

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OTIMIZAÇÃO DINÂMICA DO CULTIVO SEMI-CONTÍNUO DE *Pichia*  
*pastoris* RECOMBINANTE PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
HETERÓLOGAS**

**Inti Doraci Cavalcanti Montaña**

**SÃO CARLOS**  
**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OTIMIZAÇÃO DINÂMICA DO CULTIVO SEMI-CONTÍNUO DE *Pichia*  
*pastoris* RECOMBINANTE PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS  
HETERÓLOGAS ALFA AMILASE E PENICILINA G ACILASE**

**Inti Doraci Cavalcanti Montaño**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal de São Carlos como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do  
título de Mestre em Engenharia Química.**

*Orientador:*  
*Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano*

**SÃO CARLOS**  
**2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C376od

Cavalcanti Montañó, Inti Doraci.

Otimização dinâmica do cultivo semi-contínuo de *Pichia pastoris* recombinante para produção das enzimas heterólogas alfa amilase e penicilina G acilase / Inti Doraci Cavalcanti Montañó -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
109 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Engenharia bioquímica. 2. *Pichia pastoris*. 3. Enzimas recombinantes. 4. Controle ótimo. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**INTI DORACI CAVALCANTI MONTAÑO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



Roberto de Campos Giordano  
**Orientador, UFSCar**



Fernando Araripe Gonçalves Torres  
**UnB**



Raquel de Lima Camargo Giordano  
**UFSCar**

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Cristina, e a meu esposo Carlos Alberto, pela confiança e o apoio incondicional durante todos esses anos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano pelos ensinamentos, apoio e dedicação ao longo destes dois anos e sobre tudo pela confiança depositada na realização deste projeto. Agradeço também a amizade que fez um pouco mais fácil o fato de estar longe de casa.

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe Torres do Departamento de Biologia Celular da UnB, que gentilmente cedeu a cepa produtora de  $\alpha$ -amilase heteróloga. À Prof. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano e à Dra. Mônica Rosas da Costa lemma por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

A todos meus companheiros dos Laboratórios de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) e de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar pela amizade e ajuda oferecida. Agradeço especialmente ao Carlos, Adilson, Antonio Carlos, Dasciana, Edson e Ana Maria pelos conselhos e ajuda que foram muito importantes para a realização deste mestrado.

A meu esposo Carlos Alberto pelos conselhos, carinho e ajuda incondicional que serviram para me acalmar nos momentos difíceis. A minha mãe por sua confiança e apoio.

Aos técnicos Amadeus e Thiago, pela ajuda nas análises dos experimentos.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Este mestrado se propõe a estudar a otimização dinâmica de biorreator automatizado, tipo tanque agitado e aerado, em escala de bancada (até 5L), onde se processa o cultivo semi-contínuo de *Pichia pastoris* recombinante. Essa levedura foi clonada pelo grupo do prof. Fernando Torres, da UnB, utilizando o promotor *PGK1*, que dispensa a utilização de metanol como indutor, expressando constitutivamente a enzima  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis*. Durante a execução deste mestrado, a enzima penicilina G acilase (PGA) de *Bacillus megaterium* está sendo clonada pelo grupo de biologia molecular do DEQ-UFSCar usando a mesma construção e, portanto, a cinética de crescimento e produção da PGA heteróloga deverá ser muito semelhante à da  $\alpha$ -amilase, utilizada como estudo de caso para otimização do bioprocesso. Cultivos de *Pichia pastoris* recombinante foram realizados em frascos agitados, utilizando meio de cultivo padrão, objetivando o levantamento de dados cinéticos, ponto de partida para o escalonamento em biorreator de bancada. Posteriormente, foram realizados ensaios em biorreator de 5L, em batelada e batelada alimentada. Com os dados obtidos nos cultivos em biorreator, e utilizando algoritmo híbrido para estimativa de parâmetros (que combina o método global *Simulated Annealing*, com o local de Levenberg-Marquardt), implementado em MatLab e disponível no LaDABio (Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos), foram ajustados parâmetros cinéticos de crescimento, para serem utilizados nas simulações dos cultivos em biorreator. A partir daí, foi desenvolvido modelo de crescimento microbiano e de produção, utilizando um enfoque clássico (modelo não-estruturado, não-segregado) para descrever o sistema. Com isso, torna-se possível realizar simulações em computador usando diferentes estratégias de alimentação, para mapear a dinâmica do sistema. A seguir, foram desenvolvidos algoritmos de controle ótimo em malha aberta para definição de estratégias de alimentação. Concentrações celulares de 5,4 g/L (massa seca) foram alcançadas em cultivos em câmara rotatória (20h de cultivo, quando se esgota a glicose), expressando 218 U/mL de  $\alpha$ -amilase, comparado com 11,4 g/L(massa seca) que foram atingidos em cultivos em biorreator em bateladas simples (10h de cultivo, quando se esgota a glicose), expressando 156 U/mL de  $\alpha$ -amilase. Em cultivos em batelada alimentada concentrações celulares de

até 45 g/L foram atingidas, expressando até 260 U/mL de  $\alpha$ -amilase, com uma produtividade de 5,2 U/mL/h. Em cultivo em batelada alimentada de *P. pastoris* expressando PGA, concentrações celulares de até 35 g/L foram atingidas. Não foi detectada atividade enzimática no caldo de cultivo devido ao efeito da glicosilação. Reação de imunodeteção confirmou a expressão da enzima recombinante. Foram ajustadas quatro equações de velocidade específica de crescimento, com diferentes tipos de inibição por um produto, detectado em níveis importantes por cromatografia líquida de alto desempenho, mas ainda não identificado. Esse metabólito foi inserido como inibidor nos modelos cinéticos, utilizando as áreas dos picos, normalizadas, como uma pseudoconcentração. Os melhores ajustes aos dados experimentais foram com modelo cinético de Monod com inibição não-competitiva. Valores típicos obtidos para a velocidade específica máxima de crescimento e de fator de conversão glicose/célula em biorreator foram  $\mu_{\max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$  e  $Y_{X/S} = 0,48$ . Algoritmo de controle ótimo em malha aberta foi desenvolvido e implementado com sucesso, prevendo de forma robusta perfis ótimos de alimentação, cuja validação fica proposta como continuidade deste trabalho.

**Palavras-Chave:** *Pichia pastoris* recombinante. Cinética do cultivo. Controle ótimo de biorreator. Expressão constitutiva. Alfa-amilase. Penicilina G Acilase (PGA).

## ABSTRACT

This master's thesis project aims at studying the dynamic optimization of the operation of a bench scale (up to 5L) automated, agitated and aerated bioreactor, where the semi-continuous cultivation of recombinant *Pichia pastoris* is run. This yeast was cloned using the PGK1 promoter, which precludes the use of methanol as inducer, expressing constitutively the enzyme penicillin G Acylase (PGA) from *Bacillus megaterium*. While the group of molecular biology of DEQ-UFSCar is working on cloning the PGA, a *P. pastoris* expressing the enzyme  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* was cultivated. This clone, provided by prof. Fernando Torres, UnB, uses the same construction and, therefore, its kinetics of growth and production should be very similar to the PGA's. Cultivation of recombinant *Pichia pastoris* was performed in flasks (shaker) using standard culture medium, aiming at obtaining kinetic data, which are the starting point for the escalation to a benchtop bioreactor. Following that, tests were performed in a 5L bioreactor in batch and fed batch operation modes. With the bioreactor data, kinetic parameters of growth, to be further used in the simulations, were estimated, using a hybrid algorithm (which combines the global method Simulated Annealing, with the local one Levenberg-Marquardt). This algorithm, is implemented in Matlab and available in the software library of Ladabio (Laboratory of Development and Automation of Bioprocesses). From these data, models of microbial growth and of production were developed, following a classic approach (unstructured, non-segregated). Computer simulations using different feeding strategies and employing these models allowed mapping the dynamics of the system. From this information, optimal control strategies were proposed to define optimal feeding profiles. Cellular concentrations of 5.4 g/L (dry weight) were reached in shaker (20h of cultivation, when glucose is exhausted), expressing 218 U/mL of  $\alpha$ -amylase, compared to 11.4 g/L (dry weight) that were achieved in cultures in a bioreactor in batch simple (10h of cultivation, when glucose is exhausted), expressing 156 U/mL of  $\alpha$ -amylase. In fed-batch cultures, cell concentrations of up to 45 g/L were achieved, expressing up to 260 U/mL of  $\alpha$ -amylase, with a productivity of 5.2 U/mL/h. In fed-batch cultures of *P. pastoris* expressing PGA, cell concentrations of up to 35 g/L were achieved. Enzyme activity

was not detected in the culture broth due to the effect of glycosylation. Immunodetection reaction confirmed the expression of the recombinant enzyme. Four specific growth rate equations were adjusted, with different types of inhibition by one product, detected at significant levels by liquid chromatography high-performance, but not yet identified. This metabolite was added as an inhibitor in kinetic models, using the peak areas, normalized as a pseudoconcentration. The best fit to the experimental data were the Monod kinetic model with non-competitive inhibition. Typical values obtained for the maximum specific growth and glucose/ cell conversion factor in bioreactor were  $\mu_{\max}=0,24 \text{ h}^{-1}$  and  $Y_{X/S} = 0,48$ . Algorithm for optimal control in open loop was developed and successfully implemented, providing a robust profiles of great power, whose validation is proposed as a continuation of this work.

**Keywords:** Recombinant *Pichia pastoris*. Constitutive expression. Kinetics of cultivation. Optimal Control. Penicillin G Acylase (PGA). Alpha- amylase.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

$D$  = Taxa de diluição, ( $h^{-1}$ ).

$DO$  = Densidade óptica

$F_{ACIDO}$  = Vazão volumétrica de ácido, ( $L \cdot h^{-1}$ ).

$F_{ALIM}$  = Vazão volumétrica de meio suplementar, ( $L \cdot h^{-1}$ ).

$F_{AMOSTRA}$  = Vazão volumétrica extraída para amostragem, ( $L \cdot h^{-1}$ ).

$F_{BASE}$  = Vazão volumétrica de base, ( $L \cdot h^{-1}$ ).

$F_{EVAP}$  = Vazão volumétrica de meio evaporado do reator, ( $L \cdot h^{-1}$ ).

$k_d$  = Constante de morte, ( $h^{-1}$ ).

$K_i$  = Constante de inibição, ( $g \cdot L^{-1}$ ).

$K_S$  = Parâmetro de Monod, ( $g_{\text{glicose}} \cdot L^{-1}$ ).

$M$  = Concentração de metabólito, ( $g \cdot L^{-1}$ ).

$m$  = Coeficiente de manutenção celular, ( $g_{\text{massa seca}} \cdot g_{\text{glicose}}^{-1} \cdot h^{-1}$ ).

$O$  = Concentração de oxigênio, ( $g \cdot L^{-1}$ ).

$P$  = Concentração de produto, ( $g \cdot L^{-1}$ ).

$S$  = Concentração de substrato, ( $g \cdot L^{-1}$ ).

$S_{ALIM}$  = Concentração de substrato no meio suplementar, ( $g \cdot L^{-1}$ ).

$t$  = tempo, (h).

$V$  = Volume útil do reator, (L).

$X$  = Concentração celular, ( $g_{\text{massa seca}} \cdot L^{-1}$ ).

$Y_{X/S}$  = Fator de conversão de substrato a células, ( $g_{\text{massa seca}} \cdot g_{\text{substrato}}^{-1}$ ).

$Y_{X/P}$  = Fator de rendimento de células a produto, ( $g_{\text{produto}} \cdot g_{\text{massa seca}}^{-1}$ ).

$Y_{X/M}$  = Fator de rendimento de células a metabólito, ( $g_{\text{metabolito}} \cdot g_{\text{massa seca}}^{-1}$ ).

$\mu$  = Velocidade específica de crescimento celular, ( $h^{-1}$ ).

$\mu_{\max}$  = Velocidade específica máxima de crescimento celular, ( $h^{-1}$ ).

$\alpha$  = Coeficiente pseudo-estequiométrico para formação de produto associado ao crescimento, ( $g_{\text{produto}} \cdot g_{\text{massa seca}}^{-1}$ ).

$\beta$  = Coeficiente cinético para formação de metabólito associado ao crescimento, ( $g_{\text{metabolito}} \cdot g_{\text{massa seca}}^{-1}$ ).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 <i>Pichia pastoris</i> .....	21
Figura 2.2 Via metabólica do metanol em <i>Pichia pastoris</i> .....	24
Figura 2.3 Via metabólica da glicose (glicólise).....	25
Figura 2.4 Anel $\beta$ -lactâmico do 6-APA. ....	28
Figura 2.5 Penicilina G .....	28
Figura 2.6 Penicilina V .....	29
Figura 2.7 Reação de hidrólise enzimática da Penicilina G .....	29
Figura 2.8 Estrutura tridimensional da amilase de <i>Bacillus sp.</i> ....	32
Figura 3.1 Esquema de um biorreator operando em batelada alimentada.....	37
Figura 5.1. SDS-PAGE das proteínas totais no meio de cultivo.....	60
Figura 5.2. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em meio YPD, 30oC, pH 6,5. Expressão constitutiva de $\alpha$ -amilase extracelular .....	61
Figura 5.3. Metabólitos produzidos por <i>P. pastoris</i> . ....	62
Figura 5.4. Aminoácidos consumidos preferencialmente por <i>P. pastoris</i> . ....	63
Figura 5.5. Comparação do crescimento celular de <i>P. pastoris</i> em meio com glicose nos shakers NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC e MARCONI. ....	64
Figura 5.6. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em meio YPD com glicerol, 30°C, pH 6,5. Expressão constitutiva extracelular de $\alpha$ -amilase de <i>B. subtilis</i> . ....	65
Figura 5.7. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em meio YPD com glicose, 30°C, pH 6,5. Expressão constitutiva extracelular de $\alpha$ -amilase de <i>B. subtilis</i> . ....	66
Figura 5.8. Metabólitos produzidos por <i>P. pastoris</i> em meio com glicerol.....	67
Figura 5.9 Perfis de variação da permissividade ao longo do cultivo B1 em regime batelada .....	69
Figura 5.10 Perfis de concentração celular (massa seca), consumo de glicose, densidade ótica .....	70
Figura 5.11 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO <sub>2</sub> nos gases efluentes, (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B1).....	71

Figura 5.12 Perfis de crescimento celular (massa seca), consumo de glicose, atividade enzimática e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B2). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro. ....	72
Figura 5.13 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO <sub>2</sub> , (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B2). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro. ....	74
Figura 5.14 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose, atividade enzimática e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B3). ....	76
Figura 5.15 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO <sub>2</sub> , (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B3). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro. ....	78
Figura 5.16 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B4). ....	80
Figura 5.17 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO <sub>2</sub> , (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B4). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro. ....	81
Figura 5.18 Cromatogramas das amostras coletadas em: (A) 3h, (B) 9h, (C) 21h, (D) 50h. (Ensaio B4). ....	82
Figura 5.19 Comparação dos perfis de crescimento celular, consumo de glicose e variação da permissividade em regime batelada alimentada com a produção do produto inibidor. (Ensaio B4). ....	83
Figura 5.20 SDS-PAGE das proteínas totais no meio de cultivo (Ensaio B4). ....	84
A $\alpha$ -amilase tem ao redor de 60 kDa. ....	84
Figura 5.21 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B6). ....	85
Figura 5.22. Metabólitos produzidos por <i>P. pastoris</i> expressando PGA no cultivo em batelada alimentada (Ensaio B6). ....	86
Figura 5.23. Reação de imunodeteção (Western blot) para a confirmação da expressão e secreção da enzima recombinante. O controle positivo (esquerda) foi realizado com PGA secretada de <i>B. megaterium</i> selvagem. ....	86

