



MODELAGEM DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE
RECOMBINANTE UTILIZANDO A ABORDAGEM DINÂMICA DA ANÁLISE
DO BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS

Mayara Paes Leme Washington

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Argimiro Resende Secchi
Tito Livio Moitinho Alves

Rio de Janeiro
Maio de 2016

MODELAGEM DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE
RECOMBINANTE UTILIZANDO A ABORDAGEM DINÂMICA DA ANÁLISE
DO BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS

Mayara Paes Leme Washington

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO
ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE
ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc.

Dr. Aline Mara Barbosa Pires, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
MAIO DE 2016

Washington, Mayara Paes Leme

Modelagem do processo de produção da L-asparaginase recombinante utilizando a abordagem dinâmica da análise do balanço de fluxos metabólicos/Mayara Paes Leme Washington. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2016.

XX, 101 p.: il.; 29,7cm.

Orientadores: Argimiro Resende Secchi

Tito Livio Moitinho Alves

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2016.

Referências Bibliográficas: p. 78 – 87.

1. Otimização. 2. dFBA. 3. L-asparaginase. I. Secchi, Argimiro Resende *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Julgue seu sucesso pelas coisas
que você teve que renunciar para
conseguir”
Dalai Lama*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por trilhar o meu caminho, me dar forças para sempre seguir em frente e colocar pessoas incríveis ao meu redor.

À minha mãe, Regina, e minha madrinha, Cibele, por sempre estarem presentes na minha vida, por me mostrarem através de suas histórias que para haver conquistas, a luta é necessária. Por me mostrarem a importância do estudo, da responsabilidade, e principalmente do caráter. Agradeço pelos incentivos e apoio em todas as minhas escolhas, sem isso não teria chegado até aqui.

À toda a minha família que de alguma forma fizeram parte da minha vida e da minha formação como pessoa. Ao meu pai, meus tios e primos por entenderem os meus momentos ausentes e por me proporcionarem momentos gratificantes quando estivemos juntos que ficarão sempre na memória.

Aos meus orientadores, Argimiro e Tito, com certeza nada seria possível sem a orientação de vocês. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, confiança e incentivo, que estiveram presentes desde a graduação. Agradeço também aos outros professores do Programa de Engenharia Química da COPPE pela formação e em especial ao professor Príamo pelo incentivo à docência.

Aos colaboradores do meu trabalho, Lizandro Sousa e Karel Olavarria, pela paciência, ajuda e incentivo.

Ao meu namorado, Tarso Oliveira, pelo carinho, amor, paciência, compreensão, momentos dançantes, que tornou a minha vida bem mais leve e com mais sentido.

À Mariana e Rafaela, amigas desde o ensino médio que eu levo para a vida. Obrigada por estarem presentes em tantos momentos da minha vida e por saber que posso contar com vocês.

À Bruna Oliveira e Caren Vale, amigas que tornaram os dias na faculdade mais alegres. Obrigada pelo companheirismo, pelos risos e choros, por estarem do meu lado quando precisei. Espero compartilhar mais momentos com vocês.

À Bruna Trampus, Priscila e Mariana Carvalho, amigas que entraram na minha vida através do PEQ e que nos últimos dois anos trouxeram só coisas boas. Foram momentos de muito estudo, risos e choros, que me completaram. Espero que essa amizade possa durar por muito tempo.

Aos amigos que fiz na G-130, principalmente Jimena, Mirella, Bruno Nogueira,

Hudson, Afrânio, Tahyná, Tiago, Cauê, Carol, Gobério, Maurício e Alessandra. Sem vocês o laboratório não teria graça. Obrigada pelos momentos de aprendizado, desabafo, convívio e cafés.

Aos amigos do PEQ, Flavinha, Graziela, Rodrigo, Marcela, Izabella, Rui, Rafael, Ataíde, Chicralla, Felipe e Pedro. Não convivemos tanto, mas foram importante na minha trajetória.

À ONG Engenheiros sem Fronteiras, núcleo Rio de Janeiro, onde aprendi a real definição da engenharia social. A mudança na vida das pessoas e o sorriso das crianças pelas pequenas coisas fez com que a minha vida ganhasse muito mais significado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

MODELAGEM DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE
RECOMBINANTE UTILIZANDO A ABORDAGEM DINÂMICA DA ANÁLISE
DO BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS

Mayara Paes Leme Washington

Maio/2016

Orientadores: Argimiro Resende Secchi
Tito Livio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

A enzima L-asparaginase é utilizada como agente quimioterapêutico no tratamento da leucemia linfoblástica aguda e de outras neoplasias linfóides. Devido à baixa produtividade da enzima por *Z. mobilis*, a enzima recombinante pode ser produzida utilizando *E. coli* como sistema de expressão. Neste trabalho propõe-se um modelo matemático para a produção de L-asparaginase recombinante constituído por três blocos, metabólico, dinâmico e cinético. A construção do bloco metabólico foi feita considerando a influência da inserção do plasmídeo, a formação da proteína no metabolismo celular e a indução da expressão enzimática, utilizando a abordagem da análise do balanço dos fluxos (FBA) para caracterizar o metabolismo. O bloco dinâmico é composto pelas equações diferenciais ordinárias do balanço de massa utilizando os fluxos calculados no bloco metabólico. E o bloco cinético utiliza a cinética de Michaelis-Menten para as taxas de consumo de glicérol, oxigênio, lactose e produção de subprodutos, acetato e lactato. A análise de sensibilidade mostrou os parâmetros que mais impactaram nas variáveis de estado do processo, sendo selecionados para a primeira etapa da estimação de parâmetros, deixando os demais parâmetros para uma segunda etapa. O modelo se adequou aos dados experimentais razoavelmente e os estudos de caso mostraram que o ponto de alimentação de lactose tem alta influência nas principais variáveis do processo. Dessa forma, o modelo proposto, considerando a abordagem dinâmica do balanço de fluxos em sua resolução, se mostrou satisfatório através das simulações do processo de produção da L-asparaginase recombinante.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

MODELING OF RECOMBINANT L-ASPARAGINASE PRODUCTION
PROCESS USING THE DYNAMIC FLUX BALANCE ANALYSIS APPROACH

Mayara Paes Leme Washington

May/2016

Advisors: Argimiro Resende Secchi
Tito Livio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

L-asparaginase enzyme is used as a chemotherapeutic agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and other lymphoid malignancies. Due to the low productivity of the enzyme by *Z. mobilis*, the recombinant enzyme can be produced using *E. coli* as expression system. This work proposes a mathematical model for the recombinant production of L-asparaginase composed of three blocks, metabolic, dynamic and kinetic. The construction of the metabolic block was made considering the influence of insertion plasmid, the formation of the protein in cell metabolism and induction of enzyme expression, using the flux balance analysis (FBA) approach to characterize the metabolism. The dynamic block is composed of the ordinary differential equations of mass balance using the fluxes calculated in the previous block. And the kinetic block using the Michaelis-Menten kinetic for glycerol, oxygen, lactose consumption rates and production of by-products, acetate and lactate. The sensitivity analysis showed the parameters that most affected in the process of state variables, it was selected for the first stage of the estimation parameters, leaving the remaining parameters for a second stage. The model is adapted to the experimental data reasonably and case studies showed that lactose has a high feedpoint major influence on process variables. Thus, the model proposed, considering the dynamic approach to balance fluxes in its resolution, proved satisfactory through simulations of recombinant L-asparaginase production process.

Sumário

| | |
|--|-------------|
| Lista de Figuras | xi |
| Lista de Tabelas | xvi |
| Lista de Símbolos | xvii |
| Lista de Abreviaturas | xix |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Motivação | 1 |
| 1.2 Objetivo | 3 |
| 1.3 Estrutura da Dissertação | 4 |
| 2 Revisão Bibliográfica | 5 |
| 2.1 A enzima L-asparaginase | 5 |
| 2.1.1 A L-asparaginase proveniente de <i>Zymomonas mobilis</i> | 6 |
| 2.2 Produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> | 8 |
| 2.3 Análise do Balanço de Fluxos Metabólicos (FBA) | 11 |
| 2.4 Análise Dinâmica de Fluxos Metabólicos | 14 |
| 2.5 Otimização Multiobjetivo | 17 |
| 2.6 Considerações finais | 19 |
| 3 Construção do modelo metabólico | 20 |
| 3.1 Rede metabólica de <i>E. coli</i> | 20 |
| 3.2 Inclusão de reações no modelo metabólico | 21 |
| 3.2.1 Reação para formação do plasmídeo | 21 |
| 3.2.2 Reação para a formação da L-asparaginase | 21 |
| 3.3 Estratégia para a indução enzimática | 22 |
| 3.4 Análise do balanço de fluxos (FBA) | 23 |
| 3.5 Resultados e Discussão | 24 |
| 3.5.1 Condição aeróbia e anaeróbia | 24 |
| 3.5.2 Variação dos fluxos de oxigênio e lactose | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5.3 | Variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa | 36 |
| 3.5.4 | Variação dos fluxos de oxigênio e glicerol | 40 |
| 3.6 | Considerações finais | 44 |
| 4 | Modelagem e Simulação | 45 |
| 4.1 | Formulação do modelo | 45 |
| 4.2 | Bloco metabólico | 47 |
| 4.2.1 | Análise do balanço de fluxos (FBA) | 47 |
| 4.2.2 | Otimização Multiobjetivo | 48 |
| 4.3 | Bloco dinâmico | 49 |
| 4.4 | Bloco cinético | 51 |
| 4.4.1 | Consumo de glicerol | 51 |
| 4.4.2 | Consumo de oxigênio | 51 |
| 4.4.3 | Consumo de lactose | 52 |
| 4.4.4 | Produção de subprodutos | 52 |
| 4.5 | Calibração do modelo | 52 |
| 4.5.1 | Proposta experimental | 52 |
| 4.5.2 | Análise de sensibilidade | 53 |
| 4.5.3 | Estimação de parâmetros | 54 |
| 4.6 | Resultados e Discussão | 55 |
| 4.6.1 | Otimização multiobjetivo | 55 |
| 4.6.2 | Calibração do modelo | 57 |
| 4.6.3 | Simulação dinâmica dos fluxos | 64 |
| 4.6.4 | Estudo de caso | 66 |
| 4.7 | Considerações finais | 75 |
| 5 | Conclusão | 76 |
| | Referências Bibliográficas | 78 |
| A | Conceitos Fundamentais de Bioquímica | 88 |
| A.1 | Dogma central da Biologia molecular | 88 |
| A.2 | Ácidos nucleicos | 88 |
| A.3 | Proteínas | 90 |
| B | Reação de formação do plasmídeo | 91 |
| C | Reação de formação da L-asparaginase | 93 |
| C.1 | Biossíntese de aminoácidos | 94 |

Lista de Figuras

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Mapa mundial com as taxas de incidência de leucemia padronizado por idade por país (por 100.000 habitantes) em 2012. Fonte: IARC (FERLAY <i>et al.</i> , 2013) | 1 |
| 2.1 | Mecanismo de ação da L-asparaginase. O aminoácido L-asparagina pode ser obtido através da ação da enzima L-Asparagina Sintetase. A L-asparaginase utiliza como substrato a L-asparagina gerando amônia e L-aspartato. Devido aos baixos níveis da L-Asparagina Sintetase, células leucêmicas não apresentam quantidade suficientes de L-asparagina para síntese de proteínas na presença da L-asparaginase. Adaptado de BAPTISTA (2013). | 6 |
| 2.2 | Exemplo de um mapa plasmidial em que contém o gene de resistência ao antibiótico, o sítio de clonagem (local onde o gene de interesse é inserido), a origem de replicação e o promotor. | 9 |
| 2.3 | Mecanismo de indução por lactose ou IPTG no organismo hospedeiro (Adaptado de OVERTON (2014)). | 10 |
| 2.4 | Construção do FBA. A representação matemática das reações metabólicas se dá ao utilizar os fluxos dessas reações, construir a matriz estequiométrica, definir os limites dos fluxos e o objetivo. (Adaptado de KAUFFMAN <i>et al.</i> (2003)) | 11 |
| 2.5 | Conceito da modelagem baseada em restrições do FBA. Através dos limites dos fluxos constrói-se o espaço de soluções com essas restrições (a) e ao resolver o problema de otimização obtém-se a solução ótima (b). Adaptado de ORTH <i>et al.</i> (2010). | 12 |
| 2.6 | Abordagens para resolução do dFBA. | 16 |
| 2.7 | Conjunto de soluções do espaço de variáveis e espaço de objetivos no problema multi-objetivo. | 17 |
| 2.8 | Representação gráfica do método da soma ponderada. | 18 |
| 2.9 | Representação gráfica do método ε -restrito. | 19 |
| 3.1 | Indução da expressão enzimática com lactose. | 22 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.2 | Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao maximizar o fluxo de plasmídeo numa condição aeróbia. | 27 |
| 3.3 | Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao maximizar o fluxo de plasmídeo numa condição anaeróbia. | 28 |
| 3.4 | Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos numa condição aeróbia. | 31 |
| 3.5 | Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos numa condição anaeróbia. | 32 |
| 3.6 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de plasmídeo (a) e L-asparaginase (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 33 |
| 3.7 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de acetato (a) e lactato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 34 |
| 3.8 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de oxalacetato a partir de malato (a) e fosfoenolpiruvato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 35 |
| 3.9 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de citrato (a) e α -cetoglutarato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 36 |
| 3.10 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de plasmídeo (a) e L-asparaginase (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 37 |
| 3.11 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de acetato (a) e lactato (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 38 |
| 3.12 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de oxalacetato a partir de malato (a) e fosfoenolpiruvato (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 39 |
| 3.13 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de citrato (a) e α -cetoglutarato (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 39 |
| 3.14 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de plasmídeo (a) e L-asparaginase (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 40 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.15 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de acetato (a) e lactato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 41 |
| 3.16 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de Diidroxiacetona fosfato (a) e α -cetoglutarato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 42 |
| 3.17 | Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de oxalacetato a partir de malato (a) e fosfoenolpiruvato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo. | 43 |
| 4.1 | Fluxograma geral da estrutura do dFBA utilizada. | 46 |
| 4.2 | Esquema do experimento de expressão enzimática em biorreator. | 53 |
| 4.3 | Valores da Função objetivo para as soluções Pareto-ótimas ao variar ε | 56 |
| 4.4 | Valores dos fluxos de asparaginase (a) e oxigênio (b) para as soluções Pareto-ótimas ao variar ε | 56 |
| 4.5 | Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de acetato (a) e lactato (b). | 57 |
| 4.6 | Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de asparaginase (a) e plasmídeo (b). | 58 |
| 4.7 | Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de biomassa (a) e glicerol (b). | 59 |
| 4.8 | Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de lactose (a) e oxigênio na fase líquida (b). | 60 |
| 4.9 | Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a concentração de biomassa (a) e de glicerol (b). | 61 |
| 4.10 | Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a concentração de L-asparaginase (a) e de lactose (b). | 61 |
| 4.11 | Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a concentração de acetato (a) e lactato (b). | 62 |
| 4.12 | Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a porcentagem de oxigênio dissolvido. | 62 |
| 4.13 | Perfil dinâmico da taxa específica de crescimento (μ). | 65 |
| 4.14 | Perfil dinâmico dos fluxos da reação de formação do glicerol 3-fosfato (a) e da reação de formação do piruvato (b). | 65 |
| 4.15 | Perfil dinâmico da concentração de lactose (a) e da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose. | 66 |
| 4.16 | Perfil dinâmico da concentração de biomassa (a) e de glicerol (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose. | 67 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.17 | Perfil dinâmico da concentração de L-asparaginase (a) e de plasmídeo (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose. | 68 |
| 4.18 | Perfil dinâmico da concentração de acetato (a) e lactato (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose. | 69 |
| 4.19 | Perfil dinâmico da concentração de lactose (a) e porcentagem de oxigênio dissolvido (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose. | 70 |
| 4.20 | Perfil dinâmico da concentração de biomassa (a) e glicerol (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose. | 70 |
| 4.21 | Perfil dinâmico da concentração de L-asparaginase (a) e plasmídeo (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose. | 71 |
| 4.22 | Perfil dinâmico da concentração de acetato (a) e lactato (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose. | 72 |
| 4.23 | Perfil dinâmico da concentração de lactose (a) e porcentagem de oxigênio dissolvido (b) para diferentes vazões de ar. | 73 |
| 4.24 | Perfil dinâmico da concentração de biomassa (a) e glicerol (b) para diferentes vazões de ar. | 73 |
| 4.25 | Perfil dinâmico da concentração de L-asparaginase (a) e plasmídeo (b) para diferentes vazões de ar. | 74 |
| A.1 | Dogma central da biologia molecular. | 89 |
| A.2 | Replicação do DNA. (Adaptado de VOET <i>et al.</i> (2014)) | 89 |
| A.3 | Esquema geral da síntese de proteínas. | 90 |
| B.1 | Mapa circular do plasmídeo pET-28b(+) | 91 |
| B.2 | Sequência do gene da enzima L-asparaginase (ATCC 31821) proveniente de <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 | 92 |
| C.1 | Sequência de aminoácidos da enzima L-asparaginase (ATCC 31821) proveniente de <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 | 93 |
| C.2 | Visão geral da biossíntese de aminoácidos. Fonte: LEHNINGER <i>et al.</i> (2005). | 94 |
| C.3 | Conversão de 3-fosfoglicerato em serina. As enzimas para essa conversão são (1) 3-fosfoglicerato-desidrogenase, (2) uma amino-transferase dependente de PLP e (3) fosfoserina-fosfatase. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 95 |
| C.4 | Síntese de alanina, aspartato, glutamina, asparagina e glutamato. As reações envolvem a transaminação de (1) piruvato, (2) oxalacetato, e (3) α -cetoglutarato, e a aminação de (4) aspartato e (5) glutamato. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 96 |

| | | |
|-----|---|-----|
| C.5 | Síntese de arginina, ornitina e prolina a partir de glutamato. Os catalisadores da biossíntese da prolina são (1) γ -glutamil-cinase, (2) desidrogenase, (3) não-enzimático e (4) pirrolina-5-carboxilato-redutase. A ornitina é convertida em arginina pelo ciclo da uréia. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 97 |
| C.6 | Síntese de lisina, metionina e treonina. As enzimas que catalisam as reações são (1) aspartocinase, (2) β -aspartato-semialdeído-desidrogenase, (3) homoserina-desidrogenase e (4) metionina-sintase. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 98 |
| C.7 | Síntese de isoleucina, leucina e valina. A primeira enzima, a acetolactato-sintase, catalisa duas reações, uma conduzindo até a valina e leucina, e a outra, até a isoleucina. A valina-amino-transferase catalisa a formação de valina e isoleucina, e a leucina-amino-transferase catalisa a formação de leucina, a partir de seus respectivos α -cetoácidos. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 99 |
| C.8 | Síntese de fenilalanina, triptofano e tirosina. As enzimas envolvidas são (1) 2-ceto-3-desóxi-D-arabinoeptulose-7-fosfato-sintase, (2) antranilato-sintase, (3) triptofano-sintase, subunidade α , (4) triptofano-sintase, subunidade β , (5) corismato-mutase. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 100 |
| C.9 | Biossíntese de histidina. As enzimas envolvidas são (1) ATP-fosforribosil-transferase e (2) glutamina-amido-transferase. Fonte: VOET <i>et al.</i> (2014) | 101 |

Lista de Tabelas

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Principais trabalhos sobre a L-asparaginase proveniente de <i>Z. mobilis</i> e a produtividade obtida | 8 |
| 2.2 | Softwares utilizados no FBA. Fonte:LAKSHMANAN <i>et al.</i> (2012) | 13 |
| 3.1 | Reconstruções de redes metabólicas em escala genômica disponíveis de <i>E. coli</i> . Fonte: FEIST <i>et al.</i> (2009). | 20 |
| 3.2 | Análise dos fluxos ao variar o parâmetro alfa e os fluxos de oxigênio, lactose e glicerol. | 24 |
| 3.3 | Fluxos de algumas reações metabólicas para a maximização do fluxo do plasmídeo em condições aeróbias e anaeróbias. | 26 |
| 3.4 | Fluxos de algumas reações metabólicas ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos em condições aeróbias e anaeróbias. | 30 |
| 3.5 | Reações analisadas ao variar os fluxos de oxigênio e lactose tendo como objetivo maximizar o fluxo de plasmídeo. | 34 |
| 3.6 | Reações analisadas ao variar o fluxo de oxigênio e o parâmetro alfa tendo como objetivo maximizar o fluxo de plasmídeo. | 37 |
| 3.7 | Reações analisadas ao variar os fluxos de oxigênio e glicerol tendo como objetivo maximizar o fluxo de plasmídeo. | 41 |
| 4.1 | Condições iniciais e os parâmetros operacionais utilizados na resolução do modelo. | 51 |
| 4.2 | Parâmetros em que foi realizada a análise de sensibilidade. | 54 |
| 4.3 | Valores iniciais e limites inferior e superior dos parâmetros utilizados na estimação. | 55 |
| 4.4 | Parâmetros estimados. | 63 |
| 4.5 | Reações de formação do glicerol 3-fosfato e do piruvato e suas respectivas siglas. | 64 |
| C.1 | Aminoácidos e suas abreviações | 93 |

Lista de Símbolos

| | |
|--------------|--|
| C_{G0} | Concentração de oxigênio na vazão de alimentação de ar [g/L], p. 49 |
| C_G | Concentração de oxigênio na fase gás [g/L], p. 49 |
| C_{Le} | Concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a fase gás [g/L], p. 49 |
| C_L | Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida [g/L], p. 49 |
| C_{lcts_f} | Concentração de lactose na alimentação [g/L], p. 49 |
| C_{lcts} | Concentração extracelular de lactose [g/L], p. 49 |
| $F(t)$ | Taxa de alimentação [L/h], p. 49 |
| F_{ar} | Vazão de ar injetado no biorreator [L/h], p. 49 |
| G_f | Concentração de substrato na alimentação [g/L], p. 49 |
| G | Concentração extracelular do glicerol [g/L], p. 49 |
| PM_i | Massa molar do componente i [g/mmol], p. 49 |
| V_G | Volume do gás interno no biorreator [L], p. 49 |
| V_L | Volume do líquido no biorreator [L], p. 49 |
| V | Volume do biorreator [L], p. 49 |
| X | Concentração de biomassa [g/L], p. 49 |
| μ | Taxa específica de crescimento [h^{-1}], p. 48 |
| μ | Taxa específica de crescimento [h^{-1}], p. 49 |
| k_d | Taxa de morte celular [h^{-1}], p. 49 |

- k_1a** Coeficiente de transferência de massa gás-líquido do oxigênio [h^{-1}], p. 49
- t** Tempo [h], p. 49
- v_i** Fluxo do metabólito do componente i [mmol/ gDW h], p. 49

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------------|---|
| α -KG | <i>α-cetogluturato</i> , p. 22, 25, 29, 33, 37, 40 |
| 13dpg | <i>1,3-Bifosfoglicerato</i> , p. 25, 29 |
| 2pg | <i>2-fosfoglicerato</i> , p. 25, 29 |
| 3PG | <i>3-fosfoglicerato</i> , p. 22 |
| 3pg | <i>3-fosfoglicerato</i> , p. 25, 29 |
| ABHH | <i>Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular</i> , p. 2 |
| ANVISA | <i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i> , p. 3 |
| AcCoA | <i>Acetil Coenzima A</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| Ac | <i>Acetato</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| Actp | <i>Acetil fosfato</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| CIT | <i>Citrato</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| CoA | <i>Coenzima A</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| Dhap | <i>Fosfato de diidroxiacetona</i> , p. 25, 29 |
| E4P | <i>Eritrose-4-fosfato</i> , p. 22 |
| FBA | <i>Flux Balance Analysis</i> , p. 11, 14, 23 |
| FOR | <i>Formato</i> , p. 25, 29 |
| G3p | <i>Gliceraldeído-3-fosfato</i> , p. 25, 29 |
| Glyc3p | <i>Glicerol 3-fosfato</i> , p. 25, 29 |
| Glyc | <i>Glicerol</i> , p. 25, 29 |
| ICIT | <i>Isocitrato</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |

| | |
|--------|---|
| LLA | <i>Leuceemia Linfoblástica Aguda</i> , p. 1, 5 |
| Mal-L | <i>Malato</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| NADH | <i>Difosfopiridina nucleotídeo reduzido</i> , p. 22, 25, 29, 33, 37, 40 |
| NADPH | <i>Difosfopiridina nucleotídeo fosfato reduzido</i> , p. 22, 25, 29 |
| NADP | <i>Difosfopiridina nucleotídeo fosfato</i> , p. 25, 29 |
| NAD | <i>Difosfopiridina nucleotídeo</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| OAA | <i>Oxalacetato</i> , p. 22, 25, 29, 33, 37, 40 |
| PEP | <i>Fosfoenolpiruvato</i> , p. 22, 25, 29 |
| PPi | <i>Pirofosfato</i> , p. 21, 25, 29 |
| PYR | <i>Piruvato</i> , p. 22, 25, 29, 33, 37, 40 |
| Pi | <i>Fosfato inorgânico</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |
| Q8 | <i>Uniquinona</i> , p. 25, 29 |
| Q8h2 | <i>Uniquinol</i> , p. 25, 29 |
| R5P | <i>Ribose-5-fosfato</i> , p. 22, 25, 29 |
| SucCoA | <i>Succinil Coenzima A</i> , p. 25, 29 |
| Succ | <i>Succinato</i> , p. 25, 29 |
| dATP | <i>Trifosfato deoxiadenosina</i> , p. 21, 25, 29 |
| dCTP | <i>Trifosfato deoxicitosina</i> , p. 21, 25, 29 |
| dFBA | <i>Dynamic Flux Balance Analysis</i> , p. 14 |
| dGTP | <i>Trifosfato deoxiguanosina</i> , p. 21, 25, 29 |
| dNTP | <i>Trifosfato deoxiribonucleosídeo</i> , p. 21 |
| dTTP | <i>Trifosfato deoxitimidina</i> , p. 21, 25, 29 |
| lac-D | <i>Lactato</i> , p. 25, 29, 33, 37, 40 |

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

Leucemia é o décimo primeiro tipo de câncer mais comum no mundo com 352.000 novos casos diagnosticados em 2012 (FERLAY *et al.*, 2013). As maiores taxas de incidência da leucemia são na Austrália e na Nova Zelândia e as menores na África Ocidental. O Brasil tem uma incidência significativa quando comparada com outros países como pode ser observado na Figura 1.1. A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) representa cerca de 12% do total de leucemias, no entanto 80% em crianças (REDAELLI *et al.*, 2005).

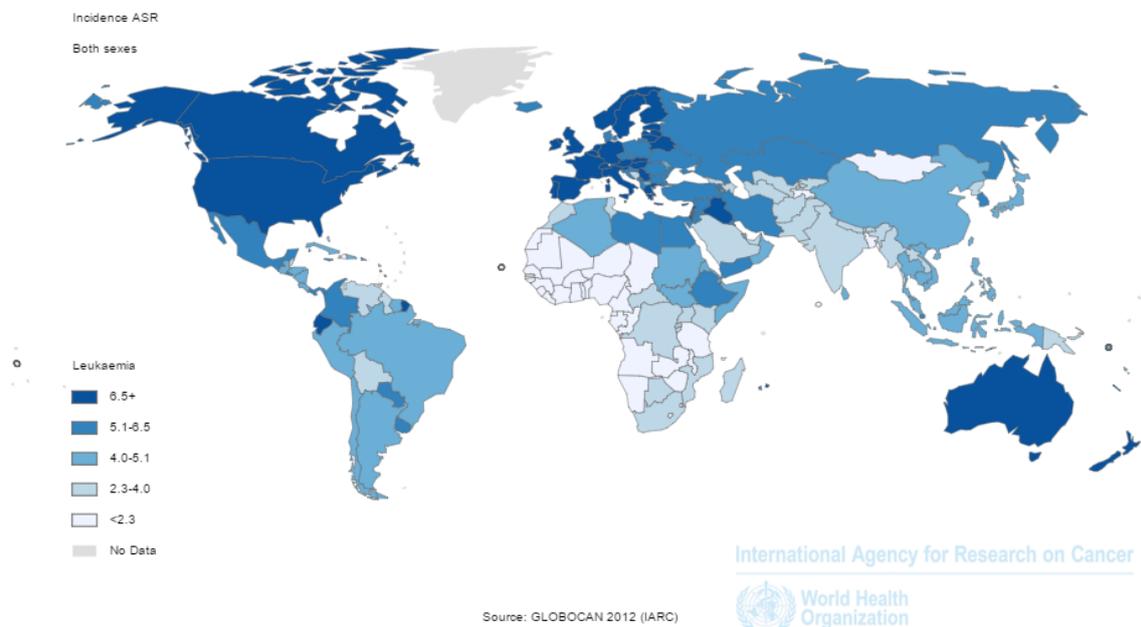


Figura 1.1: Mapa mundial com as taxas de incidência de leucemia padronizado por idade por país (por 100.000 habitantes) em 2012. Fonte: IARC (FERLAY *et al.*, 2013)

A enzima L-asparaginase é um dos medicamentos mais eficazes no tratamento

da LLA nos últimos 30 anos. Antes de se utilizar a L-asparaginase no tratamento, a sobrevida das crianças com LLA era baixa, aumentando significativamente com a inserção desse medicamento no tratamento, como dito em entrevista pela médica Sandra Logget, coordenadora do Comitê de Hematologia e Hemoterapia Pediátrica da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (ABHH):

Nos anos 1960, quando ainda não se tinha tanto conhecimento, a L-Asparaginase não entrava no tratamento e a sobrevida global das crianças com Leucemia Linfóide Aguda ficava em torno de 20%. Com a inclusão de várias doses da L-Asparaginase no tratamento, essa sobrevida subiu pra cerca de 90%. (14/01/2014 - G1 - Globo Notícias)

Isso porque a enzima catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina, essencial para a síntese proteica, a ácido aspártico e amônia, levando à morte das células leucêmicas. Assim, o grande sucesso no tratamento da LLA foi encontrado ao combinar a L-asparaginase com outras drogas e radioterapias (KUMAR *et al.*, 2013).

No Brasil, a L-asparaginase utilizada é importada. Em 2013, o Ministério da Saúde teve que assumir a compra do medicamento, que antes era realizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), pois a empresa brasileira que distribuía o medicamento comunicou ao governo federal que a fabricação pela empresa estrangeira foi interrompida e que os estoques durariam por mais um ano. O ministério conseguiu controlar melhor o abastecimento ao conseguir um novo fornecedor e viabilizar uma aquisição centralizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Com o intuito do país não ser mais surpreendido pela suspensão da produção do medicamento por uma empresa privada internacional sem atividades produtivas no Brasil, uma parceria entre a Fiocruz e os laboratórios privados NT Pharma e Unitec Biotec foi firmada em junho de 2013 para que, a partir de 2015, a L-asparaginase fosse produzida nacionalmente. Porém, devido a problemas no processo de inovação para produção do medicamento, em 2014 a L-asparaginase foi retirada da lista de Parceria para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Novas propostas de produção do medicamento deveriam ter sido apresentadas ao Ministério da Saúde até abril de 2015 por laboratórios públicos e privados, sendo que propostas não foram enviadas para a produção de L-asparaginase, e assim poderão ser reapresentadas na seleção de 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Existem formas de L-asparaginase provenientes de diferentes microrganismos, porém as formas isoladas de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* são as utilizadas no tratamento de LLA, pois apresentam uma toxicidade menor quando comparada com as outras formas dessa enzima (KUMAR *et al.*, 2013). Além disso, possuem especificidades imunológicas diferentes, oferecendo assim uma alternativa para pacientes que desenvolvem reações de hipersensibilidade a uma destas enzimas. Entretanto,

no Brasil, a ANVISA autoriza o uso do medicamento apenas obtido a partir de *E. coli*.

Tendo em vista os fatos acima citados, é de grande importância obter novas fontes de L-asparaginase e com tecnologia nacional. A bactéria *Zymomonas mobilis* pode ser uma alternativa, pois apresenta propriedades terapêuticas, com aplicações em casos de enterocolites bacterianas e infecções ginecológicas e tem sido utilizada no desenvolvimento de probióticos e na produção de levana, substância com atividade antitumoral (CALAZANS *et al.*, 2000; JALES *et al.*, 2007). Além disso, trabalhos anteriores (ABUD *et al.*; NETO *et al.*, 2006; PINHEIRO, 2001) mostram a produção da L-asparaginase pela bactéria utilizando diferentes meios de cultivo.

BAPTISTA (2013) avaliou o potencial antileucêmico da L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* produzida em *E. coli* e verificou a eficácia da enzima em linhagens de células leucêmicas e amostras primárias de pacientes diagnosticados com LLA, e EINSFELDT (2014) fez a clonagem e expressão da L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *E. coli* e obteve uma produtividade maior quando comparada com o cultivo de *Z. mobilis*, já que essa bactéria apresenta uma taxa de síntese da enzima baixa em relação à *E. coli*.

Para o desenvolvimento do processo de produção da L-asparaginase recombinante em *E. coli* em escala industrial, é de grande importância utilizar modelos matemáticos que descrevam esses processos biotecnológicos de forma que seja possível compreender, projetar e solucionar problemas na produção industrial de proteínas recombinantes (MEADOWS *et al.*, 2010). Para isso, surge a necessidade de propor modelos dinâmicos que possam prever o comportamento do metabolismo celular por completo.

1.2 Objetivo

Esse trabalho tem por objetivo a modelagem, simulação e estimação de parâmetros do processo de produção da L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* expressa em *E. coli*, utilizando na modelagem matemática do processo a abordagem dinâmica da análise do balanço de fluxos metabólicos. Tendo os seguintes objetivos específicos:

- (i) Obter um modelo da rede metabólica de *E. coli* considerando a formação do plasmídeo e da L-asparaginase recombinante;
- (ii) Considerar no modelo metabólico uma estratégia para a indução da expressão da enzima recombinante pela lactose;
- (iii) Propor um modelo dinâmico que considere as reações do metabolismo celular;

- (iv) Utilizar a abordagem dinâmica da análise do balanço de fluxos metabólicos no modelo proposto;
- (v) Estimação dos parâmetros utilizando os dados experimentais de EINSFELDT (2014);

1.3 Estrutura da Dissertação

A dissertação é composta por cinco capítulos. O Capítulo 1 descreveu alguns conceitos introdutórios, a motivação e os objetivos deste trabalho. O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica sobre a enzima L-asparaginase e sua importância, a produção de proteínas recombinantes, bioquímica de ácidos nucleicos e proteínas, e sobre a análise do balanço de fluxos metabólicos e sua abordagem dinâmica. O Capítulo 3 apresenta a construção do modelo metabólico, as reações para formar o plasmídeo e a enzima, além de análises do metabolismo ao variar o parâmetro alfa (relacionado à transcrição) e os fluxos de oxigênio, lactose e glicerol, variáveis importantes para o processo. No Capítulo 4 mostram-se o modelo proposto e seus três blocos, dinâmico, metabólico e cinético, a calibração do modelo através dos dados experimentais, a análise de sensibilidade e a estimação dos parâmetros, além dos resultados e discussão. No Capítulo 5 são expostas as conclusões e sugestões para próximos trabalhos. Em seguida, as referências bibliográficas são apresentadas.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 A enzima L-asparaginase

A enzima L-asparaginase é uma proteína terapêutica de origem microbiana universalmente utilizada no tratamento de LLA, sendo uma das enzimas mais eficazes utilizada por mais de 30 anos (KUMAR *et al.*, 2013). É encontrada em muitos tecidos animais, microrganismos, plantas e no soro de certos roedores. Sua atividade antitumoral foi observada primeiramente em 1953 em soro de porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*) (BAPTISTA, 2013). Posteriormente, a L-asparaginase de *E. coli* também apresentou capacidade de inibição do crescimento tumoral (MASHBURN e WRISTON, 1964), tendo assim a possibilidade de obter a enzima em maiores quantidades.

A enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1) catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Nas células normais, L-asparagina não é um aminoácido essencial, pois é possível sintetizá-lo através da L-asparagina sintetase, sendo essa enzima a única disponível para a síntese do aminoácido. Por outro lado, devido aos níveis baixos de L-asparagina sintetase em células leucêmicas, o aminoácido L-asparagina é essencial (KUMAR *et al.*, 2013) para esse tipo de célula. Dessa forma, como a L-asparaginase utiliza completamente o aminoácido, as células tumorais não dispõem de quantidades suficientes da L-asparagina para a síntese proteica (NARTA *et al.*, 2007). Com a inibição da síntese de proteínas, ocorre também o bloqueio da síntese de DNA e, assim, as células proliferativas não entram na fase S do ciclo celular. Tem-se então o bloqueio do ciclo celular na fase G1 fazendo com que as células neoplásicas entrem em apoptose (BAPTISTA, 2013). A Figura 2.1 mostra o mecanismo de ação da L-asparaginase.

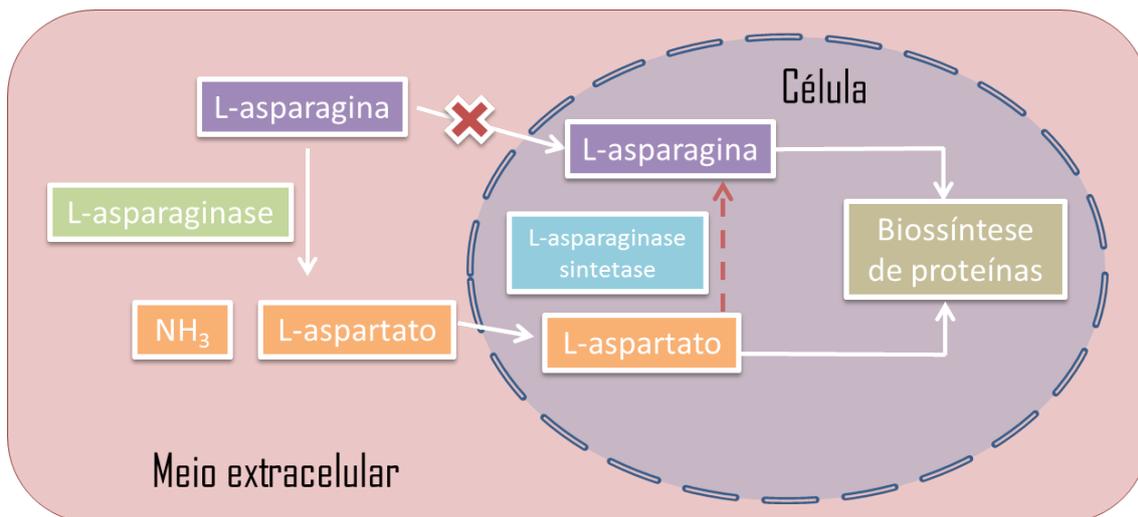


Figura 2.1: Mecanismo de ação da L-asparaginase. O aminoácido L-asparagina pode ser obtido através da ação da enzima L-Asparagina Sintetase. A L-asparaginase utiliza como substrato a L-asparagina gerando amônia e L-aspartato. Devido aos baixos níveis da L-Asparagina Sintetase, células leucêmicas não apresentam quantidade suficientes de L-asparagina para síntese de proteínas na presença da L-asparaginase. Adaptado de BAPTISTA (2013).

