.

Obviamente, não se consegue manter um processo de fermentação alcoólica obtendo-se 100% de rendimento, pois as células têm de proliferar, o que significa a síntese de muitos outros compostos intermediários, sendo o acúmulo de etanol a via metabólica que permite a geração de energia na forma de ATP (glicólise). Claro está que esse é um ponto fundamental, pois a matéria-prima incide no custo do etanol e, dessa forma, baixos rendimentos tornariam inviável a produção desse produto de baixo valor agregado.

Por outro lado, sabe-se que, quando se atinge 8% a 10% (em volume) de etanol no caldo fermentado, ocorre uma clara inibição do microrganismo, o que faz com que a velocidade da conversão do açúcar em etanol fique prejudicada, razão pela qual se procura não ultrapassar esses valores, pelo menos na produção de álcool combustível (não se está aqui comentando o caso de bebidas alcoólicas). Isso significa a necessidade de destilar um líquido que contém 10% de etanol, o que, além do dispêndio de energia, ainda gerará 90% de resíduo na forma de vinhaça, que necessita encontrar um destino adequado.

O ideal seria encontrar leveduras mais resistentes ao etanol, porém sem que ocorra queda na velocidade da fermentação alcoólica (queda na produtividade), o que não é tarefa simples. De qualquer forma, fica claro que a conversão da matéria-prima em produto já é elevada, lembrando novamente a necessidade de manter a viabilidade celular para que a fermentação não seja interrompida.

Uma situação bem diversa é a que ocorre com os processos aeróbios, por exemplo, na produção de enzimas ou antibióticos. Nesse caso, a conversão do açúcar pode ser representada esquematicamente da seguinte forma:



Nesse caso, por se operar em aerobiose, a quantidade de células geradas costuma ser grande em relação ao açúcar consumido, em comparação a uma quantidade relativamente pequena do produto-alvo. Se, por um lado, o custo da matéria-prima incide menos pesadamente no custo do produto final, por outro as operações de recuperação do produto são necessariamente mais onerosas, mas o produto-alvo é de mais alto valor agregado.

Assim, ao se encontrarem linhagens que cresçam relativamente menos, ou que acumulem menos compostos intermediários, é possível visualizar grandes incrementos na síntese do produto. Mesmo permitindo o acúmulo do produto, a célula produtora deve, ainda, contar com a característica de não produzir substâncias que sejam incompatíveis com o produto, pois isso pode levar a uma situação de desinteresse pelo processo produtivo.

Esse é o caso, por exemplo, de se estar interessado na produção de uma dada enzima, ou proteína, mas utilizar uma linhagem que também seja uma boa produtora de proteases extracelulares. Assim, ao produzir a enzima, separar as células e armazenar o produto, pode-se ter uma redução sensível da atividade enzimática em virtude da ação das proteases.

Um exemplo adicional, mais específico, é sobre a produção de glicoamilase por *Aspergillus*. Como se sabe, a glicoamilase é a enzima que hidrolisa o amido gerando glicose, sendo, pois, de muito interesse em várias aplicações, destacando-se o preparo de xaropes de glicose para a indústria de alimentos. Ocorre que alguns microrganismos produtores de glicoamilase também sintetizam a transglicosidase, enzima esta que, quando na presença de glicose, volta a polimerizá-la, gerando moléculas que não são mais hidrolisadas pela glicoamilase.

Na realidade, a presente característica desejável em uma célula pode ser bem mais generalizada. Um microrganismo ideal, quanto ao aspecto agora abordado, deve produzir o mínimo de outras substâncias, ao mesmo tempo que sintetiza o composto pretendido. Isso leva a uma maior disponibilidade de nutrientes para a síntese do produto (voltando-se à discussão anterior), mas também permite vislumbrar uma maior facilidade na recuperação desse produto.

Outra característica, da mais alta importância refere-se à estabilidade fisiológica da linhagem a ser empregada industrialmente. Isso significa que não basta que se tenha uma linhagem hiperprodutora de uma dada substância de interesse, é necessário que se conheçam as técnicas mais adequadas para a sua conservação e, mais ainda, que ela se mantenha como excelente produtora da substância de interesse ao longo de todas as etapas envolvidas desde sua proliferação em nível de laboratório, germinadores e biorreator principal (Figura 2.1).