Figura 5.24 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO <sub>2</sub> , (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B6). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro. ....	87
Figura 5.25. Ajuste do modelo de Monod ao cultivo Ens1. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto que as linhas, os valores preditos pelo modelo. ....	90
Figura 5.26 Validação do modelo proposto para o cultivo de <i>Pichia pastoris</i> em batelada alimentada, utilizando os parâmetros calibrados a partir dos dados do ensaio B1. Os símbolos representam os valores experimentais e as linhas, os valores preditos pelo modelo. Modelo de Monod sem inibição. ....	91
Figura 5.27 Ajuste dos modelos de Monod com inibição (cultivo B3). Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto que as linhas, os valores preditos pelo modelo. (a) Equação 18(a), (b) Equação 18(b) e (c) Equação 18(c). ....	92
Figura 5.28 Aplicação do Controle ótimo utilizando o modelo de Monod (a) Taxa de diluição (b) Fluxo volumétrico de alimentação. ....	94
Figura 5.29 Aplicação do Controle ótimo utilizando o modelo de Monod. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto que as linhas, os valores preditos pelo modelo. ....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Resumo de dados cinéticos obtidos por alguns autores no cultivo em batelada alimentada de <i>P. pastoris</i> . .....	27
Tabela 4.1 Composição do meio agar-YPD .....	43
Tabela 4.2 Composição do meio complexo líquido YPD.....	44
Tabela 4.3 Composição do meio sintético de cultivo.....	44
Tabela 4.4 Composição da solução de metais usada no meio suplementar.....	45
Tabela 5.1. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em câmara rotatória, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C, pH 6,5 (Ensaio F1). .....	61
Tabela 5.2. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em câmara rotatória, meio YPD com 20 g/l de glicerol e de glicose, 30°C, pH 6,5. ....	66
Tabela 5.3. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. ....	69
Tabela 5.4. Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de <i>P. pastoris</i> recombinante (Ensaio B2). ....	73
Tabela 5.5. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. (Ensaio B2). ....	73
Tabela 5.6. Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de <i>P. pastoris</i> recombinante (Ensaio B3). ....	76
Tabela 5.7. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. (Ensaio B3). ....	77
Tabela 5.8 Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de <i>P. pastoris</i> recombinante (Ensaio B4). ....	79
Tabela 5.9 Cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. (Ensaio B4). ....	80
Tabela 5.10. Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de <i>P. pastoris</i> recombinante (Ensaio B6). ....	85
Tabela 5.11. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod. ....	89

Tabela 5.12 Valores estimados pelo SA dos parâmetros dos modelos de Monod com inibição.....	91
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 <i>Pichia pastoris</i> .....	21
2.1.1. Expressão em <i>Pichia pastoris</i> .....	23
2.1.2. Expressão de proteínas heterólogas em <i>Pichia pastoris</i> .....	25
2.1.3. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em alta densidade celular .....	26
2.2. Penicilinas e Penicilina G acilase .....	28
2.3 $\alpha$ - Amilase .....	30
2.3.1. Endoamilases .....	31
2.3.2. Exoamilases .....	32
3. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA DE CONTROLE ÓTIMO .....	33
3.1 Princípio do Máximo de Pontryagin .....	35
3.2 Modelo matemático do biorreator .....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Microorganismo .....	43
4.2 Meios de Crescimento e Produção .....	43
4.2.1 Meio sólido .....	43
4.2.2 Meios Líquidos .....	44
4.3. Produção da enzima heteróloga em frascos agitados.....	45
4.3.1. Preparação de Placas de Petri em meio com agar .....	45
4.3.2 Preparação do inóculo.....	46
4.3.3 Condições de cultivo .....	46
4.3.3.1 Ensaio F1: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, meio YPD com 20 g/L Glicose .....	47
4.3.3.2 Ensaio F2: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio YPD com 20 g/L Glicerol .....	47
4.3.3.3 Ensaio F3: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio BSM com 20 g/L Glicose.....	48
4.4 Produção da enzima heteróloga em Biorreator de 5L .....	48
4.4.1 Preparação do pré-inóculo e inóculo .....	49

4.4.1.1	Preparação do pré-inóculo .....	49
4.4.1.2	Preparação do inóculo.....	49
4.4.2	Preparação do Cultivo em biorreator.....	50
4.4.2.1	Cultivo em meio complexo .....	50
4.4.2.1.1	Ensaio B1: Cultivo em batelada simples, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase .....	51
4.4.2.1.2	Ensaio B2: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis. ....	51
4.4.2.1.3	Ensaio B3: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ constantes. ....	52
4.4.2.1.4	Ensaio B4: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis por etapas. ....	53
4.4.2.1.5	Ensaio B6: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando PGA com $C_1$ constante e $C_2$ variável. ....	53
4.4.2.2.	Cultivo em meio sintético.....	53
4.4.2.2.1	Ensaio B5: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase em batelada simples, meio BSM com 40 g/L Glicose .....	54
4.5	Métodos Analíticos .....	54
4.5.1.	Massa e Viabilidade Celular.....	54
4.5.2	Análise de glicose, álcoois e ácidos orgânicos.....	55
4.5.3.	Aminoácidos.....	56
4.5.4.	Atividade da $\alpha$ -amilase .....	57
4.6	Determinação de parâmetros cinéticos .....	58
4.6.1	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular.....	58
4.6.2	Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células .....	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1.	Ensaio em Frasco Agitados.....	60
5.1.1	Ensaio F1: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase de <i>B. subtilis</i> em frascos agitados, meio YPD com 20 g/L de glicose .....	60
5.1.2	Comparação de desempenho de câmaras rotativas de diferentes fabricantes	63
5.1.3	Ensaio F2: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio YPD com 20 g/L de glicerol. ....	65

5.1.4 Ensaio F3: Cultivo de <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio BSM com 20 g/L Glicose .....	67
5.2. Biorreator de 5 L.....	68
5.2.1 Ensaio B1: Cultivo em batelada simples, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase .	68
5.2.2 Ensaio B2: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis.....	72
5.2.3 Ensaio B3: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ constantes.....	75
5.2.4 Ensaio B4: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis por etapas .....	79
5.2.5 Ensaio B6: Cultivo em batelada alimentada, <i>P. pastoris</i> expressando PGA com $C_1$ constante e $C_2$ variável .....	84
5.2.6 Ensaio B5: Cultivo em batelada simples, meio BSM com 40 g/L Glicose .....	88
5.3. Estimativa de parâmetros cinéticos.....	88
5.3.1 Ajuste dos dados do ensaio em batelada simples (Ensaio B1) utilizando Monod sem inibição como cinética de crescimento. ....	89
5.3.2 Ajuste dos dados do ensaio em batelada alimentada (Ensaio B3) utilizando Monod com inibição como cinética de crescimento. ....	91
5.4 Controle Ótimo .....	93
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO: SOLUÇÃO DO PROBLEMA DE CONTROLE ÓTIMO.....	103

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm atualmente uma grande aplicação industrial na produção de antibióticos, enzimas, aminoácidos entre outros. Um processo biotecnológico pode definir-se como aquele processo em que se utilizam microrganismos ou enzimas, como o objetivo de produção de biomassa, síntese de compostos químicos intracelulares ou extracelulares, produção de alimentos, de fontes energéticas ou ainda com propósitos ambientais.

A produção de enzimas é de grande importância, devido a serem catalisadores de alta especificidade, alta eficiência de conversão e elevada atividade em condições ambientais moderadas. Este trabalho concentra-se na produção de duas enzimas de interesse industrial: Penicilina G acilase (PGA) e  $\alpha$ -amilase.

Penicilina G acilase é enzima de grande importância na indústria de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, utilizada para catalisar a hidrólise de penicilina G, visando à produção de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), que por sua vez é empregado na síntese de penicilinas semi-sintéticas (como ampicilina, amoxicilina, oxacilina, dentre várias outras). A produção de penicilinas semi-sintéticas, por sua vez, é conduzida atualmente sob condições extremas de temperatura ( $-30^{\circ}\text{C}$ ), demanda solventes organoclorados e produz grandes volumes de resíduos não-recicláveis. Apesar do alto rendimento dessa rota, a implantação deste tipo de indústria no Brasil demandaria a utilização de equipamentos caros e o desenvolvimento de operações eficientes para o reciclo de solventes e disposição de resíduos não recicláveis. Com as crescentes exigências governamentais, no sentido da redução de impactos ambientais, a tecnologia enzimática (“rota verde”) se torna uma alternativa para tais processos, pois as reações enzimáticas são realizadas em meio aquoso, temperaturas próximas à ambiente e pressão atmosférica.

Por outro lado, a enzima  $\alpha$ -amilase pode ser encontrada em microrganismos, plantas e animais. A  $\alpha$ -amilase hidrolisa o amido (amilose), dando origem a açúcares solúveis. Tem aplicação em setores industriais, como o alimentício (liquefação do amido, cervejas, panificação), biocombustíveis (com destaque para o etanol produzido a partir de milho, nos EUA; ou de mandioca, como

na Tailândia, Nguyen et al., 2007), indústria têxtil, papel e celulose, de couro, detergentes, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003).

A produção industrial de enzimas deste tipo é normalmente realizada em processos fermentativos operados em regime batelada alimentada, onde substratos, nutrientes e indutores são alimentados ao biorreator de forma contínua ou descontínua. Este modo de operação evita problemas tais como inibição pelo substrato, repressão catabólica, entre outros. Neste contexto, a aplicação de técnicas eficientes para otimização e controle de processos vem se tornando cada vez mais importante. O objetivo na otimização de esses processos é a maximização de um produto de interesse ao final do cultivo, para este propósito o controle ótimo consiste na determinação dos perfis das variáveis de controle com o tempo, de forma a otimizar um índice de desempenho.

É provável que discrepâncias modelo-experimento devido à variabilidade da cinética, mesmo entre experimentos semelhantes, devido a mudanças não mensuráveis nas condições de inóculo, a diferenças entre linhagens, etc., frequentes nesse tipo de bioprocessos, tornem necessário lançar mão de algoritmos de otimização dinâmica em malha fechada, possivelmente empregando enfoque híbrido (utilizando, por exemplo, redes neurais ou *neuro-fuzzy* como parte do modelo). Entretanto, é interessante que a pesquisa tenha início empregando técnicas clássicas em malha aberta, inclusive para testar sua capacidade de generalização.

Neste trabalho foram realizados cultivos em batelada alimentada da levedura *Pichia pastoris* utilizando glicose como fonte de carbono. Esta levedura foi testada como uma das possíveis células hospedeiras, devido a sua construção para expressão constitutiva e extracelular da enzima recombinante, trazendo desafios para a otimização do processo, sendo um problema mais complexo do que definir condições para maximizar o crescimento celular e depois induzir a expressão. Este problema serve como caso de estudo importante para o teste da abordagem clássica de otimização dinâmica em malha aberta (controle ótimo) em reator semi-contínuo.

É importante ressaltar que, até onde vai nosso conhecimento, não são encontrados dados na literatura sobre cultivos em batelada alimentada de *P. pastoris* crescendo em glicose como fonte de substrato e sem indução por metanol.

Assim, a definição de perfis de alimentação otimizados para esse tipo de cultivo é ponto original neste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pela própria natureza interdisciplinar desta dissertação, este é um capítulo abrangente, incluindo desde a discussão do uso da levedura *P. pastoris* na expressão de proteínas heterólogas até a aplicação da teoria de controle ótimo ao cultivo microbiano visando a altas densidades celulares. O estado da arte em cada um desses tópicos foi apresentado de forma sucinta nos itens que seguem, buscando-se sempre destacar as interconexões entre as várias áreas do conhecimento tratadas aqui.

### 2.1 *Pichia pastoris*

Apesar de *Pichia pastoris* ser disponível comercialmente há anos como célula hospedeira de proteínas heterólogas, ainda há muitos pontos a elucidar sobre o comportamento desta espécie de levedura (DE SCHUTTER et al., 2009). É uma levedura metilotrófica, o que significa que tem a habilidade de utilizar metanol como única fonte de carbono na ausência de fontes mais facilmente assimiláveis, como glicerol ou glicose.

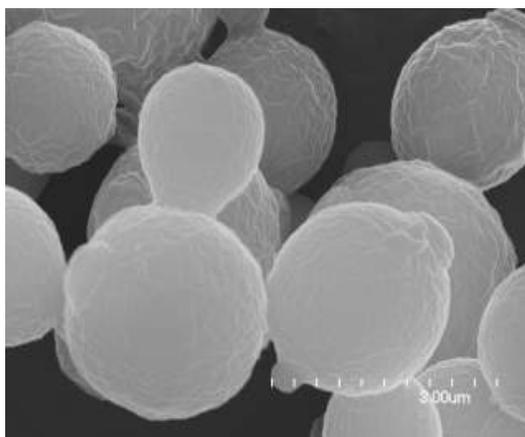


Figura 2.1 *Pichia pastoris*

Fonte: <http://www.hosp.u->

[toyama.ac.jp/blood/newhomepage/study/study63/idennsikumikaealbmin.files/slide1124\\_image009.jpg](http://toyama.ac.jp/blood/newhomepage/study/study63/idennsikumikaealbmin.files/slide1124_image009.jpg).

Acesso em: 04/02/2010)

*P. pastoris* é capaz de realizar modificações pós-tradução que são mais semelhantes às alterações que ocorrem em proteínas humanas do que *S. cerevisiae* consegue fazer. Combina as vantagens de eucariotos, como secreção eficiente para o meio e modificações pós-tradução (por exemplo, processamento proteolítico, glicosilação e formação de ligação dissulfeto), com um crescimento consistente em meio sintético, e com pouco risco de contaminação no caso de crescimento em metanol (HARTNER et al., 2008). Além disso, *P. pastoris* pertence ao grupo das leveduras Crabtree negativas, e tem uma demanda energética muito baixa para manutenção, o que a torna adequada para cultivos em alta densidade celular (JAHIC et al., 2002).

O efeito Crabtree, descrito em profusão para bactérias como *E. coli* e leveduras como *S. cerevisiae*, consiste no desvio de piruvato, proveniente da glicólise, para uma rota fermentativa, mesmo em condições plenamente aeróbicas. No caso de *E. coli*, observa-se primordialmente a fermentação acética, enquanto que *S. cerevisiae* prioriza a alcoólica. Este é um problema importante na otimização dos cultivos semi-contínuos, pois nesses casos velocidades específicas muito elevadas de crescimento celular, com abundância de glicose no meio, podem levar a aumento de concentração de acetato (no primeiro caso) ou etanol (no segundo) no meio. Esses metabólitos, excretados, podem ter efeito inibitório no crescimento do microrganismo e/ou na expressão da proteína recombinante (GANCEDO, 1998; LULI E STROHL, 1990). Por outro lado, esses compostos são reassimiláveis pelo microrganismo em situações de limitação de fontes preferenciais de carbono, o que deve ser considerado pelos modelos cinéticos de crescimento.

Em *P. pastoris* foi detectada a respiração resistente ao cianeto (CRR, do inglês), o que é comum entre leveduras Crabtree negativas, que não são capazes de fermentação aeróbica (VEIGA et al., 2003). A respiração de *P. pastoris* durante o crescimento exponencial foi prejudicada pela adição de cianeto, mas, ainda assim, baixos níveis de CRR foram observáveis (KERN et al., 2007).

