

NATÁLIA BONIFÁCIO MARTELETO

**Modelagem e otimização matemática do processo de
produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela
bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) – mutada**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan/ IPT para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2020

NATÁLIA BONIFÁCIO MARTELETO

**Modelagem e otimização matemática do processo de
produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela
bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) – mutada**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan/ IPT para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Aparecida
Moniz Piccoli

Versão Original

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marteleteo, Natália Bonifácio

Modelagem metabólica do processo de produção da
proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria
Escherichia coli BL21DE3 - mutada / Natália
Bonifácio Marteleteo; orientadora Rosane Aparecida
Moniz Piccoli. -- São Paulo, 2020.

136 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Otimização de bioprocessos. 2. Modelagem
matemática. 3. Análise de fluxos metabólicos. 4.
Amblyomin-X. 5. Escherichia coli. I. Piccoli,
Rosane Aparecida Moniz, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Natália Bonifácio Marteleto

Título da Tese: Modelagem e otimização matemática do processo de produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) – mutada

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Aparecida Moniz Piccoli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão realizada a ___/___/___, considerou a candidata:

() Aprovada () Reprovada

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **761/15** referente ao projeto intitulado: "*Modelagem metabólica do processo de produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria Escherichia coli BL21DE3 - Mutada*" sob a responsabilidade de **Natália Bonifácio Marteleto**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Rosane Aparecida Moniz Piccoli**, do Instituto Butantan, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPESH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de agosto de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 3415 - ICB 05 - 05508-000
Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP.08.2020

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP nº 761/2015, aprovado em 28/08/2015, e por solicitação da Profa. Dra. *Rosane Aparecida Moniz Piccoli*, do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP (Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT)), informamos que o título do projeto da aluna: *Natalia Bonifácio Marteleto* foi alterado para: "Modelagem e otimização matemática do processo de produção da proteína recombinante *Amblyomin-X* pela bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) - mutada", devido a análises computacionais inseridas no trabalho, visando assim melhor adequação do título ao estudo desenvolvido.

São Paulo, 03 de agosto de 2020.

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. Camila Squarzonzi Dale
Coordenadora CEPESH ICB/USP

Aos meus pais e ao meu namorado Rafael, com muito amor

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Rosane Piccoli, pelos ensinamentos teóricos e práticos, que me proporcionaram um grande desenvolvimento profissional e pessoal; mas também pelos conselhos e momentos de descontração;

Aos meus pais Luiz Otávio e Maristela, que sempre me apoiaram, incentivaram e acompanharam de perto os meus desafios e as minhas conquistas;

Ao meu namorado Rafael, por sempre buscar me compreender e estar comigo nos momentos difíceis;

À minha irmã Patrícia, ao meu irmão Luiz André e minha cunhada Thaís, por estarem sempre torcendo por mim;

Às companheiras de laboratório Telma e Carol, pelos momentos de descontração e por tornarem os ensaios mais leves;

À toda equipe do Projeto Amblyomin-X: Filomena, Rosa, Alice, Luiz, Sérgio, Renato, Débora, Antônio, Válter; pelos momentos compartilhados, conselhos e incentivos;

Às amigas e colegas de trabalho Danidtzza e Débora, por todo o carinho, amizade, conselhos e confidencialidade;

Aos amigos Fernando, Aline, Bianca, Leilane, pelas risadas e apoio;

À amiga Carol da Poli / USP, pelas conversas sinceras e acompanhar o meu trabalho;

À Natália Cerize e Adriano, pelos conselhos, apoios; pela oportunidade que me concederam e por confiarem no meu trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, à Universidade de São Paulo – USP, e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas, por me proporcionarem tamanho desenvolvimento profissional;

Ao BNDES pelo suporte financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, processo nº 158896/2015-7.

“Mas a Deus tudo é possível”

Mateus 19:26

RESUMO

MARTELETO, N. B. **Modelagem e otimização matemática do processo de produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) – mutada**. 2020. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2020.

Amblyomin-X (***Amblyomma cajennense* inhibitor of Factor Xa**) é uma proteína encontrada na saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* que inibe o Fator Xa da coagulação sanguínea. Ao ser expressa em *Escherichia coli* BL21DE3, estudos mostraram que essa proteína exibiu atividades citotóxicas em algumas células tumorais, tais como melanoma de olhos e carcinomas de pâncreas e renal. Com esses resultados, maiores quantidades de proteína foram requeridas e o desenvolvimento do processo de produção em maior escala da proteína Amblyomin-X foi necessário. A partir de um protocolo do processo de produção da proteína bem estabelecido, este trabalho de doutorado direto tem como objetivo otimizar a concentração celular obtida no momento anterior à indução da proteína heteróloga por meio da proposição de um modelo matemático fenomenológico não-estruturado que represente o processo e compreender, por meio da análise de fluxos metabólicos, a dinâmica do metabolismo *E. coli* no seu crescimento e na biossíntese da proteína. Trinta e oito ensaios foram realizados em biorreatores de 15 L no intuito de compreender os fenômenos envolvidos no processo de crescimento da bactéria e produção da proteína recombinante de interesse. Desses ensaios, dez foram tomados para avaliar os parâmetros do processo e para a proposição do modelo fenomenológico. Um modelo fenomenológico do processo de produção da Amblyomin-X composto por 14 variáveis de estado, 1 equação de transporte de indutor do meio extracelular para o meio intracelular, 1 equação cinética de crescimento celular e 1 equação cinética de produção da proteína foi proposto e simulado utilizando o *software* Matlab®. O ajuste de parâmetros do modelo foi realizado em linguagem Fortran e validado estatisticamente através do Teste-F. O modelo foi aprovado nesse teste estatístico e foi empregado para alimentar o otimizador em Matlab® visando maximizar a concentração celular no momento anterior à indução (produção de proteína associada ao crescimento). Empregando perfil de vazão de alimentação resultante da otimização, foi possível atingir a concentração de 30,25 g/L de células no biorreator. Para a compreensão do metabolismo da *E. coli* e análise de fluxos metabólicos, um ensaio (dentre os 38 demais) foi realizado com maior número de amostragens. A análise de fluxos metabólicos foi realizada utilizando o *software* Metatool e o *software* Matlab®, resultando em três conjuntos de modos de fluxos elementares. A partir desses modos elementares, foram gerados três diferentes “fotografias”, que representam o metabolismo da bactéria ao longo do processo de produção da proteína. A comparação entre tais “fotografias” mostra que não existem mudanças significativas na distribuição de fluxos nas vias do metabolismo central da bactéria ao longo do processo. A compreensão e a estimativa do fluxo de carbono a partir da

velocidade de respiração microbiana também permitiu a proposição de outro modelo matemático para o monitoramento da produção de ácido acético em tempo real.

Palavras-chave: Otimização de bioprocessos. Modelagem matemática. Análise de fluxos metabólicos. Amblyomin-X. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

MARTELETO, N. B. **Modeling and mathematical optimization of the production process of recombinant protein Amblyomin-X by the bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3) – mutated.** 2020. 136 f. Thesis (PhD in Biotechnology) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2020.

Amblyomin-X (*Amblyomma cajennense* inhibitor of Factor Xa) is a protein found in the saliva of the *Amblyomma cajennense* tick that inhibits Factor Xa from blood clotting. When expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), studies have shown that this protein exhibited cytotoxic activities in some tumor cells, such as melanoma of the eyes and pancreatic and renal carcinomas. With these results, greater amounts of protein were required and the development of the larger-scale production process of the Amblyomin-X protein was necessary. Based on a well-established protein production process protocol, this PhD work aims to optimize the cell concentration obtained prior to the induction of the heterologous protein by proposing and unstructured phenomenological mathematical model that represents the process and understand, through the analysis of metabolic flows, the dynamics of *E. coli* metabolism in its growth and protein biosynthesis. Thirty-eight tests were carried out in 15 L bioreactors in order to understand the phenomena involved in the process of bacterial growth and production of the recombinant protein of interest. From these tests, ten were taken to evaluate the process parameters and to propose the phenomenological model. A phenomenological model of the Amblyomin-X production process composed by 14 state variables, 1 transport equation of inducing extracellular media, 1 kinetic equation for protein production was proposed and simulated using Matlab® software. The adjustment of model parameters was performed in Fortran language and validated through F-Test. The model was approved in this statistical test and was used to feed the optimizer in Matlab® in order to maximize cell concentration in the moment prior induction (production of protein associated with growth). Using the feed flow profile resulting from the optimization, it was possible to reach 30.25 g/L cell concentration in the bioreactor. For the understanding of *E. coli* metabolism and analysis of metabolic flows, one test (among the remaining 38) was performed with a larger number of samples. The metabolic flow analysis was performed using the Metatool and Matlab® softwares, resulting in three sets of elementary flow modes. From these elementary modes, three different “photographs” were generated, which represent the metabolism of the bacteria throughout the protein production process. The comparison between such “photographs” show that there are no significant changes in the distribution of flows in the pathways of the central metabolism of the bacteria throughout the process. The understanding and estimation of the carbon flow from the microbial respiration speed also allowed the proposition of another mathematical model for the monitoring of acetic acid production in real time.

Keywords: Bioprocess optimization. Mathematical modeling. Analysis of metabolic flows. Amblyomin-X. *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da Amblyomin-X: domínio tipo Kunitz, domínio C-terminal, His-Tag, região hidrofóbica e pontes salinas.	23
Figura 2 – Esquema geral de um experimento de engenharia genética.	24
Figura 3 – Vias do metabolismo central da bactéria <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 4 – Visão geral do método de ponto interior.	50
Figura 5 – Visão geral dos ensaios.	51
Figura 6 – Modelo de biorreator BIOSTAT Cplus utilizado nos ensaios.	54
Figura 7 – Perfis das massas de glicose, ácido acético, celular e da proteína Amblyomin-X ao longo do tempo para o ensaio 1.	65
Figura 8 – Valores de processo do ensaio 1 registrados pelo MFCS.	66
Figura 9 – Imagem do gel de eletroforese do ensaio 1. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – ausência de proteína na amostra após 1 h da indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.	67
Figura 10 – Perfis de velocidade específica de crescimento e das concentrações de células, glicose e ácido acético ao longo do tempo.	68
Figura 11 – Simulação do modelo matemático a partir da estimativa preliminar dos parâmetros. – dados simulados; + dados experimentais dos ensaios.	73
Figura 12 – Simulação do modelo matemático com os parâmetros ajustados. – dados simulados; + dados experimentais do ensaio 1; + dados experimentais do ensaio 2.	74
Figura 13 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 1ª rodada de otimização.	76
Figura 14 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 2ª rodada de otimização.	77
Figura 15 – Perfis de concentração de glicose, células e ácido acético ao longo do tempo para o cultivo com concentração inicial de glicose de 30 g/L.	78
Figura 16 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 3ª rodada de otimização.	79
Figura 17 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 4ª rodada de otimização.	80
Figura 18 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 5ª rodada de otimização.	81
Figura 19 – Rede metabólica proposta para a bactéria <i>Escherichia coli</i>	84
Figura 20 – Distribuição dos fluxos metabólicos da etapa de batelada.	89
Figura 21 – Distribuição dos fluxos metabólicos da etapa de batelada alimentada.	90
Figura 22 – Distribuição dos fluxos metabólicos da etapa de produção.	91
Figura 23 – Perfis de velocidade específica de crescimento e das concentrações de células, glicose e ácido acético ao longo do tempo.	94
Figura 24 – Perfil da vazão de alimentação de glicose (F1) empregada no Ensaio %% e a velocidade de respiração celular registrada no ensaio.	94
Figura 25 – Perfis das variáveis de estado volume, concentração celular, de glicose e de ácido acético a partir dos dados experimentais de velocidade de respiração para o ensaio 3. Os pontos vermelhos são experimentais e a linha contínua azul os dados simulados pelo modelo.	95
Figura 26 – Dados de processo do ensaio 1.	108

Figura 27 – Dados de processo do ensaio 2.	108
Figura 28 – Dados de processo do ensaio 3.	109
Figura 29 – Dados de processo do ensaio 4.	109
Figura 30 – Dados de processo do ensaio 5.	110
Figura 31 – Dados de processo do ensaio 6.	110
Figura 32 – Dados de processo do ensaio 7.	111
Figura 33 – Dados de processo do ensaio 8.	111
Figura 34 – Dados de processo do ensaio 9.	112
Figura 35 – Dados de processo do ensaio 10.	112
Figura 36 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 1.	113
Figura 37 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 2.	113
Figura 38 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 3.	114
Figura 39 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 4.	114
Figura 40 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 5.	115
Figura 41 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 6.	115
Figura 42 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 7.	116
Figura 43 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 8.	116
Figura 44 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 9.	117
Figura 45 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S ₁), concentração de ácido acético (P ₁) e concentração de proteína (P ₂) para o ensaio 10.	117
Figura 46 – Velocidade específica de crescimento celular do ensaio 9 para a batelada.	118
Figura 47 – Velocidade específica de consumo de glicose pela célula do ensaio 9 para a batelada.	118
Figura 48 – Velocidade específica de consumo de ácido acético pela célula do ensaio 9 para a batelada.	119
Figura 49 – Velocidade específica de consumo de oxigênio pela célula do ensaio 9 para a batelada.	119
Figura 50 – Velocidade específica de formação de dióxido de carbono pela célula do ensaio 9 para a batelada.	119

Figura 51 – Velocidade específica de crescimento celular do ensaio 9 para a batelada alimentada.....	120
Figura 52 – Velocidade específica de consumo de glicose pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.....	120
Figura 53 – Velocidade específica de consumo de ácido acético pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.....	120
Figura 54 – Velocidade específica de consumo de oxigênio pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.....	121
Figura 55 – Velocidade específica de formação de dióxido de carbono pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.....	121
Figura 56 – Velocidade específica de crescimento celular do ensaio 9 para a produção....	121
Figura 57 – Velocidade específica de consumo de glicose pela célula do ensaio 9 para a produção.....	122
Figura 58 – Velocidade específica de formação de proteína pela célula do ensaio 9 para a produção.....	122
Figura 59 – Velocidade específica de consumo de ácido acético pela célula do ensaio 9 para a produção.....	122
Figura 60 – Velocidade específica de consumo de oxigênio pela célula do ensaio 9 para a produção.....	123
Figura 61 – Velocidade específica de formação de dióxido de carbono pela célula do ensaio 9 para a produção.....	123
Figura 62 – Gel de eletroforese do ensaio 1. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – ausência de proteína na amostra após 1 h da indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.....	126
Figura 63 – Gel de eletroforese do ensaio 2. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – proteína produzida 1 h após a indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.....	126
Figura 64 – Gel de eletroforese do ensaio 3. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – primeira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 4 – segunda réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 5 – terceira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução.....	127
Figura 65 – Gel de eletroforese do ensaio 4. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – ausência de proteína na amostra após 1 h da indução; 5 – ausência de proteína após 2 h da indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.....	127
Figura 66 – Gel de eletroforese do ensaio 5. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – primeira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 3 – segunda réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 4 – terceira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 5 – padrão de peso molecular.....	128
Figura 67 – Gel de eletroforese do ensaio 6. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – primeira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 3 – segunda réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 4 – terceira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 5 – padrão de peso molecular.....	128

Figura 68 – Gel de eletroforese do ensaio 7. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 3x; 4 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 5x; 5 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 10x; 6 – proteína produzida no momento anterior à indução; 7 – proteína produzida após 1 h de indução; 8 – proteína produzida após 2 h de indução; 9 – proteína produzida após 3 h de indução; 10 – proteína produzida após 4 h de indução. 129

Figura 69 – Gel de eletroforese do ensaio 8. Camadas: 1 – proteína Amblyomin-X purificada; 2 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 3x; 3 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 5x; 4 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 10x; 5 – primeira réplica da proteína produzida após 4 h de indução; 6 – segunda réplica da proteína produzida após 4 h de indução; 7 – terceira réplica da proteína produzida após 4 h de indução..... 129

Figura 70 – Gel de eletroforese do ensaio 9. Camadas: 1 – proteína Amblyomin-X purificada; 2 – ausência de proteína no momento antes da indução; 3 – ausência de proteína após 30 min da indução; 4 – proteína produzida após 1 h de indução; 5 – proteína produzida após 1,5 h de indução; 6 – proteína produzida após 2 h de indução; 7 – proteína produzida após 2,5 h de indução; 8 – proteína produzida após 3 h de indução; 9 – proteína produzida após 3,5 h de indução; 10 – proteína produzida após 4 h de indução. 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio Lysogenic Broth.....	52
Tabela 2 – Composição do meio de inóculo.....	52
Tabela 3 – Composição da solução de micronutrientes.....	53
Tabela 4 – Composição do meio de cultura nos biorreatores.....	54
Tabela 5 – Nomenclatura dos parâmetros ajustáveis do modelo matemático.....	72
Tabela 6 – Nomenclatura dos parâmetros fixos do modelo matemático.....	72
Tabela 7 – Valores estimados e ajustados dos parâmetros ajustáveis do modelo matemático.....	73
Tabela 8 – Dados experimentais do ensaio 9 para o modelo metabólico tomados na fase pseudoestacionária.....	82
Tabela 9 – Modos elementares gerados pelo software Metatool para a etapa de batelada.....	85
Tabela 10 – Modos elementares gerados pelo software Metatool para a etapa de batelada alimentada.....	85
Tabela 11 – Modos elementares gerados pelo software Metatool para a etapa de produção.....	86
Tabela 12 – Velocidades específicas de consumo e produção dos metabólitos externos. ...	87
Tabela 13 – Resultados do balanço de carbono para o ensaio.....	88
Tabela 14 – Fluxos dos metabólitos externos calculados por regressão linear e pelo software Matlab® para a etapa de batelada.....	88
Tabela 15 – Fluxos dos metabólitos externos calculados por regressão linear e pelo software Matlab® para a etapa de batelada alimentada.....	88
Tabela 16 – Fluxos dos metabólitos externos calculados por regressão linear e pelo software Matlab® para a etapa de produção.....	88
Tabela 17 – Dados experimentais do ensaio 1.....	102
Tabela 18 – Dados experimentais do ensaio 2.....	102
Tabela 19 – Dados experimentais do ensaio 3.....	103
Tabela 20 – Dados experimentais do ensaio 4.....	103
Tabela 21 – Dados experimentais do ensaio 5.....	104
Tabela 22 – Dados experimentais do ensaio 6.....	104
Tabela 23 – Dados experimentais do ensaio 7.....	105
Tabela 24 – Dados experimentais do ensaio 8.....	105
Tabela 25 – Dados experimentais do ensaio 9.....	106
Tabela 26 – Dados experimentais do ensaio 10.....	107

NOMENCLATURA

A_{crit}	Concentração crítica de acetato (g/L)
$[CO_2]_e$	Porcentagem de gás carbônico na corrente de entrada de ar do biorreator (% vol)
$[CO_2]_s$	Porcentagem de gás carbônico na corrente de saída de ar do biorreator (% vol)
CO_2	Concentração de dióxido de carbono dissolvido (g/L)
CO_2^*	Concentração máxima de dióxido de carbono dissolvido (g/L)
$dGAP/dt$	Taxa de produção da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (10^{-3} U/mL.h)
E	Concentração dos substratos essenciais (g/L)
F	Vazão de alimentação total no biorreator (L/h)
F_{ar}	Vazão de ar no biorreator (L/min)
F_b	Vazão de alimentação da fonte de nitrogênio (L/h)
F_s	Vazão de alimentação de glicose (L/h)
F_y	Vazão de alimentação da variável de interesse (L/h);
g	Termo de regulação
g_s	Carga metabólica sofrida pela célula
$[IPTG]_e$	Concentração extracelular de IPTG ($\mu\text{mol/L}$)
$[IPTG]_{e,0}$	Concentração extracelular de IPTG na indução ($\mu\text{mol/L}$)
$[IPTG]_i$	Concentração intracelular de IPTG ($\mu\text{mol/L}$)
k	Expoente do termo de inibição do crescimento celular por acetato com ácido acético como fonte de carbono
K'	Relação entre constantes de reações competitivas (g glicose L/g acetato ²)
K_a	Constante de saturação do primeiro substrato limitante (g/L)
K_b	Constante de saturação do segundo substrato limitante (g/L)
K_A	Constante de afinidade por acetato (g/L)
k_{La}^O	Coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (h^{-1})
$k_{La}^{CO_2}$	Coeficiente de transferência de dióxido de carbono volumétrico (h^{-1})
$K_{A,A}$	Constante de inibição do crescimento celular por acetato com ácido acético como fonte de carbono (g/L)
$K_{A,G}$	Constante de inibição do crescimento celular por acetato com glicose como fonte de carbono (g/L)
K_{S1}	Constante de afinidade para glicose (g/L)
K_i	Constante de conversão de unidades, com valor de 26,44 min.mmol/L.h
K_p	Constante de inibição do crescimento celular por produto (g/L)
k_p	Constantes de reações competitivas (g acetato L/ g célula g glicose h)
K_{R-IPTG}	Constante de equilíbrio para o repressor e IPTG (mM)
K_s	Constante de saturação do substrato limitante (g/L)
M	Moléculas de mRNA de lacI (moléculas/célula)
m_A	Coeficiente de manutenção celular com ácido acético como fonte de carbono (g/g.h)
MC	Massa do conjunto células e membrana (g)
m_{sx}	Coeficiente de manutenção celular com glicose como fonte de carbono
MM	Massa da membrana (g)
MU	Massa da unidade da membrana (g)
N	Número de cópias de plasmídeo (plasmídeo/célula)

n	Número de pontos de cada variável
$[N_2]_e$	Porcentagem de nitrogênio na entrada do biorreator (% vol)
$[N_2]_s$	Porcentagem de nitrogênio na saída do biorreator (% vol)
O_2	Concentração de oxigênio dissolvido (g/L)
O_2^*	Concentração máxima de oxigênio dissolvido (g/L)
$[O_2]_e$	Porcentagem de oxigênio na entrada do biorreator (% vol)
$[O_2]_s$	Porcentagem de oxigênio na saída do biorreator (% vol)
p	Número de parâmetros do modelo
P	Concentração de produto (g/L)
P_1	Concentração de ácido acético (g/L)
P_m	Concentração do produto em seu efeito inibitório (g/L)
q_P	Velocidade específica de produção da proteína (h^{-1})
q_{P0}	Velocidade específica inicial de produção da proteína (h^{-1})
r	Velocidade de transporte de IPTG ($\mu M/h$)
r_{cons}	Velocidade de consumo da variável de interesse (g/L.h)
R_{free}	Número de moléculas de repressor livre (molécula/célula)
r_{ger}	Velocidade de geração da variável de interesse (g/L.h)
R_{IPTG}	Número de moléculas de repressor ligadas ao IPTG (molécula /célula)
s	Variável de folga
S	Concentração do substrato limitante no biorreator (g/L)
S'	Concentração dos substratos que aumentam a velocidade específica de crescimento (g/L)
$S - S^*$	Medida do excesso de glicose (g/L)
S_0	Concentração de substrato na solução de alimentação (g/L)
S_1	Concentração de glicose (g/L)
S_a	Concentração do primeiro substrato limitante no biorreator (g/L)
S_b	Concentração do segundo substrato limitante no biorreator (g/L)
s_{exp}^2	Estimativa da variância do erro experimental
S_{sim}^2	Estimativa da variância do erro do modelo
S_f	Concentração de glicose na solução de alimentação (g/L)
t	Tempo (h)
u^*	Controle ótimo
V	Volume do biorreator (L)
v	Número de variáveis
V_0	Volume inicial (L)
V_A	Volume de amostra pipetada (mL)
V_{cel}	Volume de células (L)
V_m	Volume do meio de cultura (L)
W	Constante de inibição da equação de Andrews (g/L)
X	Concentração de células (g/L)
$x(t)$	Vetor de variáveis de estado
X_0	Concentração inicial de células (g/L)
X_{ind}	Concentração de células na indução (g/L)

$(Y_{XS})_{ap}$	Conversão aparente de substrato em células (gcel/gglicose)
γ	Concentração da variável de interesse no biorreator (g/L)
γ_e	Concentração da variável de interesse na alimentação (g/L)
γ_{expij}	Valor experimental da variável
$Y_{GAP/X,A}$	Relação entre enzimas e células formadas na fase ácido acético (U/g)
$Y_{GAP/X,Gl}$	Relação entre enzimas e células formadas na fase glicose (U/g)
γ_{mij}	Média da variável
γ_{simij}	Valor da variável calculada pelo modelo
$Y_{X/A,A}$	Fator de conversão de ácido acético em célula com ácido acético como fonte de carbono (g/g)
$Y_{X/A,Gl}$	Fator de conversão de ácido acético em célula com glicose como fonte de carbono (g/g)
$Y_{X/Gl,Gl}$	Fator de conversão de glicose em células (g/g)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células (g/g)
$Y_{O/X}$	Fator de conversão entre a concentração de oxigênio dissolvido e a concentração de células (g/g)
$Y_{CO_2/X}$	Fator de conversão entre a concentração de dióxido de carbono dissolvido e a concentração de células (g/g)
α_{mRNA}	Velocidade de transcrição de lacI (h^{-1})
α_R	Velocidade de transcrição do lacI (h^{-1})
ΔS	Glicose consumida (g)
ΔX	Células geradas (gDCW)
λ	Multiplicadores de Lagrange
λ_R	Velocidade de degradação do lacI (h^{-1})
μ	Multiplicadores de Kuhn-Tucker
μ_A	Velocidade específica de crescimento celular com ácido acético como fonte de carbono (h^{-1})
μ_a^S	Velocidade específica de formação de acetato em glicose (h^{-1})
μ_{fix}	Velocidade específica de crescimento fixa ($0,2 h^{-1}$)
μ_{Gl}	Velocidade específica de crescimento celular com glicose como fonte de carbono (h^{-1})
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{max,A}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima com ácido acético como fonte de carbono (h^{-1})
$\mu_{max,Gl}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima com glicose como fonte de carbono (h^{-1})
μ_X	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
π	Expoente do termo de inibição do crescimento celular por acetato com glicose como fonte de carbono
τ_{R-O}	Constante do tempo para a ligação entre repressor e IPTG (h^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	A Proteína Amblyomin-X	22
2.2	Proteínas Recombinantes	23
2.3	Considerações na escolha do sistema de expressão	25
2.4	Estratégias de operação de biorreatores	27
2.5	Metabolismo da <i>Escherichia coli</i>	28
2.6	Modelagem fenomenológica não estruturada de bioprocessos	32
2.6.1	Formulação do modelo matemático	32
2.6.2	Trabalhos de literatura	36
2.6.2.1	Roeva e Tzonkov (2006): Modelagem do cultivo de <i>Escherichia coli</i> em batelada alimentada	36
2.6.2.2	Nancib, Mosrati e Boudrant (1993): Modelagem do cultivo de <i>Escherichia coli</i> em batelada	37
2.6.2.3	Guardia e Calvo (2011): Modelagem do cultivo de <i>Escherichia coli</i> em batelada	40
2.6.2.4	Bonomi et al. (1993): Modelagem do cultivo de <i>Gluconobacter oxydans</i> em batelada	42
2.6.2.5	Martínez (2014): Modelagem da produção de proteínas recombinantes em culturas de altas concentrações de <i>Escherichia coli</i>	43
2.6.3	Ajuste de Parâmetros e Validação do Modelo Proposto	46
2.7	Otimização de bioprocessos	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	O microrganismo e sua preservação	51
3.2	Visão geral dos ensaios	51
3.3	Composição e preparação dos cultivos	52
3.3.1	Preparação do pré-inóculo	52
3.3.2	Preparação do inóculo	52
3.3.3	Condições do cultivo em biorreator	53
3.4	Métodos analíticos	55
3.4.1	Medida de densidade óptica	55
3.4.2	Determinação da concentração celular por massa seca	56
3.4.3	Determinação da concentração de glicose e ácido acético	56
3.4.4	Determinação da quantidade de proteína recombinante	57

3.4.5	Procedimento de extração da proteína heteróloga	57
3.4.6	Procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida	58
3.5	Estimativa inicial dos parâmetros do modelo não-estruturado	58
3.5.1	Fator de conversão de glicose em célula ($Y_{X/S}$).....	58
3.5.2	Constante de proporcionalidade entre crescimento celular e alimentação de base (kb).....	59
3.5.3	Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$).....	59
3.5.4	Constante de saturação (Ks).....	60
3.5.5	Coeficiente específico de manutenção celular m_{sx}	60
3.5.6	Velocidade específica de respiração qO_2	60
3.5.7	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio no início do ensaio – $k_{La\text{inicial}}$	60
3.5.8	Velocidade específica de crescimento limitado μ_{lim}	61
3.6	Validação estatística do modelo fenomenológico	61
3.7	Balanço gasoso – cálculo do <i>Oxygen Uptake Rate</i> (OUR) e do carbono <i>Carbon Evolution Rate</i> (CER).....	62
3.8	Determinação das velocidades específicas de consumo/produção dos metabólitos externos	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Resultados experimentais	64
4.2	Modelo fenomenológico	67
4.3	Resultados da Otimização	75
4.4	Análise de fluxos metabólicos	81
4.5	Modelagem metabólica.....	92
5	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO I – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS REALIZADOS.....	102
	ANEXO II – DADOS DE PROCESSO DOS ENSAIOS REGISTRADOS PELO MULTI FERMENTER COMPUTER SYSTEM (MFCS)	108
	ANEXO III – PERFIS DAS VARIÁVEIS DE ESTADO DOS ENSAIOS	113
	ANEXO IV – GRÁFICOS DAS REGRESSÕES PARA A ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS	118
	ANEXO V – REAÇÕES DO METABOLISMO DA <i>Escherichia coli</i> - METATOOL.....	124
	ANEXO VI – IMAGEM DO GEL DE ELETROFORESE DOS ENSAIOS	126
	ANEXO VII – ALGORITMO DA MODELAGEM METABÓLICA.....	131

1 INTRODUÇÃO

A plataforma tecnológica das indústrias farmacêuticas vem sendo alterada desde 1980 com o advento dos medicamentos biológicos – os biofármacos, que são aqueles produzidos a partir de seres vivos por meio de processos biotecnológicos. Tais medicamentos são em sua grande maioria proteínas, que têm estrutura molecular normalmente parcialmente conhecida e muito mais complexa do que as moléculas sintéticas, o que torna difícil a sua reprodução (FERNANDES, 2015).

O custo de desenvolvimento dos biofármacos é alto, na medida em que exige testar processos de produção para compreender os fenômenos envolvidos na obtenção do produto de interesse e estabelecer um protocolo de produção, realizar ensaios clínicos e a aprovação de agentes regulatórios. No entanto, o seu mercado vem crescendo continuamente devido à eficácia que esses medicamentos têm no tratamento de doenças não curáveis pela terapia convencional (PFIZER, 2014). No Brasil, os gastos do Ministério da Saúde com os biofármacos no ano de 2016 representaram 50% dos gastos totais com medicamentos, o que significa R\$ 13 bilhões, sendo que a parcela comprada desses biomedicamentos foi de 5% do total (INTERFARMA, 2016).

O primeiro biofármaco desenvolvido utilizando microrganismo geneticamente modificado foi a insulina humana em 1982. Desde então vários outros têm sido produzidos a partir de diferentes organismos, tais como hormônio de crescimento humano, citocinas (eritropoietina, interferona, interleucinas), fatores de coagulação, anticorpos monoclonais e fator VIII. A aplicação dos biofármacos é diversa, como por exemplo, no tratamento de Hepatite B e C, diabetes, leucemias, esclerose múltipla e Hemofilia A (PFIZER, 2014).

Em 2010, Chudzinski-Tavassi et al. reportaram uma proteína com atividade antitumoral *in vivo*, que reduz a metástase em melanoma de olhos e com atividade pró-apoptótica em melanoma de olhos e carcinomas de pâncreas e renal. Tal proteína, denominada Amblyomin-X, foi encontrada enquanto se explorava uma biblioteca cDNA derivada das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense* (BATISTA et al., 2009).

A saliva dos carrapatos é composta por várias substâncias que estão envolvidas na coagulação sanguínea, motivo que levou à seleção e à caracterização

destes compostos (BATISTA et al., 2008). Dentre essas substâncias, a Amblyomin-X é uma proteína com estrutura única capaz de inibir o Fator Xa, que tem um papel importante na coagulação sanguínea. Essa proteína, além de possuir atividade citotóxica nas células tumorais, exibe pouca ou nenhuma atividade em células normais (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010), indicando uma vantagem frente aos tratamentos convencionais contra os tipos de câncer.

O processo de produção da Amblyomin-X em escala de biorreatores era desconhecido e, dado o seu potencial como biofármaco, surgiu a necessidade do seu estudo e desenvolvimento para que os testes pré-clínicos e clínicos com essa proteína fossem realizados. Então, deu-se início ao desenvolvimento de um processo de produção que obtivesse altas concentrações da proteína de interesse.

Uma vez que o processo de produção da proteína estivesse estabelecido, resultando em um protocolo de processo, a otimização da concentração celular é interessante economicamente, na medida em que está relacionada à obtenção de maiores concentrações da proteína Amblyomin-X.

Nesse âmbito, este trabalho tem como objetivo otimizar a concentração celular resultante no momento anterior à fase de indução do processo de produção da proteína recombinante Amblyomin-X em biorreatores de 15 L, utilizando a bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) mutada, por meio de um modelo fenomenológico não estruturado que represente o processo. Tem também como objetivo compreender, por meio da análise de fluxos metabólicos, a dinâmica do metabolismo da *E. coli* no seu crescimento e na biossíntese da proteína.

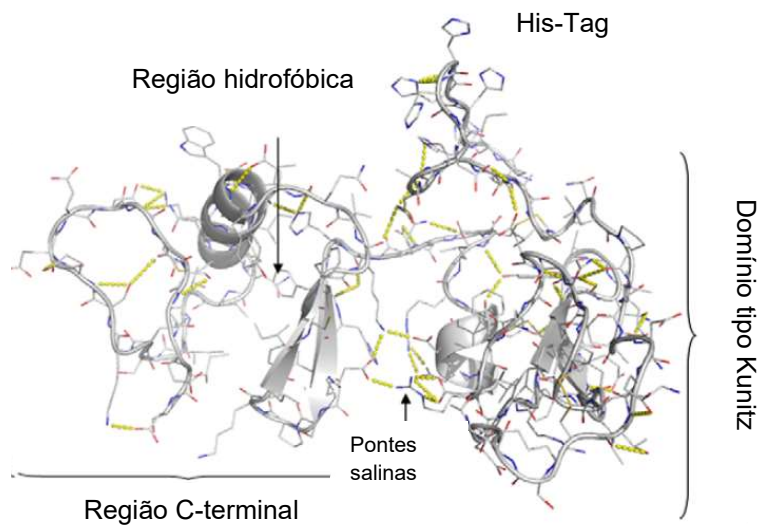
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Proteína Amblyomin-X

Carrapatos são parasitas hematófagos que desempenham um importante papel como vetores de doenças, provocadas por vírus, bactérias e protozoários, além de causar dermatoses ao seu hospedeiro. Na sua saliva estão presentes inúmeras substâncias que estão diretamente envolvidas no processo de coagulação sanguínea, algumas agindo como inibidores dos fatores do mecanismo de coagulação, outras na agregação de plaquetas ou contração vascular (BATISTA et al., 2008).

No processo de hemostase, o Fator X tem grande importância, na medida em que a sua forma ativada catalisa a transformação de protrombina em trombina, que por sua vez converte o fibrinogênio em fibrina, levando à coagulação do sangue (BATISTA et al., 2009). A Amblyomin-X (*Amblyomma cajennense* inhibitor of Factor Xa) é uma proteína de aproximadamente 14 kDa que inibe o Fator Xa (forma ativada do Fator X). Estudos posteriores realizados pelo Instituto Butantan revelaram que esta proteína também é capaz de promover citotoxicidade em células tumorais pancreáticas, renais e de pele (melanoma). Uma característica marcante da sua estrutura é a presença de apenas um domínio do tipo Kunitz, diferentemente do que ocorre em outros inibidores de serinoproteases, nos quais este domínio se repete duas ou três vezes. Na Figura 1 está apresentado um modelo estrutural da Amblyomin-X, com destaque para a região C-terminal, região hidrofóbica e pontes salinas, além da His-Tag, presente apenas nas primeiras versões da proteína recombinante (BATISTA et al., 2009; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; AKAGI et al., 2012).

Figura 1 – Estrutura da Amblyomin-X: domínio tipo Kunitz, domínio C-terminal, His-Tag, região hidrofóbica e pontes salinas.



Fonte: Batista et al. (2009).

Comparações entre o domínio tipo Kunitz da Amblyomin-X e de proteínas TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) e Ixolaris, importantes ativos no mecanismo de coagulação sanguínea, mostram uma similaridade de cerca de 40%. A TFPI é um inibidor multivalente do tipo Kunitz, inibindo o Fator Xa. Testes *in vitro* realizados com a Amblyomin-X mostraram que a transformação de protrombina em trombina pode ser inibida, no entanto, a Amblyomin-X teve pouco efeito no mecanismo de coagulação nos testes *in vivo*, o que pode ser justificado pela diferença estrutural do seu domínio tipo Kunitz.

Ao mesmo tempo em que a Amblyomin-X tem similaridades no seu domínio tipo Kunitz com outras proteínas anticoagulantes, a sua estrutura é única na medida em que abriga um domínio C-terminal que não é comum a outras proteínas. Esse fato torna difícil explicar a relação entre sua estrutura e sua função (BATISTA et al., 2009).

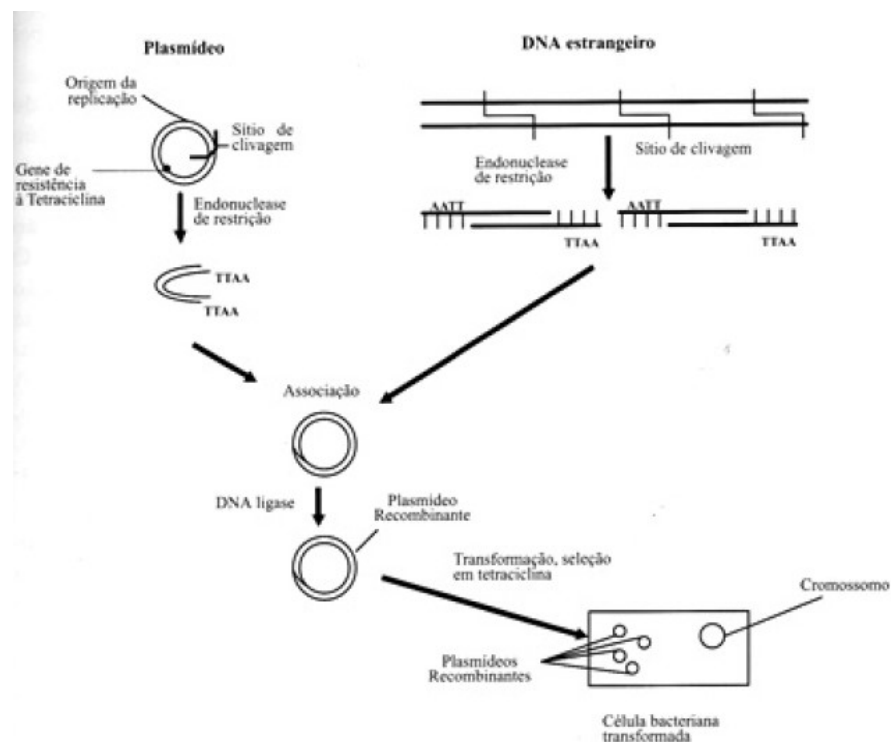
2.2 Proteínas Recombinantes

A produção de proteínas heterólogas em larga escala somente tornou-se possível com o avanço da tecnologia do DNA recombinante e com os constantes estudos das técnicas de cultivo, que envolvem a escolha do microrganismo hospedeiro, da estratégia de condução de biorreatores, o estudo das melhores composições do meio de cultivo e das etapas de separação e purificação (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

A tecnologia do DNA recombinante consiste em um conjunto de técnicas utilizadas para a combinação de fragmentos de genes provenientes de diferentes organismos. Então, o material genético correspondente à proteína de interesse é inserido na forma de plasmídeo em organismos (hospedeiros) para a amplificação desse material e produção da proteína recombinante (BORZANI et al., 2008; STRYJEWSKA et al., 2013).

Para se engenheirar uma célula, são necessárias: i) a clivagem e ligação *in vitro* do material genético, originando o DNA recombinante; ii) a escolha de um sistema de expressão e de um microrganismo hospedeiro; iii) a escolha de um método para selecionar o microrganismo portador do DNA recombinante frente a população de microrganismos presentes (Figura 2) (SCHMIDELL et al., 2005).

Figura 2 – Esquema geral de um experimento de engenharia genética.



Fonte: Schmidell et al. (2005).

Nesse contexto, proteínas heterólogas de alto valor agregado têm sido produzidas por meio da tecnologia do DNA recombinante, principalmente as de uso terapêutico. Os estudos sobre sua expressão, secreção e purificação a partir de microrganismos modificados geneticamente têm se tornando cada vez mais evidentes (SCHMIDELL et al., 2005). São exemplos os trabalhos publicados por:

- i) Cui et al. (2017): avaliaram a influência de um peptídeo sinal extraído de actinomicetos na expressão de hidrolases secretadas para o meio extracelular em *Escherichia coli* recombinante.
- ii) Campani et al. (2016): realizaram uma análise técnico-econômica da produção da proteína A de pneumococos engenheirada em *Escherichia coli*. Avaliaram a influência do enriquecimento do ar com oxigênio puro no custo de produção, tendo como intuito evitar a limitação do crescimento celular por oxigênio nos reatores.
- iii) Volynets et al. (2016): estudaram a produção da quinase 1, mediadora da cascata de sinalização que regula a apoptose celular. A proteína foi expressa na forma solúvel em *Escherichia coli*, atingindo a concentração de 0,47 g/L.
- iv) Jiang et al. (2015): produziram e compararam métodos de purificação do fator de crescimento tipo insulina ligante à proteína 7, que tem potencial terapêutico contra o câncer. Células de mamífero foram utilizadas devido à necessidade de modificações pós-traducionais.
- v) Manderson et al. (2006): desenvolveram um processo comercial para a produção de vacina contra hidatidose, doença parasitária causada por tênias que pode infestar o homem. Para tanto, utilizaram como vetor a *Escherichia coli*, onde a proteína foi produzida na forma de corpo de inclusão.
- vi) Casademunt et al. (2012): produziram em células de humanos o fator VIII recombinante, que é utilizado no tratamento de hemofilia A.

2.3 Considerações na escolha do sistema de expressão

Um dos fatores determinantes para a produção em alto nível de proteínas recombinantes é a escolha do sistema de expressão, que depende das características de crescimento da célula hospedeiro, do nível de expressão desejado, da necessidade de modificações pós-traducionais e da produção intracelular ou extracelular da proteína de interesse (MAKRIDES, 1996; CHOI; KEUM; LEE, 2006).

A *Escherichia coli* é um dos vetores mais empregados nos processos biotecnológicos por ser bem conhecida em termos genéticos e fisiológicos. Além disso, o seu emprego como hospedeiro favorece o baixo custo do processo de produção, na medida em que apresenta rápido crescimento, podendo levar a altas produtividades celulares e de produtos, além de não exigir meios de cultura dispendiosos (CHOI; KEUM; LEE, 2006; BORZANI et al., 2008; KRAUSE; NEUBAUER; NEUBAUER, 2016; CAMPANI et al., 2016).

No entanto, a expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli* depende da eficiência traducional e estabilidade do mRNA, da facilidade de *folding* (enovelamento) da proteína, do potencial citotóxico e da degradação da proteína por proteases da célula do hospedeiro. Assim, nem todo gene pode ser expresso eficientemente em *Escherichia coli* (MAKRIDES, 1996). Além disso, ela apresenta a desvantagem de não ser adequada para a produção de proteínas muito grandes e complexas, que apresentem pontes de dissulfetos ou que necessitem de modificações pós-traducionais, muito embora algumas técnicas vêm sendo empregadas para amenizar esses problemas, tal como a coexpressão de chaperonas (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

A produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* pode ser intracelular ou extracelular, porém a sua elevada expressão leva à formação de corpos de inclusão no interior da célula. Estes corpúsculos são agregados insolúveis de proteínas inativas, e apresentam várias vantagens frente à produção de proteínas na forma solúvel. A primeira delas é a facilidade com que os corpos de inclusão são separados da célula, já que basicamente com etapas de *lise* celular, lavagem e centrifugação é possível obter grandes quantidades de proteína que estão relativamente purificadas se comparadas às produzidas na forma solúvel; reduzindo o custo com remoção de contaminantes. Outra vantagem é que, por não terem atividade biológica, os corpos de inclusão não são tóxicos para a célula, facilitando a produção de proteínas com essa característica. E por fim, os corpos de inclusão são resistentes à ação de proteases da célula hospedeira, permitindo o alto rendimento da produção de proteína. No entanto, o fato de a proteína se apresentar na forma inativa nos corpos de inclusão leva à necessidade de processos de *refolding*, que além de serem onerosos, envolvem perdas de proteína.