Assim o constante estudo dessas formas de conservação mais adequadas das linhagens é tarefa das mais importantes, mantendo-se, na indústria, aquelas realmente de interesse. Para a célula há sempre a tendência de otimizar o crescimento em detrimento da síntese do produto, motivo pelo qual não basta verificar, em termos de metodologias de conservação, se a célula cresce, mas se ela continua a acumular o produto de maneira eficaz.

Conforme já mencionado, quando uma célula prolifera, há sempre alguma probabilidade de ocorrerem mutações naturais. Em um bioprocessamento típico, normalmente parte-se de uma massa pequena de células nas etapas iniciais de preparo do inóculo (Figura 2.1), chegando-se a biorreatores de dezenas de milhares de litros contendo concentrações celulares com frequência acima de 10 g de matéria seca de células/L, o que significa gerar, em termos de massa de matéria seca, algo em torno de toneladas de células. Isso mostra claramente a necessidade de se operar com material genético que seja estável, a fim de se contar com células competentes em termos de acúmulo do produto.

O emprego de linhagens relativamente instáveis pode, inclusive, limitar o emprego de sistemas de cultivo mais eficientes, como os processos contínuos, pois poderá ocorrer ao longo do tempo a seleção de células que privilegiem o crescimento em detrimento do acúmulo do produto.

O fenômeno da atenuação do acúmulo do produto de interesse pode ocorrer tanto com linhagens naturais como, em especial, com as geneticamente modificadas. Na literatura está bem documentada a viabilidade de se produzir lisina por mutantes auxotróficos, em processo contínuo, apenas quando se empregam mutantes auxotróficos em dois aminoácidos, e não em apenas um, a fim de evitar os mecanismos de controle da célula e obter o acúmulo intenso do aminoácido de interesse (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995). Nessa condição, é mais difícil o retorno às características da linhagem original, em virtude de uma maior alteração a que a célula foi submetida.

É necessário lembrar que a introdução de novas codificações genéticas pode, eventualmente, significar um ônus adicional para a célula, a qual está interessada em aprimorar o seu crescimento. Inclusive, a integração de uma codificação genética ao cromossomo da célula pode ainda não resultar na obtenção de uma hiperprodutora, em virtude da existência de um número limitado de cópias do gene de interesse.

A operação de biorreatores de grande porte, do ponto de vista técnico e econômico, praticamente exige o emprego de microrganismos não patogênicos, os quais possam ser manuseados sem riscos ambientais, particularmente nas etapas seguintes ao término do bioprocessamento. Mesmo durante o cultivo, caso se manusessem microrganismos patogênicos em reatores de dezenas de milhares de litros, os cuidados teriam de ser bastante aumentados, o que acarretaria custos adicionais.

O cultivo de patogênicos é efetuado, por exemplo, para a produção de vacinas, em reatores de pequeno porte (da ordem de centenas ou poucos milhares de litros), porém confinados em câmaras assépticas, tomando-se precauções necessárias para a não ocorrência de contaminação do meio ambiente. Isso, logicamente, significa custo adicional, o qual pode ser justificado no caso de produção de vacinas, mas tornaria inviável a produção de uma enzima ou mesmo um antibiótico.

Um microrganismo também não deve exigir condições de processo muito complexas, por motivos claros de economicidade da produção, sendo que dentro deste tópico muitos aspectos podem ser abordados.

Como se sabe, sempre existem valores ótimos do pH e da temperatura, por exemplo, em termos do acúmulo do produto. No entanto, também se sabe que o controle preciso do pH e da temperatura apenas é possível em reatores de bancada, sendo que em reatores de grande porte (dezenas de milhares de litros) deverá ocorrer uma certa heterogeneidade ao longo da altura do reator, de forma que a célula deverá manter o seu desempenho apesar de uma certa flutuação nos valores dessas grandezas tomadas como exemplo. Em outras palavras, o ideal é que o microrganismo tenha uma faixa de valores ótimos dessas grandezas, e não valores pontuais, particularmente no que se refere ao acúmulo do produto.

