Lotka

Tradução Técnica

■ Excerto 8: Cultura de células e reatores em batelada

■ Excerpt 8: Cell culture and batch reactors

◆ **Lucas Monteiro Nogueira**

Nº	Título	Idioma	Referência
1	**Bioreactors for batch cell culture** (Bioreatores para culturas de células em batelada)	**Inglês → Português**	Doran (2013)
2	**Solved example** (Exemplo resolvido)	**Inglês → Português**	Doran (2013)

◆ Referências

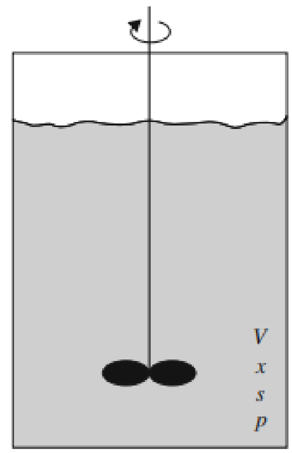
1. Doran, P.M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. 2ª edição. Academic Press.

◆ Índice

◆ 1. Bioreactors and batch cell culture

↳ *Referência 1 (Doran, 2013), pp. 793 – 796, 845. Com modificações.*

1.1. Theory



Let us perform a mass balance on cells in a well-mixed batch fermenter. The mass of cells in the reactor, M, is equal to the cell concentration x multiplied by the liquid volume V. The mass rate of cell growth R_G is equal to the product $r_X V$, where r_X is the volumetric rate of growth. Note that $r_X = \mu x$, where μ is the specific growth rate. If cell death takes place in the reactor alongside growth, $R_C = k_d V$ where k_d is the volumetric rate of cell death. We can proceed to state the following differential equation for the growth of cells in a batch reactor,

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu x V - k_d x V \quad \textbf{(1)}$$

For V constant, the equation simplifies to

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - k_d)x \quad \textbf{(2)}$$

Because μ in batch culture remains approximately constant and equal to the maximum attainable value $\mu_{\max}$ for most of the growth period, and if k_d likewise remains constant, we can integrate the foregoing equation to find the direct relationship between batch culture time and cell concentration. Using the initial condition $x = x_0$ at $t = 0$,

$$x = x_0 e^{(\mu_{\max} - k_d)t} \quad \textbf{(3)}$$

If x_f is the final biomass concentration after batch culture time t_b, rearrangement of **(3)** yields

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max} - k_d} \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right) \quad \textbf{(4)}$$

If the rate of cell death is negligible compared with growth, $k_d \ll \mu_{\max}$ and we may write

$$x = x_0 e^{(\mu_{\max} - k_d)t} \quad \rightarrow \quad x = x_0 e^{\mu_{\max} t}$$

$$\therefore t_b = \frac{1}{\mu_{\max} - k_d} \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right) \quad \rightarrow \quad t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right) \quad \textbf{(5)}$$

The latter equation can be used to compute the batch culture time required to achieve a cell density x_f starting from a cell density x_0.
The time required for batch culture can also be related to substrate conversion and other kinetic parameters using the expressions for the rates of substrate uptake derived in Chapter 12 of Doran's textbook. The mass of substrate in the reactor is *M* and equals *CV*, where *C* is the substrate concentration and *V* is the liquid volume. Noting that r_S denotes the volumetric rate of substrate uptake, we have

$$r_S V = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S \right) xV \quad \mathbf{(6)}$$

where μ is the specific growth rate, $Y_{X/S}$ is the true biomass yield from substrate, q_P is the specific rate of product formation (not directly linked with product metabolism), $Y_{P/S}$ is the true product yield from substrate, and m_S is the maintenance coefficient. Using **(6)**, the mass balance equation for substrate is

$$\frac{d(sV)}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S \right) xV \quad \mathbf{(7)}$$

Or, for μ equal to $\mu_{\max}$ and *V* constant,

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S \right) x \quad \mathbf{(8)}$$

When $\mu = \mu_{\max}$ and assuming that cell death is negligible, we can replace *x* with the exponential law $x = x_0 exp(\mu_{\max} t)$, giving

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S \right) x_0 e^{\mu_{\max} t} \quad \mathbf{(9)}$$

We can integrate this expression with the initial condition $C = C_{S,0}$ at $t = 0$ and solve for time,

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left[1 + \frac{C_{S,0} - C_{S,1}}{\left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{\mu_{\max} Y_{P/S}} + \frac{m_S}{\mu_{\max}} \right) C_{X,0}} \right] \quad \mathbf{(10)}$$