A expressão elevada de proteínas recombinantes depende também de um conjunto de elementos genéticos que estão configurados no vetor de expressão, afetando os aspectos transcricionais da produção da proteína de interesse. Na construção desse vetor, devem ser considerados: a força do promotor e indutibilidade, o uso de códons raros pela proteína a ser produzida, a eficiência da terminação na tradução e transcrição, o número de cópias de plasmídeo e seletividade do antibiótico (MAKRIDES, 1996; CHOI; KEUM; LEE, 2006).

2.4 Estratégias de operação de biorreatores

Segundo Krause, Neubauer e Neubauer (2016), a estratégia de crescimento do microrganismo em biorreatores tem uma grande influência na expressão da proteína, sendo que os sistemas de cultivo em altas densidades celulares são favoráveis na medida em que resultam em altas concentrações da proteína, resultando em um processo economicamente viável.

Para se atingir elevadas concentrações celulares, é imprescindível: i) a boa formulação do meio de cultivo; ii) o controle do processo por meio das variáveis temperatura, pH, agitação e aeração ou do modo de alimentação de substratos limitantes. Esse conjunto de fatores afeta o nível de expressão da proteína, a sua atividade e solubilidade. Portanto, todas essas condições devem ser bem avaliadas para se obter elevadas concentrações da proteína de interesse (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

O modo de operação de biorreatores em batelada alimentada é o mais usual na indústria por permitir a obtenção de elevadas concentrações celulares. Além disso, ele é preferível em relação ao modo de cultivo em batelada, na medida em que evita inibição por substrato e possibilita que esses substratos limitantes sejam adicionados continuamente. Tal suprimento, aliado ao controle de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, permite um melhor controle das velocidades metabólicas celulares, evitando a produção de metabólitos indesejados como o ácido acético em *Escherichia coli*, que inibe o crescimento do microrganismo (KRAUSE; NEUBAUER; NEUBAUER, 2016).

Uma maneira de se controlar a formação de ácido acético é alimentar o biorreator com uma vazão exponencial de glicose limitante ao crescimento celular, fixando-se uma velocidade específica de crescimento abaixo do seu valor máximo. Dessa forma, a concentração de glicose no biorreator é nula durante toda a batelada alimentada, provocando uma perturbação mínima no metabolismo da glicose (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

A vazão de alimentação de glicose no biorreator afeta a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, pois à medida que a glicose é adicionada, o consumo de oxigênio acontece, já que este é requerido para reoxidar as coenzimas NADH e FADH₂ em NAD⁺ e FAD. A porcentagem de oxigênio dissolvido no meio de cultura em relação ao seu valor máximo (%pO₂) abaixo do valor crítico para essa bactéria pode levar à formação de ácido acético; portanto, em um processo de produção em batelada alimentada envolvendo elevadas concentrações celulares, no

momento em que as variáveis manipuladas agitação e aeração atingem seu valor máximo – ou seja, a transferência de oxigênio para o meio é máxima –, o perfil da vazão de alimentação de glicose é fixado nesse mesmo valor, de modo a evitar a diminuição da porcentagem de oxigênio dissolvido no reator, mesmo limitando ainda mais o crescimento celular (KRAUSE; NEUBAUER; NEUBAUER, 2016).

Os processos de produção de proteínas recombinantes em altas concentrações celulares são normalmente divididos em duas etapas, no intuito de aumentar a produtividade da proteína. A primeira delas é caracterizada pelo crescimento celular até uma concentração desejada; e a segunda pela produção da proteína recombinante após a indução do sistema de expressão (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

A indução pode ser desencadeada por mudanças na temperatura, no pH e também por meio de indutores químicos, dependendo do promotor empregado. Os sistemas de expressão sob o controle do operon *lac* ou contendo promotores T7 são facilmente indutíveis por meio da adição de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). O operon *lac* contém dois mecanismos de controle que impedem a produção da proteína recombinante: o primeiro mecanismo bloqueia a expressão do operon *lac* na falta de um indutor (tal como o IPTG ou lactose), e o segundo na presença de glicose no meio de cultivo (KRAUSE; NEUBAUER; NEUBAUER, 2016).

Na produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* é importante a determinação do tempo ótimo de indução, bem como a concentração do indutor, de modo que este não iniba o crescimento celular (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

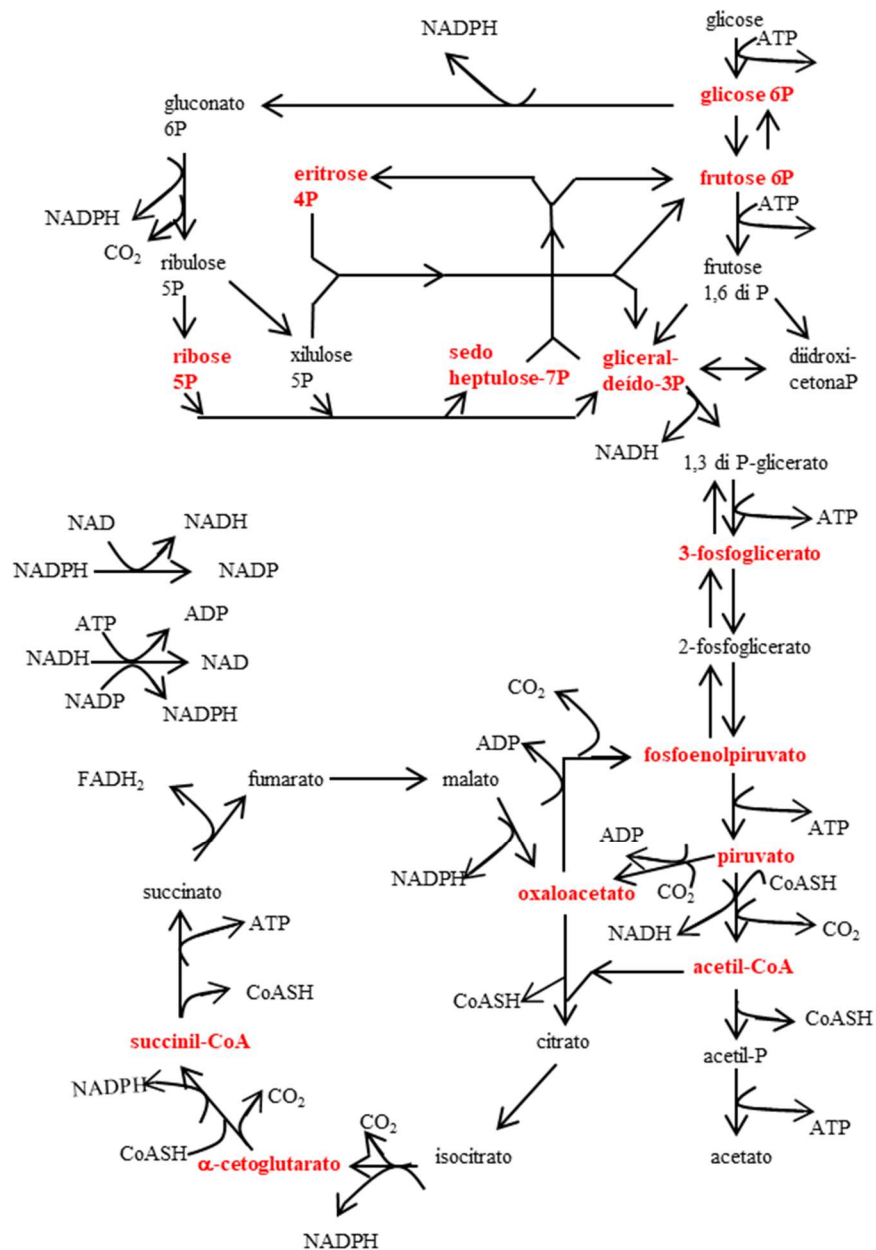
2.5 Metabolismo da *Escherichia coli*

A célula bacteriana contém uma rede de centenas de reações catalisadas por enzimas que tem a função metabólica de produzir: i) metabólitos precursores; ii) poder redutor e iii) fosfato altamente energético, em proporções requeridas pela biossíntese. Os metabólitos precursores são 13 intermediários metabólicos que dão origem aos blocos construtores nas reações de biossíntese, que por sua vez formarão as macromoléculas (NEIDHARDT; INGRAHAM; SCHAECHTER, 1990).

Segundo Neidhardt, Ingraham e Schaechter (1990), “todos os 13 metabólitos precursores são sintetizados por um conjunto de reações chamado de metabolismo central. Na *Escherichia coli* essas reações são divididas nas vias Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), que converte glicose 6-fosfato em piruvato, ciclo de Krebs, que inicia na oxidação do acetil-CoA em CO₂, e via das pentoses, que inicia na oxidação da

glicose 6-fosfato em CO_2 ". Existem ainda algumas vias centrais alternativas como a Entner-Doudoroff (ED); no entanto, na *Escherichia coli*, as enzimas dessa via são utilizadas para metabolizar gluconato; não glicose. A Figura 3 representa as vias do metabolismo central da *Escherichia coli*, com os 13 metabólitos precursores em vermelho.

Figura 3 – Vias do metabolismo central da bactéria *Escherichia coli*.

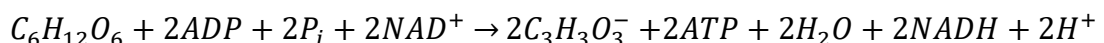


Fonte: Adaptado de Diogo (1994)

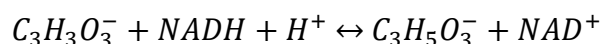
A via EMP pode ser vista em quatro etapas:

- i. A glicose é fosforilada duas vezes, formando a frutose 1,6 bisfosfato. Como as duas fosforilações são reações inviáveis, são consumidos 2 ATP.
- ii. A frutose 1,6 bisfosfato é clivada, gerando duas moléculas fosforiladas com três carbonos: a diidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato. Estas moléculas são isômeras, podendo ser interconvertidas; mas como o gliceraldeído 3-fosfato é um metabólito precursor, ou seja, é continuamente retirado do meio celular pelas reações de biossíntese, então as reações metabólicas se dão no sentido de formá-lo.
- iii. Fosforilação do gliceraldeído 3-fosfato por fosfato inorgânico, formando o 1,3 difosfoglicerato (molécula duplamente fosforilada). Esta reação é catalisada por um desidrogenase, reduzindo duas moléculas de NAD^+ a $NADH$.
- iv. Os dois grupos fosfatos de cada 1,3 difosfoglicerato são transferidos para dois ADP, formando no total quatro ATP.

Assim, na EMP a glicose é consumida formando 2 moléculas de piruvato, tendo rendimento líquido de 2 moléculas de ATP. No total, seis metabólitos precursores são produzidos pela via EMP: glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e piruvato. A EMP tem a seguinte equação geral:



Como mostra a equação acima, a oxidação da glicose depende da redução do NAD^+ . Então, para a manutenção da via EMP, os $NADH$ gerados devem ser reoxidados. Existem dois processos de reoxidação do $NADH$: na disponibilidade de oxigênio, este funciona como acceptor de elétrons; na sua ausência, o piruvato age como acceptor de elétrons, sendo reduzido a lactato:

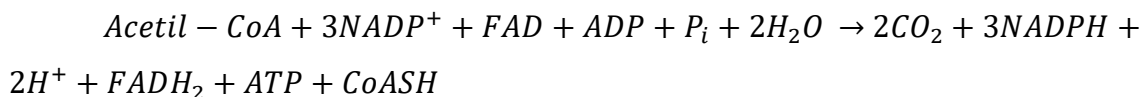


Para que o piruvato seja oxidado completamente a CO_2 , primeiramente este deve ser convertido em acetil-CoA. Esta conversão se dá por meio de quatro etapas sequenciais, catalisadas por um conjunto de três enzimas (piruvato desidrogenase, diidrolipoil transacetilase e diidrolipoil desidrogenase) e cinco coenzimas (tiamina

pirofosfato – TPP –, coenzima A – CoA –, NAD^+ , FAD e ácido lipóico) denominado complexo piruvato desidrogenase.

O acetil-CoA formado é então condensado com o oxaloacetato no ciclo de Krebs, formando o citrato pela ação da enzima citrato sintase. Em seguida, o citrato é isomerado a isocitrato, que por sua vez é oxidado a α -cetoglutarato pela isocitrato desidrogenase, com a redução de NAD^+ e formação de CO_2 . A enzima α -cetoglutarato desidrogenase catalisa a transformação do α -cetoglutarato em succinil-CoA, reduzindo NAD^+ e formando CO_2 . O succinil-CoA é transformado em succinato pela ação da succinil-CoA sintetase, gerando ATP. Esse, por sua vez, é oxidado a fumarato pela succinato desidrogenase, reduzindo FAD a FADH_2 . O fumarato é então hidratado a malato com a ação da fumarase; e a malato desidrogenase oxida o malato a oxaloacetato, gerando NADH. Assim, o ciclo é fechado, ou seja, o oxaloacetato é regenerado no seu término, podendo oxidar o acetil-CoA novamente.

A equação geral do ciclo de Krebs mostra que o acetil-CoA é oxidado a duas moléculas de CO_2 , gerando 1 ATP, 3 NADPH e 1 FADH_2 . Para que o ciclo de Krebs ocorra, é imprescindível a existência do oxigênio atuando como aceptor de elétrons, oxidando o NADH; ao contrário da via EMP, em que o piruvato pode ser o aceptor, na ausência de oxigênio.



Assim, três metabólitos precursores são produzidos pelo ciclo de Krebs: oxaloacetato, α -cetoglutarato e succinil-CoA. Como a concentração desses intermediários no meio pode ser reduzida devido às reações de biossíntese, existem algumas reações – denominadas anapleróticas – que repõem essas quantidades no meio. Uma delas é a formação de oxaloacetato a partir de piruvato, catalisada pela piruvato carboxilase.

A glicose pode ser oxidada alternativamente pela via das pentoses, que tem a função de gerar dois metabólitos precursores (eritrose 4-fosfato e ribose 5-fosfato) e poder redutor (NADPH). O NADPH doa elétrons nas reações em que o substrato tem que ser reduzido.

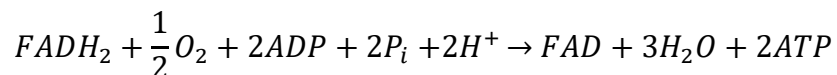
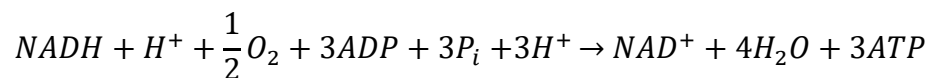
Na via das pentoses, a glicose 6-fosfato é oxidada duas vezes por enzimas específicas para NADP^+ , formando a ribulose 5-fosfato. Em seguida, a ribose 5-fosfato ou xilulose 5-fosfato são geradas a partir da ribulose 5-fosfato; moléculas essas que

são interconvertidas, formando açúcares fosforilados com número de carbonos variando entre 3 e 7.

As coenzimas NADH e FADH₂ que foram produzidas nas vias EMP e ciclo de Krebs são reoxidadas na cadeia de transporte de elétrons. Nesse processo, os seus prótons são liberados no meio e os elétrons são recebidos pelo oxigênio, sendo conduzidos até ele por uma série de transportadores de elétrons. Ao receber os elétrons, o oxigênio liga-se aos prótons, formando água.

Na cadeia de transporte de elétrons, estes vão sendo conduzidos do componente de menor potencial de oxirredução até o de maior potencial – sendo o último, o oxigênio. Tais transferências se dão com liberação de energia, que é utilizada para produzir ATP.

As equações seguintes mostram a oxidação do NADH e do FADH₂.



Dessa forma, 38 ATP são formados na oxidação completa da glicose; sendo que a via EMP gera 10 ATP (desses 10, 6 ATP são devido à oxidação do NADH), o ciclo de Krebs gera 22 ATP (20 dos 22 ATP se devem à oxidação de NADH e FADH₂); e a transformação de piruvato em acetil-CoA forma 6 ATP pela oxidação de NADH.

2.6 Modelagem fenomenológica não estruturada de bioprocessos

2.6.1 Formulação do modelo matemático

A modelagem matemática de processos biotecnológicos é uma ferramenta que visa representar as transformações que ocorrem com cada componente em um sistema, por meio de equações matemáticas que descrevem a conservação de massa desses componentes e as velocidades com as quais as transformações se processam (BORZANI et al., 2008; MARTÍNEZ, 2014). Em geral, os organismos em si e as suas interações com o ambiente são tão complexos que suas descrições matemáticas são uma aproximação do sistema como um todo, fornecendo uma representação fiel de apenas alguns dos fenômenos envolvidos no processo.

Os modelos matemáticos são utilizados na predição, simulação, monitoramento, controle e otimização de processos, sendo capaz de prever o seu comportamento em condições não testadas empiricamente. Uma vez elaborado, o modelo deve ser robusto o suficiente de modo a representar as transformações bioquímicas do sistema, exibindo um comportamento consistente com as observações experimentais; mas ter um grau de complexidade tal que o esforço computacional consiga admitir (BAILEY, 1998).

Os modelos matemáticos fenomenológicos não estruturados são constituídos pelo balanço de massa dos principais componentes do sistema (biomassa, substratos, produtos e subprodutos), e pelas expressões cinéticas que descrevem os fenômenos (BOGAERTS; CASTILLO; HANUS, 1999).

As equações de balanço de massa formuladas para cada variável de estado do processo em batelada alimentada têm a seguinte forma generalizada (Equação 1):

$$\frac{1}{V} \frac{d(V \cdot y)}{dt} = \Sigma r_{ger} - \Sigma r_{cons} + \frac{F_y}{V} \cdot y_e \quad (1)$$

Onde:

V – volume do biorreator (L);

y – concentração da variável de interesse no biorreator (g/L);

r_{ger} – velocidade de geração da variável de interesse (g/L.h);

r_{cons} – velocidade de consumo da variável de interesse (g/L.h);

F_y – vazão de alimentação da variável de interesse (L/h);

y_e – concentração da variável de interesse na alimentação (g/L);

A descrição dos fenômenos é realizada por meio de expressões cinéticas não lineares, sendo que várias delas estão disponíveis na literatura (BORZANI et al., 2008; BASTIN; DOCHAIN, 1990). Os principais fenômenos que influenciam a cinética de crescimento celular são: limitação por um único substrato, limitação por múltiplos substratos simultâneos, limitação e inibição pelo substrato e inibição por produtos metabólicos. Outras expressões são utilizadas para representar a cinética de formação dos bioprodutos. A seguir as principais expressões cinéticas serão descritas.

2.6.1.1 Limitação do crescimento celular por um único substrato

O modelo mais utilizado para representar a limitação do crescimento celular por um único substrato foi proposta por Monod (1942), que expressa a dependência da velocidade específica de crescimento pela concentração de substrato (Equação 2):

$$\mu_x = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (2)$$

Em que:

μ_x – velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});

μ_{max} – velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

S – concentração do substrato limitante no biorreator (g/L);

K_s – constante de saturação do substrato limitante (g/L).

2.6.1.2 Limitação do crescimento celular por múltiplos substratos simultâneos

Para múltiplos substratos limitantes com uso simultâneo pela célula, Megee et al. (1972) propuseram a seguinte expressão (Equação 3):

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot \frac{S_a}{K_a + S_a} \cdot \frac{S_b}{K_b + S_b} \quad (3)$$

Em que:

S_a – concentração do substrato limitante a no biorreator (g/L);

S_b – concentração do substrato limitante b no biorreator (g/L);

K_a – constante de saturação do substrato limitante a (g/L);

K_b – constante de saturação do substrato limitante b (g/L).

Tsao e Hanson (1975) notaram que a presença de certas substâncias no meio de cultura (que podem ser enzimas, aminoácidos, vitaminas e metabólitos ou nutrientes que podem existir no meio de cultura ou no interior da célula) leva à mudança na inclinação da fase exponencial da cultura. A partir da expressão de Monod (1942), propuseram um modelo cinético para representar os efeitos na velocidade de crescimento celular destes substratos que aumentam a velocidade

específica de crescimento; e daqueles substratos essenciais – que são aqueles sem os quais o crescimento microbiano não seria possível (Equação 4):

$$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_1 \cdot S_a}{K_a + S_a} + \frac{\mu_2 \cdot S_b}{K_b + S_b} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \quad (4)$$

Em que:

S – concentração dos substratos a e b que aumentam a velocidade específica de crescimento (g/L);

E – concentração dos substratos essenciais (g/L);

K – constante de saturação dos substratos a e b (g/L).

2.6.1.3 Limitação e inibição do crescimento celular por substrato

Para representar o fenômeno de inibição da velocidade de crescimento celular por altas concentrações de substrato, Andrews (1968) propôs uma modificação na Equação de Monod (Equação 5):

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot \frac{S_a}{K_s + S_a + \frac{S_a^2}{W}} \quad (5)$$

2.6.1.4 Inibição do crescimento celular por produto metabólico

Alguns autores propuseram expressões cinéticas para representar o efeito da inibição do crescimento celular pela alta concentração de produto metabólico. As expressões formuladas modificam os termos das velocidades específicas de crescimento celular, como as propostas por Zines e Rogers (1970) (Equação 6), a de Aiba (1968) (Equação 7), Aiba (1969) (Equação 8) e a de Maiorella (1984) (Equação 9); e podem ser usadas juntamente com a expressão de Monod para considerar também os efeitos de limitação do crescimento celular pela baixa concentração de substrato.

$$\mu_x = \mu_{max} \left(1 - \frac{K_p \cdot P}{\mu_{max}} \right) \quad (6)$$

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot e^{(-K_P \cdot P)} \quad (7)$$

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot \frac{K_P}{K_P + P} \quad (8)$$

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \quad (9)$$

2.6.2 Trabalhos de literatura

Está disponível na literatura uma ampla gama de modelos matemáticos descritos para processos biotecnológicos que operam em batelada ou batelada alimentada; seja para *Escherichia coli* recombinante ou não, seja para outros microrganismos. Os modelos propostos nesses trabalhos vão de encontro com as observações obtidas experimentalmente pelos autores. A seguir serão descritos os principais trabalhos que propuseram modelos fenomenológicos, principalmente para o cultivo de *Escherichia coli*, ilustrando como os fenômenos do processo foram representados.

2.6.2.1 Roeva e Tzonkov (2006): Modelagem do cultivo de *Escherichia coli* em batelada alimentada

Um problema comum no cultivo de *Escherichia coli* a partir da glicose como fonte de carbono é a formação de acetato devido ao *overflow* do metabolismo. Altas concentrações de acetato são indesejáveis, na medida em que inibem o crescimento celular e a formação de produtos associados ao crescimento. Em 2006, Roeva e Tzonkov propuseram três modelos não estruturados para o cultivo de *Escherichia coli* em *fed-batch* considerando a inibição do crescimento pelo acetato; e os compararam entre si usando i) a soma dos quadrados dos erros, ii) o critério de Fisher, iii) o critério de informação Akaike e iv) o critério do comprimento mínimo.

A variação da concentração de cada um dos componentes do sistema foi representada pelas seis equações diferenciais (Equações 10 a 15):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X - \frac{F}{V} \cdot X \quad (10)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_x \cdot X + \frac{F}{V} \cdot (S_0 - S) \quad (11)$$

$$\frac{dP_1}{dt} = \frac{1}{Y_{X,Gl}^A} \cdot \mu_X \cdot X - \frac{F}{V} \cdot P_1 \quad (12)$$

$$\frac{dO_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{O_2}^X} \cdot \mu_X \cdot X + k_{La}^O \cdot (O_2^* - O_2) - \frac{F}{V} \cdot O_2 \quad (13)$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{CO_2}^X} \cdot \mu_X \cdot X + k_{La}^{CO_2} \cdot (CO_2^* - CO_2) - \frac{F}{V} \cdot CO_2 \quad (14)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (15)$$

Os três modelos cinéticos de inibição do crescimento celular pelo acetato que foram comparados são aqueles propostos por: Cockshott e Bogle (1999) (Equação 16), Aiba (1969) (Equação 17), e Andrews (1968) (Equação 18):

$$\mu_X = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \left(1 - \frac{P_1}{K_P}\right) \quad (16)$$

$$\mu_X = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + P_1} \quad (17)$$

$$\mu_X = \mu_{max} \cdot \frac{P_1}{K_S + P_1 + \frac{P_1^2}{W}} \quad (18)$$

Para identificar o modelo cinético que melhor representava os dados experimentais, os três modelos foram analisados por critérios que consideram o menor desvio entre os dados experimentais e simulados do modelo, cuja estrutura seja a mais simples. Segundo os critérios analisados, o modelo proposto por Jerusalimsky foi o que melhor representou os dados experimentais.

2.6.2.2 Nancib, Mosrati e Boudrant (1993): Modelagem do cultivo de *Escherichia coli* em batelada

A produção de proteínas, enzimas e metabólitos heterólogos a partir de microrganismos recombinantes tornou-se possível com as técnicas de manipulação genética. Industrialmente, a modelagem matemática é um passo importante e necessário para o controle desses processos. Neste sentido, Nancib, Mosrati e Boudrant (1993) estudaram a modelagem não estruturada da produção da enzima

heteróloga gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase clonada em *Escherichia coli*, mesmo essa não tendo aplicação industrial.

O microrganismo foi cultivado em modo batelada, em meio complexo tendo a glicose como principal fonte de carbono. Assim, o efeito inibitório do crescimento pelo ácido acético formado no *overflow* do metabolismo foi considerado no modelo. A estabilidade plasmidial e o consumo do extrato de levedura presente no meio de cultura também foram incluídos no modelo (dados não mostrados neste trabalho).

Os experimentos realizados para caracterizar o comportamento microbiano e estudar a influência da concentração de ácido acético foram conduzidos em reatores de 2 L e eles permitiram visualizar que o processo pode ser dividido em duas etapas. A primeira delas é caracterizada pelo consumo da glicose, com a formação de biomassa, ácido acético e do produto de interesse. A segunda fase inicia-se após o esgotamento da glicose, e é caracterizada pela utilização do ácido acético como fonte de carbono para a formação de células e da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

O modelo proposto pelos autores é composto por equações cinéticas (Equações 23 e 24) e de balanço de massa de cada uma das duas fases (Equações 19 a 22). De forma geral, pode ser representado pelas equações:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{Gl} \cdot X + \mu_A \cdot X \quad (19)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/Gl}} \cdot \mu_{Gl} \cdot X - m_{sx} \cdot X \quad (20)$$

$$\frac{dP_1}{dt} = \frac{1}{Y_{A/A}} \cdot \mu_{Gl} \cdot X - g \cdot \left(\frac{1}{Y_{X/A}} \cdot \mu_A \cdot X + m_A \cdot X \right) \quad (21)$$

$$\frac{dGAP}{dt} = \mu_{Gl} \cdot X \cdot Y_{GAP/X,Gl} + \mu_A \cdot X \cdot Y_{GAP/X,A} \quad (22)$$

$$\mu_{Gl} = \mu_{max,Gl} \cdot \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P_1}{K_{A,Gl}} \right)^\pi} \quad (23)$$

$$\mu_A = \mu_{max,A} \cdot \frac{P_1}{K_s + P_1} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P_1}{K_{A,A}} \right)^k} \cdot g \quad (24)$$

Sendo:

X – concentração de células (g/L);

μ_{Gl} – velocidade específica de crescimento celular com glicose como fonte de carbono (h^{-1});

μ_A – velocidade específica de crescimento celular com ácido acético como fonte de carbono (h^{-1});

S_1 – concentração de glicose (g/L);

$Y_{X/Gl}$ – fator de conversão de glicose em células (g/g);

m_{sx} – coeficiente de manutenção celular com glicose como fonte de carbono;

P_1 – concentração de ácido acético (g/L);

$Y_{X/A}$ – fator de conversão de ácido acético em célula com glicose como fonte de carbono (g/g);

$Y_{X/A,A}$ – fator de conversão de ácido acético em célula com ácido acético como fonte de carbono (g/g);

m_A – coeficiente de manutenção celular com ácido acético como fonte de carbono (g/g.h);

g – termo de regulação;

$\frac{dGAP}{dt}$ – velocidade de produção da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (10^{-3} U/mL.h);

$Y_{GAP/X,Gl}$ – relação entre enzimas e células formadas na fase glicose (U/g);

$Y_{GAP/X,A}$ – relação entre enzimas e células formadas na fase ácido acético (U/g);

$\mu_{max,Gl}$ – velocidade específica de crescimento celular máxima com glicose como fonte de carbono (h^{-1});

$\mu_{max,A}$ – velocidade específica de crescimento celular máxima com ácido acético como fonte de carbono (h^{-1});

K_{Gl} – constante de afinidade para glicose (g/L);

K_A – constante de afinidade por acetato (g/L);

$K_{A,Gl}$ – constante de inibição do crescimento celular por acetato com glicose como fonte de carbono (g/L);

$K_{A,A}$ – constante de inibição do crescimento celular por acetato com ácido acético como fonte de carbono (g/L);

π – expoente do termo de inibição do crescimento celular por acetato com glicose como fonte de carbono;

k – expoente do termo de inibição do crescimento celular por acetato com ácido acético como fonte de carbono;

O interessante nesse modelo proposto é a regulação da fonte de carbono acetato por meio da introdução do termo “g”. Este termo nada mais é do que um indicativo da atuação do ácido acético como fonte de carbono. Os autores consideraram que o ácido acético somente atuaria como fonte de carbono na ausência de glicose. Assim, enquanto a concentração da glicose fosse maior que 0,1 g/L, o valor de g seria zero, e, portanto, todos os termos do modelo relacionados à fase acetato se anulariam. No momento em que a concentração de glicose se tornaria menor que 0,1 g/L, g assume o valor 1, indicando o consumo de ácido acético.

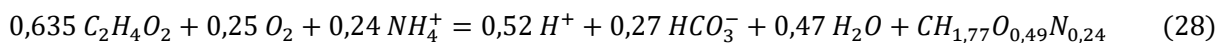
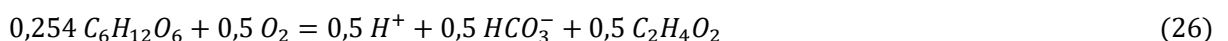
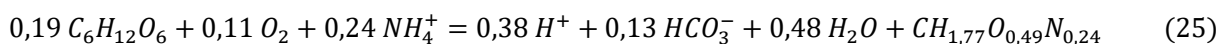
2.6.2.3 Guardia e Calvo (2011): Modelagem do cultivo de *Escherichia coli* em batelada

Guardia e Calvo (2001) também propuseram conjunto de expressões para o crescimento da *Escherichia coli* e formação de ácido acético pela célula no intuito de obter um modelo quantitativo capaz de prever diferentes condições operacionais, monitorar e controlar os bioprocessos.

O modelo cinético foi elaborado por meio de balanços estequiométricos do metabolismo da glicose e do ácido acético, e simplificado por meio da dependência entre as velocidades de consumo dos substratos e da formação dos produtos.

A formulação resultou em relações lineares, em que as velocidades dependentes (de consumo de glicose e ácido acético) foram estimadas a partir das velocidades independentes (de formação de células e de ácido acético).

Os estudos estequiométricos de metabolismo mostraram que o metabolismo da glicose pode ser simplificado nas reações de biossíntese celular, de acetato e na oxidação da glicose em dióxido de carbono, representadas pelas Equações 25, 26 e 27, respectivamente. O metabolismo do acetato pode ser representado pela síntese de biomassa e pela sua conversão em dióxido de carbono (Equações 28 e 29, respectivamente).



A partir da estequiometria das reações simplificadas do metabolismo, as velocidades de consumo de glicose e ácido acético foram representadas por meio das Equações 30 e 31, respectivamente:

$$r_s = -1,45 r_x^s - 0,93 r_a \quad (30)$$

$$r_a^a = -2,01 r_x \quad (31)$$

As expressões que compuseram o modelo cinético de formação de células e ácido acético foram:

$$\mu_{Gl} = \frac{\mu_{max,Gl} \cdot S}{K_S + S + \frac{P_1^2}{K}} \quad (32)$$

$$\mu_A = \frac{\mu_{max,A} \cdot P_1}{K_A + P_1} \cdot \left(1 - \frac{P_1}{A_{crit}}\right) \quad (33)$$

$$\mu_a^s = k_p \cdot S \cdot \left(\frac{\mu_{Gl}}{\mu_{max,Gl}}\right) \cdot \left(\frac{S - S^*}{S}\right) \quad (34)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{Gl} \cdot X + \mu_A \cdot X \cdot \left(1 - \frac{\mu_{Gl}}{\mu_{max,Gl}}\right) \quad (35)$$

$$\frac{dA}{dt} = \mu_a^s \cdot X + r_a^a \quad (36)$$

Em que:

μ_{Gl} – velocidade específica de crescimento celular em glicose (h^{-1});

$\mu_{max,Gl}$ – velocidade específica máxima de crescimento celular em glicose (h^{-1});

K – relação entre constantes de reações competitivas (g glicose L/g acetato²);

μ_A – velocidade específica de crescimento celular em acetato (h^{-1});

$\mu_{max,A}$ – velocidade específica máxima de crescimento celular em acetato (h^{-1});

A_{crit} – concentração crítica de acetato (g/L);

$\left(1 - \frac{\mu_{x,Gl}}{\mu_{max,Gl}}\right)$ – regulação do consumo de acetato;

μ_a^s – velocidade específica de formação de acetato em glicose (h^{-1});

k_p – constantes de reações competitivas (g acetato L/ g célula g glicose h);

$S - S^*$ – medida do excesso de glicose (g/L).

Os dados simulados por meio do modelo foram comparados com os resultados de ensaios realizados em biorreatores com 11 L de volume de trabalho, conduzidos em modelo batelada, com concentrações iniciais de glicose variando de 1 – 19 g/L.

2.6.2.4 Bonomi et al. (1993): Modelagem do cultivo de *Gluconobacter oxydans* em batelada

Os autores propuseram um modelo matemático não-estruturado para a conversão de D-sorbitol em L-sorbose pela bactéria *Gluconobacter oxydans*, importante etapa da produção de vitamina C. Para isso, realizaram 24 experimentos em batelada que permitiram observar os principais fenômenos envolvidos no processo: limitação do crescimento celular e da produção de sorbose pela concentração de sorbitol; inibição do crescimento celular e da formação de sorbose por altas concentrações de sorbitol; limitação do crescimento celular e da formação de sorbose pela concentração de oxigênio dissolvido; inibição do crescimento microbiano e da formação de sorbose pelo aumento da concentração de sorbose no meio de cultura; e a presença de uma fase de adaptação (fase *lag*) das células no biorreator.

O modelo não-estruturado foi composto pelo conjunto de equações:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X \quad (37)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X \quad (38)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS1}} \cdot \mu_x \cdot X - \frac{1}{Y_{PS1}} \cdot q_p \cdot X \quad (39)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS2}} \cdot \mu_x \cdot X \quad (40)$$

$$\frac{dO}{dt} = -\frac{1}{Y_{XO}} \cdot \mu \cdot X - \frac{1}{Y_{PO}} \cdot q_p \cdot X + k_L a \cdot (O_g - O) \quad (41)$$

$$\mu_x = \frac{\mu_{max} \cdot S_1}{K_{S1} + S_1 + \frac{S_1^2}{W}} \cdot \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \cdot \frac{O}{K_O + O} \cdot \exp(-K_P \cdot P) \quad (42)$$

$$q_p = A \cdot \mu_x + B \quad (43)$$

$$B = \frac{B_m \cdot S_1}{K_b \cdot S_1 + S_1} \cdot \frac{O}{K_{bo} + O} \quad (44)$$

Os parâmetros do modelo foram ajustados por meio do método de busca geométrico simplex de Nelder e Mead, conhecido como poliedros flexíveis. Obtiveram

dois conjuntos de parâmetros: para altas e baixas concentrações de sorbitol. Ambos os conjuntos mostram um bom ajuste visual com as corridas experimentais e foram submetidos à análise estatística Teste-F. Esta análise mostrou que o modelo matemático e o conjunto de parâmetros 1 representou os experimentos para um erro experimental de 16%.

2.6.2.5 Martínez (2014): Modelagem da produção de proteínas recombinantes em culturas de altas concentrações de *Escherichia coli*

Em sua tese de doutorado, Martínez (2014) propôs um modelo para a produção da proteína heteróloga ramnulose-1-fosfato aldolase (RhuA) a partir de cultivo *fed-batch* de *Escherichia coli* em altas concentrações. O modelo foi dividido em fase não induzida e induzida, sendo o primeiro composto pelo modelo cinético de crescimento celular e pelo balanço material das variáveis de estado: volume, concentração celular e concentração de substrato (glicose). Já o segundo foi subdividido em outros três: modelo de crescimento celular na fase de indução, de consumo de IPTG e da produção da proteína de interesse. O modelo da produção da proteína foi estendido para outras duas linhagens diferentes, contendo os sistemas de expressão para a produção de frutose-6-fosfato aldolase e ω -transaminase. Quando validado, ele se mostrou representar bem a produção das três proteínas.

O diferencial do trabalho de Martínez (2014) é a dependência indireta da velocidade específica de produção da proteína com a concentração de IPTG e com a concentração celular no momento de indução. Estudos mostram que essas duas variáveis afetam a concentração de proteína no final do processo; e vários trabalhos se utilizam da resposta de superfície do planejamento experimental para determinar os seus melhores valores para a execução dos ensaios laboratoriais.

Em seu modelo proposto de consumo de IPTG, a concentração de IPTG no meio intracelular ($IPTG_i$) é calculada partir da concentração celular e IPTG no meio extracelular ($IPTG_e$) no momento da indução e da taxa de transporte de IPTG no meio extracelular para o meio intracelular. A partir da concentração de $IPTG_i$ calcula-se a quantidade de moléculas de repressor ligadas ao IPTG (R_{IPTG}), e então, a velocidade específica de produção da proteína (q_p).

O modelo da fase não induzida é composto pelas Equações 45 a 50:

$$\frac{dV}{dt} = F_s + F_B \quad (45)$$

$$F_s = \frac{1}{S_f} \left(\frac{\mu_{fix}}{Y_{XS}} + m_{SX} \right) \cdot X \cdot V \quad (46)$$

$$F_B = K_B \frac{dX}{dt} \quad (47)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{X}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (48)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(F_s \cdot S_f - S \frac{dV}{dt})}{V} - \left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_{SX} \right) X \quad (49)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \exp\left(-\frac{S}{K_{iS}}\right) \quad (50)$$

Em que:

F_s – vazão de alimentação de glicose (L/h);

F_b – vazão de alimentação da fonte de nitrogênio (L/h);

S_f – concentração de glicose na solução de alimentação (g/L);

μ_{fix} – velocidade específica de crescimento fixa (0,2 h⁻¹).

As Equações 51 a 69 correspondem ao modelo da fase induzida, mais especificamente: Equações 51 a 57 – ao modelo de crescimento celular, Equações 58 a 62 – ao modelo de consumo de IPTG; e Equações 63 a 69 – à produção da proteína RhuA.

$$\frac{dV}{dt} = F_s + F_B \quad (51)$$

$$F_s = \frac{1}{S_f} \left(\frac{\mu_{fix}}{(Y_{XS})_{ap}} \right) \cdot X \cdot V \quad (52)$$

$$F_B = K_B \frac{dX}{dt} \quad (53)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu \cdot g_s) X - \frac{X}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (54)$$

$$\frac{dg_s}{dt} = - \frac{k_{s1} \left(\frac{[IPTG]_{e,0}}{X_{ind}} - 0,4 \right)}{k_{s2} + \left(\frac{[IPTG]_{e,0}}{X_{ind}} - 0,4 \right)} g_s, g_s(0) = 1 \quad (55)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(F_s \cdot S_f - S \frac{dV}{dt})}{V} - \left(\frac{\mu}{(Y_{XS})_{ap}} \right) X \quad (56)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \exp\left(-\frac{S}{K_{is}}\right) \quad (57)$$

$$\frac{dV_{cel}}{dt} = 0,0023 \frac{d(XV)}{dt} \quad (58)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = \frac{dV}{dt} - \frac{dV_{cel}}{dt} \quad (59)$$

$$\frac{d[IPTG]_e}{dt} = \frac{-r \cdot V_m - [IPTG]_e \frac{dV_m}{dt}}{V_m} \quad (60)$$

$$\frac{d[IPTG]_i}{dt} = \frac{r \cdot V_m - [IPTG]_i \frac{dV_{cel}}{dt}}{V_{cel}} \quad (61)$$

$$r = k_c a([IPTG]_e - [IPTG]_i) + K_1 X_{ind} \left(K'' [IPTG]_e + \frac{k' [IPTG]_e}{K_M + [IPTG]_i^2} \right) \exp(K_2 \mu_{fix}) \quad (62)$$

$$\frac{dM}{dt} = \alpha_{mRNA} N - \lambda_{mRNA} M \quad (63)$$

$$\frac{dR_{free}}{dt} = \frac{-1}{\tau_{R-O}} \left[R_{free} \left(\frac{[IPTG]_i / 1000}{K_{R-IPT}} \right)^n - R_{IPTG} \right] - \lambda_R R_{free} + \alpha_R M \quad (64)$$

$$\frac{dR_{IPTG}}{dt} = \frac{1}{\tau_{R-O}} \left[R_{free} \left(\frac{[IPTG]_i / 1000}{K_{R-IPT}} \right)^n - R_{IPTG} \right] - \lambda_R R_{IPTG} \quad (65)$$

$$\frac{dq_p}{dt} = -\frac{K_{P1} \left(\frac{dR_{IPTG}}{dt} \right)}{1 + K_{P2} P} q_p \quad (66)$$

$$q_{p0} = \left(33,8 + \frac{658,2 \cdot \frac{[IPTG]_{e,0}}{X_{ind}}}{41,48 + \frac{[IPTG]_{e,0}}{X_{ind}}} \right) \exp(3,73 \cdot \mu_{fix}) \quad (67)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p - \frac{P}{V} \frac{dV}{dt} \quad (68)$$

$$\frac{dU}{dt} = K_q \frac{dP}{dt} \quad (69)$$

Em que:

$(Y_{XS})_{ap}$ – conversão aparente de substrato em células (gcel/gglicose);

g_s – função descrevendo a carga metabólica;

$[IPTG]_{e,0}$ – concentração extracelular de IPTG na indução ($\mu\text{mol/L}$);

X_{ind} – concentração de células na indução (g/L);

V_{cel} – volume de células (L);

- V_m – volume do meio de cultura (L);
- r – velocidade de transporte de IPTG ($\mu\text{M}/\text{h}$);
- $[IPTG]_e$ – concentração extracelular de IPTG ($\mu\text{mol}/\text{L}$);
- $[IPTG]_i$ – concentração intracelular de IPTG ($\mu\text{mol}/\text{L}$);
- M – moléculas de mRNA de *lacI* (moléculas/célula);
- α_{mRNA} – velocidade de transcrição de *lacI* (h^{-1});
- N – número de cópias de plasmídeo (plasmídeo/célula);
- λ_{mRNA} – velocidade de degradação de mRNA (h^{-1});
- R_{free} – número de moléculas de repressor livre (molécula/célula);
- τ_{R-O} – constante do tempo para a ligação entre repressor e IPTG (h^{-1});
- K_{R-IPTG} – constante de equilíbrio para o repressor e IPTG (mM);
- R_{IPTG} – número de moléculas de repressor ligadas ao IPTG (molécula /célula);
- λ_R – velocidade de degradação do *lacI* (h^{-1});
- α_R – velocidade de transcrição do *lacI* (h^{-1});
- q_p – velocidade específica de produção da proteína (h^{-1});
- q_{p0} – velocidade específica inicial de produção da proteína (h^{-1}).

2.6.3 Ajuste de Parâmetros e Validação do Modelo Proposto

Os parâmetros do modelo podem ser estimados por diversas maneiras:

- i) Relações estequiométricas a partir de dados experimentais: quando da determinação de fatores de conversão de substrato em células ou em produto;
- ii) Ajuste por regressão linear dos dados experimentais às equações cinéticas linearizadas: para obtenção dos parâmetros cinéticos, tais como velocidade específica máxima de crescimento celular, constantes de limitação e inibição por substratos e produtos;
- iii) Valores encontrados em literatura.

Uma vez proposto o modelo matemático e estimados preliminarmente os seus parâmetros, deve ser realizado o ajuste do modelo proposto aos dados experimentais. O ajuste consiste em determinar o conjunto de parâmetros tal que a diferença entre os dados simulados e experimentais seja mínima. Tal ajuste pode ser determinado por meio de regressões não lineares; no entanto, este cálculo pode levar a diferentes mínimos locais da função objetivo, dificultando a convergência para um mínimo global.

Com o modelo matemático ajustado, este deve ser validado estatisticamente, mostrando que ele representa o processo experimental. O Teste-F é uma análise estatística na qual é obtido o erro experimental, que engloba erros analíticos e de amostragem, a heterogeneidade no biorreator e a falta de reprodutibilidade dos processos biotecnológicos. Pelo Teste-F, o modelo matemático proposto é válido quando a variância do erro do modelo for menor que a variância do erro experimental.

2.7 Otimização de bioprocessos

O problema de otimização matemática de processos consiste em minimizar ou maximizar uma função objetivo, respeitando as restrições de igualdade e/ou desigualdade, as quais podem ser lineares ou não lineares. Nos bioprocessos, as restrições de igualdade são equações diferenciais ordinárias fortemente não lineares, cujo conjunto representa o modelo fenomenológico não-estruturado do processo (PICCOLI, 2000). A determinação do vetor de variáveis de decisão (também denominadas variáveis controle) desse problema é um tipo de otimização referido como problema de controle ótimo.