As formulações disponíveis no mercado da L-asparaginase para tratamento de LLA são provenientes dos microrganismos *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi*, pois apresentam uma toxicidade menor quando comparada com a enzima de outras fontes e, além disso, possuem especificidades imunológicas diferentes (EINSFELDT, 2014), sendo assim uma alternativa para pacientes que apresentam hipersensibilidade ao medicamento.

2.1.1 A L-asparaginase proveniente de *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa que normalmente é relacionada com a produção de etanol. Isso porque apresenta propriedades interessantes, como tolerância à concentração relativamente alta de etanol e baixo rendimento de biomassa porém alto rendimento em etanol (CAZETTA *et al.*, 2007).

Devido às suas propriedades terapêuticas, outros estudos, além da produção de etanol, foram feitos. Reporta-se na literatura a aplicação de culturas de *Z. mobilis* para tratamento de enterocolite e cistite crônicas, e infecções ginecológicas (SWINGS e DE LEY, 1977). Além disso, tem sido utilizada no desenvolvimento de probióticos (JALES *et al.*, 2007) e na produção de levana, substância com atividade antitumoral (CALAZANS *et al.*, 2000).

O Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ (localizado na cidade do Rio de Janeiro – Brasil) apresenta diversos estudos utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* para produção de várias subs-

tâncias, como etanol, ácido glicônico, sorbitol e ácido lactobiônico (ALVES, 1993; FERRAZ, 1996; FONSECA, 2003; SEVERO JÚNIOR, 2008; WILBERG, 1996). Além disso, o laboratório vem estudando o cultivo de *Z. mobilis* visando a produção da enzima L-asparaginase (ABUD, 2005; EINSFELDT, 2014; PINHEIRO, 2001) e seu potencial antileucêmico (BAPTISTA, 2013).

PINHEIRO (2001) estudou o cultivo da *Zymomonas mobilis* em meios com L-asparagina como fonte de nitrogênio para produção da L-asparaginase. No caso do trabalho de ABUD (2005) houve a produção da enzima por *Z. mobilis* em processos no modo batelada e desenvolvimento do modelo cinético. Além disso, ABUD (2005) estimou a constante de Michaelis-Menten, K_m , mostrando assim uma alta afinidade do L-asparaginase produzida pelo substrato. Esse trabalho gerou uma patente (ABUD *et al.*) na qual mostrou o processo de produção da L-asparaginase por *Z. mobilis* utilizando distintos meios de cultivo e condições de fermentação. Na literatura foi encontrado outro trabalho, também realizado no Brasil, de NETO *et al.* (2006) que teve como objetivo a otimização da produção da L-asparaginase por *Z. mobilis* usando o planejamento fatorial incompleto, obtendo uma produtividade maior que ABUD (2005).

No entanto, esses trabalhos mostraram uma baixa produtividade da L-asparaginase por *Z. mobilis* e não mostraram a possível ação antitumoral da enzima. Com o intuito de obter uma produtividade maior, EINSFELDT (2014) fez a clonagem e expressão da L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *E. coli*, e obteve produtividade superior aos observados nos trabalhos anteriores em meio de cultivo complexo. Além disso, avaliou as condições de expressão da enzima em meio de cultura definido com glicerol como substrato, utilizando planejamento fatorial fracionado, aumentando a produtividade cerca de 50 vezes quando comparada com o meio de cultivo complexo.

Através da Tabela 2.1 é possível comparar os valores da produtividade obtida pelos trabalhos citados anteriormente e observar a considerável diferença entre o trabalho de EINSFELDT (2014) e os demais, mostrando assim sua grande relevância para a produção da L-asparaginase proveniente de *Zymomonas mobilis*.

No sentido de estudar o potencial antileucêmico da L-asparaginase recombinante de *Z. mobilis*, BAPTISTA (2013) avaliou os aspectos citotóxicos e citostáticos desta enzima sobre linhagens de células leucêmicas e amostras primárias de pacientes diagnosticados com LLA. E através de diversas análises como viabilidade, apoptose, ciclo celular, entre outras, verificou-se *in vitro* a eficácia da L-asparaginase recombinante sobre as amostras estudadas.

Tabela 2.1: Principais trabalhos sobre a L-asparaginase proveniente de *Z. mobilis* e a produtividade obtida

| Autor | Objetivo do trabalho | Produtividade da L-asparaginase |
|--------------------|--|---------------------------------|
| PINHEIRO (2001) | Estudou o cultivo <i>Z. mobilis</i> em meios com L-asparagina como fonte de nitrogênio para produção da L-asparaginase | - |
| ABUD (2005) | Produção da enzima por <i>Z. mobilis</i> em processos no modo batelada e desenvolvimento do modelo cinético | 0,005 UI/mL em 33h de cultivo |
| NETO et al. (2006) | Otimização da produção da L-asparaginase por <i>Z. mobilis</i> usando o planejamento fatorial incompleto | 0,016 UI/mL em 21h de cultivo |
| BAPTISTA (2013) | Estudou o potencial antileucêmico da L-asparaginase recombinante de <i>Z. mobilis</i> | - |
| EINSFELDT (2014) | Clonagem e expressão da L-asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i> em <i>E. coli</i> | 20,4 UI/mL em 16h de cultivo |

2.2 Produção de proteínas recombinantes em *E. coli*

A produção de proteínas recombinantes é um mercado multimilionário (MAT-TANOVICH *et al.*, 2011), sendo o hospedeiro bacteriano responsável por aproximadamente 30% dos produtos biofarmacêuticos existentes no mercado (OVERTON, 2014). O microrganismo hospedeiro mais utilizado para produção de muitas proteínas biofarmacêuticas é *Escherichia coli* (MEADOWS *et al.*, 2010), que possui a plataforma de expressão mais popular (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Além do organismo hospedeiro, a escolha do vetor de expressão também é uma parte importante da produção de proteínas recombinantes, pois depende do tamanho da proteína, do número de cópias formado, da resistência ao antibiótico, entre outras considerações. Em *E. coli* um dos vetores utilizados é o plasmídeo, que são estruturas de DNA circular que se replicam separadamente do cromossomo do microrganismo hospedeiro (LEHNINGER *et al.*, 2005).

Genericamente, o plasmídeo apresenta promotor, gene de resistência ao antibiótico, o sítio de clonagem onde o gene de interesse é inserido, a origem de replicação (Figura 2.2). Comumente utiliza-se vetores da família pET que apresentam o sistema promotor T7, sendo este muito popular na expressão de proteínas recombinantes, pois representa um caso de sucesso para pelo menos 50% das proteínas celulares (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

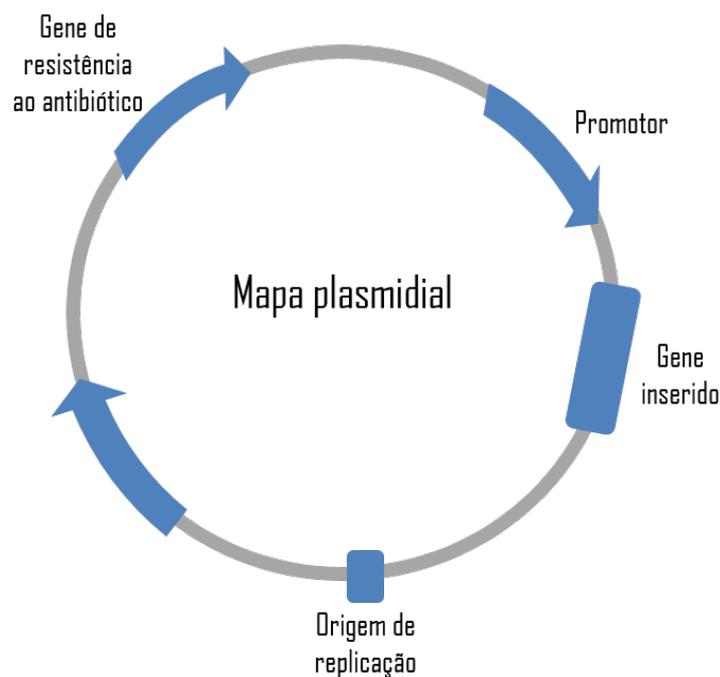
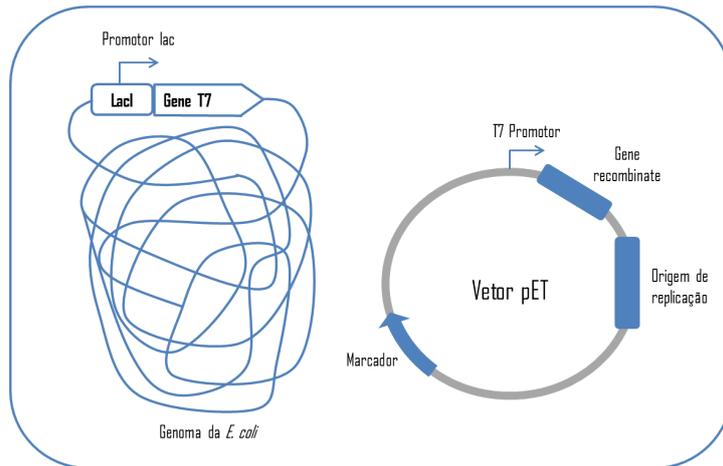
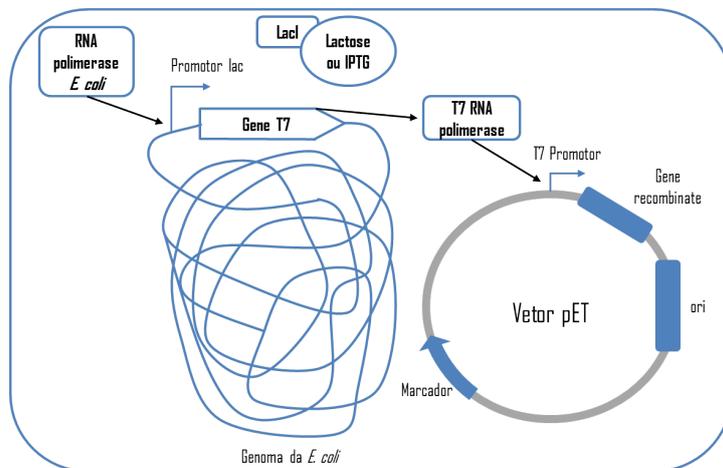


Figura 2.2: Exemplo de um mapa plasmidial em que contém o gene de resistência ao antibiótico, o sítio de clonagem (local onde o gene de interesse é inserido), a origem de replicação e o promotor.

Nesse sistema, o gene de interesse é replicado utilizando um promotor que é reconhecido pela T7 RNA polimerase. A *E. coli* utilizada para expressão de proteínas recombinantes apresenta uma cópia do gene que codifica para essa enzima e tem um promotor *lac* em que a RNA polimerase nativa de *E. coli* consegue se ligar. Quando a proteína repressora *lac* (*LacI*) está presente na sequência do operador *lac* do DNA da célula hospedeira, a T7 RNA polimerase não pode ser transcrita e traduzida (OVERTON, 2014). Porém, pode-se fazer a indução da formação dessa polimerase e consequente transcrição do gene de interesse ao inserir no sistema lactose ou seu análogo não-hidrolisável isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), pois esses compostos se ligam à *LacI* não deixando essa proteína se ligar ao DNA de *E. coli* (ROSANO e CECCARELLI, 2014). Assim, é possível controlar a expressão da proteína recombinante por esse sistema de indução que pode ser representado na Figura 2.3.



(a) Sem indução



(b) Com indução

Figura 2.3: Mecanismo de indução por lactose ou IPTG no organismo hospedeiro (Adaptado de OVERTON (2014)).

2.3 Análise do Balanço de Fluxos Metabólicos (FBA)

A análise do balanço de fluxos metabólicos (FBA - *Flux Balance Analysis*) é uma abordagem de modelagem matemática baseada em restrições para analisar os fluxos dos metabólitos através da rede metabólica (ORTH *et al.*, 2010). Essas redes foram reconstruídas para diversos organismos e apresentam todas as reações conhecidas do metabolismo. Além disso, o Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos da Universidade da Califórnia em San Diego (UCSD) validaram mais de trinta modelos metabólicos em escala genômica com dados experimentais (MONK, 2016).

Inicialmente deve-se representar matematicamente as reações metabólicas. O balanço de massa do sistema metabólico é descrito através da matriz estequiométrica $S_{m,n}$ para n reações e m metabólitos (KAUFFMAN *et al.*, 2003). Como pode-se observar na Figura 2.4, sabendo as reações intracelulares e como se dá sua estequiometria é possível construir a matriz S e definir os limites dos fluxos para cada uma delas, estes baseados na reversibilidade das reações, no conhecimento da termodinâmica celular ou medidas experimentais (RAMAN e CHANDRA, 2009). Vale ressaltar que o sinal do fluxo está relacionado com o sentido da reação, se esta for irreversível apresentará apenas sinal positivo, porém se for reversível poderá apresentar sinal positivo ou negativo dependendo do sentido em que a reação ocorre.

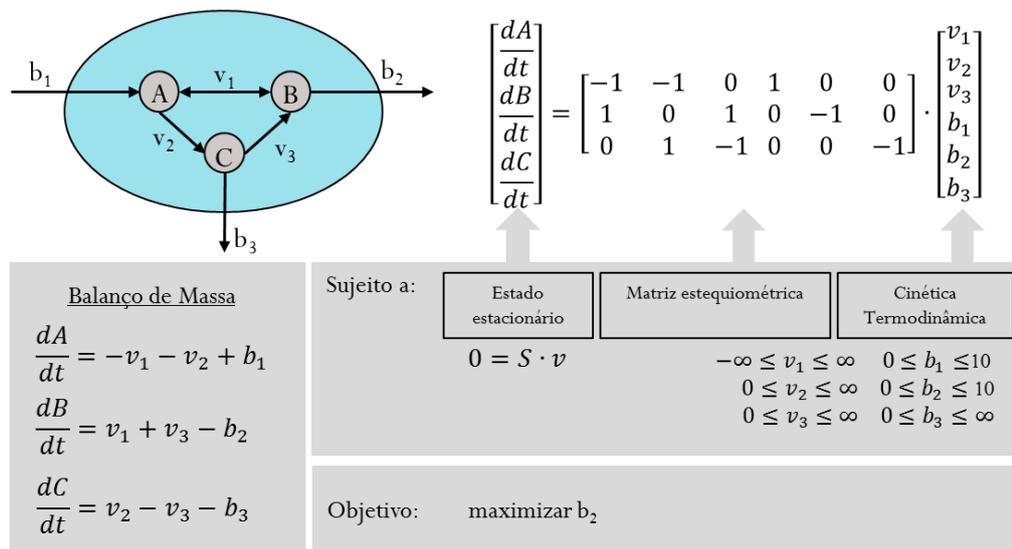


Figura 2.4: Construção do FBA. A representação matemática das reações metabólicas se dá ao utilizar os fluxos dessas reações, construir a matriz estequiométrica, definir os limites dos fluxos e o objetivo. (Adaptado de KAUFFMAN *et al.* (2003))

A abordagem do FBA considera o estado pseudo-estacionário para o metabolismo intracelular, assumindo um rápido equilíbrio das concentrações dos metabólitos em relação às perturbações extracelulares (HJERSTED e HENSON, 2006; SÁNCHEZ

et al., 2014; VAN IMPE *et al.*, 2013). Assim, tendo formulado os balanços de massa, o próximo passo é resolver o problema de programação linear tendo como função objetivo um determinado fluxo, como por exemplo a taxa específica de crescimento, a produção ou consumo de ATP, a taxa de produção de determinado produto ou taxa de consumo de determinado nutriente (GIANCHANDANI *et al.*, 2010; VARGAS *et al.*, 2011). Outra função objetivo que se pode considerar é o princípio da máxima eficiência enzimática (FENG *et al.*, 2012; HOLZHÜTTER, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2014; SCHUETZ *et al.*, 2012), em que faz-se a minimização da soma do quadrado dos fluxos. Esses problemas de otimização podem ser escritos da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \min_v \quad & Z \\ \text{sujeito a:} \quad & S \cdot v = 0 \\ & a_i \leq v_i \leq b_i \end{aligned} \quad (2.1)$$

em que Z é a função objetivo, S é a matriz estequiométrica, v é o vetor dos fluxos das reações da rede metabólica e a_i e b_i são os limites inferior e superior, respectivamente, dos fluxos para cada reação i .

Como resultado da otimização se obtém a distribuição de fluxos da rede metabólica. As restrições que o balanço de massa impõe através da matriz estequiométrica S e dos limites inferior e superior dos fluxos definem um espaço de soluções admissível (Figura 2.5a), podendo assim encontrar uma solução ótima dependendo da função objetivo (Figura 2.5b). Esse é o conceito da modelagem baseada em restrições.

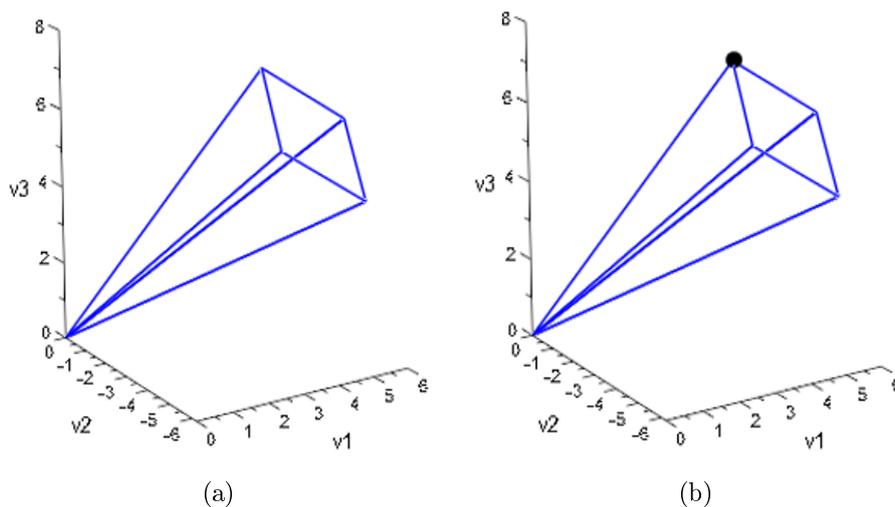


Figura 2.5: Conceito da modelagem baseada em restrições do FBA. Através dos limites dos fluxos constrói-se o espaço de soluções com essas restrições (a) e ao resolver o problema de otimização obtém-se a solução ótima (b). Adaptado de ORTH *et al.* (2010).

Nos últimos anos houve um crescimento no número de *softwares* utilizados

para a análise do balanço de fluxos metabólicos (FBA), tendo hoje mais de vinte aplicações disponíveis (LAKSHMANAN *et al.*, 2012). A classificação desses *softwares* em três grupos foi feita por LAKSHMANAN *et al.* (2012), em que o primeiro apresenta aplicações que podem ser utilizadas de forma independente, sendo instalada no computador do usuário e utilizando localmente; o segundo com aplicações baseada em *toolbox*, onde são necessários outros softwares como, por exemplo, MATLAB (<http://www.mathworks.com/products/matlab/>), Mathematica (<http://www.wolfram.com/mathematica/>); e o terceiro e último grupo com aplicações que podem ser acessadas *online*. A Tabela 2.2 lista alguns softwares dos grupos descritos acima.

Tabela 2.2: Softwares utilizados no FBA. Fonte:LAKSHMANAN *et al.* (2012)

| Tipo | Nome | Referência |
|---------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Aplicação independente | | |
| | OptFlux | ROCHA <i>et al.</i> (2010) |
| | SBRT | WRIGHT e WAGNER (2008) |
| | MetaFluxNet | LEE <i>et al.</i> (2003) |
| | BioOpt | CVIJOVIC <i>et al.</i> (2010) |
| | SurreyFBA | GEVORGYAN <i>et al.</i> (2011) |
| | FASIMU | HOPPE <i>et al.</i> (2011) |
| | GEMSiRV | LIAO <i>et al.</i> (2012) |
| Baseado em <i>toolbox</i> | | |
| | CellNetAnalyzer | STEFFEN <i>et al.</i> (2007) |
| | COBRA Toolbox | SHELLENBERGER <i>et al.</i> (2012) |
| | SNAToolbox | URBANCZIK (2006) |
| | FBA-SimVis | GRAFAHREND-BELAU <i>et al.</i> (2009) |
| | MetaFlux | LATENDRESSE <i>et al.</i> (2012) |
| Com acesso online | | |
| | CycSim | LE FÈVRE <i>et al.</i> (2009) |
| | WEbcoli | JUNG <i>et al.</i> (2009) |
| | GSMN-TB | BESTE <i>et al.</i> (2007) |
| | Acorn | SROKA <i>et al.</i> (2011) |
| | Model SEED | HENRY <i>et al.</i> (2010) |
| | FAME | BOELE <i>et al.</i> (2012) |
| | MicrobesFlux | FENG <i>et al.</i> (2012) |

2.4 Análise Dinâmica de Fluxos Metabólicos

Tendo em vista que entender a dinâmica do metabolismo celular em escala industrial é fundamental para o projeto, controle e a otimização de processos biotecnológicos (ANTONIEWICZ, 2013), uma importante abordagem apareceu para caracterizar o estado dinâmico do sistema intracelular, a análise do balanço de fluxos metabólicos dinâmica (dFBA).

Essa abordagem, que é uma extensão do FBA, se baseia no estado pseudo-estacionário para o metabolismo intracelular e dinâmico para o meio extracelular (ANTONIEWICZ, 2013), ou seja, assume-se que as concentrações dos metabólitos intracelulares se equilibram rapidamente em relação às perturbações extracelulares (HJERSTED e HENSON, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2014; VAN IMPE *et al.*, 2013). Além disso, é obtida na ausência de dados da cinética enzimática e com poucas informações relacionadas ao processo regulatório celular (HJERSTED e HENSON, 2006).

Através do FBA apenas se obtém a distribuição dos fluxos metabólicos, não mostrando as características dinâmicas dos fluxos, porém poderá indicar a mudança instantânea desses fluxos metabólicos (MAHADEVAN *et al.*, 2002). Assim, as restrições relacionadas com as mudanças dos fluxos devem ser introduzidas no problema. Dessa forma, o modelo do metabolismo intracelular acoplado ao balanço de massa dinâmico dos substratos e produtos extracelulares através da cinética de consumo do substrato e da taxa de liberação do produto poderá prever o comportamento celular transiente (HJERSTED e HENSON, 2006).

Existem três abordagens para a resolução do problema da análise dinâmica do balanço de fluxos (dFBA). A primeira é a abordagem da **otimização dinâmica** em que envolve a otimização ao longo de todo o período do tempo de interesse para obter perfis temporais para os fluxos e metabólitos (Figura 2.6c). Esse problema de otimização dinâmica pode ser discretizado transformando-o em um problema de programação não-linear (NLP) e ser resolvido por métodos de otimização adequados (MAHADEVAN *et al.*, 2002).

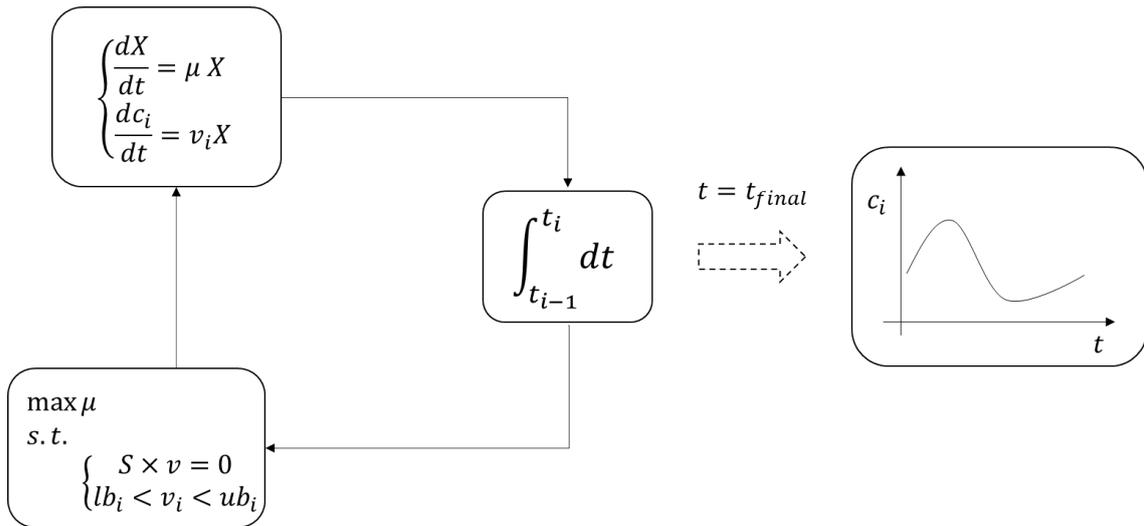
Já a segunda é a abordagem de **otimização estática** em que envolve a divisão do tempo em vários intervalos e a solução da otimização instantânea no início de cada intervalo de tempo, seguido por uma integração ao longo desse intervalo (Figura 2.6a). O problema pode ser resolvido ao fazer a otimização do problema de programação linear (LP) repetidamente para cada intervalo de tempo, obtendo a distribuição de fluxos em um determinado instante de tempo (MAHADEVAN *et al.*, 2002).

A abordagem da otimização estática apresenta a desvantagem de precisar de um compromisso entre o tamanho pequeno do passo e o tempo computacional (HÖFF-

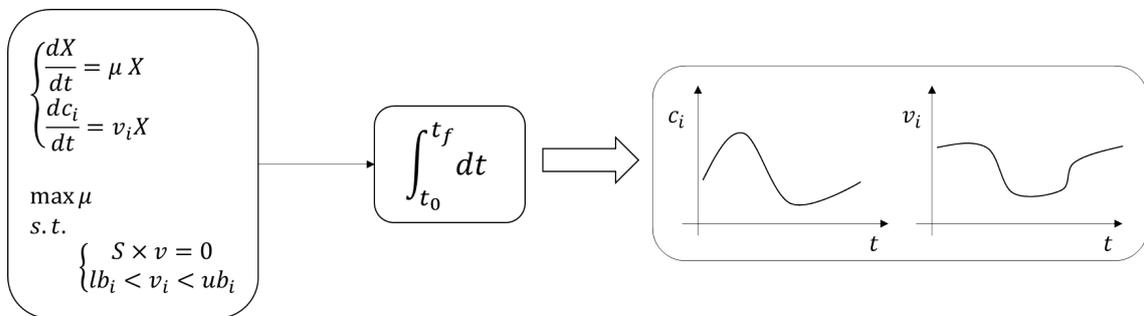
NER *et al.*, 2013). Porém, o número de variáveis a ser resolvido é bem menor em comparação à primeira abordagem e, além disso, o problema de otimização é um LP, sendo o oposto ao NLP da abordagem dinâmica (MAHADEVAN *et al.*, 2002). À medida que a rede metabólica aumenta, o número de variáveis e restrições aumentam proporcionalmente no NLP e, assim, a abordagem dinâmica fica limitada à modelos metabólicos de pequena escala (HÖFFNER *et al.*, 2013; MAHADEVAN *et al.*, 2002). Então, a abordagem estática terá uma aplicabilidade melhor nos casos de redes metabólicas de larga escala.

A terceira é a abordagem direta (Figura 2.6b) em que se resolve simultaneamente o problema de programação linear (LP) e as equações diferenciais ordinárias, normalmente utilizando métodos implícitos de integração com tamanho do passo de tempo adaptativo para controle de erros (GOMEZ *et al.*, 2014; HÖFFNER *et al.*, 2013). Algumas dificuldades podem ser encontradas nessa implementação, como não obter um vetor solução único para o LP, rigidez e quando o LP se torna inviável próximo ao limite de viabilidade.

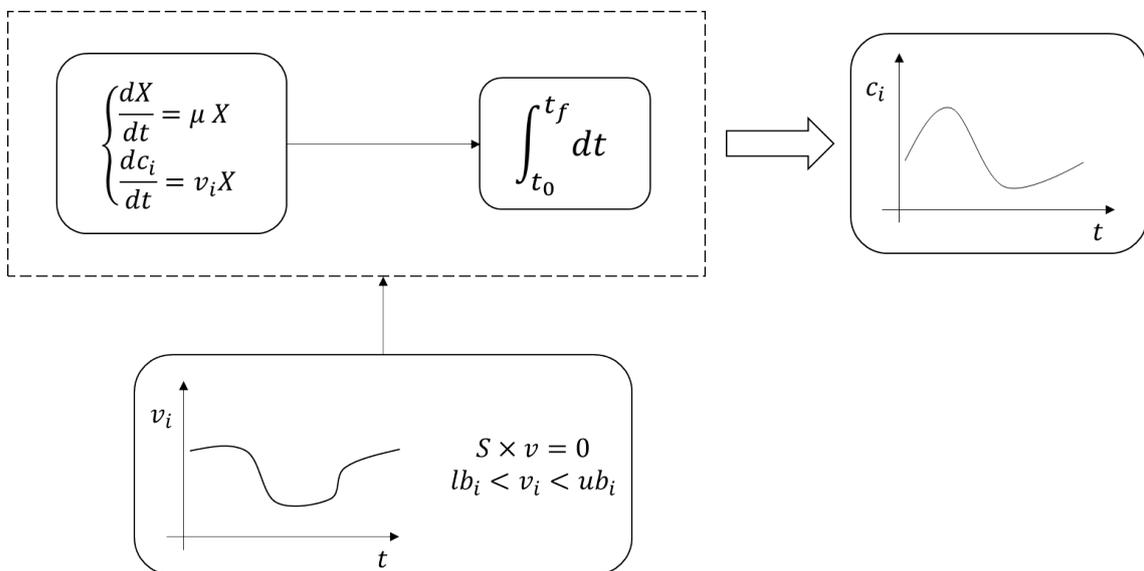
A reformulação do LP como um sistema algébrico e integração de um sistema algébrico-diferencial e a utilização da otimização lexicográfica para obter o vetor de fluxos ótimo já foi proposta (GOMEZ *et al.*, 2014; HARWOOD *et al.*, 2015; HÖFFNER *et al.*, 2013), de forma a enfrentar os desafios ditos anteriormente. Nesta reformulação, um problema de otimização multi-objetivo é resolvido pelo método da priorização de objetivos de forma sequencial, usando como restrições adicionais as soluções ótimas das funções objetivos já otimizadas.



(a) Abordagem da otimização estática



(b) Abordagem direta



(c) Abordagem da otimização dinâmica

Figura 2.6: Abordagens para resolução do dFBA.

2.5 Otimização Multiobjetivo

A otimização multiobjetivo é um problema com dois ou mais objetivos que devem ser otimizados simultaneamente. Nesse caso, a solução se difere da otimização mono-objetivo. Para um problema multi-objetivo será obtido um conjunto de soluções ótimas que satisfaça as restrições e otimize as funções-objetivo. Esse conjunto de soluções é chamado de Pareto.

Há o espaço de variáveis e o de objetivos na otimização multiobjetivo (AZUMA, 2011). O espaço de variáveis é onde se encontra o conjunto de soluções do problema. Enquanto o espaço de objetivos é formado pelas funções-objetivos a partir das variáveis de decisão, formando um conjunto de Pareto que é denominado fronteira Pareto-ótima (Figura 2.7).

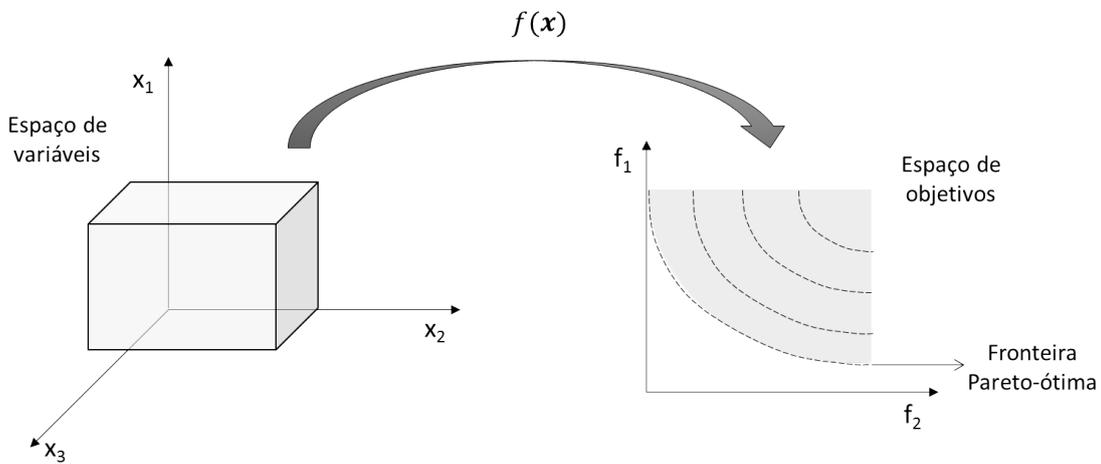


Figura 2.7: Conjunto de soluções do espaço de variáveis e espaço de objetivos no problema multi-objetivo.

Existem algumas abordagens clássicas de resolução de problemas de otimização multiobjetivo como o método da soma ponderada e do ε -restrito que serão descritas a seguir.

Método da soma ponderada

O problema multiobjetivo normalmente é resolvido combinando múltiplos objetivos em um única função escalar objetivo. Essa abordagem é conhecida como método da soma ponderada. De forma mais detalhada, esse método minimiza a soma ponderada dos objetivos, como formulado abaixo:

$$\begin{aligned} \min_x \quad & \sum_{i=1}^n \omega_i f_i(x) \\ & \sum_{i=1}^n \omega_i = 1 \\ & \omega_i > 0, \quad i = 1, \dots, n \end{aligned}$$

em que ω_i é o peso de cada função objetivo $f_i(x)$.

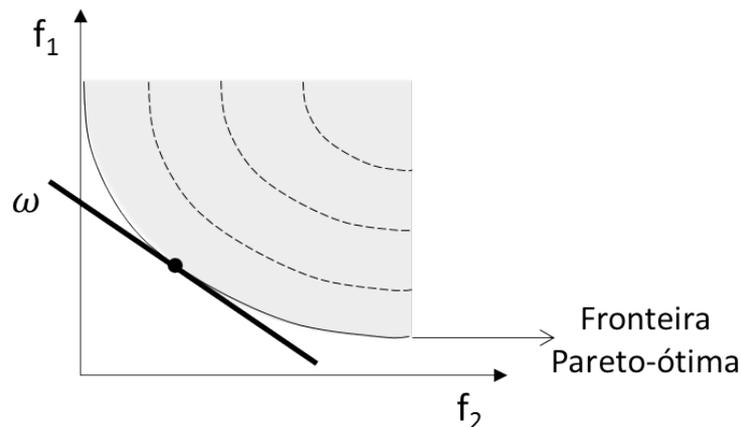


Figura 2.8: Representação gráfica do método da soma ponderada.

Um único ponto na curva de Pareto é obtido ao considerar determinado vetor peso (Figura 2.8), ou seja, uma solução ótima é obtida para um conjunto definido de pesos para as funções objetivos. Um solução ótima eficiente é obtida para problemas multiobjetivos que apresentam a curva de Pareto convexa (EHRGOTT, 2006). O método não é capaz de determinar todas soluções para casos não-convexos da curva de Pareto.

Método ε -restrito

Um dos métodos considerados mais populares para encontrar soluções eficientes em otimização multiobjetivo é o ε -restrito (EHRGOTT, 2006), que foi proposto por CHANKONG e HAIMES (1983). Nesse método, uma das funções-objetivo é escolhida para ser otimizada e as outras serão restrições do problema. Dessa forma, os métodos clássicos de resolução para a otimização mono-objetivo podem ser aplicados.

O problema pode ser formulado da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \min_x \quad & f_j(x) \\ & f_i(x) \leq \varepsilon_i, \forall i \in \{1, \dots, n\} \setminus \{j\} \end{aligned}$$

em que cada ε_i , definido pelo usuário, será o limite máximo para cada função objetivo $f_i(x)$. Para cada valor de ε_i escolhido, obtém-se uma solução Pareto-ótima (Figura 2.9).

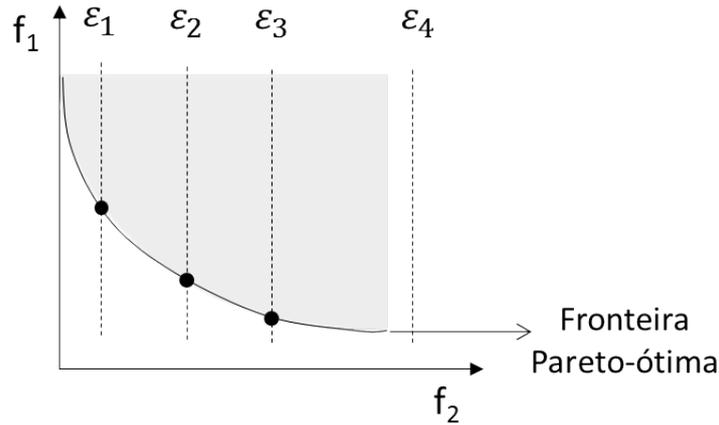


Figura 2.9: Representação gráfica do método ε -restrito.

Assim, o método pode ser utilizado para diferentes espaços de objetivos, convexo, não-convexo e discreto. Entretanto, ao definir o vetor ε deve-se considerar valores factíveis para cada função objetivo.

2.6 Considerações finais

Através da revisão bibliográfica feita nesse capítulo foi possível entender a importância da L-asparaginase no tratamento da LLA e da obtenção desse biofármaco de diferentes fontes. Além disso, mostrou-se que a *Z. mobilis* é uma alternativa para a produção da L-asparaginase devido suas propriedades terapêuticas e que EINS-FELDT (2014) obteve uma alta produtividade da enzima recombinante expressa em *E. coli* quando comparada com os demais trabalhos e BAPTISTA (2013) verificou o potencial antileucêmico da enzima recombinante. Dessa forma, como, para a produção de proteínas recombinantes, obter informações sobre o comportamento do metabolismo intracelular tem grande relevância, a abordagem matemática considerando o dFBA é uma interessante ferramenta a ser utilizada. Assim, nos capítulos a seguir a construção do modelo metabólico e a formulação do modelo matemático proposto são apresentados.

Capítulo 3

Construção do modelo metabólico

Esse capítulo apresenta a construção do modelo metabólico que será utilizado no modelo dinâmico proposto exposto no Capítulo 4. Além das hipóteses consideradas e algumas análises de forma a mostrar sua consistência.

3.1 Rede metabólica de *E. coli*

O genoma de *E. coli*(MG 1655) já foi completamente sequenciado e é um dos organismos mais bem caracterizados e estudados, além de ser de grande interesse industrial (EDWARDS e PALSSON, 2000; REED *et al.*, 2003). No sentido de obter modelos que possam prever o metabolismo de *E. coli*, reconstruções de modelos metabólicos que considerem a modelagem *in silico* integrada com distintos dados, como genômico (relativo ao genoma), transcriptômico (relativo à transcrição), metabolômico (relativo aos metabólitos) e proteômico (relativo ao proteoma) têm sido propostos nos últimos anos (ARCHER *et al.*, 2011; EDWARDS e PALSSON, 2000; FEIST *et al.*, 2007; ORTH *et al.*, 2011; REED *et al.*, 2003).