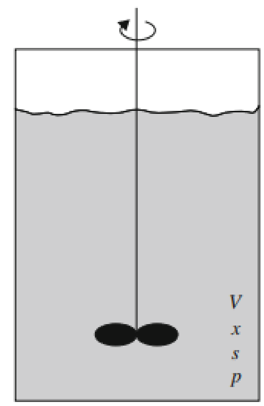
where t_b is the batch culture time and $C_{S,1}$ is the final substrate concentration. If no product is formed or if production is directly linked with energy metabolism, eq. **(10)** can be simplified to

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left[1 + \frac{C_{S,0} - C_{S,1}}{\left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{m_S}{\mu_{\max}} \right) C_{X,0}} \right] \quad \textbf{(11)}$$

If maintenance requirements can be neglected, the equation is further simplified to

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left[1 + \frac{Y_{X/S}}{C_{X,0}} \left(C_{S,0} - C_{S,1} \right) \right] \quad \textbf{(12)}$$

1.1. Teoria



Realizamos um balanço de massa em um fermentador em batelada agitado. A massa de células no reator, *M*, é igual à concentração de células *x* multiplicada pelo volume líquido *V*. A taxa de crescimento R_G da massa de células é igual ao produto $r_X V$, onde r_X é a taxa volumétrica de crescimento. Note que $r_X = \mu x$, onde μ é a taxa de crescimento específico. Se a morte de células ocorre no reator em conjunção com o crescimento destas, tem-se $R_C = k_d V$, onde k_d é a taxa volumétrica de morte celular. Podemos então enunciar a seguinte equação diferencial para o crescimento de células em um reator em batelada,

$$\frac{d\left(xV\right)}{dt} = \mu x V - k_d x V \quad \textbf{(1)}$$

Para *V* constante, temos a forma simplificada

$$\frac{dx}{dt} = \left(\mu - k_d\right) x \quad \textbf{(2)}$$

Sabe-se que μ em uma cultura em batelada permanece aproximadamente constante e igual ao valor máximo praticável $\mu_{\max}$ pela maior parte do período de crescimento; o mesmo ocorre com k_d; sendo assim, podemos integrar a equação precedente e encontrar a relação direta entre tempo de cultura em batelada e concentração celular. Usando a condição inicial $x = x_0$ em $t = 0$, temos

$$x = x_0 e^{\left(\mu_{\max} - k_d\right)t} \quad \textbf{(3)}$$

Se x_f é a concentração final de biomassa após um tempo de cultura em batelada t_b, podemos isolar t_b em **(3)** e obter

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max} - k_d} \ln \left(\frac{x_f}{x_0} \right) \quad \textbf{(4)}$$

Se a taxa de morte celular é desprezível se comparada à taxa de crescimento, $k_d \ll \mu_{\max}$ e podemos escrever

$$x = x_0 e^{(\mu_{\max} - k_d)t} \quad \rightarrow \quad x_f = x_0 e^{\mu_{\max} t_b}$$

$$\therefore t_b = \frac{1}{\mu_{\max} - k_d} \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right) \quad \rightarrow \quad t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left(\frac{x_f}{x_0}\right) \quad \textbf{(5)}$$

Esta última equação pode ser utilizada para estabelecer o tempo de cultura em batelada necessário para alcançar uma densidade celular x_f a partir de um valor inicial x_0.

O tempo necessário de cultura em batelada pode ser associado à conversão de substrato e outros parâmetros de cinética de reatores utilizando as expressões para taxa de absorção de substrato derivadas no capítulo 12 de Doran (2013). A massa de substrato no reator é *M* e é igual a *CV*, onde *C* é a concentração de substrato e *V* é o volume líquido. Notando que r_S denota a taxa volumétrica de absorção de substrato, temos

$$r_S V = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S\right) x V \quad \textbf{(6)}$$

onde μ é a taxa de crescimento específico, $Y_{X/S}$ é o rendimento efetivo de biomassa a partir do substrato, q_P é a taxa específica de formação de produto (não ligada diretamente ao metabolismo de produto), $Y_{P/S}$ é o rendimento verdadeiro de produto a partir de substrato, e m_S é o coeficiente de manutenção. Usando **(6)**, o balanço de massa para o substrato torna-se

$$\frac{d(sV)}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S\right) x V \quad \textbf{(7)}$$

ou, para μ igual a $\mu_{\max}$ e *V* constante,

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S\right) x \quad \textbf{(8)}$$