O problema de controle ótimo pode ser representado como:

$$u^* = f(x(t), t) \quad (70)$$

Onde:

u^* – controle ótimo;

$x(t)$ – vetor de variáveis de estado.

Nesse caso, o controle é designado como malha fechada, na qual existe uma relação entre o vetor de variáveis controle e os estados do sistema a cada instante. Nos casos em que a complexidade do sistema é grande tal que não permita determinar o vetor das variáveis controle diretamente dos estados do sistema ao longo do tempo, o controle é designado como malha aberta. Assim, é determinada uma trajetória de controle que leva o sistema de um estado inicial ao estado final, respeitando as restrições impostas (MENEGALDO, 2001).

Metodologias específicas estão disponíveis para a resolução de problemas de controle ótimo em malha aberta e fechada. Neste trabalho serão discutidas algumas mais utilizadas para o controle em malha aberta, que é o problema aqui encontrado.

Os métodos de controle em malha aberta são classificados em indiretos e diretos. Os indiretos baseiam-se na minimização indireta da função objetivo (MENEGALDO, 2001) (Equações 71 a 75):

$$G_0(u, x(t)) = \varphi_0(x(t_f)) + \int_t^{t_f} g_0(t, x(t), u(t)) dt \quad (71)$$

Sujeita a:

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(t, x(t), u(t)) \quad (72)$$

$$x(0) = x^0 \quad (73)$$

$$h(x(t_f)) = 0 \quad (74)$$

$$u^{min} \leq u(t) \leq u^{max} \quad (75)$$

Onde

Eq. 72 – restrições de igualdade não lineares, ou seja, as equações diferenciais ordinárias do modelo fenomenológico não-estruturado;

Eq. 73 e 74 – restrições de contorno;

Eq. 75 – restrição de desigualdade nas variáveis de controle, ou seja, são os limites mínimo e máximo das variáveis de decisão,

$u(t)$ – vetor de variáveis de controle.

Dois condições são necessárias para a otimalidade: i) o gradiente do Hamiltoniano do sistema (Equação 76) em relação à variável de controle u deve ser nulo (Equação 77); ii) o gradiente do Hamiltoniano em função do vetor das variáveis de estado deve ser igual ao negativo da derivada dos multiplicadores de Lagrange (Equação 78); seguindo a restrição imposta pelas condições finais (Equação 79).

$$H(t, x(t), u(t), \lambda(t)) = g_0 + \lambda^T f \quad (76)$$

$$\nabla_u H = 0 \quad (77)$$

$$\dot{\lambda}^T = -\nabla_x H \quad (78)$$

$$\lambda(t_f)^T = \frac{\partial \varphi(x(t_f))}{\partial x(t_f)} \quad (79)$$

Assim, o problema resume-se em resolver um sistema de equações diferenciais com condições de contorno em dois pontos, formado pelo cálculo de $u(t, \lambda, x)$ –

substituindo a Equação 77 na Equação 72 –, e suas restrições (Equações 73 e 74); pela condição de otimalidade (Equação 78) e suas restrições (Equação 79).

Os métodos de controle em malha aberta diretos clássicos são baseados no método de Newton. O algoritmo de ponto interior é um destes métodos, que resolve uma sequência de problema de minimização aproximado, por meio da introdução das variáveis de folga s . Dessa forma, as desigualdades (representadas pela Equação 82) do problema original (conjunto formado pelas Equações 80, 81 e 82) são transformadas em igualdade (representadas pela Equação 85) no problema aproximado (conjunto formado pelas Equações 83, 84 e 85).

$$\min f(x) \tag{80}$$

sujeita a

$$h(x) = 0 \tag{81}$$

$$g(x) \leq 0 \tag{82}$$

$$\min f(x) - \mu \sum_i \ln(s_i) \tag{83}$$

sujeita a

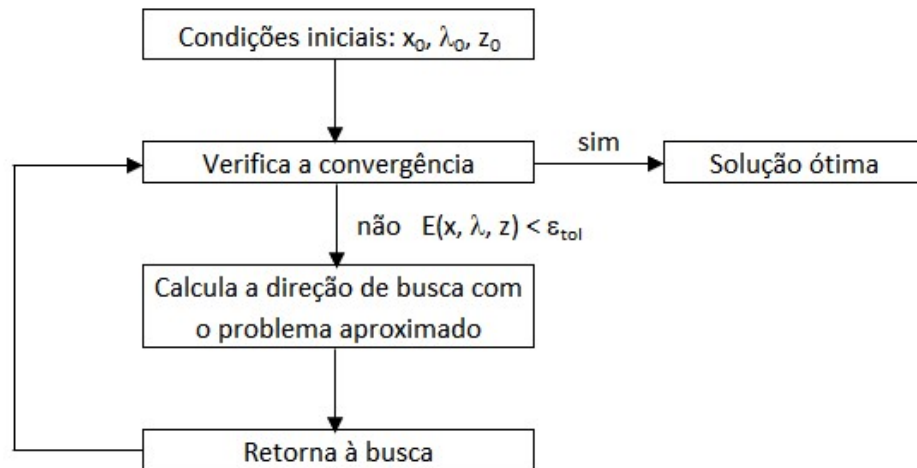
$$h(x) = 0 \tag{84}$$

$$g(x) + s = 0 \tag{85}$$

Onde μ é o multiplicador de Kuhn-Tucker, cujo valor é positivo.

O termo logaritmo adicionado na Equação 83 é designado como função barreira, que delimitará o espaço da busca pelo ponto ótimo. Então, à medida que μ diminui para o valor próximo de zero, o mínimo da função aproximada (Equação 83) se aproxima do mínimo da função original (Equação 80).

O método de ponto interior tem a visão geral descrita como na Figura 4:

Figura 4 – Visão geral do método de ponto interior.

$$z_0 = \frac{\mu}{x_0} \quad (86)$$

$$\begin{bmatrix} I & \nabla g(x_0) \\ \nabla g(x_0)^T & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} w \\ \lambda_0 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \nabla f(x_0) - z_{L,0} - z_{U,0} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (87)$$

$$\Sigma_k = X_k^{-1} Z_k \quad (88)$$

$$\begin{bmatrix} W_k + \Sigma_k & \nabla g(x_k) \\ \nabla g(x_k)^T & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} d_k^x \\ d_k^\lambda \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \nabla f(x_k) + \nabla g(x_k) \lambda_k \\ g(x_k) \end{bmatrix} \quad (89)$$

$$d_k^z = \mu X_k^{-1} e - z_k - \Sigma_k d_k^x \quad (90)$$

$$x_{k+1} = x_k + a_k d_k^x \quad (91)$$

$$\lambda_{k+1} = \lambda_k + a_k d_k^\lambda \quad (92)$$

$$z_{k+1} = z_k + a_k d_k^z \quad (93)$$

Dessa forma, dada a estimativa inicial para as variáveis de decisão, os valores iniciais dos multiplicadores de Lagrange e z são calculados pelas Equações 87 e 86, respectivamente. Em seguida, a convergência é verificada por meio da tolerância e, em caso positivo, a solução ótima foi encontrada. Em caso negativo, a direção da busca é calculada com o problema aproximado por meio das Equações 88, 89 e 90. Com isso, é possível calcular o ponto subsequente à estimativa inicial (Equações 91, 92 e 93) e verificar novamente a convergência. O algoritmo permanece iterativo até a sua convergência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 O microrganismo e sua preservação

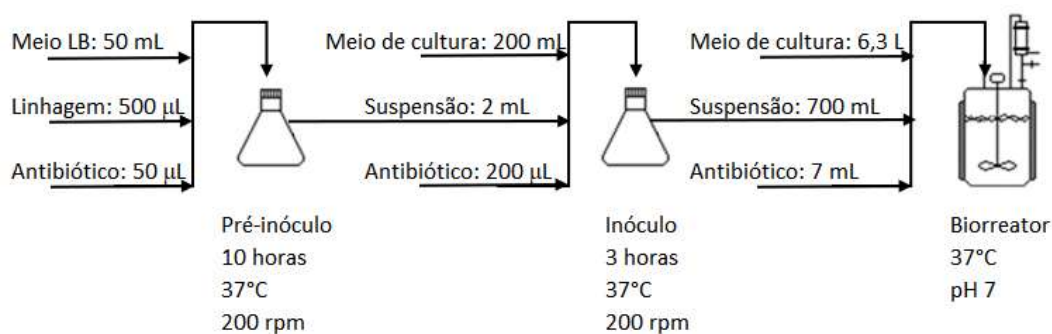
O microrganismo utilizado neste trabalho foi a *Escherichia coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pJexpress411 – que está sob controle do promotor T7 – e o inserto Amblyomin-X, transformada pela empresa DNA2.0 e posteriormente fornecida pelo Instituto Butantan (IB). Essa linhagem confere resistência à canamicina e a proteína de interesse é expressa por meio do indutor isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).

O microrganismo foi preservado em um banco de trabalho mantido em *freezer* -80°C com solução de glicerol 20% (v/v) após ser cultivado em meio Lysogenic Broth (LB) estéril com antibiótico.

3.2 Visão geral dos ensaios

O processo de produção da proteína recombinante deste trabalho pode ser visto de uma forma geral pela Figura 5, em que estão representadas as etapas de pré-inóculo (reativação), inóculo e de produção da proteína em biorreator.

Figura 5 – Visão geral dos ensaios.



3.3 Composição e preparação dos cultivos

3.3.1 Preparação do pré-inóculo

Na preparação do pré-inóculo, foi coletada uma alíquota de 500 μ L do microrganismo preservado no banco de trabalho e inoculada imediatamente após o seu descongelamento para um frasco Erlenmeyer (erlen) de 250 mL contendo 50 mL de meio LB (Tabela 1) e 50 μ L de solução de antibiótico na concentração 0,05 g/mL. Em seguida, o frasco foi incubado em agitador rotativo orbital por 10 h em 200 rpm e 37°C.

Tabela 1 – Composição do meio Lysogenic Broth

Item	Componentes	Fórmula	Quantidade (g/L)
1	Triptona	Complexa	10,0
2	Extrato de Levedura	Complexa	5,0
3	Cloreto de Sódio	NaCl	10,0

3.3.2 Preparação do inóculo

No preparo do inóculo, 2 mL do pré-inóculo foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo 0,2 mL de solução de antibiótico e 200 mL de meio de cultura complexo cuja composição foi baseada no trabalho de Gombert e Kilikian (1997) (Tabela 2). Esses frascos foram então incubados em uma câmara com agitação orbital a 200 rpm e 37°C por 3 horas.

Tabela 2 – Composição do meio de inóculo.

Item	Componentes	Fórmula	Quantidade	Unidade
1	Glicose	$C_6H_{12}O_6$	10	g/L
2	Fosfato Monobásico de Potássio	KH_2PO_4	13	g/L
3	Fosfato Dibásico de Potássio	K_2HPO_4	10	g/L
4	Fosfato Dibásico de Amônio	$(NH_4)_2HPO_4$	3	g/L
5	Fosfato Monobásico de Sódio Hidratado	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	4,6	g/L
6	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,46	g/L
7	Extrato de Levedura	Complexa	1	g/L
8	Solução de Micronutrientes	Tabela 3	3	mL/L

Tabela 3 – Composição da solução de micronutrientes.

Item	Componentes	Fórmula	Quantidade	Unidade
1	Cloreto de Ferro (III) Monohidratado ou Cloreto de Ferro (III) Hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	27 ou 41,14	g/L
2	Cloreto de Zinco ou Sulfato de Zinco Heptahidratado	ZnCl_2 ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,3 ou 2,73	g/L
3	Cloreto de Cobalto Hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0	g/L
4	Cloreto de Cálcio Dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24,6	g/L
5	Cloreto de Cobre (II) Dihidratado	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,27	g/L
6	Ácido Bórico	H_3BO_3	0,5	g/L
7	Sulfato de Alumínio Hidratado	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	1,6	g/L
8	Sulfato de Manganês Hidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,8	g/L
9	Molibdato de Sódio Dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0	g/L
10	Ácido Clorídrico 37%	HCl 37%	100,0	mL/L

3.3.3 Condições do cultivo em biorreator

Os ensaios foram realizados no biorreator BIOSTAT® Cplus da Sartorius, com capacidade de 15 L. Este biorreator representado pela Figura 6 é equipado com agitação e aeração mecânicas e controles automáticos de temperatura e pH. Uma alíquota de 700 mL do inóculo preparado como descrito anteriormente no item 3.3.2. foi adicionada no biorreator contendo 0,1% (v/v) de antibiótico e 7 L de meio de cultura complexo também baseado no trabalho de Gombert e Kilikian (1997), cuja composição está descrita na Tabela 4. O cultivo foi mantido a 37°C, com pH 6,8 controlado por meio de alimentação de solução de NH_4OH 60% em volume. A porcentagem de oxigênio dissolvido foi mantida acima de 20% da saturação do ar por ajuste manual da agitação e aeração. A agitação foi ajustada entre 400 e 1200 rpm, e a aeração entre 3,5 e 10 L/min. Antiespumante polietilenoglicol (Fluent Cane 114 – Dow Química) foi adicionado quando necessário.

As variáveis do processo tais como temperatura, pH, pO_2 , volume de base adicionada, aeração e agitação foram registradas e monitoradas ao longo do tempo pelo *software* Multi Fermenter Computer System (MFCS). A saída de gases do biorreator permaneceu conectada a um analisador de gases da marca Hartmann &

Braun, que mediu em tempo real a fração volumétrica de oxigênio e gás carbônico nesta linha.

Figura 6 – Modelo de biorreator BIOSTAT Cplus utilizado nos ensaios.



Fonte: <https://www.sartorius.com/sartorius/en/EUR/products/bioreactors-fermentors/in-situ-sterilizable-pilot-production/biostat-cplus>

Tabela 4 – Composição do meio de cultura nos biorreatores.

Item	Componentes	Fórmula	Quantidade	Unidade
1	Glicose	$C_6H_{12}O_6$	3	g/L
2	Fosfato Monobásico de Potássio	KH_2PO_4	13	g/L
3	Fosfato Dibásico de Potássio	K_2HPO_4	10	g/L
4	Fosfato Dibásico de Amônio	$(NH_4)_2HPO_4$	3	g/L
5	Fosfato Monobásico de Sódio Hidratado	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	4,6	g/L
6	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2	g/L
7	Extrato de Levedura	Complexa	1	g/L
8	Solução de Micronutrientes	Tabela 3	3	mL/L

O cultivo nos biorreatores foi dividido em fases. Primeiramente, as células se multiplicaram em modo batelada até o consumo total da glicose (fase I). Em seguida, o processo foi conduzido em modo batelada alimentada (fase II) com a adição de uma solução de alimentação – composta por 600 g/L de glicose, 21,4 g/L de sulfato de magnésio e 7 mL de antiespumante – para concentrações limitantes, seguindo um perfil exponencial calculado pela Equação 94:

$$F = \frac{X_0 \cdot V_0 \cdot \mu \cdot \exp(\mu \cdot t)}{S_0 \cdot Y_{x/s}} \quad (94)$$

Em que:

X_0 – a concentração inicial de células (g/L);

V_0 – o volume inicial (L);

μ – a velocidade específica de crescimento prefixada (h^{-1});

S_0 – a concentração de substrato na solução de alimentação (g/L);

$Y_{x/s}$ – a conversão de substrato em células (g/g).

Na fase II, os valores dos parâmetros prefixados foram: $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$; $S_0 = 600 \text{ g/L}$; $Y_{x/s} = 0,35 \text{ g/g}$. No momento em que a concentração de células no meio de cultivo atingiu 30 g/L , iniciou-se a produção da proteína de interesse (fase III), por meio da indução do vetor recombinante com uma solução de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) que resultasse em $1,05 \text{ mM}$ no biorreator. A produção foi mantida à temperatura de 32°C e teve duração de 4 h , baseado em testes preliminares (dados não mostrados).

3.4 Métodos analíticos

Ao longo dos ensaios, foram coletadas amostras no intervalo de duas horas nas fases I e II, e no intervalo de uma hora na fase III; em que foram analisadas: a concentração celular por meio de densidade óptica e massa seca, pH e as concentrações de glicose e ácido acético por HPLC. Os próximos itens descrevem essas análises detalhadamente.

3.4.1 Medida de densidade óptica

A densidade óptica da amostra foi medida em um espectrofotômetro U-2000 (Hitachi Co.) no comprimento de onda de 600 nm , sendo que a faixa de leitura confiável do equipamento é de $0,2$ a $0,8$.

3.4.2 Determinação da concentração celular por massa seca

A concentração de células no biorreator foi determinada por massa seca, utilizando um aparelho de filtração com membrana de porosidade de 0,45 μm da marca Millipore. Nos momentos em que a concentração celular tornava-se difícil de ser filtrada, a amostra era centrifugada a 10.000 rpm e 4°C por 10 min em uma centrífuga Hitachi Himac CR22GII. O sobrenadante foi coletado para as análises de concentração de nitrogênio amoniacal, de glicose e de ácido acético no biorreator. A massa celular na membrana foi armazenada em estufa na temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 4 horas, transferida para um dessecador até a temperatura ambiente, sendo pesada em seguida. O valor da umidade da membrana foi levado em consideração no cálculo da concentração de células, em g/L, dado pela Equação 95:

$$X = \frac{MC - MM + MU}{VA} \cdot 1000 \quad (95)$$

Em que:

MC – massa do conjunto células e membrana (g);

MM – massa da membrana (g);

MU – massa da umidade da membrana (g);

VA – volume de amostra pipetada (mL).

3.4.3 Determinação da concentração de glicose e ácido acético

Para a determinação da concentração de glicose e ácido acético, primeiramente parte do sobrenadante coletado na filtração da amostra teve que ser desproteínizado da seguinte maneira: 800 μL de água deionizada foi adicionada em um microtubo de 2 mL juntamente com 200 μL de solução de ácido tricloroacético e 1 mL do sobrenadante coletado. A amostra no microtubo foi centrifugada em uma centrífuga Hitachi Himac CR22GII a 10.000 rpm, na temperatura de 4°C por 10 min. O sobrenadante centrifugado por distribuído em dois tubos, os quais foram injetados em dois cromatógrafos de fase líquida (HPLC), sendo um para a determinação da concentração da glicose, e outro, para a determinação da concentração de ácidos.

O método de análise de açúcares é composto pelo sistema HPLC Waters, com bomba W515, amostrador automático W2707, detector de índice de refração W2410 e coluna de açúcares Shodex® SC 1011; 0,187 g/L de EDTA-Ca foi usado como fase móvel, na vazão de 0,6 mL/min. As temperaturas da coluna e do detector foram de 60°C e 45°C, respectivamente. O sistema de ácidos é composto por HPLC Waters com bomba W515, amostrador automático W2707 e detector de índice de refração W2414, com emprego da coluna para ácidos Shodex® SH 1011; 0,01 N de H₂SO₄ foi usado como fase móvel na vazão de 1 mL/min. As temperaturas da coluna e do detector foram de 60°C e 45°C, respectivamente. A calibração tanto do aparelho para a glicose como a do aparelho para o ácido acético foi realizada utilizando uma solução de glicose ou ácido acético com diluições na faixa de 0,1 a 10,0 g/L.

3.4.4 Determinação da quantidade de proteína recombinante

A concentração da proteína de interesse foi determinada pelo método de Bradford (1976), após a avaliação do resultado do gel de eletroforese: quando o gel mostrou a presença somente da proteína heteróloga, então se pôde afirmar que o resultado do método de Bradford correspondia à concentração da Amblyomin-X na amostra.

Da coleta do microrganismo recombinante – contendo os agregados da proteína – que atingiu altas concentrações celulares no cultivo em biorreator até a determinação da concentração final de Amblyomin-X no ensaio, foram seguidas as seguintes etapas: i) extração da proteína com solução de BugBuster®; ii) análise das proteínas presentes na amostra resultante da extração por meio do gel de eletroforese; e iii) uso do procedimento de Bradford para encontrar a concentração da proteína produzida no ensaio.

3.4.5 Procedimento de extração da proteína heteróloga

Primeiramente a amostra de células coletada ao final do cultivo em biorreator foi ressuspensa em 300 µL de solução contendo 98% (v/v) de BugBuster®, 1% (v/v) de fenilmetilsulfonil e 1% (v/v) de fluoreto e lisozima. Após 20 min, a amostra foi centrifugada por 20 min a 5000 g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de BugBuster® puro e em 300 µL de BugBuster® diluído em água deionizada na proporção 1:10 em volume. A amostra foi

então centrifugada por 15 min a 5000 g, o sobrenadante foi descartado, e novamente foi ressuspensa em 300 µL de BugBuster® diluído. Esta etapa foi realizada três vezes.

Em seguida a amostra foi ressuspensa em 1 mL de solução de ácido deoxicólico na concentração de 1g/L e centrifugada por 15 min a 5000 g. Após o descarte do sobrenadante, foi realizada por três vezes a lavagem com 1 mL de solução tampão (pH 8,5) contendo Tris HCl (50 mM) e EDTA-Na₂ (1mM).

Por fim, a amostra foi ressuspensa em 300 µL de solução tampão (pH 8,5) contendo Tris HCl (20 mM), ureia (7 M), DTT (ditiotretol) e EDTA-Na₂ (1mM); e foi adicionado 600 µL de solução tampão (pH 8,5) contendo Tris HCl (50 mM) e EDTA-Na₂ (1mM).

3.4.6 Procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida

Na preparação do gel de eletroforese (SDS-PAGE), foram utilizadas as soluções e tampões do kit Bio-Rad, stain-free, de poliacrilamida 12%, com as proporções e procedimentos descritos pelo kit. As amostras contendo as proteínas extraídas do microrganismo recombinante na etapa anterior (denominadas A) foram aplicadas nos poços do gel de poliacrilamida, seguindo a ordem:

- 1º poço: amostra padrão de Amblyomin-X purificado;
- 2º poço: amostra A no tempo 1 h antes da indução do vetor recombinante;
- 3º poço: amostra A no tempo 1 h após a indução do vetor recombinante;
- 4º poço: amostra A no tempo 2 h após a indução do vetor recombinante;
- 5º poço: amostra A no tempo 3 h após a indução do vetor recombinante;
- 6º poço: amostra A no tempo 4 h após a indução do vetor recombinante.

A eletroforese ocorreu a 80 mV nos primeiros 20 min, e a 200 mV no restante do procedimento. Ao final da separação das proteínas, o gel foi analisado por imagem, com o equipamento Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

3.5 Estimativa inicial dos parâmetros do modelo não-estruturado

3.5.1 Fator de conversão de glicose em célula ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão é calculado como:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (72)$$

Onde:

ΔX – células geradas (gDCW);

ΔS – glicose consumida (g).

Esse fator de conversão foi calculado pela regressão linear de um gráfico plotado com massa de célula formada *versus* massa de glicose consumida.

3.5.2 Constante de proporcionalidade entre crescimento celular e alimentação de base (kb)

O valor da constante de proporcionalidade foi estimado pelo ajuste entre as curvas de crescimento celular (concentração de células *versus* tempo) e da quantidade da base NH_4OH alimentada.

3.5.3 Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$)

A velocidade específica máxima de crescimento foi determinada durante a fase de batelada, já que durante a fase de batelada alimentada a velocidade específica de crescimento foi limitada em um valor menor do que na fase de batelada, a fim de evitar a formação de produtos indesejados, tal como o ácido acético.

A velocidade específica de crescimento celular é dada por (Equação 96):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (96)$$

Para um determinado período da etapa de batelada, onde não se tem limitação de substrato e o crescimento é balanceado (fase exponencial de crescimento), temos (Equação 97 a 99):

$$\int_0^t \mu \cdot dt = \int_{X_0}^X \frac{1}{X} \cdot dX \quad (97)$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu \cdot t \quad (98)$$

$$\ln X = \mu \cdot t + \ln X_0 \quad (99)$$

Assim, podemos obter a velocidade específica de crescimento, que é máxima para a fase de crescimento exponencial da batelada, plotando-se um gráfico de $\ln X$

versus tempo, em que o $\mu_{\text{máx}}$ será o coeficiente angular do ajuste linear dos pontos experimentais.

3.5.4 Constante de saturação (Ks)

A constante de saturação para o substrato glicose foi calculada a partir de um gráfico de μ *versus* concentração de glicose. O valor de Ks será o valor da concentração de glicose no ponto em que a velocidade específica de crescimento é igual à metade do seu valor máximo.

3.5.5 Coeficiente específico de manutenção celular m_{sx}

O coeficiente específico de manutenção foi estimado segundo valor da literatura. De acordo com Varma (2013), sob condições aeróbias observa-se valores de m_{sx} entre 0,055 e 0,07 g/gDCW.h; então considerou-se o valor de 0,06 g/gDCW.h para esse parâmetro.

3.5.6 Velocidade específica de respiração qO_2

O valor de qO_2 foi calculado por meio de um ajuste linear do gráfico plotado entre a velocidade de respiração celular - OUR e a concentração de células, sendo que o cálculo de OUR foi realizado pelo balanço de oxigênio no biorreator ao longo de todo o ensaio.

$$qO_2 = \frac{OUR}{X} \quad (100)$$

3.5.7 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio no início do ensaio – $k_{L\alpha\text{inicial}}$

A estimativa do $k_{L\alpha\text{inicial}}$ foi calculada pelo método de Cooper et al, que correlaciona o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio com a potência do motor para fornecer a agitação ao meio de cultura e com a aeração. Assim (Equação 101):

$$k_{L\alpha} = A \cdot \left(\frac{P_g}{V}\right)^\alpha \cdot (V_s)^\beta \quad (101)$$

Onde A , α e β são constantes, V_s é a velocidade superficial do gás de entrada (m/h) e P_g a potência do motor (HP).

3.5.8 Velocidade específica de crescimento limitado μ_{lim}

A velocidade específica de crescimento limitado foi calculada de forma semelhante à velocidade específica de crescimento máxima: plotando-se um gráfico de $\ln X$ versus tempo e determinando o μ_{lim} pelo coeficiente angular da regressão linear dos dados experimentais. Mas nesse caso, o cálculo desse parâmetro foi realizado na fase de batelada alimentada.

3.6 Validação estatística do modelo fenomenológico

O Teste F é uma análise estatística que, por ser baseada no cálculo do erro experimental de repetições de ensaios, garante que o modelo aprovado por essa análise represente o conjunto de dados experimentais.

A variância do erro do modelo foi calculada como (SCHMIDELL et al., 2005):

$$s_{sim}^2 = \frac{\sum_{i=1}^v \sum_{j=1}^n (y_{simij} - y_{expij})^2}{(n \cdot v)_{sim} - p} \quad (102)$$

Em que:

S_{sim}^2 – estimativa da variância do erro do modelo;

n – número de pontos de cada variável;

v – número de variáveis;

p – número de parâmetros do modelo;

y_{simij} – valor da variável calculada pelo modelo;

y_{expij} – valor experimental da variável.

E a variância do erro experimental é dada por:

$$s_{exp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^v \sum_{j=1}^n (y_{expij} - \bar{y}_{ij})^2}{(n \cdot v)_{exp} - v} \quad (103)$$

Onde:

s^2_{exp} – estimativa da variância do erro experimental;

y_{mij} – média da variável.

Calculando a relação entre as variâncias dos erros, temos:

$$F = \frac{s_{sim}^2}{s_{exp}^2} \quad (104)$$

Para que o modelo represente adequadamente os dados experimentais ajustados, é necessário que F seja menor que 1, ou seja, a variância do erro do modelo deve ser menor que a variância do erro experimental.

3.7 Balanço gasoso – cálculo do *Oxygen Uptake Rate* (OUR) e do carbono *Carbon Evolution Rate* (CER)

As velocidades de consumo de oxigênio pela célula (OUR) e de geração de gás carbônico (CER) foram calculadas ao longo dos ensaios por meio do balanço de massa dessas espécies, já que a proporção de saída desses gases do biorreator era analisada em tempo real. Assim, a OUR (em mmol/L.h) foi calculada como:

$$OUR = \left[\left(\frac{F_{ar} \cdot [O_2]_e}{V} \right) - \left(\frac{[N_2]_e}{[N_2]_s} \cdot \frac{F_{ar} \cdot [O_2]_s}{V} \right) \right] \cdot Ki \quad (105)$$

Onde:

F_{ar} – vazão de ar no biorreator (L/min);

$[O_2]_e$ – Porcentagem de oxigênio na entrada do biorreator (% vol);

$[O_2]_s$ – Porcentagem de oxigênio na saída do biorreator (% vol);

$[N_2]_e$ – Porcentagem de nitrogênio na entrada do biorreator (% vol);

$[N_2]_s$ – Porcentagem de nitrogênio na saída do biorreator (% vol);

Ki – constante de conversão de unidades, com valor de 26,44 min.mmol/L.h.

Do mesmo modo, o CER foi calculado como:

$$CER = \left[\left(\frac{F_{ar} \cdot [CO_2]_e}{V} \right) - \left(\frac{[N_2]_e}{[N_2]_s} \cdot \frac{F_{ar} \cdot [CO_2]_s}{V} \right) \right] \cdot Ki \quad (106)$$

Onde:

$[CO_2]_e$ – Porcentagem de gás carbônico na corrente de entrada de ar do biorreator (% vol);

$[CO_2]_s$ – Porcentagem de gás carbônico na corrente de saída de ar do biorreator (% vol);

3.8 Determinação das velocidades específicas de consumo/produção dos metabólitos externos

A determinação das velocidades específicas de consumo de produção dos metabólitos externos em mmol/gDCW.h se deu por meio de uma regressão linear entre o metabólito de interesse a massa de células produzida. Assim foram calculados:

- A velocidade específica de formação de célula (mmol/gDCW.h): é dada pelo coeficiente angular do ajuste do gráfico do logaritmo neperiano da massa de células formada (em gramas) *versus* o tempo (em horas). Em seguida, foi realizada a conversão de gramas de célula para mmol de célula considerando massa específica da célula de 100 g/mol.
- A velocidade específica de consumo de glicose (mmol/gDCW.h): é dada pela multiplicação entre coeficiente angular do ajuste do gráfico de glicose (em mmol) *versus* a massa de células formada (em gramas) e o valor da velocidade específica de células formadas (em h⁻¹).
- A velocidade específica de consumo de oxigênio (qO_2 em mmol/gDCW.h): é dada pelo coeficiente angular do ajuste do gráfico de OUR (em mmol/h) *versus* a massa de células (em gramas) multiplicado por 2.
- A velocidade específica de gás carbônico (qCO_2 em mmol/gDCW.h): é dada pelo coeficiente angular do ajuste do gráfico de CER (em mmol/h) *versus* a massa de células formada (em gramas).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados experimentais

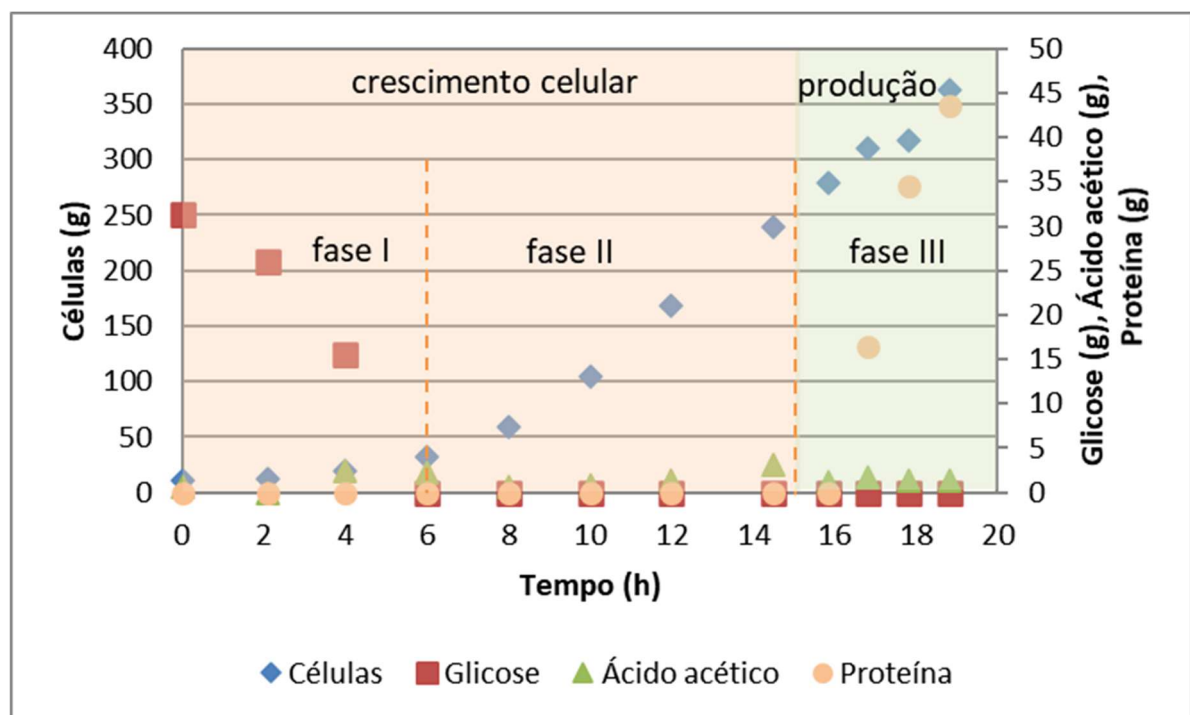
O protocolo do processo de produção da Amblyomin-X foi estabelecido por meio da realização de vinte e oito ensaios. Destes, vinte e dois ensaios foram realizados como parte do planejamento experimental (MARQUES, 2018), em que foram avaliadas as melhores condições para a produção da proteína heteróloga, variando-se a temperatura, a concentração celular e de IPTG no momento da indução. A partir da compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de produção da proteína de interesse, outros dez ensaios performados nas condições definidas no protocolo do processo de produção – tais como concentrações iniciais de inóculo e glicose no biorreator, e temperatura, concentração de IPTG e concentração celular no momento da indução – e seus dados foram utilizados neste trabalho, para que o protocolo pudesse ser otimizado.

Como exemplo para a descrição do processo, será utilizado o ensaio 1. Como pode ser visto na Figura 7, o processo é dividido em três fases, sendo as duas primeiras representadas pelo crescimento celular à temperatura de 37°C – em que se almeja obter altas concentrações de microrganismo – e a terceira pela produção da proteína na forma de corpos de inclusão, a partir da indução com IPTG, na temperatura de 32°C. As primeiras seis horas de ensaio (fase I) são caracterizadas por batelada de 4 g/L de glicose, na qual todo o carbono é consumido. Esta baixa concentração inicial de substrato evita a manifestação dos fenômenos de inibição do crescimento celular por altas concentrações de substrato e também por altas concentrações de subproduto (ácido acético) formado pela célula. Experimentos anteriores mostraram que 0,7 g/L de ácido acético inibe o crescimento da *Escherichia coli* cultivada neste trabalho. Na fase I, a bactéria se multiplica com velocidade específica de 0,24 h⁻¹, e forma ácido acético com concentração de até 0,4 g/L.

Na fase II inicia-se a batelada alimentada, que se estende até o final do processo. Solução de glicose concentrada e de sulfato de magnésio é adicionada em perfil exponencial, com velocidade específica de crescimento fixa de 0,2 h⁻¹, de maneira que a sua concentração residual no biorreator seja nula. Tal velocidade específica imposta limita o crescimento da célula e evita a formação de subprodutos indesejáveis e/ou inibitórios para o crescimento celular. Com essa limitação, o crescimento celular segue um perfil de crescimento em exponencial, porém com

velocidade menor que a sua velocidade específica máxima, até seguir um perfil linear após a indução (fase III). Isso porque nesta fase, a transferência de oxigênio para o meio de cultivo se torna limitada; ou seja, a agitação e aeração que foram manipuladas durante todo o processo para fornecer a transferência de oxigênio para o crescimento celular atingem seus valores máximos. Então, a vazão de alimentação, que seguia o perfil exponencial, tem o seu perfil alterado para que a concentração de oxigênio no meio não se torne limitante, ou seja, próximo do valor crítico de 0,26 mg/L (~4%) estipulado pela literatura (SCHMIDELL et al., 2005).

Figura 7 – Perfis das massas de glicose, ácido acético, celular e da proteína Amblyomin-X ao longo do tempo para o ensaio 1.



Os resultados do ensaio ilustrados na Figura 7 condizem com o reportado pela literatura: a condução do processo em batelada alimentada até a obtenção de elevadas concentrações de microrganismo e a posterior indução do vetor recombinante promove altas concentrações da proteína de interesse. Neste ensaio, obteve-se 47 g/L de *E. coli* e 5,6 g/L de Amblyomin-X, no volume final de 7,8 L de meio no biorreator. Os resultados de outros ensaios estão no ANEXO I na forma de tabelas e no ANEXO III na forma gráfica.

Os valores dos parâmetros registrados pelo *software* MFCS estão representados na Figura 8, que mostra a variação da temperatura, pH, porcentagem

de oxigênio dissolvido, aeração, agitação e consumo de base ao longo do ensaio. Os parâmetros registrados pelo *software* de outros ensaios estão ilustrados no ANEXO II deste trabalho.

A Figura 9 mostra a produção da proteína Amblyomin-X ao longo do tempo, cujas as camadas são (da esquerda para a direita): 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – proteína produzida no momento antes da indução (tempo zero); 4 – proteína produzida 1 h após a indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida 3 h após a indução; 7 – proteína produzida 4 h após a indução. Por meio da imagem do gel de eletroforese nota-se que a purificação das amostras coletadas no ensaio imediatamente antes e após a indução foi eficiente, com bandas de outras proteínas pouco presentes. Nota-se também o aumento da nitidez da banda da proteína de interesse ao longo do tempo. As imagens do gel de eletroforese dos demais ensaios estão dispostas no ANEXO VI.

Figura 8 – Valores de processo do ensaio 1 registrados pelo MFCS.

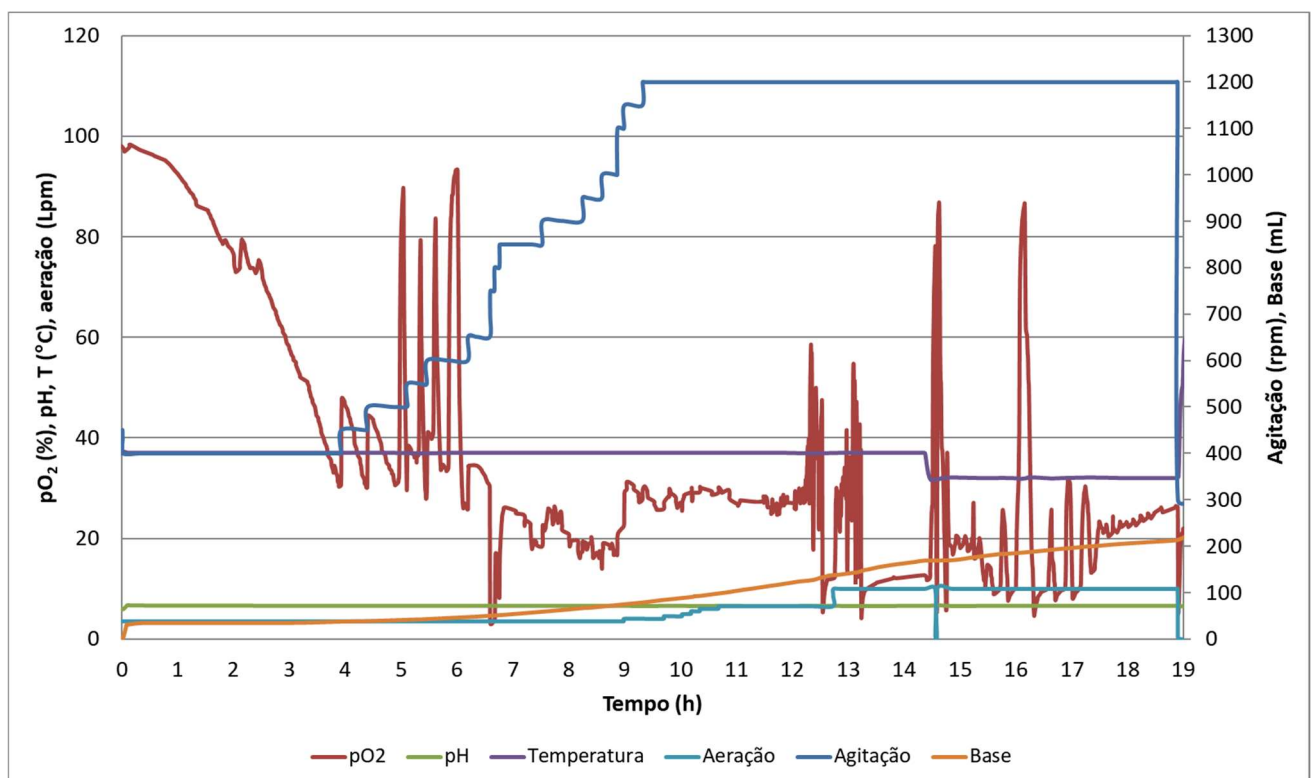
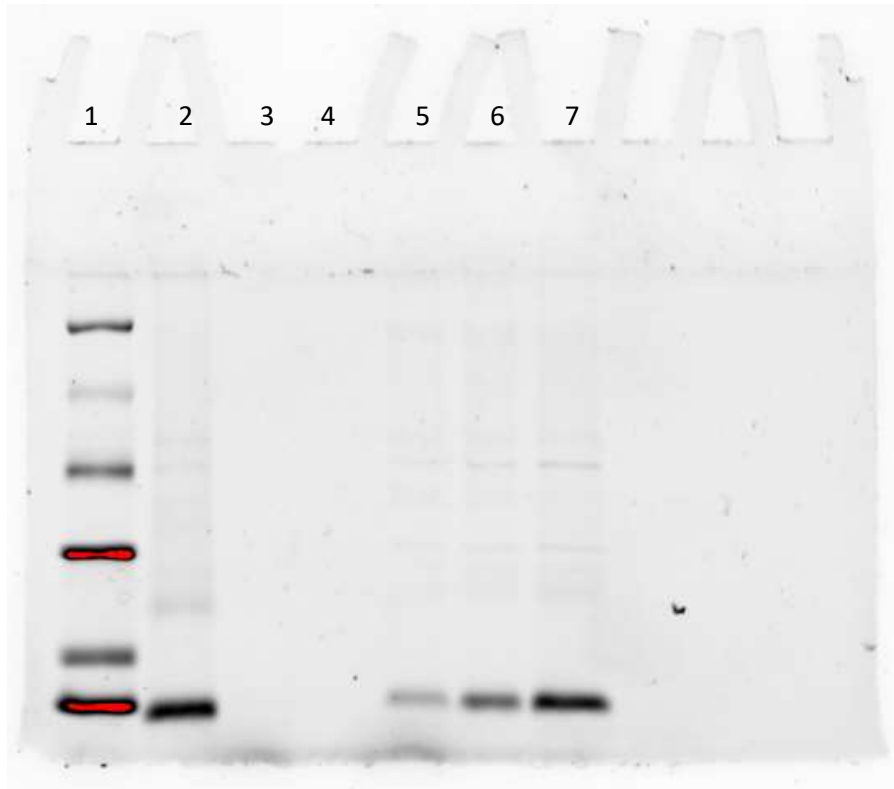


Figura 9 – Imagem do gel de eletroforese do ensaio 1. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – ausência de proteína na amostra após 1 h da indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.



Uma vez conhecido o processo de produção da proteína e estabelecido o protocolo do seu processo, deu-se início à proposição de um modelo fenomenológico e metabólico que representasse tal processo. Este modelo será apresentado a seguir no item 4.2.

4.2 Modelo fenomenológico

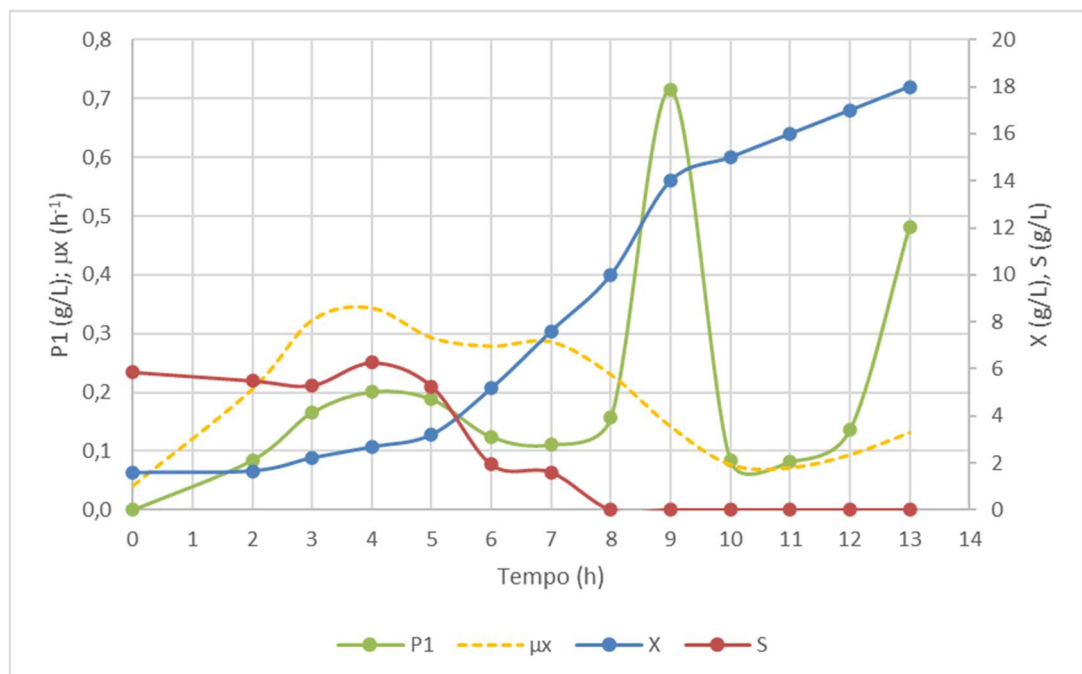
Os cultivos em biorreator foram utilizados para identificar e compreender dos fenômenos envolvidos no processo de crescimento celular e de produção da proteína heteróloga. Daqueles fenômenos que são mais comumente encontrados em processos biotecnológicos, foram identificados: i) limitação do crescimento celular pela baixa concentração dos substratos (glicose e oxigênio dissolvido) e ii) inibição do crescimento celular pela alta concentração do produto metabólico ácido acético. O meio de cultura foi preparado com as concentrações dos sais elevada para que nenhum outro componente se tornasse limitante ao longo do cultivo. Além de adicionar

sulfato de nitrogênio no meio de cultura, a adição de hidróxido de amônio para controlar o pH garantiu a não limitação desse substrato limitante.