Em contrapartida, o efeito *Pasteur* ocorre quando se observa limitação ou ausência de oxigênio no meio de cultivo (CARVALHO et al., 2007). A produção de ATP pelo catabolismo anaeróbico é muito inferior à produção aeróbica. Isso pode levar ao aumento do fluxo metabólico dada rota glicolítica, para suprir a demanda energética da célula.

Como se verá no próximo subitem, este trabalho de mestrado enfocou o cultivo de linhagem de *P. pastoris* recombinante para a qual uma construção não-

convencional foi empregada: expressão constitutiva da proteína heteróloga, associada ao gene de enzima da rota glicolítica. Com isso, pode-se levantar a hipótese de que o cultivo da levedura *P. pastoris* com baixos níveis de oxigênio, de forma a induzir o efeito Pasteur, pode levar a um aumento do fluxo metabólico até o piruvato e, em consequência, a uma maior produção da enzima por cada célula viável. Por outro lado, ao se trabalhar nessa região, ao crescimento celular torna-se mais lento. Recai-se, assim, claramente em um problema de otimização das condições de aeração do cultivo, tendo como objetivo maximizar a produtividade em termos da enzima desejada.

### **2.1.1. Expressão em *Pichia pastoris***

Neste trabalho utilizam-se duas construções distintas para *P. pastoris*: vetores de expressão contendo o promotor *PGK1* (expressão constitutiva); e *AOX1* (expressão induzida) (Araujo, 2008).

A abordagem convencional para esse sistema emprega o promotor do gene *AOX1*. Nesse caso, utiliza-se metanol para a indução (MACAULEY-PATRICK et al., 2005), e há forte repressão quando as células crescem em glicose e na maioria das outras fontes de carbono. Nesse sistema de expressão, metanol induz o promotor álcool oxidase (*AOX1*), que controla o gene que codifica a expressão dessa enzima, que catalisa o primeiro passo no metabolismo do metanol. Esse primeiro passo consiste na oxidação do álcool em formaldeído e peróxido de hidrogênio (LEDEBOER et al., 1985).

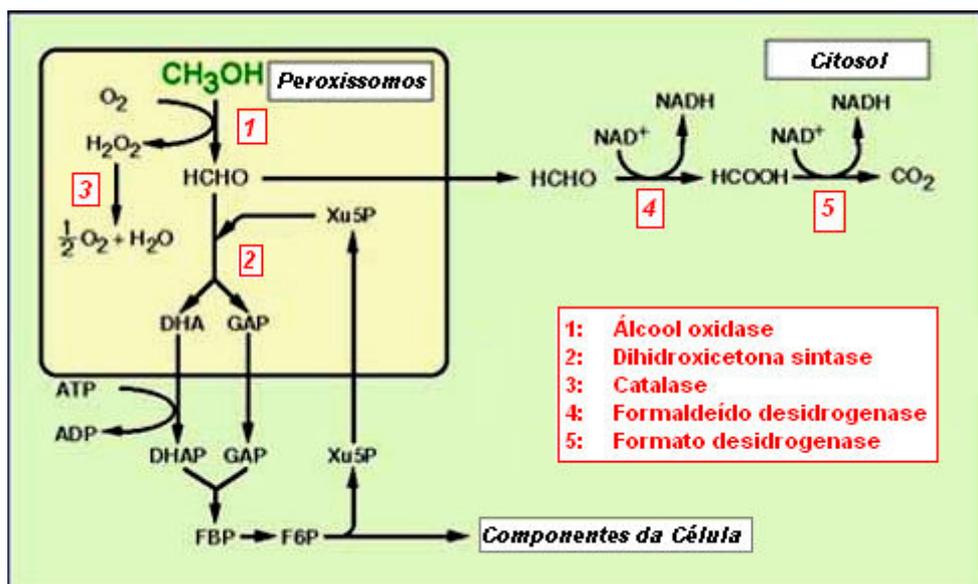


Figura 2.2 Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*.

Fonte: <http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp/english/MeOHmetab.jpeg>. Acesso em: 22/02/2010

Quando a levedura é cultivada em glicose, álcool oxidase não é detectada nas células. No entanto, usando metanol como substrato, álcool oxidase pode constituir até 35% do total de proteínas celulares (CREGG et al., 1985).

*P. pastoris* também é um organismo modelo importante para investigar a proliferação peroxissomal e assimilação de metanol. As enzimas essenciais para o metabolismo do metanol são compartimentadas em peroxissomos, que são responsáveis pelo armazenamento das enzimas diretamente relacionadas com o metabolismo do peróxido de hidrogênio, substância altamente tóxica para a célula. Neles está presente a enzima catalase, que transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A proliferação de peroxissomos é um reflexo das condições ambientais. Quando as células são cultivadas em glicose, poucos peroxissomos estão presentes. Quando cultivadas em metanol, eles podem ocupar até 80% do volume total de célula (CREGG et al., 1993).

Por outro lado, o promotor *PGK1* controla o gene que codifica a expressão da enzima glicolítica fosfoglicerato quinase, que transfere o grupo fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para a ADP, formando ATP e 3-fosfoglicerato (vide Figura 2.3). Assim, este promotor pode ser induzido por qualquer fonte de carbono cujo catabolismo seja direcionado à rota glicolítica, e está entre os mais eficientes sistemas usados para expressão constitutiva de proteínas heterólogas em diferentes leveduras e fungos filamentosos (BURKE et al., 2000). Assim, no caso de *P. pastoris*, pode servir como alternativa ao promotor *AOX1*.

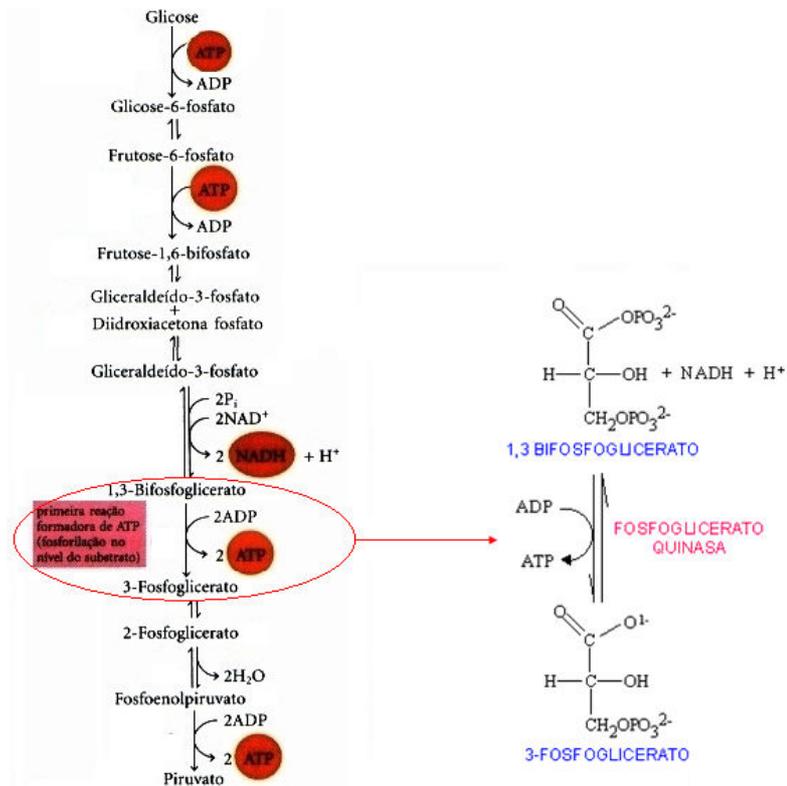


Figura 2.3 Via metabólica da glicose (glicólise).  
Fonte: LEHNINGUER et al. 2006

Este trabalho concentra-se principalmente na utilização do promotor PGK1, de acordo com a estratégia definida pelo grupo do Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres, do Departamento de Biologia Celular da UnB, que gentilmente cedeu uma cepa produtora de  $\alpha$ -amilase heteróloga. Ressalte-se que a proteína heteróloga é secretada, o que é uma vantagem em termos do custo de purificação (ALMEIDA et al., 2005).

### 2.1.2. Expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris*

A bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais frequentemente utilizado para a produção de DNA e proteínas recombinantes. Isto é devido à alta velocidade específica de crescimento e de produção de proteína de *E. coli*. As condições de crescimento são, também, pouco exigentes.

Expressão de proteínas em *E. coli* é normalmente mais rápida do que em *P. pastoris* por várias razões. As células competentes de *E. coli* pode ser armazenadas congeladas, enquanto que as células de *Pichia* têm de ser produzidas imediatamente antes do uso (DE SCHUTTER et al., 2009). Os rendimentos da expressão em *Pichia* variam entre os diferentes clones, e normalmente um grande número de clones devem ser rastreados para a expressão de proteínas antes que um bom produtor seja encontrado. Tempos de indução ótimos em *Pichia* são geralmente da ordem do dia, enquanto que *E. coli* geralmente alcança um rendimento ótimo poucas horas após a indução.

Uma grande diferença de *Pichia* sobre *E. coli* é que *Pichia* é capaz de produzir pontes dissulfeto e glicosilação em proteínas. Isso significa que, nos casos em que pontes dissulfeto sejam necessárias, *E. coli* pode produzir uma proteína que não esteja corretamente enovelada, que normalmente é inativa ou insolúvel.

*Saccharomyces cerevisiae* é também utilizada como um sistema de expressão, com vantagens semelhantes sobre *E. coli*. No entanto, *Pichia* tem duas vantagens principais sobre *S. cerevisiae*: em primeiro lugar, por ser uma levedura metilotrófica, pode ser facilmente cultivada em soluções de metanol razoavelmente concentradas, capazes de inativar a maioria dos outros microrganismos. Em segundo lugar, pode crescer em densidades celulares muito mais elevadas do que a levedura de panificação (DE SCHUTTER et al., 2009).

### **2.1.3. Cultivo de *P. pastoris* em alta densidade celular**

Como já se mencionou, uso de *P. pastoris* para a expressão de proteínas recombinantes tornou-se popular por várias razões: facilidade para manipulação genética e cultivo, meios de cultura simples e baratos, fácil escalonamento, possibilidade de crescer em alta densidade celular e, sendo um eucarioto, habilidade para produzir e secretar proteínas recombinantes solúveis, glicosiladas se necessário, e corretamente enoveladas (DALY E HEARN et al., 2005).

A expressão de proteínas heterólogas por *P. pastoris* pode, certamente, ser alcançada em culturas em câmara rotativa, mas os níveis de produção de proteínas são mais altos em culturas em fermentador, onde é factível o controle de agitação e aeração, de pH, de composição do meio (Cereghino et. al., 2002).

Por outro lado, a expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser intracelular ou secretada. *P. pastoris* secreta baixas quantidades de proteínas endógenas, inclusive proteases, e pode crescer em meio sintético, sem adição de proteínas adicionais, o que facilita ainda mais as etapas seguintes de purificação (TSCHOPP et al., 1987; BARR et al., 1992; CREGG E CEREGUINO, 2000).

Os fatores mais importantes que afetam a densidade celular e o rendimento de proteínas recombinantes são: taxa de aeração, controle de pH, alimentação de nutrientes (STRATTON et al. 1998). A seguir, a Tabela 2.1 apresenta um resumo dos resultados alcançados por alguns autores em cultivos em batelada alimentada de *P. pastoris*.

Tabela 2.1. Resumo de dados cinéticos obtidos por alguns autores no cultivo em batelada alimentada de *P. pastoris*.

Referência	Substrato	Reator (L)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$	$C_x^{\max}$ (g/l)
Jahic et al., 2002	Glicerol/Metanol	10	0,26	0,70	138
d'Anjou e Daugulis 1997	Glicerol/Metanol	10	0,25	0,42	85
Chiruvolu et al., 1997	Glicerol/Metanol	5	-	0,367- 0,202	52,79- 192,1
Hang et al., 2009	Glicose/Metanol	50	0,16	0,39	89

A estratégia mais usual para expressão de uma proteína heteróloga é promover o crescimento da biomassa para, a seguir, induzir a expressão. No presente caso, a expressão da PGA utilizando o promotor *PGK1* será associada ao crescimento, o que necessariamente fará com que parte do fluxo metabólico seja desviado para esse fim. Ou seja, a expressão desde o início do cultivo pode reduzir a velocidade de crescimento. Assim, o efeito final sobre a produtividade do biorreator com respeito à molécula recombinante é, claramente, um ponto em aberto, a ser avaliado a partir de resultados experimentais.

## 2.2. Penicilinas e Penicilina G acilase

Antibiótico é qualquer composto químico utilizado para eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos infecciosos. A penicilina é o antibiótico mais conhecido, e tem sido empregada para tratar múltiplas enfermidades, como a sífilis, a gonorréia, o tétano e a escarlatina, dentre outros.

As penicilinas são estruturas semelhantes que possuem um núcleo comum, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (ver Figura 2.4), que é responsável pela atividade antimicrobiana, embora isoladamente seja um composto inativo.

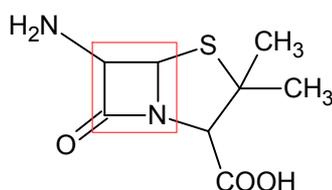


Figura 2.4 Anel  $\beta$ -lactâmico do 6-APA.

O 6-APA contém dois anéis, um de cinco átomos (anel tiazolidínico) e outro de quatro átomos, o anel  $\beta$ -lactâmico (vide Figura 2.4), que é responsável pela designação geral de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Baggaley et al., 1997). Dentre essas penicilinas se encontram a Penicilina G ou benzil penicilina, como mostrado na Figura 2.5, e a Penicilina V ou fenoximetil penicilina, como mostrado na Figura 2.6. Para a produção de Penicilina G durante um cultivo microbiano deve-se fornecer o ácido fenilacético (AFA), enquanto que, para a produção de Penicilina V, deve-se fornecer o ácido fenoxiacético (AFNA).

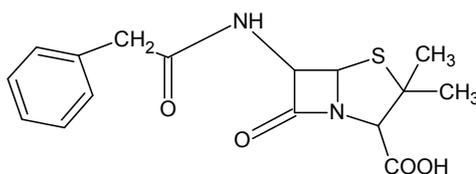


Figura 2.5 Penicilina G

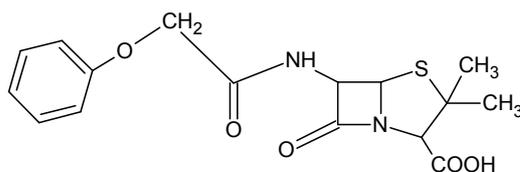


Figura 2.6 Penicilina V

Dependendo da forma de obtenção, as penicilinas podem ser classificadas em:

1. *Penicilinas biossintéticas ou naturais*: são obtidas diretamente de caldos de cultura de bioprocessos, de grande interesse industrial; as principais são a Penicilina G e a Penicilina V.
2. *Penicilinas Semi-sintéticas*: são obtidas a partir das penicilinas naturais após hidrólise por enzimas denominadas penicilinas acilase, que disponibilizam o 6-APA para posterior produção de penicilinas semi-sintéticas.

As penicilinas semi-sintéticas apresentam estabilidade em meio ácido, podendo assim ser administradas oralmente, melhor absorção, efetividade a baixa concentração para uma ampla variedade de organismos, além de menor número de efeitos colaterais que as penicilinas naturais (HOU E POOLE, 1969).