Atualizações foram feitas, assim como mostrado na Tabela 3.1, de forma a obter maiores informações sobre genes, metabólitos e reações do metabolismo da *E. coli*.

Tabela 3.1: Reconstruções de redes metabólicas em escala genômica disponíveis de *E. coli*. Fonte: FEIST *et al.* (2009).

| Cepa | Versão | Genes do Modelo | Metabólitos | Reações | Compartimentos | Referência |
|---------------|---------|-----------------|-------------|---------|-------------------------------------|-----------------------------|
| K-12 | iJR904 | 904 | 625 | 931 | 2 (c ¹ ,e ²) | REED <i>et al.</i> (2003) |
| K-12 MG1655 | iJE660 | 660 | 438 | 627 | 2 (c,e) | EDWARDS e PALSSON (2000) |
| K-12 MG1655 | iAF1260 | 1260 | 1039 | 2077 | 3 (c,e,p ³) | FEIST <i>et al.</i> (2007) |
| K-12 MG1655 | iJO1366 | 1366 | 1136 | 2251 | 3 (c, e, p) | ORTH <i>et al.</i> (2011) |
| W (ATCC 9637) | iCA1273 | 1273 | 1111 | 2477 | 3 (c,e,p) | ARCHER <i>et al.</i> (2011) |

¹citoplasma

²extracelular

³periplasma

Nesse sentido, foi considerado nesse trabalho o modelo iJO1366 de ORTH *et al.* (2011), por ser o mais completo modelo para a bactéria *E. coli*, como base para a construção metabólica considerando a formação do plasmídeo e expressão da enzima L-asparaginase recombinante.

3.2 Inclusão de reações no modelo metabólico

Para que o modelo metabólico possa prever a expressão da L-asparaginase recombinante é necessário considerar a reação de formação do plasmídeo que contenha o gene da proteína recombinante, a reação para formar a enzima e a indução da expressão enzimática.

A adição das reações no modelo, descritas a seguir, foram feitas utilizando a *toolbox* COBRA (Constraint-Based Reconstruction and Analysis)(SCHELLENBERGER *et al.*, 2012).

3.2.1 Reação para formação do plasmídeo

O plasmídeo é um DNA circular e assim na reação de sua formação utiliza-se os trifosfato deoxiribonucleosídeos (dNTPs). Nesse trabalho foi considerado o plasmídeo pET-28b, também utilizado por EINSFELDT (2014) na expressão enzimática, e para adicionar a sua reação é necessário saber a estequiometria para cada um dos quatro dNTPs e, além disso, que 1,36mol de ATP é requerido por mol de dNTP por polimerização (CUNNINGHAM *et al.*, 2009). A construção dessa reação foi detalhada no Apêndice B. Assim, a reação obtida pode ser escrita como a seguir:

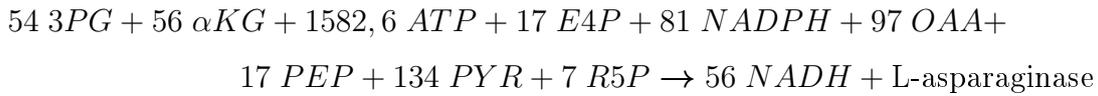


em que $dATP$ é composto trifosfato deoxiadenosina, $dCTP$, trifosfato deoxicitosina, $dGTP$, trifosfato deoxiguanosina, $dTTP$, trifosfato deoxitimidina e PPi , pirofosfato.

3.2.2 Reação para a formação da L-asparaginase

Para adicionar a reação para formação da enzima foi necessário saber a composição de aminoácidos e estabelecer que 4,324mol de ATP é requerido por mol de aminoácido por polimerização (CUNNINGHAM *et al.*, 2009). A construção dessa reação foi detalhada no Apêndice C e assim a reação obtida considerando os precur-

sores dos aminoácidos foi:



em que *3PG* é o composto 3-fosfoglicerato, αKG , α -cetogluturato, *E4P*, eritrose-4-fosfato, *NADPH*, difosfopiridina nucleotídeo fosfato reduzido, *OAA*, oxalacetato, *PEP*, fosfoenolpiruvato, *PYR*, piruvato, *R5P*, ribose-5-fosfato e *NADH*, difosfopiridina nucleotídeo reduzido.

3.3 Estratégia para a indução enzimática

A indução da expressão enzimática ocorre na presença do indutor, a lactose, como mostrado na Figura 3.1. Sem a presença do indutor há a repressão da expressão gênica (Figura 3.1a), porém na presença de lactose tem-se a produção das proteínas recombinantes (Figura 3.1b).

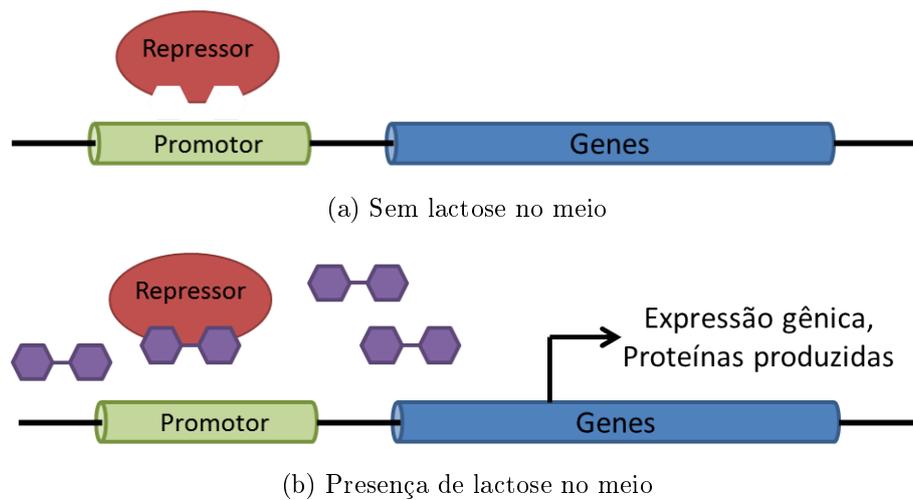


Figura 3.1: Indução da expressão enzimática com lactose.

Para considerar esse fenômeno foi proposta a formação do plasmídeo asterisco obtido na presença de lactose e apenas esse componente poderia formar a enzima recombinante posteriormente. Dessa forma, a seguinte reação foi incluída ao modelo:



Para acoplar a produção da enzima recombinante com a síntese do plasmídeo considera-se uma relação entre os fluxos dessas reações como é mostrado na próxima seção.

3.4 Análise do balanço de fluxos (FBA)

Tendo em vista que é de grande importância observar a consistência do modelo, algumas análises do balanço de fluxos metabólicos (FBA) foram realizadas tendo como objetivo a maximização da taxa específica de crescimento celular e do fluxo de plasmídeo.

Inicialmente, uma nova restrição é considerada onde o fluxo da L-asparaginase está relacionada linearmente com o fluxo do plasmídeo como a seguir:

$$v_{asp} = \alpha \cdot v_{plasmid^*}$$

em que α [mmol L-asparaginase/mmol de plasmídeo] representa o produto das atividades transcricional (número de transcritos por gene) e translacional (número de ribossomos por transcrição) (CUNNINGHAM *et al.*, 2009). Numa perspectiva quantitativa, o valor de α será considerado para a produção proteica totalmente ativa, ou seja, na presença de lactose.

Assim, a formulação do problema pode ser descrita da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \min_v \quad & Z \\ \text{sujeito a:} \quad & S \cdot v = 0 \\ & v_{asp} = \alpha \cdot v_{plasmid^*} \\ & a_i \leq v_i \leq b_i \end{aligned} \tag{3.1}$$

em que Z é a função objetivo, S é a matriz estequiométrica, v é o vetor dos fluxos das reações da rede metabólica, v_{asp} é o fluxo da reação de formação da L-asparaginase, $v_{plasmid^*}$ é o fluxo da reação de formação do plasmídeo asterisco descrito anteriormente, α é um parâmetro associado às atividades transcricional e translacional como dito acima e a_i e b_i são os limites inferior e superior, respectivamente, dos fluxos para cada reação i .

Tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo, foram feitas variações nos fluxos de oxigênio, condições aeróbia e anaeróbia, lactose, glicerol e no parâmetro alfa, no sentido de observar a resposta da rede metabólica a essas mudanças. As considerações para análise em questão estão expostas na Tabela 3.2.

Outra função objetivo utilizada foi considerando o princípio da máxima eficiência enzimática (FENG *et al.*, 2012; HOLZHÜTTER, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2014; SCHUETZ *et al.*, 2012), em que faz-se a minimização da soma do quadrado dos fluxos. Assim, para a formulação do problema 3.1, considera-se a seguinte função objetivo: $Z = \sum v_i^2$. Porém, para essa função objetivo foram adicionadas restrições para a taxa específica de crescimento celular e para o fluxo de plasmídeo, em que foram considerados valores constantes. Para essa função objetivo foi feita a análise

para condições aeróbias ($v_{O_2} = -10$) e anaeróbias ($v_{O_2} = 0$).

Tabela 3.2: Análise dos fluxos ao variar o parâmetro alfa e os fluxos de oxigênio, lactose e glicerol.

| | v_{O_2} | $v_{lactose}$ | $v_{glicerol}$ | α |
|---|-----------|---------------|----------------|----------|
| 1. Variação do limite inferior do fluxo de oxigênio | 0 -10 | -4 | -8 | 100 |
| 2. Variação do limite inferior do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa | 0 -10 | -4 | -8 | 0 500 |
| 3. Variação do limite inferior dos fluxos de oxigênio e lactose | 0 -10 | -1 -10 | -8 | 100 |
| 4. Variação do limite inferior dos fluxos de oxigênio e glicerol | 0 -10 | -4 | -8 -20 | 100 |

3.5 Resultados e Discussão

Para que o modelo metabólico seja considerado no modelo dinâmico para formação da enzima recombinante, deve-se garantir que este represente adequadamente o metabolismo celular. Assim, algumas análises para o modelo metabólico construído, descritas na seção anterior, são discutidas. Tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo, foram feitas análises dos fluxos considerando condições aeróbicas e anaeróbicas, além de variar o parâmetro alfa e os fluxos de oxigênio, lactose e glicerol. Para a função objetivo que considera o princípio da máxima eficiência enzimática analisou-se as condições em aerobiose e anaerobiose. Através da otimização foi obtida a distribuição dos fluxos de cerca de 2000 reações para cada condição, porém foram analisados apenas alguns fluxos de interesse. As subseções a seguir mostram cada uma dessas análises.

3.5.1 Condição aeróbia e anaeróbia

Maximização do fluxo do plasmídeo

Sabe-se que o metabolismo celular responde de forma distinta em condições na presença ou ausência de oxigênio. Dessa forma, ao maximizar o fluxo plasmidial e considerar essas duas condições, a distribuição de fluxos metabólicos foi gerada para 2251 reações e a Tabela 3.3, com reações da glicólise, do ciclo do ácido cítrico, da formação da asparaginase e do plasmídeo e seus respectivos fluxos, foi construída. Os mesmos dados da tabela foram mostrados nas Figuras 3.2 e 3.3 de forma a obter uma melhor visualização.

O oxigênio é aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, importante componente para que a alta geração de energia ocorra nessa etapa. Como para a formação do plasmídeo é necessária grande quantidade de energia (ATP), ao maximizar o fluxo

de plasmídeo o metabolismo se comporta no sentido de formar os componentes que o geram, ATP e nucleotídeos.

Como pode-se observar na Tabela 3.3, o fluxo de plasmídeo é maior na condição aeróbia do que na anaeróbia. Na ausência de oxigênio, o rendimento energético é baixo quando comparado à respiração aeróbia. Assim, como para a formação do plasmídeo é necessária uma quantidade alta de energia (ATP), o fluxo de formação desse componente deverá ser menor em condições anaeróbicas como mostrado na análise.

Nesse sentido, fluxos maiores para as reações da glicólise são obtidos quando em anaerobiose devido também à formação de energia nessa fase, além da reação do ciclo do ácido cítrico com alto fluxo para formação do succinato e ATP. As reações do ciclo de Krebs não ficam tão ativas como na aerobiose, pois os produtos dessa fase não são utilizados na fosforilação oxidativa.

Vale ressaltar que os fluxos máximos para a formação do plasmídeo obtidos nas duas condições, aeróbia e anaeróbia, são maiores que o máximo obtido experimentalmente (WILLIAMS *et al.*, 2009), sendo cinco e quinze vezes maior, respectivamente. Portanto, os fluxos obtidos nessa análise não são condizentes com a realidade, mas mostram na verdade o sentido em que o metabolismo responde na condição apresentada.

Tabela 3.3: Fluxos de algumas reações metabólicas para a maximização do fluxo do plasmídeo em condições aeróbias e anaeróbias.

| Reação metabólica | Fluxo anaeróbio (mmol/gDW h) | Fluxo aeróbio (mmol/gDW h) |
|---|---------------------------------|-------------------------------|
| $ATP + Glyc \rightarrow ADP + Glyc3p + H$ | 8,0 | 8,0 |
| $Glyc3p + NADP \rightleftharpoons Dhap + H + NADPH$ | 8,0 | 8,0 |
| $Dhap \rightleftharpoons G3p$ | 15,1 | 13,5 |
| $G3p + NAD + Pi \rightleftharpoons 13dpg + H + NADH$ | 21,9 | 17,9 |
| $3pg + ATP \rightleftharpoons 13dpg + ADP$ | - 21,9 | -17,9 |
| $2pg \rightleftharpoons 3pg$ | -20,7 | -14,4 |
| $2pg \rightleftharpoons H_2O + PEP$ | 20,7 | 14,4 |
| $ADP + H + PEP \rightarrow ATP + PYR$ | 20,5 | 8,3 |
| $CO_2 + H_2O + PEP \rightarrow H + OAA + Pi$ | 0,20 | 0,45 |
| $lac-D + NAD \rightleftharpoons H + NADH + PYR$ | 0 | 0 |
| $CoA + PYR \rightarrow AcCoA + CO_2 + NADH$ | 0 | 0 |
| $CoA + PYR \rightarrow AcCoA[c] + FOR$ | 25,9 | 14,4 |
| $AcCoA + Pi \rightleftharpoons Actp + CoA$ | 7,6 | 9,3 |
| $Ac + ATP \rightleftharpoons Actp + ADP$ | -7,6 | -9,3 |
| $AcCoA + H_2O + OAA \rightarrow CIT + CoA + H$ | 0,04 | 0,11 |
| $ICIT + NADP \rightleftharpoons \alpha KG + CO_2 + NADPH$ | 0,04 | 0,11 |
| $\alpha KG + CoA + NAD \rightarrow CO_2 + NADH + SucCoA$ | 0 | 0 |
| $ATP + CoA + Succ \rightleftharpoons ADP + Pi + SucCoA$ | -1000 | 0 |
| $Q8 + Succ \rightarrow FUM + Q8h2$ | 0 | 0 |
| $FUM + H_2O \rightleftharpoons Mal-L$ | 2,4 | 6,9 |
| $Mal-L + NAD \rightleftharpoons H + NADH + OAA$ | 2,4 | 6,9 |
| $1575 dATP + 1678 dCTP + 1712 dGTP$ $+1554 dTTP + 8866 ATP \rightarrow 1/2 Plasmid + 6519 P Pi$ | $1,28 \cdot 10^{-5}$ | $3,7 \cdot 10^{-5}$ |
| $54 3PG + 56 \alpha KG + 1582,6 ATP + 17 E4P$ $+81 NADPH + 97 OAA + 17 PEP + 134 PYR$ $+7 R5P \rightarrow 56 NADH + L - asparaginase$ | $6,4 \cdot 10^{-4}$ | $2,0 \cdot 10^{-3}$ |

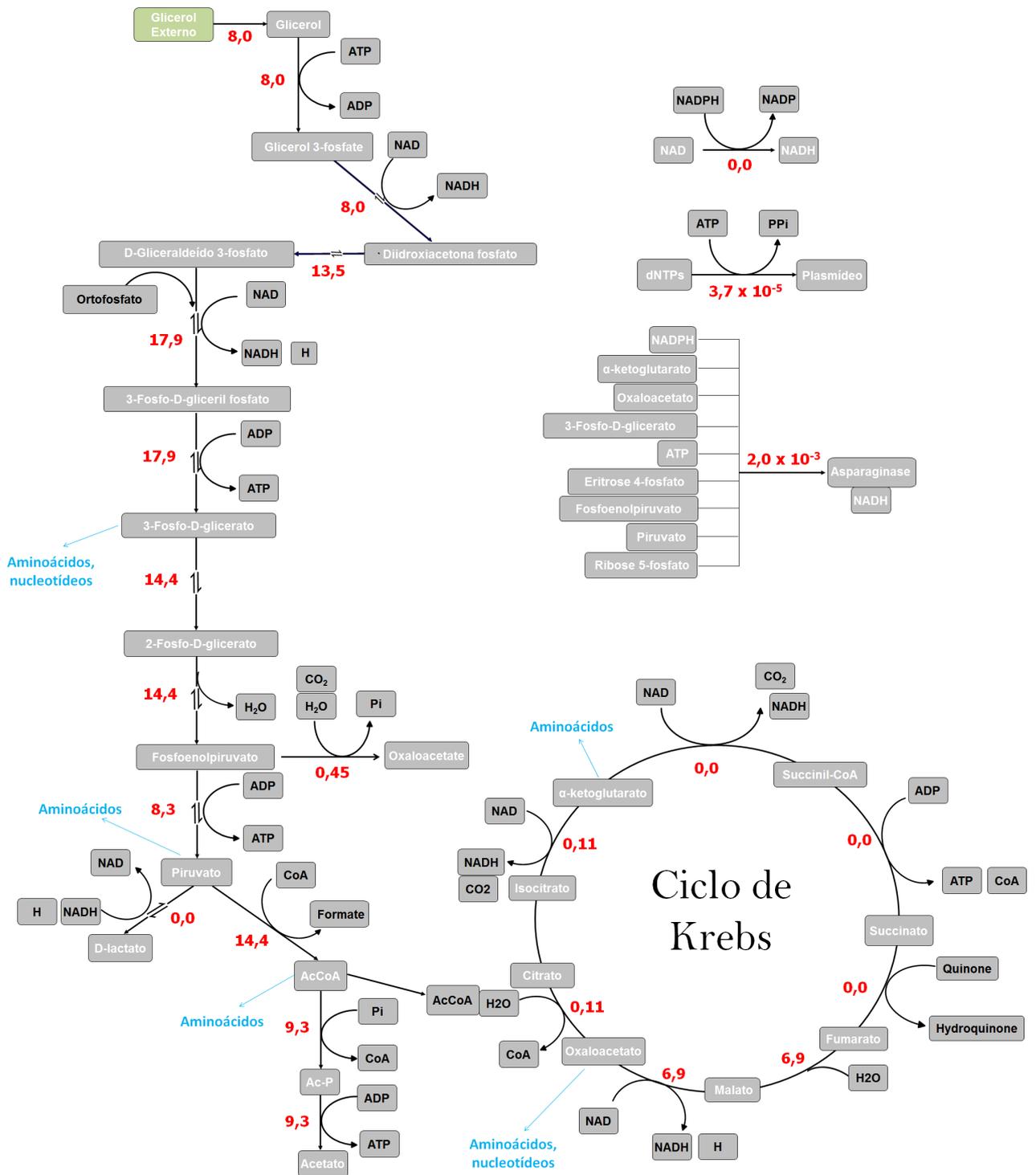


Figura 3.2: Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao maximizar o fluxo de plasmídeo numa condição aeróbia.

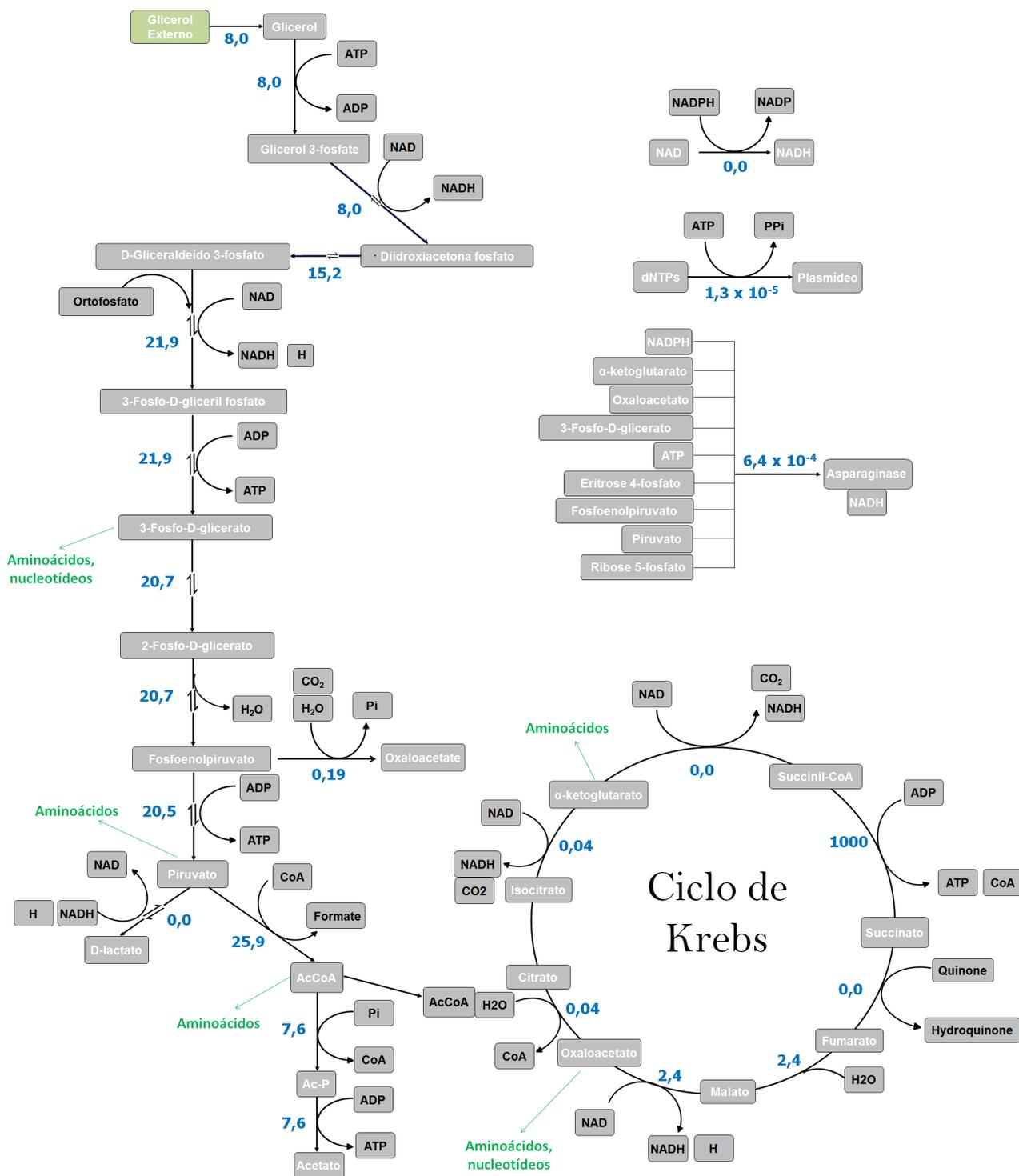


Figura 3.3: Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao maximizar o fluxo de plasmídeo numa condição anaeróbia.

Princípio da Máxima Eficiência Enzimática

Esse princípio considera que devido à seleção natural durante a evolução, as células conseguiram realizar funções vitais com o mínimo de esforço (HOLZHÜTTER, 2004) e assim postular esse princípio da minimização dos fluxos metabólicos. Dessa forma, ao considerar essa função objetivo, a distribuição de fluxos estacionária obtida estará mostrando o estado metabólico de uma forma global, não mais maximizando um determinado fluxo.

Para essa análise foi considerado constante o valor do fluxo de plasmídeo em $1,0 \cdot 10^{-6}$ mmol/gDW h, valor consistente com o observado experimentalmente por WILLIAMS *et al.* (2009). Para a taxa específica de crescimento celular considerou-se 80% do valor máximo calculado para as mesmas condições, ou seja, $0,6 \text{ h}^{-1}$. Ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos, a distribuição dos fluxos foi gerada e algumas reações com seus respectivos fluxos foram mostradas na Tabela 3.4. Os mesmos dados da tabela foram mostrados nas Figuras 3.4 e 3.5 de forma a ter um melhor entendimento.

Pode-se observar que os fluxos referentes à glicólise para a condição anaeróbia são maiores quando comparado com aqueles para a condição aeróbia, considerando o mesmo fluxo de formação de plasmídeo. Isso se deve à formação mais rápida de ATP na etapa da glicólise sendo que em anaerobiose não terá a alta quantidade de ATP gerada na cadeia respiratória. Além disso, deve-se considerar a necessidade de energia para um fluxo constante de plasmídeo proposta nessa análise.

Já no caso das reações do ciclo de Krebs a situação se inverte, fluxos menores são observados na anaerobiose em relação à condição aeróbia. Isso ocorre pois, na presença de oxigênio, as reações desse ciclo geram principalmente NADH e succinato que são utilizados na cadeia respiratória para geração de ATP. Já na condição anaeróbia fluxos menores são obtidos para as reações do ciclo do ácido cítrico quando comparado à aerobiose, pois nessa condição não ocorrerá a fosforilação oxidativa.

Tabela 3.4: Fluxos de algumas reações metabólicas ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos em condições aeróbias e anaeróbias.

| Reação metabólica | Fluxo anaeróbio (mmol/gDW h) | Fluxo aeróbio (mmol/gDW h) |
|---|---------------------------------|-------------------------------|
| $ATP + Glyc \rightarrow ADP + Glyc3p + H$ | 5,2 | 0,63 |
| $Glyc3p + NADP \rightleftharpoons Dhap + H + NADPH$ | 5,1 | 0,5 |
| $Dhap \rightleftharpoons G3p$ | 17,7 | 6,9 |
| $G3p + NAD + Pi \rightleftharpoons 13dpg + H + NADH$ | 21,4 | 14,0 |
| $3pg + ATP \rightleftharpoons 13dpg + ADP$ | - 21,5 | -14,0 |
| $2pg \rightleftharpoons 3pg$ | -21,1 | -13,0 |
| $2pg \rightleftharpoons H_2O + PEP$ | 21,1 | 12,9 |
| $ADP + H + PEP \rightarrow ATP + PYR$ | 11,0 | 6,3 |
| $CO_2 + H_2O + PEP \rightarrow H + OAA + Pi$ | 0,74 | 1,9 |
| $lac-D + NAD \rightleftharpoons H + NADH + PYR$ | -3,2 | $8,9 \cdot 10^{-12}$ |
| $NAD + CoA + PYR \rightarrow AcCoA + CO_2 + NADH$ | 1,1 | 4,6 |
| $CoA + PYR \rightarrow AcCoA[c] + FOR$ | 12,8 | 4,1 |
| $AcCoA + Pi \rightleftharpoons Actp + CoA$ | 2,8 | 5,1 |
| $Ac + ATP \rightleftharpoons Actp + ADP$ | -2,8 | -5,1 |
| $AcCoA + H_2O + OAA \rightarrow CIT + CoA + H$ | 0,24 | 1,2 |
| $ICIT + NADP \rightleftharpoons \alpha KG + CO_2 + NADPH$ | 0,24 | 1,2 |
| $\alpha KG + CoA + NAD \rightarrow CO_2 + NADH + SucCoA$ | $6,3 \cdot 10^{-13}$ | 0,53 |
| $ATP + CoA + Succ \rightleftharpoons ADP + Pi + SucCoA$ | 0,08 | 0,20 |
| $Q8 + Succ \rightarrow FUM + Q8h2$ | $3,7 \cdot 10^{-16}$ | 6,0 |
| $FUM + H_2O \rightleftharpoons Mal-L$ | 0,17 | 1,2 |
| $Mal-L + NAD \rightleftharpoons H + NADH + OAA$ | 0,17 | 1,2 |
| $1575 dATP + 1678 dCTP + 1712 dGTP$ $+1554 dTTP + 8866 ATP \rightarrow 1/2 Plasmid + 6519 PPi$ | $1,0 \cdot 10^{-6}$ | $1,0 \cdot 10^{-6}$ |
| $54 3PG + 56 \alpha KG + 1582,6 ATP + 17 E4P$ $+81 NADPH + 97 OAA + 17 PEP + 134 PYR$ $+7 R5P \rightarrow 56 NADH + L - asparaginase$ | $1,0 \cdot 10^{-8}$ | $1,0 \cdot 10^{-8}$ |

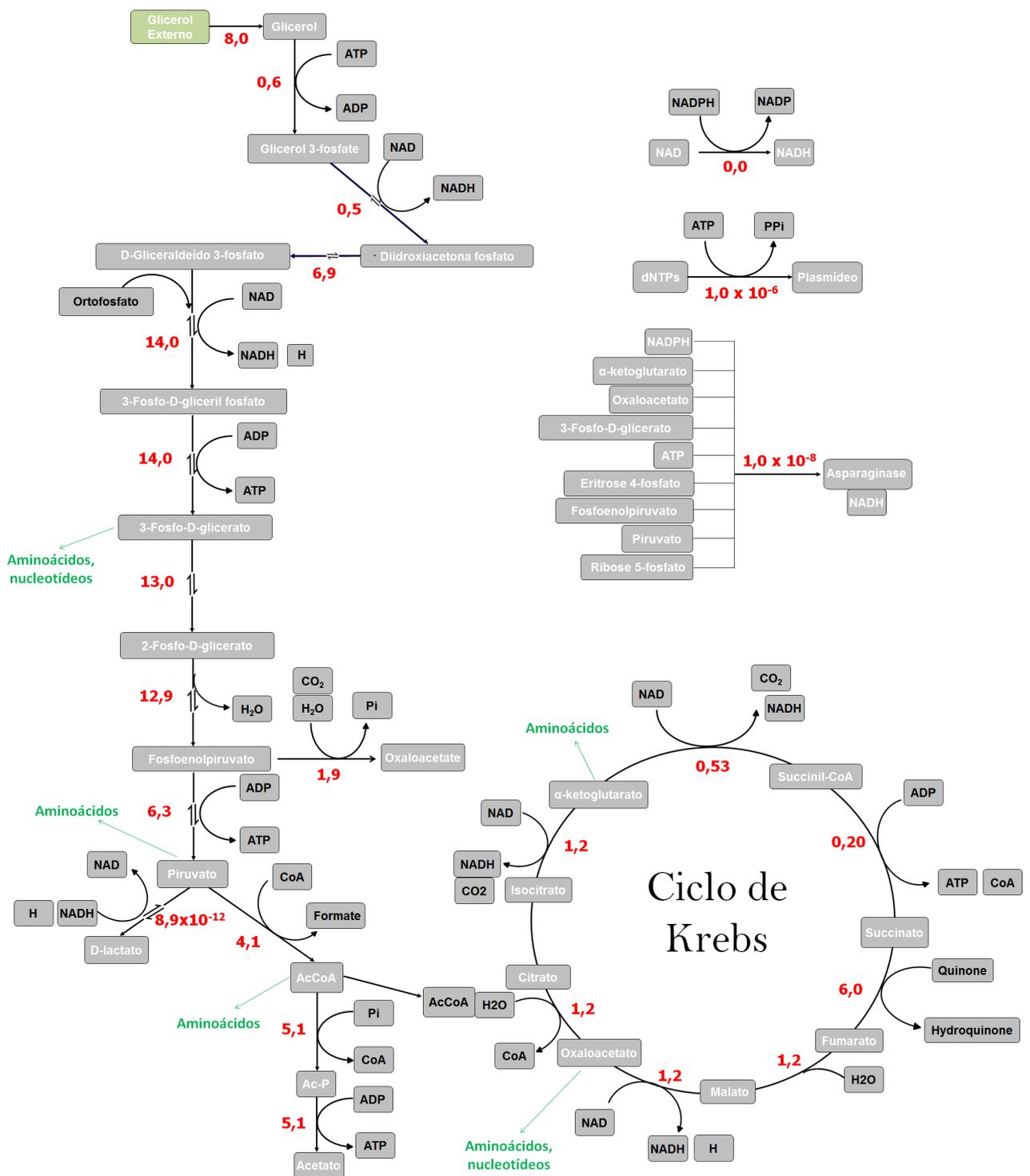


Figura 3.4: Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos numa condição aeróbia.

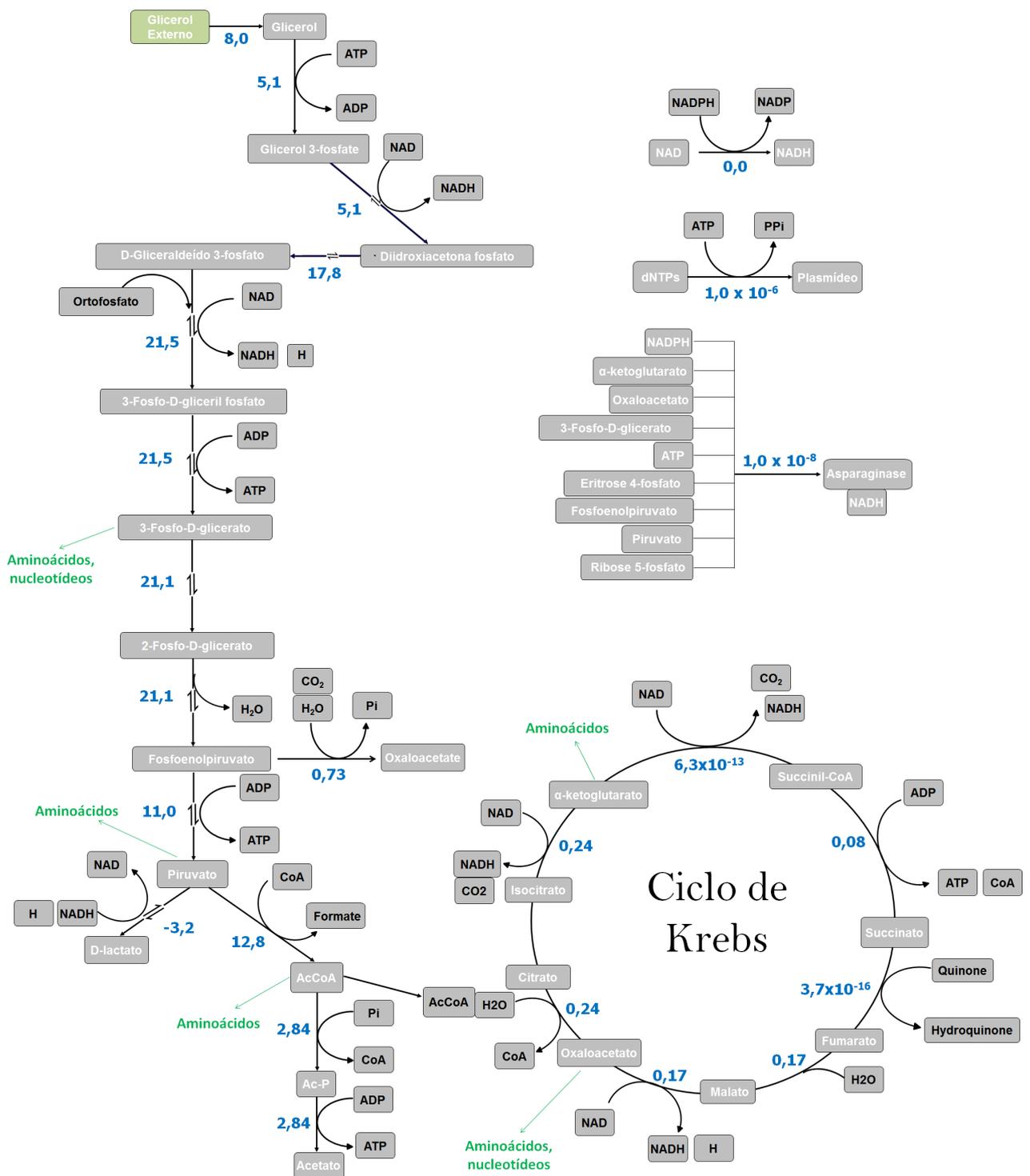


Figura 3.5: Fluxos [mmol/gDW h] das reações metabólicas ao minimizar a soma do quadrado dos fluxos numa condição anaeróbia.

3.5.2 Variação dos fluxos de oxigênio e lactose

Maximização do fluxo de plasmídeo

Tendo em vista a importância do oxigênio para o processo, como mostrado anteriormente, e da lactose por ser um indutor para a expressão da L-asparaginase, a variação dos fluxos desses componentes foi analisada para fluxos de algumas reações de interesse ao maximizar o fluxo de plasmídeo.

Como pode-se observar na Figura 3.6, para maiores fluxos de consumo de lactose e oxigênio, os fluxos de plasmídeo e asparaginase são os máximos para a faixa estudada. Como para a formação da asparaginase e do plasmídeo grande quantidade energia é requerida, explica-se um maior fluxo desses componentes para maiores fluxos de oxigênio. No caso da lactose, além de ser um indutor da expressão enzimática, também pode ser uma fonte de carbono para a célula, não desconsiderado nesse caso.

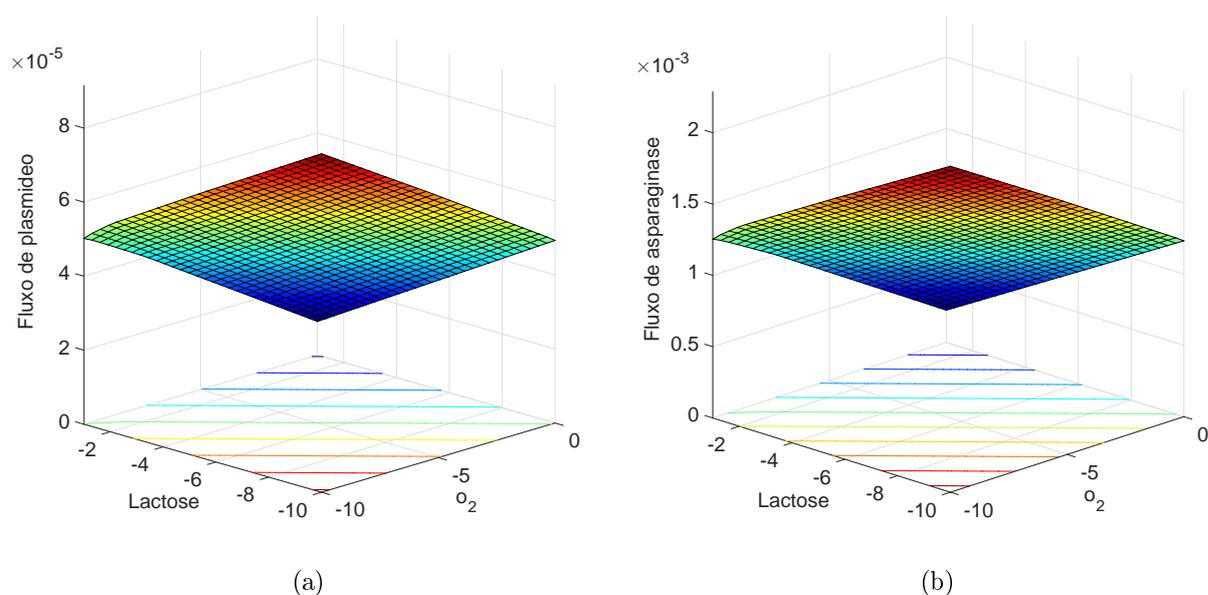


Figura 3.6: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de plasmídeo (a) e L-asparaginase (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

Tendo em vista que os precursores dos aminoácidos utilizados para a formação da L-asparaginase impactam diretamente o metabolismo central, como, por exemplo, o oxalacetato, fosfoenolpiruvato e o α -cetoglutarato, e que é necessária a geração de ATP para formar a enzima e o plasmídeo, as seguintes reações da Tabela 3.5 foram analisadas:

Tabela 3.5: Reações analisadas ao variar os fluxos de oxigênio e lactose tendo como objetivo maximizar o fluxo de plasmídeo.

| Sigla | Reação |
|--------|---|
| ACKr | $Ac + ATP \rightleftharpoons Actp + ADP$ |
| LDH_D | $lac - D + NAD \rightleftharpoons H + NADH + PYR$ |
| MDH | $Mal - L + NAD \rightleftharpoons H + NADH + OAA$ |
| PPC | $CO_2 + H_2O + PEP \rightarrow H + OAA + Pi$ |
| CS | $AcCoA + H_2O + OAA \rightarrow CIT + CoA + H$ |
| ICDHyr | $ICIT + NADP \rightleftharpoons \alpha KG + CO_2 + NADPH$ |

Para as reações referente à formação de acetato e lactato (ACKr e LDH_D) em que os gráficos estão na Figura 3.7, à medida que os fluxos de oxigênio e lactose aumentam o fluxo de formação de acetato também aumenta, tendo a mesma situação para o plasmídeo e asparaginase. Isso mostra que a formação de ATP por essa reação tem grande importância para formar esses componentes, já que necessitam de energia para sua geração.