Nessa direção, são igualmente interessantes os microrganismos que conseguem manter um bom desempenho quando cultivados em baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Como ficará claro no capítulo sobre transferência de oxigênio, a necessidade de manutenção de altas concentrações de oxigênio dissolvido traz problemas bastante sérios no tocante a um maior dispêndio de energia, em virtude de maiores agitação e aeração do meio. Nesse sentido, os microrganismos que crescem de forma aglomerada (forma miceliar, por exemplo) são mais complicados quando comparados às células que crescem isoladamente, pois a concentração de oxigênio no meio de cultivo terá de ser mais elevada a fim de que as células mais internas desses aglomerados tenham acesso ele.

Já foi abordada anteriormente a inconveniência de operar com linhagens que excretem quantidades exageradas de proteínas para o meio, mas ainda há uma questão adicional, pois a geração de espuma é frequentemente atribuída à presença de proteínas no meio de cultivo, situação ainda mais complexa para os processos aeróbios, em virtude da necessidade de aerar e agitar o conteúdo do biorreator.

Normalmente, a geração de espuma pode ocorrer no início de um bioprocessamento aeróbio, quando se empregam meios de cultivo contendo extratos de carne ou de levedura, ou água de maceração de milho (*corn steep liquor*), e nas etapas mais avançadas de um processo em virtude da presença de proteínas. Isso causa problemas, como a necessidade de empregar um menor volume útil do reator, a fim de ter condições de controlar a espuma, além do uso frequente de antiespumantes que, além de onerarem o produto final, ainda podem causar dificuldades nas etapas de recuperação do produto e uma redução na transferência de oxigênio, o que exige o aumento da agitação e da aeração, agravando a situação. Assim, é importante a seleção de microrganismos que excretem poucas proteínas junto com o produto desejado.

As características que um meio de cultivo deve apresentar serão discutidas na próxima seção, mas neste momento convém mencionar que o microrganismo selecionado para um processo industrial não deve exigir meio de cultura extremamente oneroso, por questões claramente de economia do processo produtivo. Essa é a razão

pela qual um maior conhecimento das necessidades nutricionais de uma linhagem é de vital importância, objetivando o fornecimento apenas dos nutrientes necessários. Em algumas circunstâncias, esse desconhecimento leva à necessidade da adição de certas substâncias, como extrato de levedura, extrato de carne, peptona etc., as quais costumam ser bastante dispendiosas.

Particularmente na área de produção de vacinas, costumam-se utilizar meios de cultura bastante complexos e onerosos, bem como nos cultivos envolvendo células animais, mas aqui, novamente, os volumes de reação são relativamente pequenos e os produtos gerados podem ser considerados de alto valor agregado.

Finalmente, como se imagina a produção de produtos extracelulares, há todo o interesse em que a linhagem selecionada libere fácil e rapidamente o produto para o meio, de onde ele será recuperado nas etapas seguintes ao processo fermentativo.

Além do aspecto ligado a uma eventual inibição do próprio microrganismo pela retenção de um dado produto do metabolismo, ainda cumpre lembrar que, com frequência, a primeira etapa de recuperação do produto significa a separação do microrganismo (por centrifugação ou filtração), trabalhando, a seguir, com o caldo isento de células, sendo estas descartadas. Diferentemente, para os produtos acumulados de forma intracelular, após a separação do microrganismo, o caldo cultivado é que será descartado.

Nessa direção, um exemplo interessante foi o apresentado por Agüero et al. (1990) sobre a produção de glicoamilase por *Aspergillus niger* NRRL 337 e *Aspergillus awamori* NRRL 3112, sendo essa segunda linhagem, sem dúvida, melhor produtora que a primeira. Esses autores indicaram que, a um pH de 4,0, *A. niger* reteve cerca de 30% da atividade associada às células, enquanto *A. awamori*, apenas algo em torno de 10%, indicando que a linhagem melhor produtora tende a ser mais eficiente na excreção do produto de interesse. Já a pH 6,0, as células de *A. niger* retiveram cerca de 70% da atividade enzimática, enquanto nas células de *A. awamori* essa retenção foi da ordem de 40% em relação à atividade total (soma da atividade enzimática extracelular, encontrada no caldo, com a atividade intracelular, ou seja, a atividade encontrada nas células – atividades enzimáticas expressas por unidade de volume de amostra), mostrando de forma clara a influência do pH na eficiência da capacidade de excreção das células. Indicaram ainda que as atividades totais obtidas com cada uma das linhagens atingiram valores muito próximos tanto a pH 4,0 como 6,0, indicando que o pH interferiu na excreção, mas não na síntese propriamente dita.