A penicilina G acilase (PGA) é uma das mais importantes enzimas utilizadas em escala industrial, catalisando (normalmente em processo com enzimas imobilizadas) a hidrólise de penicilina G (benzil penicilina), obtendo ácido fenilacético (AFA) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), que por sua vez, como já mencionado, é composto chave para síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos (SEVO et al., 2001). Depois da glicose isomerase, a PGA é a enzima mais amplamente usada em escala industrial (Shewale e Sivaraman, 1989).

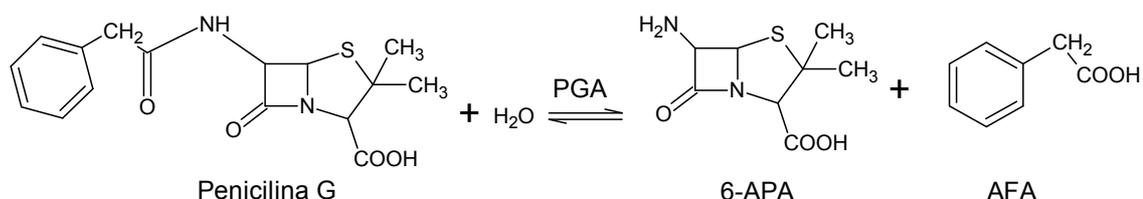


Figura 2.7 Reação de hidrólise enzimática da Penicilina G

Mais de 15 penicilinas semi-sintéticas derivadas do 6-APA são comercializadas atualmente, embora amoxicilina e amplicilina sejam de maior

relevância comercial (ILLANES et al., 1994). As penicilinas acilases mais importantes são a Penicilina G acilase e a Penicilina V acilase. Penicilinas acilases provenientes de bactérias têm maior afinidade para hidrolisar penicilina G e as provenientes de fungos e actinomicetos têm maior afinidade para hidrolisar a penicilina V (SAVIDGE, 1984).

As bactérias mais conhecidas que produzem PGA são: *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter viscosus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila* e *Providencia rettgeri* (SEVO et al., 2001). As bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* produzem PGA acumulada no espaço periplasmático (de forma intracelular), e para obter a enzima precisa-se de uma etapa de purificação na qual há ruptura das células, encarecendo os custos para sua recuperação. As bactérias Gram-positivas como *Bacillus megaterium* produzem PGA de forma extracelular, diminuindo os custos de sua recuperação (SADVIGE E COLE, 1975).

PGAs produzidas por diferentes microrganismos naturalmente apresentam características, propriedades e valores de parâmetros cinéticos diferentes. PGA de *E. coli* tem em torno de 120 kDa (SADVIGE E COLE, 1975) e a de *B. megaterium* em torno de 90 kDa (YANG et al., 2006).

### 2.3 $\alpha$ - Amilase

O amido é um polímero de D-glicose onde as moléculas são unidas entre si por ligações O-glicosídicas (LEHNINGER et al, 2002). Moléculas de amido são compostas por centenas ou milhares de átomos, que vão de cinquenta a vários milhares. Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: amilose e amilopectina.

Amilose é um polímero linear que constitui aproximadamente 20% do amido, consistindo em 500 a 20000 unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, que conferem à molécula uma estrutura helicoidal.

Amilopectina constitui aproximadamente 80% do amido, formada por aproximadamente 1400 unidades de D-glicose, ligadas por cadeias lineares unidas

por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, ocorrendo também ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 (cadeias laterais).

Grande variedade de microrganismos usa enzimas hidrolíticas para degradar o amido, para servir como fonte de energia. Alguns dos grupos de enzimas de degradação do amido são:

### 2.3.1. Endoamilases:

Endoamilases são enzimas capazes de quebrar as ligações glicosídicas presentes na parte interna (endo-) da cadeia de amilose e amilopectina. A  $\alpha$ -amilase é uma endoamilase bem conhecida (GALDINO, 2008).

$\alpha$ -amilases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de polissacarídeos, como glicogênio e amido. Esta enzima (vide Figura 8) não hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina nem ligações  $\alpha$ -1,4 próximas às  $\alpha$ -1,6. Assim, o produto da hidrólise de amido por  $\alpha$ -amilase são oligossacarídeos, denominados dextrinas-limite, além de maltose e glicose. A clivagem do amido pela  $\alpha$ -amilase constitui o primeiro passo na degradação enzimática de polissacarídeos, o que é essencial na assimilação de carboidratos. Para completar a hidrólise enzimática de amido, então, é necessário utilizar um exoamilase, como a amiloglicosidase (ou glicoamilase).

A  $\alpha$ -amilase foi isolada de vários fungos, leveduras e bactérias. Tem aplicação em setores industriais, como o alimentício (liquefação do amido, cervejas, panificação), biocombustíveis (com destaque para o etanol produzido a partir de milho, nos EUA; ou de mandioca, como na Tailândia, Nguyen et al, 2007), indústria têxtil, papel e celulose, de couro, detergentes, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003).

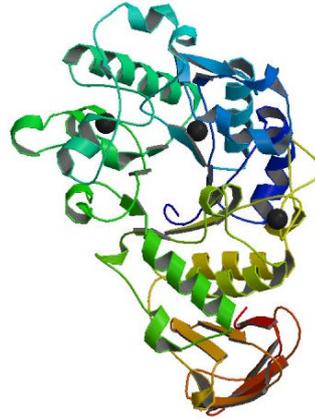


Figura 2.8 Estrutura tridimensional da amilase de *Bacillus sp.*  
Fonte: RCSB PDB Protein Data Bank.

### 2.3.2. Exoamilases:

As exoamilases agem sobre os resíduos externos de glicose da amilose e da amilopectina produzindo somente glicose. Entre as enzimas pertencentes a esta classe, destacase a glicoamilase. A glicoamilase é capaz de hidrolizar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 em amido solúvel e oligossacarídeos relacionados com inversão da configuração para produzir  $\beta$ -glicose. Além da atividade  $\alpha$ -1,4, a enzima hidrolisa lentamente as ligações  $\alpha$ -1,6 do amido (GALDINO, 2008).

### 3. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA DE CONTROLE ÓTIMO

Muitos cultivos em biorreator são operados em regime de batelada alimentada, levando a produtividades maiores do que a resultante a partir de operação em batelada.

O problema de otimização de biorreatores semi-contínuos usualmente consiste na determinação de perfil de alimentação de substrato, com o propósito de maximizar o crescimento de biomassa e/ou a produtividade do biorreator em termos da biomolécula de interesse. Trata-se de sistema não-linear, e seu controle ótimo recai em um problema do tipo arco singular, uma vez que as variáveis de controle aparecem de forma linear no modelo e no índice desempenho. (TEBBANI et al., 2007). Esse é o caso quando o controle é a vazão mássica de substrato alimentado, como ficará claro nas equações de balanço mostradas no item 3.2.

O controle ótimo em malha aberta consiste na determinação prévia de um perfil otimizado de alimentação de meio suplementar, sem utilizar informações obtidas em tempo real durante o cultivo. Esse enfoque tem, certamente, limitações quando, como é o caso de sistemas biológicos, há grande variabilidade do modelo cinético que serve de base aos cálculos. De qualquer forma, esta abordagem é uma primeira etapa no estudo da otimização de cultivos reais e, nessa perspectiva, foi a metodologia empregada neste mestrado.

A determinação da trajetória ótima da variável de controle pode ser realizada mediante a aplicação do Princípio de Máximo de Pontryagin (RAMIREZ, 1994), que transforma o problema de otimização em um problema de valor de contorno em dois pontos (*two point boundary value problem* "TPBVP"). No entanto, resolver esse problema é numericamente difícil, pois o problema é sensível à inicialização (TEBBANI et al., 2007).

O primeiro passo no desenvolvimento da formulação matemática para a obtenção dos algoritmos de controle ótimo é a descrição, por meio das equações de estado, da dinâmica do sistema a ser controlado. A formulação apresentada aqui segue a nomenclatura de Ramirez, (1994). As equações de estado são

apresentadas geralmente como um conjunto de equações diferenciais de primeira ordem do tipo:

$$\frac{d\underline{x}}{dt} = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), t) = \underline{\dot{x}} \quad (1)$$

Onde  $\underline{x}(t)$ , o vetor de variáveis de estado de dimensão  $n$ , no tempo  $t$ ,  $\underline{u}(t)$  é o vetor de controle de dimensão  $m$ , que especifica as variáveis de entrada no modelo do sistema,  $\underline{f}$  é o vetor de funções ( $n \times 1$ ), e  $\underline{\dot{x}}$  é o vetor das derivadas do estado, calculadas pelas equações diferenciais que constituem o modelo. As letras ou símbolos com um traço em baixo indicam vetores e com dois traços, matrizes.

Junto às equações de estado, temos um conjunto de condições de contorno e restrições sobre as variáveis de estado, no tempo inicial, final, e ao longo da trajetória (equações 2a). Nesta formulação, o modelo do sistema é reescrito como restrições de igualdade do problema de otimização (equação 2b):

$$\begin{aligned} \underline{x}(t_0) &= \underline{x}_0 \\ \underline{S}(\underline{x}(t), \underline{u}(t)) &\leq \underline{0} \end{aligned} \quad (2a)$$

$$\underline{T}(\underline{x}(t_f)) \leq \underline{0}$$

$$\underline{g} = \underline{0} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) - \underline{\dot{x}}(t) \quad (2b)$$

Onde  $\underline{x}_0$  é o vetor de condições iniciais, que geralmente é conhecido,  $\underline{g}$  é o vetor de restrições de igualdade sobre a trajetória (o modelo),  $\underline{S}$  é o vetor de restrições de desigualdade sobre a trajetória, e  $\underline{T}$  é o vetor de restrições de desigualdade no estado final.

O propósito do problema de controle ótimo é determinar a política de controle que vai maximizar ou minimizar um específico índice de desempenho, sujeito a restrições impostas pela natureza física do problema. No problema de controle ótimo de sistemas dinâmicos, requer-se buscar o extremo de um índice de desempenho  $J$ , o qual é função de variáveis de estado,  $\underline{x}$ , variáveis de controle,  $\underline{u}$ , as quais são função do tempo,  $t$ . Então, o funcional  $J$  é uma função de funções.

O índice de desempenho deve ser escolhido para que a otimização resulte em uma lei de controle implementável. A forma geral do índice de desempenho é:

$$J = h(\underline{x}(t_f), t_f) + \int_{t_0}^{t_f} F(\underline{x}, \underline{u}, t) dt \quad (3)$$

Onde  $F$  é um escalar, e o primeiro termo de (3) é a contribuição do estado final para o índice de desempenho, algo que acontece com frequência nos problemas de controle ótimo.

Uma vez que este é um problema de otimização com restrições, pode-se introduzir o Lagrangiano

$$L = F(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\lambda}^T (\underline{f} - \dot{\underline{x}}) \quad (4)$$

Onde  $\underline{\lambda}(t)$  é o vetor das variáveis adjuntas (também chamadas variáveis de co-estado) de dimensão  $n$  (multiplicadores dinâmicos de Lagrange). O funcional aumentado, se não se considerar na sua definição o termo relacionado ao estado final,  $h$ , fica então:

$$J_A = \int_{t_0}^{t_f} L(\underline{x}, \dot{\underline{x}}, \underline{u}, \underline{\lambda}, t) dt \quad (5)$$

### 3.1 Princípio do Máximo de Pontryagin

O Princípio do Máximo de Pontryagin (ou Mínimo, dependendo da formulação do problema) permitiu a inclusão de restrições sobre as variáveis de controle. Este problema pode ser transformado em um problema de dois pontos de valores de contorno a través da introdução de um vetor das variáveis adjuntas ( $\underline{\lambda}(t)$ ). O problema então, consiste em dois conjuntos de equações diferenciais, as equações dinâmicas do modelo matemático e as equações diferenciais das variáveis adjuntas, unidas por uma condição de otimização. Para um dos conjuntos são conhecidas somente condições iniciais e para o outro, somente condições finais. Uma dedução detalhada do equacionamento resultante pode ser encontrada em Raimirez, (1994), pgs. 86-93. Aqui, reportam-se apenas as equações resultantes.

As condições necessárias para a otimização, na presença restrições sobre  $\underline{u}(t)$ , são convenientemente expressadas em termos do "Hamiltoniano" ( $H$ ), o índice de desempenho é maximizado/minimizado, maximizando-se/minimizando  $H$ :

$$\max_{\underline{u}(t), t_f} H = F(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) \quad (6)$$

Aplicando o Princípio do Máximo de Pontryagin, um conjunto de condições necessárias para maximizar ou minimizar o funcional são definidas como:

$$\text{Equação de Euler-Lagrange: } \underline{\dot{\lambda}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}} \quad (7)$$

$$\text{Relações de Restrição: } \underline{\dot{x}} = \underline{f} = \frac{\partial H}{\partial \underline{\lambda}} \quad (8)$$

$$\text{Transversalidade: } \left[ \frac{\partial h}{\partial \underline{x}}(t_f) - \underline{\lambda}(t_f) \right]^T \delta \underline{x}_f + \left( H(t_f) + \frac{\partial h}{\partial t}(t_f) \right) \delta t_f = 0 \quad (9)$$

$$\text{Controle Ótimo: } \frac{\partial H}{\partial \underline{u}} = \underline{0} \quad (10)$$

Uma solução do tipo *bang-bang* (com o controle assumindo os valores das restrições superior e inferior, de forma alternada) é regida pelo sinal da equação (11):

$$\frac{\partial^2 H}{\partial \underline{u}^2} = \underline{\xi} \quad (11)$$

Se  $\underline{\xi} > 0$ , então o valor da variável de controle que minimiza o Hamiltoniano será o seu valor mínimo,  $\underline{u}^{\min}$ , se  $\underline{\xi} < 0$ , então o valor da variável de controle que minimiza o Hamiltoniano será o seu valor máximo  $\underline{u}^{\max}$ , se  $\underline{\xi} = 0$ , então recai-se em um arco singular.

### 3.2 Modelo matemático do biorreator

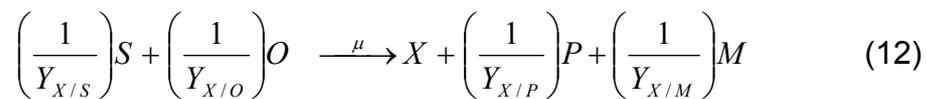
Os modelos matemáticos têm um papel fundamental no desenvolvimento de sistemas de controle, pois fornecem uma relação funcional entre as variáveis envolvidas no processo.

Neste trabalho, é proposto um modelo simplificado para a descrição do processo de crescimento de *Pichia pastoris*, não estruturado e não segredado, composto por um conjunto de equações diferenciais ordinárias não lineares, de

primeira ordem. Para tanto, utiliza-se a formulação de Nielsen et al. (2003). Em todo o equacionamento que segue, admite-se que o biorreator semi-contínuo, operado em batelada alimentada, é de mistura ideal.

A rota metabólica considerada para o crescimento de *P. pastoris*, assumindo implicitamente que os demais nutrientes presentes no preparo do meio de cultivo, com exceção de glicose (e oxigênio), não são limitantes esta descritas a seguir:

Crescimento por rota oxidativa em glicose:



Como se observará no capítulo de resultados, nas corridas realizadas em biorreator o controle de oxigênio dissolvido nunca saturou, ou seja, foi possível sempre manter o nível de oxigenação definido como *set-point*, mesmo para densidades celulares elevadas. A baixa velocidade específica de crescimento dessa levedura, quando comparada com bactérias como a *E. coli*, contribuiu para esse fato. Entretanto, a presença de um metabólito ainda não identificado (*M*) foi detectada, o que leva à utilização neste modelo de cinéticas de crescimento com diferentes formas de inibição (Equação 18).