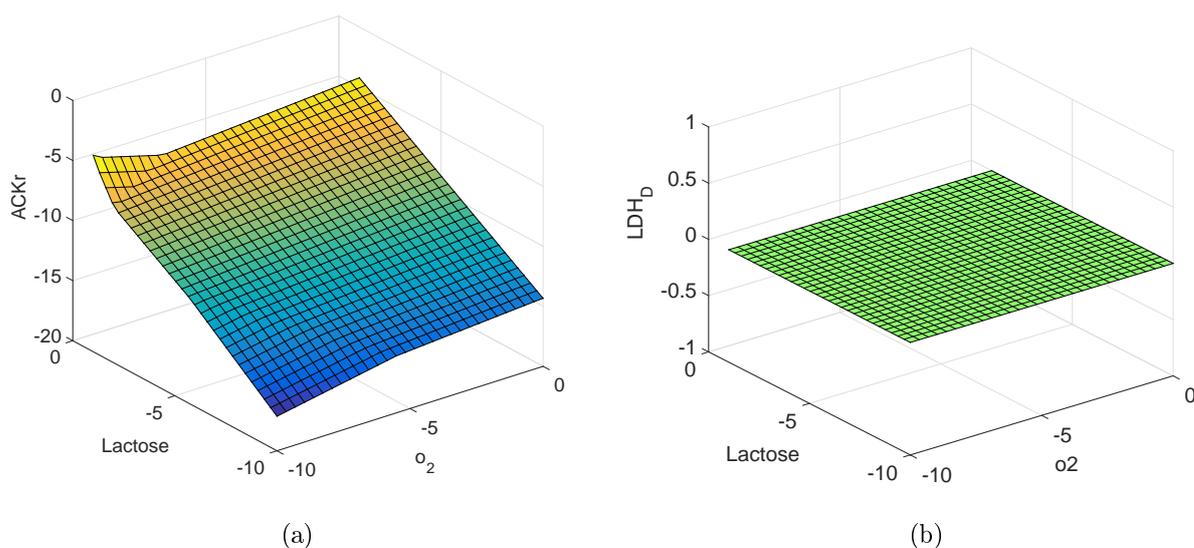


Figura 3.7: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de acetato (a) e lactato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

Além disso, a necessidade de formar o acetato e conseqüentemente ATP ocorre devido à provável quantidade insuficiente de energia gerada através da cadeia respiratória utilizando o oxigênio como acceptor final de elétrons para que haja a formação do plasmídeo e da enzima.

No caso do fluxo de formação de lactato não houve alterações, permanecendo nulo para toda a faixa estudada. Essa reação utiliza o piruvato como reagente para formar NAD e lactato, porém como há alta demanda de energia ao invés de formar

lactato, forma-se Acetil-Coa, importante componente do ciclo do ácido cítrico e para formação do acetato e ATP, rotas mais visadas nessa situação.

No caso das reações para formação do oxalacetato (MDH e PPC) que utilizam como reagente o malato e o fosfoenolpiruvato, respectivamente, os gráficos obtidos ao variar os fluxos de oxigênio e lactose estão na Figura 3.8. O oxalacetato é um importante componente pois participa da formação tanto de aminoácidos quanto de nucleotídeos que são usados para compor a enzima e o plasmídeo.

O que se observa é que para fluxos altos de oxigênio e lactose, obtém-se maiores fluxos para as duas reações da análise e para essa mesma situação os fluxos de plasmídeo e asparaginase também são maiores na faixa de estudo. Dessa forma, pode-se correlacionar a geração da asparaginase e do plasmídeo com a formação do oxalacetato.

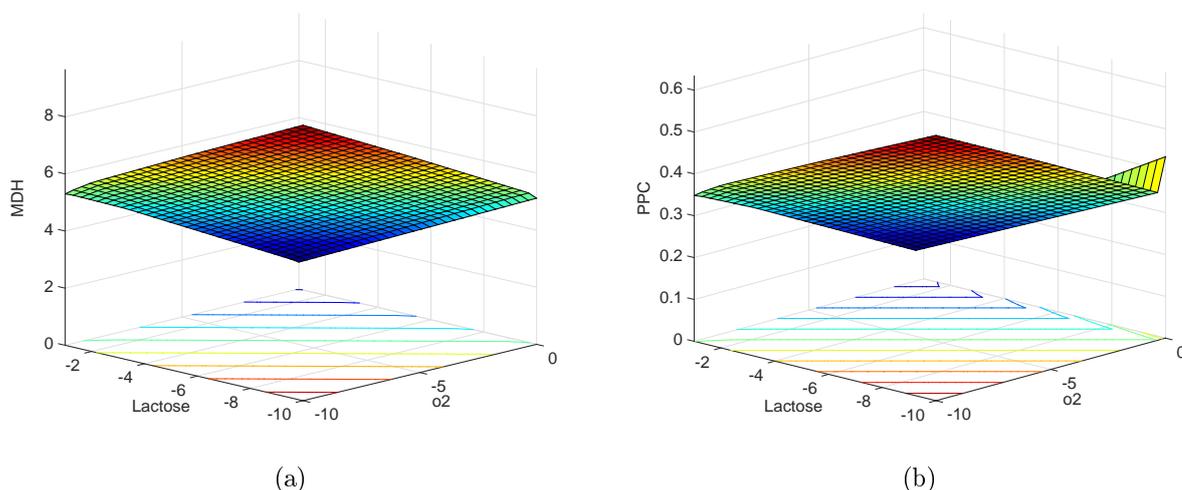


Figura 3.8: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de oxalacetato a partir de malato (a) e fosfoenolpiruvato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

As reações para formação de citrato e α -cetogluturato (CS e ICDHyr, respectivamente) fazem parte do ciclo do ácido cítrico e de forma sequencial, estando assim completamente correlacionadas. Isso pode ser observado nos gráficos da Figura 3.9, em que apresentam valores de fluxos e tendências idênticas.

Além disso, pode-se observar que para maiores fluxos de lactose e oxigênio, fluxos maiores também são observados para formação de citrato e α -cetogluturato, tendo a mesma situação tanto para a formação do plasmídeo e da asparaginase. Como o α -cetogluturato é um dos precursores para a formação de aminoácido, ao maximizar o fluxo de plasmídeo e conseqüentemente o fluxo de asparaginase, além de energia são necessários os componentes para formação dos aminoácidos.

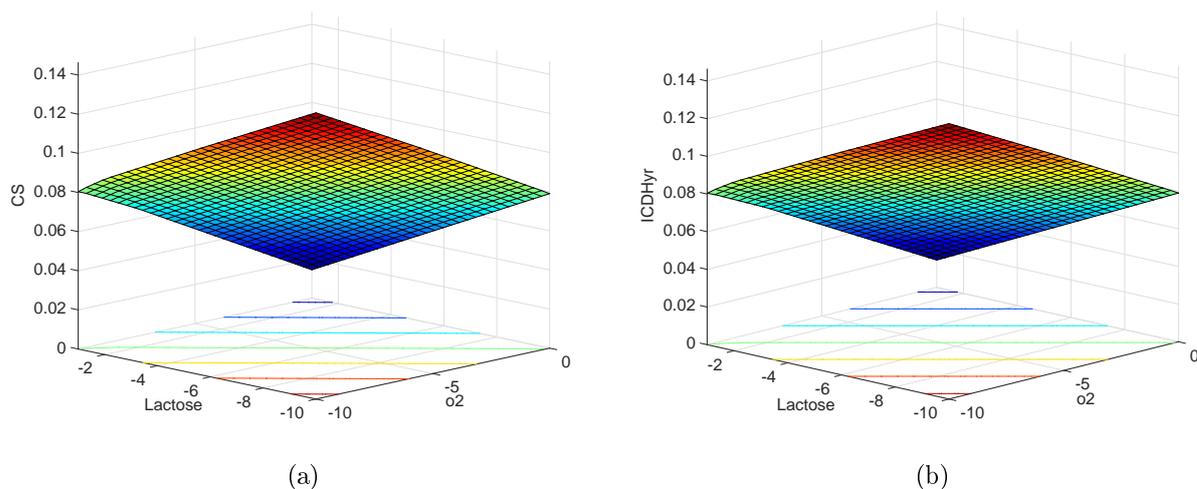


Figura 3.9: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de citrato (a) e α -cetoglutarato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e lactose, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

3.5.3 Variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa

Maximização do fluxo de plasmídeo

Devido à relação do oxigênio com a geração do plasmídeo e da enzima e como o parâmetro alfa correlaciona o fluxo desses dois componentes, como mostrado anteriormente, a análise dos fluxos para algumas reações foi feita variando tanto o valor do parâmetro alfa como o fluxo de oxigênio tendo como objetivo a maximização do plasmídeo.

A Figura 3.10 mostra os gráficos para os fluxos de asparaginase e plasmídeo. À medida que o valor de alfa aumenta, o fluxo de plasmídeo diminui significativamente e o contrário acontece para o fluxo de asparaginase. Isso ocorre pois os dois componentes precisam de grande quantidade de energia para serem formados e assim quanto maior a formação de um menor a do outro como se observa nos gráficos.

Além disso, para valores mais baixos do parâmetro alfa a resposta para os fluxos tanto de plasmídeo quanto de asparaginase é mais acentuada, enquanto para valores altos deste parâmetro não há alterações significativas. Isso se deve ao fato de que mesmo com o aumento do valor de alfa, a enzima que catalisa a formação da L-asparaginase chega à saturação.

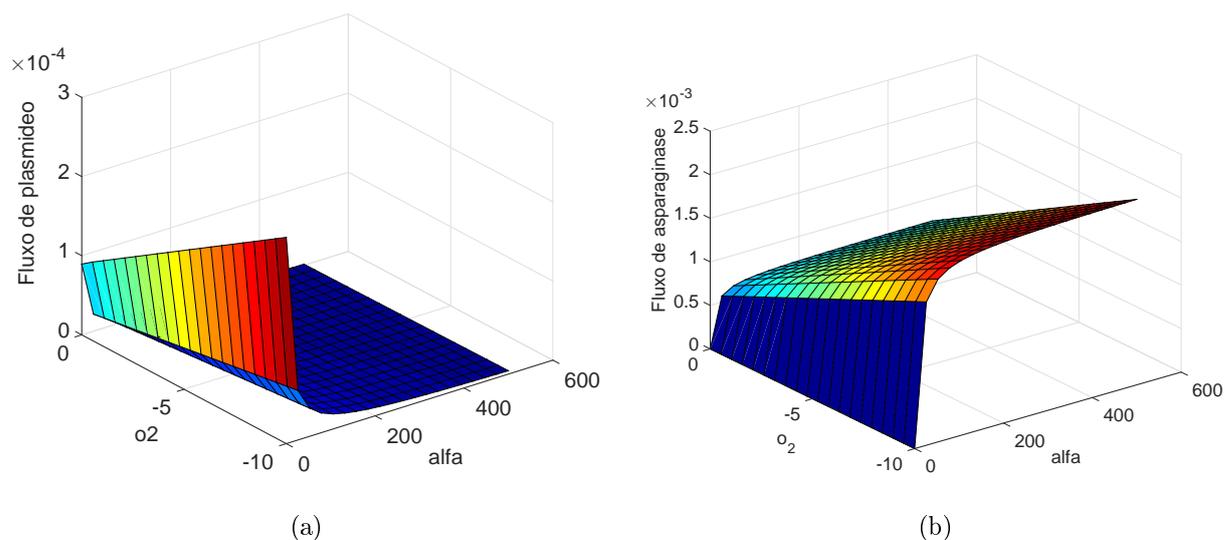


Figura 3.10: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de plasmídeo (a) e L-asparaginase (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

Como os precursores dos aminoácidos utilizados na reação de formação da L-asparaginase impactam diretamente o metabolismo central, por exemplo, o oxalacetato, fosfoenolpiruvato e o α -cetoglutarato, e sabendo que a geração de ATP é essencial para formar a enzima e o plasmídeo, os fluxos das reações da Tabela 3.6 a seguir foram analisadas:

Tabela 3.6: Reações analisadas ao variar o fluxo de oxigênio e o parâmetro alfa tendo como objetivo maximizar o fluxo de plasmídeo.

| Sigla | Reação |
|--------|---|
| ACKr | $Ac + ATP \rightleftharpoons Actp + ADP$ |
| LDH_D | $lac - D + NAD \rightleftharpoons H + NADH + PYR$ |
| MDH | $Mal - L + NAD \rightleftharpoons H + NADH + OAA$ |
| PPC | $CO_2 + H_2O + PEP \rightarrow H + OAA + Pi$ |
| CS | $AcCoA + H_2O + OAA \rightarrow CIT + CoA + H$ |
| ICDHyr | $ICIT + NADP \rightleftharpoons \alpha KG + CO_2 + NADPH$ |

Nos gráficos da Figura 3.11 são mostrados os fluxos das reações para formar acetato e lactato (ACKr e LDH_D, respectivamente). Pode-se notar que o parâmetro alfa só influencia a formação de acetato para valores baixos enquanto o fluxo de oxigênio tem maior influência, mostrando assim que quanto maior o fluxo de oxigênio maior a taxa de formação de acetato. Isso porque para essa mesma condição há alta formação do plasmídeo e asparaginase, componentes que necessitam de bastante energia (ATP) para serem gerados, e então a reação ACKr ocorre no sentido de formar ATP. Isso porque a quantidade de energia gerada através da cadeia respiratória

provavelmente não é suficiente para a formação do plasmídeo e da L-asparaginase, tendo assim a necessidade de formar o acetato.

No caso do fluxo de formação de lactato também não houve alterações, assim como na análise anterior, permanecendo nulo para toda a faixa estudada. Essa reação utiliza o piruvato como reagente para formar NAD e lactato, porém como há alta demanda de energia, ao invés de formar lactato, forma-se Acetil Coa, importante componente para formação de aminoácidos, acetato e ATP.

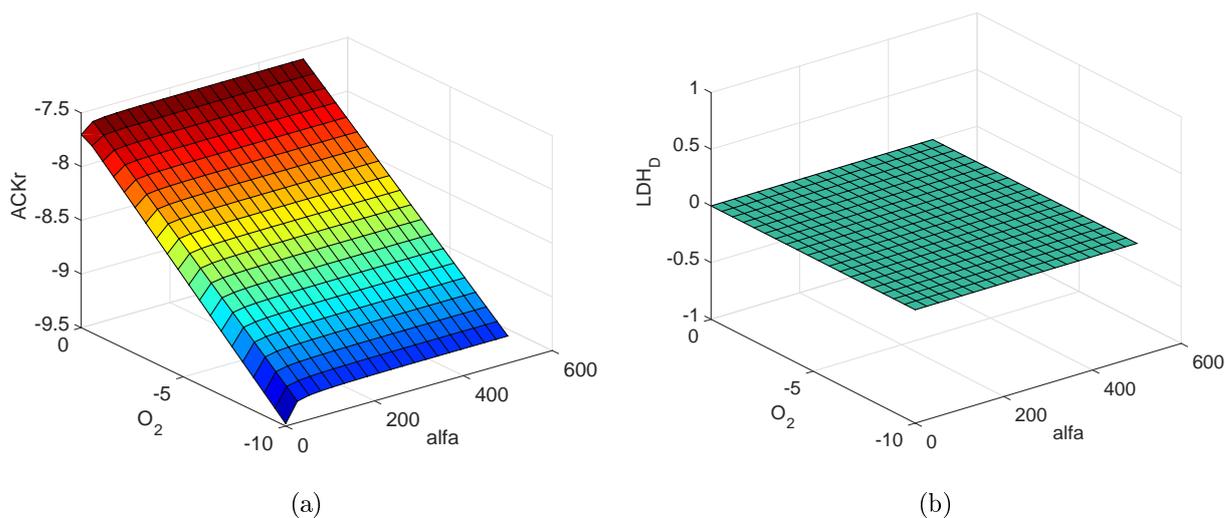


Figura 3.11: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de acetato (a) e lactato (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

Nas reações para formação de oxalacetato a partir de malato e fosfoenolpiruvato (MDH e PPC) cujos fluxos são mostrados nos gráficos da Figura 3.12, a tendência do gráfico 3.12a é semelhante ao do gráfico da asparaginase (Figura 3.10b) enquanto a do gráfico 3.12b se assemelha ao do plasmídeo (Figura 3.10a). Como o oxalacetato é precursor para a formação de aminoácidos e nucleotídeos, de grande importância para formar a enzima como o plasmídeo, pode-se notar que a reação MDH está relacionada com a asparaginase e a reação PPC tem maior relação com o plasmídeo.

Pode-se observar nos gráficos da Figura 3.13 os fluxos para a formação de citrato e α -cetoglutarato (CS e ICDHyr) em que apresentam tendências idênticas ao gráfico obtido para a asparaginase (Figura 3.10b). Já que essas reações são sequenciais e que o componente α -cetoglutarato é um dos precursores para formação dos aminoácidos, nota-se que há relação entre a geração da enzima e dos componentes das reações apresentadas.

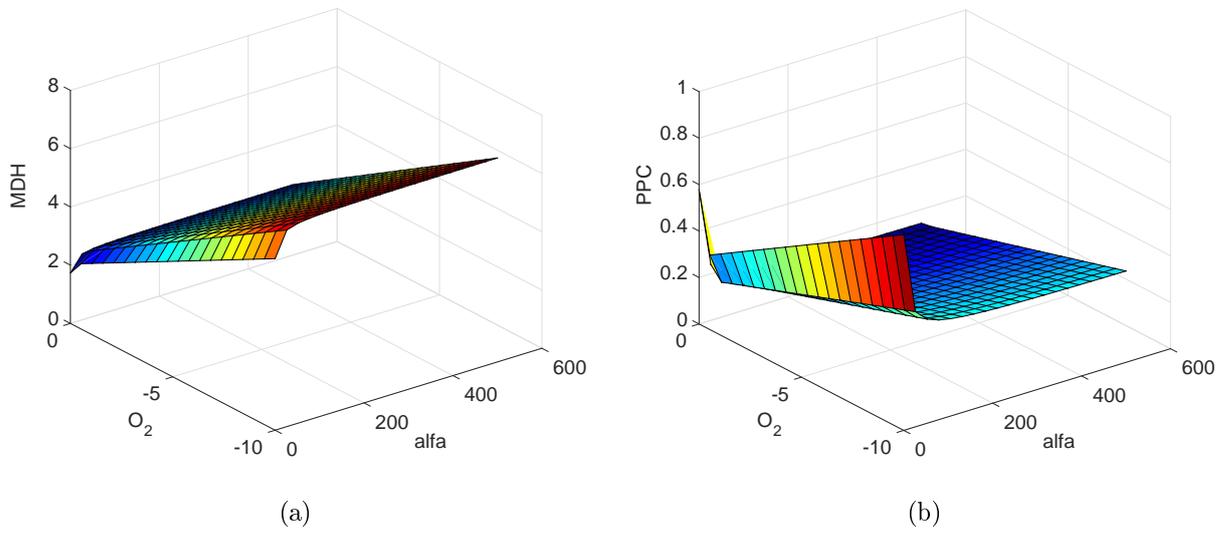


Figura 3.12: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de oxalacetato a partir de malato (a) e fosfoenolpiruvato (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

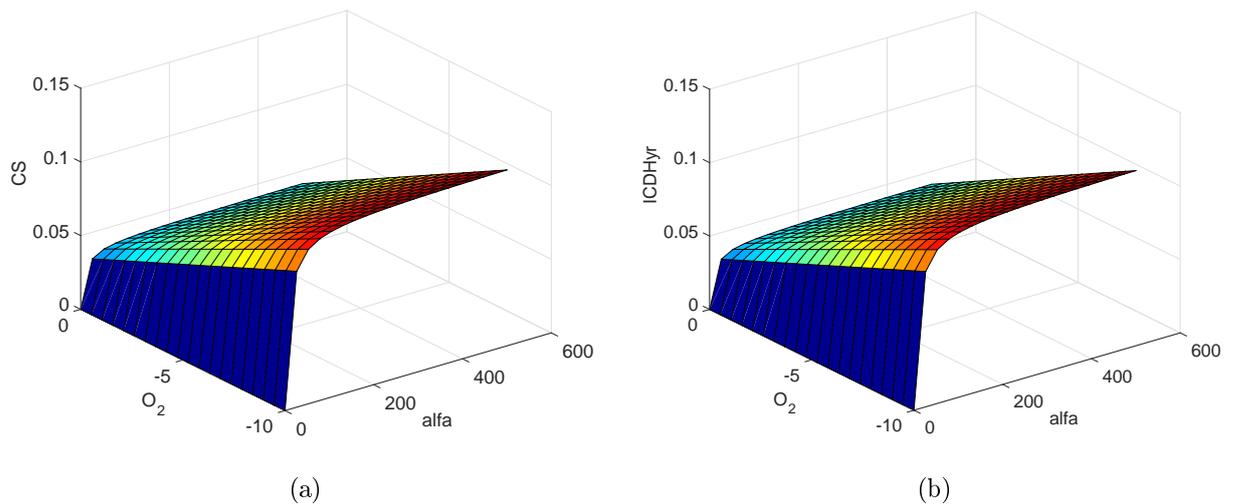


Figura 3.13: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de citrato (a) e α -cetogluturato (b) para a variação do fluxo de oxigênio e do parâmetro alfa, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

3.5.4 Variação dos fluxos de oxigênio e glicerol

Maximização do fluxo de plasmídeo

Além da importância do oxigênio para o processo de formação do plasmídeo e da asparaginase, tem-se o glicerol como fonte de carbono. Assim, foram feitas variações dos fluxos de oxigênio e glicerol ao maximizar o fluxo de plasmídeo para analisar algumas reações do metabolismo.

Como pode ser observado nos gráficos da Figura 3.14, para altos fluxos de oxigênio e glicerol, maiores fluxos de plasmídeo e asparaginase são obtidos. Tendo em vista que o glicerol é a principal fonte de carbono, importante para a ativação das vias metabólicas para gerar energia na célula e o oxigênio, acceptor de elétrons da cadeia respiratória, com grande papel para formar a maior parte de ATP através dessa via, esses componentes são fundamentais para obter o plasmídeo e a enzima.

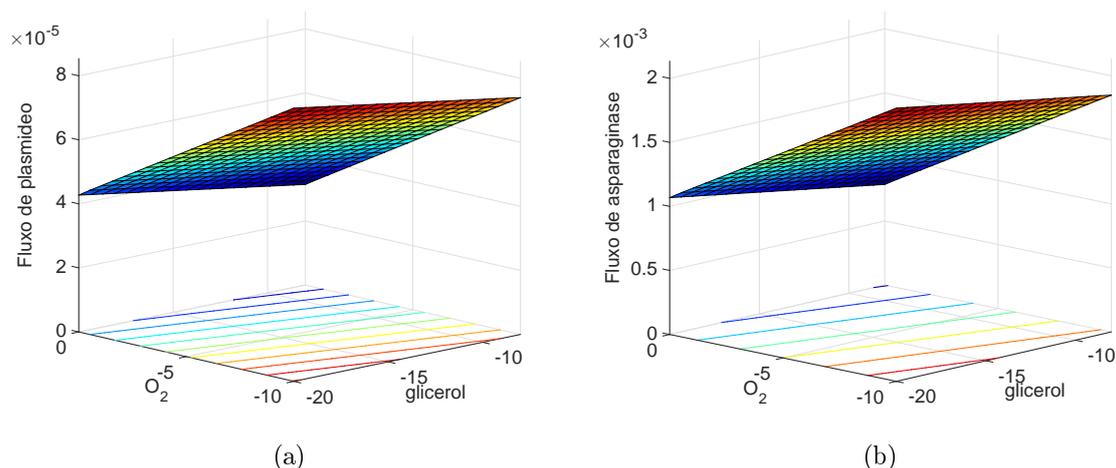


Figura 3.14: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de plasmídeo (a) e L-asparaginase (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

Os precursores dos aminoácidos que são utilizados na reação para a formação da L-asparaginase impactam diretamente o metabolismo central, como, por exemplo, o oxalacetato, fosfoenolpiruvato e o α -cetogluturato. Devido a esse fato e que a geração de ATP é fundamental para formar a enzima e o plasmídeo, os fluxos das reações da Tabela 3.7 a seguir foram analisadas:

Tabela 3.7: Reações analisadas ao variar os fluxos de oxigênio e glicerol tendo como objetivo maximizar o fluxo de plasmídeo.

| Sigla | Reação |
|--------|---|
| ACKr | $Ac + ATP \rightleftharpoons Actp + ADP$ |
| LDH_D | $lac - D + NAD \rightleftharpoons H + NADH + PYR$ |
| MDH | $Mal - L + NAD \rightleftharpoons H + NADH + OAA$ |
| PPC | $CO_2 + H_2O + PEP \rightarrow H + OAA + Pi$ |
| ICDHyr | $ICIT + NADP \rightleftharpoons \alpha KG + CO_2 + NADPH$ |
| G3PD2 | $GLYC3P + NADP \rightleftharpoons DHAP + H + NADPH$ |

No caso das reações para a formação de acetato e lactato (ACKr e LDH_D), em que os gráficos dos fluxos estão na Figura 3.15, para maiores fluxos de glicerol e oxigênio tem-se uma maior taxa de formação de acetato, sendo que para a mesma situação os fluxos de plasmídeo e asparaginase também estão altos como mostrado anteriormente. Isso mais uma vez mostra a relação dessa reação de formação de acetato e ATP como a geração do plasmídeo e enzima, já que é necessário grande quantidade de energia para que esses componentes sejam formados. Além disso, mostra também que essa necessidade de gerar ATP através dessa reação está relacionada a provável insuficiente geração de energia a partir da cadeia respiratória para a quantidade de plasmídeo e L-asparaginase gerados.

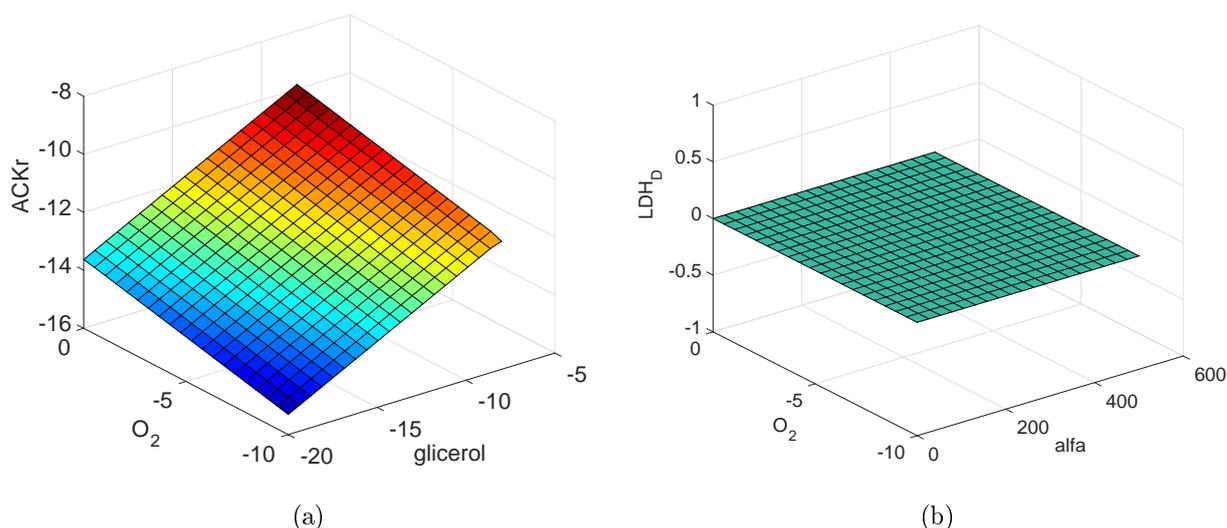


Figura 3.15: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] de acetato (a) e lactato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

Já para o fluxo de formação de lactato não houve alterações (Figura 3.15b), assim como nas análises anteriores, permanecendo nulo para toda a faixa estudada. Como dito anteriormente, essa reação utiliza o piruvato como reagente para formar NAD e lactato, porém como há alta demanda de energia, ao invés de formar lactato,

forma-se Acetil Coa, importante componente para formação de aminoácidos, acetato e ATP.

No sentido de mostrar a influência do glicerol na glicólise, analisou-se a reação de formação de Diidroxiacetona fosfato (DHAP) (Figura 3.16a). Observa-se que o oxigênio não está influenciando essa reação e que à medida que o fluxo de formação de glicerol diminui o fluxo da reação G3PD2 também diminui, estando assim totalmente vinculadas. Isso se dá pois o glicerol-3-fosfato, reagente da reação, depende do glicerol para ser formado.

Para reação de formação do α -cetogluturato, em que o gráfico dos fluxos está mostrado na Figura 3.16b, tem-se maior fluxo quando os fluxos de oxigênio e glicerol são altos, e isso ocorre também com os fluxos de plasmídeo e enzima. Como o α -cetogluturato é um dos precursores dos aminoácidos, ao maximizar o fluxo de plasmídeo e conseqüentemente o fluxo de asparaginase, além de energia são necessários os componentes para formação dos aminoácidos.

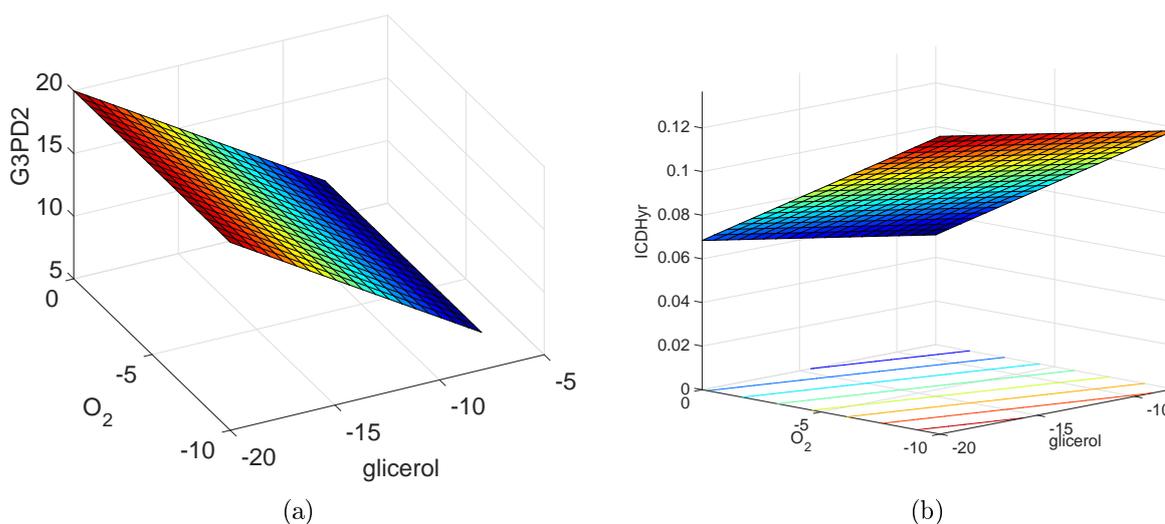


Figura 3.16: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de Diidroxiacetona fosfato (a) e α -cetogluturato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

No caso das reações para formação do oxalacetato (MDH e PPC) que utilizam como reagente o malato e o fosfoenolpiruvato, respectivamente, os gráficos obtidos ao variar os fluxos de oxigênio e glicerol estão na Figura 3.17. O oxalacetato é um dos precursores de aminoácidos quanto de nucleotídeos, componentes utilizados para compor a enzima e o plasmídeo.

O que se observa é que para fluxos altos de oxigênio e glicerol, obtém-se maiores fluxos para as duas reações da análise e para essa mesma situação os fluxos de plasmídeo e asparaginase também eram maiores na faixa de estudo. Dessa forma,

pode-se correlacionar a geração da asparaginase e do plasmídeo com a formação do oxalacetato, assim como observado na análise anterior.

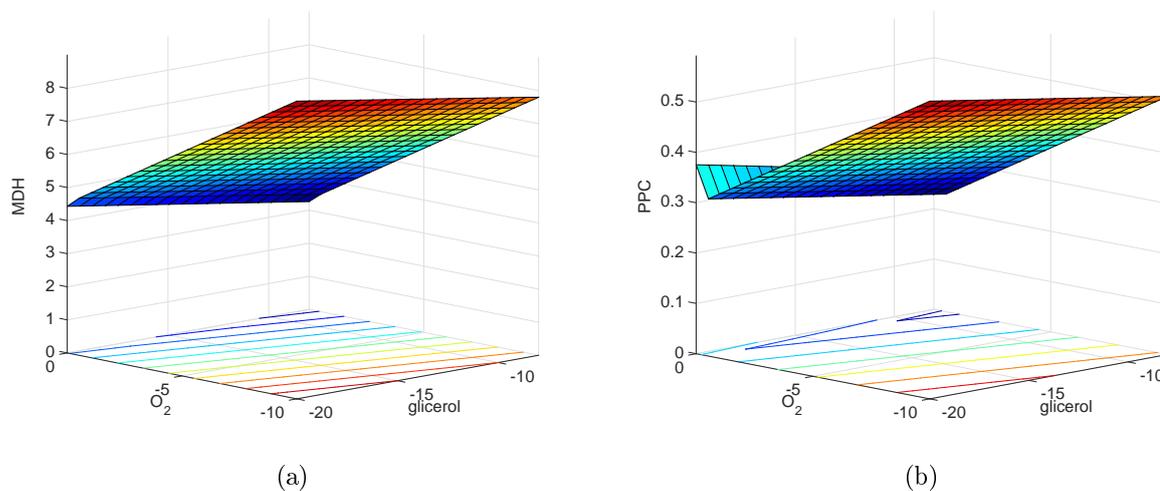


Figura 3.17: Análise dos fluxos [mmol/gDW h] para formação de oxalacetato a partir de malato (a) e fosfoenolpiruvato (b) para a variação dos fluxos de oxigênio e glicerol, tendo como objetivo a maximização do fluxo do plasmídeo.

3.6 Considerações finais

Neste capítulo foram mostradas as estratégias para a construção do modelo metabólico da *E. coli*, ao adicionar reações para formação do plasmídeo e da asparaginase, e discutidos os resultados das análises do balanço dos fluxos (FBA) considerando a maximização do fluxo de plasmídeo e a minimização da soma do quadrado dos fluxos apenas nas condições aeróbias e anaeróbias. Através dessas análises foi possível observar que, como a adição de novas reações que utilizam grande quantidade de energia (ATP), nucleotídeos e aminoácidos, as reações metabólicas favorecidas foram as que produziam esses componentes necessários. Além disso, nota-se a relação entre as principais vias do metabolismo central com a geração do plasmídeo e da asparaginase através dos precursores do aminoácidos e nucleotídeos, mostrando consistência no modelo metabólico proposto.

Capítulo 4

Modelagem e Simulação

Este capítulo apresenta a modelagem proposta para descrever o processo de produção da L-asparaginase recombinante utilizando o modelo metabólico construído no capítulo anterior, além de expor a estrutura e a calibração do modelo proposto, as técnicas utilizadas na sua resolução e as simulações realizadas. Posteriormente, os resultados são mostrados e discutidos.

4.1 Formulação do modelo

A estrutura do dFBA foi formulada utilizando abordagem já conhecida na literatura (JAMSHIDI e PALSSON, 2010; MAHADEVAN *et al.*, 2002). Considera-se que o metabolismo intracelular está no estado pseudo-estacionário, ou seja, acredita-se que a cinética intracelular é significativamente mais rápida quando comparada com a cinética extracelular. O modelo apresenta três blocos que são resolvidos de forma integrada assim como proposto por SÁNCHEZ *et al.* (2014), utilizando a abordagem da otimização direta (GOMEZ *et al.*, 2014; HÖFFNER *et al.*, 2013; SÁNCHEZ *et al.*, 2014) para resolução do problema da análise dinâmica do balanço de fluxos (dFBA).

A Figura 4.1 representa o modelo proposto, suas considerações e de que forma a integração entre os blocos foi feita. Primeiramente as condições iniciais para cada variável de estado são alimentadas no bloco cinético onde se encontram as restrições para as otimizações, que são resolvidas, como o consumo de glicerol, taxa de produção de subprodutos, etc. Então, no bloco metabólico considera-se a rede metabólica de *E. coli* construída no Capítulo 3, em que os fluxos da enzima e do plasmídeo são correlacionadas linearmente através do parâmetro α .

Com isso é possível resolver a primeira otimização (FBA) como um problema de programação linear (LP) ao maximizar a taxa de crescimento e posteriormente utilizar essa taxa ótima ajustada na segunda otimização. Essa otimização consideraria apenas a minimização da soma do quadrado dos fluxos, um problema de programação

quadrática (QP), porém, como a formação do plasmídeo e enzima requerem uma quantidade significativa de energia (ATP), ao calcular os fluxos desses componentes através dessa consideração, estes foram nulos. Como observa-se experimentalmente a formação destes compostos, uma otimização multiobjetivo foi proposta. Além da função objetivo anterior, foi considerado o fluxo para formação de plasmídeo máxima. Através das soluções Pareto-ótimas, utilizando o método ε -restrito, foi possível considerar um valor para ε (valor mínimo para o fluxo de plasmídeo) consistente com o fluxo máximo experimental de plasmídeo (WILLIAMS *et al.*, 2009).