Os trabalhos da literatura relatam que sob concentrações de glicose não limitantes, a velocidade específica de consumo desta fonte de carbono é alta, maior que as reações de oxidação (velocidade da reação de consumo final do oxigênio), levando ao *overflow* do metabolismo e, conseqüentemente, ao aumento da concentração de ácido acético no meio de cultivo. Os ensaios de cultivo nos biorreatores foram realizados com concentrações iniciais de glicose não inibitórias ao crescimento celular – portanto, esse fenômeno não foi levado em consideração na proposição do modelo não-estruturado – e baixas o suficiente para evitar o *overflow* e a formação do ácido acético. Outro fenômeno que não foi observado nos cultivos foi a inibição do crescimento celular devido à altas concentrações de oxigênio dissolvido no meio; ou seja, estas concentrações não inibem o crescimento da bactéria *Escherichia coli*.

O fenômeno de inibição do crescimento celular pela formação crescente de ácido acético foi observado no cultivo representado pela Figura 10:

Figura 10 – Perfis de velocidade específica de crescimento e das concentrações de células, glicose e ácido acético ao longo do tempo.



A Figura 10 mostra que, enquanto a concentração de ácido acético se manteve em até 0,2 g/L – ou seja, nas primeiras 8 horas –, a concentração de células cresceu em velocidade específica crescente e máxima, atingindo o patamar entre 0,30 – 0,35

h^{-1} , aproximadamente. No instante entre 8 e 9 horas, quando a concentração de ácido acético aumentou para 0,7 g/L, a velocidade específica de crescimento diminuiu para $0,15 \text{ h}^{-1}$, e se manteve entre 0,10 e $0,15 \text{ h}^{-1}$ até o final do cultivo. Com isso, pode-se afirmar que a concentração de 0,7 g/L de ácido acético é inibitória ao crescimento celular.

A partir dos fenômenos observados, o modelo não-estruturado foi proposto. As variáveis de estado que compõem o modelo e que são mensuráveis são: volume (V), concentração de células (X), de glicose (S1), ácido acético (P1), oxigênio dissolvido (S2) e proteína (P2). Os perfis de concentração destas variáveis ao longo do tempo para todos os cultivos estão expostos no ANEXO I. Com essas cinco primeiras variáveis, é possível representar o processo até o momento da indução. Para representar de forma robusta a fase em que a proteína é formada, foram acrescentadas ao modelo as variações, conforme descrito no trabalho de Martínez (2014), de: volume de células (V_{cel}), volume do meio de cultura (V_m), concentração de IPTG extracelular e intracelular, da carga metabólica sofrida pela célula, do número de moléculas de repressor livre e de repressor ligado ao IPTG. Dessa forma, o modelo proposto, que engloba as fases de crescimento e de produção da proteína, é composto por 14 equações de balanço material (Equações 107 a 120), 2 equações cinéticas (que são as de velocidade específica de crescimento celular e de formação da proteína heteróloga) (Equações 121 e 122) e 1 equação de transporte (Equação 123), que é o transporte do indutor do meio extracelular para o intracelular.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (107)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X \cdot g_s - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt} \quad (108)$$

$$\frac{dg_s}{dt} = \frac{-K_{s1} \cdot \left(\frac{IPTG_e}{30} - 0,4 \right)}{K_{s2} + \frac{IPTG_e}{30} - 0,4} \cdot g_s \quad (109)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 \cdot S_0}{V} - \frac{S_1}{V} \frac{dV}{dt} - \frac{\mu_x \cdot X}{Y_{X/S}} - m_s \cdot X \quad (110)$$

$$\frac{dA}{dt} = \frac{\mu_x \cdot X}{Y_{XAC}} - \left[\frac{1}{Y_{XACA}} \cdot \mu_{maxac} \cdot \frac{A}{K_{AC} + A} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{A}{K_{AC} + A} \right)^{\gamma}} \cdot X \cdot g \right] - \frac{A}{V} \frac{dV}{dt} \quad (111)$$

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{(F_1 + F_2) \cdot O_2^*}{V} - \frac{\mu_x \cdot X}{Y_{XO}} + k_L a (O_2^* - O_2) - \frac{O_2}{V} \frac{dV}{dt} \quad (112)$$

$$\frac{dV_{cel}}{dt} = 0,0023 \cdot X \cdot \frac{dV}{dt} + 0,0023 \cdot V \cdot \frac{dX}{dt} \quad (113)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = \frac{dV}{dt} - \frac{dV_{cel}}{dt} \quad (114)$$

$$\frac{dIPTG_e}{dt} = -r - \frac{IPTG_e}{dt} \cdot \frac{dV_m}{dt} \quad (115)$$

$$\frac{dIPTG_i}{dt} = r \cdot \frac{V_m}{V_{cel}} - \frac{IPTG_i}{V_{cel}} \cdot \frac{dV_{cel}}{dt} \quad (116)$$

$$\frac{dM}{dt} = \alpha \cdot N - \lambda \cdot M \quad (117)$$

$$\frac{dR_{free}}{dt} = -\frac{1}{\tau_r} \left[R_{free} \left(\frac{IPTG_i/1000}{K_r} \right)^n - R_{IPTG} \right] - \lambda_R \cdot R_{free} + \alpha_R \cdot M \quad (118)$$

$$\frac{dR_{IPTG}}{dt} = \frac{1}{\tau_r} \left[R_{free} \left(\frac{IPTG_i/1000}{K_r} \right)^n - R_{IPTG} \right] - \lambda_R \cdot R_{IPTG} \quad (119)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = \frac{\mu_p \cdot X}{1000} - \frac{P_2}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (120)$$

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \cdot \frac{K_p}{K_p + A} \cdot \frac{O}{K_O + O} \quad (121)$$

$$\mu_p = 72,38 \cdot \frac{R_{IPTG}}{K_{P1} + R_{IPTG} + \frac{R_{IPTG}^2}{K_{P2}}} \quad (122)$$

$$r = k_c a (IPTG_e - IPTG_i) + \left[K_1 \cdot 30 \cdot \left(K'' \cdot IPTG_e + \frac{K' \cdot IPTG_e}{K_m + IPTG_i^2} \right) \exp(K_2 \cdot 0,2) \right] \quad (123)$$

Onde:

F – diferença entre a soma das vazões de alimentação da fonte de glicose (F_1) e nitrogênio (F_2) e vazão da retirada de amostras (F_3) (L/h):

$$F = F_1 + F_2 - F_3 \quad (124)$$

Sendo F_1 a vazão experimental de alimentação da fonte de glicose

$$F_2 = k_b \cdot \mu_x \cdot X \quad (125)$$

Ao longo de todo o cultivo, a variação da concentração de células ao longo do tempo (Equação 108) depende da sua velocidade específica de crescimento (Equação 121), que é governada pelos fenômenos de limitação pela concentração de substratos e inibição pela concentração de produto metabólico. Após o momento da indução, em que o IPTG é adicionado, a variação da concentração de células torna-se dependente também da carga metabólica sofrida pela célula (g_s), que é variável e

representada pela Equação 109. Isto porque vários recursos que seriam utilizados no metabolismo da célula hospedeira são deslocados para a expressão da proteína heteróloga, levando à diminuição na velocidade específica de crescimento celular.

A expressão da concentração de ácido acético ao longo do tempo (Equação 111) é representada pela diferença entre a concentração de ácido acético formado no metabolismo celular e a soma entre o consumo do ácido acético pela célula no momento em que a concentração de glicose é muito baixa (menor que 0,1 g/L) – como proposto por Nancib, Mosrati e Boudrant (1993) – e a diluição do ácido acético no meio de cultivo.

As Equações 113 e 114 predizem o volume total de células – usando o volume específico celular de $0,0023 L_{\text{célula}}/g_{\text{DCW}}$ – e de meio de cultura, respectivamente; cujos valores serão utilizados para o cálculo das concentrações de IPTG intracelular (Equação 116) e extracelular (Equação 115).

A Equação 117 calcula o número de moléculas de mRNA de *lacI* – M (moléculas/célula) – na célula ao longo do tempo; que é dependente da taxa de transcrição (α), número de cópias de plasmídeo (N) e da taxa de degradação das moléculas de mRNA de *lacI* (λ).

As Equações 118 e 119 descrevem a variação número de moléculas de repressor que estão na sua forma livre ou ligados ao IPTG, respectivamente; sendo que este último afeta a velocidade específica de formação da proteína de interesse (Equação 122).

A taxa de transporte de IPTG do meio extracelular para o meio intracelular é representada pela Equação 123, em que estão descritos os termos de transporte ativo específico e não específico, e o de difusão de IPTG do meio extracelular para o intracelular, levando em consideração a concentração celular e a velocidade específica de crescimento.

Neste modelo matemático está presente uma série de parâmetros, sendo trinta destes ajustáveis (Tabela 5) e dois fixos (Tabela 6). A partir dos valores estimados preliminarmente, obteve-se a simulação do processo em Matlab® representada pela Figura 11. Esta Figura mostra, além da simulação do modelo, também os dados experimentais de seis ensaios. Nessa simulação, o valor de IPTG assumiu os valores 0 ou 1, dependendo do tempo de processo: 0 para tempo menor que 16,8 h e 1 para o tempo de processo maior que esse valor.

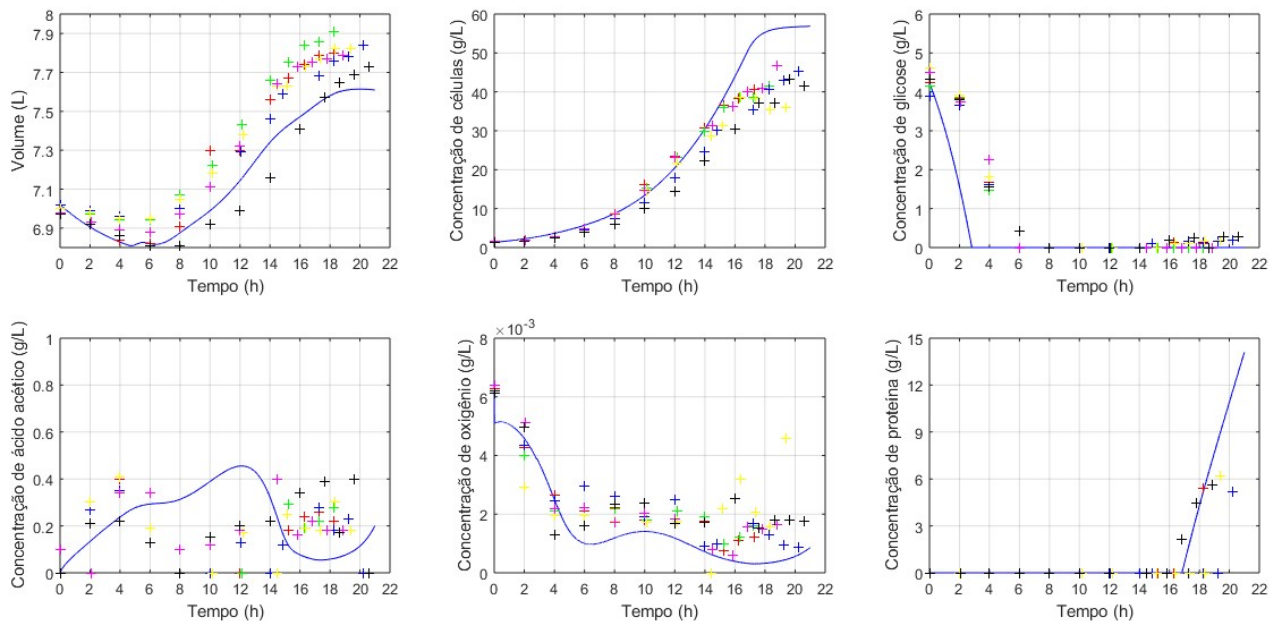
Tabela 5 – Nomenclatura dos parâmetros ajustáveis do modelo matemático.

Parâmetros Ajustáveis	Nomenclatura
$Y_{X/s}$	Fator de conversão de glicose em célula (g/g)
Y_{XAC}	Fator de conversão de ácido acético em célula com glicose como fonte de carbono (g/g)
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
K_{S1}	Constante de limitação da glicose no crescimento celular (g/L)
K_P	Coefficiente de inibição celular pelo ácido acético (L/g)
K_O	Constante de limitação do oxigênio no crescimento celular (g/L)
K_b	Constante de proporcionalidade entre crescimento celular e alimentação de base (Lmeio.Lalimentação/g)
m_s	Coefficiente específico de manutenção celular (g/g.h)
Y_{XACA}	Fator de conversão de ácido acético em célula com ácido acético como fonte de carbono (g/g)
μ_{maxac}	Velocidade específica de crescimento celular máxima com ácido acético como fonte de carbono (h^{-1})
K_{AC1}	Constante de afinidade por acetato (g/L)
K_{AC2}	Constante de inibição do crescimento celular por acetato com ácido acético como fonte de carbono (g/L)
γ	Expoente do termo de inibição do crescimento celular por acetato com ácido acético como fonte de carbono
Y_{XO}	Fator de conversão de oxigênio em célula (g/g)
K_{s1}	Constante 1 da equação de variação da carga metabólica sofrida pela célula ao longo do tempo
K_{s2}	Constante 2 da equação de variação da carga metabólica sofrida pela célula ao longo do tempo
K_{ca}	Coefficiente específico de transferência de massa (h^{-1})
K''	Constante 1 do transporte ativo não específico de IPTG
K'	Constante 2 do transporte ativo não específico de IPTG
K_2	Constante da dependência do transporte de IPTG em relação ao crescimento celular
N	Número de cópias de plasmídeo (plasmídeo/célula)
α	Velocidade de transcrição de $lacI$ (h^{-1})
λ	Velocidade de degradação de mRNA (h^{-1})
α_r	Velocidade de transcrição do $lacI$ (h^{-1})
λ_r	Velocidade de degradação do $lacI$ (h^{-1})
K_r	Constante de equilíbrio para a ligação repressor-IPTG (mM)
n	Cooperatividade da ligação $lacI$ -IPTG
τ_r	Constante de tempo para a ligação repressor-IPTG (h^{-1})
K_{P1}	Constante 1 da equação da velocidade específica de produção da proteína
K_{P2}	Constante 2 da equação da velocidade específica de produção da proteína

Tabela 6 – Nomenclatura dos parâmetros fixos do modelo matemático.

Parâmetros Fixos	Nomenclatura	Valores
S_0	Concentração de glicose na solução de alimentação (g/L)	600
O_2^*	Solubilidade máxima do oxigênio dissolvido no meio de cultivo (g/L)	0,0065

Figura 11 – Simulação do modelo matemático a partir da estimativa preliminar dos parâmetros. – dados simulados; + dados experimentais dos ensaios.



Uma vez proposto o modelo, seus parâmetros foram ajustados considerando 6 ensaios. Para encontrar o conjunto de parâmetros que tornam a diferença entre os dados simulados e os experimentais a mínima possível, foi utilizado o método de busca geométrico simplex de Nelder e Mead na forma de um algoritmo em Fortran, o programa AJPAR (Antônio Bonomi, comunicação pessoal), cuja função objetivo (resíduo R) é a somatória do quadrado dos desvios normalizados pela média entre o valor experimental e o valor calculado (Equação 126) (AUGUSTO et al., 1994).

$$R = \sum_i \left(\frac{y_i \text{ calculado} - y_i \text{ experimental}}{\left(\frac{y_i \text{ calculado} + y_i \text{ experimental}}{2} \right)} \right)^2 \quad (126)$$

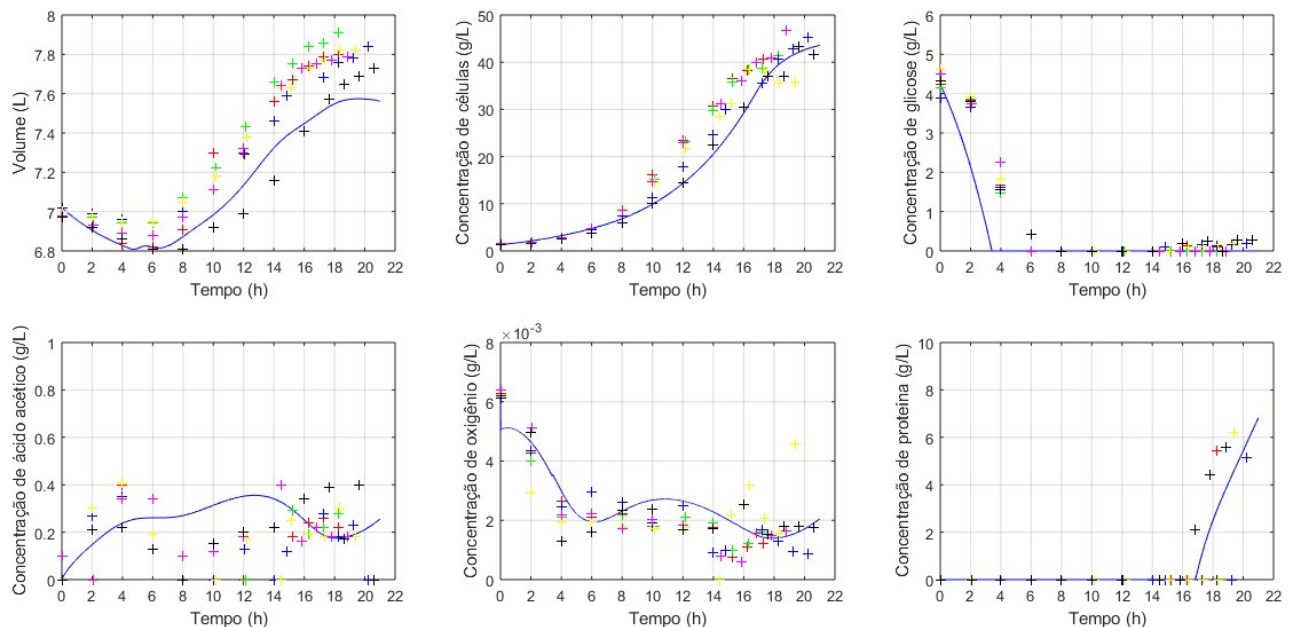
A Tabela 7 mostra os valores estimados e ajustados dos parâmetros. Comparando visualmente a Figura 11 com a Figura 12, percebe-se que o modelo se ajustou melhor aos dados experimentais após o ajuste dos parâmetros.

Tabela 7 – Valores estimados e ajustados dos parâmetros ajustáveis do modelo matemático.

Parâmetro	Unidade	Estimativa inicial	Valor ajustado
$Y_{x/s}$	g/g	0,35	0,34
Y_{xAC}	g/g	2	1,98
μ_{max}	h^{-1}	0,24	0,25
K_{S1}	g/L	3,00E-07	1,47E-07
K_P	(L/g)	50	48
K_O	(g/L)	0,0005	0,0002

K _b	(Lmeio.Lalimentação/g)	0,002	0,002
m _s	(g/g.h)	0,01	0,05
Y _{XACA}	(g/g)	2	2
μ _{maxac}	(h ⁻¹)	0,22	0,25
K _{AC1}	(g/L)	0,05	0,02
K _{AC2}	(g/L)	2	3
γ	-	5	5
Y _{xo}	(g/g)	0,7	0,8
K _{s1}	h ⁻¹	0,5	1,0
K _{s2}	μmol IPTG/g _{DCW}	0,0573	0,0767
K _{ca}	(h ⁻¹)	0,213	0,194
K''	h ⁻¹	2,00E-05	2,71E-05
K'	μM ² .h ⁻¹	2	2
K ₂	h	21,3	21,3
N	-	500	496
α	(h ⁻¹)	27	21
λ	(h ⁻¹)	16,26	13,80
α _r	(h ⁻¹)	172,8	161,8
λ _r	(h ⁻¹)	1,28	1,22
K _r	(mM)	0,289	0,369
n	-	0,6	0,8
τ _r	(h ⁻¹)	6,3	7,8
K _{P1}	célula/molécula.h	8,00E-06	5,33E-06
K _{P2}	g _{célula} /mg _{proteína}	1000	1132

Figura 12 – Simulação do modelo matemático com os parâmetros ajustados. – dados simulados; + dados experimentais do ensaio 1; + dados experimentais do ensaio 2.



Para validar o modelo não estruturado, o ajuste dos parâmetros foi avaliado por meio da análise estatística Teste F, em que foi obtido um valor de F igual a 2,4%. Isso

significa que a variância do erro dos dados simulados (ou calculados) é menor do que a variância do erro experimental, mostrando que o modelo representa o conjunto de resultados experimentais. Dessa forma, o modelo não estruturado poder ser empregado no otimizador, no qual a função objetivo de concentração celular máxima no final da fase de crescimento será avaliada.

4.3 Resultados da Otimização

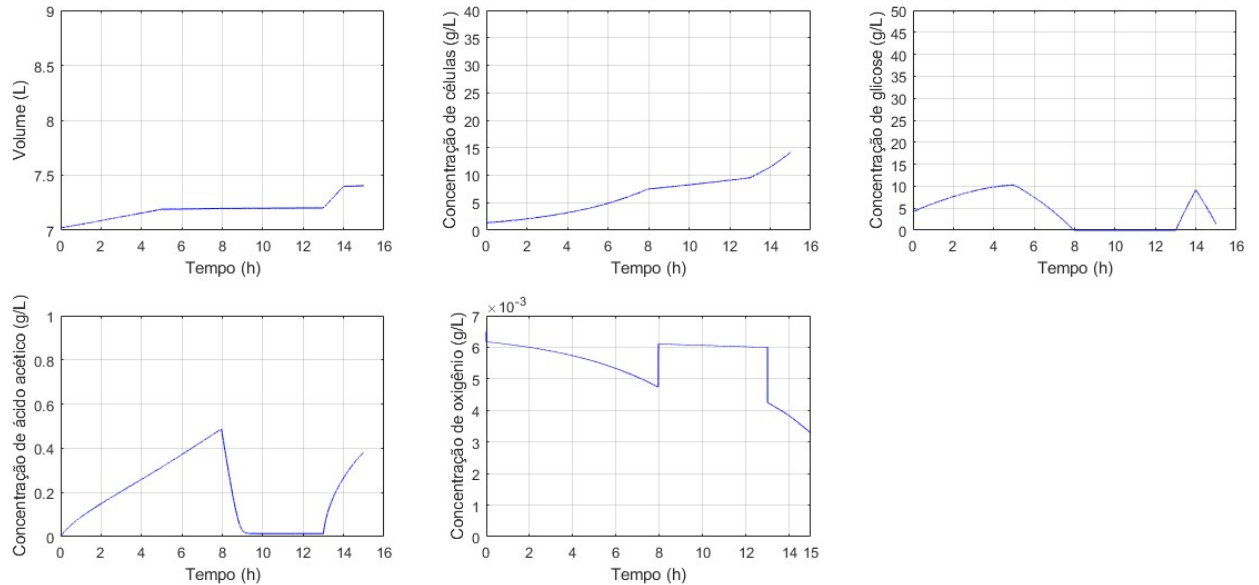
Uma vez ajustado o modelo não estruturado, ele foi submetido à otimização matemática, que visa encontrar o perfil de vazão de alimentação de solução de glicose que resulte no melhor resultado para o processo, respeitando as restrições impostas pelo modelo, que são as equações diferenciais das variáveis de estado e o volume máximo de trabalho do biorreator (10 L).

O melhor resultado para o processo – ou seja, a função objetivo – pode ser, dentre outros: i) a concentração máxima de células obtida na fase de crescimento; ii) a produtividade máxima de células na fase de crescimento; iii) a concentração e iv) produtividade máximas da proteína resultante.

A função objetivo avaliada foi a concentração máxima de células obtida no final da fase de crescimento. O modelo não-estruturado ajustado foi otimizado em Matlab® por meio da rotina “fmincon” utilizando o algoritmo “ponto interior”, com tolerância da solução de 1^{-10} e tolerância da função de 1^{-6} . Para tanto, a vazão de alimentação foi discretizada em 15 trechos (tornando-a um vetor com 15 variáveis de decisão, com valores mínimos de 0 e máximos de 5 L/h). Para todas as rodadas de otimização, o valor do coeficiente de transferência de oxigênio foi mantido fixo em 1300 h^{-1} , representando a máxima transferência de oxigênio para o meio de cultura ao manipular a agitação e aeração.

Tomando-se o modelo não estruturado com os parâmetros ajustados e considerando como estimativa inicial o vetor de vazão com valores iguais a 0,01 L/h para todas as variáveis de decisão, obteve-se como resultado a simulação da 1ª rodada de otimização (Figura 13):

Figura 13 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 1ª rodada de otimização.

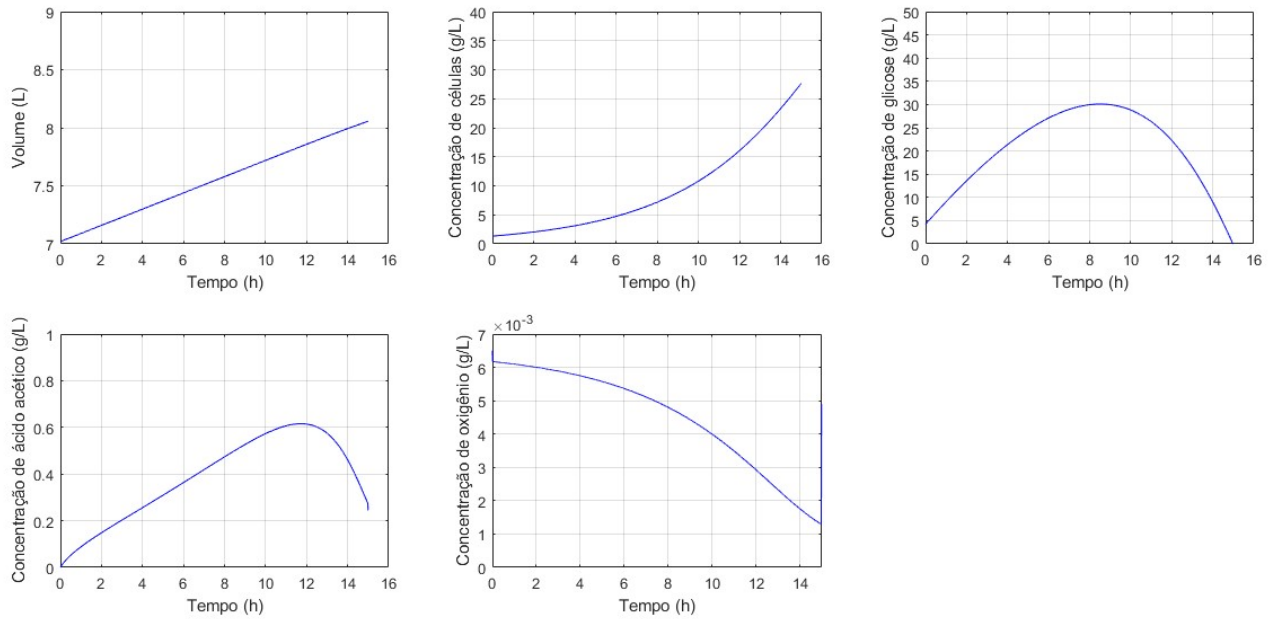


A Figura 13 mostra que até aproximadamente 5 h, a vazão crescente imposta pelo otimizador resultou numa concentração de glicose tal que não limitasse o crescimento celular. Com isso, a velocidade específica de crescimento celular manteve-se em seu valor máximo de $0,24 \text{ h}^{-1}$, até o momento em que a concentração de ácido acético – que se elevou devido à velocidade específica de crescimento máxima – atingiu valores próximos ao de inibição do crescimento celular, e então a velocidade específica de crescimento celular diminuiu.

Com isso, a vazão imposta pelo otimizador tornou-se nula até 13 h, e a concentração de glicose diminuiu devido ao seu consumo pela célula. No momento em que a concentração de glicose se tornou limitante (concentração menor que $0,1 \text{ g/L}$), o ácido acético começou a ser consumido. Com a diminuição na velocidade específica de crescimento celular, diminuiu também o consumo de oxigênio. A concentração de células obtida no final do processo foi de $14,44 \text{ g/L}$.

Alterando-se a estimativa inicial do vetor de vazão de alimentação para $0,5 \text{ L/h}$, obteve-se como resultado os valores simulados para as variáveis de estado representados pela Figura 14:

Figura 14 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 2ª rodada de otimização.



O primeiro ponto a ser observado é que o valor ótimo encontrado para a função objetivo é altamente dependente da estimativa inicial do vetor de variáveis de decisão. Alterando-se somente tal estimativa, a concentração máxima de células obtida no final do processo alterou de 14,44 g/L para 27,58 g/L. Isso mostra que a rotina de otimização encontra um mínimo local; e que a avaliação da estimativa inicial se faz necessária para se obter um resultado ao menos próximo do mínimo global.

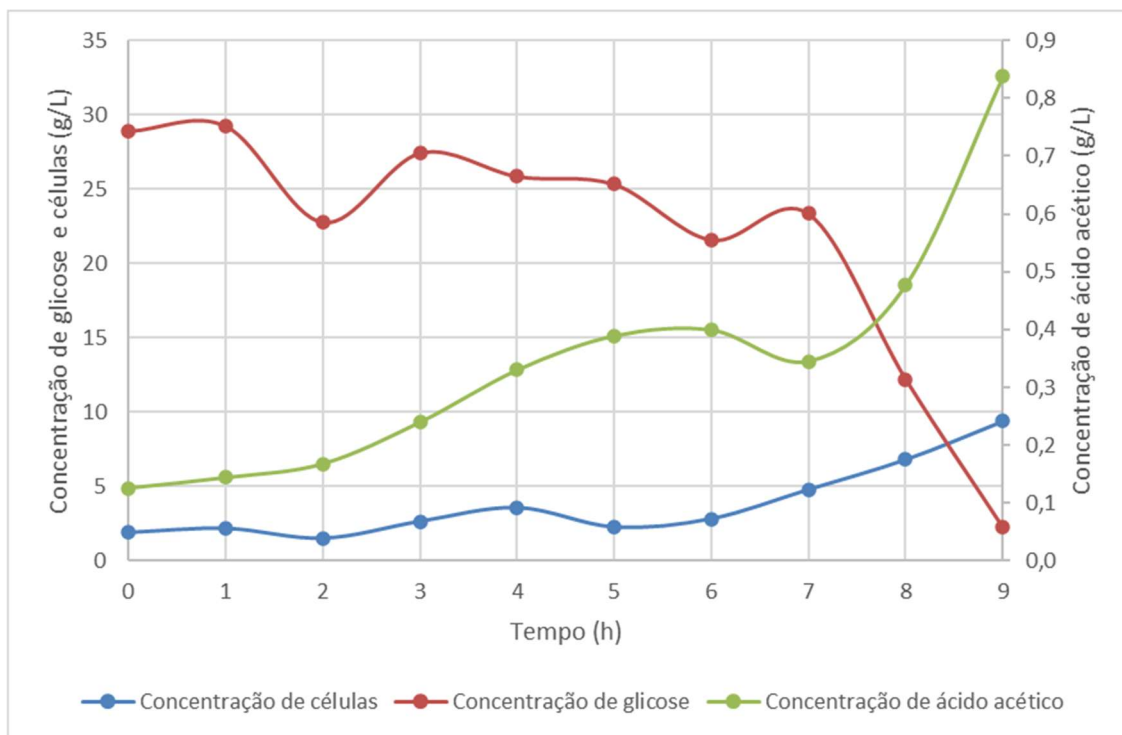
O perfil da vazão de alimentação de solução de glicose imposta pelo otimizador na 2ª rodada de otimização é diferente daquele obtido na 1ª rodada. No entanto, a resposta das variáveis de estado da 2ª rodada seguiram a mesma tendência da 1ª rodada; ou seja, apesar da concentração de glicose não limitante no meio de cultura, a variação da concentração de células ao longo do tempo é dependente do valor máximo da sua velocidade específica de crescimento ($0,24 \text{ h}^{-1}$). A concentração inibitória de ácido acético reduziu esta velocidade; mas o aumento da concentração de células ainda em perfil exponencial levou à queda da concentração de glicose e de oxigênio dissolvido no biorreator.

Na equação cinética de crescimento celular do modelo não estruturado proposto, o fenômeno de inibição do crescimento celular devido à altas concentrações de glicose não foi considerado, já que nos ensaios realizados esta concentração inicial era não inibitória e, portanto, esse fenômeno esteve ausente no processo. No entanto, a consideração desse fenômeno na otimização é necessária, já que a resposta do

vetor de vazão do algoritmo de otimização pode ser alta de tal modo que resulte em concentrações de glicose inibitórias ao crescimento celular.

Um ensaio realizado com concentração inicial de glicose de 30 g/L (Figura 15) mostrou uma fase lag no crescimento celular (notada nas primeiras 5 horas do gráfico da Figura 15), possivelmente devido à inibição do crescimento pela concentração inicial de glicose, já que não havia produto inibitório ao crescimento celular, tampouco substrato limitante. Caso houvesse substrato limitante, o crescimento celular após 6 horas de cultivo não seria possível, já que nenhum nutriente foi acrescentado ao biorreator no período demonstrado na Figura 15.

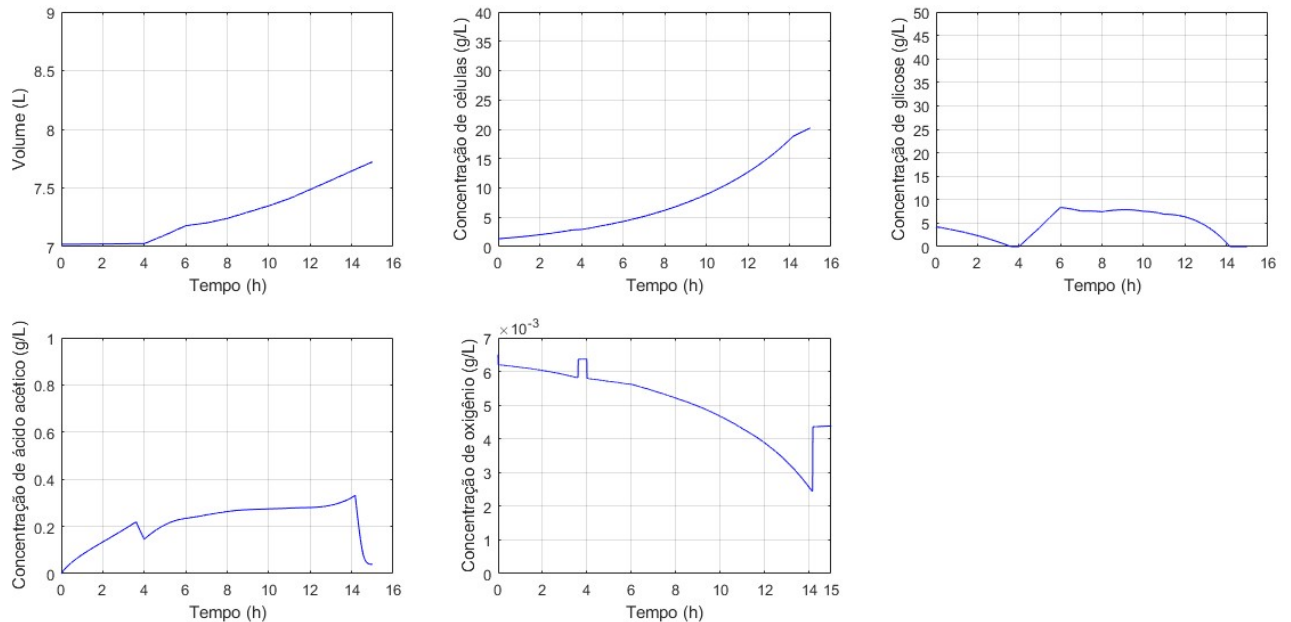
Figura 15 – Perfis de concentração de glicose, células e ácido acético ao longo do tempo para o cultivo com concentração inicial de glicose de 30 g/L.



Dessa forma, o modelo originalmente proposto foi modificado, inserindo-se a inibição do crescimento celular pela alta concentração de glicose, representada pela Equação de Andrews. Mantendo-se como estimativa inicial do vetor de vazão os valores de 0,5 L/h; e adotando-se como 30 g/L o valor para a constante de inibição da Equação de Andrews, observou-se uma lenta convergência da rotina de otimização. Então, a estimativa inicial do vetor vazão de alimentação foi alterada para um perfil exponencial, cujos valores foram baseados na vazão de alimentação aplicada

experimentalmente no ensaio 3. Como resultado, obtiveram-se os perfis das variáveis de estado ilustrados na Figura 16:

Figura 16 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 3ª rodada de otimização.



No período de 4 a 6 h de processo, a vazão imposta pelo otimizador resultou no aumento da concentração de glicose para aproximadamente 8 g/L, devido à limitação da glicose no tempo de 4 h. A menor velocidade específica de crescimento celular a partir de seis horas de processo deve-se ao aumento de glicose no meio de cultura. Com isso, obteve-se a diminuição da concentração de células obtida no final do processo em relação à rodada anterior, de 27,58 g/L para 20,30 g/L.

Para a próxima rodada de otimização (Figura 17), a velocidade específica máxima de crescimento celular foi alterada para $0,30 \text{ h}^{-1}$, mantendo-se as condições – estimativa inicial do vetor de vazão de alimentação e demais parâmetros do modelo – da rodada anterior. Com esta alteração, espera-se que a variação da concentração celular na fase em batelada (nas primeiras 4 horas de processo aproximadamente) seja maior em relação às rodadas anteriores, promovendo uma maior concentração celular e, portanto, ao maior requerimento por fonte de carbono na fase *fed-batch*.

Figura 17 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 4ª rodada de otimização.

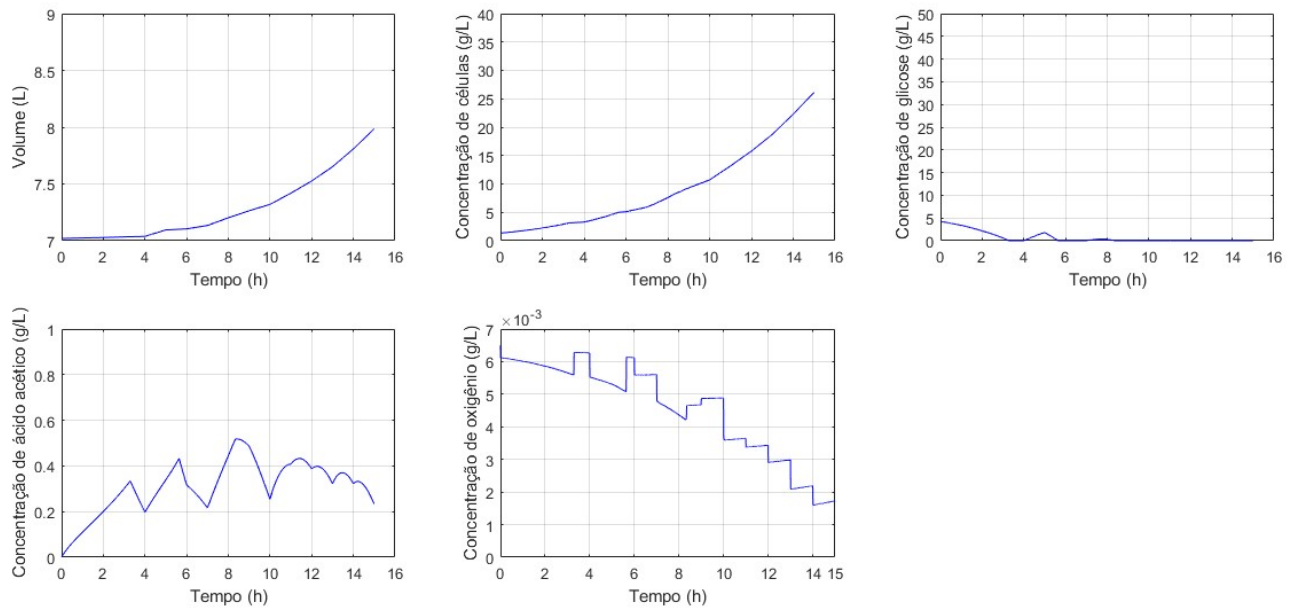
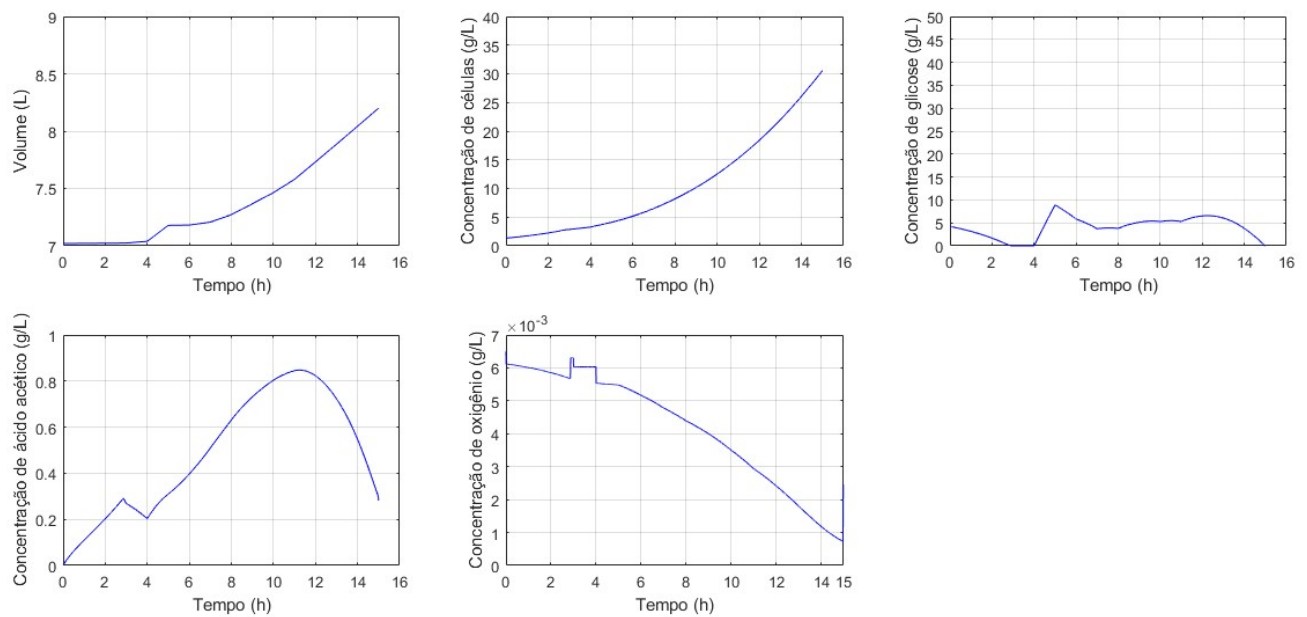


Figura 17 mostra que, na 8ª hora de processo, aproximadamente, houve a inibição do crescimento celular devido ao aumento da concentração de ácido acético no meio de cultivo. Com isso, a concentração celular máxima obtida foi 25,96 g/L.

Para avaliar a influência do modelo cinético de inibição do crescimento celular pela concentração de ácido acético no meio de cultivo na concentração celular resultante, o modelo anteriormente empregado (AIBA; SHODA, 1969) foi alterado para o modelo proposto por Cockshott e Bogle (1999), mantendo-se as mesmas condições da 4ª rodada de otimização (estimativa inicial do vetor de variáveis de decisão e parâmetros do modelo). O resultado está ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Perfil das variáveis de estado resultantes da 5ª rodada de otimização.



A Figura 18 mostra que, alterando-se o modelo cinético de inibição do crescimento celular pela concentração de ácido acético, é possível atingir a concentração de células final de 30,54 g/L. Este foi o melhor resultado obtido pelo otimizador. O vetor de vazão de alimentação resultante da otimização tem o exponencial perfil esperado, acompanhando o perfil do crescimento celular.