A Figura 3.1 mostra um esquema do biorreator, com as vazões mássicas usadas nos balanços.

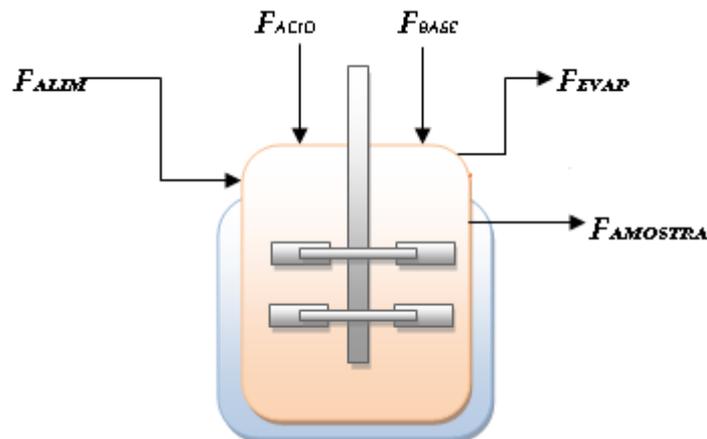


Figura 3.1 Esquema de um biorreator operando em batelada alimentada.

Admitindo densidade do meio invariante, reator ideal (de mistura perfeita) e vazões  $F_{ACIDO}$ ,  $F_{BASE}$ ,  $F_{EVAP}$  não significativas, obtém-se :

$$\frac{dV}{dt} = F_{ALIM} - F_{AMOSTRA} \quad (13)$$

Onde:

$F_{ALIM}$  : Vazão volumétrica de meio suplementar (L/h).

$F_{ACIDO}$  : Vazão volumétrica de ácido (L/h).

$F_{BASE}$  : Vazão volumétrica de base (L/h).

$F_{EVAP}$  : Vazão volumétrica de meio evaporado do reator (L/h).

$F_{AMOSTRA}$  : Vazão volumétrica extraída para amostragem (L/h).

$V$  = volume útil do reator (L)

Assim foram obtidas a seguintes equações, que constituem o modelo matemático do biorreator:

*Balanço de Células:* 
$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d - D).X \quad (14)$$

*Balanço de Substrato:* 
$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m\right) \cdot X + (S_{ALIM} - S).D \quad (15)$$

*Balanço de Produto:* 
$$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \mu \cdot X - D.P \quad (16)$$

*Balanço de Metabólito:* 
$$\frac{dM}{dt} = \beta \cdot \mu \cdot X - D.M \quad (17)$$

Onde:

$$D = \frac{F_{ALIM}}{V}$$

$\mu$  = velocidade de crescimento celular (1/h)

$$\alpha = \left(\frac{1}{Y_{X/P}}\right)$$

$$\beta = \left(\frac{1}{Y_{X/M}}\right)$$

$k_d = \text{coeficiente de morte celular (1/h)}$

$m_x = \text{coeficiente de manutenção (1/h)}$

As cinéticas de crescimento podem ser definidas usando a equação de Monod, aqui também incluindo diferentes formas de inibição pelo metabólito indesejado  $M$ :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + \frac{K_S}{K_I} M^2} \quad (18a)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \frac{K_I}{K_I + M} \quad (18b)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \left( 1 - \frac{M}{K_I} \right) \quad (18c)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad (18d)$$

Note-se que a equação (18e) corresponde ao modelo de Monod sem inibição.

Reformulando o problema, em termos matriciais obtemos:

$$\dot{\underline{x}} = \underline{A}\underline{x} - \underline{x}u + \underline{B}u$$

Onde:

O vetor de variáveis de controle, neste caso, tem dimensão  $1 \times 1$ ,  $u=D$ .

$$\dot{\underline{x}} = \frac{d}{dt} \begin{vmatrix} X \\ S \\ P \\ M \end{vmatrix}; \quad \underline{x} = \begin{vmatrix} X \\ S \\ P \\ M \end{vmatrix} \quad (19)$$

$$\underline{A} = \begin{vmatrix} (\mu - k_d) & 0 & \dots & 0 \\ -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m\right) & 0 & \dots & 0 \\ \alpha \cdot \mu & 0 & \dots & 0 \\ \beta \cdot \mu & 0 & \dots & 0 \end{vmatrix}_{4 \times 4}; \quad \underline{B} = \begin{vmatrix} 0 \\ S_{ALIM} \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix}; \quad (20)$$

Note-se que esse equacionamento assume que ocorre produção de enzima recombinante e de metabólito indesejado de forma associada ao crescimento, e em presença de oxigênio. Essa hipótese é consistente com o uso do promotor *PGK1*, associado a enzima da rota glicolítica, e com o fato, observado experimentalmente, de que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo pôde sempre ser controlada em 30% da saturação pelo sistema de agitação e aeração (eventualmente utilizando ar enriquecido por oxigênio). No caso do promotor *AOX1*, esse equacionamento deve ser alterado, de forma a associar o produto desejado ao consumo do indutor, metanol.

**Perfil exponencial de alimentação:** A abordagem clássica para definição de um perfil de alimentação em um biorreator semi-contínuo parte da idéia de se manter a concentração de um substrato limitante (suposto único) em um valor constante,  $S_0$ , geralmente baixo, para se evitar rotas catabólicas indesejadas. Assim,  $dS/dt = 0$ , vide Nielsen et al., (2003) para a dedução detalhada da equação do perfil de alimentação, equação (21). É importante observar que a hipótese subjacente nessa formulação é que a velocidade específica de crescimento,  $\mu$ , depende apenas da concentração do substrato limitante (ou seja, se não considerarmos efeitos inibitórios por produtos, e assumirmos que há um único substrato limitante). Nesse caso, se  $S$  for constante,  $S = S_0$ ,  $\mu$  também o será,  $\mu = \mu_0$ .

$$F_{ALIM} = \frac{\mu_0 X_0 V_0}{(S_{ALIM} - S_0) Y_{X/S1}} \exp(\mu_0 (t - t_o)) \quad (21)$$

Onde  $S_0, X_0, V_0, t_o$  são valores no final da fase em batelada.  $\mu_0$  é a velocidade específica crítica de crescimento, correspondente à concentração de glicose  $S_0$ , que se deseja manter. A idéia por trás dessa estratégia é evitar que o microrganismo cresça a velocidades superiores à crítica, pois nessa situação seu metabolismo seria desviado para rotas catabólicas indesejadas. Quando o microrganismo é Crabtree positivo, como *E. coli* ou *S. cerevisiae*, poderia iniciar-se uma fermentação aeróbica (principalmente acética, no primeiro caso, e etanólica, no segundo). No caso de *P. pastoris*, o acúmulo excessivamente rápido de biomassa poderia resultar em limitação de oxigênio dissolvido, ao menos localmente (pois a hipótese de reator de

mistura ideal pode ser prejudicada em altas densidades celulares), levando à fermentação anaeróbica.

Ressalte-se que a equação (21) é o clássico perfil exponencial de alimentação, frequentemente utilizado em cultivos de alta densidade celular, mas que se baseia, de fato, em um modelo extremamente simplificado da cinética de crescimento sendo, portanto, pouco mais que um formulação heurística do problema.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descrevem-se os materiais e métodos utilizados durante a dissertação. Incluem-se neste capítulo os cultivos de *Pichia pastoris* em câmara rotativa (*shaker*) e em biorreator; bem como as análises das amostras para acompanhamento das variáveis de interesse e da produção da enzima. É importante ressaltar que os meios e procedimentos descritos a seguir para cultivo da levedura expressando  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis* são os mesmos a serem utilizados na expressão da PGA de *B. megaterium*.

A clonagem da PGA está presentemente sendo feita em colaboração com o grupo do Prof. Fernando Torres, da UnB, pela Dra. Mônica Rosas da Costa lemma, do laboratório de Engenharia dos Processos Enzimáticos (LabEnz), coordenado pela Profa. Raquel Giordano, do DEQ/UFSCar. As técnicas requeridas para a manipulação molecular de *P. pastoris*, tais como transformação, substituição gênica e clonagem por complementação funcional, são semelhantes às descritas para *S. cerevisiae*, um dos mais bem caracterizados sistemas genéticos. A forma preferencial de transformação em *P. pastoris* é pela integração cromossomal (Araujo 2008). No DEQ/UFSCar, a Dra.lemma realizou a síntese do gene da PGA, seguida pela construção de um vetor de expressão baseado no vetor comercial da série pPICZ $\alpha$  (Invitrogen), que possui o gene *Sh ble* de resistência a zeocina como marca de seleção para bactérias e leveduras, no qual o promotor *AOX1* foi substituído pelo promotor *PGK1*. A partir daí, segue a clonagem do gene da PGA e transformação de *P. pastoris* GS115 por eletroporação. Faz-se então um *screening* de colônias crescidas em placa e uma análise da quantidade de cópias integradas. Esse sistema foi clonado em paralelo com o desenvolvimento desta dissertação, em um trabalho de biologia molecular ainda não concluído, pois aparentemente ocorre glicosilação indesejada da PGA. Atualmente, estuda-se como alternativa a possibilidade de desglicosilar enzimaticamente a enzima. Como não se obteve ainda PGA em forma ativa, enquanto prossegue a pesquisa na biologia molecular desse sistema, utilizou-se aqui, como estudo de caso para otimizar as condições de cultivo, o vetor fornecido pelo Prof. Torres, expressando  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*.

## 4.1 Microorganismo

*Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen USA). Possui o promotor PGK1, região terminadora do gene *AOX1* de *P. pastoris*, o gene da  $\alpha$ -amilase (Amy) de *B. subtilis* clonado e o gene *Sh ble* de resistência a zeocina como marca de seleção.

## 4.2 Meios de Crescimento e Produção

Em todos os casos de preparação do meio de crescimento, a fonte de carbono foi esterilizada separadamente dos demais nutrientes. As condições de esterilização foram 120°C durante 20 min. A solução de sais foi esterilizada por filtração usando filtros de 0,22 $\mu$ m.

### 4.2.1 Meio sólido

Este meio contendo zeocina, sempre na concentração final de 100 $\mu$ g/mL, foi utilizado para obter colônias isoladas de *Pichia pastoris*. Sua composição é dada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Composição do meio agar-YPD

<b>Nutrientes</b>	<b>Meio YPD Agar (g/L)</b>
Extrato de levedura	10
Peptona	20
Glicose	20
Agar bacteriológico	20

### 4.2.2 Meios líquidos

Ao longo deste trabalho de mestrado foram realizados experimentos em meio complexo e meio sintético. O meio YPD (meio complexo) (ALMEIDA et al., 2005) foi utilizado nos experimentos F1, F2, B1, B2, B3, B4 e B6. Já o meio BSM (meio sintético) (CREGG, 2007) foi utilizado nos experimentos F3 e B5. Os ensaios F1 a F3 foram realizados em frascos agitados e os ensaios B1 a B6 foram realizados em biorreator automatizado. As composições das soluções utilizadas na preparação dos meios de crescimento e produção estão apresentadas nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2 Composição do meio complexo líquido YPD.

<b>Nutrientes</b>	<b>Meio YPD (g/L)</b>
Extrato de levedura	10
Peptona	20
Glicose	20

O meio BSM forma precipitados a pH maiores que 5,0 como resultado da baixa solubilidade dos fosfatos de cálcio e magnésio. O pH deste meio é aproximadamente 1,5, e deve ser ajustado dentro do reator com uma solução concentrada de hidróxido de amônio (28% NH<sub>3</sub>), que serve como fonte de nitrogênio durante a fermentação.

Tabela 4.3 Composição do meio sintético de cultivo

<b>Nutrientes</b>	<b>BSM</b>	<b>BSM modificado</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	26,7 mL/L	4,25 mL/L
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,93 g/L	0,93 g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,2 g/L	18,2 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	14,9 g/L	14,9 g/L
KOH	4,13 g/L	4,13 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	5 g/L
Glicose	40 g/L	40 g/L

O meio BSM pode ser modificado com o objetivo de minimizar a precipitação, reduzindo a quantidade de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% de 26,7 mL/L a 4,25 mL/L, e

com a adição de 5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O pH depois da autoclavagem é igual aproximadamente a 4,5. No experimento F3 foi utilizado o meio BSM modificado e no experimento B5 o meio BSM.

Para os ensaios em batelada alimentada (B3, B4 e B6) o meio suplementar consistiu de uma solução de 500 g/L de glicose e 12 mL/L de solução de metais PTM1 (vide Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Composição da solução de metais usada no meio suplementar.

<b>Nutrientes</b>	<b>PTM1</b>
ZnCl <sub>2</sub>	20 g/L
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	65 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	6 g/L
KI	0,8 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3 g/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	5 mL/L
Biotina	0,2 g/L
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 g/L

### 4.3. Produção da enzima heteróloga em frascos agitados

#### 4.3.1. Preparação de Placas de Petri em meio com agar

*Pichia pastoris* foi armazenada como células vegetativas em Eppendorfs estéreis contendo 900 µL de caldo fermentativo junto com 100 µL de solução crioprotetora de glicerol 80% v/v, em ultrafreezer a -70°C.

Em placas de Petri estéreis foram adicionados 20  $\mu$ L de zeocina e 20mL de meio de cultura YPD agar (vide Tabela 2.1) o qual foi previamente fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação, com auxílio de uma alça de platina estéril, raspou-se o Eppendorf que continha o microorganismo e espalhou-se sobre a placa de forma homogênea. As placas foram incubadas a 30°C durante dois dias.

#### **4.3.2 Preparação do inóculo**

Realizada em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 10 mL de meio YPD (vide Tabela 4.2). Após a adição de uma colônia isolada do microorganismo crescida em placa, os meios de germinação eram mantidos a 30°C e 250 rpm, permanecendo as células de *Pichia pastoris* incubadas durante 12h.

#### **4.3.3 Condições de cultivo**

Após 12 h de incubação, o inóculo foi transferido a frasco de 1000 mL contendo 200 mL do meio YPD, e incubado em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm. O pH foi corrigido para 6,5 utilizando soluções de NaOH e HCl 1M (no meio complexo), e medido também ao final dos cultivos. A adição de 10 mL de inóculo dava início aos cultivos, que se prolongavam por aproximadamente 100 h.

#### **4.3.3.1 Ensaio F1: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, meio YPD com 20 g/L Glicose**

Esse experimento foi realizado com o objetivo do levantamento de dados para definição de modelo cinético de crescimento e produção. Os ensaios foram realizados em triplicata e todos os cultivos partiram do mesmo inóculo. Neste ensaio o meio utilizado foi o YPD (Tabela 4.2) com 20 g/L de glicose, e o pH foi ajustado em 6,5 utilizando soluções de NaOH e HCl 1M. O *shaker* utilizado foi da marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC.

Foram realizadas análises da concentração de glicose, dos metabólitos e atividade enzimática com amostras retiradas dos três ensaios ao longo do cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da densidade ótica do caldo e o peso de célula seca foi determinado por centrifugação do caldo de cultivo e posterior secagem em estufa a 60 °C (vide item 4.5). Foi feito acompanhamento em microscópio como forma de controle da pureza do cultivo.

#### **4.3.3.2 Ensaio F2: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio YPD com 20 g/L Glicerol**

Neste experimento o microrganismo foi cultivado utilizando o meio YPD com 20 g/L de glicerol em lugar da glicose, e o pH foi ajustado em 6,5 utilizando soluções de NaOH e HCl 1M. O *shaker* utilizado foi da marca MARCONI.