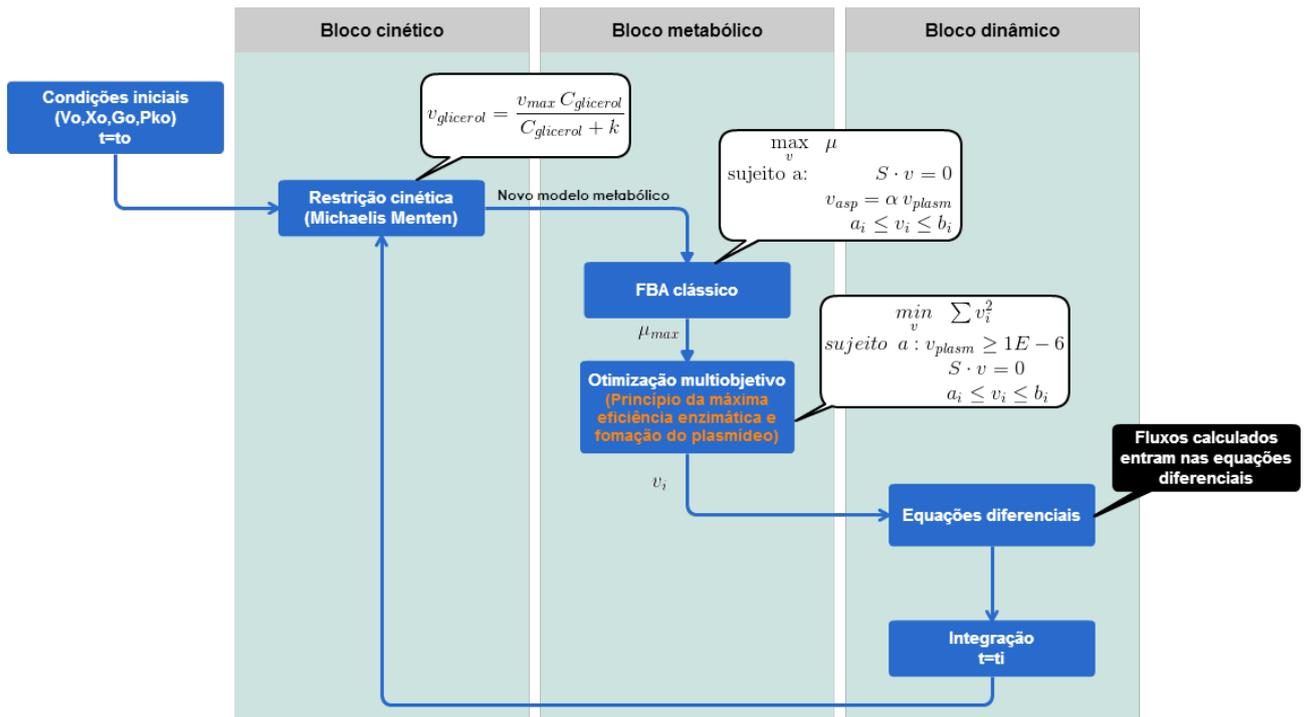


Figura 4.1: Fluxograma geral da estrutura do dFBA utilizada.

Como resultado dessa otimização descrita acima, os valores dos fluxos que estão relacionados ao consumo ou formação dos metabólitos de todo o metabolismo da bactéria são obtidos e estes são inseridos nas equações diferenciais ordinárias do bloco dinâmico em que ocorre a integração numérica para um passo de tempo, calculando o novo valor para as variáveis de estado e voltando assim para o bloco cinético. Esse ciclo utilizando os três blocos é repetido até atender o critério de convergência da integração numérica, ajustando o passo e/ou a ordem do método, para então avançar para o próximo intervalo de tempo.

A implementação do modelo foi feita no MATLAB[®] e o *software* Gurobi (GUROBI OPTIMIZATION, INC., 2015) foi utilizado para resolver os problemas de otimização. A integração numérica foi realizada por um método tipo BDF (*Backward Differentiation Formula*) de passo e ordem variáveis, implementada no solver ode15s, com tolerância relativa de 10^{-3} e tolerância absoluta de 10^{-6} .

4.2 Bloco metabólico

4.2.1 Análise do balanço de fluxos (FBA)

Para a análise do balanço de fluxos que utiliza a abordagem de modelagem baseada em restrições, a rede metabólica é representada por n reações e m metabólitos através de S , matriz estequiométrica $m \times n$. Além disso, considera-se que não há acúmulo dos componentes intracelulares, e assim o balanço de massa para todos os metabólitos é:

$$S \times v = 0$$

em que v é o vetor de fluxos metabólicos [mmol/gDW h]. Além disso, os limites inferior e superior para cada fluxo devem ser incluídos, levando em consideração a reversibilidade da reação, em conjunto com a função objetivo para maximizar a taxa específica de crescimento e com a restrição de que o fluxo da asparaginase é linearmente relacionado com o fluxo do plasmídeo ativado, este formado apenas na presença de lactose, através de um parâmetro α que representa o produto das atividades de transcrição e tradução (CUNNINGHAM *et al.*, 2009). Assim o primeiro problema de otimização, uma programação linear (LP), pode ser formulado da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \max_v \quad & \mu \\ \text{sujeito a:} \quad & S \cdot v = 0 \\ & v_{asp} = \alpha \cdot v_{plasmid*} \\ & a_i \leq v_i \leq b_i \end{aligned} \tag{4.1}$$

em que μ é taxa específica de crescimento [h^{-1}], a_i e b_i são os limites inferior e superior, respectivamente, e α é um parâmetro associado às atividades transcricional e translacional conforme discutido no Capítulo 3.

Através da resolução dessa otimização obtém-se a taxa específica de crescimento máxima (μ^*) que é utilizada na otimização dos fluxos. Nessa segunda otimização, um problema de programação quadrática (QP) é resolvido ao minimizar a soma dos quadrados dos fluxos, que é baseado no princípio da máxima eficiência enzimática (FENG *et al.*, 2012; HOLZHÜTTER, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2014; SCHUETZ *et al.*, 2012).

Além das restrições utilizadas no problema 4.1, foi necessário considerar que haveria formação de plasmídeo através de uma otimização multiobjetivo, que é descrita na próxima subseção (4.2.2). Assim, o fluxo de plasmídeo deve ser maior que um

determinado valor ε e o problema final é formulado como segue:

$$\begin{aligned}
 \min_v \quad & \sum v_i^2 \\
 \text{sujeito a: } & S \cdot v = 0 \\
 & v_{plasmid} \geq \varepsilon \\
 & v_{asp} = \alpha \cdot v_{plasmid} \\
 & \mu = k \cdot \mu^* \\
 & a_i \leq v_i \leq b_i
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

em que μ^* é o valor da taxa específica de crescimento ótima obtida no problema 4.1, k é um parâmetro que varia entre 0 e 1 e é utilizado na calibração do modelo.

Através da resolução do problema 4.2, a distribuição de fluxos de todas as reações metabólicas é obtida e utilizada no bloco dinâmico do modelo proposto.

4.2.2 Otimização Multiobjetivo

Tendo em vista que para a produção do plasmídeo e asparaginase grande quantidade de energia (ATP) é necessária, ao utilizar o princípio de máxima eficiência enzimática como função objetivo, os fluxos obtidos para esses componentes foram nulos. No entanto, como observa-se experimentalmente a formação tanto de plasmídeo quanto da enzima, reformulou-se o problema de otimização com uma função multiobjetivo.

Dessa forma, para resolução desse problema o método ε -restrito foi utilizado, em que a restrição de que o fluxo de plasmídeo deveria ser maior que ε foi adicionada. Para obter as soluções Pareto-ótimas, variou-se o valor de ε até um valor máximo de $2 \cdot 10^{-6}$. Como o fluxo máximo experimental de plasmídeo, obtido por WILLIAMS *et al.* (2009), foi de $1,3 \cdot 10^{-6}$, o valor ótimo de ε foi escolhido de forma consistente com esse fluxo experimental e utilizado no problema 4.2 do bloco metabólico.

4.3 Bloco dinâmico

O bloco dinâmico apresenta as equações diferenciais ordinárias do balanço de massa para os componentes do processo no modo batelada ou batelada alimentada, em que o balanço para o oxigênio foi baseado em LONGHI *et al.* (2004). As equações podem ser escritas da seguinte forma:

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad (4.3)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d)X - X \frac{F(t)}{V} \quad (4.4)$$

$$\frac{dG}{dt} = \frac{F(t)}{V}(G_f - G) - v_G PM_G X \quad (4.5)$$

$$\frac{dC_{lcts}}{dt} = \frac{F(t)}{V}(C_{lcts_f} - C_{lcts}) - v_{lcts} PM_{lcts} X \quad (4.6)$$

$$\frac{dP_i}{dt} = v_{P_i} PM_{P_i} X - P_i \frac{F(t)}{V} \quad (4.7)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = k_{l_a}(C_{L_e} - C_L) - v_{O_2} X - C_L \frac{F(t)}{V} \quad (4.8)$$

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{F_{ar}}{V_G}(C_{G0} - C_G) - k_{l_a}(C_{L_e} - C_L) \frac{V_L}{V_G} \quad (4.9)$$

em que V é o volume [L], t é o tempo [h], $F(t)$ é a taxa de alimentação [L/h], X é a concentração de biomassa [g/L], μ é a taxa específica de crescimento [1/h] (obtida no problema 4.2 do bloco metabólico), k_d é a taxa de morte celular [1/h], G é a concentração extracelular do glicerol [g/L], G_f é a concentração de substrato na alimentação [g/L], C_{lcts} é a concentração extracelular de lactose [g/L], C_{lcts_f} é a concentração de lactose na alimentação [g/L], P_i é concentração de produto do componente i [g/L], v_i é o fluxo do metabólito do componente i [mmol/ gDW h] (obtido no problema 4.2 do bloco metabólico), e PM_i é a massa molar do componente i [g/mmol], C_L é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida [g/L], C_G é a concentração de oxigênio na fase gás [g/L], k_{l_a} é o coeficiente de transferência de

massa gás-líquido do oxigênio [h^{-1}], C_{Le} é a concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a fase gás [g/L], F_{ar} é a vazão de ar injetado no biorreator [L/h], V_G é o volume do gás interno no biorreator [L], V_L é o volume do líquido no biorreator [L], C_{G0} é a concentração de oxigênio na vazão de alimentação de ar [g/L]. Os produtos, P_i , mais relevantes considerados foram plasmídeo, L-asparaginase, acetato e lactato.

A concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a fase gás é escrita como a seguir:

$$C_{Le} = K \cdot C_G \quad (4.10)$$

em que K é o coeficiente de equilíbrio (adimensional) descrito como:

$$K = \frac{C_m}{C_{G0}} \quad (4.11)$$

em que C_m é a concentração de saturação de oxigênio na fase líquida [g/L] que é função da temperatura e pressão. Através dos dados experimentais reportados na literatura GREEN e PERRY (2007); LONGHI *et al.* (2004) para ar e água na pressão atmosférica, obtém-se a seguinte equação para essa concentração:

$$C_m = 3,62 \cdot 10^{-6} T^2 - 3,312 \cdot 10^{-4} T + 0,01466217 \quad (4.12)$$

em que T é a temperatura do biorreator [$^{\circ}\text{C}$].

A concentração de oxigênio no gás de alimentação é obtida pela seguinte equação, ao considerar gás ideal:

$$C_{G0} = \frac{P \bar{M} x_{O_2}}{R(T + 273,15)} \quad (4.13)$$

em que x_{O_2} é a fração molar de oxigênio, P é a pressão do biorreator [bar], \bar{M} é a massa molar do oxigênio [g/mol] e R é a constante dos gases [bar/mol K].

A porcentagem de oxigênio dissolvido é obtido da seguinte forma:

$$p_{O_2} = 100 \frac{C_L}{C_m} \quad (4.14)$$

As condições iniciais e os parâmetros operacionais considerados estão na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições iniciais e os parâmetros operacionais utilizados na resolução do modelo.

| | Valor | Unidade |
|---------------|--------|--------------|
| V_0 | 1,5 | L |
| X_0 | 0,05 | g/L |
| G_0 | 31 | g/L |
| C_{Ac_0} | 0 | g/L |
| C_{Lac_0} | 0 | g/L |
| C_{Lcts_0} | 0 | g/L |
| C_{Asp_0} | 0 | g/L |
| C_{Plasm_0} | 0 | g/L |
| C_{L_0} | 0,0072 | g/L |
| C_{G_0} | 0,1321 | g/L |
| T | 37 | °C |
| R | 0,082 | atm L/mol K |
| P | 1 | atm |
| x_{O_2} | 0,21 | Adimensional |
| V_L | 1,5 | L |
| V_G | 1 | L |
| F_{ar} | 90 | L/h |

4.4 Bloco cinético

4.4.1 Consumo de glicerol

O bloco cinético inclui a taxa de consumo de glicerol (v_G), usando a cinética de Michaelis-Menten (MICHAELIS e MENTEN, 1913; PALSSON e LIGHTFOOT, 1984) através da seguinte equação para o **limite inferior** do fluxo:

$$LB_{v_G} = \frac{v_{G_{max}} G}{k_G + G} \quad (4.15)$$

em que $v_{G_{max}}$ é a taxa máxima de consumo de glicerol [mmol/gDW h], G é a concentração de glicerol [g/L] e k_G é a contante de saturação [g/L].

4.4.2 Consumo de oxigênio

Considerando um processo aeróbio, esse bloco também inclui a taxa de consumo de oxigênio da fase líquida (v_{O_2}) definindo o **limite inferior** para o fluxo, usando a cinética de Michaelis-Menten (MICHAELIS e MENTEN, 1913; PALSSON e LIGHTFOOT, 1984):

$$LB_{v_{O_2}} = \frac{v_{O_2_{max}} C_L}{k_{O_2} + C_L} \quad (4.16)$$

em que $v_{O_2_{max}}$ é a taxa máxima de consumo de oxigênio na fase líquida [mmol/gDW h], C_L é a concentração de oxigênio na fase líquida [g/L] e k_{O_2} é a constante de saturação [g/L].

4.4.3 Consumo de lactose

A taxa de consumo de lactose (v_{lcts}) é considerada usando a cinética de Michaelis-Menten (MICHAELIS e MENTEN, 1913; PALSSON e LIGHTFOOT, 1984) definindo o **limite inferior** do fluxo como:

$$LB_{v_{lcts}} = \frac{v_{lcts_{max}} C_{lcts}}{k_{lcts} + C_{lcts}} \quad (4.17)$$

em que $v_{lcts_{max}}$ é a taxa máxima de consumo de lactose [mmol/gDW h], C_{lcts} é a concentração de lactose [g/L] e k_{lcts} é a constante de saturação [g/L].

4.4.4 Produção de subprodutos

A formação de subprodutos foi considerada forçando a produção ao fixar o **limite inferior** dos fluxos das reações desses metabólitos, assim como SÁNCHEZ *et al.* (2014). Dessa forma, considera-se que:

$$LB_{v_i} = f_i, \text{ para } i = \{Ac, Lac\} \quad (4.18)$$

em que f_i é o parâmetro associado a cada subproduto i [mmol/gDW h], acetato e lactato.

4.5 Calibração do modelo

4.5.1 Proposta experimental

Os dados experimentais utilizados para a calibração do modelo são provenientes de EINSFELDT (2014). No experimento considerado nesse trabalho (esquema na Figura 4.2), foi utilizado o biorreator Minifors (INFORS HT) com volume de trabalho de 1,5L e mantendo uma taxa de aeração de 1vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto). A concentração de células no início do experimento era de 0,05g/L e a indução da expressão da proteína foi realizada no final da fase exponencial, com concentração celular de cerca de 1,3 g/L, com 5 g/L de lactose, e mantendo a temperatura em 37 °C.

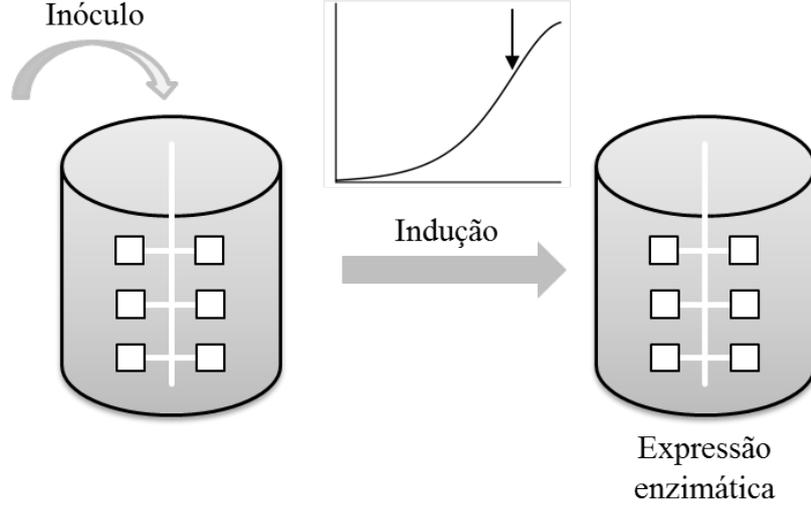


Figura 4.2: Esquema do experimento de expressão enzimática em biorreator.

4.5.2 Análise de sensibilidade

A análise de sensibilidade paramétrica é uma metodologia para avaliar o efeito de pequenas variações nos parâmetros nas variáveis de saída do modelo (DI MAGGIO *et al.*, 2010). Essa análise pode fornecer informações úteis para a estimação de parâmetros, otimização, sensibilidade do processo e simplificação do modelo (MALY e PETZOLD, 1996).

Em problemas de estimação de parâmetros, é importante ter a informação relativa aos coeficientes de sensibilidade paramétrica, derivadas das variáveis de estado em relação aos parâmetros, que é uma medida da sensibilidade do modelo em relação às variações nos valores dos parâmetros. A matriz dos coeficientes de sensibilidade, denominada matriz sensibilidade, foi calculada por perturbação numérica do valor dos parâmetros. Este método consiste em aproximar a derivada das variáveis com o parâmetro por diferenças finitas, como a seguir:

$$S_i = \frac{dy}{dp_i} \cong \frac{\Delta y}{\Delta p_i} \quad (4.19)$$

em que S_i é o vetor de coeficientes de sensibilidade para cada i -ésimo parâmetro, p_i é o parâmetro i e \mathbf{y} é o vetor de variáveis de estado.

Esse cálculo é realizado ao considerar uma perturbação (ξ) no parâmetro e simular o comportamento do modelo para esse novo valor de parâmetro. Para a aproximação da derivada por diferenças centrais, a simulação deve ser realizada para a adição e subtração desta perturbação paramétrica. Com isso, os coeficientes de sensibilidade S_i são calculados da seguinte forma:

$$S_i = \frac{\mathbf{y}(p_i + \xi) - \mathbf{y}(p_i - \xi)}{(p_i + \xi) - (p_i - \xi)} = \frac{\Delta \mathbf{y}}{2 \cdot \xi} \quad (4.20)$$

Além disso, esses coeficientes foram normalizados, podendo assim comparar melhor a influência de cada parâmetro nas variáveis. Essa normalização foi feita como segue:

$$\mathbf{S}_n = \mathbf{Y} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{P} \quad (4.21)$$

em que S_n é a matriz sensibilidade normalizada, Y é a matriz diagonal do inverso da diferença entre os valores máximo e mínimos das variáveis de estado, S é a matriz sensibilidade e P é a matriz diagonal dos parâmetros.

Os parâmetros utilizados na análise de sensibilidade e seus valores estão na Tabela 4.2, sendo que a perturbação utilizada no método para todos os parâmetros foi de +/- 10%.

Tabela 4.2: Parâmetros em que foi realizada a análise de sensibilidade.

| Parâmetro | Valor | Unidade |
|------------------|--------|---------------------|
| k | 0,8 | Adimensional |
| k_d | 0,01 | 1/h |
| α | 50 | mol asp/mol plasmid |
| k_G | 0,05 | g/L |
| k_{lcts} | 0,05 | g/L |
| k_{O_2} | 20000 | g/L |
| $v_{G_{max}}$ | 10 | mmol/gDW h |
| $v_{lcts_{max}}$ | 1 | mmol/gDW h |
| $v_{O_2_{max}}$ | 0,0024 | mmol/gDW h |
| k_{la} | 8,26 | 1/h |
| $f_{lactato}$ | 2 | mmol/gDW h |
| $f_{acetato}$ | 1 | mmol/gDW h |

4.5.3 Estimação de parâmetros

A estimação de parâmetros, que tem como objetivo ajustar os valores dos parâmetros de forma que a predição do modelo seja próxima aos dados experimentais, é basicamente um problema de otimização em que se minimiza o erro entre os valores preditos pelo modelo e os medidos experimentalmente.

A função objetivo utilizada foi:

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^N (y_i^e - y_i^m)^2 \quad (4.22)$$

em que N é o número de experimentos, y^e é a variável medida experimentalmente e y^m é a variável predita pelo modelo.

Inicialmente, os parâmetros mais sensíveis obtidos na análise de sensibilidade foram estimados ($k, k_d, v_{G_{max}}$ e k_{la}) e então, mantendo esses parâmetros constantes,

os outros parâmetros importantes para o processo foram estimados separadamente ($v_{lcts_{max}}$, $f_{lactato}$, α , $f_{acetato}$). Os valores dos limites inferior e superior utilizados na estimação são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores iniciais e limites inferior e superior dos parâmetros utilizados na estimação.

| Parâmetro | Limite inferior | Limite superior | Unidade |
|------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| k | 0.1 | 2 | Adimensional |
| k_d | 0.1 | 1 | 1/h |
| α | 5 | 75 | mol asp/mol plasmid |
| $v_{G_{max}}$ | 15 | 45 | mmol/gDW h |
| $v_{lcts_{max}}$ | 1 | | mmol/gDW h |
| k_{la} | 20.7 | 62 | 1/h |
| $f_{lactato}$ | 1 | 10 | mmol/gDW h |
| $f_{acetato}$ | 0,05 | 2 | mmol/gDW h |

Para resolver esse problema foi utilizado métodos de otimização local, método do ponto interior (FORSGREN *et al.*, 2002; KARMARKAR, 1984), e global, método do enxame de partículas (KENNEDY e EBERHART, 1995; SHI e EBERHART, 1998; YANG e SIMON, 2005). Sendo que nos casos em que se utilizou o método global, a otimização continuou pelo método local para refinamento da solução.

4.6 Resultados e Discussão

Essa seção apresenta os resultados e sua discussão referentes ao modelo dinâmico proposto considerando em sua estrutura os blocos metabólico, dinâmico e cinético, incluindo as soluções Pareto-ótimas da otimização multiobjetivo, a calibração do modelo, mostrando os parâmetros mais sensíveis e a estimação destes, além de simulações e estudos de caso no sentido de avaliar a resposta do modelo.

4.6.1 Otimização multiobjetivo

As soluções Pareto-ótimas foram obtidas variando ε até o valor máximo de $2 \cdot 10^{-6}$ e os valores para a função objetivo, o fluxo de asparaginase e de oxigênio estão nas Figuras 4.3 e 4.4.

O objetivo é minimizar a soma do quadrado dos fluxos tendo como restrição que o fluxo de plasmídeo seja maior ou igual a ε (Problema 4.2). Ao observar os valores da função objetivo (Figura 4.3), ao aumentar o valor de ε , há também um aumento para o valor ótimo da função objetivo, fenômeno esse esperado, pois ao alterar o fluxo de plasmídeo, ocorrerá um aumento dos demais fluxos da rede metabólica para a sua produção.

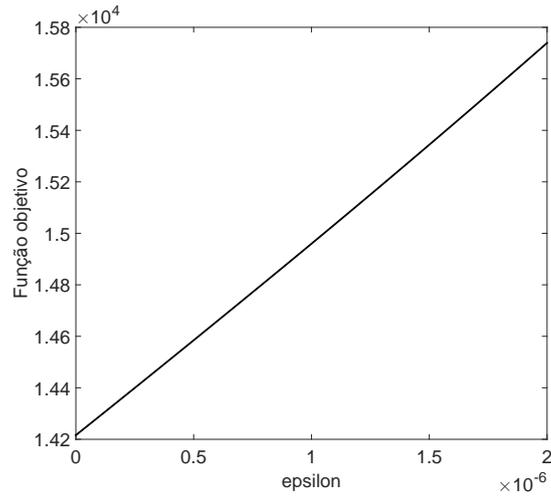


Figura 4.3: Valores da Função objetivo para as soluções Pareto-ótimas ao variar ε .

No caso do fluxo de asparaginase, como está relacionado linearmente com o fluxo de plasmídeo e este aumenta à medida que o valor de ε também aumenta, o fluxo da enzima deve ser maior com o aumento de epsilon como mostrado na Figura 4.4a. Para o fluxo de oxigênio (Figura 4.4b), mostra-se que há uma taxa de consumo maior quando o valor de ε cresce, isso porque quanto maior a formação de plasmídeo, que ocorre com o aumento de epsilon, maior a necessidade de energia (ATP) e assim um consumo maior de oxigênio é necessário.

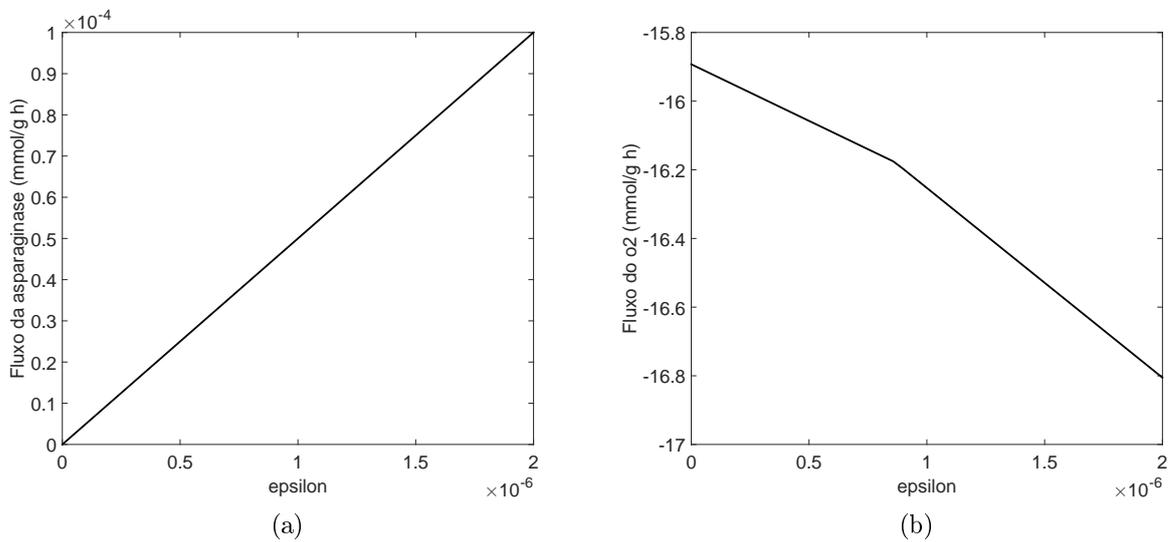


Figura 4.4: Valores dos fluxos de asparaginase (a) e oxigênio (b) para as soluções Pareto-ótimas ao variar ε .

Tendo essas soluções Pareto-ótimas, apenas uma solução ótima deve ser escolhida e então o valor de epsilon ser utilizado no modelo proposto. Baseado no maior fluxo de plasmídeo experimental de $1,3 \cdot 10^{-6}$ (WILLIAMS *et al.*, 2009), foi escolhido um

valor menor de $1 \cdot 10^{-6}$ como o valor ótimo de ε e utilizado no problema 4.2 do bloco metabólico do modelo.

4.6.2 Calibração do modelo

Análise de sensibilidade

Os coeficientes dinâmicos de sensibilidade foram calculados para as variáveis de estado (concentração de acetato, lactato, L-asparaginase, plasmídeo, biomassa, glicerol, lactose e oxigênio), através da perturbação de $\pm 10\%$ nos seguintes parâmetros: k , k_d , α , k_G , k_{lcts} , k_{lcts} , v_{O_2max} , $k_{l}a$, $f_{lactato}$ e $f_{acetato}$.

Os gráficos da Figura 4.5 mostram que a concentração tanto de acetato (Figura 4.5a) quanto de lactato (Figura 4.5b) não são sensíveis à perturbação nos parâmetros estudados, assim como a concentração de L-asparaginase (Figura 4.6a).

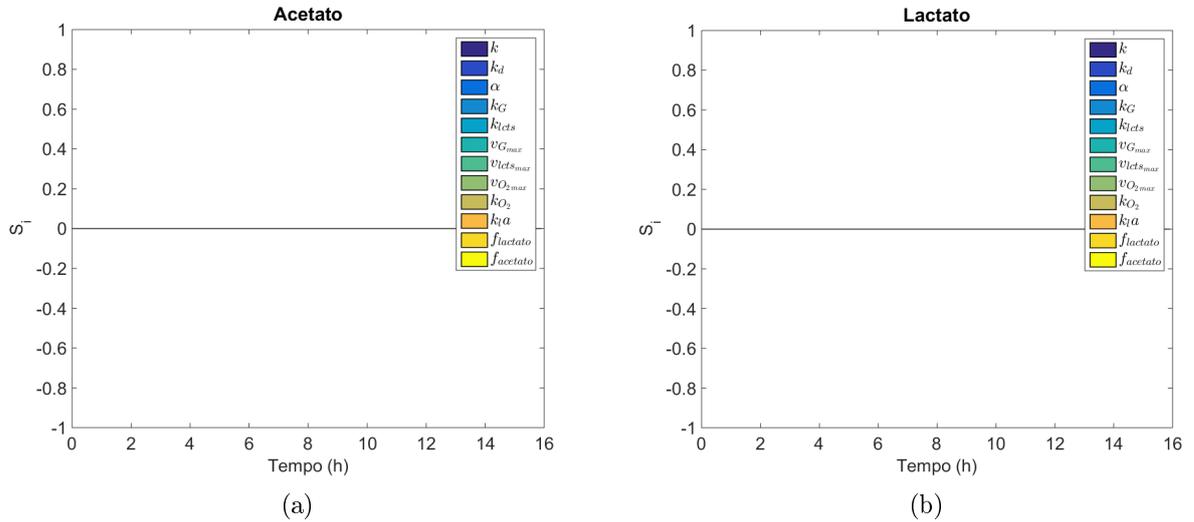


Figura 4.5: Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de acetato (a) e lactato (b).

A Figura 4.6b mostra o perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade para a concentração de plasmídeo. Nota-se que a influência dos parâmetros k , k_d , v_{Gmax} e $k_{l}a$ foi significativa, principalmente nos tempos finais. Esses parâmetros estão relacionados ao crescimento e morte celular, ao consumo de substrato e à transferência de massa de oxigênio, fatores importantes que contribuem para a formação de produtos como o DNA circular em questão.

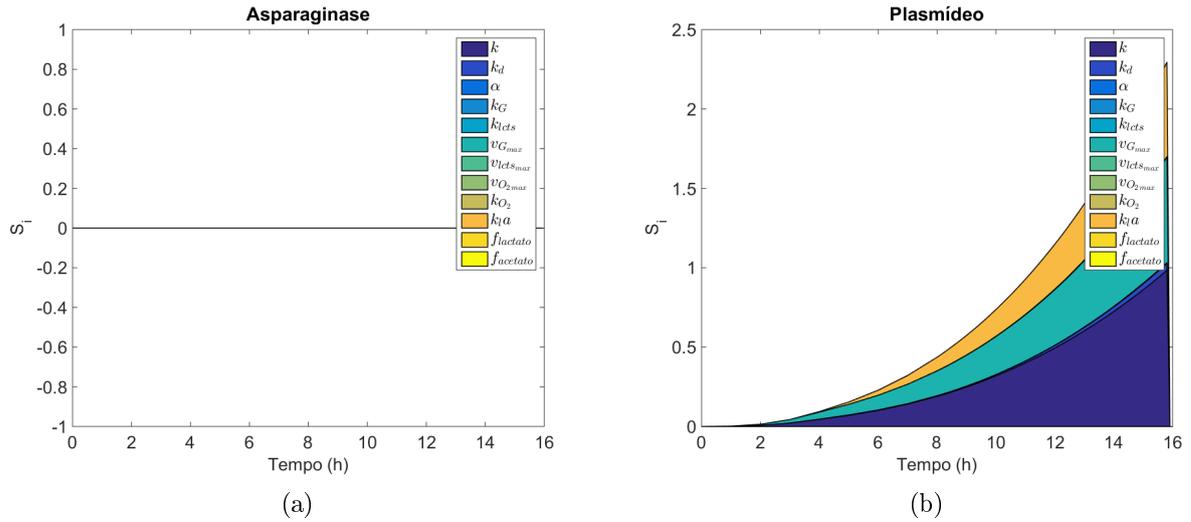


Figura 4.6: Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de asparaginase (a) e plasmídeo (b).

O perfil dinâmico dos coeficientes de sensibilidade para a concentração de biomassa e glicerol é mostrado nos gráficos da Figura 4.7. É possível observar que os mesmos quatro parâmetros que tiveram influência significativa na concentração de plasmídeo (Figura 4.6b), influenciam também a concentração de biomassa e glicerol. No caso do glicerol (Figura 4.7b) percebe-se uma sensibilidade menor em relação aos parâmetros relacionados à morte celular e à transferência de massa de oxigênio, mostrando alta influência para perturbações no parâmetro k e v_{Gmax} .

Esses parâmetros estão intrinsecamente relacionados ao consumo de glicerol já que ditam a taxa de crescimento celular e de consumo de glicerol, tendo assim um efeito correto da análise apresentada. No caso da biomassa, os quatro parâmetros k , k_d , v_{Gmax} e k_{Ia} têm influência. Tendo em vista que a taxa de crescimento e morte celular estão completamente correlacionados com a biomassa e que a presença da fonte de carbono, glicerol, e de oxigênio é essencial para a viabilidade da célula, os parâmetros ditos anteriormente atuam de forma esperada.

Observa-se na Figura 4.8 os gráficos do perfil dinâmico dos coeficientes de sensibilidade para a concentração de lactose e oxigênio na fase líquida. Para a concentração de lactose (Figura 4.8a) pode-se notar que os parâmetros k , v_{Gmax} e k_{Ia} que apresentam maior influência, porém não tão significativo como para as outras variáveis (os valores dos coeficientes são cerca de dez vezes menores). Como a lactose também pode ser uma fonte de carbono para a célula, ao perturbar os parâmetros relacionados com o crescimento celular, consumo de glicerol e transferência de massa de oxigênio, pode haver alterações na concentração desse componente como mostra a análise.

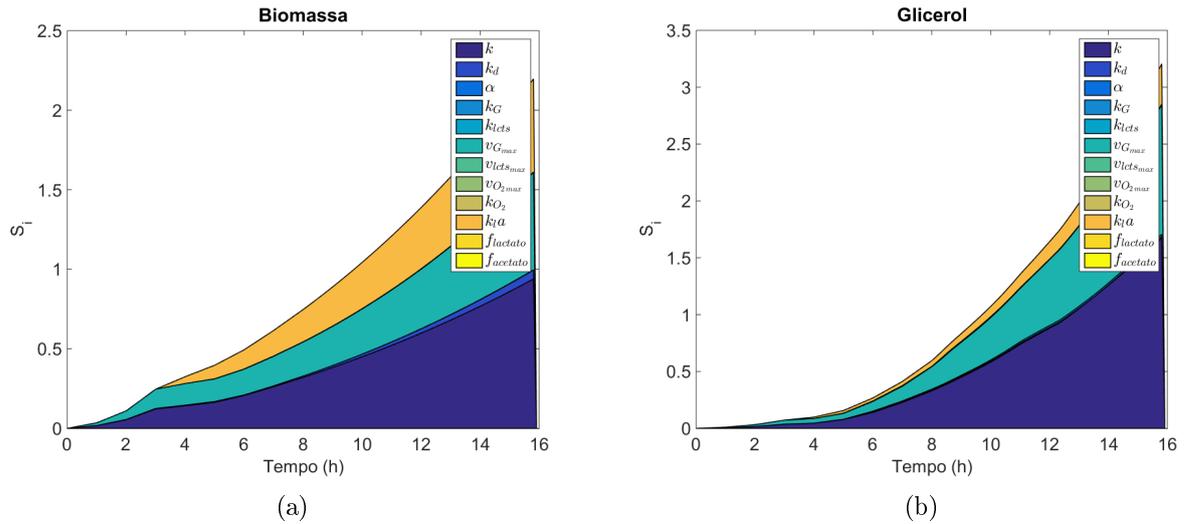


Figura 4.7: Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de biomassa (a) e glicerol (b).

No caso da concentração de oxigênio na fase líquida (Figura 4.8b), percebe-se uma maior sensibilidade ao perturbar os parâmetros apenas nas primeiras horas. Isso porque, para as condições utilizadas, há um consumo variável de oxigênio apenas no início do processo e após 4h todo oxigênio dissolvido é instantaneamente consumido. Os parâmetros k , v_{Gmax} e k_{La} mostraram maior efeito. Como o oxigênio é um aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, sendo importante na geração de ATP, está relacionado com o crescimento celular e conseqüentemente ao consumo de substrato. Portanto, esses parâmetros são relevantes para a concentração de oxigênio, principalmente o k_{La} que é o coeficiente de transferência de massa de oxigênio. Novamente a análise está condizente com o esperado.

De uma formação geral, os parâmetros que mais impactaram nas variáveis de estado do processo para a perturbação de $\pm 10\%$ foram: k , k_d , v_{Gmax} e k_{La} . Assim, a estimação de parâmetros inicial foi feita com esse conjunto de parâmetros. Posteriormente, os outros parâmetros foram estimados separadamente.

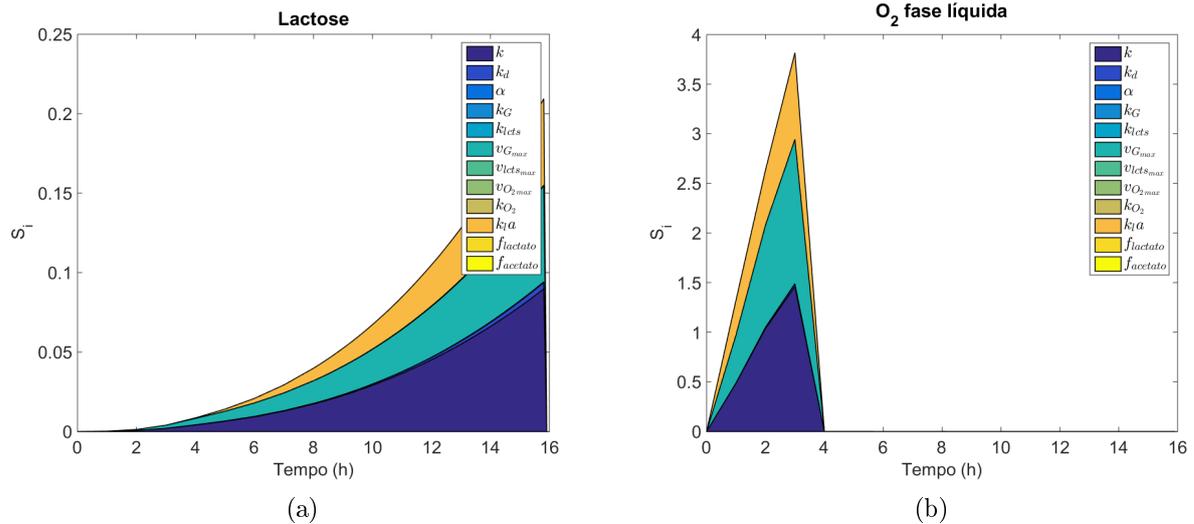


Figura 4.8: Perfil temporal dos coeficientes de sensibilidade (S_i) para a concentração de lactose (a) e oxigênio na fase líquida (b).