4.4 Análise de fluxos metabólicos

A análise de fluxos metabólicos foi realizada para as três etapas do processo de produção da Amblyomin-X: fase de batelada, batelada alimentada sem produção da proteína e com a produção da proteína. Assim, foram obtidas três diferentes “fotografias” do metabolismo celular, que permitiram visualizar a distribuição dos fluxos nas principais vias do metabolismo da *Escherichia coli* e verificar as diferenças entre as distribuições ao longo do processo de produção.

Para a determinação dos fluxos nas vias do metabolismo central foi realizado um ensaio com maior número de amostragem (ensaio 9). Na fase de batelada, foram desconsideradas na análise as primeiras duas horas e meia do processo, em que há o consumo preferencial do extrato de levedura ao da glicose como fonte de carbono.

Em todas as etapas para as quais foram feitas as análises de fluxo, supõe-se que o crescimento celular estava balanceado, ou seja, os metabólitos intracelulares

estavam em estado pseudoestacionário; portanto suas concentrações não variavam ao longo do tempo.

A Tabela 8 mostra os dados do ensaio, bem como aqueles que foram utilizados para encontrar a distribuição de fluxos para cada etapa. Nessa Tabela, OUR (*Oxygen Uptake Rate*) é a velocidade de consumo de oxigênio pela célula e CER (*Carbon Evolution Rate*) é a velocidade de formação de dióxido de carbono pela célula. Os dados em azul são aqueles que foram utilizados para a análise de fluxos da batelada, os de cor laranja para a batelada alimentada e os verdes para a etapa de produção. A evolução dessas variáveis ao longo do tempo no biorreator é mostrada no ANEXO III.

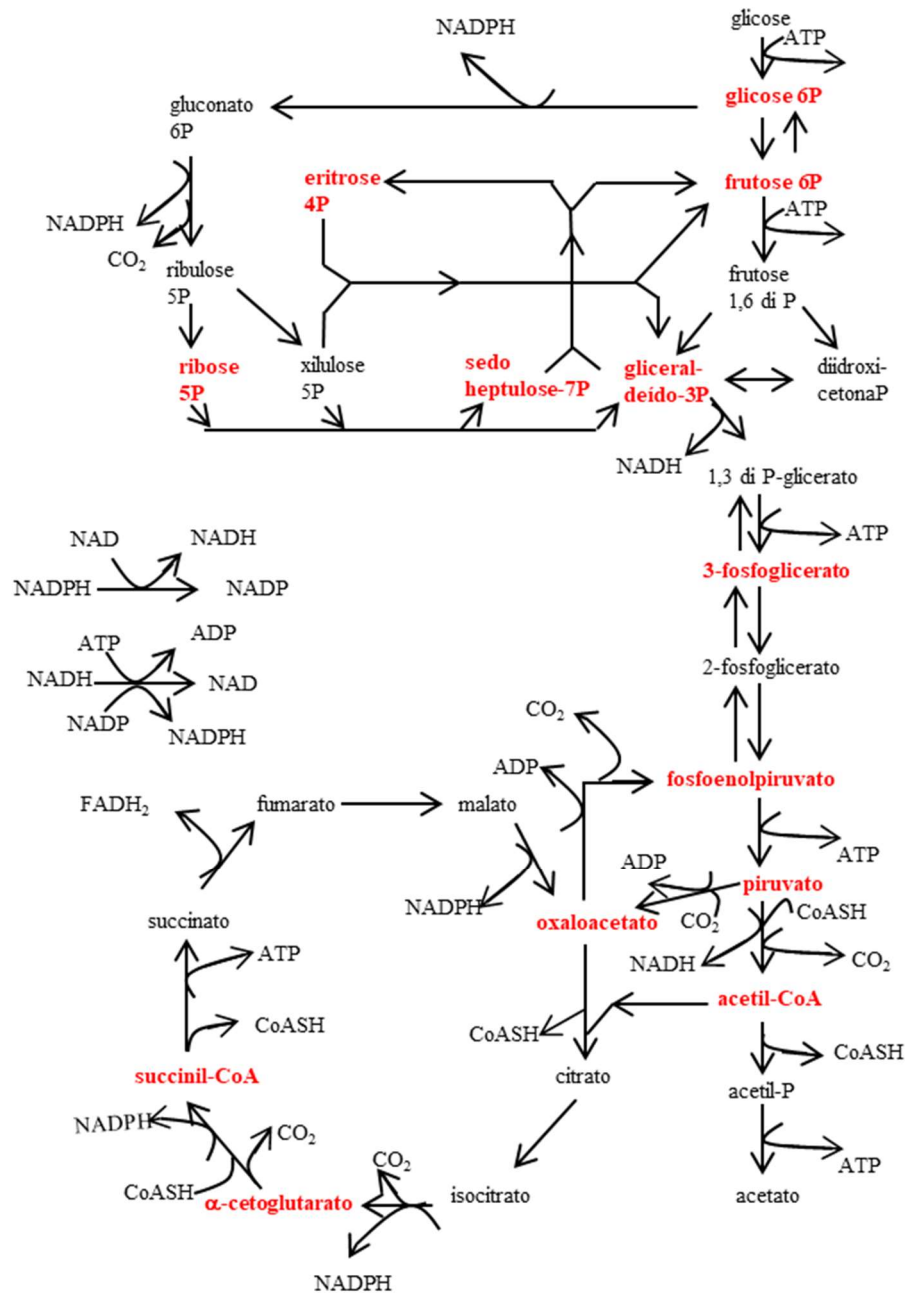
Tabela 8 – Dados experimentais do ensaio 9 para o modelo metabólico tomados na fase pseudoestacionária.

Tempo (h)	Células (g)	Glicose consumida (mmol)	Ácido acético produzido (mmol)	OUR (mmolO ₂ /h)	CER (mmolCO ₂ /h)	Proteína (mmol)
0,00	10,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	12,15	6,47	0,00	-3,20	8,77	0,00
1,00	11,93	3,16	0,00	-4,18	11,47	0,00
1,50	12,23	13,81	34,02	-7,14	19,60	0,00
2,00	13,81	20,64	33,99	-11,60	31,84	0,00
2,50	14,33	36,16	35,14	-10,17	44,10	0,00
3,00	15,53	46,68	37,24	7,98	59,04	0,00
3,50	16,03	74,40	37,33	34,99	82,14	0,00
4,00	19,81	100,66	36,76	79,59	105,06	0,00
4,50	20,80	128,00	34,12	-	-	0,00
5,00	24,51	153,78	0,00	101,00	128,12	0,00
5,50	24,91	181,10	0,00	149,76	137,41	0,00
6,00	26,11	208,43	0,00	123,74	77,24	0,00
6,50	26,50	235,75	0,00	-24,91	35,98	0,00
7,00	29,96	235,75	0,00	-32,34	40,11	0,00
7,50	31,14	278,10	0,00	42,94	109,65	0,00
8,08	35,31	332,74	0,00	44,39	105,48	0,00
8,50	37,80	383,84	0,00	50,28	105,41	0,00
9,00	39,75	436,57	0,00	198,06	238,19	0,00
9,50	45,27	513,07	0,00	238,76	273,93	0,00
10,00	53,16	592,03	0,00	274,61	307,03	0,00
10,50	58,55	664,44	0,00	301,97	330,45	0,00
11,00	59,70	743,95	0,00	321,95	359,97	0,00
11,50	82,02	860,34	0,00	367,46	400,15	0,00
12,00	74,34	933,29	0,00	390,45	419,53	0,00
12,50	79,81	1049,14	0,00	464,06	481,94	0,00
13,00	83,40	1172,36	0,00	520,26	502,43	0,00

13,50	96,12	1324,27	0,00	588,69	587,72	0,00
14,00	103,00	1471,81	0,00	652,72	665,84	0,00
14,50	113,11	1640,67	0,00	691,56	701,68	0,00
15,00	132,07	1827,28	0,00	722,60	757,06	0,00
15,50	134,86	2035,75	0,00	594,04	748,69	0,00
16,00	144,49	2217,17	0,00	730,44	785,22	0,00
16,50	165,63	2469,63	32,79	740,75	805,23	0,00
17,00	176,08	2603,97	33,95	749,85	829,37	0,00
17,50	179,37	2834,93	35,70	789,48	860,70	0,00
18,00	208,45	3027,55	35,63	804,72	864,27	0,00
18,92	221,81	3375,64	39,14	814,43	831,33	0,28
19,42	230,00	3569,08	40,50	913,70	824,02	0,81
19,92	236,06	3773,45	40,83	1005,30	1012,65	1,46
20,42	248,99	3987,12		1100,90	1074,66	2,04
20,92	259,30	4198,59	44,56	1071,79	1063,51	2,55
21,42	260,73	4401,05	44,81	1120,54	1061,44	2,60
21,92	276,44	4605,42	44,46	1100,90	1074,66	2,99
22,42	277,12	4798,59	41,06	1045,97	982,28	3,60

Na análise de fluxos, inicialmente foram determinados os modos de fluxos elementares a partir uma rede metabólica para a *Escherichia coli* (Figura 19), a qual contempla as principais vias do metabolismo central da bactéria: a via da glicólise (Embden-Meyerhof-Parnas), a via das pentoses e do ciclo de Krebs. Além disso, foi contemplada a formação de células a partir de 13 intermediários do metabolismo para as três etapas, a formação de ácido acético para a etapa de batelada e a formação de proteína para a etapa de produção.

Figura 19 – Rede metabólica proposta para a bactéria *Escherichia coli*.



Os modos elementares foram determinados utilizando-se o *software* Metatool, onde a glicose, ADP, ATP, oxigênio, gás carbônico, células, ácido acético e proteína (estes dois últimos quando aplicável) foram descritos como metabólitos externos da rede metabólica – ou seja, as espécies medidas da rede, com exceção do ADP e ATP –, e os outros metabólitos representados na Figura 19 foram descritos como sendo os metabólitos internos à rede. O arquivo contendo as reações das redes metabólicas está descrito no ANEXO V.

O *software* Metatool gerou um conjunto com 21 macrorreações para a etapa de batelada, 18 para a batelada alimentada e 29 para a etapa de proteína, que podem ser agrupadas como mostram as Tabela 9, 10 e 11. Desses conjuntos, as três primeiras macrorreações foram desprezadas no cálculo das velocidades dos metabólitos internos à rede, bem como o fluxo de ATP e ADP de todas as macrorreações.

Tabela 9 – Modos elementares gerados pelo software Metatool para a etapa de batelada.

1	ATP = ADP
2	ATP = ADP
3	ATP = ADP
4	Gliext + 26 ADP + 8 O = 26 ATP + 4 CO ₂ + 1 ACETATO
5	1.4204 Gliext + 23.6593 ADP + 8.3027 O = 23.6593 ATP + 4.2669 CO ₂ + XR
6	Gliext + 37 ADP + 12 O = 37 ATP + 6 CO ₂
7	Gliext + 35 ADP + 12 O = 35 ATP + 6 CO ₂
8	Gliext + 16 ADP + 4 O = 16 ATP + 2 CO ₂ + 2 ACETATO
9	2.49973 Gliext + 6.02862 ATP + 1.2398 O = 6.02862 ADP + CO ₂ + 3.28947 XR
10	1.61722 Gliext + 32.4593 ADP + 10.6645 O = 32.4593 ATP + 5.4478 CO ₂ + XR
11	Gliext + 38 ADP + 12 O = 38 ATP + 6 CO ₂
12	Gliext + 19.3333 ADP + 5.33333 O = 19.3333 ATP + 2.66667 CO ₂ + 1.66667 ACETATO
13	Gliext + 5.56679 ADP + 2.31668 O = 5.56679 ATP + 1.28633 CO ₂ + 1.10767 XR
14	1.88919 Gliext + 2.3575 ATP + 1.43874 O = 2.3575 ADP + CO ₂ + 2.42866 XR
15	2.15003 Gliext + 3.92589 ATP + 1.35375 O = 3.92589 ADP + CO ₂ + 2.79642 XR
16	1.68899 Gliext + 1.15368 ATP + 1.50397 O = 1.15368 ADP + CO ₂ + 2.14638 XR
17	Gliext + 5.73441 ADP + 2.37002 O = 5.73441 ATP + 1.31229 CO ₂ + 1.10156 XR
18	1.52743 Gliext + 29.0113 ADP + 9.587 O = 29.0113 ATP + 4.90905 CO ₂ + XR
19	1.57255 Gliext + 30.7441 ADP + 10.1285 O = 30.7441 ATP + 5.1798 CO ₂ + XR
20	1.4823 Gliext + 27.2785 ADP + 9.0455 O = 27.2785 ATP + 4.6383 CO ₂ + XR
21	Gliext + 37.6667 ADP + 12 O = 37.6667 ATP + 6 CO ₂

Tabela 10 – Modos elementares gerados pelo software Metatool para a etapa de batelada alimentada.

1	ATP = ADP
2	ATP = ADP
3	ATP = ADP
4	1.4204 Gliext + 23.6593 ADP + 8.3027 O = 23.6593 ATP + 4.2669 CO ₂ + XR
5	Gliext + 37 ADP + 12 O = 37 ATP + 6 CO ₂
6	Gliext + 35 ADP + 12 O = 35 ATP + 6 CO ₂
7	2.49973 Gliext + 6.02862 ATP + 1.2398 O = 6.02862 ADP + CO ₂ + 3.28947 XR
8	1.61722 Gliext + 32.4593 ADP + 10.6645 O = 32.4593 ATP + 5.4478 CO ₂ + XR
9	Gliext + 38 ADP + 12 O = 38 ATP + 6 CO ₂
10	Gliext + 5.56679 ADP + 2.31668 O = 5.56679 ATP + 1.28633 CO ₂ + 1.10767 XR
11	1.88919 Gliext + 2.3575 ATP + 1.43874 O = 2.3575 ADP + CO ₂ + 2.42866 XR

12	$2.15003 \text{ Gliext} + 3.92589 \text{ ATP} + 1.35375 \text{ O} = 3.92589 \text{ ADP} + \text{CO}_2 + 2.79642 \text{ XR}$
13	$1.68899 \text{ Gliext} + 1.15368 \text{ ATP} + 1.50397 \text{ O} = 1.15368 \text{ ADP} + \text{CO}_2 + 2.14638 \text{ XR}$
14	$\text{Gliext} + 5.73441 \text{ ADP} + 2.37002 \text{ O} = 5.73441 \text{ ATP} + 1.31229 \text{ CO}_2 + 1.10156 \text{ XR}$
15	$1.52743 \text{ Gliext} + 29.0113 \text{ ADP} + 9.587 \text{ O} = 29.0113 \text{ ATP} + 4.90905 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
16	$1.57255 \text{ Gliext} + 30.7441 \text{ ADP} + 10.1285 \text{ O} = 30.7441 \text{ ATP} + 5.1798 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
17	$1.4823 \text{ Gliext} + 27.2785 \text{ ADP} + 9.0455 \text{ O} = 27.2785 \text{ ATP} + 4.6383 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
18	$\text{Gliext} + 37.6667 \text{ ADP} + 12 \text{ O} = 37.6667 \text{ ATP} + 6 \text{ CO}_2$

Tabela 11 – Modos elementares gerados pelo software Metatool para a etapa de produção.

1	$\text{ATP} = \text{ADP}$
2	$\text{ATP} = \text{ADP}$
3	$\text{ATP} = \text{ADP}$
4	$220.797 \text{ Gliext} + 3763.67 \text{ ADP} + 1293 \text{ O} = 3763.67 \text{ ATP} + 629.565 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
5	$1.4204 \text{ Gliext} + 23.6593 \text{ ADP} + 8.3027 \text{ O} = 23.6593 \text{ ATP} + 4.2669 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
6	$\text{Gliext} + 37 \text{ ADP} + 12 \text{ O} = 37 \text{ ATP} + 6 \text{ CO}_2$
7	$\text{Gliext} + 35 \text{ ADP} + 12 \text{ O} = 35 \text{ ATP} + 6 \text{ CO}_2$
8	$2.49973 \text{ Gliext} + 6.02862 \text{ ATP} + 1.2398 \text{ O} = 6.02862 \text{ ADP} + \text{CO}_2 + 3.28947 \text{ XR}$
9	$226.313 \text{ Gliext} + 642.265 \text{ ATP} + 63.8606 \text{ O} = 642.265 \text{ ADP} + 32.1168 \text{ CO}_2 + 148.172 \text{ XR} + \text{AMBLY}$
10	$253.425 \text{ Gliext} + 5217.7 \text{ ADP} + 1684.54 \text{ O} = 5217.7 \text{ ATP} + 825.333 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
11	$1.61722 \text{ Gliext} + 32.4593 \text{ ADP} + 10.6645 \text{ O} = 32.4593 \text{ ATP} + 5.4478 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
12	$493.052 \text{ Gliext} + 10027.3 \text{ ADP} + 3264.72 \text{ O} = 10027.3 \text{ ATP} + 1632.55 \text{ CO}_2 + 148.172 \text{ XR} + \text{AMBLY}$
13	$\text{Gliext} + 38 \text{ ADP} + 12 \text{ O} = 38 \text{ ATP} + 6 \text{ CO}_2$
14	$137 \text{ Gliext} + 746.971 \text{ ADP} + 287.435 \text{ O} = 746.971 \text{ ATP} + 126.783 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
15	$\text{Gliext} + 5.56679 \text{ ADP} + 2.31668 \text{ O} = 5.56679 \text{ ATP} + 1.28633 \text{ CO}_2 + 1.10767 \text{ XR}$
16	$234.869 \text{ Gliext} + 1291.79 \text{ ADP} + 514.166 \text{ O} = 1291.79 \text{ ATP} + 252.674 \text{ CO}_2 + 108.406 \text{ XR} + \text{AMBLY}$
17	$136.458 \text{ Gliext} + 720.954 \text{ ADP} + 280.93 \text{ O} = 720.954 \text{ ATP} + 123.53 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
18	$118.355 \text{ Gliext} + 147.986 \text{ ATP} + 63.6957 \text{ O} = 147.986 \text{ ADP} + 14.913 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
19	$1.88919 \text{ Gliext} + 2.3575 \text{ ATP} + 1.43874 \text{ O} = 2.3575 \text{ ADP} + \text{CO}_2 + 2.42866 \text{ XR}$
20	$2.15003 \text{ Gliext} + 3.92589 \text{ ATP} + 1.35375 \text{ O} = 3.92589 \text{ ADP} + \text{CO}_2 + 2.79642 \text{ XR}$
21	$1.68899 \text{ Gliext} + 1.15368 \text{ ATP} + 1.50397 \text{ O} = 1.15368 \text{ ADP} + \text{CO}_2 + 2.14638 \text{ XR}$
22	$\text{Gliext} + 5.73441 \text{ ADP} + 2.37002 \text{ O} = 5.73441 \text{ ATP} + 1.31229 \text{ CO}_2 + 1.10156 \text{ XR}$
23	$138.232 \text{ Gliext} + 794.275 \text{ ADP} + 302.217 \text{ O} = 794.275 \text{ ATP} + 134.174 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
24	$245.134 \text{ Gliext} + 4899.32 \text{ ADP} + 1585.04 \text{ O} = 4899.32 \text{ ATP} + 775.587 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
25	$230.225 \text{ Gliext} + 4326.8 \text{ ADP} + 1406.13 \text{ O} = 4326.8 \text{ ATP} + 686.13 \text{ CO}_2 + \text{AMBLY}$
26	$1.52743 \text{ Gliext} + 29.0113 \text{ ADP} + 9.587 \text{ O} = 29.0113 \text{ ATP} + 4.90905 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
27	$1.57255 \text{ Gliext} + 30.7441 \text{ ADP} + 10.1285 \text{ O} = 30.7441 \text{ ATP} + 5.1798 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
28	$1.4823 \text{ Gliext} + 27.2785 \text{ ADP} + 9.0455 \text{ O} = 27.2785 \text{ ATP} + 4.6383 \text{ CO}_2 + \text{XR}$
29	$\text{Gliext} + 37.6667 \text{ ADP} + 12 \text{ O} = 37.6667 \text{ ATP} + 6 \text{ CO}_2$

A partir dos modos elementares, foi realizada a análise de fluxos metabólicos. Nessa análise, as velocidades de consumo e produção específicas de substratos e produtos foram obtidas por meio de uma regressão linear a partir dos dados experimentais dessas variáveis durante a etapa correspondente com velocidade

específica de formação de células constante. Os gráficos com as regressões estão ilustrados no ANEXO IV e os resultados das velocidades de consumo e produção específicas (fluxos) estão mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Velocidades específicas de consumo e produção dos metabólitos externos.

	$V_{células}$ (mmol/gDCW.h)	$V_{glicose}$ (mmol/gDCW.h)	V_{O_2} (mmol/gDCW.h)	V_{CO_2} (mmol/gDCW.h)	$V_{ác.acético}$ (mmol/gDCW.h)	$V_{proteína}$ (mmol/gDCW.h)
Batelada	2,65	2,54	15,30	5,40	-1,16	-
Batelada alimentada	1,85	2,99	15,75	7,17	-	-
Produção	0,70	1,66	13,94	6,50	0,01	0,0041

O balanço de carbono foi realizado para cada etapa no intuito de verificar a consistência dos dados experimentais. A Tabela 13 mostra que na etapa de batelada, a razão de carbono dos produtos em relação aos substratos é menor do que 1, ou seja; o fluxo de carbono dos produtos medidos é menor do que deveria ser. Isso indica que: ou a medida de glicose está superestimada (existe um erro de medida dessa variável acima do real), ou a(s) medida(s) de produto(s) está(ão) subestimada(s). Poderia indicar ainda que algum subproduto foi produzido ao longo do ensaio, mas não foi levado em consideração na rede metabólica. No entanto, os perfis das cromatografias líquidas realizadas ao longo do ensaio mostram que no período considerado para a análise de fluxos não houve a formação de subprodutos. A mesma análise é válida para a etapa de batelada alimentada, em que a razão saída-entrada foi de 0,83.

Na etapa de produção da proteína o balanço de carbono é maior do que 1, indicando que ou a medida da glicose está subestimada ou as dos produtos estão superestimadas. Vale observar que no balanço de carbono não foi considerada a formação de ácido lático mostrada nos cromatogramas do ensaio; se fosse considerada, o balanço de carbono seria ainda maior que 1,20. Para a análise de fluxo dessa etapa, a formação dos dois subprodutos: ácido acético e lático não foi considerada, pois caso contrário poderia levar à uma distribuição de fluxos com um acúmulo de erro.

Tabela 13 – Resultados do balanço de carbono para o ensaio.

	V _{células} (gC/gDCW.h)	V _{glicose} (gC/gDCW.h)	V _{CO₂} (gC/gDCW.h)	V _{ác.acético} (gC/gDCW.h)	V _{proteína} (gC/gDCW.h)	Balanço C	Razão saída/entrada
Batelada	0,13	0,18	0,06	-0,03	-	0,01	0,92
Batelada alimentada	0,09	0,22	0,07	-	-	0,05	0,83
Produção	0,03	0,12	0,08	0,00	0,03	-0,02	1,20

As Tabelas 14, 15 e 16 mostram a comparação entre os fluxos dos metabólitos calculados pela regressão linear e pelo programa em Matlab® utilizando os modos elementares das Tabelas 9 a 11. O erro entre esses dois métodos ultrapassou 20% para o CO₂ na etapa de batelada e para a proteína na etapa de produção. No caso do CO₂ isso se deve pela sua baixa massa molar e fração de carbono na molécula, fazendo com que maiores alterações no seu fluxo leve a um impacto menor no balanço de carbono em relação às outras espécies. Em relação à proteína, por ser a espécie com menor velocidade específica dentre os demais, a alteração na sua velocidade também é a que gera um menor impacto no balanço de carbono.

Tabela 14 – Fluxos dos metabólitos externos calculados por regressão linear e pelo software Matlab® para a etapa de batelada.

	V _{células} (mmol/gDCW.h)	V _{glicose} (mmol/gDCW.h)	V _{O₂} (mmol/gDCW.h)	V _{CO₂} (mmol/gDCW.h)	V _{ác.acético} (mmol/gDCW.h)	V _{proteína} (mmol/gDCW.h)
Regressão	2,65	2,54	15,30	5,40	-1,16	-
Matlab®	2,41	2,56	14,29	7,42	-1,16	-
Erro	9,2%	-0,6%	6,6%	-37,4%	0	-

Tabela 15 – Fluxos dos metabólitos externos calculados por regressão linear e pelo software Matlab® para a etapa de batelada alimentada.

	V _{células} (mmol/gDCW.h)	V _{glicose} (mmol/gDCW.h)	V _{O₂} (mmol/gDCW.h)	V _{CO₂} (mmol/gDCW.h)	V _{ác.acético} (mmol/gDCW.h)	V _{proteína} (mmol/gDCW.h)
Regressão	1,85	2,99	15,75	7,17	-	-
Matlab®	1,96	2,71	15,40	7,92	-	-
Erro	-6,2%	9,2%	2,2%	-10,5%	-	-

Tabela 16 – Fluxos dos metabólitos externos calculados por regressão linear e pelo software Matlab® para a etapa de produção.

	V _{células} (mmol/gDCW.h)	V _{glicose} (mmol/gDCW.h)	V _{O₂} (mmol/gDCW.h)	V _{CO₂} (mmol/gDCW.h)	V _{ác.acético} (mmol/gDCW.h)	V _{proteína} (mmol/gDCW.h)
Regressão	0,70	1,66	13,94	6,50	-	0,0041
Matlab®	0,58	1,72	13,74	6,89	-	0,0013
Erro	16,4%	-3,5%	1,4%	-6,1%	-	67,6%

Com a contribuição dos modos elementares calculada pelo Matlab®, foram calculadas as velocidades específicas dos metabólitos internos à rede metabólica, resultando nas três “fotografias” ilustradas nas Figuras 20, 21 e 22, que representam a distribuição das vias metabólicas nas etapas de batelada, batelada alimentada e produção de proteína respectivamente. Como o balanço de carbono indicou que existem erros de medidas (ou a falta de medidas), as velocidades dos metabólitos internos que foram calculadas apresentam erro; e supõe que este erro está distribuído ao longo da rede metabólica.

Figura 20 – Distribuição dos fluxos metabólicos da etapa de batelada.

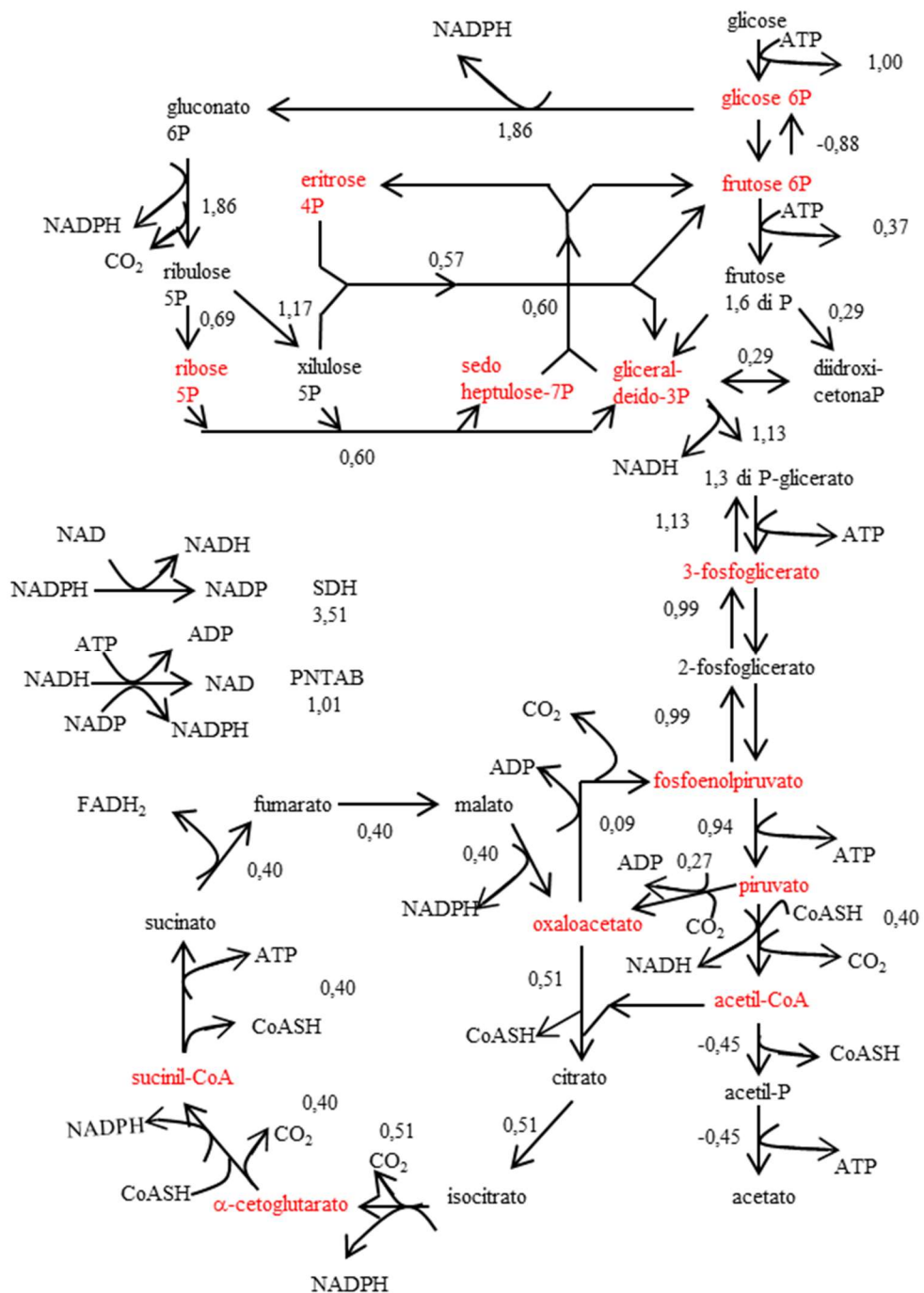


Figura 21 – Distribuição dos fluxos metabólicos da etapa de batelada alimentada.

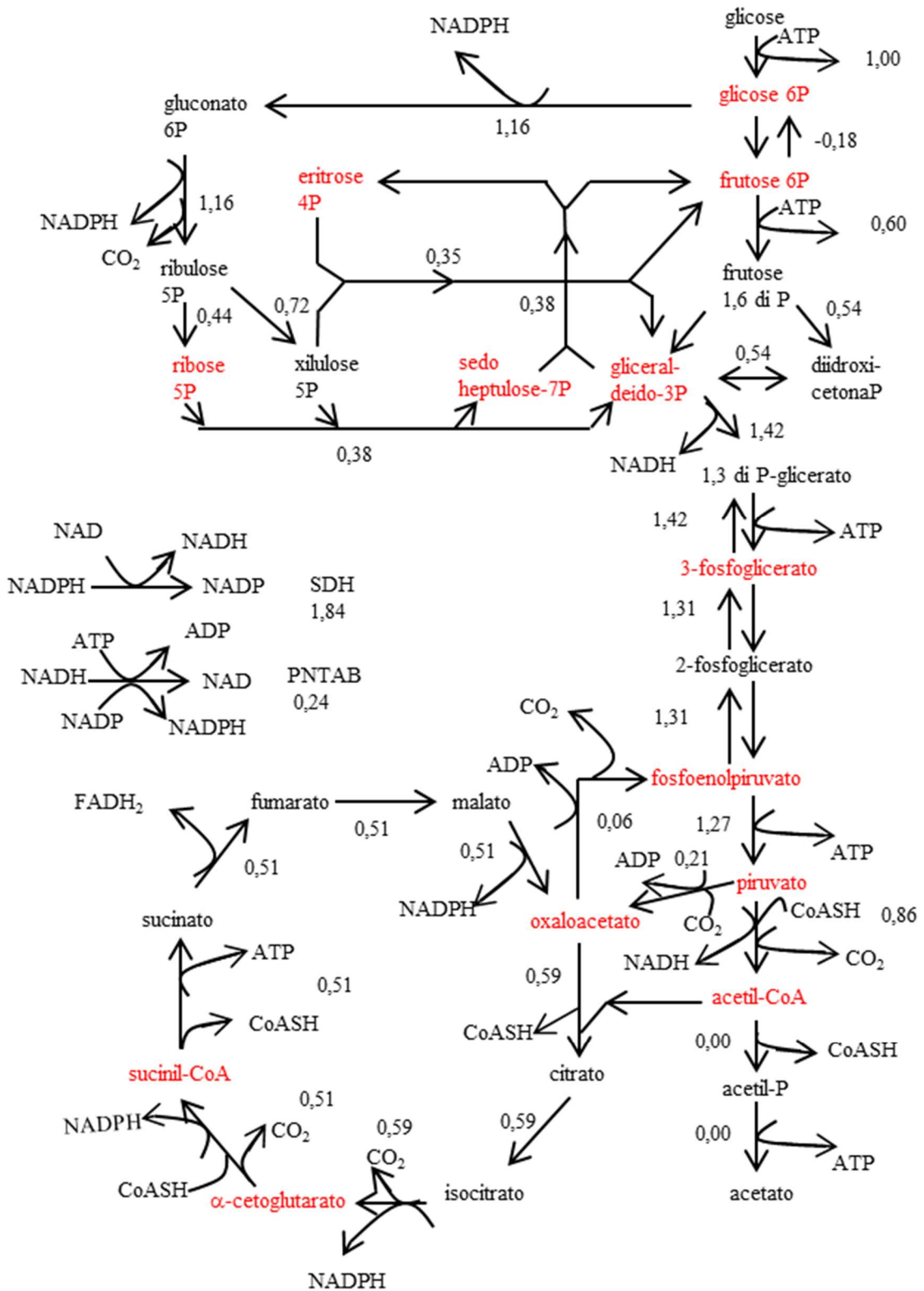
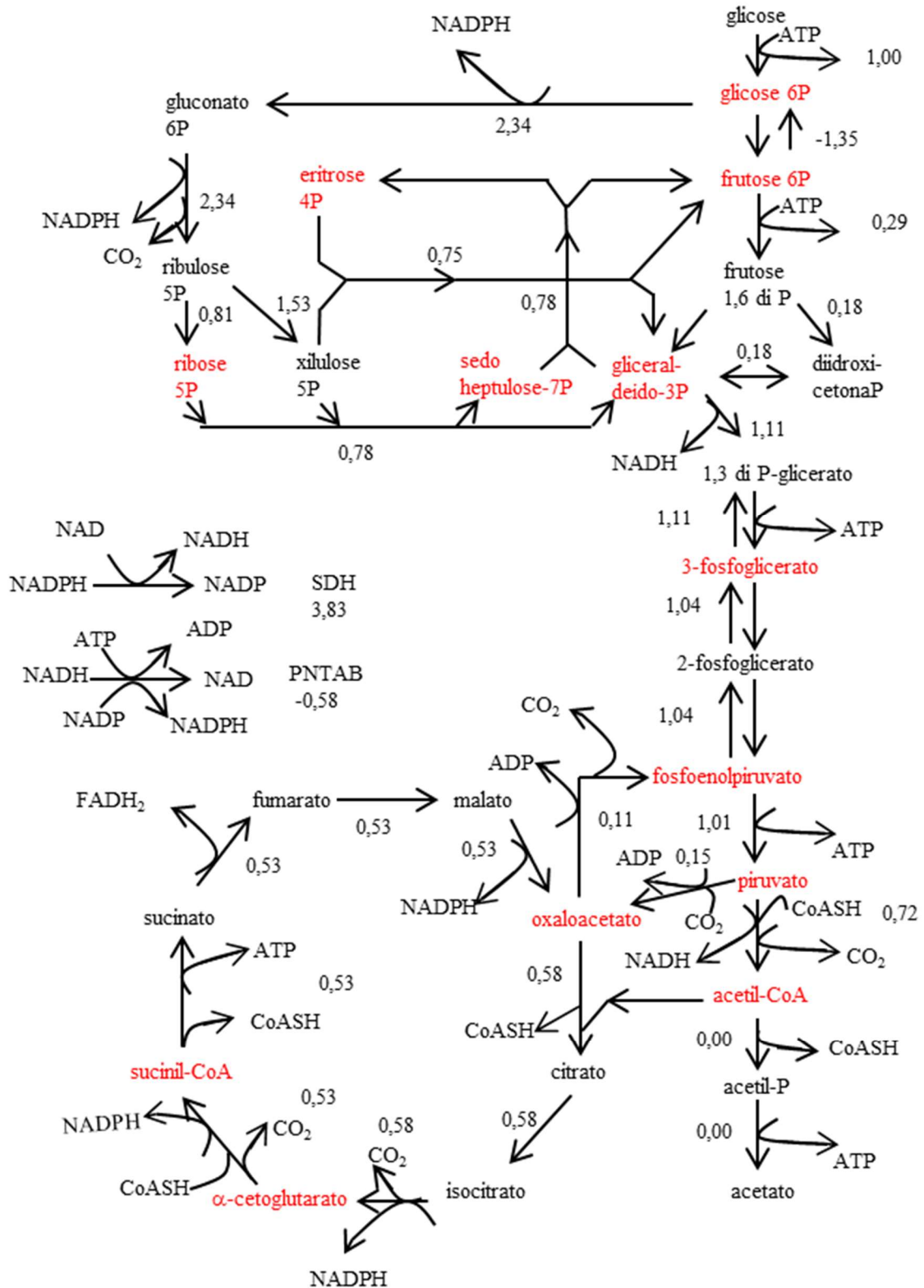


Figura 22 – Distribuição dos fluxos metabólicos da etapa de produção.



As Figuras 20, 21 e 22 mostram que a distribuição dos fluxos metabólicos da *Escherichia coli* não sofre grandes variações ao longo do processo de produção da

Amblyomin-X. Em todas as três “fotografias” vê-se a alta demanda por NADPH a partir da reversibilidade da frutose 6-fosfato a glicose 6-fosfato para aumentar o fluxo na via das pentoses. A maior parte do NADPH formado nas três etapas (94% na batelada, 79% na batelada alimentada e 82% na produção) é utilizada para reduzir o NAD a NADH, catalisado pela enzima transidrogenase solúvel. Além disso, de 25 a 30% da glicose é consumida no ciclo de Krebs, gerando de 1,71 a 2,17 mmol de coenzimas por grama de célula por hora que serão reoxidadas na cadeia de transporte de elétrons, formando ATP.

4.5 Modelagem metabólica

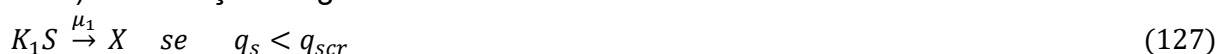
A modelagem matemática baseada num modelo não estruturado foi proposta com a finalidade de representar todos os fenômenos de limitação e inibição observados no processo de crescimento celular e produção da proteína recombinante. Esse modelo, após ter os seus parâmetros ajustados aos dados experimentais e validados estatisticamente foi empregado em um otimizador matemático para maximizar/minimizar uma função objetivo de interesse. O resultado obtido do otimizador, seja uma trajetória ótima, ou valores ótimos das variáveis dependentes ou independente, além de conferir grandes melhorias ao processo, pode ser empregado no controle e automação do processo.

Outra abordagem de modelagem metabólica foi proposta com o objetivo de monitorar o processo de crescimento celular em tempo real, evitando os fenômenos de limitação e inibição do processo por substratos e produtos do metabolismo. A ideia foi garantir a etapa de crescimento celular com elevadas concentrações e produtividades celulares. Essa obtenção é uma das condições necessárias para a obtenção de elevadas concentrações do produto após a etapa de indução.

A abordagem metabólica foi baseada em Costa et al. (2008), que propôs dividir o fluxo de glicose em diferentes vias do metabolismo, como mostrado no item 4.4.

O catabolismo da glicose contempla diferentes vias. Nesse caso, foram consideradas apenas três equações (Equações 127, 128 e 129):

1) A oxidação da glicose:



2) A fermentação da glicose:



3) A oxidação do acetato:



Onde:

X é a concentração celular (g/L);

S é a concentração de glicose (g/L);

A é a concentração de ácido acético (g/L);

μ_1 , μ_2 e μ_3 são as velocidades específicas de crescimento celular (h^{-1});

K_1 , K_2 , K_3 e K_4 são os coeficientes estequiométricos (g/g);

q_s é o fluxo de glicose em cada uma das reações metabólicas (g/(g.h));

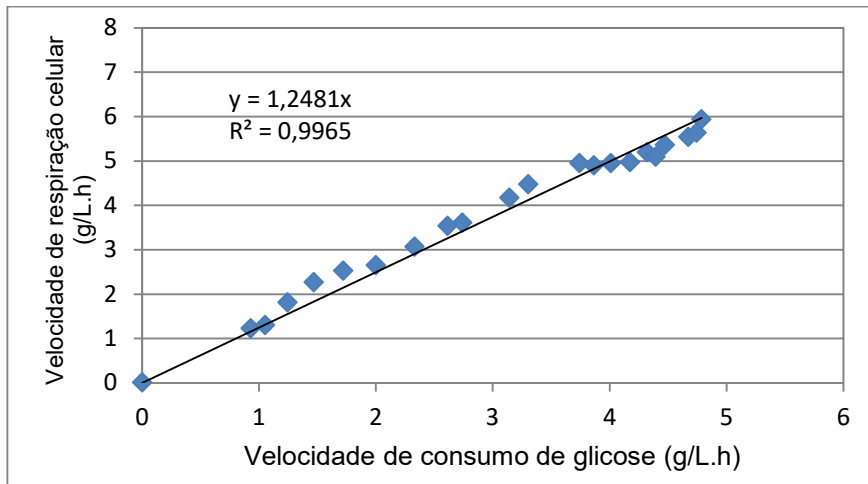
q_{scr} é o valor crítico do fluxo de glicose (g/(g.h));

As variáveis de estado volume, concentração celular, glicose e ácido acético para processos em biorreatores conduzidos em batelada alimentada são representadas pela equação geral mostrada pela Equações 130.

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -K_1 & -K_2 & 0 \\ 0 & K_3 & -K_4 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{bmatrix} - \frac{F_1}{V} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} + \frac{F_1}{V} \begin{bmatrix} 0 \\ S_0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (130)$$

Os valores das velocidades específicas foram os encontrados no balanço metabólico (item 4.4) e os valores do fluxo de glicose ao longo do tempo obtidos através da relação entre os valores da velocidade de respiração microbiana (OUR) (obtidos pelo balanço gasoso em tempo real dos ensaios experimentais) e os valores experimentais da velocidade de consumo de glicose. A relação observada está mostrada na Figura 23, com os dados experimentais do ensaio 3.

Figura 23 – Perfis de velocidade específica de crescimento e das concentrações de células, glicose e ácido acético ao longo do tempo.



Essa relação é representada pela Equação 131, onde:

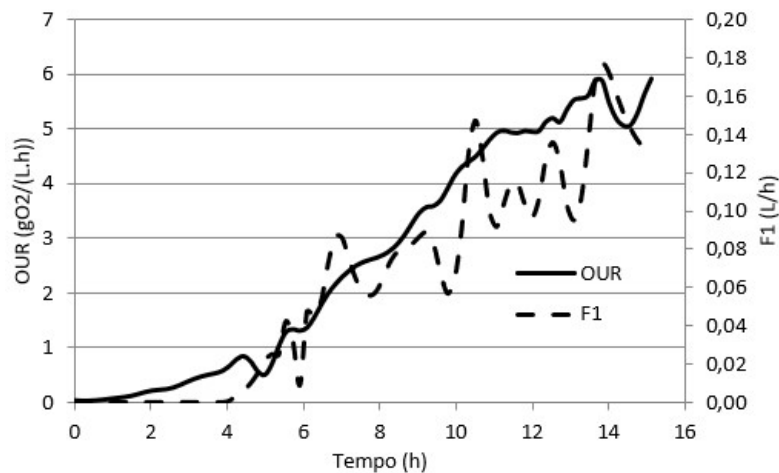
$$\text{OUR} = 1,2481 * \frac{dS}{dt} \quad (r2 = 0,9779) \quad (131)$$

Sendo que:

$$q_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (132)$$

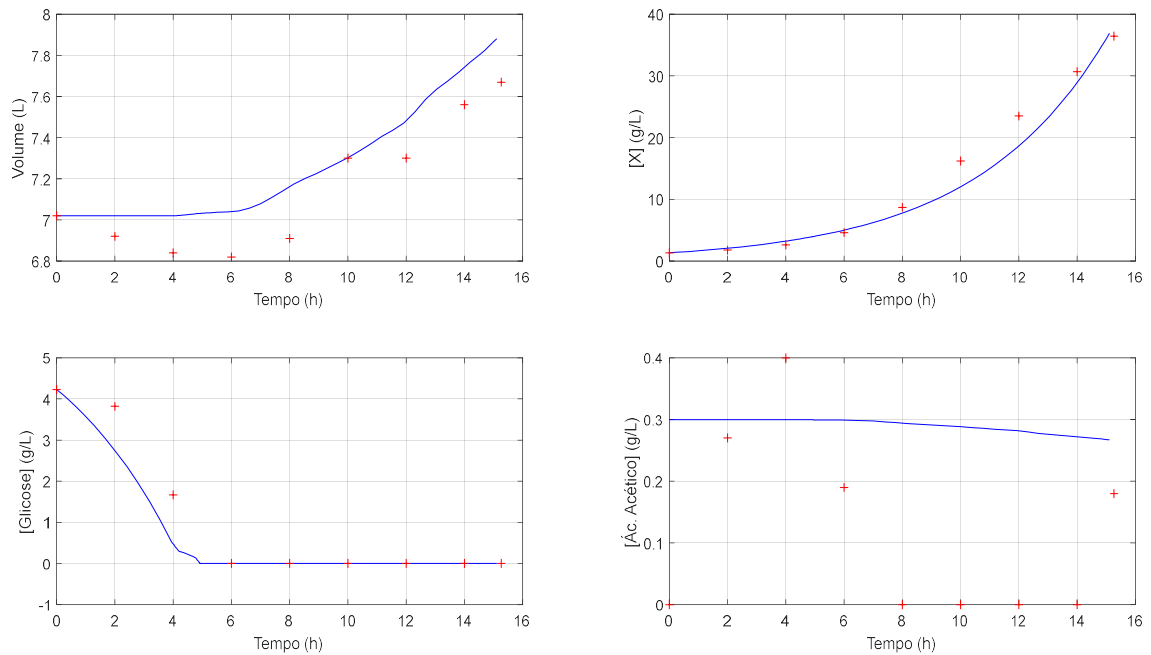
Para a simulação e a verificação da aplicabilidade do modelo foram empregados os dados experimentais do ensaio 3. Os dados de OUR e de vazão de alimentação que alimentaram o modelo são mostrados na Figura 24.