É importante ressaltar que a grande maioria dos dados encontrados na literatura sobre cultivos de *P. pastoris* utilizam glicerol como fonte de carbono, e indução por metanol devido ao uso do promotor *AOX1*. Este promotor é fortemente reprimido na presença de glicose no meio de cultivo.

O promotor *PGK1* pode ser induzido por diferentes fontes de carbono, apresentando alta transcrição em meio com D-glicose. Com este ensaio pretende-se comparar a expressão da enzima em presença de uma fonte de carbono diferente da glicose.

#### **4.3.3.3 Ensaio F3: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio BSM com 20 g/L Glicose**

Este experimento teve como objetivo avaliar o crescimento de *Pichia pastoris* no meio sintético utilizando 20 g/L de glicose como fonte de carbono. O meio sintético, por ter na sua composição substâncias de estrutura química definida, facilitaria o entendimento do processo e a realização dos balanços de massa. O shaker utilizado foi da marca MARCONI.

Foi escolhido o meio BSM (vide Tabela 4.3) por ser o meio mais comumente encontrado na literatura (CREGG, 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata. Devido a que não é possível implementar um controle de pH nos ensaios em frascos agitados, utilizou-se o meio BSM modificado, que apresenta  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na sua formulação, deixando o pH próximo a 5,0 depois da autoclavagem.

#### **4.4 Produção da enzima heteróloga em Biorreator de 5L**

Os experimentos foram realizados em biorreator tipo tanque agitado, encamisado e aerado, com capacidade de 5L, conectado a um analisador de gases (Sick/Maihak S.710). Fluxômetros de massa (GFC AALBORG) foram empregados para suprir ar e oxigênio. O biorreator está equipado com um sensor de capacitância Biomass System (FOGALE nanotech) encarregado de proporcionar em tempo real dados de viabilidade do microrganismo e de condutividade do meio. A agitação ficou entre 200 e 700 rpm e a entrada de ar ou ar enriquecido com  $\text{O}_2$  entre 1 e 2 VVM. Agitação e aeração foram ajustadas ao longo dos cultivos para garantir que a concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido fosse mantida em 30% da saturação (eletrodo Metler Toledo, modelo CE, O2 4050). A temperatura foi mantida em 30°C. O controle de pH foi realizado pela adição de solução de 28%(v/v) de  $\text{NH}_3$  e 10%(v/v) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . O

conjunto experimental foi monitorado por um sistema que utilizava o ambiente LabView (National Instruments) (REIS, 2009).

#### **4.4.1 Preparação do pré-inóculo e inóculo**

##### **4.4.1.1 Preparação do pré-inóculo**

Realizada passando uma única colônia crescida em placa (vide item 2.2.1) para um frasco estéril de 500 mL contendo 10 mL de meio YPD (vide Tabela 2.2). O pH foi corrigido para 6,5 utilizando soluções de NaOH e HCl 1M. Após adição do microrganismo, os meios de germinação eram mantidos a 30°C e 250 rpm, permanecendo as células de *Pichia pastoris* incubadas durante 24h.

##### **4.4.1.2 Preparação do inóculo**

Após 24 h de incubação o pré-inóculo foi transferido para frasco de 1000 mL contendo 200 mL do meio YPD e incubado em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm durante 24h.

Após ler a densidade ótica do inóculo, este foi centrifugado por 20 minutos a 14000g (4000 rpm) em uma centrífuga refrigerada EPPENDORF, modelo 5810R a 4°C, em frascos de centrifuga de 400 mL. Foi inoculado ao reator o volume de meio suficiente para obter uma DO inicial no biorreator de aproximadamente 1,5. O sobrenadante foi descartado deixando aproximadamente 20 mL de meio para re-suspender as células. O biorreator foi inoculado com 20 mL de solução concentrada de células.

#### **4.4.2 Preparação do Cultivo em biorreator**

Após esterilização do biorreator, do meio de cultivo, da alimentação e demais soluções, um volume de inóculo, de aproximadamente 20 mL, foi adicionado a 4L de volume de meio inicial, dando início ao processo fermentativo que se prolongava por aprox. 100 h.

Os valores experimentais da fase exponencial do cultivo F1, conduzido em frascos agitados em triplicata, foram utilizados para a determinação dos valores dos fatores de conversão e da velocidade máxima específica de crescimento do microrganismo. Os parâmetros estimados foram utilizados para o planejamento do primeiro cultivo em biorreator em regime de batelada simples.

Utilizou-se um perfil de alimentação exponencial após a fase de batelada para prolongar a fase *log* de crescimento, o perfil de alimentação para os cultivos em biorreator, B2 a B6, foi obtido por simulações realizadas previamente a partir de dados cinéticos de crescimento celular provenientes do ensaio em batelada simples (B1). Amostras retiradas em intervalos definidos de tempo foram utilizadas para determinação da concentração celular. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e acompanhamento do consumo dos nutrientes e do perfil dos produtos.

##### **4.4.2.1 Cultivo em meio complexo**

Na primeira fase do processo, o reator contendo 4L de meio YPD com 20 g/L de glicose como fonte de carbono foi inoculado como explicado anteriormente. O meio suplementar era composto por uma solução de 500g/L de glicose e 12 mL/L de solução de metais (PTM1). Depois de aproximadamente 10h de cultivo em batelada, quando a concentração de glicose atingiu valores inferiores a

3g/L, foi dado início à batelada alimentada. A alimentação era feita até que fosse alcançado o volume de trabalho do reator (5L).

#### **4.4.2.1.1 Ensaio B1: Cultivo em batelada simples, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase**

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo YPD, tendo como objetivo o levantamento de dados experimentais a serem utilizados posteriormente para definição de modelo cinético de crescimento.

Os dados de massa celular, concentração de substrato e produtos, foram utilizados nas simulações computacionais utilizando a técnica de busca heurística chamada de *simulated annealing* (SA), para a identificação do conjunto de valores de parâmetros de um modelo cinético não estruturado, não segregado. O conjunto de dados obtidos nas simulações foram empregados para o planejamento dos cultivos posteriores (B2 até B5) e na definição de perfis ótimos de vazão de meio suplementar.

#### **4.4.2.1.2 Ensaio B2: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis.**

Neste experimento o microrganismo foi cultivado em regime de batelada alimentada. Após adição do inóculo, foram retiradas amostras a cada duas horas para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose, de metabólitos, e de atividade enzimática. Quando a glicose foi consumida, depois de aproximadamente 10h de cultivo em batelada, uma alimentação contendo meio YPD com 500 g/L de glicose (vide Tabela 4.2) foi iniciada. A vazão inicial de alimentação foi 20,0 mL/h e foi incrementada exponencialmente, com  $\mu_0 = 0,12 \text{ h}^{-1}$ .

É importante ressaltar que, até onde vai nosso conhecimento, não são encontrados dados na literatura sobre cultivos em batelada alimentada de *P. pastoris* crescendo em glicose como fonte de substrato e sem indução por metanol. Assim, a definição de perfis de alimentação otimizados para esse tipo de cultivo é ponto original neste trabalho.

Nos ensaios realizados em regime batelada alimentada foi implementada estratégia de alimentação exponencial, ou seja, utilizando a equação (21), que fica:

$$F_{ALIM} = C_1 \exp(C_2(t - t_o)) \quad (22)$$

$$\text{Onde } C_1 = \frac{\mu_0 X_0 V_0}{(S_{ALIM} - S_0) Y_{X/S}} \text{ e } C_2 = \mu_0 = 0,12 \text{ h}^{-1}$$

Os valores das constantes  $C_1$  e  $C_2$ , entretanto, tiveram que ser mudados ao longo do cultivo para evitar o acúmulo de glicose dentro do biorreator.

#### **4.4.2.1.3 Ensaio B3: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ constantes.**

Esse experimento foi realizado com o objetivo de se obter um melhor crescimento celular e consumo integral da glicose. A composição do meio suplementar foi mudada por suspeita de excesso em algum nutriente presente no meio suplementar do ensaio B2. O meio de cultivo utilizado também foi o meio YPD. Quando a glicose foi consumida, depois de aproximadamente 10h de cultivo em batelada, uma alimentação contendo 500 g/L de glicose e 12 mL/L de solução de metais PTM1 (vide Tabela 4.4) foi iniciada. A vazão inicial de alimentação foi 30,0 mL/h e foi incrementada exponencialmente usando  $\mu_0 = 0,12 \text{ h}^{-1}$ .

O valor da constante  $C_2$  foi mantido constante ( $0,12 \text{ h}^{-1}$ ) e a constante  $C_1$  foi mudada ao longo do cultivo para evitar o acúmulo de glicose dentro do biorreator (ver item 4.4.2.1.2).

#### **4.4.2.1.4 Ensaio B4: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis por etapas.**

Este experimento foi realizado nas mesmas condições do ensaio anterior. Foram retiradas amostras a cada duas horas para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose, de metabólitos e de atividade enzimática.

Os valores das constantes  $C_1$  e  $C_2$  foram mantidos constantes até o final do cultivo (ver item 4.4.2.1.2), onde  $C_1= 0,03$  L/h e  $C_2=0,12$  h<sup>-1</sup>.

#### **4.4.2.1.5 Ensaio B6: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando PGA com $C_1$ constante e $C_2$ variável.**

Este experimento foi realizado nas mesmas condições do ensaio B4 com o propósito de comparação de resultados. Foram retiradas amostras a cada duas horas para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose, de metabólitos, e de atividade enzimática.

Novamente, os valores das constantes  $C_1$  e  $C_2$  foram mantidos constantes até o final do cultivo,  $C_1= 0,03$  L/h e  $C_2=0,12$  h<sup>-1</sup>.

#### **4.4.2.2. Cultivo em meio sintético**

O reator foi carregado com 4L de meio BSM contendo 40 g/L de glicose como fonte de carbono e 4,3 mL/L de solução de metais (PTM1) (ver Tabelas 4.3 e 4.4). O pH foi ajustado a 6,0 com uma solução 28% de NH<sub>4</sub>OH. O meio suplementar era composto por uma solução de 500g/L de glicose e 12 mL/L de

solução de metais (PTM1). A alimentação prosseguiu até que fosse alcançado o volume de trabalho do reator (5L).

#### **4.4.2.2.1 Ensaio B5: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase em batelada simples, meio BSM com 40 g/L Glicose**

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo BSM (vide Tabela 4.3). Devido à mudança de meio, é requerido um novo levantamento de dados experimentais para a determinação dos parâmetros do modelo cinético de crescimento.

### **4.5 Métodos Analíticos**

Amostras retiradas em intervalos definidos de tempo foram utilizadas para a realização das respectivas análises. Em culturas em frascos agitados, alíquotas de 2 mL do caldo de fermentação foram centrifugadas (centrífuga EPPENDORF, modelo 5403) por 20 min a 11600g (11000 rpm) e 4°C. Em culturas em biorreator as células foram separadas por filtração do meio a 0,22 $\mu$ m. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e acompanhamento do consumo dos nutrientes e do perfil dos produtos

#### **4.5.1. Massa e Viabilidade Celular**

As concentrações celulares foram acompanhadas pela medição da densidade ótica (DO), com um espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000, a 600 nm. As amostras foram convenientemente diluídas de modo

que o valor da absorvância fosse inferior a 0,8 para garantir que a medida estivesse dentro da faixa de linearidade da relação entre densidade ótica e concentração.

A concentração celular foi ainda determinada pelo método gravimétrico. O peso de célula seca em cultivos em “shaker” foi determinado após centrifugação de 2 ml de caldo de cultivo em centrífuga refrigerada, seguido por duas lavagens com água destilada do pellet obtido, re-suspensão do pellet em 1mL de água destilada e finalmente secagem em estufa a 60 °C durante 24h. Já para cultivos em biorreator, o peso de célula seca foi determinado pela filtração de um volume conhecido de amostra em uma membrana com diâmetro de poro de 0,22 µm previamente pesada, e finalmente esta membrana foi colocada em estufa a 60 °C durante 24h para secagem.

A concentração celular (em grama de célula seca/litro) foi determinada pela curva de calibração entre o peso de célula seca em função da densidade ótica:  $\text{Concentração celular (g/l)} = 0,426\text{DO}_{600\text{nm}} + 0,911$ , corrigida pelo fator de diluição. Coeficiente de correlação  $r = 0,90$ .

A viabilidade celular foi acompanhada com o sensor de capacitância Biomass system (FOGALE nanotech). Esta medida é gerada aplicando-se um campo elétrico ao caldo de cultivo, que, na faixa de frequência de 2,076 MHz (para leveduras), varia linearmente com a concentração de células viáveis. Para todos os cultivos, antes da inoculação do biorreator, o sensor de biomassa foi zerado, após alguns minutos medindo a permissividade do meio.

#### **4.5.2 Análise de glicose, álcoois e ácidos orgânicos**

As concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos foram medidas por cromatografia líquida de troca iônica (cromatógrafo Waters, detector modelo 486) utilizando a coluna Aminex HPX-87H, Bio-Rad, como fase estacionária, e solução de ácido sulfúrico 5 mM, eluindo a uma vazão de 0,6 mL/min, como fase móvel. A temperatura para separação dos componentes foi de 50°C. A detecção dos ácidos foi realizada em detector UV a um comprimento de onda de 210 nm, e a dos carboidratos e álcoois por índice de refração.

O consumo de glicose durante os experimentos foi monitorado por análise enzimática (Kit Enzimático, Laborlab). Adicionava-se 1,0 mL do reagente de trabalho (preparado como descrito no protocolo do fabricante) em um microtubo tipo Eppendorf com 10  $\mu$ L da amostra convenientemente diluída, contendo glicose. Incubava-se o microtubo por 10 minutos a 37°C. Após a reação, a leitura da absorbância era realizada a 505 nm.

#### 4.5.3. Aminoácidos

A concentração de aminoácidos foi determinada pelo sistema Pico-Tag, por cromatografia de fase reversa (cromatógrafo Waters, detector modelo 486), utilizando pré-coluna para derivatização das amostras. Para desproteção da amostra, inicialmente foi colocada alíquota de 0,5 mL em ultrafiltro Millipore, modelo Amicon, com tamanho de poro de 3 Kda, centrifugado a 8000rpm a 4°C durante 8 min. O protocolo utilizado para derivatização dos aminoácidos segue os seguintes passos:

1. Secagem da amostra com ar (aproximadamente 20 $\mu$ L).
2. Re-hidratação com 10 $\mu$ L de solução etanol, água, trietilamina (2:2:1).
3. Agitação em vortex e secagem da solução resultante.
4. Adição de 20 $\mu$ L solução de derivatização composta por etanol, trietilamina, fenil-isotiocianato e água na proporção 7:1:1:1.
5. Agitação em vortex e reação durante 20 min.
6. Secagem com ar.
7. Adição de 500  $\mu$ L de tampão diluente e agitação em vortex.

A separação utilizava como eluentes acetato de sódio tri-hidratado a pH 6,4 – fase móvel A e acetonitrila 60% v/v – fase móvel B, eluindo a uma vazão de 1,0 mL/min.

#### 4.5.4. Atividade da $\alpha$ -amilase

*Método do amido:* A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada conforme descrito em Moraes et al., 1995: 0,2g de amido solúvel (marca synth) era dissolvido em 100 ml de tampão acetato de sódio (pH 5,9) fervendo; esta solução foi resfriada a 40°C. A solução reagente foi preparada pela adição de 1ml de solução de iodo (0,5% de I<sub>2</sub> em 5% de KI) e 5 ml de uma solução 5M de HCL a 500 ml de água destilada. 200 $\mu$ L da enzima apropriadamente diluída foram adicionados a 1 ml da solução de amido e a mistura foi incubada a 40°C em banho termostático durante 10 min. 200 $\mu$ L da mistura reacional incubada foram adicionados a 5 ml de solução reagente para parar a reação. A hidrólise do amido pela enzima foi medida a 620 nm em contraste com 200 $\mu$ L de água em 5ml de solução reagente, como branco. Uma unidade (1U) de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 40 °C.