Estimação de parâmetros

A partir da estimação de parâmetros feita, gráficos comparando os dados experimentais com os valores preditos pelo modelo proposto foram gerados (Figuras 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12). Ao observar o comportamento da concentração de células (Figura 4.9a), nota-se as fases exponencial e estacionária do crescimento microbiano. Além disso, uma pequena diluição ocorre no momento da alimentação com lactose (tempo igual a 8h), não afetando no perfil do crescimento. Percebe-se também que na fase estacionária o modelo não prevê a queda na concentração de biomassa, porém de uma forma geral o modelo prediz corretamente o comportamento.

Para o glicerol (Figura 4.9b), que é a fonte de carbono, observa-se consumo no sentido não só da geração de biomassa mas também para formação dos subprodutos, acetato e lactato. O modelo prevê a tendência do perfil de concentração de glicerol, destoando apenas para os tempo finais em que apresenta uma taxa de consumo maior do que o experimental. Como não há o erro experimental, não é possível determinar o intervalo de confiabilidade do modelo.

O comportamento dinâmico para a L-asparaginase é mostrado na Figura 4.10a. A concentração da enzima começa a aumentar após a alimentação de lactose, indutor da expressão enzimática. No entanto, experimentalmente a formação da enzima ocorre apenas cerca de duas horas após a indução enquanto o modelo prevê presença da L-asparaginase a partir do momento em que há indutor no meio, como na descrição do modelo proposto. Embora não mostre o exato momento do início da formação da enzima, a simulação consegue prever de forma satisfatória o comportamento da produção enzimática.

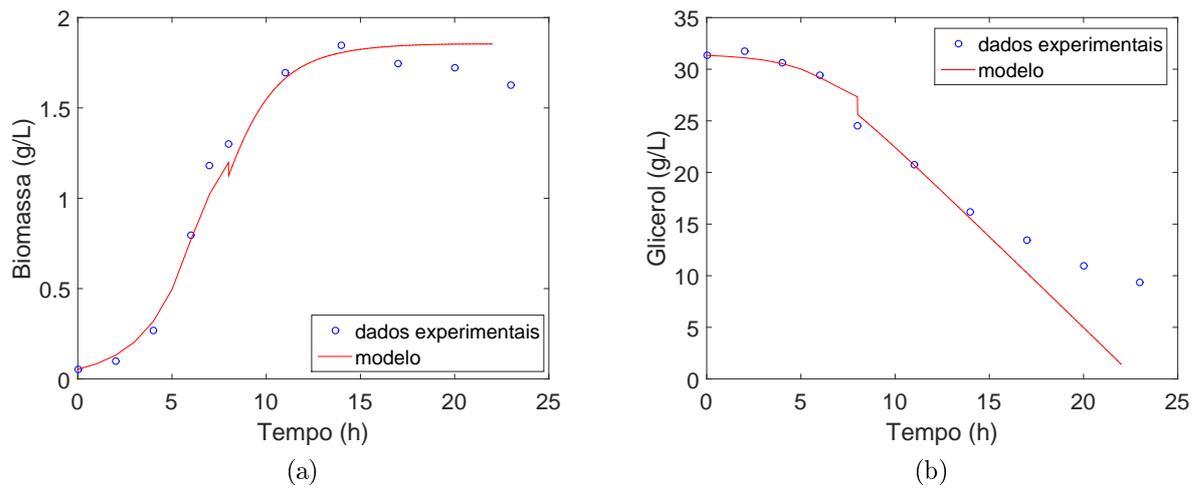


Figura 4.9: Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a concentração de biomassa (a) e de glicerol (b).

Através da Figura 4.10b pode-se notar o perfil dinâmico da concentração de lactose. A alimentação de lactose foi feita após oito horas do início do experimento, sendo consumida tanto para a formação da enzima como para ser utilizada como fonte de carbono, já que isso é possível. Como é possível verificar, os valores preditos pelo modelo se adequam aos dados experimentais.

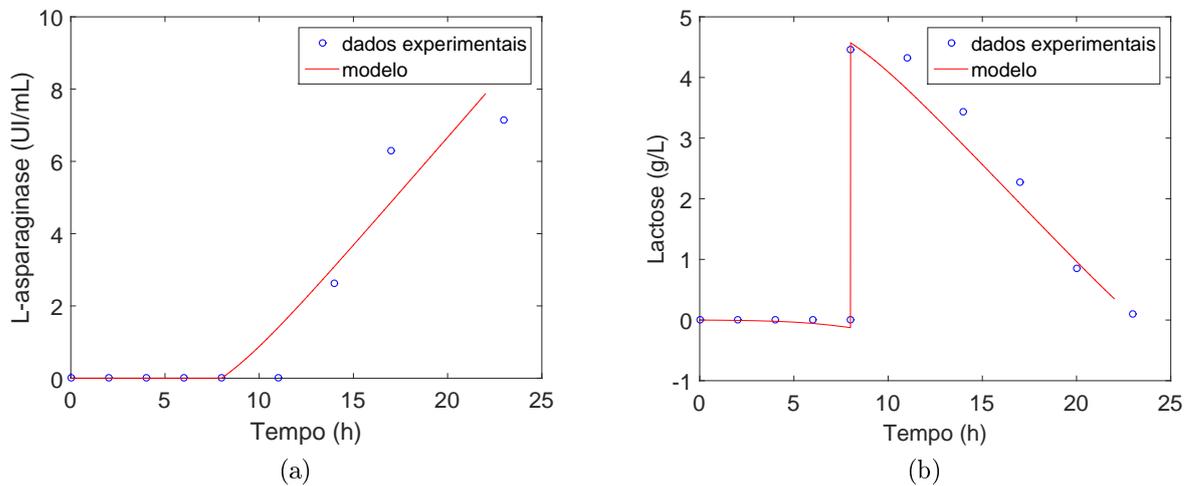


Figura 4.10: Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a concentração de L-asparaginase (a) e de lactose (b).

A formação dos subprodutos acetato e lactato é mostrada na Figura 4.11. Esses compostos são gerados quando há alta demanda por ATP e suprimento baixo de oxigênio, situação que ocorre na presença desses componentes, já que com a formação do plasmídeo e da enzima há alta necessidade por energia e a porcentagem de oxigênio dissolvido é baixa. A tendência prevista na simulação do processo foi adequada em relação ao observado experimentalmente.

Nesse caso, como foi forçada a formação dos subprodutos através da estimação de parâmetros relacionados diretamente aos seus respectivos fluxos, foi possível observar a formação de lactato, diferente do que foi mostrado no Capítulo 3.

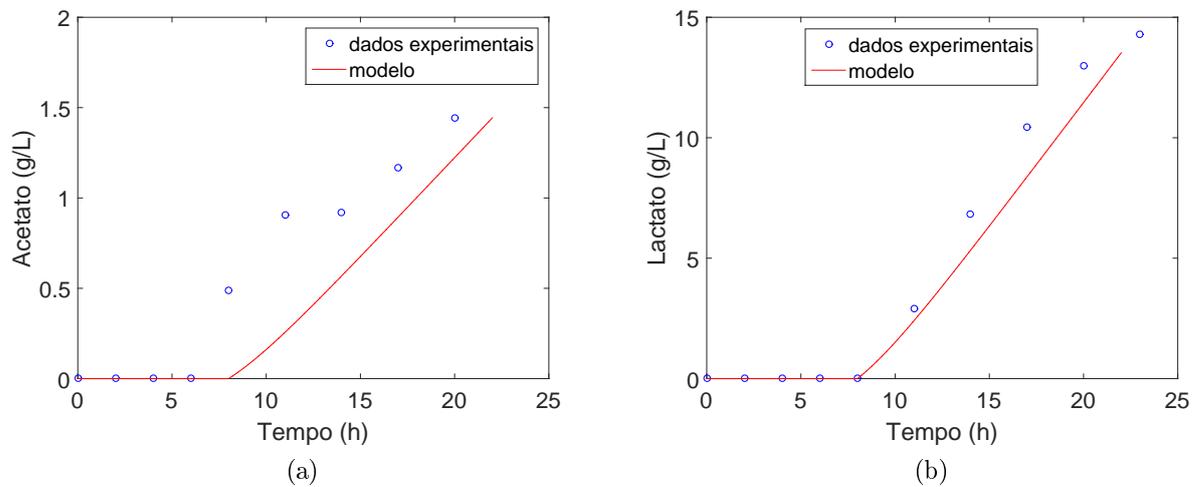


Figura 4.11: Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a concentração de acetato (a) e lactato (b).

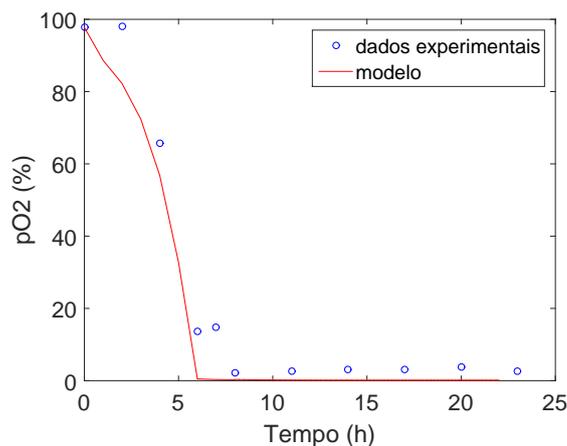


Figura 4.12: Comparação dos dados experimentais com os valores da simulação para a porcentagem de oxigênio dissolvido.

A Figura 4.12 apresenta o gráfico para a porcentagem de oxigênio dissolvido. Nota-se que a variação de oxigênio dissolvido ocorre principalmente nas primeiras

horas do início de experimento, em que a taxa de crescimento é alta, e esse comportamento é previsto pelo modelo proposto.

Os valores dos parâmetros estimados estão na Tabela 4.4. O parâmetro k está relacionado com a taxa de crescimento, e quanto mais próximo de um, o valor de μ utilizado no problema 4.2 mais se aproxima da taxa máxima de crescimento. Como na produção de proteínas recombinantes a taxa de crescimento é mais baixa devido à formação de plasmídeo e enzima que requer alta geração de energia, o valor de k estimado é razoável.

SÁNCHEZ *et al.* (2014) também estimou esse parâmetro, porém o valor não foi próximo ao obtido nesse trabalho, foi cerca de 0,9. Isso se deve ao fato de que esse trabalho estuda outro processo, para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, sendo distinto da produção de proteínas recombinantes.

Tabela 4.4: Parâmetros estimados.

| Parâmetro | Valor estimado | Unidade |
|------------------|----------------|---------------------|
| k | 0,45 | Adimensional |
| k_d | 0,33 | 1/h |
| α | 47,6 | mol asp/mol plasmid |
| $v_{G_{max}}$ | 30,0 | mmol/gDW h |
| $v_{lcts_{max}}$ | 0,52 | mmol/gDW h |
| $k_l a$ | 47,9 | 1/h |
| $f_{lactato}$ | 6,20 | mmol/gDW h |
| $f_{acetato}$ | 1,00 | mmol/gDW h |

O modelo proposto considera apenas as células que apresentam plasmídeo e o parâmetro k_d relacionado à taxa de morte celular foi incluído com o intuito de mostrar células que perdem esse DNA circular e não sobrevivem no meio. Através da estimacão pode-se observar uma alta taxa de morte (k_d), podendo ter relação com a instabilidade plasmidial. Com a perda do plasmídeo a célula não consegue sobreviver por conta da presença de antibiótico no meio, como observado experimentalmente. Essa instabilidade pode ser causada por diversos fatores como a taxa de crescimento, o número de cópias do plasmídeo, a concentração de oxigênio dissolvido, a carga metabólica imposta à célula, entre outros (EINSFELDT *et al.*, 2011; FRIEHS, 2004; GUPTA *et al.*, 1995; POPOV *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2006).

O parâmetro α , parâmetro associado às atividades transcricional e translacional, não poderia ser tão alto pois afetaria o fluxo de formação de plasmídeo e também nem tão baixo que formasse pouca enzima, como mostrado no Capítulo 3. Assim, o valor estimado está consistente como o esperado.

CUNNINGHAM *et al.* (2009) definiu o parâmetro α como a relação entre os fluxos da β -lactamase e do plasmídeo e variou seu valor de forma a observar o efeito nos fluxos metabólicos. Porém, não estimou esse parâmetro, apenas utilizou um

valor médio para expressão gênica do LacZ obtido por KIERZEK *et al.* (2001), que fez flutuações randômicas no número de moléculas de proteínas, como base. Como o parâmetro α estimado nesse trabalho está correlacionado diretamente com a geração da L-asparaginase e incluído na formulação do modelo dinâmico, não foi possível comparar com os trabalhos anteriores.

O coeficiente de transferência de massa de oxigênio, k_{la} , calculado ($47,9 \text{ h}^{-1}$) foi próximo do valor estimado por EINSFELDT (2014) ($41,3 \text{ h}^{-1}$) trabalho do qual os dados experimentais foram utilizados. Já os parâmetros $v_{G_{max}}$, $v_{lcts_{max}}$, $f_{lactato}$ e $f_{acetato}$ estão relacionados com a taxa de geração ou consumo de glicerol, lactose, lactato e acetato, respectivamente. Seus valores estimados estão adequados, pois há alto consumo de glicerol, necessário para o crescimento celular e formação de subprodutos, baixo consumo de lactose, utilizado na indução da expressão enzimática e eventualmente como fonte de carbono, e os subprodutos que são formados moderadamente, tendo maior formação de lactato em relação ao acetato.

4.6.3 Simulação dinâmica dos fluxos

Através do modelo dinâmico proposto é possível obter também informações dos fluxos metabólicos das reações intracelulares do modelo metabólico considerado. Dentre os fluxos de cerca de 2000 reações foi escolhida a taxa específica de crescimento e os fluxos das reações de formação do glicerol 3-fosfato e do piruvato para análise, descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Reações de formação do glicerol 3-fosfato e do piruvato e suas respectivas siglas.

| Sigla | Reação |
|-------|--|
| GLYK | $\text{ATP} + \text{Glyc} \rightarrow \text{ADP} + \text{Glyc3p} + \text{H}$ |
| PYK | $\text{ADP} + \text{H} + \text{PEP} \rightarrow \text{ATP} + \text{PYR}$ |

O perfil temporal da taxa específica de crescimento (Figura 4.13) está totalmente relacionado com a concentração de células (Figura 4.9a). Inicialmente a taxa permanece constante, diminuindo quando as células entram na fase exponencial de crescimento. No momento da indução da expressão enzimática, através da alimentação com lactose, há um aumento na taxa já que a lactose pode ser um substrato para a célula, voltando posteriormente a reduzir seu valor até um valor próximo à taxa de morte celular, pois não haverá mais crescimento celular.

Já o fluxo da reação de formação do glicerol 3-fosfato (Figura 4.14a) está relacionado com o consumo do substrato glicerol. Assim, tem-se um fluxo constante que começa a reduzir de forma semelhante à taxa específica de crescimento, porém, quando ocorre a indução, o fluxo aumenta significativamente devido à uma maior crescimento celular e à formação dos subprodutos acetato e lactato.

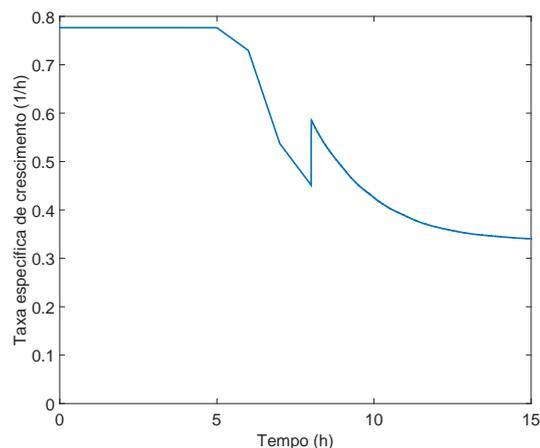


Figura 4.13: Perfil dinâmico da taxa específica de crescimento (μ).

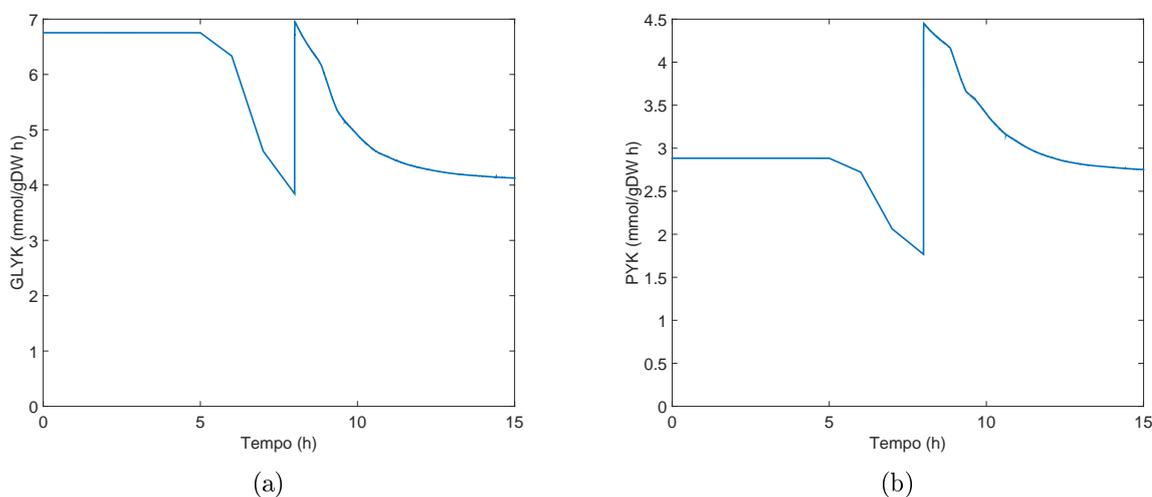


Figura 4.14: Perfil dinâmico dos fluxos da reação de formação do glicerol 3-fosfato (a) e da reação de formação do piruvato (b).

No caso do fluxo da reação de formação do piruvato (Figura 4.14b), importante reação da glicólise em que tem-se a geração de energia (ATP). Pode-se observar um aumento significativo desse fluxo no momento da indução da expressão enzimática, já que é necessária grande quantidade de ATP para formar a enzima como mostrado também no Capítulo 3.

4.6.4 Estudo de caso

Com o intuito de observar o efeito do ponto de alimentação de lactose, da vazão de alimentação de lactose e da vazão de ar que é injetado no biorreator nas principais variáveis de estado do processo de produção de L-asparaginase recombinante, algumas simulações foram realizadas.

Diferentes pontos de alimentação de lactose

O primeiro estudo foi feito considerando diferentes pontos de alimentação de lactose (2h, 4h, 6h, 8h e 10h) e verificando a mudança nas variáveis de interesse (concentração de lactose, oxigênio dissolvido, biomassa, glicerol, L-asparaginase, plasmídeo, acetato e lactato).

A lactose é consumida a partir dos pontos de alimentação como mostrado na Figura 4.15a e assim para ponto de alimentação em maiores tempos demoraria mais para que a lactose fosse totalmente consumida, já que a taxa máxima de consumo é a mesma. No caso da porcentagem de oxigênio dissolvido (Figura 4.15b), o comportamento não é afetado para pontos de alimentação no tempo 8h e 10h, em que o oxigênio dissolvido já está nulo, porém para pontos em menores tempos há a formação de picos no instante da alimentação devido à mudança na concentração de saturação de oxigênio, fazendo com que a porcentagem de oxigênio dissolvido aumentasse nesse ponto.

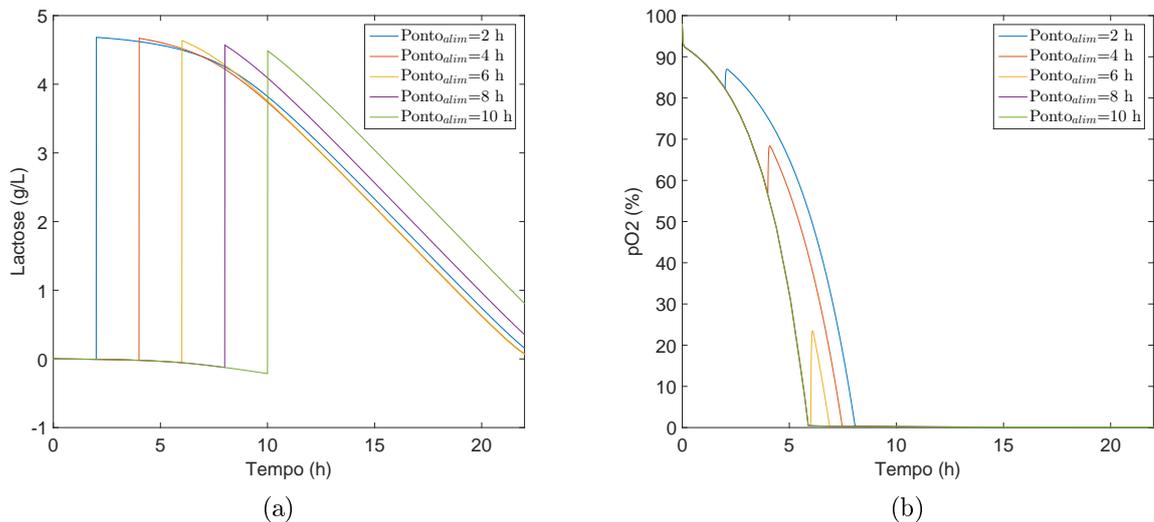


Figura 4.15: Perfil dinâmico da concentração de lactose (a) e da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose.

A partir da Figura 4.16a observa-se a concentração de biomassa que apresenta um perfil semelhante para todos os casos, entretanto nos pontos em que ocorre a alimentação de lactose há uma pequena diluição voltando a crescer a seguir. Nota-se

de forma mais acentuada esse efeito para o ponto de alimentação no tempo 10h, em que a fase de desaceleração do crescimento já iniciou, demorando mais para chegar à fase estacionária.

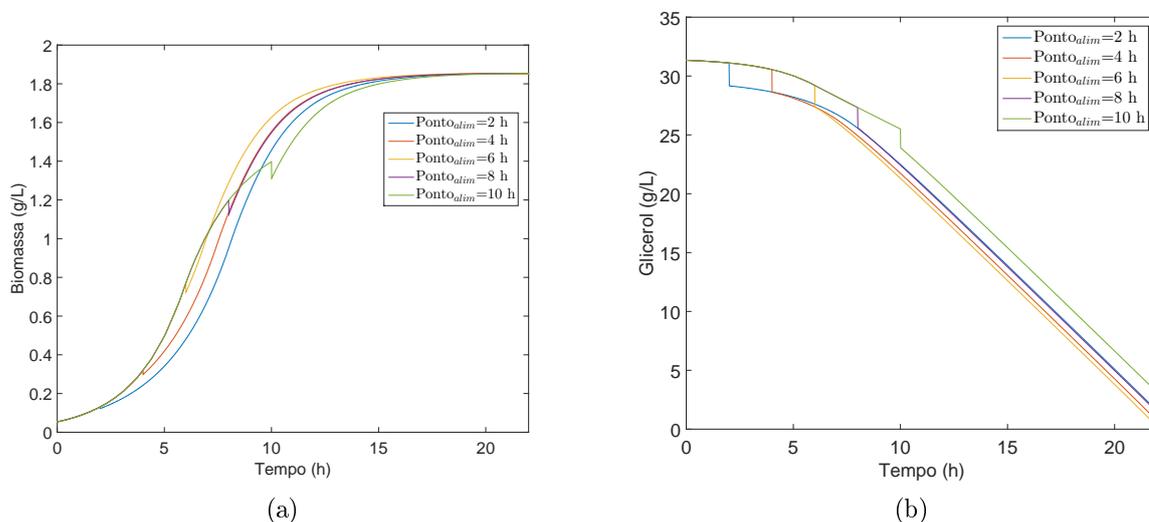


Figura 4.16: Perfil dinâmico da concentração de biomassa (a) e de glicerol (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose.

Para o perfil dinâmico do glicerol (Figura 4.16b), verifica-se apenas a diluição nos momentos em que ocorre a alimentação de lactose e posterior consumo do substrato como esperado. Na Figura 4.17a o gráfico para a concentração de L-asparaginase no tempo é mostrado. Como só haverá formação da enzima na presença de lactose, indutor da expressão enzimática, é de se esperar que haja formação da L-asparaginase a partir do instante em que ocorre a alimentação de lactose, como observado. Além disso, é possível perceber uma concentração maior final da enzima, quando a alimentação de lactose acontece nos tempos 2h, 4h e 6h, para o tempo da simulação.

Diversos trabalhos na literatura, utilizando o planejamento de experimentos, mostraram que o ponto em que se faz a indução, próximo ou na fase exponencial do crescimento, possui efeito significativo sobre a produção de proteínas recombinantes (CHUAN *et al.*, 2008; LARENTIS *et al.*, 2011, 2014; MANDERSON *et al.*, 2006; MARINI *et al.*, 2014; SUNITHA *et al.*, 2000). Sendo que dependendo do sistema recombinante distintos efeitos podem ser observados. Por exemplo, na expressão de uma fitase de *Bacillus sp.*, o melhor momento para a indução foi o início da fase exponencial de crescimento (SUNITHA *et al.*, 2000). Entretanto, para indução de uma proteína de leptospira em *E.coli* a melhor etapa foi no final da fase exponencial de crescimento LARENTIS *et al.* (2014).

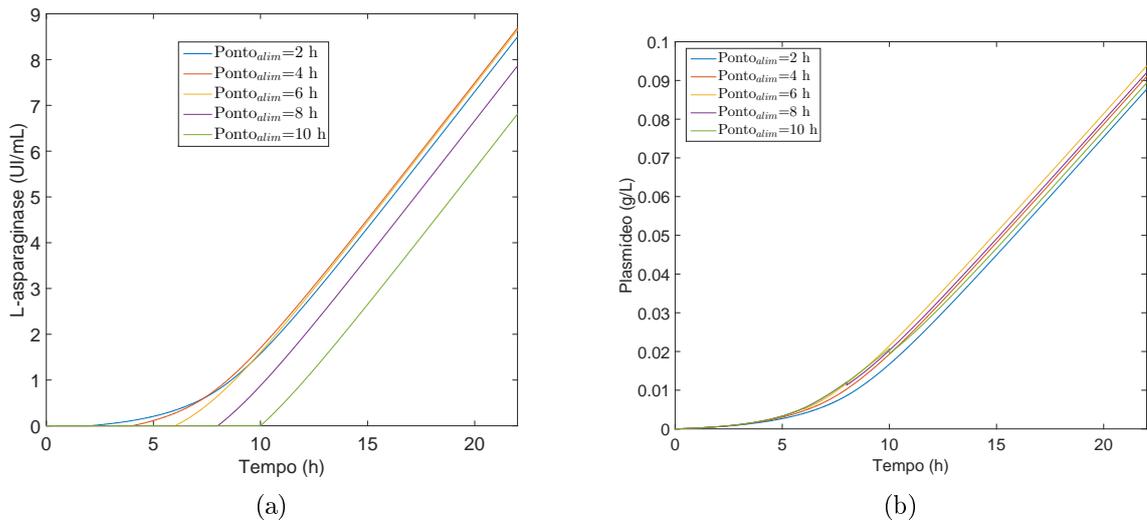


Figura 4.17: Perfil dinâmico da concentração de L-asparaginase (a) e de plasmídeo (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose.

LARENTIS *et al.* (2011), ao mostrar que o ponto em que fez a indução para a expressão de três proteínas de *Pseudomonas stutzeri* em *E.coli* apresentou efeito negativo para duas destas proteínas e positivo para a terceira, reforçou a ideia de que cada sistema recombinante deve ser analisado de forma particular. Dessa forma, EINSFELDT (2014) analisou o efeito do ponto da indução sobre a produção da L-asparaginase de *Z. mobilis* em *E.coli* mostrando efeito positivo, ou seja, pontos mais próximos do final da fase exponencial de crescimento levam ao aumento da expressão da proteína recombinante. Estando condizente ao observado nesse trabalho através da Figura 4.17a.

Já no caso do plasmídeo (Figura 4.17b), não houve uma influência significativa no seu comportamento ao alterar o ponto de alimentação de lactose, isso porque o modelo considera que haja sempre a formação do plasmídeo. O comportamento dinâmico do acetato e lactato, mostrado na Figura 4.18, apresentam perfis semelhantes ao da enzima. Isso ocorre devido à relação desses compostos com a formação da L-asparaginase, tanto para a geração de energia quanto para a regeneração de NAD.

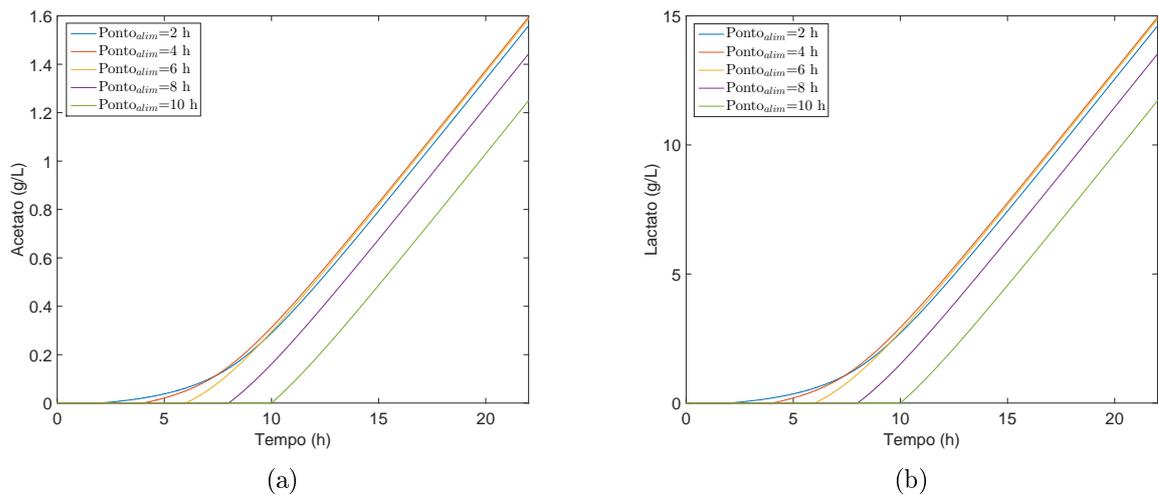


Figura 4.18: Perfil dinâmico da concentração de acetato (a) e lactato (b) para diferentes pontos de alimentação de lactose.

Assim, o ponto de alimentação de lactose influencia consideravelmente na resposta das variáveis do processo.

Variação da vazão de alimentação de lactose

Para essas simulações foi considerado a alimentação de lactose durante todo o processo e testadas diferentes vazões no sentido de observar a resposta das variáveis de interesse. Para uma concentração de lactose na corrente de alimentação de 75g/L, as vazões testadas foram entre 0-0,10 L/h.

Como esperado, nota-se à medida que se aumenta a vazão de lactose a concentração de lactose também aumenta no tempo final da simulação (Figura 4.19a). Quando não há alimentação de lactose (vazão nula), o sistema se comporta como no modo batelada, destoando dos demais perfis e sem a formação de L-asparaginase, acetato e lactato (Figuras 4.19, 4.20, 4.21 e 4.22).

O perfil para a porcentagem de oxigênio dissolvido (p_{O_2}), mostrado na Figura 4.19b, apresenta um maior consumo de oxigênio quando não há alimentação de lactose, devido à maior produção de células (Figura 4.20a) nesse período de tempo em relação aos perfis quando tem-se alimentação de lactose e conseqüente expressão da enzima. Com a variação na vazão de alimentação de lactose a influência na concentração de oxigênio dissolvido não foi muito significativa de uma vazão para outra.

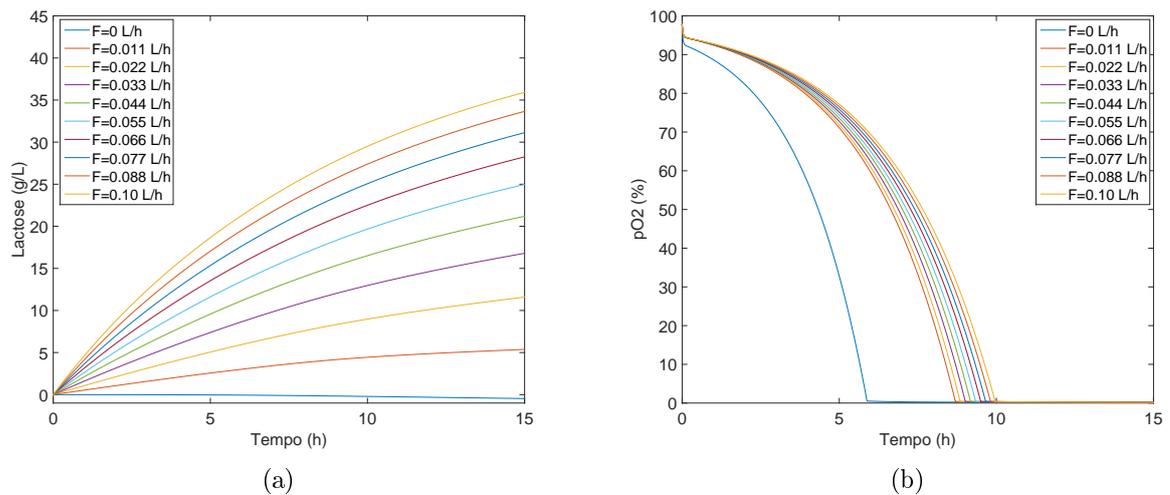


Figura 4.19: Perfil dinâmico da concentração de lactose (a) e porcentagem de oxigênio dissolvido (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose.

A biomassa (Figura 4.20a) apresenta comportamento semelhante para as distintas vazões estudadas, diferenciando quando a vazão é nula. Inicialmente, para essa situação, as células apresentam um menor fase *lag* e posteriormente se mantém num valor final menor quando comparado para os casos em que há presença de lactose. Isso se deve pois a lactose pode ser utilizada como fonte de carbono pela célula e considera-se a mesma taxa de morte celular (k_d), parâmetro estimado para o experimento em que havia formação de enzima, para o sistema em modo batelada.

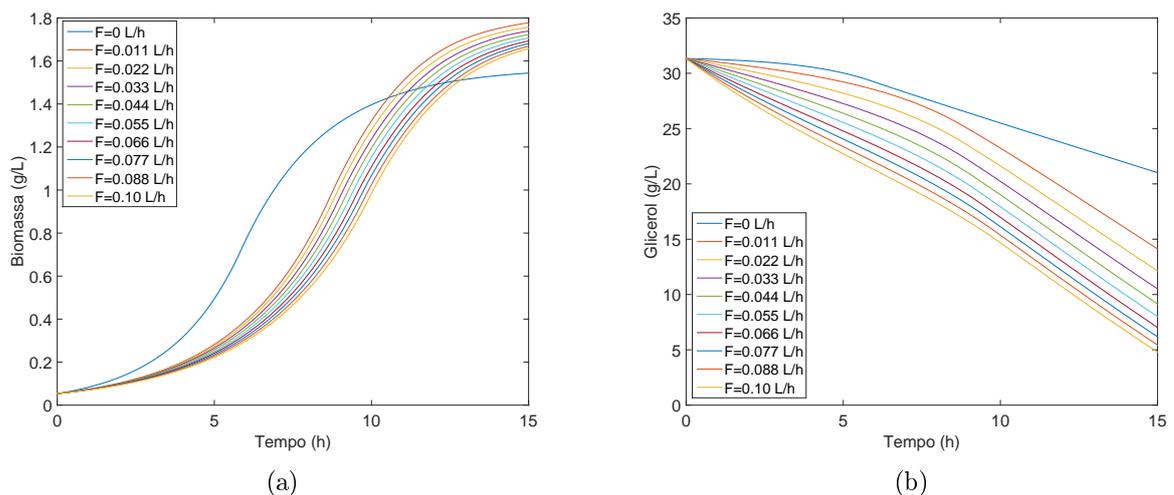


Figura 4.20: Perfil dinâmico da concentração de biomassa (a) e glicerol (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose.

No caso do glicerol (Figura 4.20b) nota-se um consumo maior conforme a vazão de alimentação de lactose aumenta, porém isso está relacionado à diluição que ocorre com o aumento do volume final do biorreator para maiores vazões. Além disso, ao

comparar com o caso em que há ou não presença de lactose, o consumo é maior quando a vazão de alimentação de lactose não é nula, já que tem-se a formação da enzima e dos subprodutos.

Com base na Figura 4.21b que apresenta o comportamento do plasmídeo para as diferentes vazões, verifica-se que na ausência de lactose tem-se uma formação maior de plasmídeo uma vez que não há a expressão da enzima que está correlacionada ao fluxo de plasmídeo. Para os casos com distintas vazões de lactose, não houve uma influência expressiva.

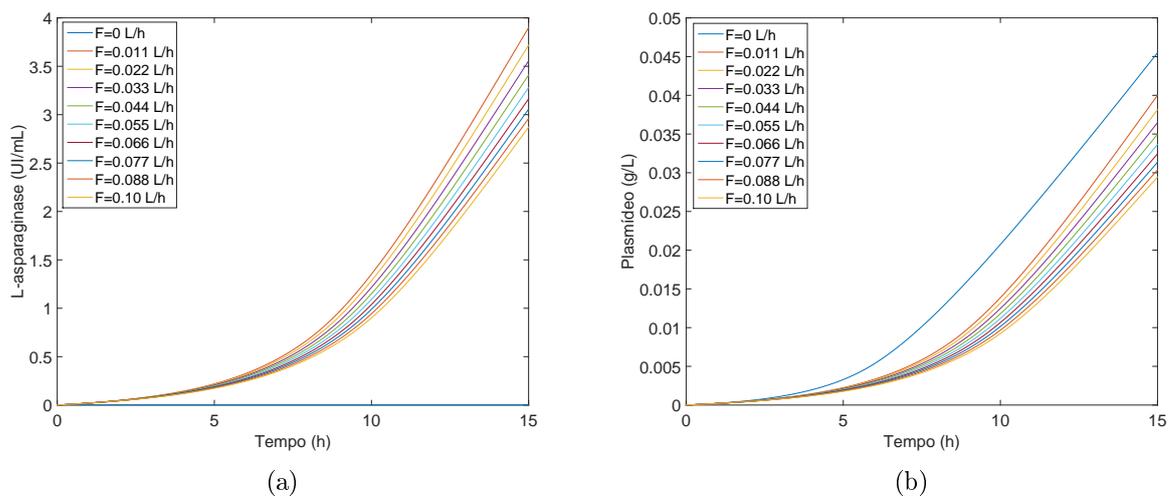


Figura 4.21: Perfil dinâmico da concentração de L-asparaginase (a) e plasmídeo (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose.