Figura 24 – Perfil da vazão de alimentação de glicose (F1) empregada no Ensaio %% e a velocidade de respiração celular registrada no ensaio.



A simulação do modelo foi feita com o auxílio do software Matlab® (ANEXO VII) e o resultado para os dados do ensaio 3 é mostrado na Figura 25.

Figura 25 – Perfis das variáveis de estado volume, concentração celular, de glicose e de ácido acético a partir dos dados experimentais de velocidade de respiração para o ensaio 3. Os pontos vermelhos são experimentais e a linha contínua azul os dados simulados pelo modelo.



O resultado mostra que essa abordagem pode ser facilmente empregada como uma forma de estimar as concentrações celulares e de ácido acético, através de dados em tempo real da velocidade de respiração microbiana (OUR) proveniente do balanço gasoso. O emprego dessa modelagem como monitoramento do processo possibilita a verificação em tempo real da produção de ácido acético, evitando a perda de ensaios pela inibição desse subproduto.

5 CONCLUSÃO

Foram conduzidos com sucesso 38 ensaios em biorreatores de 15 L para diferentes concentrações celulares e da proteína Amblyomin-X.

A condução desses 38 ensaios permitiu observar que: i) a produção de proteínas recombinantes é diretamente proporcional à concentração celular; ii) a obtenção de elevadas produtividades celulares depende da máxima transferência de oxigênio no meio de cultivo; iii) a observação do fenômeno de *overflow* metabólico em *Escherichia coli*, quando cultivada em glicose, exige estratégias de condução de processo sob condições limitantes da fonte de carbono.

Das observações desses 38 ensaios foi possível propor um modelo matemático fenomenológico não estruturado para a produção da proteína recombinante Amblyomin-X contendo 14 variáveis de estado, 1 variáveis operacionais e 30 parâmetros, contemplando os fenômenos observados de limitação por glicose, de limitação por oxigênio dissolvido e de inibição por ácido acético.

Foi possível ajustar os 30 parâmetros do modelo fenomenológico não estruturado e validá-lo estatisticamente, utilizando o método de Nelder e Mead descrito no programa em Fortran AJPARG. Dessa validação, concluiu-se que o modelo conseguiu representar os fenômenos mais significativos na condução dos cultivos com a *Escherichia coli* BL21(DE3) expressando a proteína Amblyomin-X, tanto na etapa de crescimento celular, como na etapa de expressão da proteína.

A obtenção de um modelo fenomenológico não estruturado ajustado e validado permitiu maximizar a concentração celular no momento anterior à indução, otimização essa utilizando o software Matlab®.

A concentração celular máxima obtida foi de 30,54 g/L no tempo de 15 h, resultando na produtividade celular de 2,04 g/L.h.

A concentração de proteína Amblyomin-X resultante dessa condução otimizada foi de 6 g/L, obtida através da simulação do modelo matemático validado.

A capacidade máxima de transferência de oxigênio determina os valores das produtividades celulares finais. Portanto, o valor do coeficiente de transferência de oxigênio ($k_L a$) do biorreator empregado deve ser medido com precisão, pois é fundamental na definição do melhor protocolo de processo de produção da proteína

Amblyomin-X. O valor máximo empregado do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) do biorreator de 15 L empregado foi de 1300 h^{-1} .

Os problemas mais frequentes encontrados durante as buscas de perfis ótimos de alimentação foram os de convergência em pontos de mínimo local, ou aqueles inerentes aos métodos de otimização.

Na análise de fluxos metabólicos, foi possível encontrar a distribuição dos fluxos da *Escherichia coli* na produção da proteína Amblyomin-X, verificando que não há diferenças significativas na distribuição de fluxos ao longo de todo o processo.

Através desses fluxos foi possível observar que: i) a máxima velocidade específica de crescimento celular, sob as condições de não limitação da glicose, foi de $0,24 \text{ h}^{-1}$; ii) a máxima velocidade específica de crescimento celular, sob as condições de não produção de ácido acético, foi de $0,22 \text{ h}^{-1}$.

A compreensão e a estimativa do fluxo de carbono a partir da velocidade de respiração microbiana também permitiu a proposição de um outro modelo matemático para o monitoramento da produção de ácido acético em tempo real.

REFERÊNCIAS

- AIBA, S., SHODA, M. (1969). Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 47, 790-794.
- AIBA, S., SHODA, M., NAGATANI, M. (1968). Kinetics of product formation in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 845-864.
- AKAGI, E. M., JÚNIOR, P. L., SIMONS, S. M., BELLINI, M. H., BARRETO, S. A., CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. (2012). Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 66(1), 64-69.
- ANDREWS, J. F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 707-723.
- AUGUSTO, E. E. F. P.; BONOMI, A.; GUIDICI, R. Estratégias para ajuste de parâmetros em modelos de processos fermentativos inibidos pelo substrato e produto. Estudos de casos. 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Anais vol. 1, páginas 1252-1257, 1994.
- BAILEY, J. E. (1998). Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Prog.*, 14, 8-20.
- BASTIN, G., DOCHAIN, D. (1990). *Online estimation and adaptive control of bioreactors*. Netherlands: Elsevier.
- BATISTA, I. F., CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M., FARIA, F., SIMONS, S. M., BARROS-BATESTTI, D. M., LABRUNA, M. B., et al. (2008). Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*, 51(5), 823-834.
- BATISTA, I. F., RAMOS, O. H., VENTURA, J. S., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L., HO, P. L., & CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. (2009). A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 493(2), 151-156.
- BOGAERTS, Ph., CASTILLO, J., HANUS, R. (1999). A general mathematical modelling technique for bioprocesses in engineering applications. *SAMS*, 35, 87-113.
- BONOMI, A., AUGUSTO, E. F. P., BARBOSA, N. S., MATTOS, M. N., MAGOSSO, L. R., SANTOS, A. L. (1993). Unstructured model proposal for the microbial oxidation of D-sorbitol to L-sorbose. *Journal of Biotechnology*, 31, 39-59.
- BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. D., AQUARONE, E. (2008). *Biotechnologia Industrial - Volume I: Fundamentos*. São Paulo: Blucher.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- CAMPANI, G., DOS SANTOS, M. P., DA SILVA, G. G., HORTA, A. C., BADINO, A. C., GIORDANO, R. D., et al. (2016). Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. *Chemical Engineering and Processing* 103, 63-69.
- CASADEMUNT, E., MARTINELLI, K., JERNBERG, M., WINGE, S., TIEMEYER, M., BIESERT, L., et al. (2012). The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur. J. Haematol.* 89, 165-176.
- CHOI, J. H., KEUM, K. C., & LEE, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 876-885.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M., DE-SÁ-JÚNIOR, P. L., SIMONS, S. M., MARIA, D. A., VENTURA, J. D., BATISTA, I. D., et al. (25 de Abril de 2010). A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon*, pp. 1145-1154.
- COCKSHOT, A. R., Bogle, I. D. L. (1999). Modelling the effects of glucose feeding on a recombinant *E. coli* fermentation. *Bioprocess Engineering*, 20, 83-90.
- COSTA, R., ROCHA, I., FERREIRA, E.C. Mathematical Modeling of recombinant *Escherichia coli* aerobic batch fermentations. Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR, Braga, Portugal, September 4-6, 2008.
- CUI, Y., MENG, Y., ZHANG, J., CHENG, B., YIN, H., GAO, C., et al. (2017). Efficient secretory expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a novel actinomycete signal peptide. *Protein Expression and Purification* 129, 69-74.
- FERNANDES, R. (2015). Medicamentos biológicos e biossimilares em Portugal: caracterização do mercado, do consumo e da segurança. *Dissertação de Mestrado*. Portugal.
- GOMBERT, A. K., & KILIKIAN, B. V. (1997). A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. *Brazilian Journal*.
- GUARDIA, M. J., CALVO, E. G. (2001). Modeling of *Escherichia coli* growth and acetate formation under different operational conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 449-455.
- Interfarma. (09 de Agosto de 2016). *Biofármacos: a nova geração de insumos para a indústria farmacêutica*. Acesso em 23 de Janeiro de 2018, disponível em <https://www.interfarma.org.br/noticias/1020>
- JIANG, M.-S., YANG, X., ESPOSITO, D., NELSON, E., YUAN, J., HOPKINS, R. F., et al. (2015). Mammalian cell transient expression, non-affinity purification, and characterization of human recombinant IGFBP7, an IGF-1 targeting therapeutic protein. *International Immunopharmacology*, 29(2):476-487.
- KRAUSE, M., NEUBAUER, A., & NEUBAUER, P. (2016). The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 15, 110-123.

- Ltda, L. P. (2014). *Manual de Medicamentos Biológicos e Biossimilares*. Acesso em 23 de Janeiro de 2018, disponível em <http://static.labnetwork.com.br.s3.amazonaws.com/wordpress/wp-content/uploads/2014/07/Manual-Medicamentos-Biol%C3%B3gicos-e-Biossimilares.pdf>
- MAIORELLA, B. L., WILKE, C. R., BLANCH, H. W. (1981). Alcohol production and recovery. *Adv. Biochem. Eng.*, 20, 43.
- MAKRIDES, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60(3):512–538.
- MANDERSON, D., DEMPSTER, R., & CHISTI, Y. (2006). A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33(3): 173-182.
- MARQUES, T. O. (2018). ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE AMBLYOMIN-X PELA BACTÉRIA *Escherichia coli* BL21DE3. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
- MARTÍNEZ, D. C. (2014). *Modeling bioreactors for the production of recombinant proteins in high-cell density cultures of Escherichia coli*. Barcelona, Espanha: Universitat Autònoma de Barcelona.
- MEGEE, R. D., DRAKE, J. F., FREDRICKSON, A. G., TSUCHIYA, H. M. (1972). Studies in intermicrobial symbiosis *S. cerevisiae* and *L. casei*. *Canadian J. Microbiol.*, 18, 1733-1742.
- MENEGALDO, L. L. (2001). MODELAGEM BIOMECÂNICA E CONTROLE ÓTIMO DA POSTURA HUMANA ATRAVÉS DE ALGORITMOS BASEADOS NA TEORIA DAS APROXIMAÇÕES CONSISTENTES. Tese de Doutorado, Escola Politécnica da USP.
- MONOD, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Hermann & Cie., Paris.
- NANCIB, N., MOSRATI, R., BOUDRANT, J. (1993). Modelling of batch fermentation of a recombinant *Escherichia coli* producing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on a complex selective medium. *The Chemical Engineering Journal*, 52, B35-B48.
- NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L., SCHAECHTER, M. (1990). *Physiology of the bacterial cell - A molecular approach*. Massachusetts: Sinauer Associates.
- PICCOLI, R. A. M. (2000). OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR VIA FERMENTATIVA, BASEADA NUM MODELO MATEMÁTICO ESTRUTURADO. Tese de Doutorado, Escola Politécnica da USP.
- PROVOST, A., BASTIN, G. (2004). Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition. *Journal of Process Control*, 14, 717-728.
- ROEVA, O., TZONKOV, S. (2006). Modelling of *Escherichia coli* Cultivations: Acetate inhibition in a fed-batch culture. *Bioautomation*, 4, 1-11.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U. D., AQUARONE, E., BORZANI, W. (2005). *Biotecnologia Industrial*. v.2. São Paulo: Edgard Blucher LTDA.

- STRYJEWSKA, A., KIEPURA, K., LIBROWSKI, T., LOCHYNSKI, S. (2013). Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports*, 65(5):1075-1085.
- TSAO, G. T. and HANSON, T. P. (1975). Extended Monod Equation for batch cultures with multiple exponential phases. *Biotechnology and Bioengineering*, v 23, p. 1591-1598.
- VOLYNETS, G. P., GORBATIUK, O. B., KUKHARENKO, O. P., USENKO, M. O., YARMOLUK, S. M. (2016). Production of recombinant human apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 126, 89-92.
- ZINES, D. D., ROGERS, P. L. (1970). The effect of ethanol on continuous culture stability. *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 561-575.

ANEXO I – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS REALIZADOS

Tabela 17 – Dados experimentais do ensaio 1.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	6,98	1,53	4,49	0,10	0,0064	0,00
1	2	6,93	1,86	3,75	0,00	0,0051	0,00
2	4	6,89	2,73	2,26	0,34	0,0022	0,00
3	6	6,88	4,73	0,00	0,34	0,0022	0,00
4	8	6,97	8,55	0,00	0,10	0,0017	0,00
5	10,0	7,11	14,74	0,00	0,12	0,0020	0,00
6	12,0	7,32	23,04	0,00	0,18	0,0018	0,00
7	14	7,64	31,25	0,00	0,40	0,0008	0,00
8	15,8	7,73	36,15	0,00	0,16	0,0006	0,00
9	16,8	7,75	40,04	0,00	0,22	0,0016	2,11
10	17,8	7,77	40,82	0,00	0,18	0,0015	4,44
11	18,8	7,79	46,65	0,00	0,18	0,0016	5,59

Tabela 18 – Dados experimentais do ensaio 2.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	6,67	1,33	4,21	0,00	0,0063	0,00
1	2	6,49	1,51	3,62	0,00	0,0055	0,00
2	4	6,27	2,09	2,55	0,26	0,0026	0,00
3	6	6,11	3,52	0,45	0,00	0,0025	0,00
4	8	5,97	5,31	0,28	0,00	0,0017	0,00
5	10,1	5,87	8,96	0,00	0,00	0,0018	0,00
6	12,1	5,81	13,71	0,00	0,35	0,0014	0,00
7	14	5,34	18,45	0,00	0,28	0,0013	0,00
8	16,1	5,78	26,35	0,25	0,37	0,0013	0,00
9	16,9	4,96	29,23	0,00	0,24	0,0015	0,00
10	18,3	5,60	32,11	0,00	0,44	0,0003	3,18
11	19,3	5,46	29,23	0,00	0,39	0,0012	4,68
12	20,3	5,31	26,82	0,00	0,52	0,0013	5,31
13	21,3	5,18	35,68	0,00	0,51	0,0011	5,98

Tabela 19 – Dados experimentais do ensaio 3.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	7,02	1,34	4,23	0,00	0,0063	0,00
1	2	6,92	1,77	3,82	0,27	0,0043	0,00
2	4	6,84	2,64	1,67	0,40	0,0026	0,00
3	6	6,82	4,62	0,00	0,19	0,0021	0,00
4	8	6,91	8,72	0,00	0,00	0,0022	0,00
5	10	7,30	16,20	0,00	0,00	0,0018	0,00
6	12	7,30	23,51	0,00	0,00	0,0018	0,00
7	14	7,56	30,71	0,00	0,00	0,0018	-
8	15,3	7,67	36,46	0,00	0,18	0,0008	-
9	16,3	7,74	38,25	0,13	0,24	0,0011	-
10	17,3	7,79	40,74	0,09	0,26	0,0012	-
11	18,3	7,80	41,44	0,11	0,22	0,0013	5,42

Tabela 20 – Dados experimentais do ensaio 4.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)
0	0	7,00	1,37	4,14	0,00	0,0062
1	2	6,97	1,79	3,85	0,27	0,0040
2	4	6,94	2,77	1,48	0,35	0,0021
3	6	6,94	4,83	0,00	0,19	0,0016
4	8	7,07	8,69	0,00	0,00	0,0022
5	10,2	7,22	15,26	0,00	0,00	0,0018
6	12,2	7,43	23,28	0,00	0,00	0,0021
7	14	7,66	29,85	0,00	0,00	0,0019
8	15,2	7,75	35,92	0,00	0,29	0,0010
9	16,3	7,84	38,56	0,00	0,19	0,0012
10	17,3	7,86	38,72	0,00	0,22	0,0016
11	18,2	7,91	41,36	0,00	0,28	0,0013

Tabela 21 – Dados experimentais do ensaio 5.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	7,02	1,38	3,88	0,00	0,0062	0,00
1	2	6,99	1,77	3,65	0,27	0,0044	0,00
2	4	6,96	2,67	1,62	0,35	0,0024	0,00
3	6	6,95	4,57	0,00	0,13	0,0029	0,00
4	8	7,00	7,39	0,00	0,00	0,0026	0,00
5	10	7,11	11,37	0,00	0,00	0,0019	0,00
6	12,1	7,29	17,83	0,00	0,13	0,0025	0,00
7	14	7,46	24,72	0,00	0,00	0,0009	0,00
8	14,8	7,59	30,04	0,11	0,12	0,0010	-
9	17,3	7,68	35,45	0,15	0,28	0,0017	-
10	18,3	7,76	40,74	0,12	0,18	0,0013	-
11	19,3	7,78	42,92	0,15	0,23	0,0009	-
12	20,3	7,84	45,33	0,19	0,00	0,0009	5,16

Tabela 22 – Dados experimentais do ensaio 6.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	7,00	1,41	4,62	0,00	0,0062	0,00
1	2	6,98	1,81	3,91	0,30	0,0029	0,00
2	4	6,95	2,69	1,82	0,41	0,0020	0,00
3	6	6,95	4,67	0,00	0,19	0,0019	0,00
4	8	7,05	8,97	0,00	0,00	0,0018	0,00
5	10,2	7,18	14,45	0,00	0,00	0,0017	0,00
7	12,2	7,38	21,80	0,00	0,17	0,0017	0,00
8	14	7,63	28,57	0,00	0,00	0,0000	0,00
9	15,2	7,63	31,25	0,00	0,25	0,0022	-
10	16,4	7,73	38,49	0,10	0,19	0,0032	-
11	17,4	7,77	38,33	0,09	0,18	0,0021	-
12	18,4	7,82	35,45	0,16	0,30	0,0016	-
13	19,4	7,82	35,92	0,19	0,18	0,0046	6,20

Tabela 23 – Dados experimentais do ensaio 7.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	6,99	1,40	4,22	0,13	0,0060	0,00
1	2	6,94	1,87	3,90	0,30	0,0043	0,00
2	4	6,89	2,89	1,27	0,00	0,0027	0,00
3	6	6,91	5,15	0,00	0,00	0,0026	0,00
4	8	6,99	9,45	0,00	0,09	0,0027	0,00
5	10,0	7,12	15,26	0,00	0,10	0,0013	0,00
6	12,0	7,31	20,48	0,00	0,18	0,0012	0,00
7	14	7,56	25,65	0,00	0,28	0,0011	0,00
8	16,0	7,77	32,88	0,13	0,12	0,0018	0,00
9	18,0	8,01	40,28	0,18	0,15	0,0013	0,00
10	20,0	8,16	45,41	0,28	0,28	0,0014	0,00
11	21,2	8,23	48,21	0,00	0,21	0,0012	-
12	22,5	8,30	49,22	0,41	0,16	0,0014	-
13	23,5	8,36	55,21	0,47	0,28	0,0010	-
14	24,5	8,31	56,85	0,49	0,20	0,0014	-
15	25,5	8,35	59,80	0,49	0,28	0,0011	4,47

Tabela 24 – Dados experimentais do ensaio 8.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)
0	0	6,97	1,37	4,32	0,00	0,0061
1	2	6,92	1,60	3,80	0,21	0,0050
2	4	6,86	2,43	1,57	0,22	0,0013
3	6	6,81	3,85	0,42	0,13	0,0016
4	8	6,81	5,92	0,00	0,00	0,0023
5	10,0	6,92	10,03	0,00	0,15	0,0024
6	12,0	6,99	14,37	0,00	0,20	0,0017
7	14	7,16	22,38	0,00	0,22	0,0017
8	16,0	7,41	30,55	0,20	0,34	0,0025
9	17,6	7,57	37,01	0,25	0,39	0,0015
10	18,6	7,65	37,01	0,00	0,17	0,0018
11	19,6	7,69	43,23	0,28	0,40	0,0018
12	20,6	7,73	41,60	0,28	0,00	0,0018

Tabela 25 – Dados experimentais do ensaio 9.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	6,98	1,57	3,97	0,00	0,0059	0,00
1	0,5	6,96	1,75	3,81	0,00	0,0061	0,00
2	1	6,93	1,72	3,92	0,00	0,0057	0,00
3	1,5	6,90	1,77	3,65	0,29	0,0049	0,00
4	2	6,87	2,01	3,49	0,29	0,0038	0,00
5	2,5	6,84	2,09	3,09	0,30	0,0036	0,00
6	3	6,82	2,28	2,83	0,32	0,0025	0,00
7	3,5	6,80	2,36	2,10	0,32	0,0023	0,00
8	4	6,78	2,92	1,41	0,32	0,0018	0,00
9	4,5	6,76	3,08	0,69	0,30	0,0012	0,00
10	5	6,73	3,64	0,00	0,00	0,0050	0,00
11	5,5	6,72	3,71	0,00	0,00	0,0019	0,00
12	6	6,70	3,89	0,14	0,00	0,0015	0,00
13	6,5	6,69	3,96	0,26	0,00	0,0059	0,00
14	7	6,66	4,50	0,00	0,00	0,0060	0,00
15	7,5	6,65	4,68	0,00	0,00	0,0034	0,00
16	8,1	6,65	5,31	0,00	0,00	0,0031	0,00
17	8,5	6,64	5,69	0,00	0,00	0,0022	0,00
18	9	6,63	5,99	0,00	0,00	0,0023	0,00
19	9,5	6,64	6,82	0,00	0,00	0,0019	0,00
20	10,0	6,62	8,03	0,00	0,00	0,0017	0,00
21	10,5	6,62	8,84	0,00	0,00	0,0023	0,00
22	11	6,62	9,02	0,00	0,00	0,0024	0,00
23	11,5	6,63	12,36	0,00	0,00	0,0022	0,00
24	12	6,63	11,22	0,00	0,00	0,0021	0,00
25	12,5	6,64	12,01	0,00	0,00	0,0019	0,00
26	13	6,66	12,52	0,00	0,00	0,0015	0,00
27	13,5	6,69	14,37	0,00	0,00	0,0017	0,00
28	14	6,71	15,34	0,00	0,00	0,0019	0,00
29	14,5	6,74	16,78	0,00	0,00	0,0017	0,00
30	15	6,77	19,50	0,00	0,00	0,0016	0,00
31	15,5	6,81	19,81	0,00	0,00	0,0022	0,00
32	16	6,84	21,14	0,00	0,00	0,0028	0,00
33	16,5	6,89	24,05	0,00	0,28	0,0031	0,00
34	17	6,91	25,49	0,00	0,29	0,0031	0,00
35	17,5	6,95	25,80	0,00	0,30	0,0031	0,00
36	18	6,98	29,85	0,00	0,30	0,0016	0,00
37	18,9	7,06	31,41	0,00	0,33	0,0022	0,57
38	19,4	7,09	34,05	0,00	0,34	0,0016	1,67
39	19,9	7,13	33,12	0,00	0,34	0,0010	2,98
40	20,4	7,17	34,75	0,00	0,41	0,0009	4,15
41	20,9	7,20	36,00	0,00	0,37	0,0010	5,16
42	21,4	7,24	36,00	0,00	0,37	0,0011	5,23

43	21,9	7,29	37,94	0,00	0,36	0,0011	5,98
44	22,4	7,32	37,86	0,00	0,33	0,0014	7,17

Tabela 26 – Dados experimentais do ensaio 10.

Amostra	Tempo (h)	V (L)	X (g/L)	S ₁ (g/L)	P ₁ (g/L)	O ₂ (g/L)	P ₂ (g/L)
0	0	6,98	1,81	4,45	0,00	0,0063	0,00
1	1	7,01	1,97	4,32	0,00	0,0059	0,00
2	2	6,99	2,14	4,28	0,39	0,0047	0,00
3	3	6,96	2,43	3,26	0,43	0,0036	0,00
4	4	6,94	2,96	2,38	0,46	0,0015	0,00
5	5	6,93	3,60	0,00	0,40	0,0029	0,00
6	6	6,94	4,50	0,69	0,00	0,0023	0,00
7	7	6,93	5,75	0,00	0,00	0,0024	0,00
8	8	6,92	7,08	0,00	0,00	0,0021	0,00
9	9	6,91	9,29	0,00	0,00	0,0015	0,00
10	10	6,87	11,04	0,00	0,00	0,0018	0,00
11	11	6,94	13,32	0,00	0,20	0,0017	0,00
12	12	7,04	16,62	0,00	0,00	0,0012	0,00
13	13	7,13	18,45	0,00	0,00	0,0012	0,00
14	14	7,21	20,98	0,00	0,23	0,0000	0,00
15	15	7,29	21,95	0,00	0,39	0,0013	0,00
16	16	7,38	25,34	0,00	0,00	0,0013	0,00
17	17	7,45	26,70	0,00	0,00	0,0010	0,00
18	18	7,50	29,34	0,00	0,00	0,0012	0,00
19	18,8	7,53	31,02	0,00	0,00	0,0019	0,27
20	19,3	7,54	31,87	0,00	0,00	0,0018	1,32
21	20	7,54	36,85	0,00	0,00	0,0016	2,29
22	20,3	7,55	33,51	0,00	0,38	0,0014	3,65
23	20,8	7,57	36,46	0,00	0,00	0,0013	4,29
24	21,3	7,59	36,07	0,00	0,00	0,0012	-
25	21,8	7,61	36,62	0,00	0,00	0,0011	5,86
26	22,3	7,60	37,79	0,00	0,00	0,0010	6,68

ANEXO II – DADOS DE PROCESSO DOS ENSAIOS REGISTRADOS PELO MULTI FERMENTER COMPUTER SYSTEM (MFCS)

Figura 26 – Dados de processo do ensaio 1.

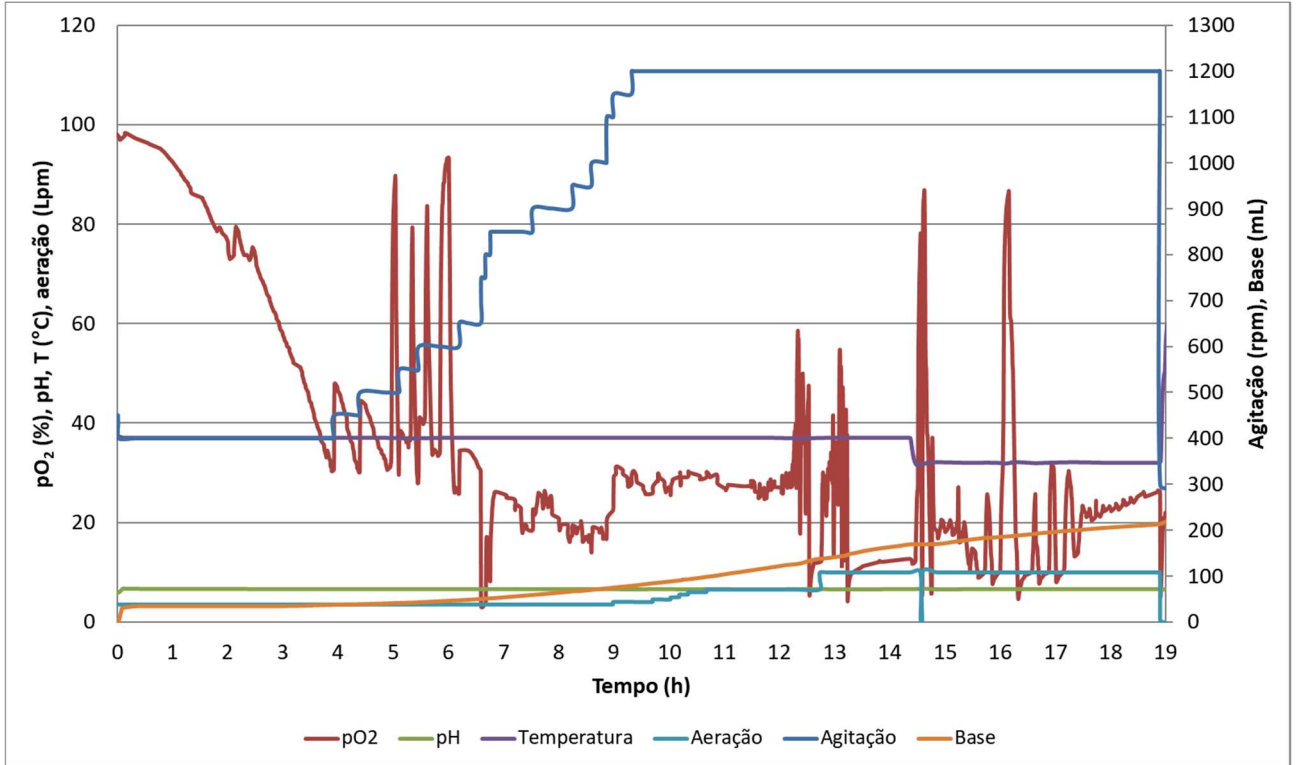


Figura 27 – Dados de processo do ensaio 2.

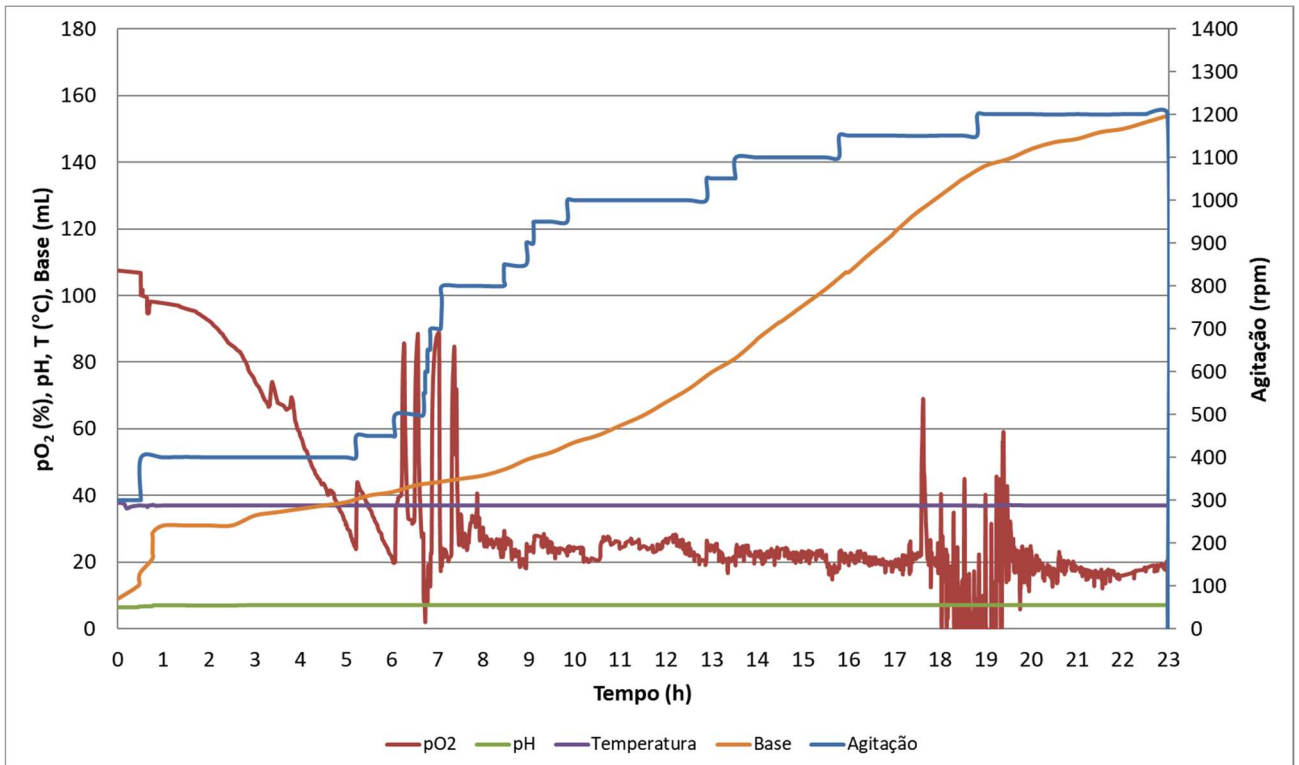


Figura 28 – Dados de processo do ensaio 3.

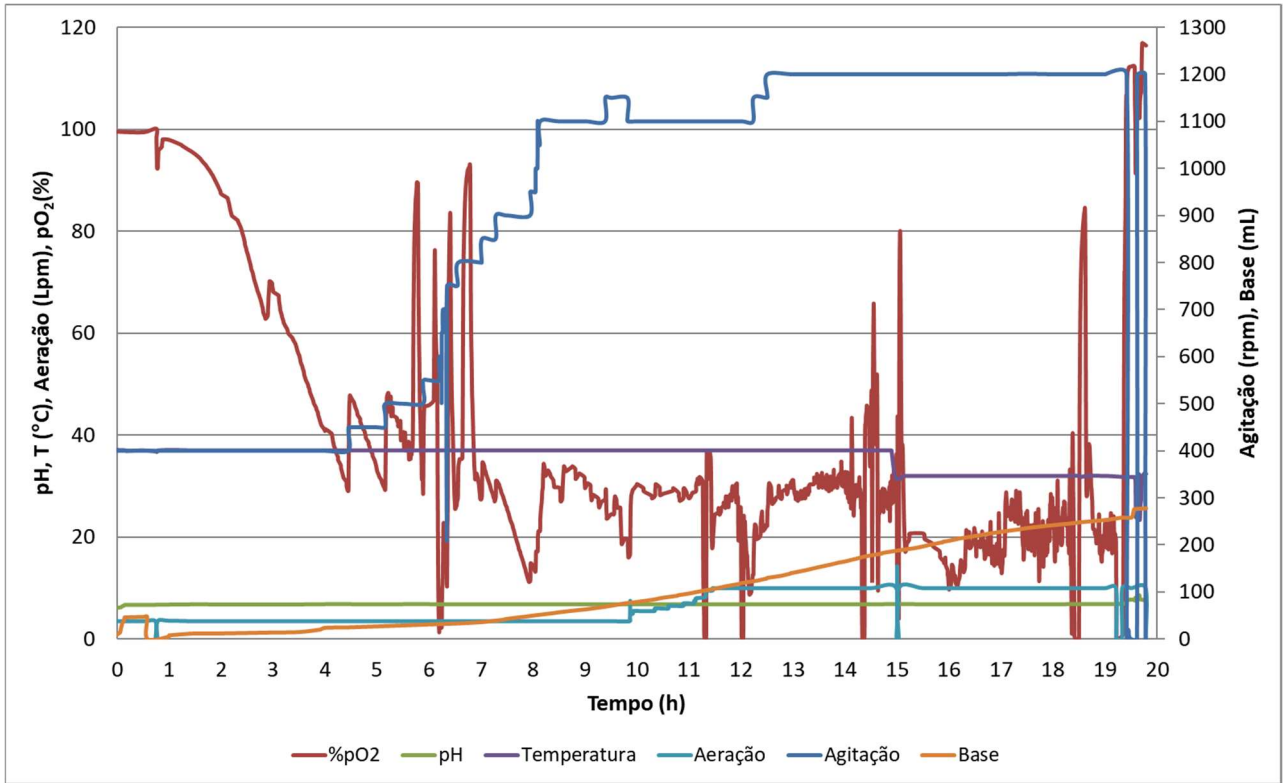


Figura 29 – Dados de processo do ensaio 4.

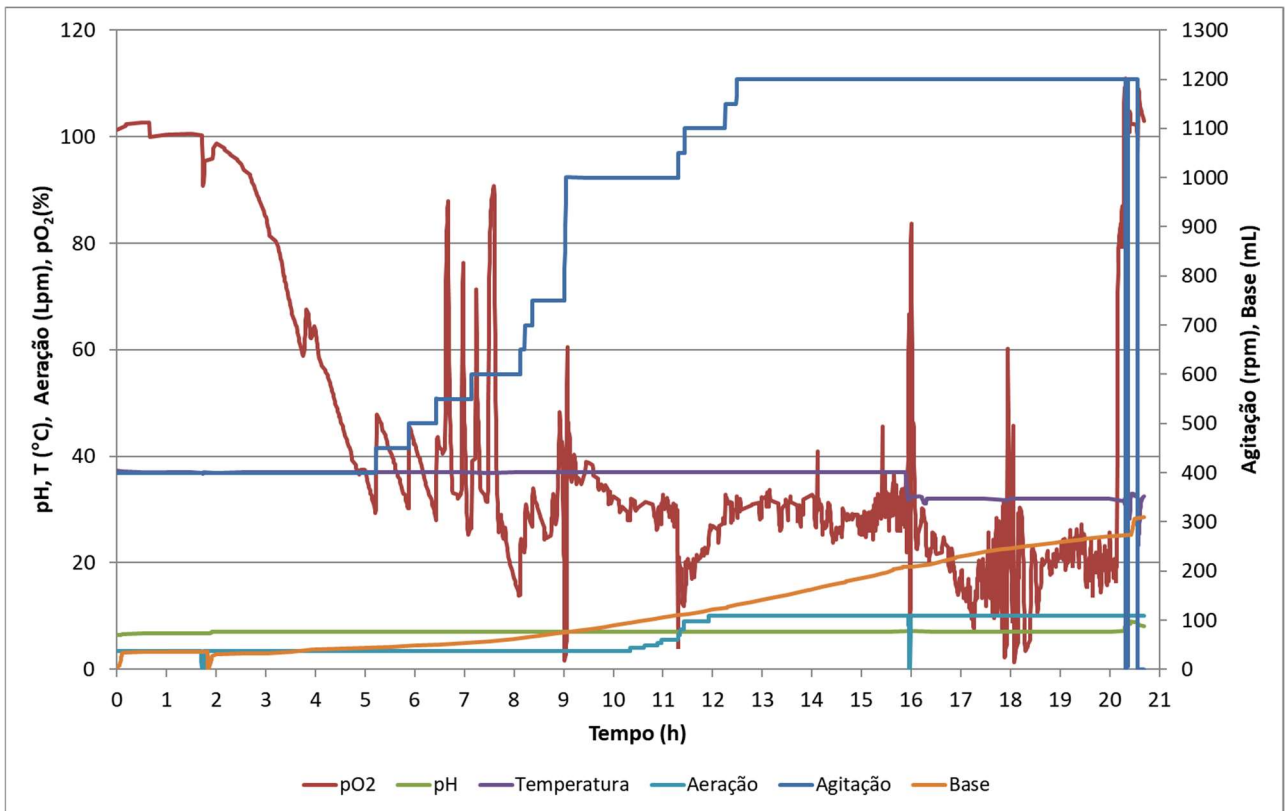


Figura 30 – Dados de processo do ensaio 5.

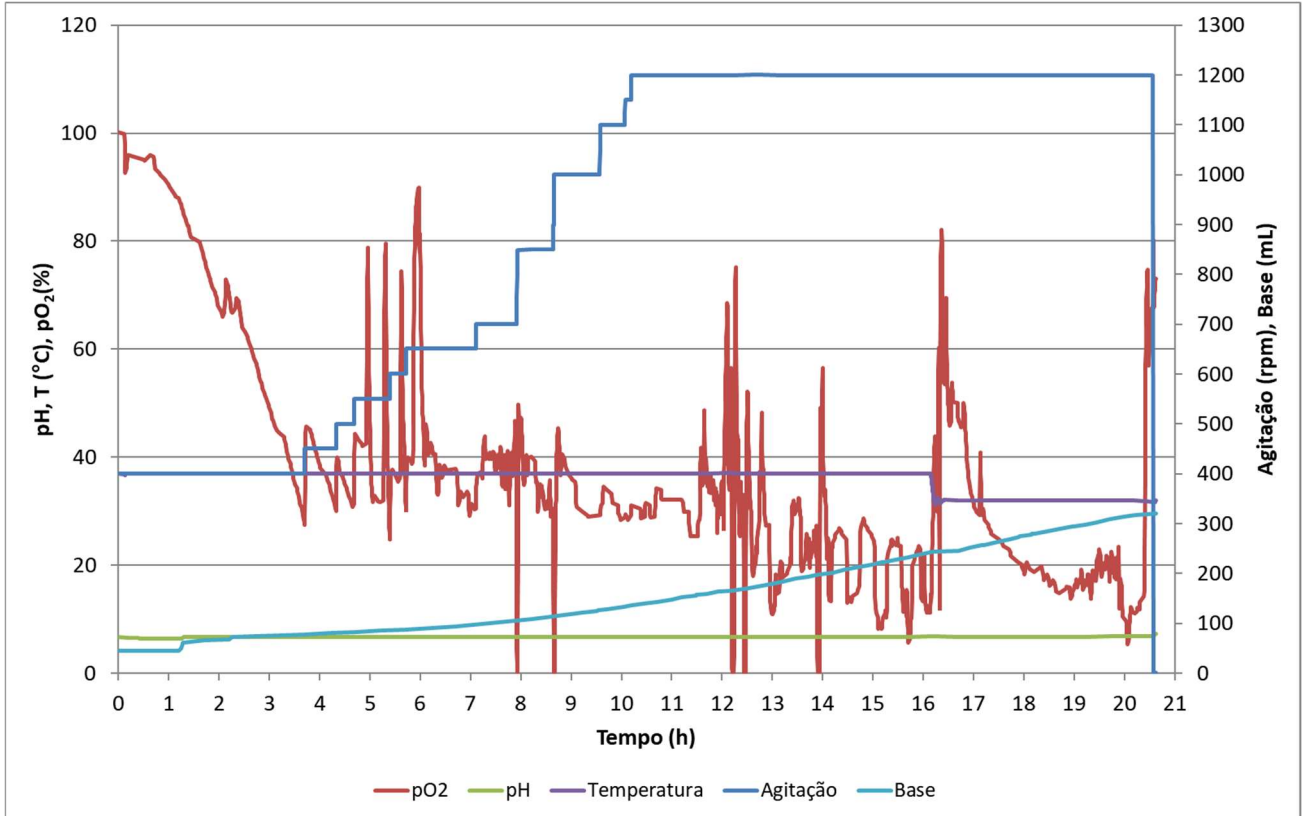


Figura 31 – Dados de processo do ensaio 6.

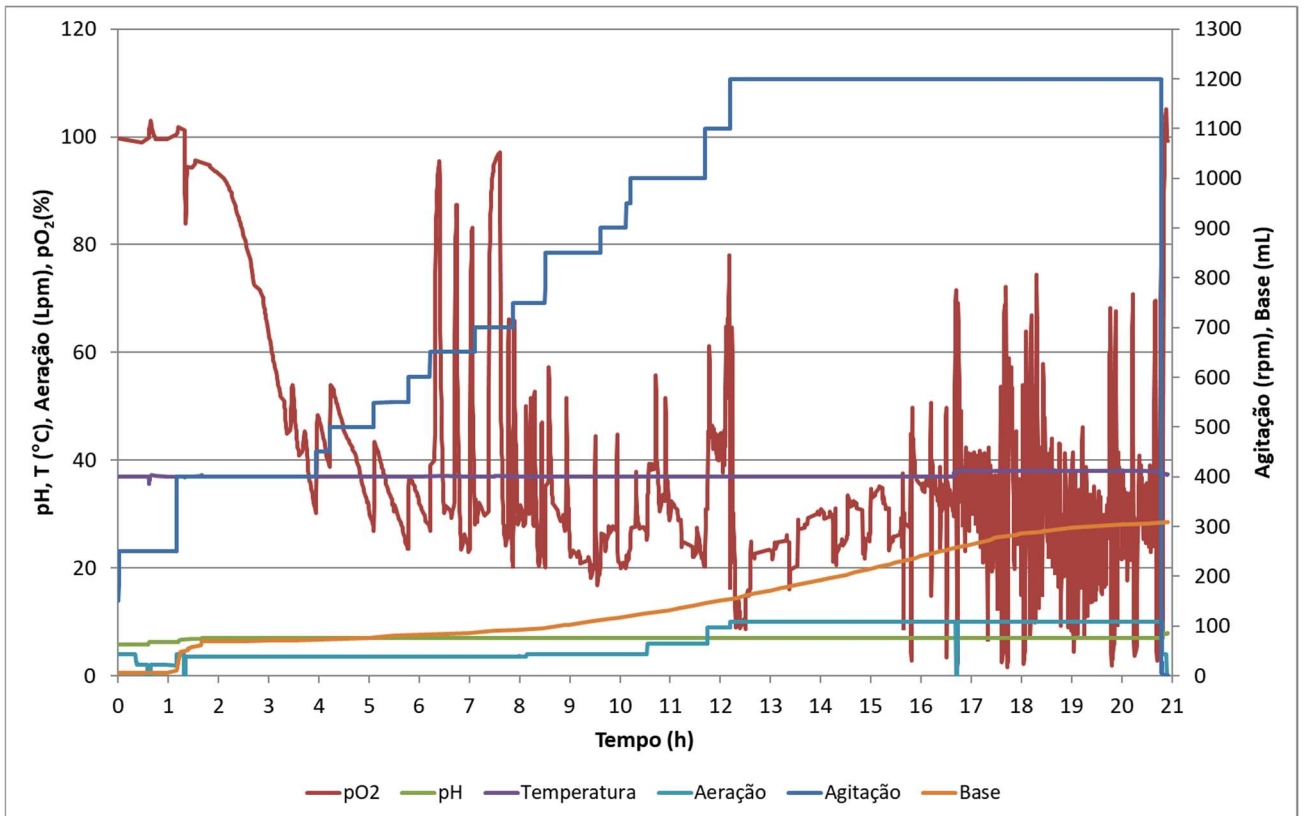


Figura 32 – Dados de processo do ensaio 7.