*Método de enzimático:* A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada por análise enzimática (Kit Enzimático, Laborlab), que utiliza o substrato Gal G2 - CNP (2-cloro-4-nitrofenil-galacto piranosil maltodiose) que é diretamente hidrolisado pela  $\alpha$ -amilase da amostra produzindo cloronitrofenol (CNP). O CNP absorve em 405 nm, e a velocidade de aparecimento da cor é diretamente proporcional à atividade enzimática.

O espectrofotômetro em 405 nm era zerado em absorbância contra água deionizada; em uma cubeta mantida a 37°C, colocava-se 10 $\mu$ L de amostra e 1ml de substrato (que já vem pronto para uso), e depois de homogeneizar disparava-se o cronômetro. Após exatos 2, 3 e 4 minutos registraram-se as respectivas absorbâncias. A atividade de cada amostra foi calculada com o coeficiente angular vezes um valor de ajuste fornecido pelo fabricante.

## 4.6 Determinação de parâmetros cinéticos

### 4.6.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade de crescimento microbiano é diretamente proporcional à concentração celular, portanto pode ser obtida por meio de um balanço de massa no reator em regime batelada (admitindo densidade do meio invariante):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (23)$$

Considerando-se que na fase exponencial de crescimento,  $\mu = \mu_{\max}$ , o valor da velocidade específica máxima de crescimento pode ser determinado como segue:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_0}^t \mu \cdot dt$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{\max} \cdot t \quad (24)$$

A equação (24) é uma linha reta em gráfico mono-log. Assim, um perfil linear indica a duração da fase exponencial de crescimento, sem limitação por qualquer substrato. A velocidade máxima de crescimento correspondente à inclinação da reta obtida nessa região, a partir de uma regressão dos dados experimentais.

### 4.6.2 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células

Admitindo que o estado metabólico do microrganismo é invariante durante etapas do cultivo, a equação para o cálculo do rendimento de substrato a células ( $Y_{x/s}$ ) fica (BAILEY E OLLIS, 1986):

$$X - X_o = Y_{x/s} \cdot (X_0 - X) \quad (25)$$

Com os valores experimentais de concentração celular e de glicose obtêm-se os valores de  $Y_{x/s}$  através da regressão linear.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio em Frasco Agitados

#### 5.1.1 Ensaio F1: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase de *B. subtilis* em frascos agitados, meio YPD com 20 g/L de glicose

Os resultados apresentados neste sub-item foram todos obtidos em *shaker* NEW BRUNSWICK. Uma comparação de desempenho com outro equipamento (MARCONI) será apresentada no próximo item.

A Figura 5.1 mostra a evolução da concentração de enzima no sobrenadante, com o aumento da intensidade da banda em ~60 kDa.

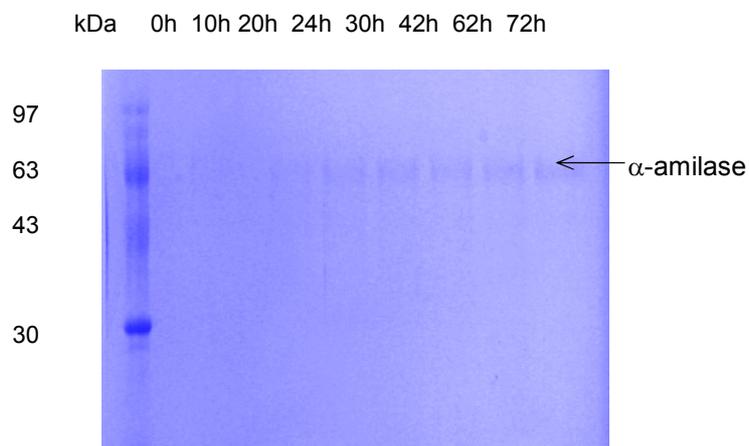


Figura 5.1. SDS-PAGE das proteínas totais no meio de cultivo. O sobrenadante foi coletado em diferentes tempos. A  $\alpha$ -amilase tem ao redor de 60 kDa.

Pode-se ainda observar claramente, na Figura 5.2, que a produção da proteína está associada ao crescimento celular da *P. pastoris*, como se espera em um sistema de expressão constitutiva, no qual o promotor *PGK1* apresenta alta transcrição em meio com D-glicose.

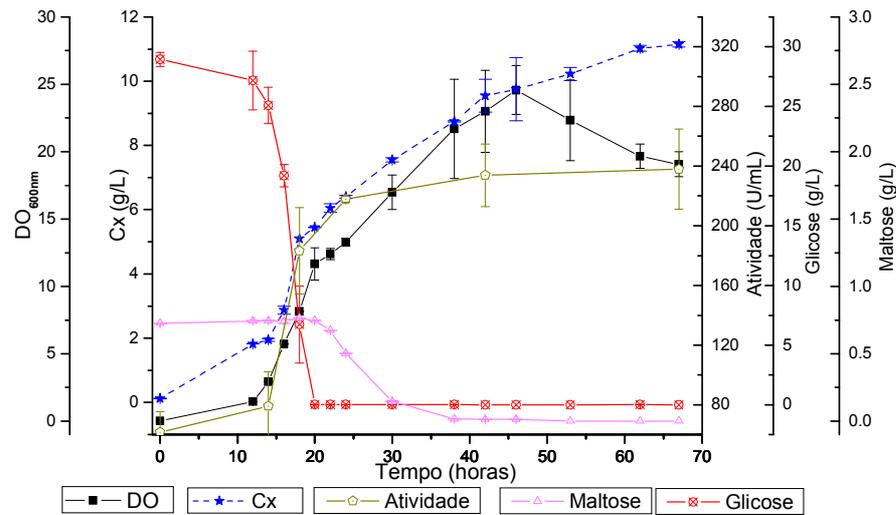


Figura 5.2. Cultivo de *P. pastoris* em meio YPD, 30°C, pH 6,5. Expressão constitutiva de  $\alpha$ -amilase extracelular. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas. Shaker New Brunswick.

Durante a fase lag, tanto a glicose como a maltose (presente no extrato de levedura) não foram consumidas de forma significativa, permanecendo constantes em torno de 28 g/l e 0,7 g/l respectivamente. Entretanto, no intervalo entre 14 e 20 h de cultivo (fase exponencial) a glicose foi esgotada por completo, observando-se ainda a produção de etanol, ácido málico e ácido fórmico durante este período (vide Figura 5.3). Foram realizadas coletas a cada 6 horas até chegar à fase estacionária, a qual foi alcançada após 67 h de cultivo. A Tabela 5.1 apresenta resultados de ensaio realizado em triplicata. Os valores máximos de concentração celular, de atividade enzimática (por volume de meio) e de atividade específica estão também indicados nessa Tabela.

Tabela 5.1. Cultivo de *P. pastoris* em câmara rotatória, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C, pH 6,5 (Ensaio F1). Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas após 67 h de cultivo. Desvios padrão estimados a partir de três ensaios independentes. Velocidade específica máxima de crescimento e fator de conversão, estimados na fase exponencial (12-20h de cultivo).

$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$Y_{x/s}$	$C_X^{\max}$ (g/l)	Atividade enzimática $\text{U/mL}^{\max}$	Atividade específica $\text{U/g}_{\text{cel}}$
$0,24 \pm 2,7 \times 10^{-2}$	$0,18 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$11,35 \pm 8 \times 10^{-2}$	$238 \pm 27$	$20969 \pm 2522$

Dentre os produtos do catabolismo, destacam-se o etanol e os ácidos fórmico e málico. É sabido que as condições de aeração não controladas do cultivo em *shaker* podem levar a limitação de oxigênio. Deve-se destacar que, segundo Veiga et al., 2003, ao contrário de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* é levedura Crabtree negativa, sendo incapaz de fermentação aeróbica.

Após 20 h, como é típico em cultivos batelada, devido à insuficiência de glicose *P. pastoris* começou a utilizar fontes alternativas de carbono (Figura 5.3): maltose, aminoácidos, além de malato, formiato e etanol produzidos na fase anterior.

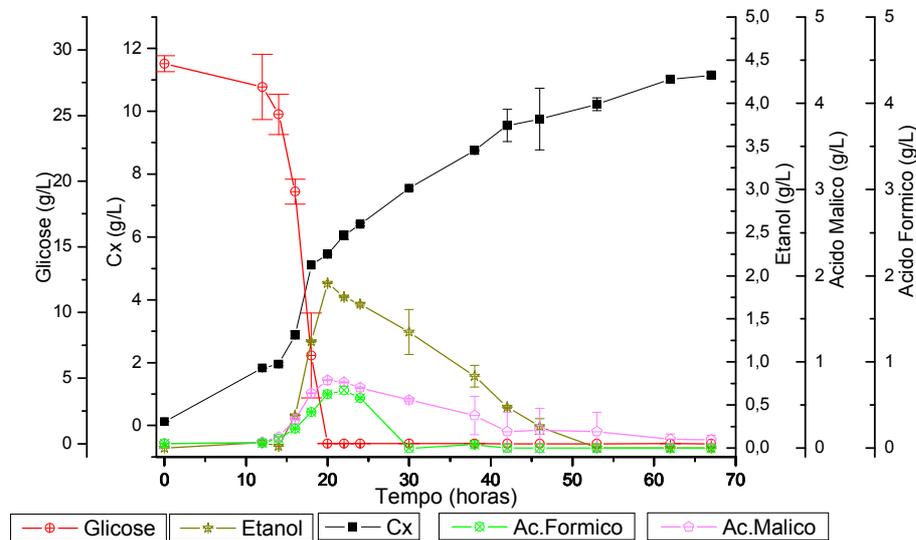


Figura 5.3. Metabólitos produzidos por *P. pastoris*. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas.

Na Figura 5.3 podem ser vistos os metabólitos produzidos por *P. pastoris* durante o cultivo. Em maior proporção encontra-se o etanol, com um pico de 1,9 g/L, seguido pelo ácido málico, com 0,85 g/L e logo após pelo fórmico. Os três produtos começaram a ser consumidos após o esgotamento da glicose, sendo aparentemente o formiato o substrato preferencial, seguido pelo etanol e, finalmente, pelo malato.

*Pichia pastoris* consumiu preferencialmente alguns aminoácidos (ver Figura 5.4): ácido glutâmico, ácido aspártico metionina, arginina, isoleucina e fenilalanina. Os demais aminoácidos são omitidos da figura por concisão. Durante a fase exponencial de crescimento esgotaram-se Met e Asp, enquanto que os demais

aparentemente são também utilizados como fonte de carbono, após serem esgotados glicose, etanol e ácidos orgânicos. Em 120 h todos os aminoácidos são consumidos e o pH foi medido valendo  $7,1 \pm 8 \times 10^{-3}$  (desvio padrão de cinco ensaios).

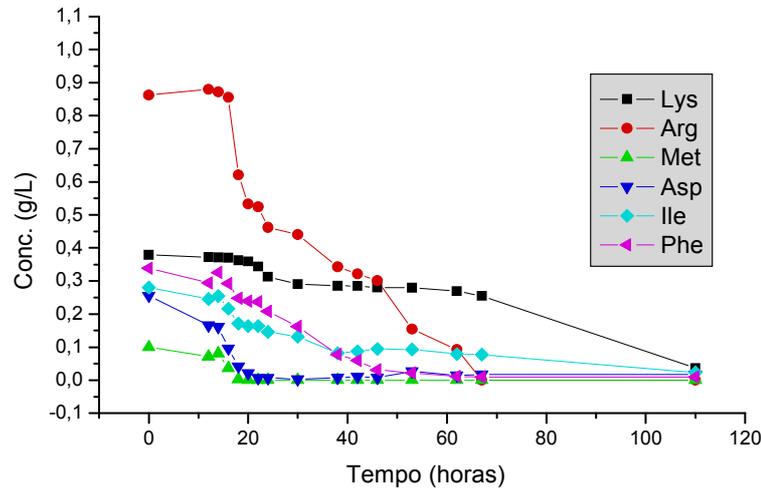


Figura 5.4. Aminoácidos consumidos preferencialmente por *P. pastoris*.

Em relação à variação do valor de pH, este apresentou uma queda no intervalo das 14 às 20 h de cultivo (fase exponencial), quando a glicose foi esgotada por completo e o crescimento celular foi mais rápido, valendo  $5,87 \pm 7 \times 10^{-3}$  (desvio padrão de cinco ensaios). Já na fase final do cultivo (após 120h) o pH foi medido valendo  $7,1 \pm 8 \times 10^{-3}$  (desvio padrão de cinco ensaios). Isto é consistente com as fases apresentadas no crescimento do microorganismo, na fase exponencial de crescimento ouve uma produção de ácidos o que ocasionou a diminuição no valor do pH, logo após do consumo da glicose, a levedura consumiu os ácidos produzidos, o que foi refletido no aumento do valor do pH ao final do cultivo.

### 5.1.2 Comparação de desempenho de câmaras rotativas de diferentes fabricantes

As leveduras podem crescer em presença ou ausência de oxigênio, sendo que o crescimento anaeróbio é mais lento e ineficiente, devido a que apenas uma pequena parte da fonte de carbono é utilizada para manutenção e crescimento

das células, a maior parte do substrato é usado principalmente para produzir álcool e dióxido de carbono. Em contraste, em condições aeróbias, na presença de uma quantidade suficiente de oxigênio dissolvido, a levedura cresce usando a maior parte da fonte de carbono disponível para o crescimento celular e só produz quantidades insignificantes de álcool.

Todas as etapas de crescimento dos microrganismos e produção da enzima foram realizadas em frascos agitados com controle de temperatura e velocidade de agitação. Nos laboratórios do DEQ/UFSCar encontram-se disponíveis para uso câmaras rotativas de temperatura controlada das marcas NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC e MARCONI. Ensaio realizados nestes dois equipamentos mostraram divergências nos resultados obtidos (vide Figura 5.5):

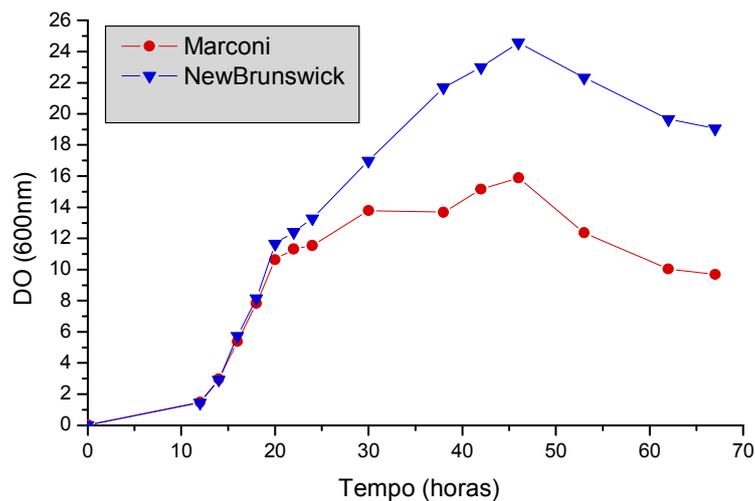


Figura 5.5. Comparação do crescimento celular de *P. pastoris* em meio com glicose nos shakers NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC e MARCONI.