As Figuras 4.21a e 4.22 apresentam os perfis dinâmicos para a L-asparaginase, o acetato e lactato. Percebe-se que o comportamentos para esses componentes são bem semelhantes, isso porque a enzima só é formada com a presença de lactose, indutor da expressão enzimática, e devido à carga metabólica imposta à célula com a formação dos subprodutos, acetato e lactato, que são gerados. De uma forma geral, não há um impacto relevante nessas variáveis.

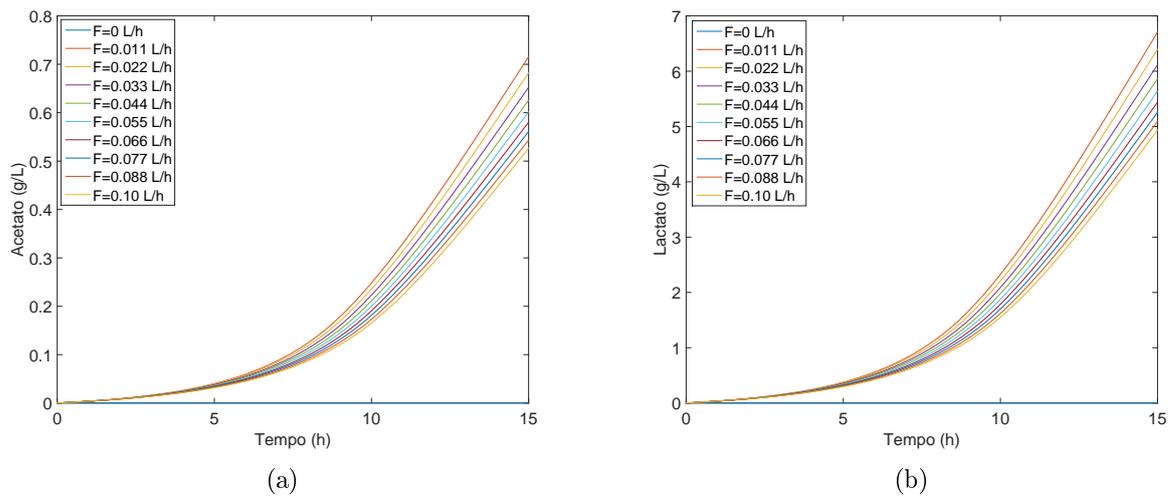


Figura 4.22: Perfil dinâmico da concentração de acetato (a) e lactato (b) para diferentes vazões de alimentação de lactose.

As simulações acima mostram que a presença ou não da lactose no sistema é que influencia as variáveis do processo e não necessariamente os distintos valores para a vazão de alimentação de lactose.

Variação da vazão de ar

Para esse estudo foi considerado diferentes vazões de ar para injeção no biorreator entre 10-100 L/h, com o intuito de observar o efeito nas principais variáveis do processo. Vale ressaltar que a condição experimental de EINSFELDT (2014), utilizada nesse trabalho na calibração do modelo, considera a vazão de ar para injeção de 90 L/h. Nas Figuras 4.23, 4.24 e 4.25 estão os comportamentos dinâmicos da lactose, oxigênio dissolvido, biomassa, glicerol, L-asparaginase e plasmídeo. Os gráficos para o acetato e lactato não foram expostos por terem o comportamento semelhante ao da L-asparaginase.

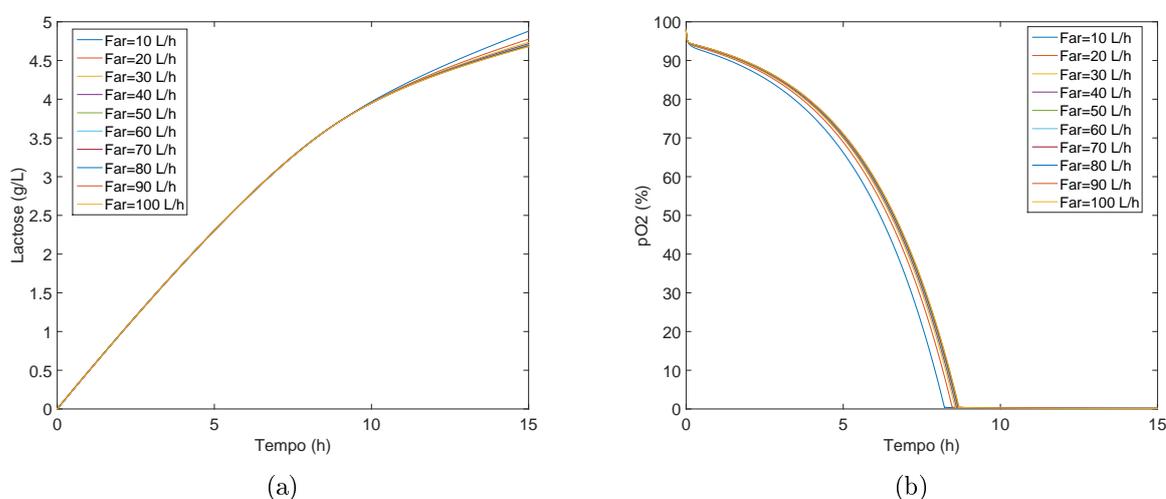


Figura 4.23: Perfil dinâmico da concentração de lactose (a) e porcentagem de oxigênio dissolvido (b) para diferentes vazões de ar.

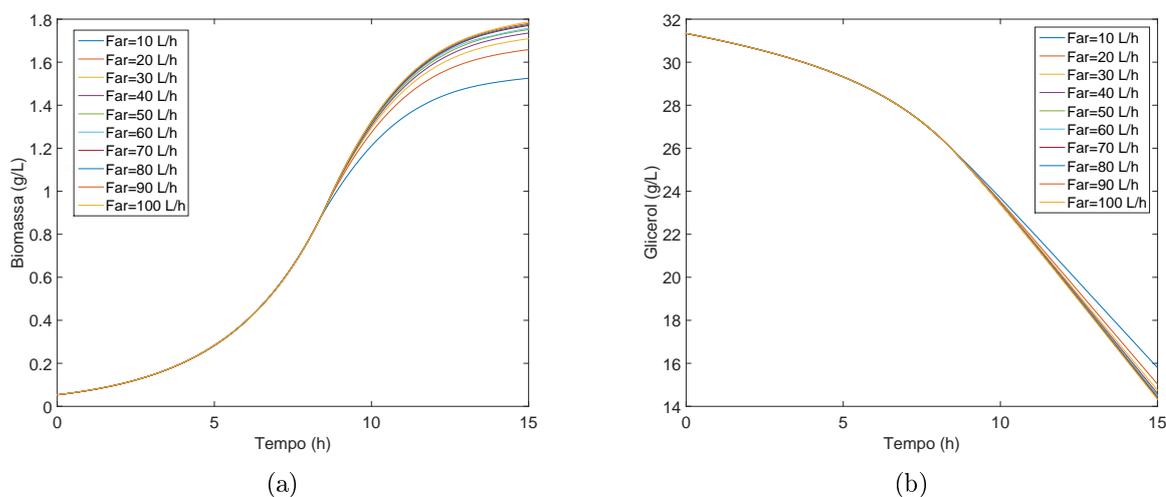


Figura 4.24: Perfil dinâmico da concentração de biomassa (a) e glicerol (b) para diferentes vazões de ar.

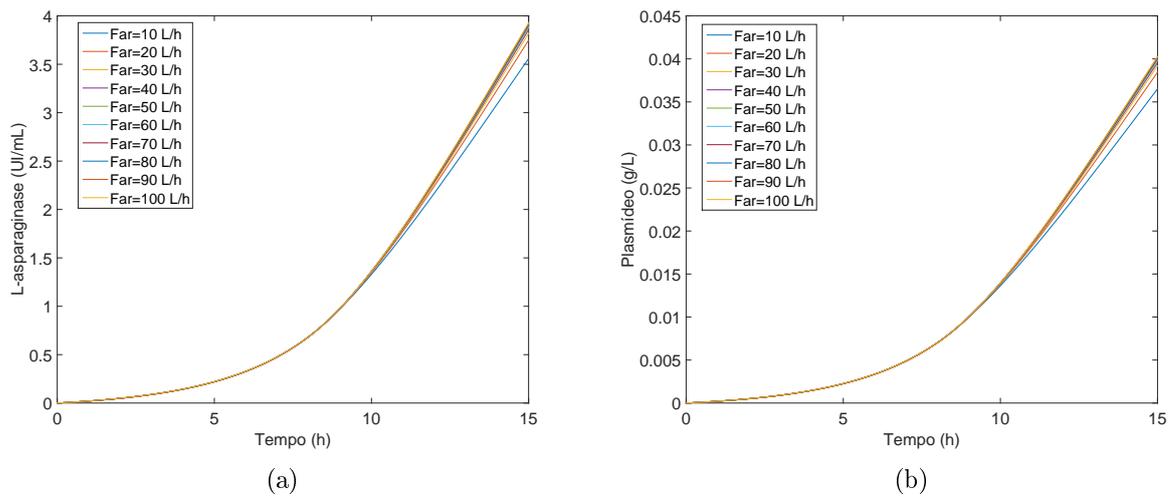


Figura 4.25: Perfil dinâmico da concentração de L-asparaginase (a) e plasmídeo (b) para diferentes vazões de ar.

Como pode ser observado em todos os gráficos, apenas para vazões baixas de ar desviam pouco em relação às outras vazões. Isso porque, mesmo aumentando a vazão de ar, como o coeficiente de transferência de massa de oxigênio permanece constante, não há alteração no consumo de oxigênio pela célula. Teria que mudar também a agitação e temperatura do biorreator, que não foram considerados no modelo proposto.

4.7 Considerações finais

Esse capítulo apresentou a formulação do modelo proposto, considerando o modelo metabólico construído anteriormente, por meio de três blocos, metabólico, dinâmico e cinético. Mostrando, no bloco metabólico, a inclusão da abordagem da análise do balanço de fluxos (FBA) e o porquê da utilização de uma função multi-objetivo, discutindo o melhor valor de ε a ser considerado no modelo a partir das soluções Pareto ótimas e do máximo valor experimental para o fluxo plasmidial. No bloco dinâmico mostrou-se as equações diferenciais para o balanço de massa e como os fluxos metabólicos foram inseridos nestas. Já no bloco cinético, as taxas de consumo de glicerol, oxigênio, lactose e de produção dos subprodutos utilizadas foram apresentadas baseando-se na cinética Michaelis-Menten. Além disso, foi feita a calibração do modelo, iniciando com a análise de sensibilidade para assim obter um conjunto inicial de parâmetros, que afetam significativamente o modelo, para a primeira etapa da estimação destes parâmetros, seguindo para a etapa final de estimação dos parâmetros restantes. Posteriormente, os resultados e discussão foram expostos, além do estudo de casos variando os pontos de alimentação de lactose, a vazão de alimentação de lactose e a vazão de ar de injeção no biorreator, mostrando as influências nas principais variáveis do processo.

Capítulo 5

Conclusão

O presente trabalho realizou, satisfatoriamente, a construção do modelo metabólico considerando as reações da formação da L-asparaginase, utilizando os precursores dos aminoácidos, e do plasmídeo, e a expressão enzimática através da lactose. As análises iniciais mostraram a grande necessidade de energia requerida para formar a proteína recombinante, sendo uma grande carga metabólica para a célula fazendo com que as diferentes vias metabólicas sejam ativadas.

Adicionalmente, foi formulado o modelo em três blocos, metabólico (utilizando o modelo construído anteriormente), dinâmico e cinético. Por meio da análise de sensibilidade, um conjunto inicial de parâmetros foi utilizado na estimação e posteriormente os outros também foram estimados. O ajuste do modelo aos dados experimentais de EINSFELDT (2014) foi razoável, porém entende-se a necessidade de mais experimentos para que a validação do modelo fosse possível.

De uma forma geral, o modelo dinâmico proposto, considerando na formulação a abordagem da análise do balanço de fluxos metabólicos, foi adequado para o processo de produção da L-asparaginase recombinante. Através dessa formulação é possível acompanhar as mudanças metabólicas nesse tipo de processo biotecnológico, trazendo grande contribuição para o projeto, otimização e controle do processo de produção de proteínas recombinantes.

E finalmente alguns estudos de caso foram feitos e foi possível notar que o ponto de alimentação de lactose e a vazão de alimentação de lactose, considerada durante todo o processo, têm grande influência nas principais variáveis do sistema.

Sugestões para futuros trabalhos

Algumas sugestões para futuros trabalhos são a reconstrução do modelo metabólico para a *E. coli* BL21 (DE3) que possui o gene que codifica a T7RNA polimerase sob controle do promotor lacUV5 e é bastante utilizada na expressão de proteínas; considerar a instabilidade plasmidial na modelagem matemática e que a indução da expressão enzimática ocorre através da ligação de quatro moléculas da alolactose (produto do metabolismo da lactose) na proteína LacI (tetrâmero); realização de experimentos em diferentes condições para produção da L-asparaginase recombinante de formar a validar o modelo proposto, e a otimização dinâmica do processo manipulando a vazão de alimentação de lactose tendo como objetivo a maximização da concentração da L-asparaginase.

Referências Bibliográficas

- ABUD, A. K. S., 2005, *Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por Zymomonas mobilis*. Tese de doutorado, COPPE.
- ABUD, A. K. D. S., ALVES, T. L. M., PINTO, J. C. C. D. S., 2004, *Processo de produção de asparaginase pela bactéria Zymomonas mobilis e uso do caldo fermentativo e/ou da enzima purificada no tratamento de doenças*. Patente, Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ (Rio de Janeiro,RJ), BR n. PI0404952-7.
- ALVES, T., 1993, *Estudo da produção de etanol por Zymomonas mobilis*. Tese de doutorado, COPPE/UFRJ.
- ANTONIEWICZ, M. R., 2013, “Dynamic metabolic flux analysis-tools for probing transient states of metabolic networks”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, n. 6, pp. 973–978.
- ARCHER, C. T., KIM, J. F., JEONG, H., et al., 2011, “The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*”, *BMC Genomics*, v. 12, n. 1, pp. 9.
- AZUMA, R. M., 2011, *Otimização multiobjetivo em problema de estoque e roteamento gerenciados pelo fornecedor*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- BAPTISTA, I. C., 2013, *Avaliação da atividade antileucêmica de L-Asparaginase recombinante de Zymomonas mobilis*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- BESTE, D. J., HOOPER, T., STEWART, G., et al., 2007, “GSMN-TB: a web-based genome-scale network model of *Mycobacterium tuberculosis* metabolism”, *Genome biology*, v. 8, n. 5, pp. R89.
- BOELE, J., OLIVIER, B. G., TEUSINK, B., 2012, “FAME, the Flux Analysis and Modeling Environment”, *BMC Systems Biology*, v. 6, n. 1, pp. 8.

- CALAZANS, G. M. T., LIMA, R. C., DE FRANÇA, F. P., et al., 2000, “Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 27, n. 4, pp. 245–247.
- CAZETTA, M. L., CELLIGOI, M. A. P. C., BUZATO, J. B., et al., 2007, “Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production”, *Bioresource Technology*, v. 98, n. 15, pp. 2824–2828.
- CHANKONG, V., HAIMES, Y., 1983, *Multiobjective decision making theory and methodology*. Elsevier Science, New York.
- CHUAN, Y. P., LUA, L. H. L., MIDDELBERG, A. P. J., 2008, “High-level expression of soluble viral structural protein in *Escherichia coli*”, *Journal of Biotechnology*, v. 134, n. 1-2, pp. 64–71.
- CRICK, F., 1958, “On protein synthesis”, *Symposia of the Society for Experimental Biology*, v. 12, pp. 138–163.
- CUNNINGHAM, D., KOEPEL, R., ATAAI, M., et al., 2009, “Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint”, *Microbial Cell Factories*, v. 8, pp. 27.
- CVIJOVIC, M., OLIVARES-HERNANDEZ, R., AGREN, R., et al., 2010, “BioMet Toolbox: Genome-wide analysis of metabolism”, *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. SUPPL. 2, pp. 144–149.
- DA SAÚDE, M., 2013. “Saúde garante medicamento contra leucemia infantil”. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anteriores-agencia-saude/4480-saude-garante-medicamento-contraleucemia-infantil>>.
- DA SAÚDE, M., 2014. “Ministério da Saúde apresenta para a indústria lista de produtos prioritários”. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/16106-ministerio-da-saude-apresenta-para-a-industria-lista-de-produtos-pri>>.
- DA SAÚDE, M., 2015. “Medicamentos biológicos lideram lista de novos projetos de PDP”. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sctie/noticias-sctie/18652-medicamentos-biologicos-lideram-lista-de-novos-projetos-de-pdp>>.

- DI MAGGIO, J., DIAZ RICCI, J. C., DIAZ, M. S., 2010, “Global sensitivity analysis in dynamic metabolic networks”, *Computers and Chemical Engineering*, v. 34, n. 5, pp. 770–781.
- EDWARDS, J. S., PALSSON, B. Ø., 2000, “The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 10, pp. 5528–5533.
- EHRGOTT, M., 2006, “A discussion of scalarization techniques for multiple objective integer programming”, *Annals of Operations Research*, v. 147, n. 1, pp. 343–360.
- EINSFELDT, K., SEVERO JÚNIOR, J., CORRÊA ARGONDIZZO, A., et al., 2011, “Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability”, *Vaccine*, v. 29, n. 41, pp. 7136–7143.
- EINSFELDT, K., 2014, *Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de Zymomonas mobilis para aplicação como biofármaco*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- FEIST, A. M., HENRY, C. S., REED, J. L., et al., 2007, “A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information.” *Molecular systems biology*, v. 3, n. 121, pp. 121.
- FEIST, A. M., HERRGARD, M. J., THIELE, I., et al., 2009, “Reconstruction of biochemical networks in microbial organisms”, *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 2, pp. 129–143.
- FENG, X., XU, Y., CHEN, Y., et al., 2012, “MicrobesFlux: a web platform for drafting metabolic models from the KEGG database”, *BMC Systems Biology*, v. 6, n. 1, pp. 94.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., et al., 2013. “GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer”. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>.
- FERRAZ, H., 1996, *Produção de sorbitol e ácido glicônico utilizando células permeabilizadas e imobilizadas de Zymomonas mobilis e separação simultânea dos produtos por eletrodialise*. Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ.

- FONSECA, E., 2003, *Modelagem da produção de sorbitol e ácido glicônico por células permeabilizadas e imobilizadas de Zymomonas mobilis em reator tipo cesta agitada*. Tese de doutorado, COPPE/UFRJ.
- FORSGREN, A., GILL, P., WRIGHT, M., 2002, *Interior methods for nonlinear optimization*, v. 44. SIAM Review. ISBN: 0036144502414.
- FRIEHS, K., 2004, “Plasmid Copy Number and Plasmid Stability”, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 86, pp. 47–82.
- GEVORGYAN, A., BUSHELL, M. E., AVIGNONE-ROSSA, C., et al., 2011, “SurreyFBA: A command line tool and graphics user interface for constraint-based modeling of genome-scale metabolic reaction networks”, *Bioinformatics*, v. 27, n. 3, pp. 433–434.
- GIANCHANDANI, E. P., CHAVALI, A. K., PAPIN, J. A., 2010, “The application of flux balance analysis in systems biology”, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 2, n. 3, pp. 372–382.
- GOMEZ, J. A., HÖFFNER, K., BARTON, P. I., 2014, “DFBALab: a fast and reliable MATLAB code for dynamic flux balance analysis.” *BMC bioinformatics*, v. 15, n. 1, pp. 409.
- GRAFAHREND-BELAU, E., KLUKAS, C., JUNKER, B. H., et al., 2009, “FBA-SimVis: Interactive visualization of constraint-based metabolic models”, *Bioinformatics*, v. 25, n. 20, pp. 2755–2757.
- GREEN, D., PERRY, R., 2007, *Perry’s Chemical Engineers’ Handbook, Eighth Edition*. McGraw Hill professional. McGraw-Hill Education. ISBN: 9780071593137.
- GUPTA, R., SHARMA, P., VYAS, V., 1995, “Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*”, *Journal of Biotechnology*, v. 41, pp. 29–37.
- GUROBI OPTIMIZATION, INC., 2015. “Gurobi Optimizer”. Disponível em: <<http://www.gurobi.com/>>.
- HARWOOD, S. M., HÖFFNER, K., BARTON, P. I., 2015, “Efficient solution of ordinary differential equations with a parametric lexicographic linear program embedded”, *Numerische Mathematik*.
- HENRY, C. S., DEJONGH, M., BEST, A. A., et al., 2010, “High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models.” *Nature biotechnology*, v. 28, n. 9, pp. 977–982.

- HJERSTED, J. L., HENSON, M. A., 2006, “Optimization of fed-batch *Saccharomyces cerevisiae* fermentation using dynamic flux balance models.” *Biotechnology progress*, v. 22, pp. 1239–1248.
- HÖFFNER, K., HARWOOD, S. M., BARTON, P. I., 2013, “A reliable simulator for dynamic flux balance analysis”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, n. 3, pp. 792–802.
- HOLZHÜTTER, H. G., 2004, “The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks”, *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. May, pp. 2905–2922.
- HOPPE, A., HOFFMANN, S., GERASCH, A., et al., 2011, “FASIMU: flexible software for flux-balance computation series in large metabolic networks.” *BMC bioinformatics*, v. 12, n. 1, pp. 28.
- JALES, S. T. L., SOARES-SOBRINHO, J. L., NUNES, L. C. C., et al., 2007, “Formulation technology of a probiotic (*Zymomonas mobilis*) in gelatinous capsules”, *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 4, pp. 553–557.
- JAMSHIDI, N., PALSSON, B., 2010, “Mass action stoichiometric simulation models: Incorporating kinetics and regulation into stoichiometric models”, *Biophysical Journal*, v. 98, n. 2, pp. 175–185.
- JUNG, T. S., YEO, H. C., REDDY, S. G., et al., 2009, “WEbcoli: An interactive and asynchronous web application for in silico design and analysis of genome-scale *E.coli* model”, *Bioinformatics*, v. 25, n. 21, pp. 2850–2852.
- KARMAKAR, N., 1984, “A new polynomial-time algorithm for linear programming”, *Combinatorica*, v. 4, pp. 373–395.
- KAUFFMAN, K. J., PRAKASH, P., EDWARDS, J. S., 2003, “Advances in flux balance analysis”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n. 5, pp. 491–496. ISSN: 09581669.
- KENNEDY, J., EBERHART, R., 1995, “Particle swarm optimization”, *Neural Networks, 1995. Proceedings., IEEE International Conference on*, v. 4, pp. 1942–1948.
- KIERZEK, A. M., ZAIM, J., ZIELENKIEWICZ, P., 2001, “The effect of transcription and translation initiation frequencies on the stochastic fluctuations in prokaryotic gene expression”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 11, pp. 8165–8172.

- KUMAR, K., KAUR, J., WALIA, S., et al., 2013, “L-asparaginase: an effective agent in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)”, *Leukemia & lymphoma*.
- LAKSHMANAN, M., KOH, G., CHUNG, B. K. S., et al., 2012, “Software applications for flux balance analysis”, *Briefings in Bioinformatics*, v. 15, n. 1, pp. 108–122.
- LARENTIS, A. L., ARGONDIZZO, A. P. C., ESTEVES, G. D. S., et al., 2011, “Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage”, *Protein Expression and Purification*, v. 78, n. 1, pp. 38–47.
- LARENTIS, A. L., NICOLAU, J. F. M. Q., ESTEVES, G. D. S., et al., 2014, “Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor.” *BMC research notes*, v. 7, n. 1, pp. 671.
- LATENDRESSE, M., KRUMMENACKER, M., TRUPP, M., et al., 2012, “Construction and completion of flux balance models from pathway databases”, *Bioinformatics*, v. 28, n. 3, pp. 388–396.
- LE FÈVRE, F., SMIDTAS, S., COMBE, C., et al., 2009, “CycSim - An online tool for exploring and experimenting with genome-scale metabolic models”, *Bioinformatics*, v. 25, n. 15, pp. 1987–1988.
- LEE, D. Y., YUN, H., PARK, S., et al., 2003, “MetaFluxNet: The management of metabolic reaction information and quantitative metabolic flux analysis”, *Bioinformatics*, v. 19, n. 16, pp. 2144–2146.
- LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., 2005, *Principles of biochemistry*. W. H. Freeman. ISBN: 9780716743392.
- LIAO, Y. C., TSAI, M. H., CHEN, F. C., et al., 2012, “GEMSiRV: A software platform for GENome-scale metabolic model simulation, reconstruction and visualization”, *Bioinformatics*, v. 28, n. 13, pp. 1752–1758.
- LONGHI, L. G. S., LUVIZETTO, D. J., FERREIRA, L. S., et al., 2004, “A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, pp. 35–40.

- MAHADEVAN, R., EDWARDS, J. S., DOYLE, F. J., 2002, “Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*.” *Biophysical journal*, v. 83, n. 3, pp. 1331–1340.
- MALY, T., PETZOLD, L. R., 1996, “Numerical methods and software for sensitivity analysis of differential-algebraic systems”, *Applied Numerical Mathematics*, v. 20, pp. 57–59.
- MANDERSON, D., DEMPSTER, R., CHISTI, Y., 2006, “A recombinant vaccine against hydatidosis: Production of the antigen in *Escherichia coli*”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 3, pp. 173–182.
- MARINI, G., LUCHESE, M. D., ARGONDIZZO, A. P. C., et al., 2014, “Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process.” *BMC biotechnology*, v. 14, pp. 1.
- MASHBURN, L. T., WRISTON, J. C., 1964, “Tumor inhibitory effect of L-Asparaginase from *Escherichia coli*.” *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 105, pp. 450–452.
- MATTANOVICH, D., BRANDUARDI, P., DATO, L., et al., 2011, “Recombinant protein production in yeasts”. In: *Recombinant Gene Expression*, v. 824, *Methods in Molecular Biology*, cap. 17, pp. 329–358, Humana Press, November.
- MEADOWS, A. L., KARNIK, R., LAM, H., et al., 2010, “Application of dynamic flux balance analysis to an industrial *Escherichia coli* fermentation”, *Metabolic Engineering*, v. 12, pp. 150–160.
- MICHAELIS, L., MENTEN, M. L., 1913, “The kinetics of invertase action”, *Biochem Z*, v. 49, n. February, pp. 333–369.
- MONK, J., 2016. “Supplementary Table 1: Available predictive genome-scale metabolic network reconstructions”. Disponível em: <<http://systemsbiology.ucsd.edu/InSilicoOrganisms/OtherOrganisms>>.
- NARTA, U. K., KANWAR, S. S., AZMI, W., 2007, “Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 61, n. 3, pp. 208–221.
- NETO, D. C., BATISTA, J., BORSATO, D., 2006, “L - asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation : optimization

- of culture conditions using factorial design”, *Acta Sci. Technol*, v. 28, pp. 151–153.
- ORTH, J. D., THIELE, I., PALSSON, B. Ø., 2010, “What is flux balance analysis?” *Nature biotechnology*, v. 28, n. 3, pp. 245–248.
- ORTH, J. D., CONRAD, T. M., NA, J., et al., 2011, “A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism–2011.” *Molecular systems biology*, v. 7, n. 535, pp. 535.
- OVERTON, T. W., 2014, “Recombinant protein production in bacterial hosts”, *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 5, pp. 590–601.
- PALSSON, B. Ø., LIGHTFOOT, E. N., 1984, “Mathematical modelling of dynamics and control in metabolic networks . I . On Michaelis-Menten kinetics”, *J. theor. Biol*, v. 111, pp. 273–302.
- PINHEIRO, I. O., 2001, *Fermentações de Zymomonas mobilis em meio mínimo usando asparagina como fonte de nitrogênio*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- POPOV, M., PETROV, S., NACHEVA, G., et al., 2011, “Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli*”, *BMC Biotechnology*, v. 11, pp. 1–12.
- RAMAN, K., CHANDRA, N., 2009, “Flux balance analysis of biological systems: Applications and challenges”, *Briefings in Bioinformatics*, v. 10, n. 4, pp. 435–449.
- REDAELLI, A., LASKIN, B. L., STEPHENS, J. M., et al., 2005, “A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL)”, *European Journal of Cancer Care*, v. 14, n. 1, pp. 53–62.
- REED, J. L., VO, T. D., SCHILLING, C. H., et al., 2003, “An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR)”, *Genome biology*, v. 4, n. 9, pp. R54.
- ROCHA, I., MAIA, P., EVANGELISTA, P., et al., 2010, “OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering.” *BMC systems biology*, v. 4, n. 1, pp. 45.
- ROSANO, G. L., CECCARELLI, E. A., 2014, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges”, *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. April, pp. 1–17.

- SÁNCHEZ, B. J., PÉREZ-CORREA, J. R., AGOSIN, E., 2014, “Construction of robust dynamic genome-scale metabolic model structures of *Saccharomyces cerevisiae* through iterative re-parameterization”, *Metabolic Engineering*, v. 25, pp. 159–173.
- SCHELLENBERGER, J., THIELE, I., ORTH, J. D., et al., 2012, “Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0”, *Nat Protoc.*, v. 6, n. 9, pp. 1290–1307.
- SCHUETZ, R., ZAMBONI, N., ZAMPIERI, M., et al., 2012, “Multidimensional optimality of microbial metabolism”, *Science*, v. 336, n. May, pp. 601–604.
- SEVERO JÚNIOR, J., 2008, *Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiónico com separação simultânea por eletrodialise*. Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ.
- SHI, Y., EBERHART, R., 1998, “A modified particle swarm optimizer”, *Evolutionary Computation Proceedings, 1998. IEEE World Congress on Computational Intelligence., The 1998 IEEE International Conference on*, pp. 69–73.
- SROKA, J., BIENIASZ-KRZYWIEC, L., GWÓZDŹ, S., et al., 2011, “Acorn: a grid computing system for constraint based modeling and visualization of the genome scale metabolic reaction networks via a web interface.” *BMC bioinformatics*, v. 12, pp. 196.
- STEFFEN, K., J., S.-R., ERNST D., G., 2007, “Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer”, *Journal of Biotechnology*, v. 129, n. 2, pp. 329–351.
- SUNITHA, K., KIM, Y. O., LEE, J. K., et al., 2000, “Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, n. 1, pp. 51–56.
- SWINGS, J., DE LEY, J., 1977, “The biology of *Zymomonas*.” *Bacteriological reviews*, v. 41, n. 1, pp. 1–46.
- URBANCZIK, R., 2006, “SNA—a toolbox for the stoichiometric analysis of metabolic networks”, *BMC Bioinformatics*, v. 7, pp. 129.
- VAN IMPE, J. F., VERCAMMEN, D., VAN DERLINDEN, E., 2013, “Toward a next generation of predictive models: A systems biology primer”, *Food Control*, v. 29, n. 2, pp. 336–342.

- VARGAS, F. A., PIZARRO, F., PÉREZ-CORREA, J. R., et al., 2011, “Expanding a dynamic flux balance model of yeast fermentation to genome-scale.” *BMC systems biology*, v. 5, n. 1, pp. 75.
- VOET, D., VOET, J., PRATT, C., 2014, *Fundamentos de Bioquímica - 4.ed.: A Vida em Nível Molecular*. Artmed Editora. ISBN: 9788582710661.
- WILBERG, K., 1996, *Estudo da produção de sorbitol e ácido glicônico utilizando células permeabilizadas de Zymomonas mobilis*. Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ.
- WILLIAMS, J. A., LUKE, J., LANGTRY, S., et al., 2009, “Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 6, pp. 1129–1143.
- WRIGHT, J., WAGNER, A., 2008, “The systems biology research tool: evolvable open-source software”, *BMC systems biology*, v. 2, pp. 55.
- XU, J., LI, W., WU, J., et al., 2006, “Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, pp. 780–788.
- YANG, C., SIMON, D., 2005, “A new particle swarm optimization technique”, *18th International Conference on Systems Engineering (ICSEng'05)*, v. 1, pp. 164–169.

Apêndice A

Conceitos Fundamentais de Bioquímica

A.1 Dogma central da Biologia molecular

De acordo com o dogma central da biologia molecular (CRICK, 1958) é possível entender como o fluxo de informação genética acontece nos sistemas biológicos. De forma simplificada, ocorre a replicação do DNA e sua transcrição para formar o RNA e, a partir deste, tem-se a tradução gerando a sequência de aminoácidos, formando uma proteína (Figura A.1).

A replicação do DNA ocorre ao sintetizar fitas-filhas utilizando como molde a fita-parental de DNA e nucleotídeos livres que pareiam com as bases desta. Da mesma forma, o RNA é sintetizado utilizando nucleotídeos livres que pareiam com as bases complementares em uma das fitas de DNA. O mRNA corresponde ao gene que codifica uma proteína e este é traduzido através do ribossomo e do RNA transportador que catalisam a formação da cadeia polipeptídica.

A.2 Ácidos nucleicos

Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. As bases são derivadas de dois compostos, purina e pirimidina. O DNA e o RNA possuem em sua estrutura duas bases purínicas, adenina (A) e guanina (G), e duas bases pirimidínicas, podendo ser a citosina (C), uracil (U) e timina (T) (VOET *et al.*, 2014). Sendo que tanto o DNA quanto o RNA apresentam citosina, porém a uracil está presente apenas no RNA e a timina no DNA.

Os ribonucleotídeos apresentam a pentose ribose, e estes são encontrados no RNA (ácido ribonucleico), já os desoxinucleotídeos apresentam a pentose 2'-desoxirribose e fazem parte do DNA (ácido desoxirribonucleico) (LEHNINGER *et al.*, 2005). O

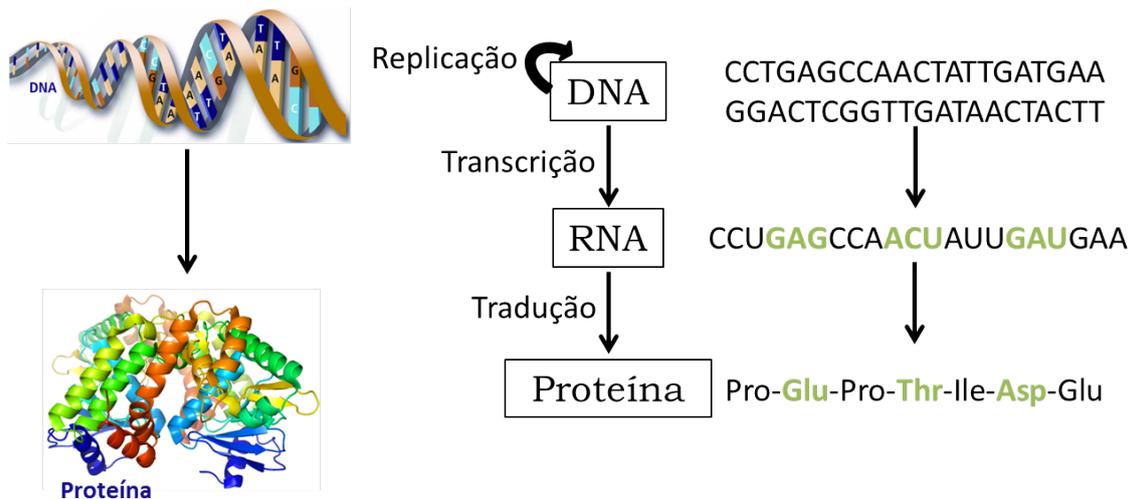


Figura A.1: Dogma central da biologia molecular.

DNA possui algumas características principais, como duas cadeias polinucleotídicas formando uma dupla hélice e cada base nitrogenada está ligada a uma base da fita oposta (há o pareamento das bases complementares). Já o RNA é uma fita simples e se difere do DNA pela substituição da timina pela uracil e pela presença de grupos hidroxila no carbono 2'.

A replicação do DNA ocorre através de enzimas chamadas de DNA polimerases. Essas enzimas utilizam a fita simples do DNA como molde para catalisar a síntese da fita complementar utilizando desoxinucleosídeos trifosfatos (dNTPs) adequados (Figura A.2). A reação libera pirofosfato (PP_i) que pode ser hidrolisado posteriormente.

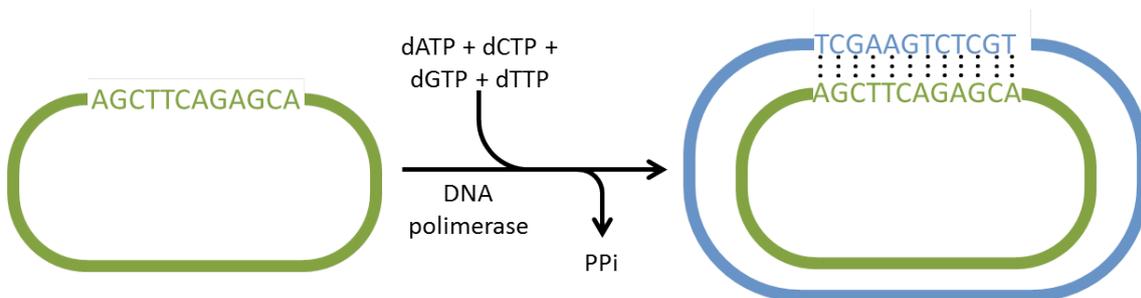
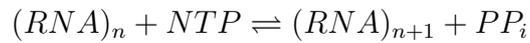


Figura A.2: Replicação do DNA. (Adaptado de VOET *et al.* (2014))

Já a formação do RNA ocorre através da transcrição pela RNA polimerase que utiliza a fita simples de DNA como molde. A enzima catalisa a síntese de RNA sendo necessário para a reação os ribonucleosídeos trifosfatos (NTPs) e tem-se também a liberação de pirofosfato (PP_i):



A.3 Proteínas

Para gerar a sequência de aminoácidos e sintetizar proteínas é necessário traduzir o código genético. A informação genética está contida no RNA mensageiro (mRNA) gerado a partir da transcrição do gene do DNA.

Se ligam ao mRNA moléculas de RNA transportador (tRNA), cada uma carregando um aminoácido correspondente. Esse aminoácido está relacionado com o anticódon (sequência de trinucleotídeos) presente na sequência do tRNA e complementar ao códon do mRNA.

Assim, durante a tradução, a cadeia polipeptídica é formada de acordo com a ordem na qual os anticódons do tRNA se ligam aos códons do mRNA no ribossomo e com a ligação de cada aminoácido que está presente em cada tRNA (Figura A.3).