Esses resultados indicam a necessidade de se verificar com a devida atenção a retenção do produto de interesse pelas células quando se procura efetuar trabalhos de seleção de linhagens, ou se estudam diferentes condições de cultivo, mesmo que o interesse resida na recuperação de produtos extracelulares. Caso contrário, corre-se o risco de descartar linhagens, ou condições de cultivo, que poderiam ser potencialmente interessantes.

2.3.2 CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DE MEIOS DE CULTIVO

Conforme já comentado no início da Seção 2.3, é sempre muito difícil mencionar as características de microrganismos sem associá-las a um determinado meio de cultivo. Dessa forma, as características anteriormente indicadas, na verdade, em muitos casos dependem do meio utilizado, de maneira que se poderia repetir na presente seção características como permitir o acúmulo de produto no meio, não permitir a síntese de substâncias incompatíveis com o produto etc. Claramente isso não teria um maior interesse, além de tornar-se monótono, preferindo-se descrever algumas características mais específicas, mas que agora, obviamente, dependerão do microrganismo a ser utilizado. Igualmente, não será apresentada uma discussão item a item, mas será efetuada uma abordagem mais geral.

Algumas características gerais do meio que devem ser consideradas são:

- ser o mais barato possível;
- atender às necessidades nutricionais do microrganismo;
- auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado, o que evita variações drásticas de pH ou uma excessiva formação de espuma;
- não provocar problemas na recuperação do produto;
- ter componentes que permitam algum tempo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo o tempo;
- ter composição razoavelmente fixa;
- não causar dificuldades no tratamento final do efluente.

Todas essas são características importantes, destacando-se o custo do meio de cultura, que deve ser o menor possível, desde que atenda às necessidades do microrganismo selecionado. E é justamente essa combinação de atender às necessidades nutricionais do microrganismo, a fim de que o produto possa ser sintetizado, e ser minimamente oneroso que, com frequência, acaba por causar certas complicações, que merecem ser mais detidamente discutidas.

Como se sabe, os microrganismos utilizam diversos açúcares, como glicose, sacarose e frutose, ou ainda polissacarídeos, como o amido e a celulose, como fonte de carbono e, frequentemente, de energia. Como fonte de nitrogênio são frequentemente utilizados sais, como o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (o qual costuma provocar reduções significativas do pH e, em alguns casos, fenômenos de inibição pelo sulfato) e o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, aminoácidos ou a ureia (a qual permite reduzir os problemas de controle do pH). Como fonte de fósforo utilizam-se os fosfatos solúveis, como o monoamônio fosfato (MAP) ou o diamônio fosfato (DAP), os quais passam a ser fontes de nitrogênio e fósforo simultaneamente. Além disso, necessita-se adicionar outros elementos, como: Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn, Co etc., em concentrações frequentemente reduzidas, na forma de seus sais solúveis.

Meios de cultura constituídos apenas por essas substâncias costumam ser chamados de meios definidos, ou meios sintéticos, cuja composição química é sempre bem conhecida e pode ser reproduzida a qualquer instante. Por essa razão, para as células que apresentam bom desempenho em meios desse tipo, espera-se a ocorrência de um sistema produtivo estável, além de, em geral, não apresentarem problemas quanto à recuperação e à purificação do produto final. Esses meios, mesmo sendo mais onerosos, podem ser preferidos caso permitam uma maior economia nas etapas de recuperação do produto.

No entanto, para uma grande variedade de linhagens, há a necessidade da adição de certos “fatores de crescimento”, ou seja, alguns aminoácidos específicos ou vitaminas (como biotina, tiamina, riboflavina etc.). Claro está que, quando se conhecem essas necessidades específicas, o que nem sempre é o caso, é possível adicionar essas substâncias puras a fim de manter o meio em sua forma mais definida, mas seu custo pode tornar-se inviável, particularmente para instalações de grande porte, a menos que isso signifique um enorme ganho econômico na recuperação do produto ou a preservação de alguma característica fundamental deste, necessariamente de alto valor agregado.