Sendo $\mu = \mu_{\max}$ e desprezando efeitos de morte celular, podemos substituir *x* pela lei exponencial $x = x_0 exp(\mu_{\max} t)$, obtendo

$$\frac{ds}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{Y_{P/S}} + m_S\right) x_0 e^{\mu_{\max} t} \quad \textbf{(9)}$$

Em seguida, integramos essa expressão com a condição inicial $C = C_{S,0}$ em $t = 0$ e resolvemos para t,

$$t_b = \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left[1 + \frac{C_{S,0} - C_{S,1}}{\left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{q_P}{\mu_{max} Y_{P/S}} + \frac{m_S}{\mu_{max}}\right) C_{X,0}}\right] \quad \textbf{(10)}$$

onde t_b é o tempo de cultura em batelada e $C_{S,1}$ é a concentração final de substrato. Se não houver formação de produto ou se a produtividade estiver diretamente ligada ao metabolismo energético, a equação **(10)** pode ser simplificada a

$$t_b = \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left[1 + \frac{C_{S,0} - C_{S,1}}{\left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{m_S}{\mu_{max}}\right) C_{X,0}}\right] \quad \textbf{(11)}$$

Se exigências de manutenção podem ser desprezadas, a equação pode ser simplificada ainda mais, tornando-se

$$t_b = \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left[1 + \frac{Y_{X/S}}{C_{X,0}}\left(C_{S,0} - C_{S,1}\right)\right] \quad \textbf{(12)}$$

1.2. Solved example

Nicotiana tabacum cells are cultured to high density for production of polysaccharide gum. The reactor used is a stirred tank that initially contains 100 liters of medium. The maximum specific growth rate of the culture is 0.18 day^{-1} and the yield of biomass from substrate is 0.5 g g^{-1}. The concentration of growth-limiting substrate in the medium is 3% (*w*/*v*). The reactor is inoculated with 1.5 g/L of cells and operated in batch until the substrate is virtually exhausted; medium flow is then started at a rate of 4 L day^{-1}. Fed-batch operation is carried out for 40 days under quasi-steady-state conditions. True or false?

1.( ) The batch culture time is greater than 12 days.
2.( ) The final biomass concentration after the batch culture period is greater than 19 g/L.
3.( ) The final mass of cells in the reactor is greater than 5.0 kg.
4.( ) The fermenter is available 275 days per year with a downtime between runs of 24 h. Accordingly, the plant cell biomass produced annually is greater than 16 kg.

Solution.

1.True. The initial substrate concentration is $C_{s,0}$ = 3% (*w*/*v*) = 3 g per 100 mL = 30 g/L. The batch culture time to achieve $C_{S,1}$ = 0 is determined with equation **(12)**,

$$t_b = \frac{1}{\mu_{max}} \ln\left[1 + \frac{Y_{X/S}}{C_{X,0}}\left(C_{S,0} - C_{S,1}\right)\right] = \frac{1}{0.18} \ln\left[1 + \frac{0.5}{1.5} \times (30 - 0)\right] = \boxed{13.3\text{ d}}$$

The batch culture time is about 13 days and 7 hours.

2.False. The biomass density at 13.3 days is

$$C_{X,1} = C_{X,0}\exp\left(\mu_{\max} t_b\right) = 1.5\times\exp\left(0.18\times 13.3\right) = \boxed{16.4 \text{ g/L}}$$

3.False. The mass of cells at the start of fed-batch operation is equal to the final batch cell concentration multiplied by the initial medium volume,

$$X_0 = C_{X,1}V = 16.4\times 100 = 1640 \text{ g}$$

The final mass of cells after 40 days of fed-batch culture is given by

$$X_1 = X_0 + Y_{X/S}C_{S,0}Ft_{FB} = 1640 + 0.5\times 30\times 4\times 40 = 4040 \text{ g} = \boxed{4.04 \text{ kg}}$$

4.True. The mass of cells produced in each reactor run is equal to the final biomass minus the biomass used for inoculation,

$$\text{Biomass produced per run} = 4040 - 1.5\ \frac{\text{g}}{\text{L}}\times 100 \text{ L} = 3890 \text{ g} = 3.89 \text{ kg}$$