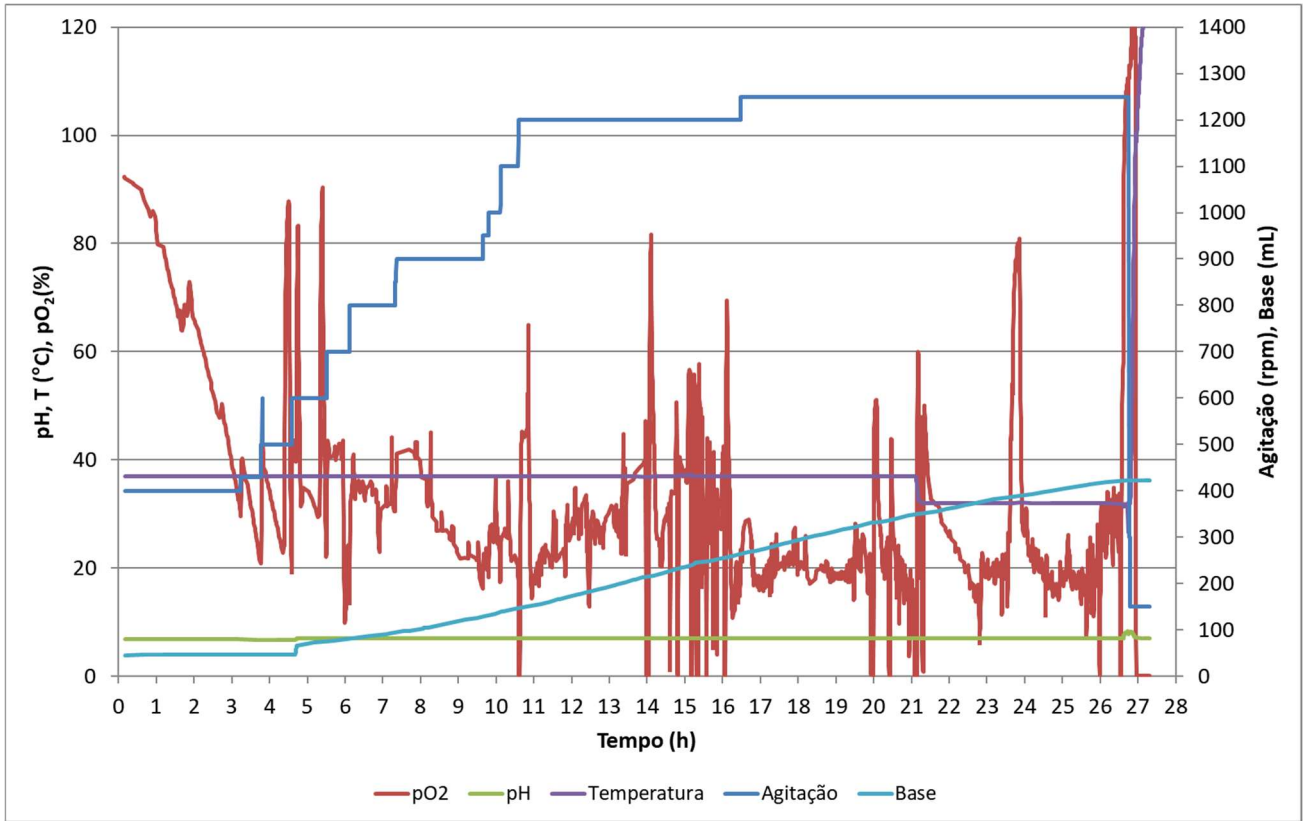


Figura 33 – Dados de processo do ensaio 8.

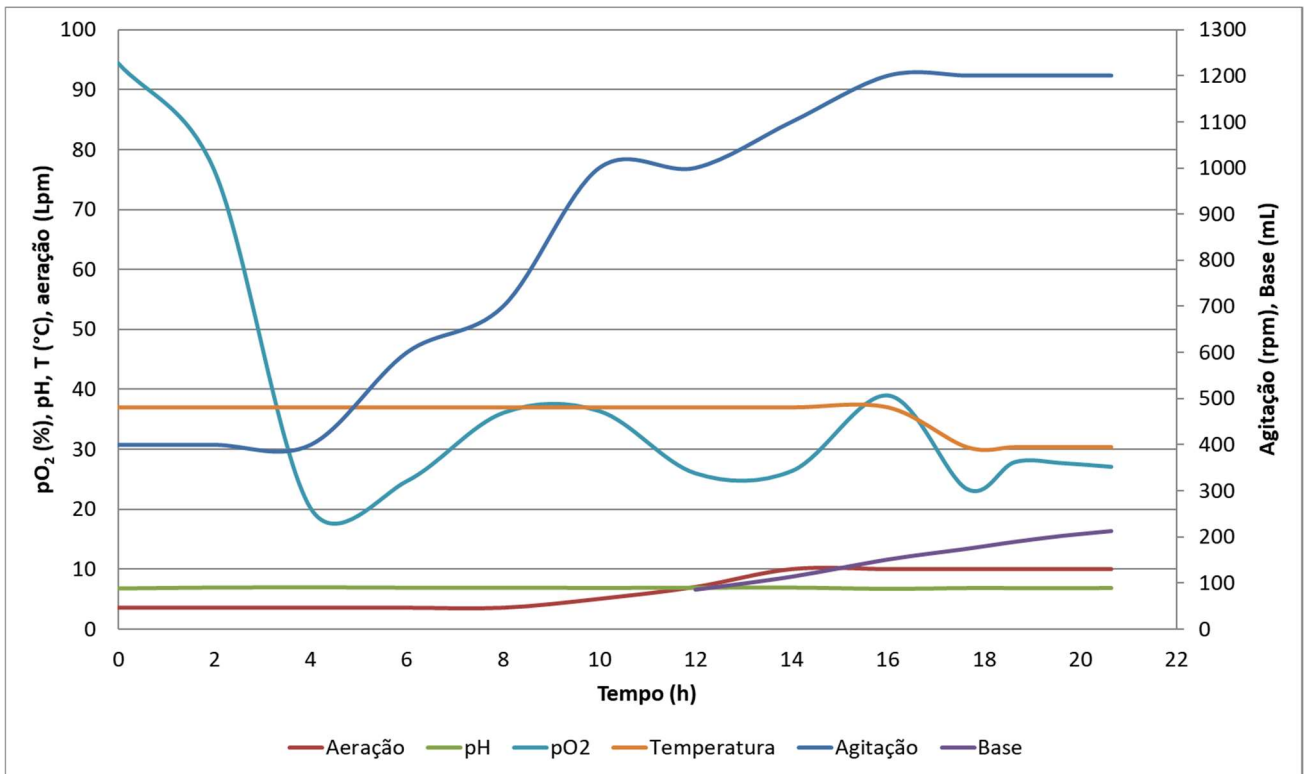


Figura 34 – Dados de processo do ensaio 9.

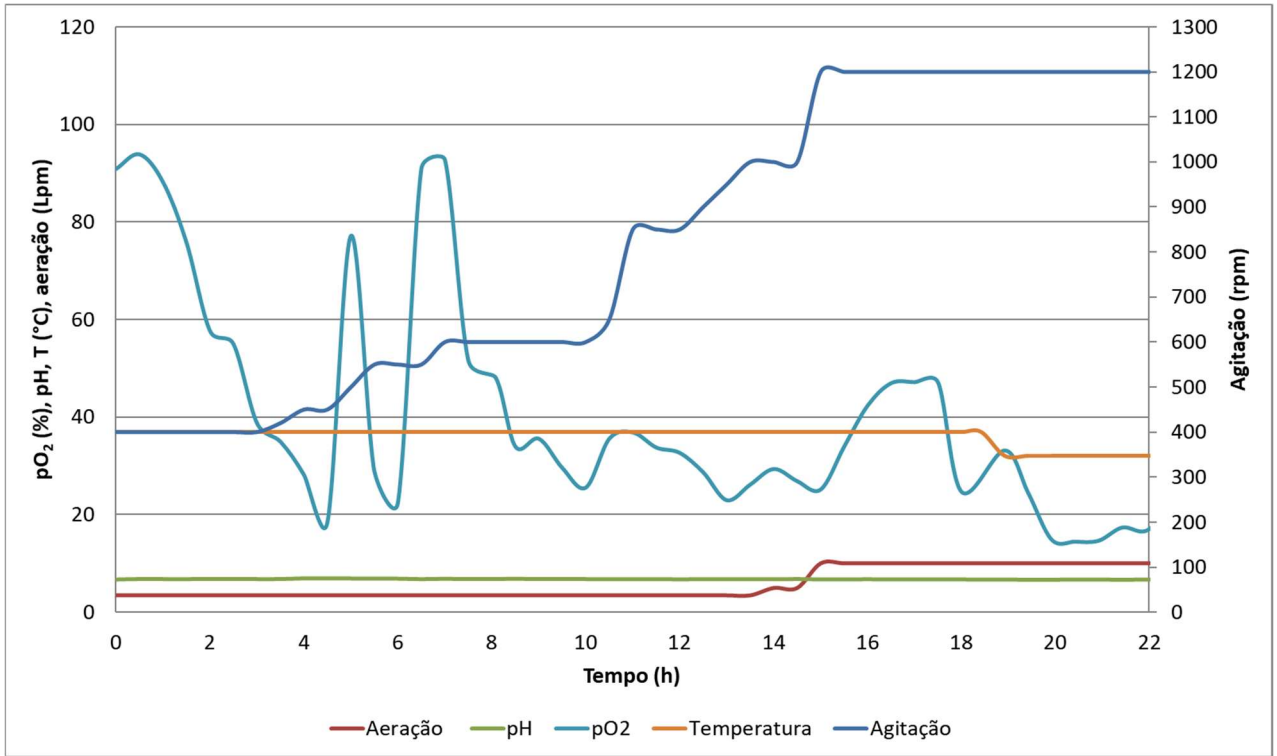
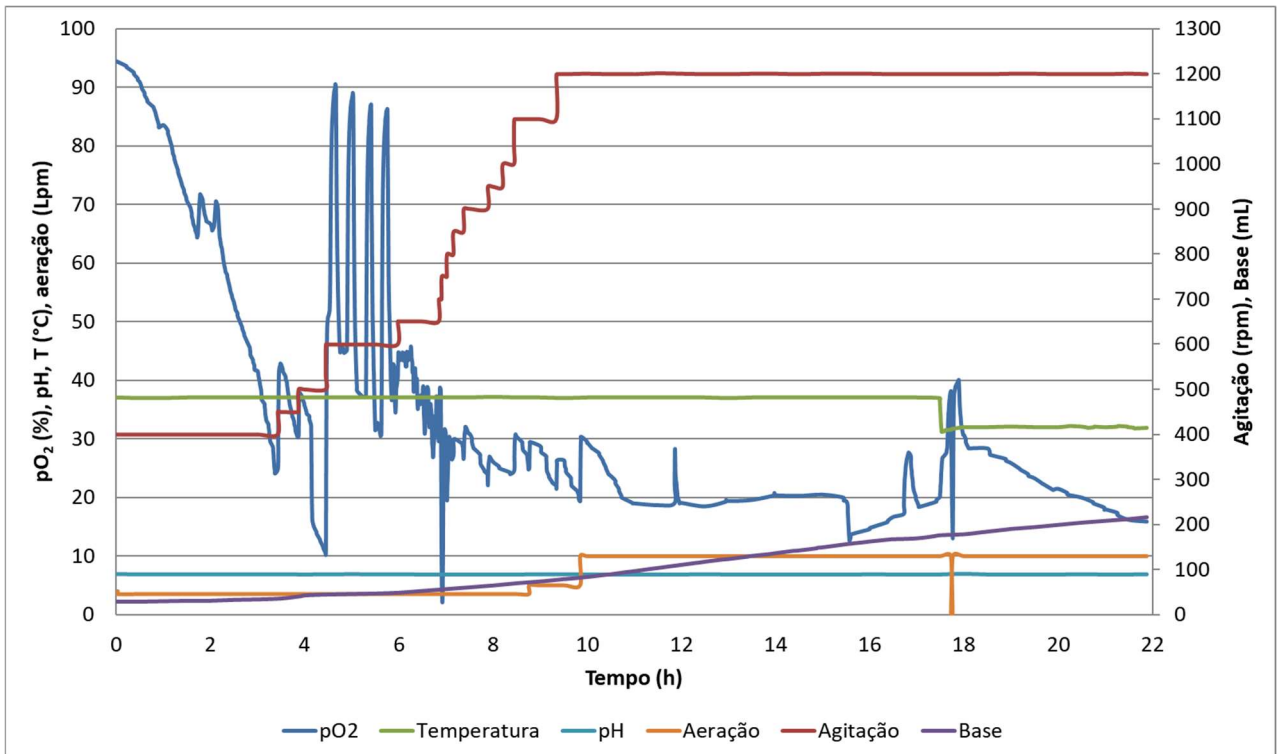


Figura 35 – Dados de processo do ensaio 10.



ANEXO III – PERFIS DAS VARIÁVEIS DE ESTADO DOS ENSAIOS

Figura 36 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 1.

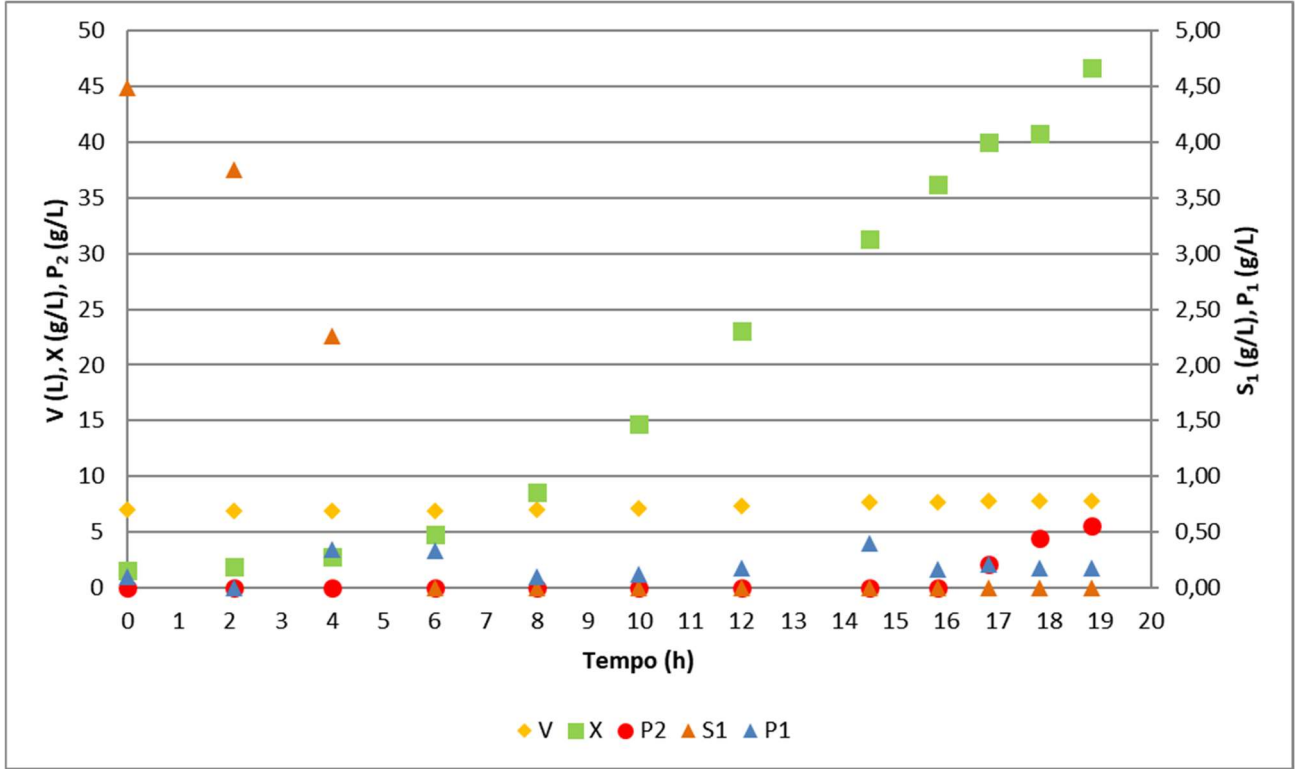


Figura 37 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 2.

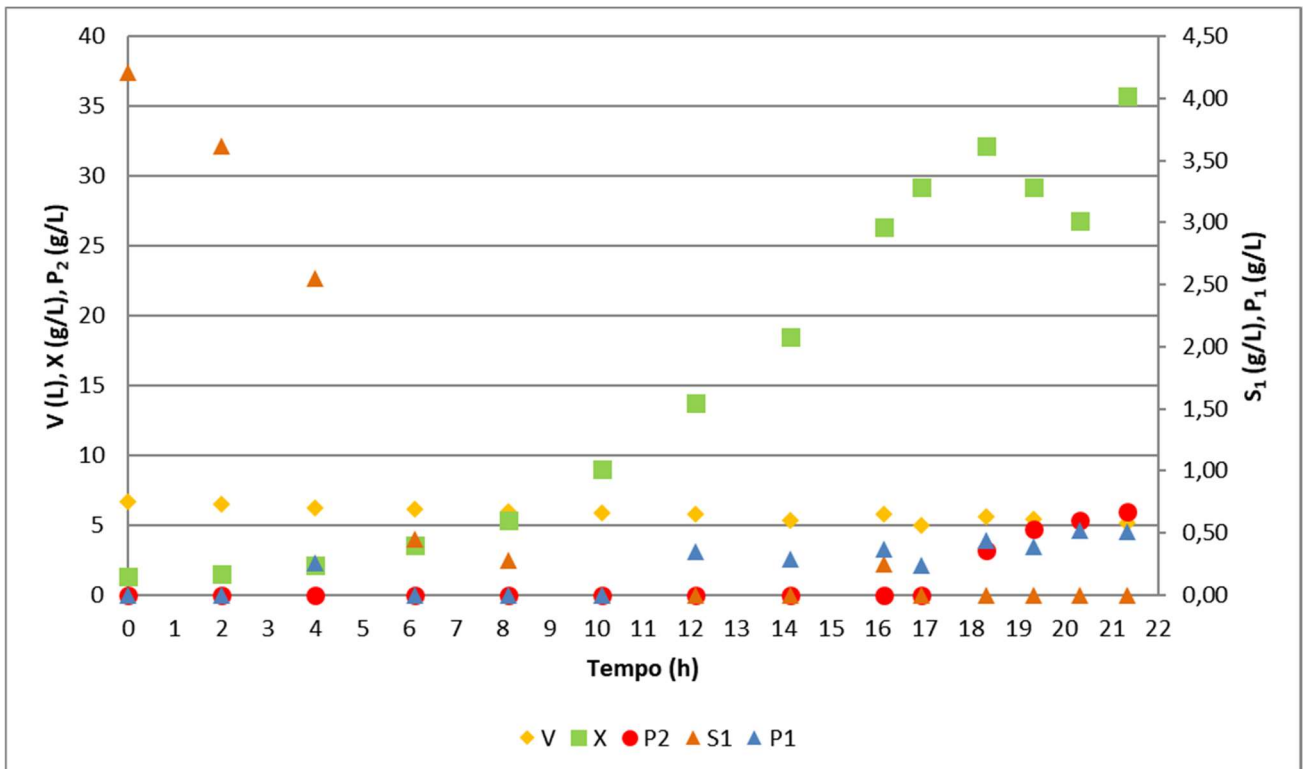


Figura 38 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 3.

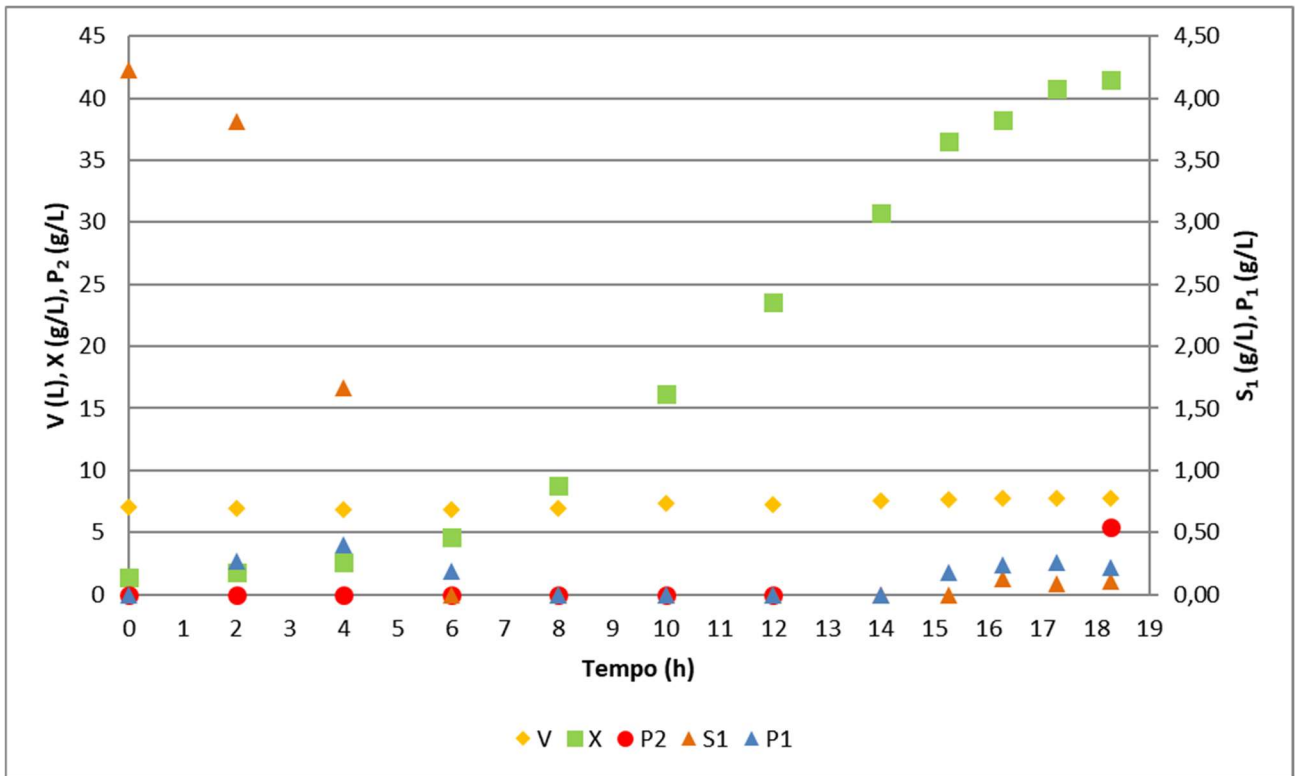


Figura 39 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 4.

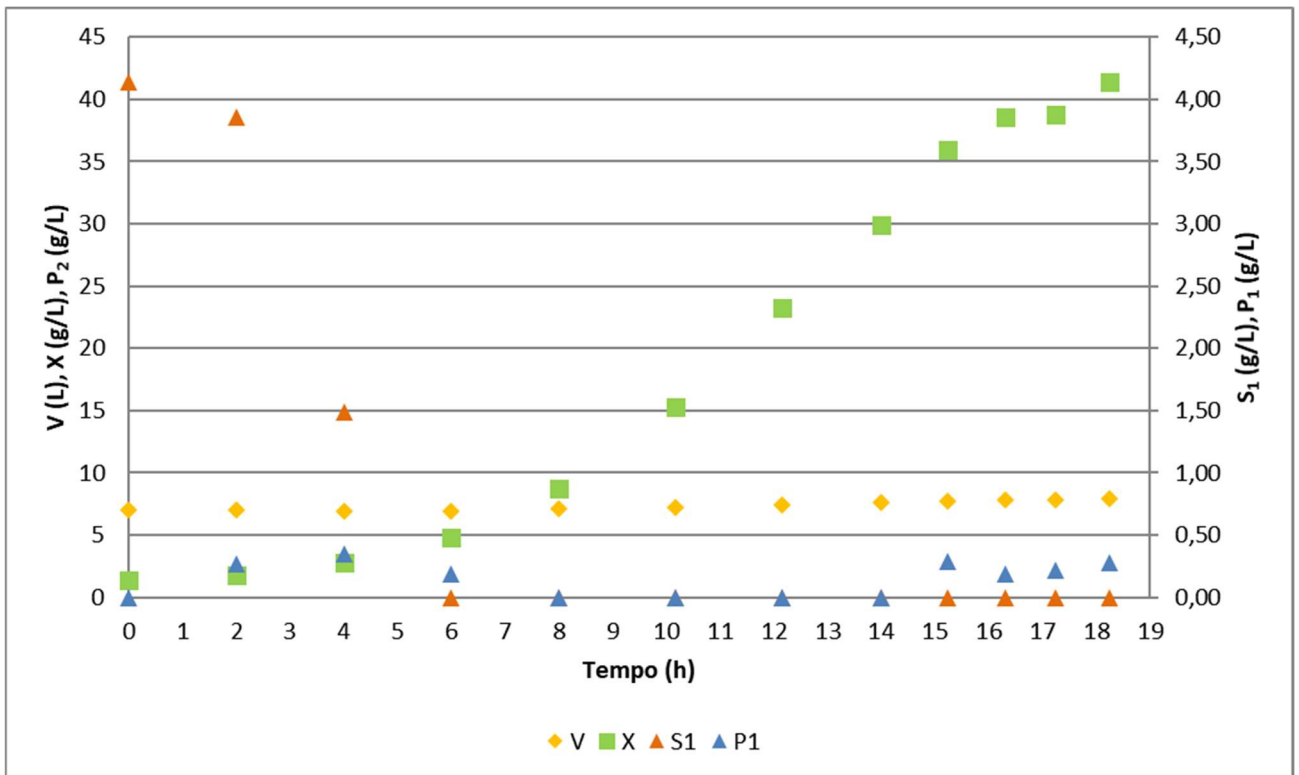


Figura 40 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 5.

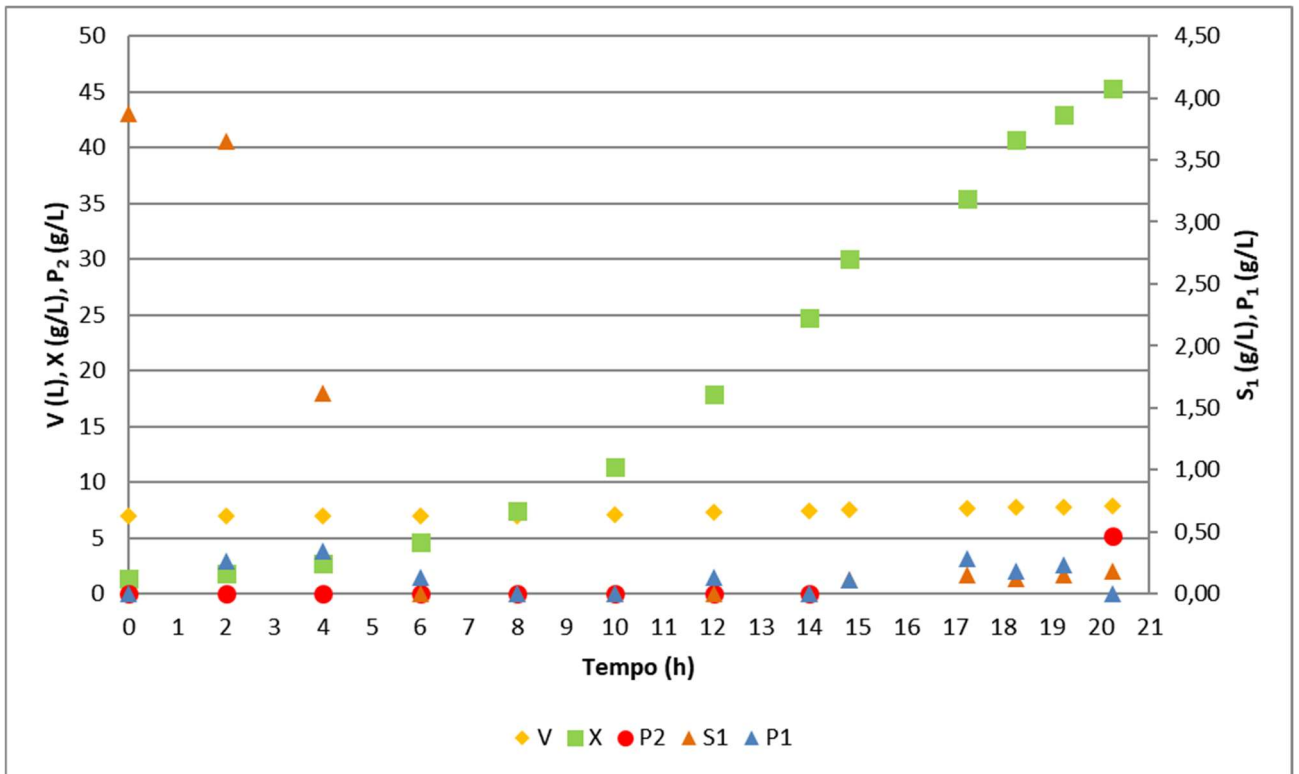


Figura 41 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 6.

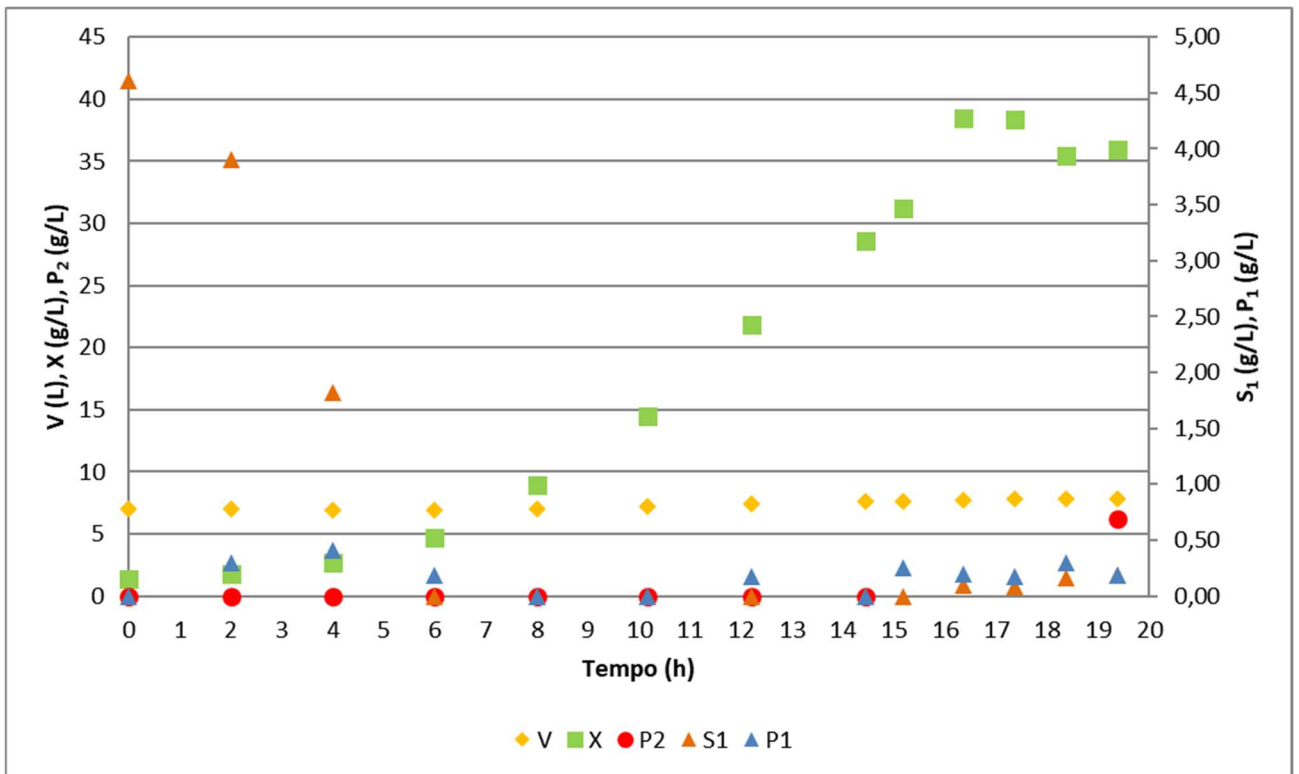


Figura 42 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 7.

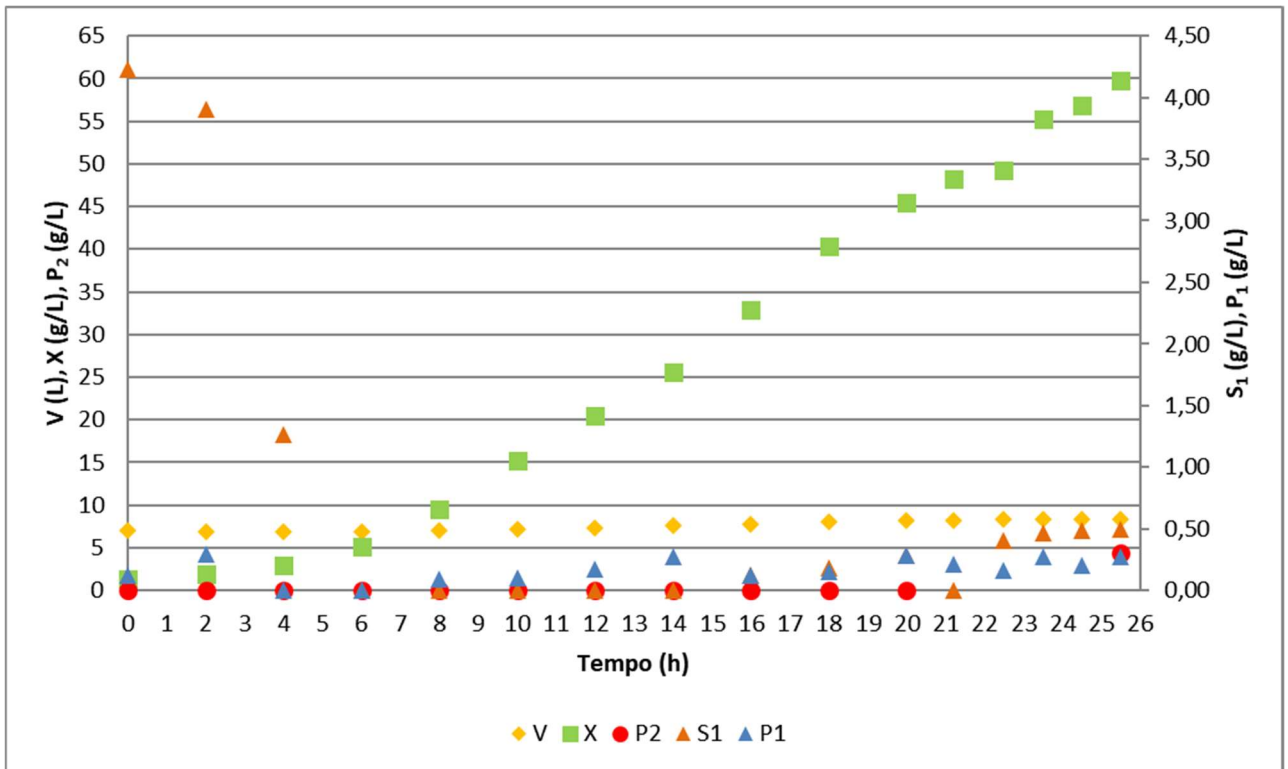


Figura 43 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S1), concentração de ácido acético (P1) e concentração de proteína (P2) para o ensaio 8.

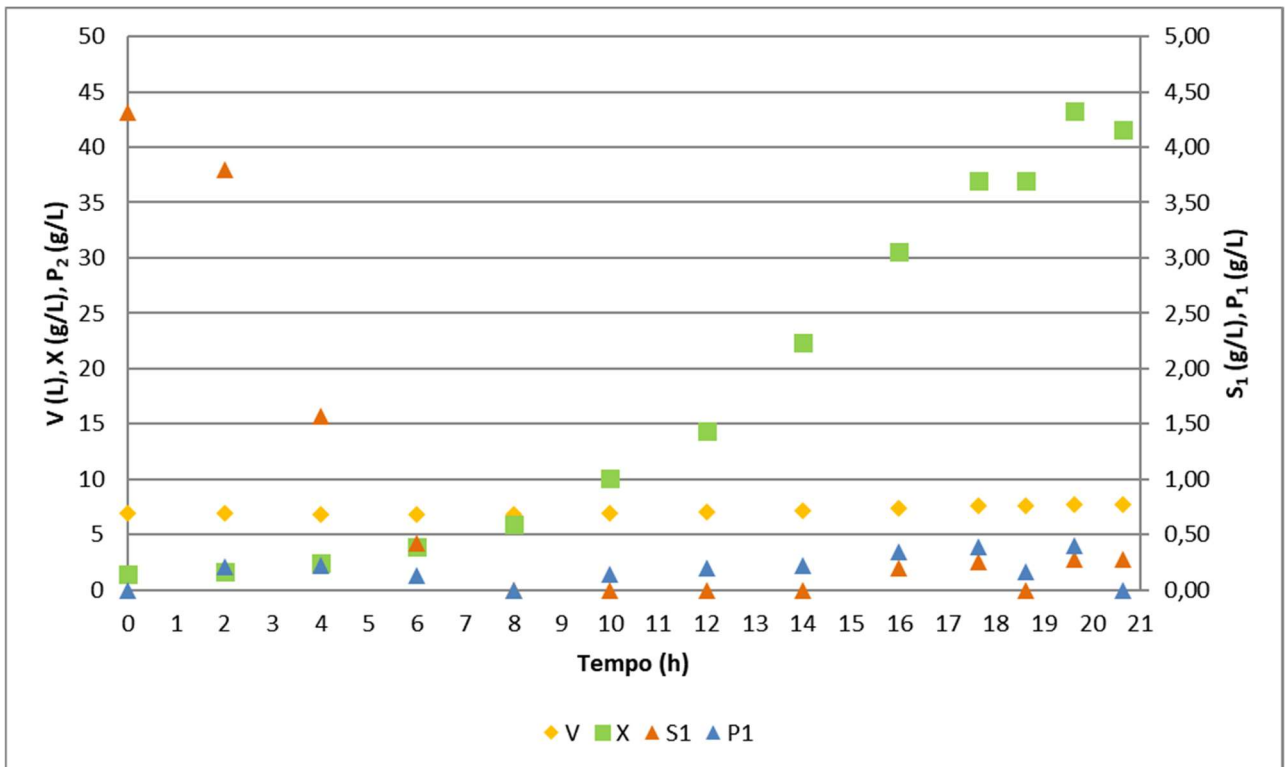


Figura 44 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S₁), concentração de ácido acético (P₁) e concentração de proteína (P₂) para o ensaio 9.

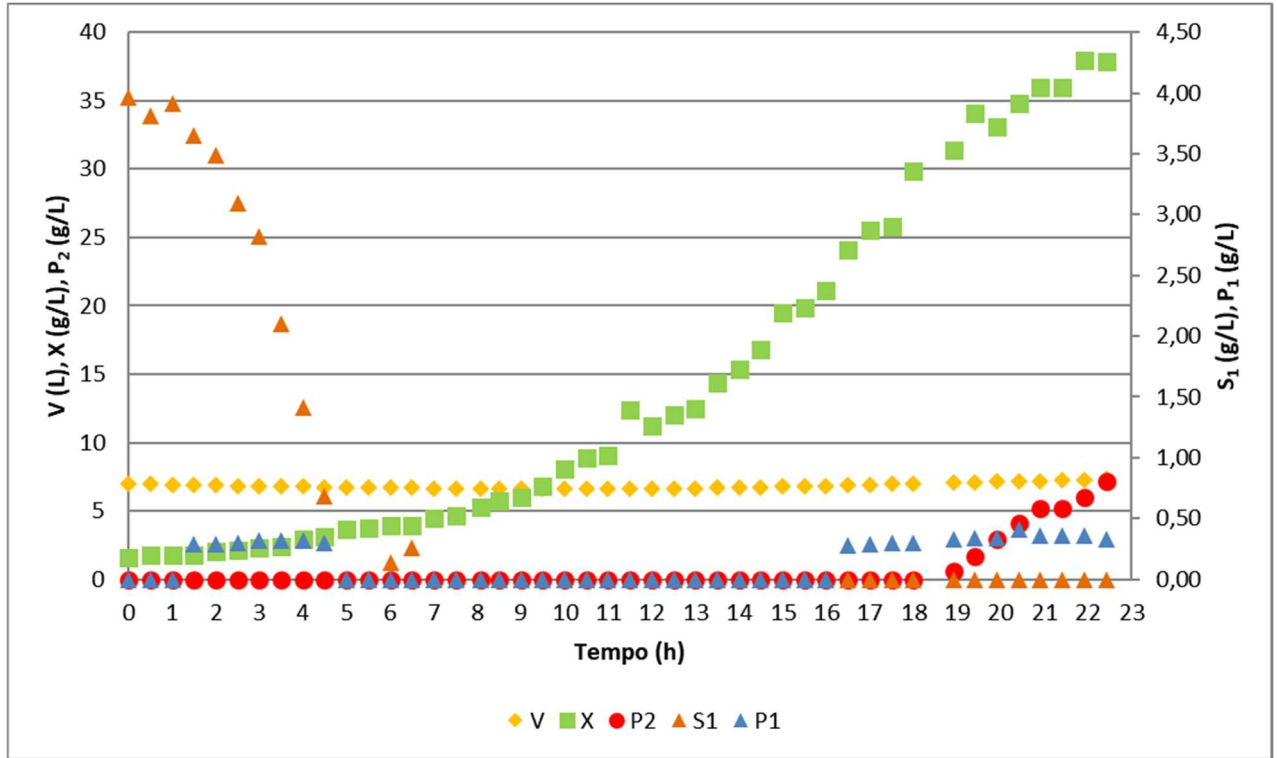
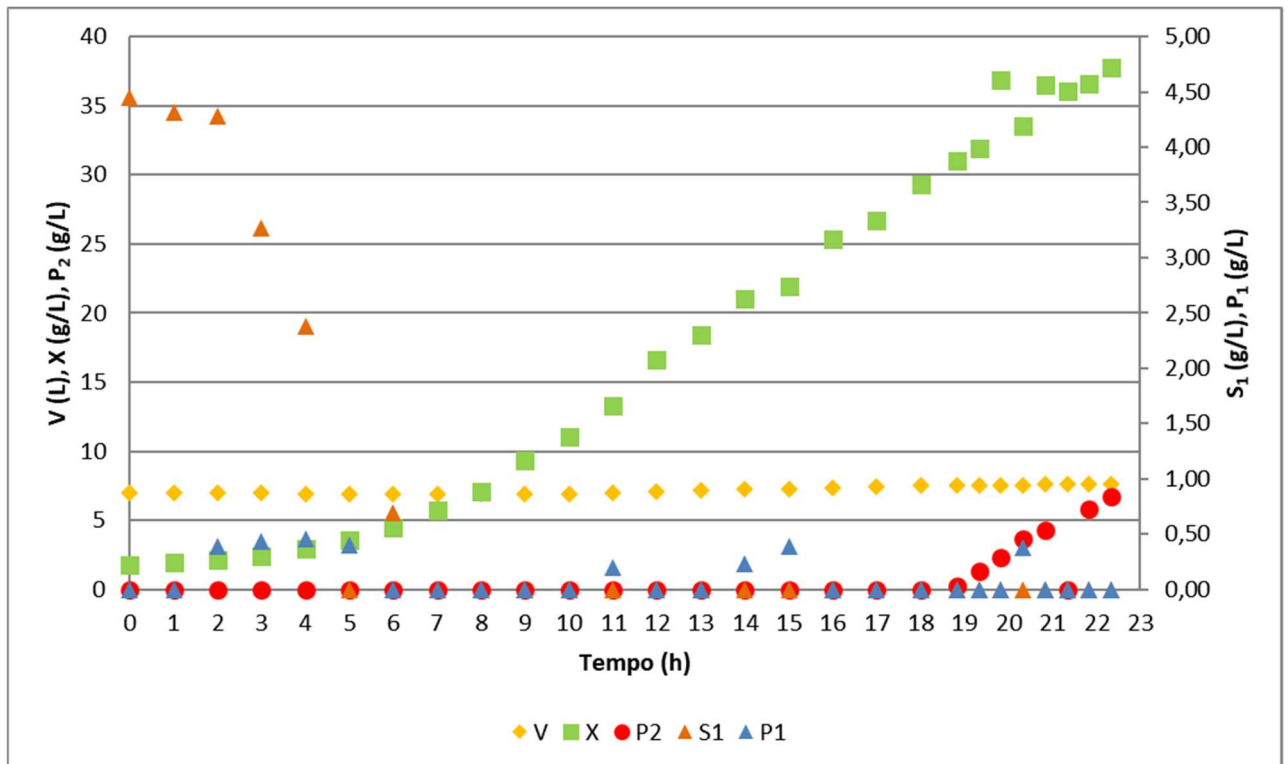


Figura 45 – Variação de volume (V), concentração de células (X), concentração de glicose (S₁), concentração de ácido acético (P₁) e concentração de proteína (P₂) para o ensaio 10.