Alternativamente, para suprir as necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, com características nutricionais mal conhecidas, podem-se adicionar certos materiais complexos como: extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, peptona (hidrolisado de proteínas) etc. Esses materiais (adicionados individual ou conjuntamente) permitem introduzir no meio de cultura os fatores faltantes em um meio definido, mas, além de onerosos, são complexos e de composição variável ao longo do tempo de armazenagem e dependendo do fabricante e do lote empregado. Assim, pode-se imaginar a ocorrência de oscilações no bioprocessamento, além de possíveis dificuldades nas operações de recuperação do produto final, dependendo das características desse produto e dessas operações.

É frequente observar, nos trabalhos básicos de isolamento ou seleção de linhagens, o emprego de meios contendo grandes quantidades desses extratos ou hidrolisados (vários gramas por litro, ou mesmo dezenas de gramas por litro). Dessa forma, no desenvolvimento do processo produtivo, uma das tarefas iniciais é verificar a possibilidade da obtenção de iguais desempenhos em meios isentos desses materiais ou com a adição de quantidades mínimas, tendo em vista o custo envolvido.

Na direção dos meios mais complexos e, igualmente, menos onerosos, razão pela qual são empregados na maioria dos processos fermentativos em grande escala, cumpre mencionar o uso de matérias-primas naturais, como caldo de cana-de-açúcar, melaços, farinhas diversas (de trigo, milho, soja, cevada), água de maceração de milho (*corn steep liquor*) etc. Essas matérias-primas são de composição química desconhecida, podendo-se determinar os teores de açúcares disponíveis, nitrogênio, fósforo, mas não os teores dos sais minerais, pois certamente há sempre um número muito grande de constituintes. Meios de cultura contendo esses materiais naturais com frequência são completados com alguns sais (particularmente contendo nitrogênio e fósforo).

Claro está que a composição química estará na dependência de uma série de fatores, como solo, variedade do vegetal, safra, clima, processamento durante a colheita, estocagem etc. Esses fatos indicam a expectativa de que ocorram oscilações no bioprocessamento que emprega essas matérias-primas, além de obrigarem as empresas produtoras de antibióticos ou enzimas a manterem instalações-piloto para o ajuste da composição do meio a cada novo lote de matéria-prima que a empresa recebe (particularmente aquelas que usam a água de maceração de milho), a fim de evitar maiores surpresas nos biorreatores de grande porte.

Essas matérias-primas naturais podem inclusive causar problemas adicionais na recuperação e na purificação do produto final, bem como nos tratamentos das águas residuais. No entanto, ainda continuam a ser as matérias-primas preferidas em grande número de casos, pela simples razão de serem as mais baratas.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A definição adequada do microrganismo a ser empregado, assim como do meio de cultura para esse microrganismo, é etapa fundamental para o sucesso de um bioprocessamento. No entanto, é sempre importante lembrar que a definição de um bioprocessamento, assim como as preocupações com a recuperação do produto, são etapas da mais alta importância.

Em alguns casos, o emprego de microrganismos disponíveis em coleções de cultura pode levar ao desenvolvimento de processos produtivos que sejam atraentes. É necessário lembrar, no entanto, que presentemente se dispõe de muitos recursos para o aprimoramento de linhagens produtivas, o que torna os processos fermentativos cada vez mais promissores.

Essas considerações trazem também um importante alerta sobre a constante necessidade de desenvolvimento do processo produtivo já instalado, justamente por essa grande variedade de desenvolvimentos possíveis. Presentemente é bastante difícil imaginar que uma dada empresa disponha do microrganismo “ótimo”, ou do meio de cultura “otimizado”. É da mais alta importância que essa empresa continue a busca por melhores condições em termos de microrganismo e meio; caso contrário, poderá ser ultrapassada por outras com ofertas de produtos de menor custo ou melhor qualidade.

REFERÊNCIAS

AGUERO, J. M. Z et al. Influência do pH na síntese e liberação de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 e *Aspergillus niger* NRRL 337. *Revista de Microbiologia*, v. 21, n. 4, p. 355-360, 1990.