The total reaction time is

$$t_T = t_b + t_{fb} + t_{dn}$$

where t_b = 13.3 d is the reaction time, t_{fb} = 40 d is the fed-batch operation time, and t_{dn} = 24 h = 1 d is the reactor downtime. Thus,

$$t_T = 13.3 + 40 + 1 = 54.3 \text{ d}$$

In one year, the number of runs carried out is

$$\text{Number of runs} = \frac{275 \text{ d}}{54.3 \text{ d/run}} = 5.06 \approx 5$$

The total biomass produced annually is equal to the biomass produced per run multiplied by the number of runs per year,

$$\text{Biomass produced per year} = 3.89\times 5 = \boxed{19.5 \text{ kg}}$$

1.2. Exemplo resolvido

Células de *Nicotiana tabacum* são cultivadas para a produção de goma polissacarídica. O reator utilizado é um tanque agitado que inicialmente contém 100 litros de meio de cultura. A taxa de crescimento máxima da cultura é 0.18 dia^{-1} e o rendimento de biomassa obtido a partir do substrato é 0.5 g g^{-1}. A concentração de substrato limitante de crescimento no meio é 3% (w/v). O reator é inoculado com 1.5 g/L de células e operado em batelada até o substrato ser virtualmente exaurido; após isso, o escoamento de meio de cultura é iniciado a uma taxa de 4 L dia^{-1}. A operação em batelada é conduzida ao longo de 40 dias sob condições quase-estacionárias. Verdadeiro ou falso?

1.( ) O tempo de cultura em batelada é maior que 12 dias.

2.( ) A concentração final de biomassa após o período de cultura em batelada é maior que 19 g/L.

3.( ) A massa final de células no reator é maior que 5.0 kg.

4.( ) O fermentador pode operar por 275 dias no decurso de um ano e o tempo entre operações é 24 h. Portanto, a biomassa de células vegetais produzida anualmente é maior que 16 kg.

Solução.

1.Verdadeiro. A concentração inicial de substrato é $C_{S,0}$ = 3% (w/v) = 3 g por 100 mL = 30 g/L. O tempo de cultura em batelada necessário para obter $C_{S,1}$ = 0 é dado por

$$t_b = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left[1 + \frac{Y_{X/S}}{C_{X,0}}\left(C_{S,0} - C_{S,1}\right)\right] = \frac{1}{0.18} \ln\left[1 + \frac{0.5}{1.5} \times (30-0)\right] = \boxed{13.3 \text{ d}}$$

O tempo de cultura em batelada é aproximadamente igual a 13 dias e 7 horas.

2.Falso. A densidade de biomassa ao fim de 13.3 dias é

$$C_{X,1} = C_{X,0} \exp\left(\mu_{\max} t_b\right) = 1.5 \times \exp\left(0.18 \times 13.3\right) = \boxed{16.4 \text{ g/L}}$$

3.Falso. A massa de células no início da operação *fed-batch* é igual à concentração final de células em batelada multiplicada pelo volume inicial do meio de cultura,

$$X_0 = C_{X,1} V = 16.4 \times 100 = 1640 \text{ g}$$

A massa final de células após 40 dias de cultura *fed-batch* é dada por

$$X_1 = X_0 + Y_{X/S} C_{S,0} F t_{FB} = 1640 + 0.5 \times 30 \times 4 \times 40 = 4040 \text{ g} = \boxed{4.04 \text{ kg}}$$

4.Verdadeiro. A massa de células produzida em cada operação é igual à biomassa final menos a biomassa utilizada para inoculação,

$$\text{Biomassa produzida por operação} = 4040 - 1.5 \,\frac{\text{g}}{\text{L}} \times 100 \text{ L} = 3890 \text{ g} = 3.89 \text{ kg}$$

O tempo total de reação é

$$t_T = t_b + t_{fb} + t_{dn}$$

onde t_b = 13.3 dias é o tempo de reação, t_{fb} = 40 d é o tempo de operação *fed-batch*, e t_{dn} = 24 h = 1 d é o *downtime* ou tempo de paralisação do reator. Portanto,

$$t_T = 13.3 + 40 + 1 = 54.3 \text{ d}$$

Em um ano, o número de operações realizadas é

$$\text{Número de operações} = \frac{275\ \text{d}}{54.3\ \text{d/op}} = 5.06 \approx 5$$

A massa de células produzida anualmente é igual à biomassa produzida por operação multiplicada pelo número de operações realizadas em um ano,

$$\text{Biomassa produzida por ano} = 3.89 \times 5 = \boxed{19.5\ \text{kg}}$$