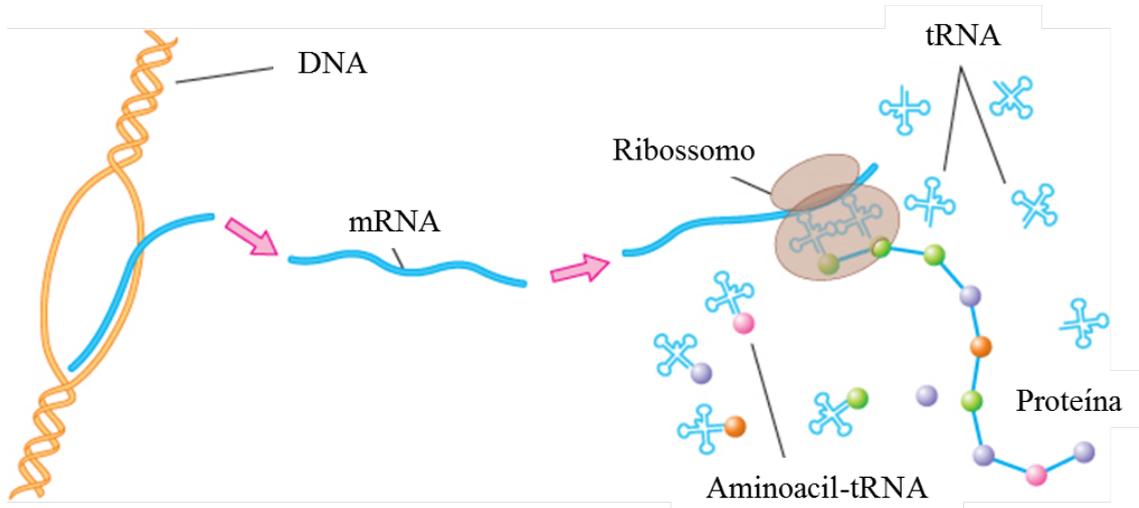


Figura A.3: Esquema geral da síntese de proteínas.

Apêndice B

Reação de formação do plasmídeo

Através da sequência do plasmídeo pET-28b(+)(http://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2566/), mostrado na Figura B.1, que apresenta 5368 pares de base, e da sequência do gene da L-asparaginase (Figura B.2), foi construída a reação para a formação de uma fita do plasmídeo com o gene inserido ao obter a quantidade de cada base nitrogenada presente nas sequências descritas.

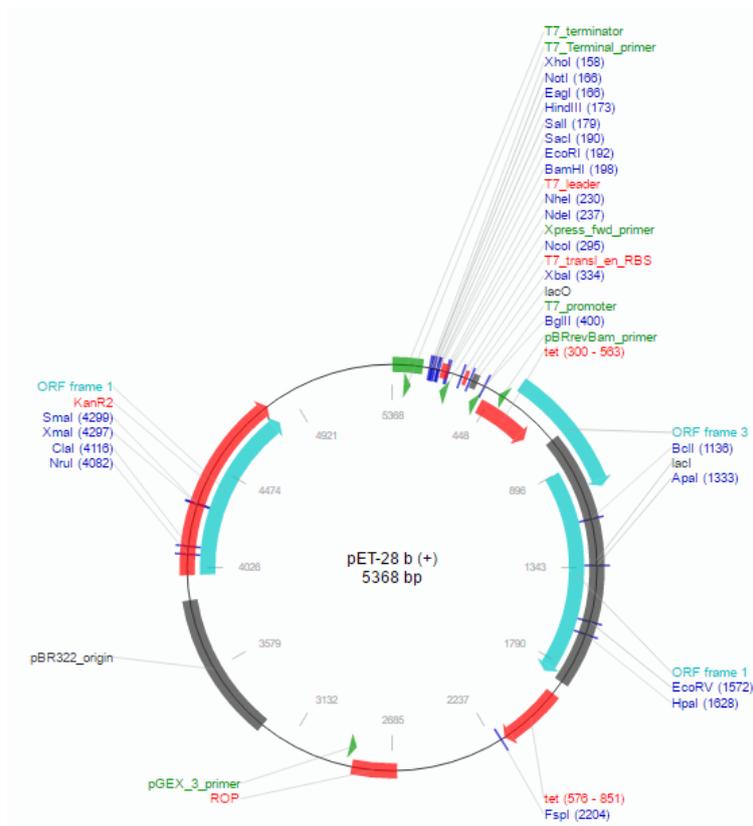


Figura B.1: Mapa circular do plasmídeo pET-28b(+)

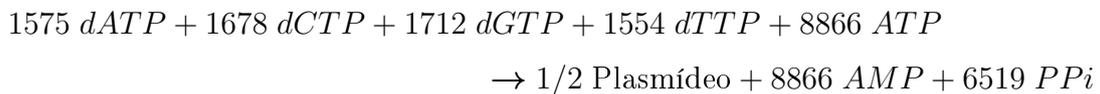
```

1 atgatgattt ttaaaatccc tgtaaggcc tttctgctg cggccttggc aatatgcatg
61 atgatggggg ctactccggc gatatctatg aataatcagg ttcattcaat tcagacgtta
121 ccgcgcattt tagttctggc aacgggcggc acgatttccg gcaagaaaaa tggaatgtct
181 gaaatcggct ataatgcagg cggcgttact ggaaaacagc tcgttgaaga tataaccggaa
241 ttagctaaac tcgctgaaat caatgtcgaa caaattgcc aatcggctc gcaagatag
301 aatgatgcca tatggctgag cttggccaag cgcaccaag acgccgtgc ccataacgaa
361 gcgatggta ttgtgattac ccatggcacc gataccatgg aagaaaccgc cttttcctt
421 gatacgggta ttcgcaccga caagccgatt attctgacag gcgccatgag ccctagcact
481 gccattgggt cagatgggtc cgccaattta tatgaggcga ttgaagtcgc ggccaccccc
541 aaggccaaag atcatggcgt catgatgctc atgaatgaca ctattcatgc agccagatgg
601 gcaagcaaaa cccacacaac cggcgtcgaa acctttcagt ccatcaatgc aggacctatc
661 ggttatgtcg atccggcttc ggtgcggttt attgagccga aaaaacagcc tgtccaagc
721 tatggccttc cgacgactgc gctttgctt gcggtcgaaa tcctttacgc ccatagcggg
781 atgggggctt caattatcaa tgatctcacc aaaacgggcg tgaaaggcat tattcttgcc
841 ggtgttggtg acgggaatag ttcaaaagaa gcgatggctg ccctcaatct tgccgtcaaa
901 caaggcgtga ttgtgtgag ttcaccaga accggatcag gctttgtgaa tcgcaatgct
961 gaggtcaatg atgacaaaaa cgactttgtt gtctcttatg atctttcgcc ccagaaagcc
1021 cgcactcttc ttcagatttt aatagccaat ggcaaaaaca aactttctga tatccaatct
1081 gcatttgaag ctggttttta a

```

Figura B.2: Sequência do gene da enzima L-asparaginase (ATCC 31821) proveniente de *Zymomonas mobilis* CP4

Assim, a seguinte reação pode ser obtida considerando a necessidade de 1,36 mol de ATP por mol de dNTP por polimerização CUNNINGHAM *et al.* (2009):



Vale ressaltar que a reação acima considera a formação de apenas uma fita do plasmídeo.

Apêndice C

Reação de formação da L-asparaginase

Tendo a sequência de aminoácidos para a L-asparaginase obtida após a tradução (Figura C.1), optou-se pelos precursores dos aminoácidos para compor a reação de formação da enzima. As abreviações dos aminoácidos estão apresentadas na Tabela C.1.

```
1 mmifkipvka ssaaalaicm mmgatpaim nnqvhsiqtl prilvlatgg tsgkknngms
61 eigynaggvt gkqlvedipe laklaeinve qianigsqdm ndaiwrlak riqdavahne
121 adgivithgt dtmeetaffl dtvirtkpi iltgamrpst aigadgpanl yeaievaatp
181 kakdhgvmiv mndtihaarw askthttave tfqsinagpi gyvdpasvrf iepkkqpvs
241 yglpttaplp aveilyahsg mgasiindli ktgvkgiila gvgdgnsske amaalnlavk
301 qgvivvrssr tsgsfvnrnv evnddkndfv vsydlspqka rillqilian gknklsdiqs
361 afeagf
```

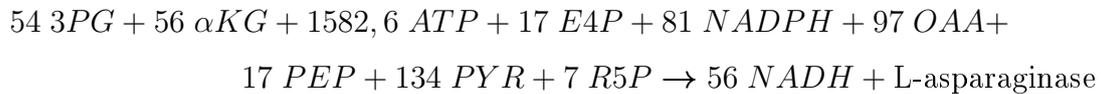
Figura C.1: Sequência de aminoácidos da enzima L-asparaginase (ATCC 31821) proveniente de *Zymomonas mobilis* CP4

Tabela C.1: Aminoácidos e suas abreviações

| Aminoácidos | |
|------------------|----------------|
| Arginina (R) | Alanina (A) |
| Histidina (H) | Asparagina (N) |
| Isoleucina (I) | Aspartato (D) |
| Leucina (L) | Cisteína (C) |
| Lisina (K) | Glutamato (E) |
| Metionina (M) | Glutamina (Q) |
| Fenilalanina (F) | Glicina (G) |
| Treonina (T) | Prolina (P) |
| Triptofano (W) | Serina (S) |
| Valina (V) | Tirosina (Y) |

Para saber os coeficientes estequiométricos da reação e os componentes gerados,

é necessário entender como se dá a biossíntese dos aminoácidos, que será mostrada na seção C.1. Além disso, foi considerado que 4,324mol de ATP é requerido por mol de aminoácido por polimerização (CUNNINGHAM et al., 2009) e assim foi possível construir a seguinte reação com os precursores dos aminoácidos:



em que 3PG é o composto 3-fosfoglicerato, αKG , α -cetogluturato, E4P, eritrose-4-fosfato, NADPH, difosfopiridina nucleotídeo fosfato reduzido, OAA, oxalacetato, PEP, fosfoenolpiruvato, PYR, piruvato, R5P, ribose-5-fosfato e NADH, difosfopiridina nucleotídeo reduzido.

C.1 Biossíntese de aminoácidos

Os aminoácidos são sintetizados a partir de precursores metabólicos conhecidos, sendo um total de vinte existentes. Todos os aminoácidos são provenientes de intermediários da glicólise, do ciclo de Krebs ou da via das pentoses como pode ser observado na Figura C.2. Os principais componentes utilizados para a formação dos aminoácidos são: 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato, oxalacetato, α -cetogluturato, aspartato, glutamato e eritrose-4-fosfato.

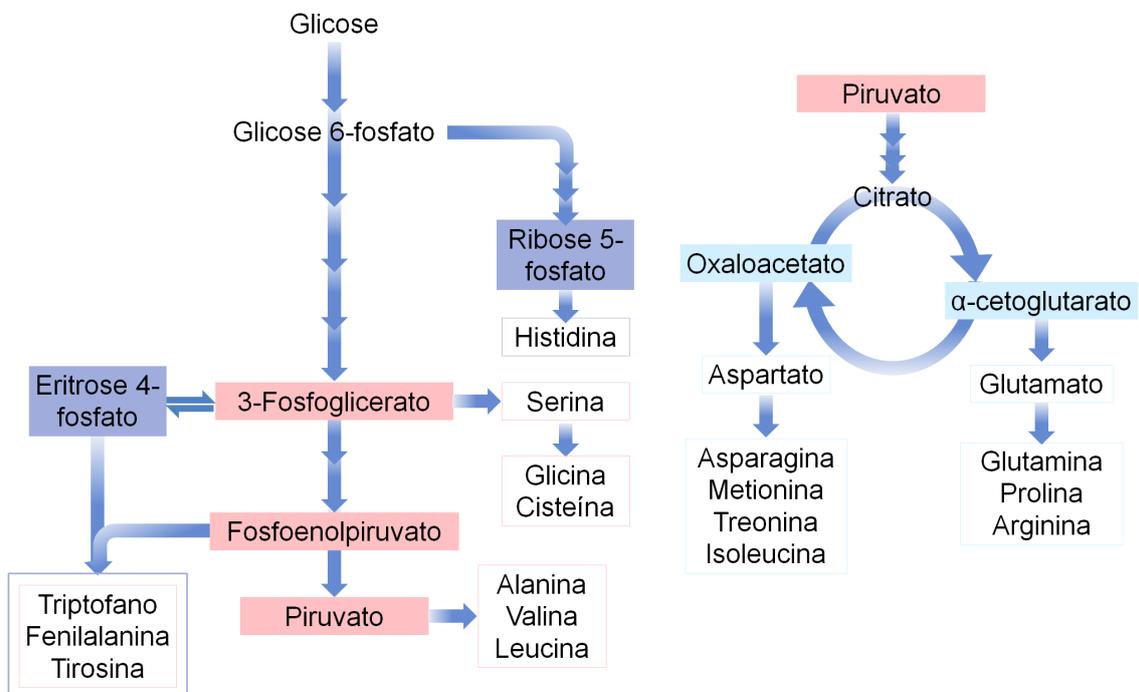


Figura C.2: Visão geral da biossíntese de aminoácidos. Fonte: LEHNINGER *et al.* (2005).

O piruvato, oxalacetato e o α -cetoglutarato estão relacionados diretamente à alanina, aspartato e ao glutamato, respectivamente. A síntese desses aminoácidos acontece em apenas um passo através da reação de transaminação (Figura C.4). Sendo que a asparagina e a glutamina necessitam de ATP para serem formadas.

O glutamato é o precursor da prolina e arginina. As reações para formação da prolina utilizam ATP e NADPH, já a arginina é formada pelas reações do ciclo da uréia, utilizando ATP e NAD (Figura C.5). A serina é formada a partir do 3-fosfoglicerato, usando NAD e glutamato nas reações, e esta é utilizada para formar glicina e cisteína (Figura C.3).

O precursor da lisina, metionina e treonina é o aspartato. Inicialmente ocorre a reação de fosforilação e segue em três rotas para a formação dos aminoácidos, utilizando NADPH e ATP (Figura C.6). Já para a formação da leucina, isoleucina e valina utiliza-se o piruvato como composto inicial (Figura C.7).

Os aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, tem como precursores o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. Inicialmente tem-se uma reação de condensação desses compostos e assim segue para as reações de formação dos aminoácidos (Figura C.8). Finalmente a síntese de histidina é derivada do composto 5-fosforribosil- α -pirofosfato (PRPP) (Figura C.9).

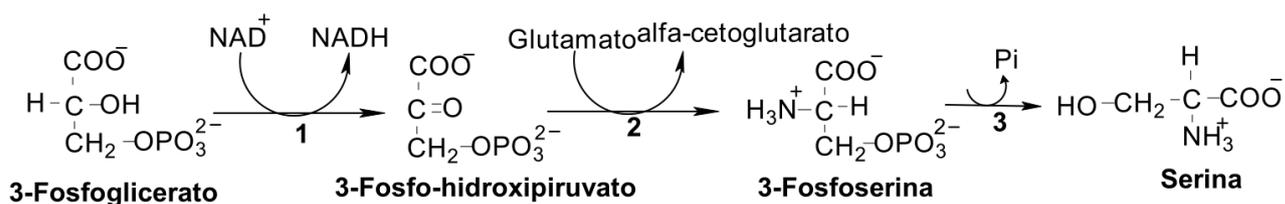


Figura C.3: Conversão de 3-fosfoglicerato em serina. As enzimas para essa conversão são (1) 3-fosfoglicerato-desidrogenase, (2) uma amino-transferase dependente de PLP e (3) fosfosserina-fosfatase. Fonte: VOET *et al.* (2014)

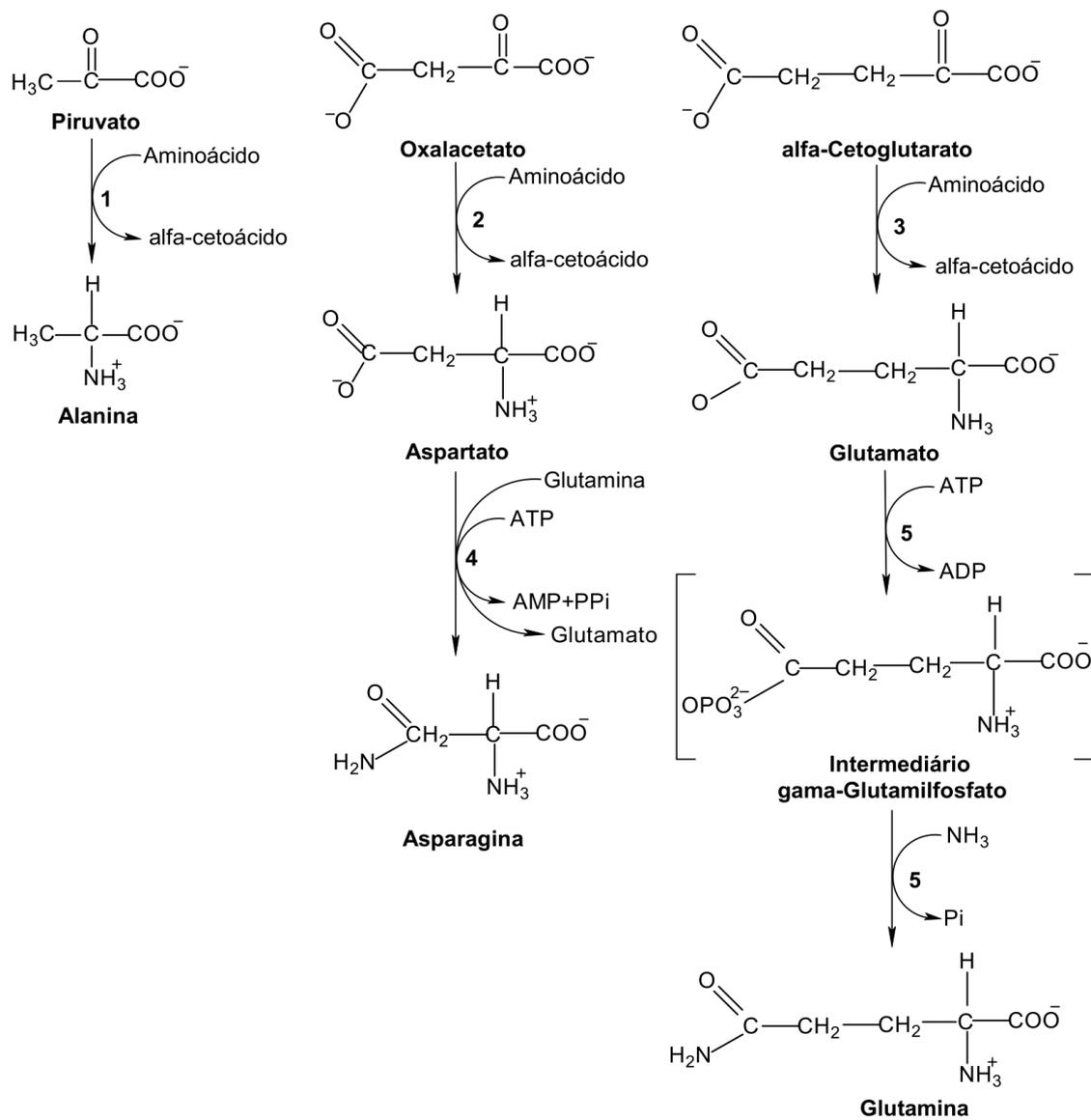


Figura C.4: Síntese de alanina, aspartato, glutamina, asparagina e glutamina. As reações envolvem a transaminação de (1) piruvato, (2) oxalacetato, e (3) α -cetoglutarato, e a aaminação de (4) aspartato e (5) glutamato. Fonte: VOET *et al.* (2014)

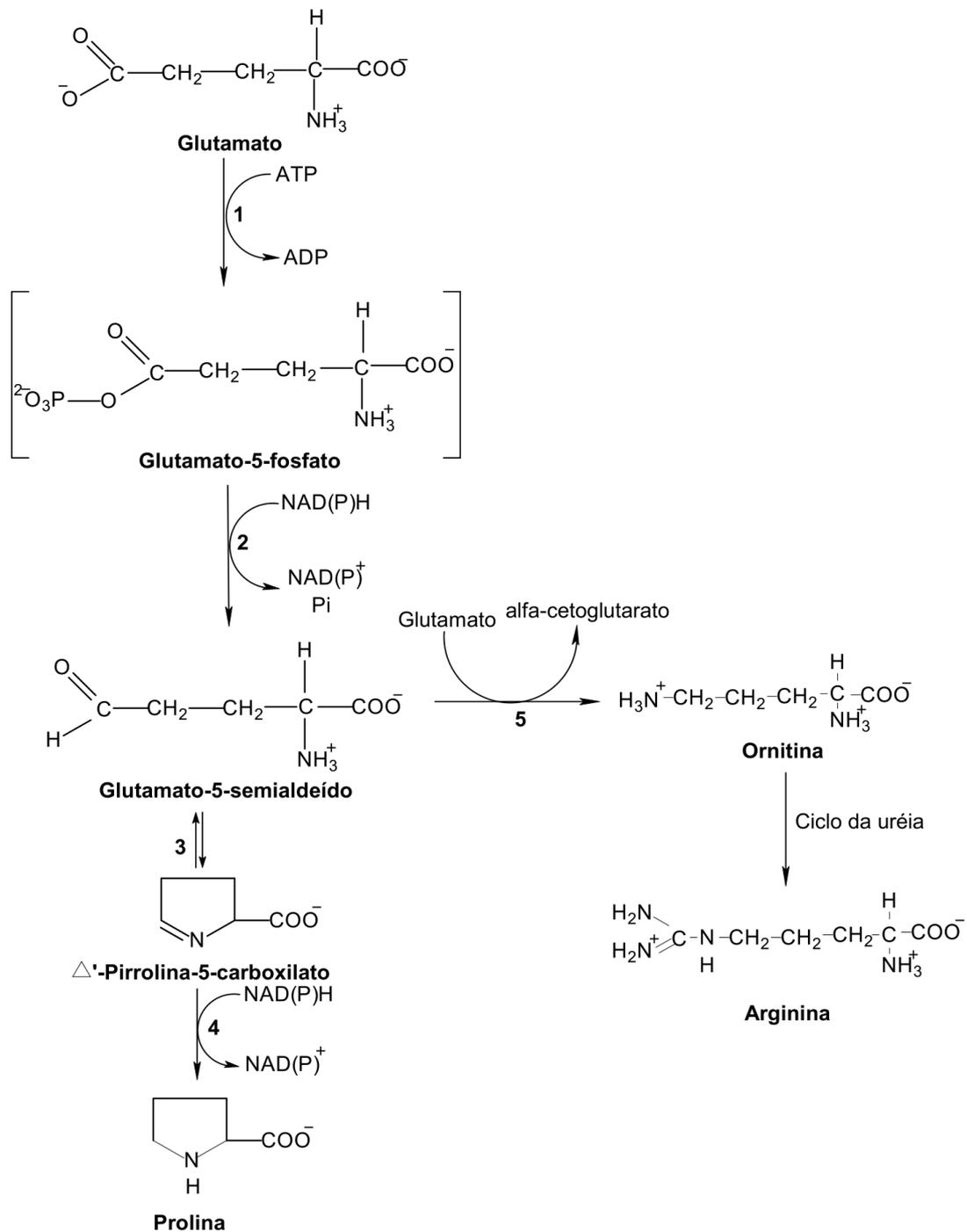


Figura C.5: Síntese de arginina, ornitina e prolina a partir de glutamato. Os catalisadores da biossíntese da prolina são (1) γ -glutamil-cinase, (2) desidrogenase, (3) não-enzimático e (4) pirrolina-5-carboxilato-redutase. A ornitina é convertida em arginina pelo ciclo da uréia. Fonte: VOET *et al.* (2014)

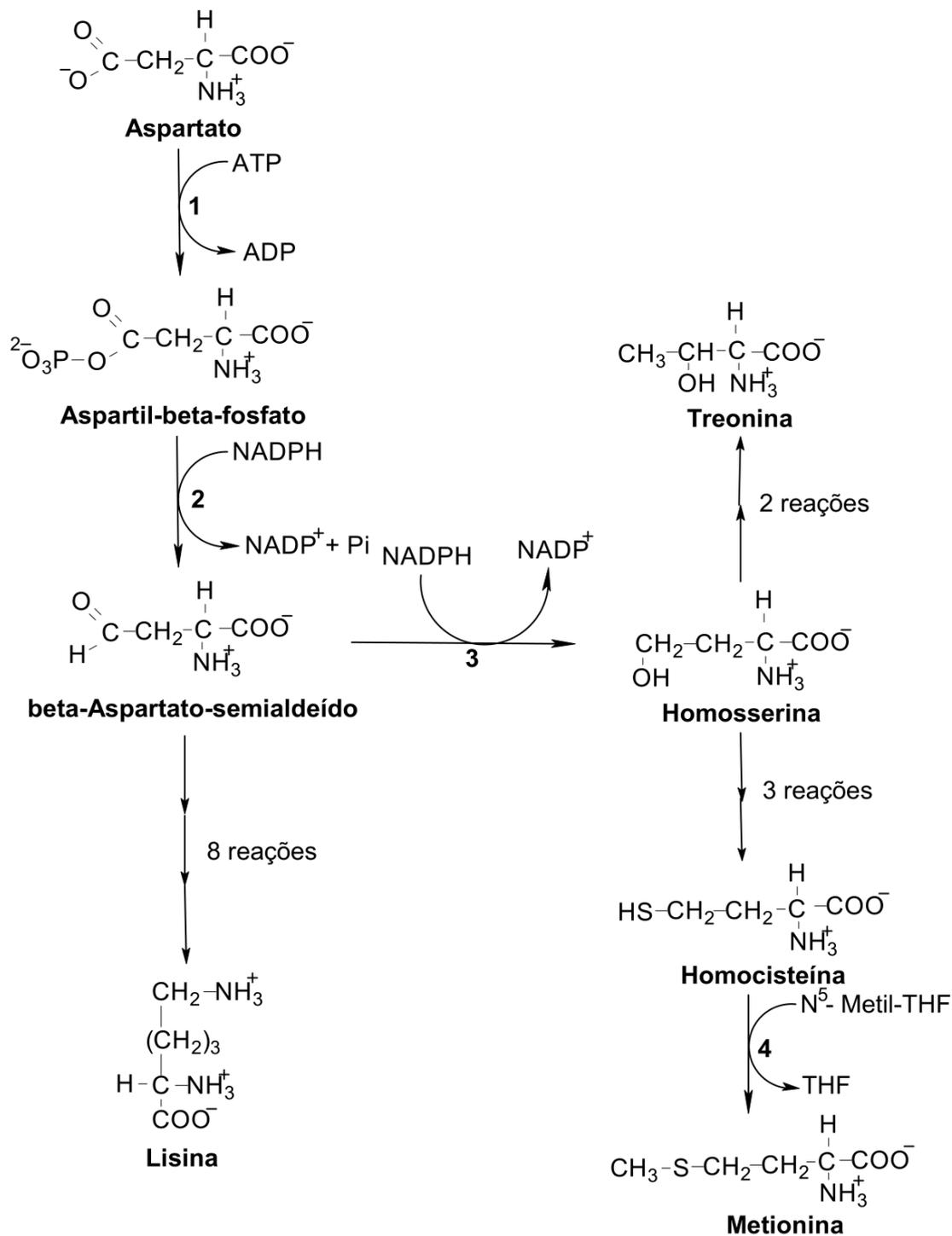


Figura C.6: Síntese de lisina, metionina e treonina. As enzimas que catalisam as reações são (1) aspartocinase, (2) β -aspartato-semialdeído-desidrogenase, (3) homoserina-desidrogenase e (4) metionina-sintase. Fonte: VOET *et al.* (2014)

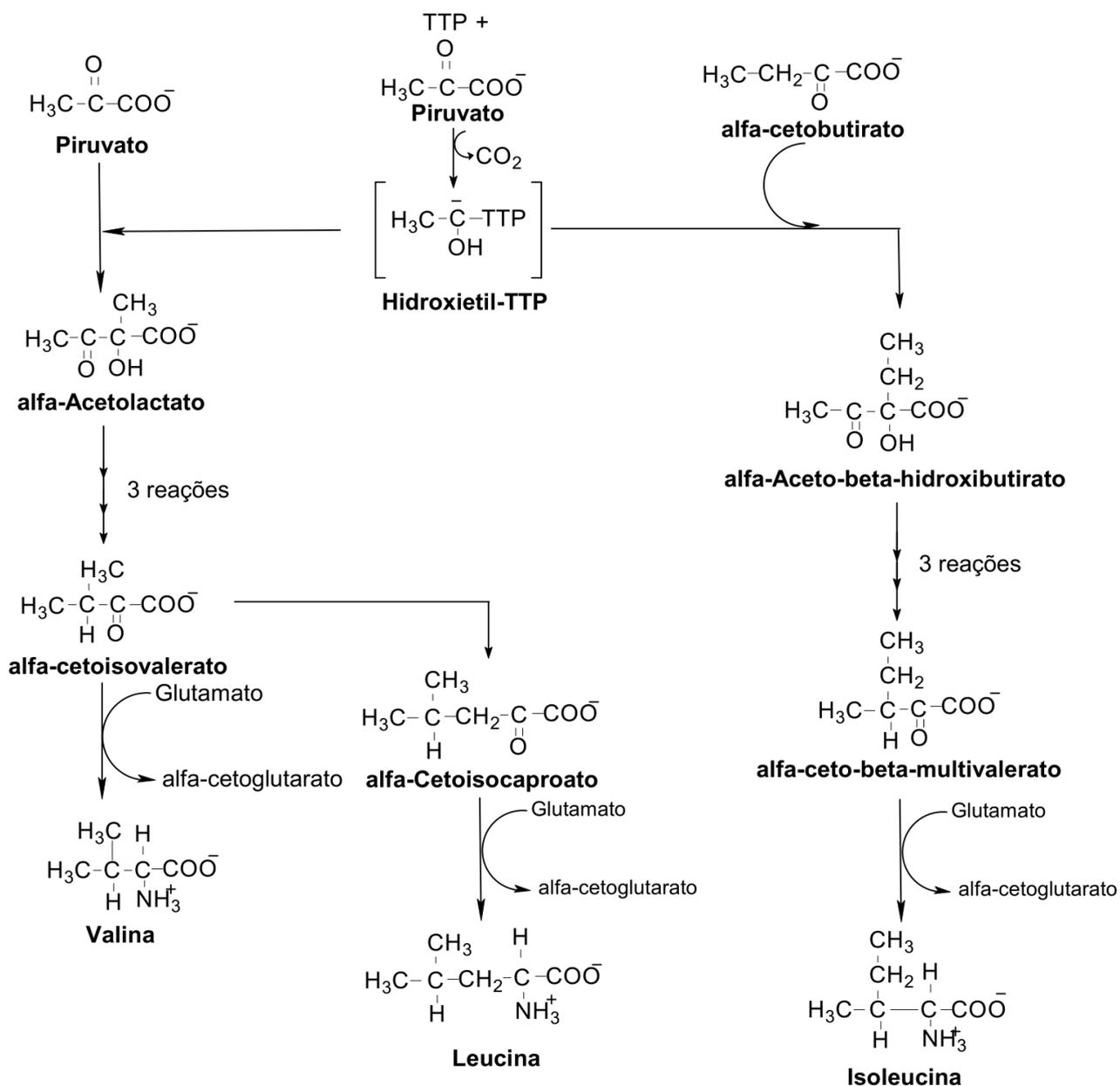


Figura C.7: Síntese de isoleucina, leucina e valina. A primeira enzima, a acetolactato-sintase, catalisa duas reações, uma conduzindo até a valina e leucina, e a outra, até a isoleucina. A valina-amino-transferase catalisa a formação de valina e isoleucina, e a leucina-amino-transferase catalisa a formação de leucina, a partir de seus respectivos α -cetoácidos. Fonte: VOET *et al.* (2014)

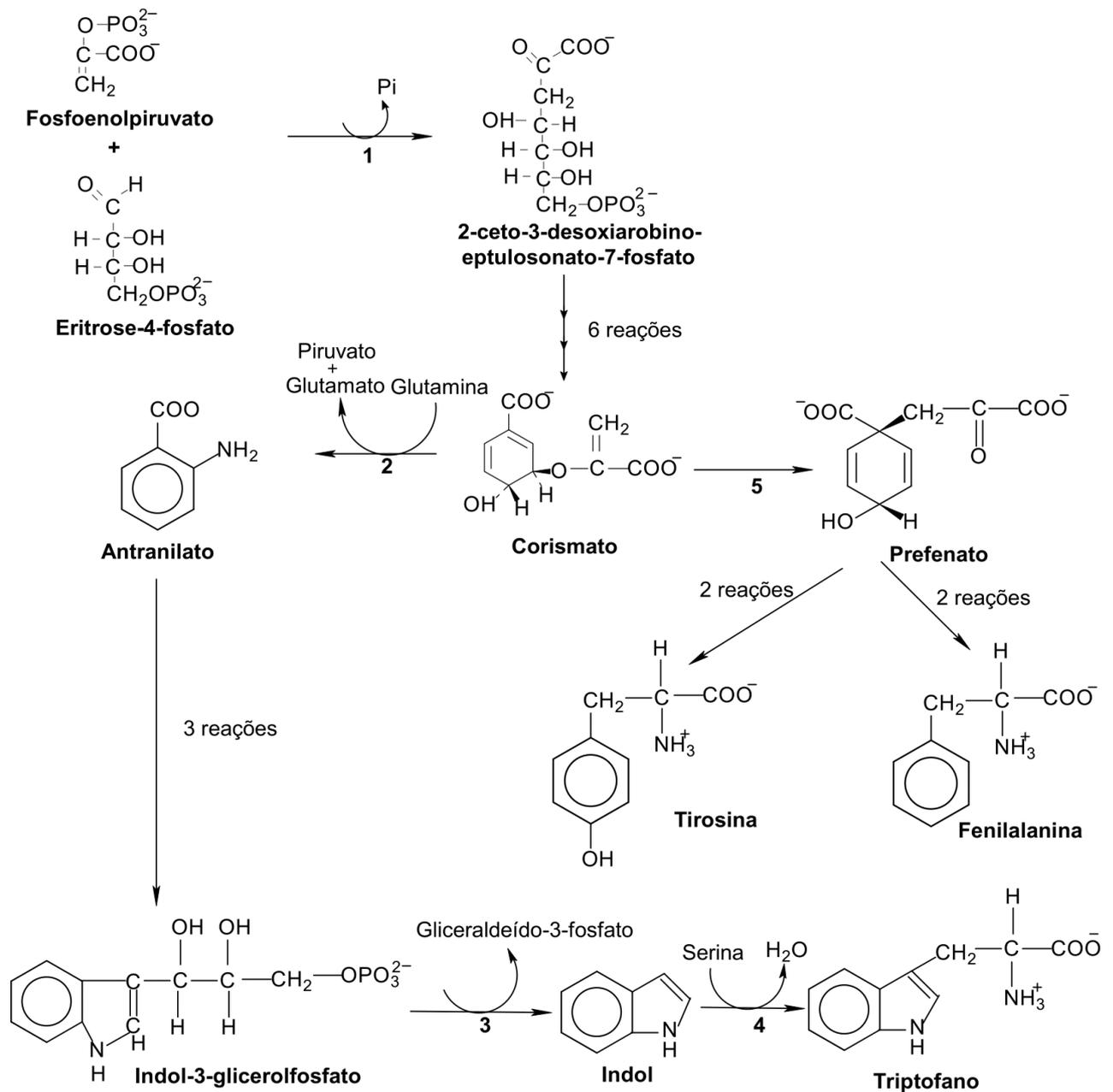


Figura C.8: Síntese de fenilalanina, triptofano e tirosina. As enzimas envolvidas são (1) 2-ceto-3-desóxi-D-arabinoeptulose-7-fosfato-sintase, (2) antranilato-sintase, (3) triptofano-sintase, subunidade α , (4) triptofano-sintase, subunidade β , (5) corismato-mutase. Fonte: VOET *et al.* (2014)

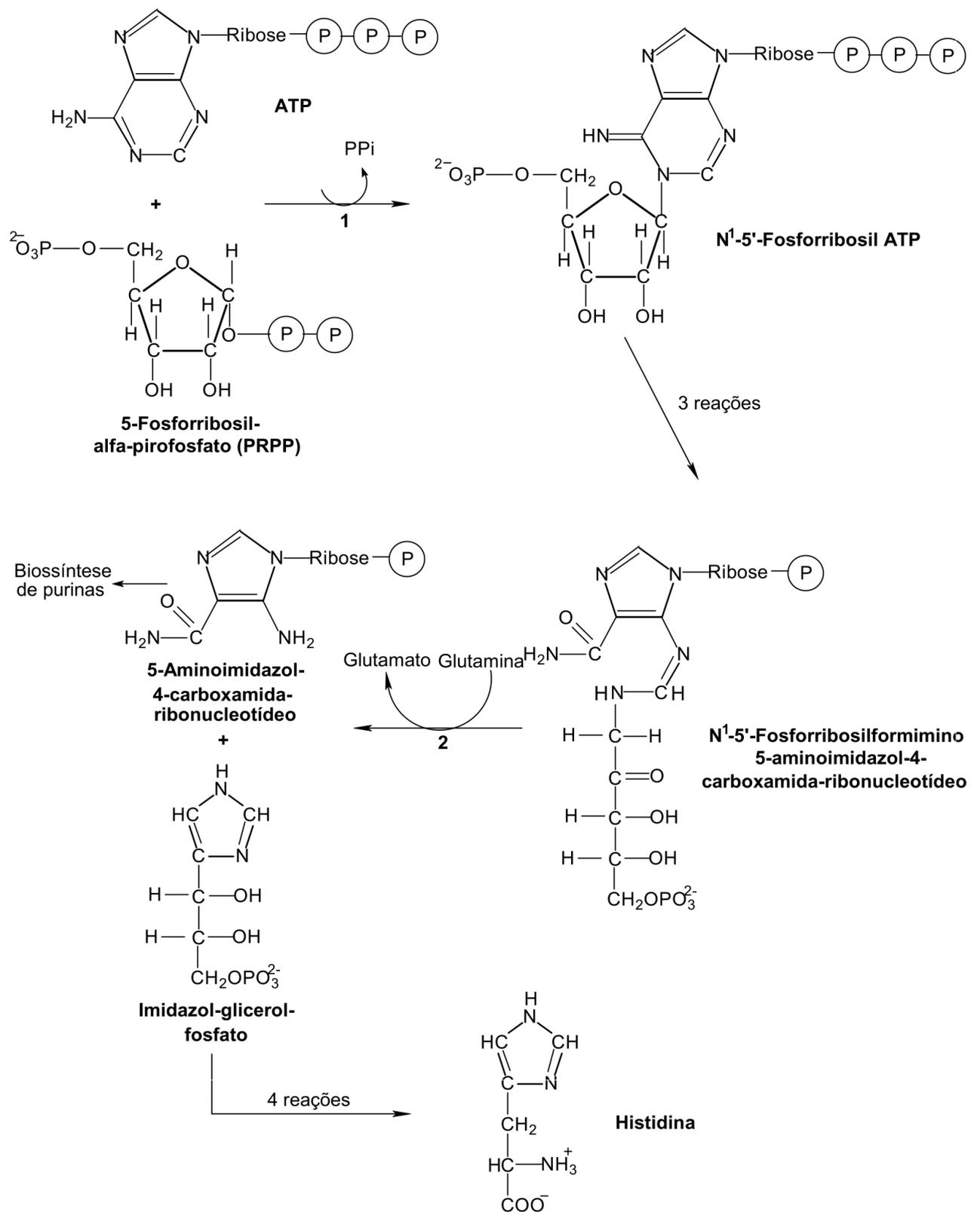


Figura C.9: Biossíntese de histidina. As enzimas envolvidas são (1) ATP-fosforribosil-transferase e (2) glutamina-amido-transferase. Fonte: VOET *et al.* (2014)