ANEXO IV – GRÁFICOS DAS REGRESSÕES PARA A ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS

Figura 46 – Velocidade específica de crescimento celular do ensaio 9 para a batelada.

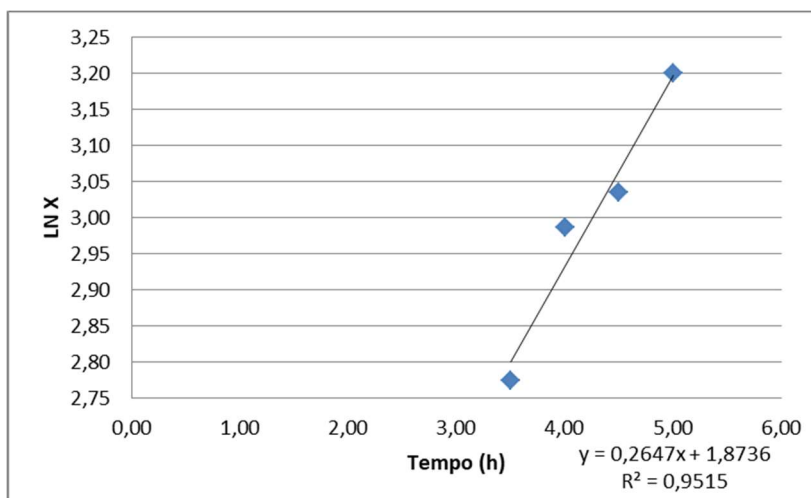


Figura 47 – Velocidade específica de consumo de glicose pela célula do ensaio 9 para a batelada.

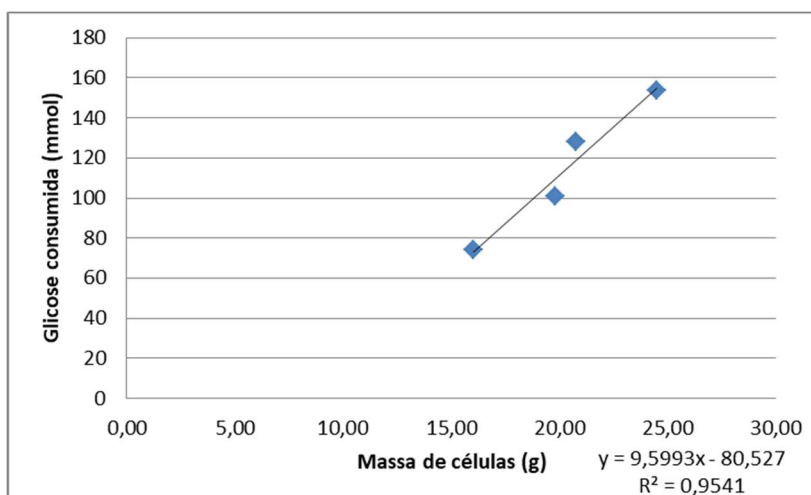


Figura 48 – Velocidade específica de consumo de ácido acético pela célula do ensaio 9 para a batelada.

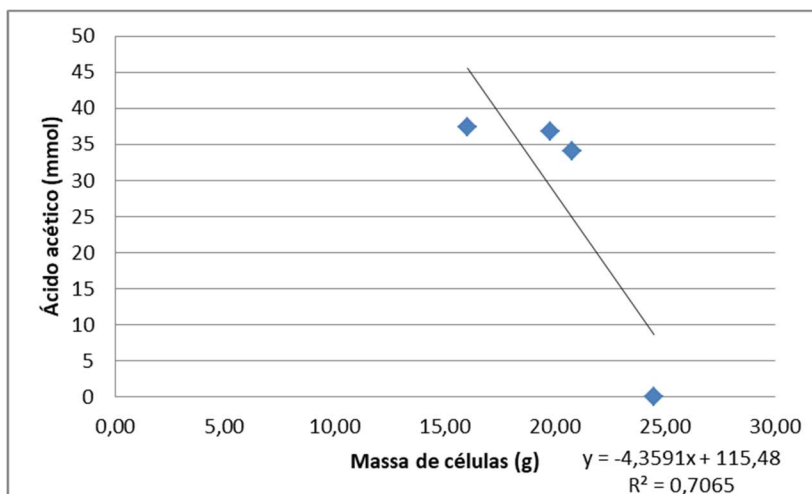


Figura 49 – Velocidade específica de consumo de oxigênio pela célula do ensaio 9 para a batelada.

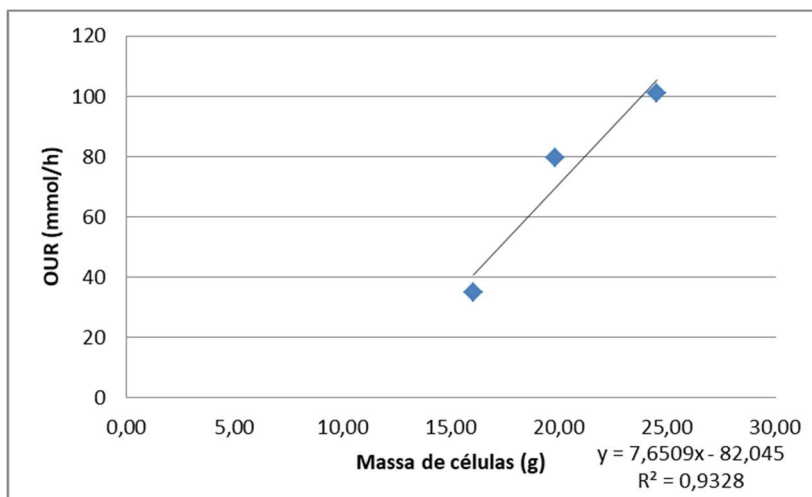


Figura 50 – Velocidade específica de formação de dióxido de carbono pela célula do ensaio 9 para a batelada.

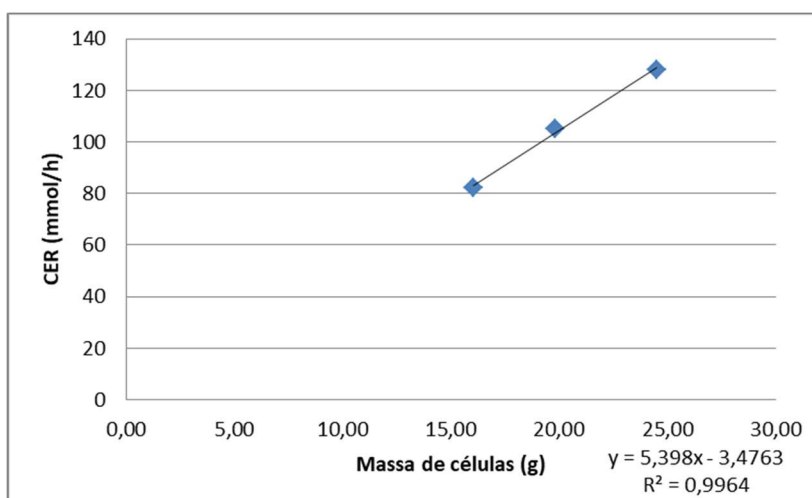


Figura 51 – Velocidade específica de crescimento celular do ensaio 9 para a batelada alimentada.

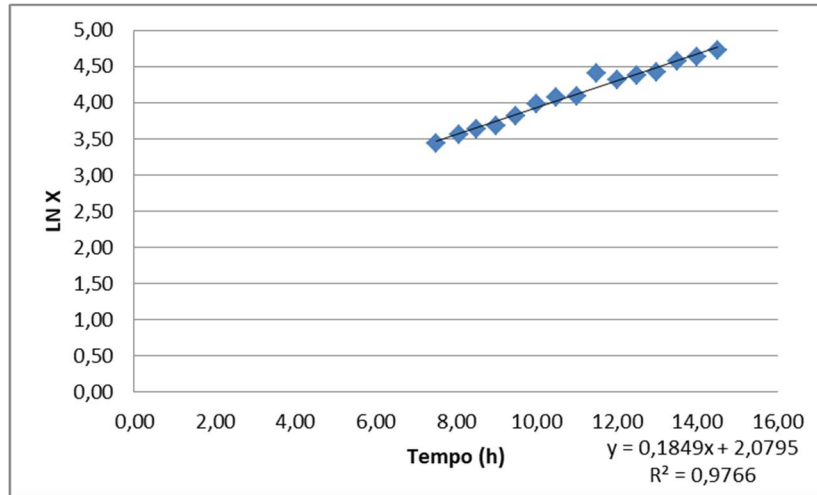


Figura 52 – Velocidade específica de consumo de glicose pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.

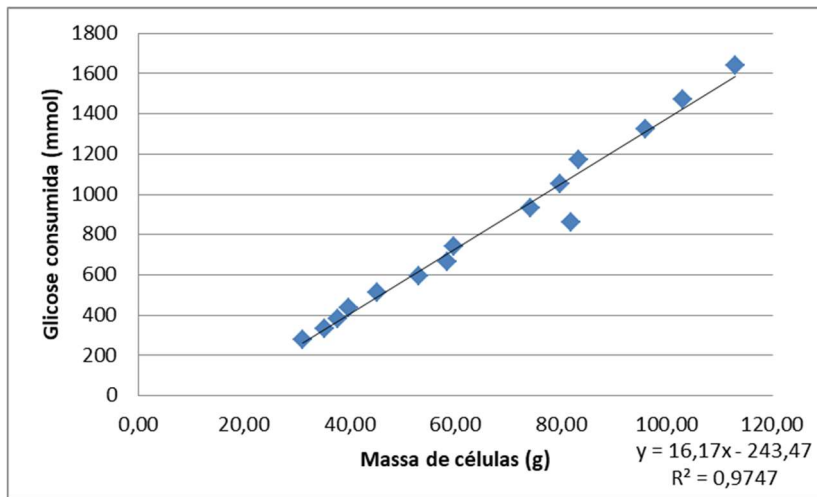


Figura 53 – Velocidade específica de consumo de ácido acético pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.

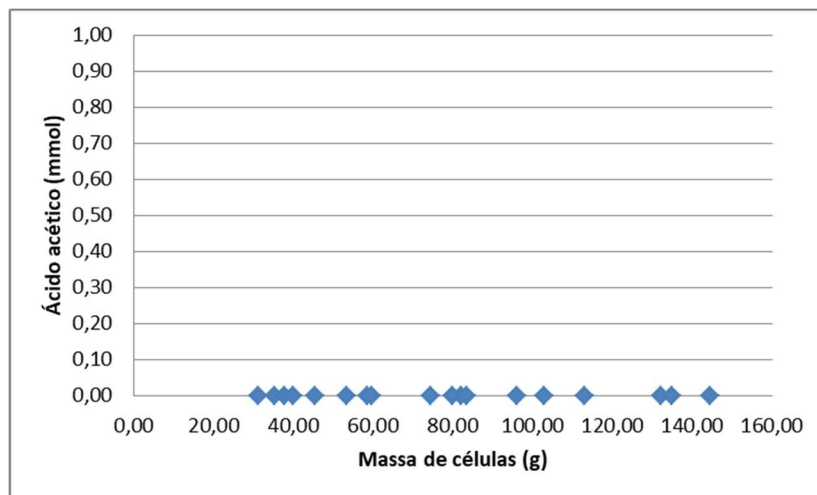


Figura 54 – Velocidade específica de consumo de oxigênio pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.

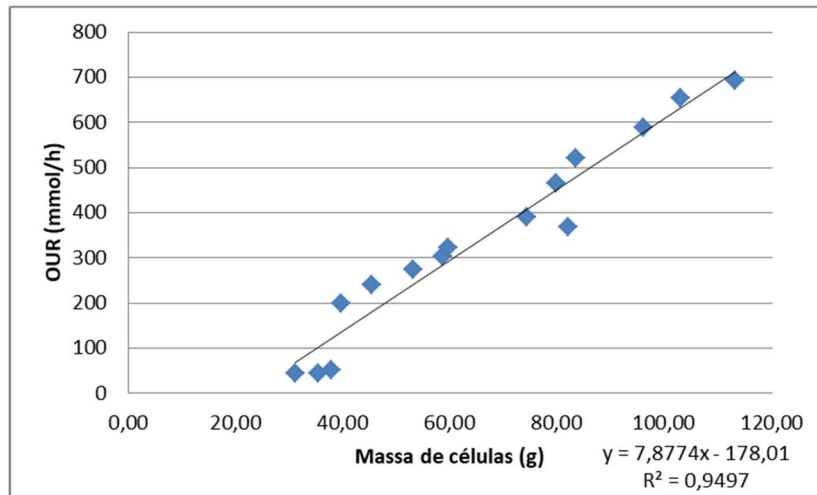


Figura 55 – Velocidade específica de formação de dióxido de carbono pela célula do ensaio 9 para a batelada alimentada.

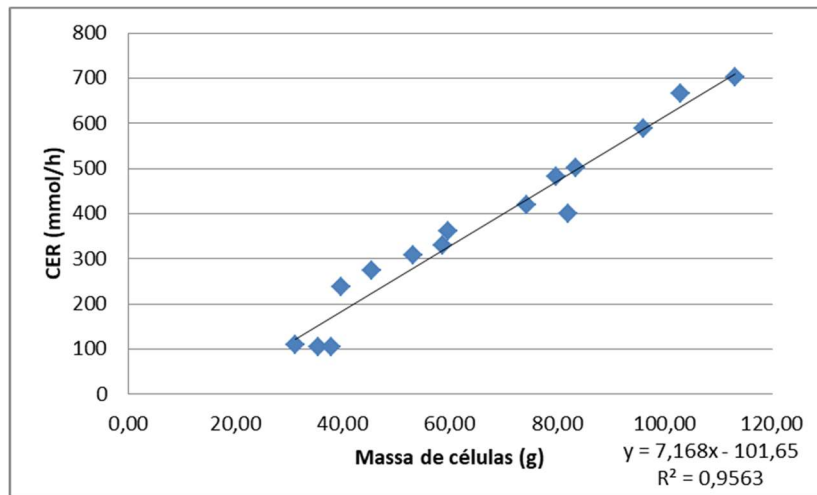


Figura 56 – Velocidade específica de crescimento celular do ensaio 9 para a produção.

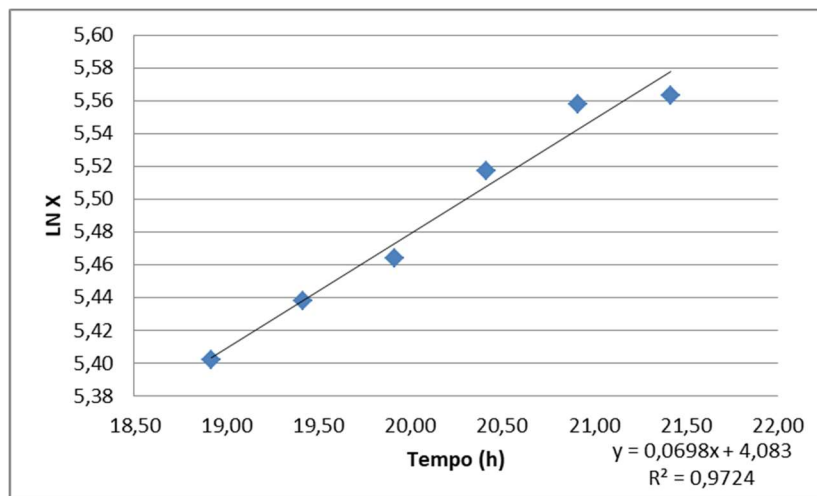


Figura 57 – Velocidade específica de consumo de glicose pela célula do ensaio 9 para a produção.

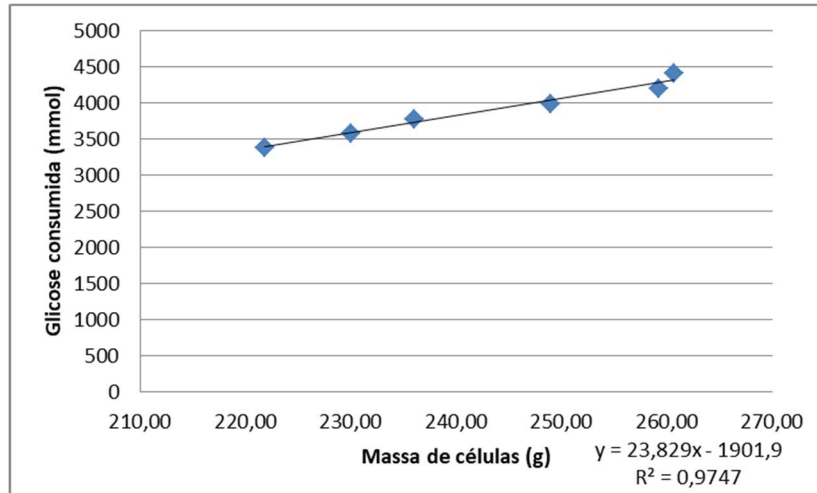


Figura 58 – Velocidade específica de formação de proteína pela célula do ensaio 9 para a produção.

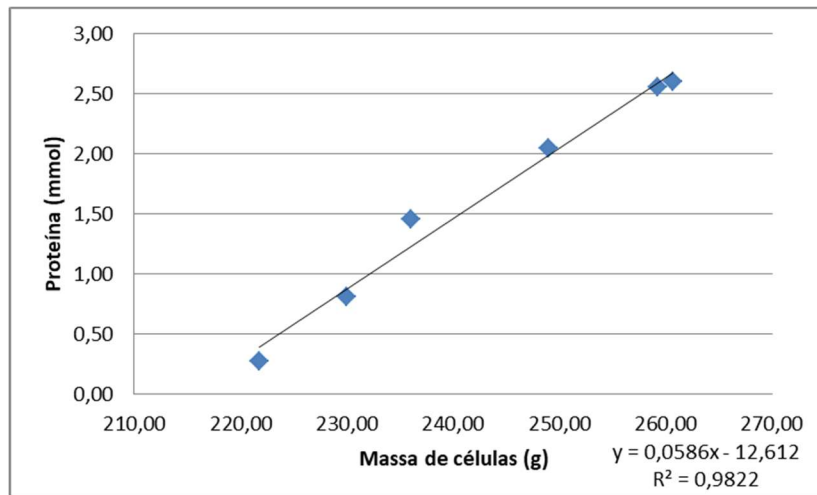


Figura 59 – Velocidade específica de consumo de ácido acético pela célula do ensaio 9 para a produção.

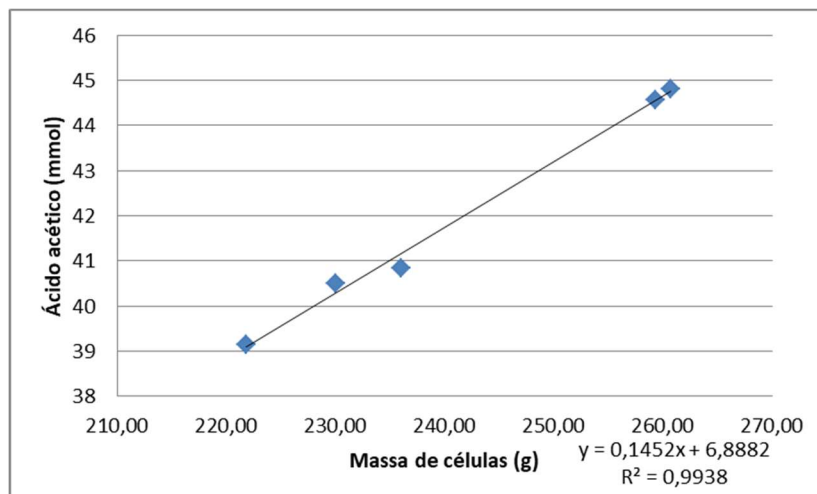
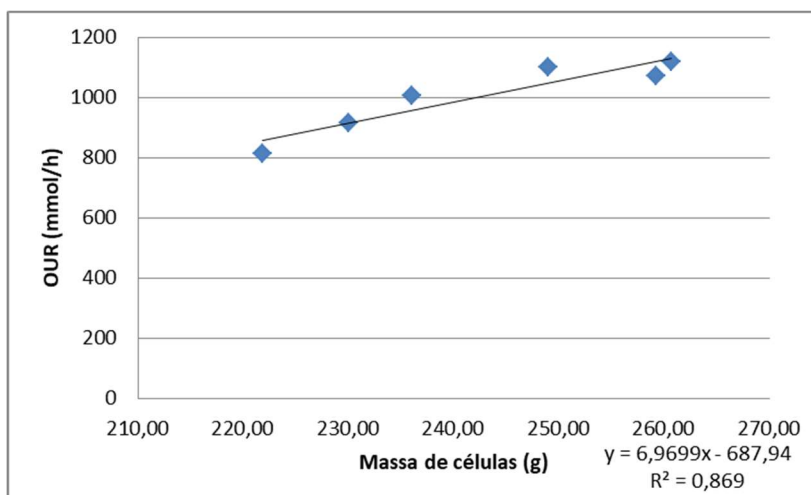
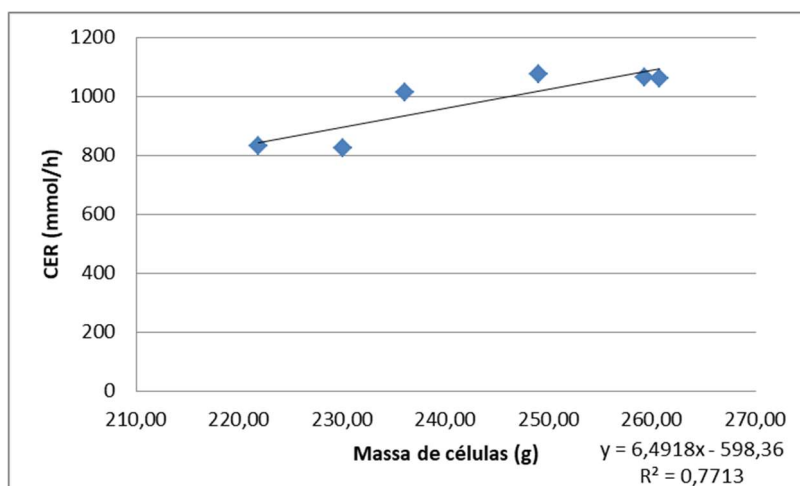


Figura 60 – Velocidade específica de consumo de oxigênio pela célula do ensaio 9 para a produção**Figura 61** – Velocidade específica de formação de dióxido de carbono pela célula do ensaio 9 para a produção.

ANEXO V – REAÇÕES DO METABOLISMO DA *Escherichia coli* - METATOOL

-ENZREV

EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

-ENZIRREV

EMP1 EMP3 VP1 VP5 GLN3 EMP10 CPD CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8 OXNAD OXFAD SDH
PNTAB AD1 AD2 BIOMASSA AcAc1 AcAc2 Prot

-METINT

G6P PG6 RbI5P Rb5P X5P S7P E4P G3P DHP F16P F6P PIR BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA CoASH OXA Cit
IsoCit ACG SucCoA Suc FAD Fum FADH Mal NAD NADH NADP NADPH AcP

-METEXT

Gliext ADP ATP CO2 O XR ACETATO AMBLY

-CAT

EMP1 : Gliext + ATP = G6P + ADP .

EMP2 : G6P = F6P .

EMP3 : F6P + ATP = F16P + ADP .

EMP4 : F16P = G3P + DHP .

EMP5 : DHP = G3P .

EMP6 : G3P + NAD = BPG13 + NADH .

EMP7 : BPG13 + ADP = PG3 + ATP .

EMP8 : PG3 = PG2 .

EMP9 : PG2 = PEP .

EMP10 : PEP + ADP = PIR + ATP .

VP1 : G6P + NADP = PG6 + NADPH .

GLN3 : F16P = F6P .

VP5 : PG6 + NADP = NADPH + RbI5P + CO2 .

VP6 : RbI5P = Rb5P .

VP7 : RbI5P = X5P .

VP8 : Rb5P + X5P = S7P + G3P .

VP9 : G3P + S7P = E4P + F6P .

VP10 : X5P + E4P = F6P + G3P .

CPD : PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO2 .

CK1 : AcCoA + OXA = Cit + CoASH .

CK2 : Cit = IsoCit .

CK3 : IsoCit + NADP = ACG + NADPH + CO2 .

CK4 : ACG + NAD + CoASH = SucCoA + CO2 + NADH .

CK5 : SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH .

CK6 : Suc + FAD = Fum + FADH .

CK7 : Fum = Mal .

CK8 : Mal + NAD = OXA + NADH .

AD1 : PIR + CO2 + ATP = OXA + ADP .

AD2 : OXA + ATP = PEP + ADP + CO2 .

BIOMASSA : 205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP + 2833 PIR +
3748 AcCoA + 1079 ACG + 1787 OXA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP = 10000 XR + 18485
ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH .

OXNAD : NADH + O + 3 ADP = NAD + 3 ATP .

OXFAD : FADH + O + 2 ADP = FAD + 2 ATP .

SDH : NADPH + NAD = NADP + NADH .

PNTAB : NADH + ATP + NADP = NAD + ADP + NADPH .

AcAc1 : AcCoA = AcP + CoASH .

AcAc2 : AcP + ADP = ATP + ACETATO .

Prot : 275 Rb5P + 823 E4P + 1647 PG3 + 1510 PEP + 4186 PIR + 686 AcCoA + 1510 ACG + 3088 OXA +
13242 ATP + 20790 NADPH + 3500 NAD = 69 AMBLY + 3500 NADH + 13242 ADP + 686 CoASH + 20790
NADP .

ANEXO VI – IMAGEM DO GEL DE ELETROFORESE DOS ENSAIOS

Figura 62 – Gel de eletroforese do ensaio 1. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – ausência de proteína na amostra após 1 h da indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.

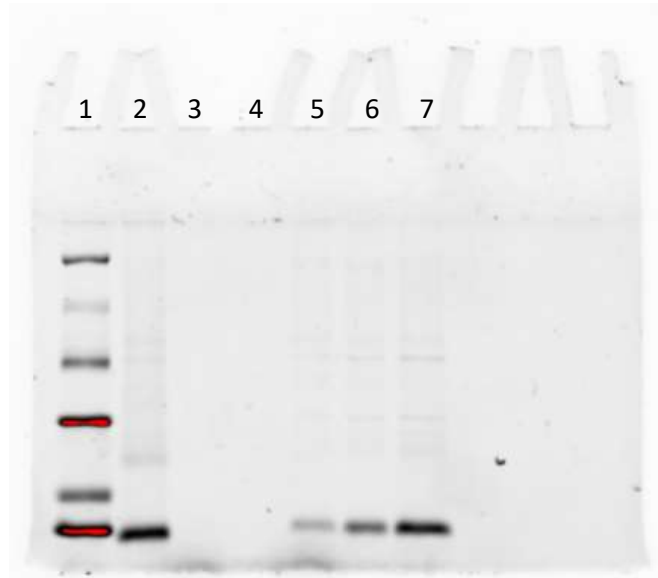


Figura 63 – Gel de eletroforese do ensaio 2. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – proteína produzida 1 h após a indução; 5 – proteína produzida 2 h após a indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.

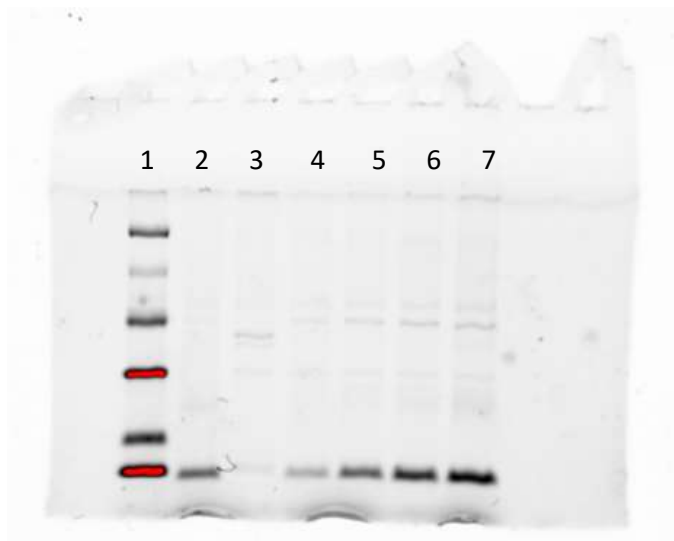


Figura 64 – Gel de eletroforese do ensaio 3. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – primeira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 4 – segunda réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 5 – terceira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução.

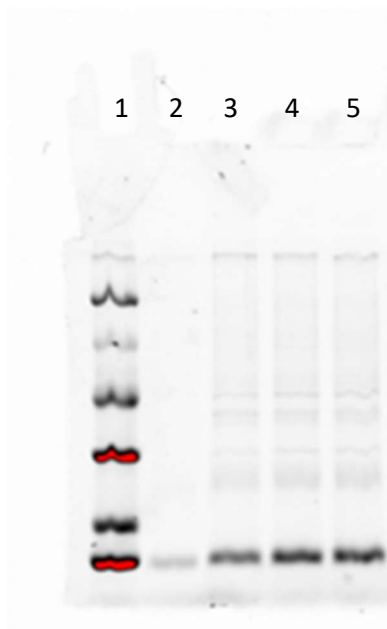


Figura 65 – Gel de eletroforese do ensaio 4. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – ausência de proteína na amostra no momento anterior à indução; 4 – ausência de proteína na amostra após 1 h da indução; 5 – ausência de proteína após 2 h da indução; 6 – proteína produzida após 3 h de indução; 7 – proteína produzida após 4 h de indução.

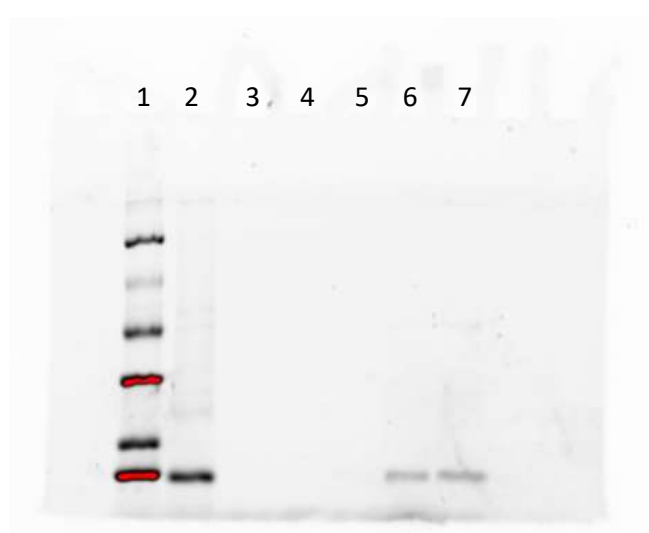


Figura 66 – Gel de eletroforese do ensaio 5. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – primeira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 3 – segunda réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 4 – terceira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 5 – padrão de peso molecular.

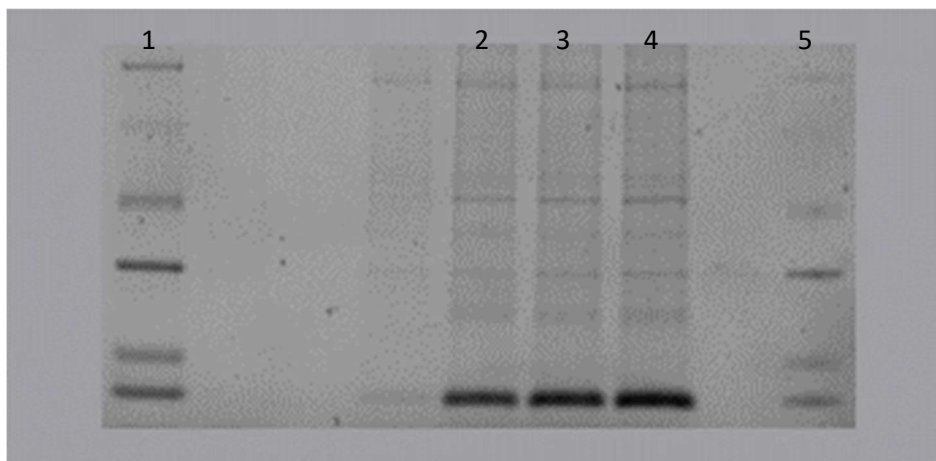


Figura 67 – Gel de eletroforese do ensaio 6. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – primeira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 3 – segunda réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 4 – terceira réplica da amostra da proteína produzida após 4 h de indução; 5 – padrão de peso molecular.

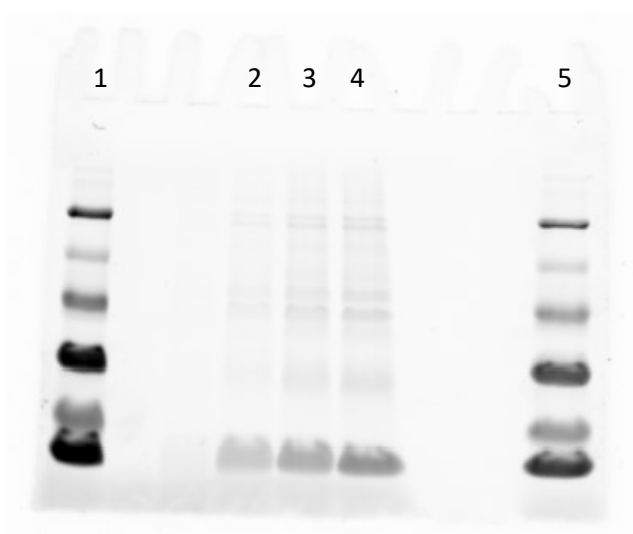


Figura 68 – Gel de eletroforese do ensaio 7. Camadas: 1 – padrão de peso molecular; 2 – proteína Amblyomin-X purificada; 3 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 3x; 4 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 5x; 5 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 10x; 6 – proteína produzida no momento anterior à indução; 7 – proteína produzida após 1 h de indução; 8 – proteína produzida após 2 h de indução; 9 – proteína produzida após 3 h de indução; 10 – proteína produzida após 4 h de indução.

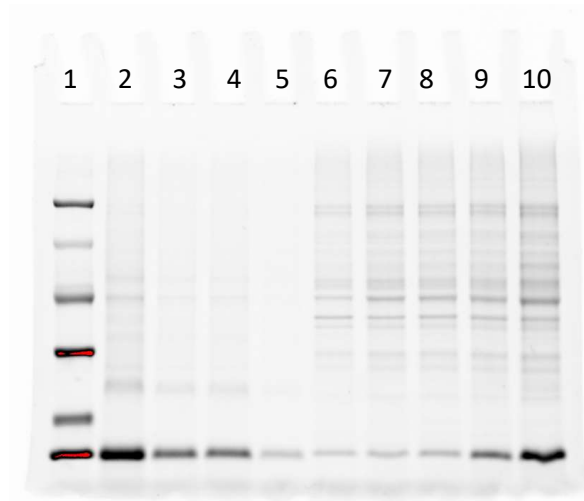


Figura 69 – Gel de eletroforese do ensaio 8. Camadas: 1 – proteína Amblyomin-X purificada; 2 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 3x; 3 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 5x; 4 – proteína Amblyomin-X purificada diluída 10x; 5 – primeira réplica da proteína produzida após 4 h de indução; 6 – segunda réplica da proteína produzida após 4 h de indução; 7 – terceira réplica da proteína produzida após 4 h de indução.

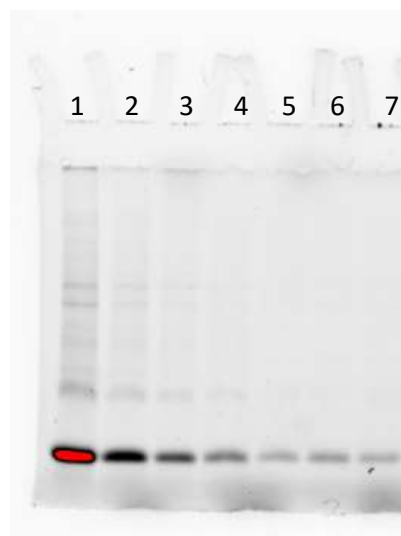
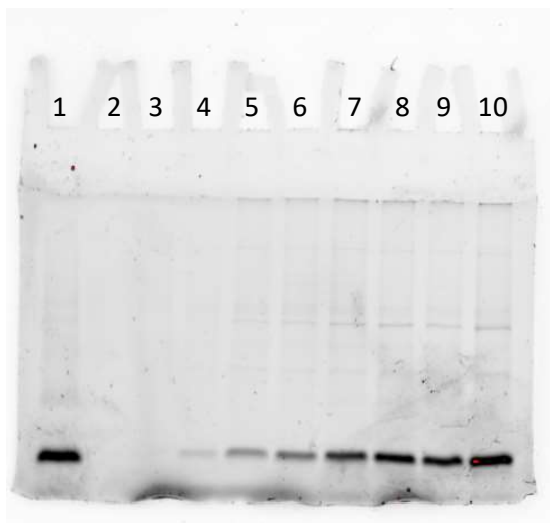


Figura 70 – Gel de eletroforese do ensaio 9. Camadas: 1 – proteína Amblyomin-X purificada; 2 – ausência de proteína no momento antes da indução; 3 – ausência de proteína após 30 min da indução; 4 – proteína produzida após 1 h de indução; 5 – proteína produzida após 1,5 h de indução; 6 – proteína produzida após 2 h de indução; 7 – proteína produzida após 2,5 h de indução; 8 – proteína produzida após 3 h de indução; 9 – proteína produzida após 3,5 h de indução; 10 – proteína produzida após 4 h de indução.



ANEXO VII – ALGORITMO DA MODELAGEM METABÓLICA

modpri.m

```

clear all

global i fl aour
%Conjunto experimental para Ensaio 3

tempexp9=[0.00      2.00      4.00      6.00      8.00      10.00      12.00
14.00      15.27];
vexp9= [7.02;      6.92;      6.84;      6.82;      6.91;      7.3;      7.3;
7.56;      7.67];
xexp9= [1.34;      1.77;      2.64;      4.62;      8.72;      16.20;      23.51;
30.71;      36.46];
s1exp9= [4.23;      3.82;      1.67;      0.00;      0.00;      0.00;      0.00;
0.00;      0.00];
p1exp9= [0.00;      0.27;      0.40;      0.19;      0.00;      0.00;      0.00;
0.00;      0.18];
s2exp9= [0.00628; 0.00426; 0.00264; 0.00212; 0.00222; 0.00181; 0.00182;
0.00177; 0.00077];
p2exp9= [0.00;      0.00;      0.00;      0.00;      0.00;      0.00;      0.00;
0.00;      0.00];

i=2;
aour=[0.0000      0.0000      0.0212;
0.1843      0.0000      0.0135;
0.3687      0.0000      0.0142;
0.5530      0.0000      0.0219;
0.7374      0.0000      0.0349;
0.9217      0.0000      0.0506;
1.1061      0.0000      0.0662;
1.2904      0.0000      0.0816;
1.4747      0.0000      0.1033;
1.6591      0.0000      0.1367;
1.8434      0.0000      0.1739;
2.0278      0.0000      0.2015;
2.2121      0.0000      0.2142;
2.3965      0.0000      0.2265;
2.5808      0.0000      0.2559;
2.7652      0.0000      0.3058;
2.9495      0.0000      0.3635;
3.1338      0.0000      0.4163;
3.3182      0.0000      0.4592;
3.5025      0.0000      0.4918;
3.6869      0.0000      0.5186;
3.8712      0.0000      0.5633;
4.0556      0.0008      0.6538;
4.2399      0.0037      0.7733;
4.4242      0.0061      0.8300;
4.6086      0.0100      0.7346;
4.7929      0.0152      0.5560;
4.9773      0.0217      0.4883;
5.1616      0.0252      0.6821;
5.3460      0.0249      1.0157;
5.5303      0.0425      1.2693;
5.7146      0.0321      1.3221;
5.8990      0.0089      1.2972;
6.0833      0.0474      1.3510;
6.2677      0.0449      1.5315;

```

```

6.4520  0.0526  1.7642;
6.6364  0.0723  1.9739;
6.8207  0.0865  2.1422;
7.0051  0.0861  2.2802;
7.1894  0.0745  2.3966;
7.3737  0.0641  2.4897;
7.5581  0.0577  2.5553;
7.7424  0.0558  2.5984;
7.9268  0.0588  2.6383;
8.1111  0.0667  2.6952;
8.2955  0.0746  2.7817;
8.4798  0.0792  2.9044;
8.6641  0.0809  3.0700;
8.8485  0.0830  3.2735;
9.0328  0.0867  3.4594;
9.2172  0.0889  3.5591;
9.4015  0.0828  3.5821;
9.5859  0.0678  3.6822;
9.7702  0.0569  3.9006;
9.9545  0.0643  4.1368;
10.1389 0.0906  4.2956;
10.3232 0.1307  4.3899;
10.5076 0.1475  4.4879;
10.6919 0.1276  4.6353;
10.8763 0.0993  4.7981;
11.0606 0.0919  4.9243;
11.2449 0.1038  4.9638;
11.4293 0.1143  4.9302;
11.6136 0.1141  4.9179;
11.7980 0.1034  4.9564;
11.9823 0.0967  4.9408;
12.1667 0.1065  4.9530;
12.3510 0.1278  5.1229;
12.5354 0.1360  5.1902;
12.7197 0.1249  5.1187;
12.9040 0.1030  5.3512;
13.0884 0.0953  5.5241;
13.2727 0.1065  5.5526;
13.4571 0.1362  5.6043;
13.6414 0.1685  5.8727;
13.8258 0.1773  5.8759;
14.0101 0.1722  5.4662;
14.1944 0.1616  5.1823;
14.3788 0.1516  5.0543;
14.5631 0.1435  5.0574;
14.7475 0.1372  5.2744;
14.9318 0.1328  5.6265;
15.1162 0.1300  5.9137];

```

```
f1=0;
```

```

tspan = [0 15.1162];
Yo = [7.02,1.34,4.23,0.3];
[t, Xcn]=ode45('fmodmet',tspan,Yo);

```

```

subplot(221), plot(t, Xcn(:,1), 'b-')
grid
xlabel('Tempo (h)')
ylabel('Volume (L)')
hold on;
plot(tempexp9,vexp9,'r+')

```

```
subplot (222), plot(t, Xcn(:,2), 'b-')
```

```

grid
xlabel('Tempo (h)')
ylabel('[X] (g/L)')
hold on;
plot(tempexp9,xexp9,'r+')
hold on;

subplot (223), plot(t, Xcn(:,3), 'b-')
grid
xlabel('Tempo (h)')
ylabel('[Glicose] (g/L)')
hold on;
plot(tempexp9,s1exp9,'r+')
hold on;

subplot (224), plot(t, Xcn(:,4), 'b-')
grid
xlabel('Tempo (h)')
ylabel('[Ác. Acético] (g/L)')
hold on;
plot(tempexp9,p1exp9,'r+')
hold on;

```

fmodmet.m

```

function Xcn = fmodmet(t,x)

global i f1 aour

%Parâmetros
qsmax = 1.7; %(g/g.h)
qscr = 0.8;
s0 = 600; %(gsubst/L)
ks = 0.1;
kis = 4.31;
mi1 = 0.22;
mi2 = 0.28;
mi3 = 0.14;
k1 = 2;
k2 = 20;
k3 = 14;
k4 = 4;

texp = aour(i,1);

if t <= texp
    f1 = aour(i-1,2);
    our = aour(i-1,3);
else
    f1 = aour(i,2);
    our = aour(i,3);

    i = i+1;
end

qs = (our / 1.24)/x(2);

```



```

%Equação de balanço de volume do reator

Xcn(1,1) = f1;

%Equação de balanço de concentração de células no reator
if (qs <= qscr) && (x(4) > 0)

    mi2 = 0;
    mi3 = 0;

elseif (qs <= qscr) && (x(4) <= 0)

    mi1 = 0;
    mi3 = 0;

else
    mi2 = 0;
    mi1 = 0;

end

Xcn(2,1) = (mi1 + mi2 + mi3)* x(2) - f1 / x(1);

%Equação de balanço de concentração de glicose no reator

if x(3) < (1.0 *(10^-7))
    dSdt = 0;
else

dSdt = ((-mi1*k1 - mi2*k2) * x(2)) - (f1 * x(3) / x(1)) + (f1 * s0 / x(1));

Xcn(3,1) = dSdt;
end

%Equação de balanço de concentração de acético no reator

if x(4) < 0
    dadt =0;
else
dadt = (k3 * mi2 - k4 * mi3) * x(2) - (f1 / x(1) * x(4));
Xcn(4,1) = dadt;
end

end

```