BAILEY, J. E. et al. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnology and Bioengineering*, p. 568-579, 2002.

GONZALEZ, J. B.; FERNANDEZ, F. J.; TOMASINI, A. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 322-333, 2003.

HA, S. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 2, p. 504-509, 2011.

KOFFAS, M. A.; JUNG, G. Y.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metabolic Engineering*, v. 5, p. 32-41, 2003.

OHTA, K. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 893-900, 1991.

SCHMIDELL, W.; FERNANDES, O. L. O aspecto evolutivo dos processos industriais biotecnológicos. *Revista Politécnica*, n. 209, p. 31-33, 1993.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. *Principles of fermentation technology*. 2. ed. United Kingdom: Elsevier Science, 1995.

Este volume, *Engenharia Bioquímica*, é composto por vinte capítulos que explicam temas relevantes à área, como microrganismos e meios de cultura para utilização industrial, formas de efetuar a esterilização de equipamentos, meios de cultura e esterilização por filtração.

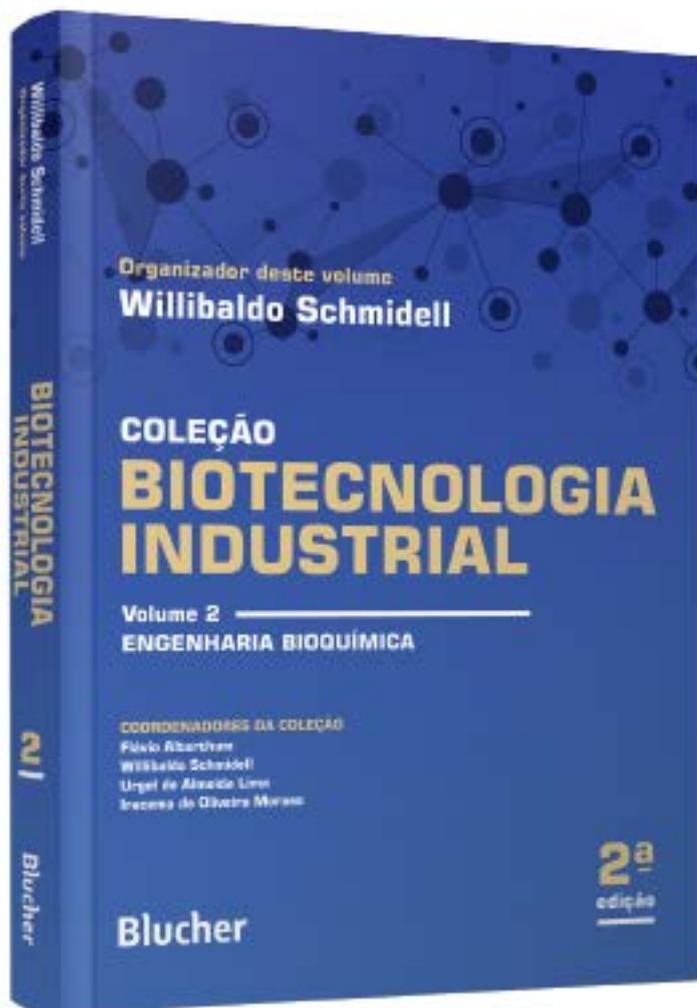
Também são abordados alguns tipos de biorreatores e suas formas de operação, construção de equipamentos e suas relações com o tratamento biológico de resíduos, além de contar com capítulos relacionados com análise, modelagem e simulação de bioprocessos, propondo equacionamentos para obtenção detalhada das eventuais formas de operação e da avaliação econômica de tais processos biológicos.

Esta obra é uma referência teórica para profissionais, estudantes e pesquisadores da área, oferecendo conhecimentos importantes e atualizados sobre engenharia bioquímica dentro do escopo da biotecnologia industrial.



www.blucher.com.br

Blucher



Clique aqui e:

[VEJA NA LOJA](#)

Biotecnologia Industrial - Vol. 2 **Engenharia Bioquímica**

Willibaldo Schmidell

ISBN: 9786555060188

Páginas: 748

Formato: 17 x 24 cm

Ano de Publicação: 2021

Peso: 0.919 kg