Pela Figura 5.5 observa-se que o cultivo de *P. pastoris* se vê grandemente afetado pela aeração fornecida pela câmara rotatória: o valor da densidade ótica máxima alcançada no cultivo foi diminuído em aproximadamente 42% ao se mudar de equipamento.

### 5.1.3 Ensaio F2: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio YPD com 20 g/L de glicerol.

Devido à disponibilidade de equipamentos no laboratório, o experimento utilizando glicerol como fonte de carbono foi realizado utilizando o shaker de marca MARCONI. Para efeito de comparação de resultados, este item apresentará dados experimentais de cultivo em glicose utilizando os mesmos equipamentos usados para o cultivo em meio com glicerol.

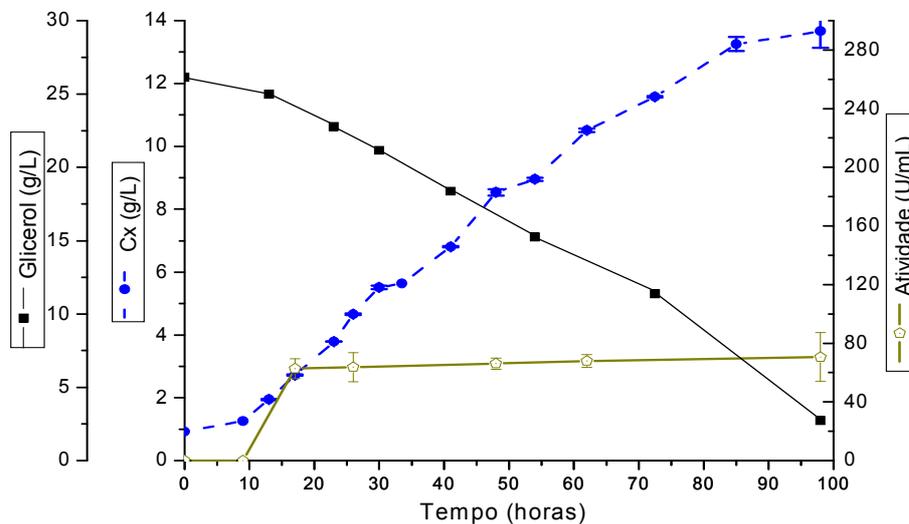


Figura 5.6. Cultivo de *P. pastoris* em meio YPD com glicerol, 30°C, pH 6,5. Expressão constitutiva extracelular de  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas. Shaker Marconi.

Comparando as Figuras 5.6 e 5.7, nota-se que enquanto a glicose é consumida nas primeiras 20 h de cultivo, o glicerol leva 100 h de cultivo para ser completamente esgotado, podendo-se inferir que *P. pastoris* apresenta preferência pelo consumo de glicose. Também fica claro que a atividade enzimática alcançada no cultivo em meio com glicerol é muito inferior à atividade obtida em cultivo com glicose como fonte de carbono. Então, partindo desses resultados, fica claro que o promotor *PGK1* tem baixa transcrição em meio com glicerol, tornando-o um substrato pouco atrativo para o cultivo deste microorganismo recombinante.

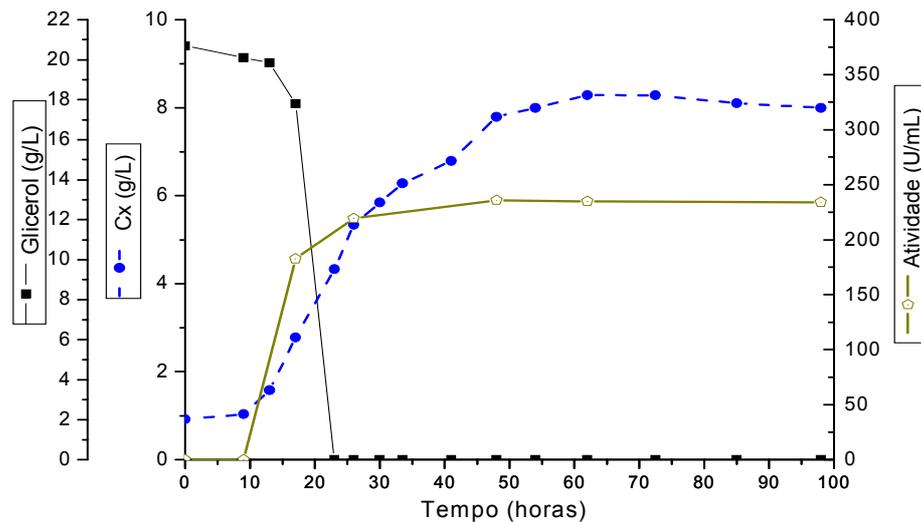


Figura 5.7. Cultivo de *P. pastoris* em meio YPD com glicose, 30°C, pH 6,5. Expressão constitutiva extracelular de  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas. Shaker Marconi.

A Tabela 5.2 compara os parâmetros de crescimento e produção, em *shaker* MARCONI, para glicose e glicerol. A título de ilustração repetem-se nessa tabela os resultados em glicose usando o *shaker* NEW BRUNSWICK. Como se observa nessa tabela, é de se esperar a obtenção de maiores densidades celulares com glicerol como fonte de carbono, mas com o promotor *PGK1* essa maior massa celular não irá se refletir em maiores produtividades na enzima recombinante.

Tabela 5.2. Cultivo de *P. pastoris* em câmara rotatória, meio YPD com 20 g/l de glicerol e de glicose, 30°C, pH 6,5. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas após 67 h de cultivo. Desvios padrão estimados a partir de três ensaios independentes. Velocidade específica máxima de crescimento e fator de conversão estimados na fase exponencial.

Marca da câmara rotativa	Fonte de C	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$Y_{x/s}$	$C_x^{\max}$ (g/l)	Atividade enzimática $\text{U/mL}^{\max}$	Atividade específica $\text{U/g}_{\text{cel}}$
MARCONI	Glicerol	$0,22 \pm 1,0 \times 10^{-3}$	$0,38 \pm 4,6 \times 10^{-2}$	$14,26 \pm 8 \times 10^{-2}$	$70,6 \pm 7,4$	4950,91
MARCONI	Glicose	$0,20 \pm 1,0 \times 10^{-2}$	$0,17 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$8,28 \pm 8 \times 10^{-2}$	$233 \pm 22$	28743,96
NEW BRUNSWICK	Glicose	$0,24 \pm 2,7 \times 10^{-2}$	$0,18 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$11,35 \pm 8 \times 10^{-2}$	$238 \pm 27$	$20969 \pm 2522$

Com respeito aos metabólitos produzidos no cultivo com glicerol como fonte de carbono, aparece em maior quantidade o ácido acético (vide Figura 5.8) chegando a 4 g/L ao final do cultivo

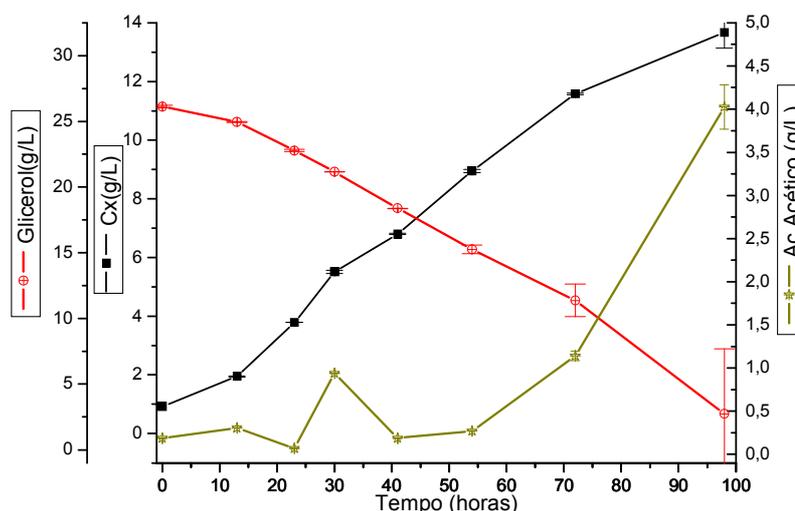


Figura 5.8. Metabólitos produzidos por *P. pastoris* em meio com glicerol. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas.

#### 5.1.4 Ensaio F3: Cultivo de *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase em frascos agitados, em meio BSM com 20 g/L Glicose

Cultivos utilizando meio sintético foram feitos de forma a facilitar o fechamento de balanços de carbono e nitrogênio, permitindo mais fácil identificação da evolução do perfil metabólico da levedura. Segundo Choi e Park, (2006), o pH ótimo da enzima  $\alpha$ -amilase está entre 6,0 e 6,5. Devido a que o meio definido BSM (vide item 4.2.2) tem um pH aproximado de 1,5 depois de se autoclavar, foi usado o meio BSM modificado, que apresenta um pH aproximado de 5,0. Assim, estes ensaios foram realizados a pH de 5,0 devido à formação de precipitados a valores maiores de pH, como resultado da baixa solubilidade dos fosfatos de cálcio e magnésio, o que prejudica a quantificação da densidade celular pelos métodos anteriormente descritos neste trabalho.

Experimentos em triplicata foram realizados, obtendo-se uma densidade ótica máxima de  $1,13 \pm 0,002$  ao longo de 73h de cultivo, não apresentando crescimento celular considerável. O pH ao final do cultivo foi de  $3,3 \pm 0,001$ . Partindo destes resultados, fica claro que o meio de cultivo BSM não é recomendável para a realização de ensaios em câmara rotativa com ausência de controle de pH.

## 5.2. Biorreator de 5 L

Foram realizados dois tipos de ensaios em biorreator: 1) batelada simples; e 2) batelada alimentada. Os resultados desses cultivos são mostrados a seguir:

### 5.2.1 Ensaio B1: Cultivo em batelada simples, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase

O cultivo foi começado com uma concentração de glicose de 20 g/L, pH de 6,5 e volume inicial de 3,5 L. O oxigênio dissolvido foi controlado em 30% da saturação. Realizaram-se tomadas de amostra a cada duas horas durante todo o cultivo, coletaram-se em tempo real dados de viabilidade do microrganismo e de condutividade do meio com o sensor de capacitância Biomass System (FOGALE Nanotech). A Figura 5.9 mostra como os dados da permissividade do meio, adquiridos em tempo real (online) pelo sensor FOGALE acompanham muito bem aos dados off-line da concentração celular durante todo o cultivo, servindo como uma ferramenta promissora para o monitoramento do cultivo (vide Figura 5.9).

Os resultados do cultivo B1 foram utilizados para gerar uma curva de calibração entre a permissividade e a concentração celular. A correlação foi obtida por regressão linear a partir dos dados de concentração celular determinados pelo método gravimétrico:

$$C_x = 0,1317 * Perm - 3.6802$$

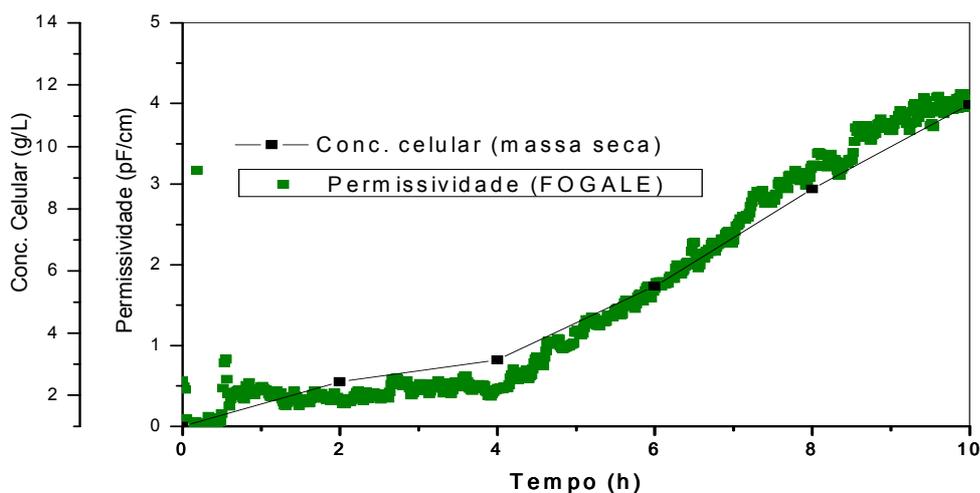


Figura 5.9 Perfis de variação da permissividade ao longo do cultivo B1 em regime batelada.

Tabela 5.3. Cultivo de *P. pastoris* em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. Velocidade específica máxima de crescimento e fator de conversão estimados na fase exponencial (Ensaio B1).

Ensaio	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$Y_{x/s}$	$C_x$ (g/l)	Atividade enzimática (U/mL)	U/g <sub>cel</sub> após 10h de cultivo
			(Tempo em que esgota a glicose)	(U/mL)	
B1	$0,23 \pm 2,0 \times 10^{-2}$	$0,49 \pm 9,0 \times 10^{-2}$	11,4 (10h)	156 (10h)	13.684
F1	$0,24 \pm 2,7 \times 10^{-2}$	$0,18 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	5,4 (20h)	218 (20h)	43.833

A Tabela 5.3 apresenta um resumo dos resultados obtidos no cultivo. Pode-se observar um aumento no fator de conversão de substrato a células,  $Y_{x/s}$ , quando comparado com o cultivo em shaker (Ensaio F1), ficando evidente que o eficiente controle de oxigênio no reator evitou o crescimento anaeróbico, o qual é bastante lento e ineficiente e, portanto, a maior parte do substrato foi usado principalmente para manutenção e crescimento das células evitando a produção excessiva de metabólitos indesejados.

A Figura 5.10 indica que a expressão da enzima heteróloga com o promotor *PGK1* de *Pichia pastoris* é de fato associada ao crescimento celular, após uma fase inicial de adaptação de 4h. As informações obtidas neste cultivo foram empregadas no item 5.3 para a estimativa de parâmetros cinéticos de crescimento.

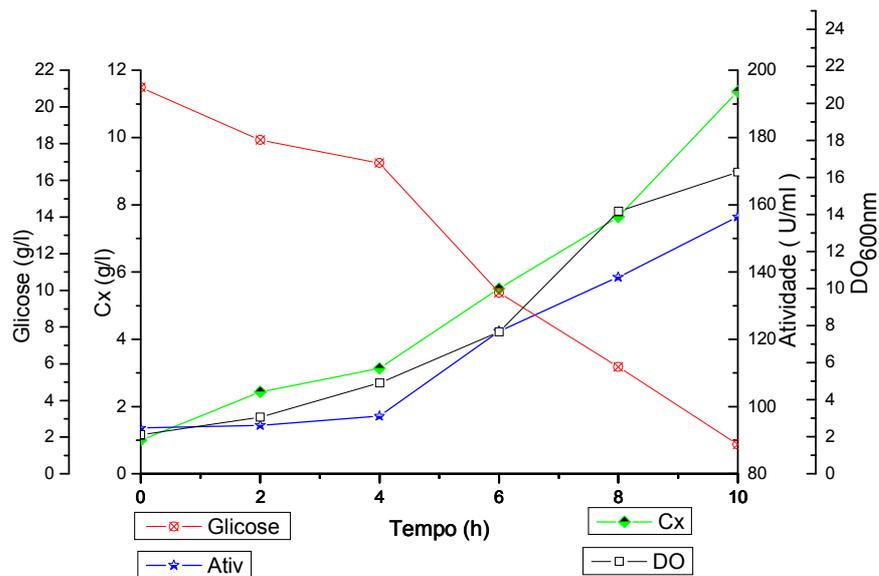
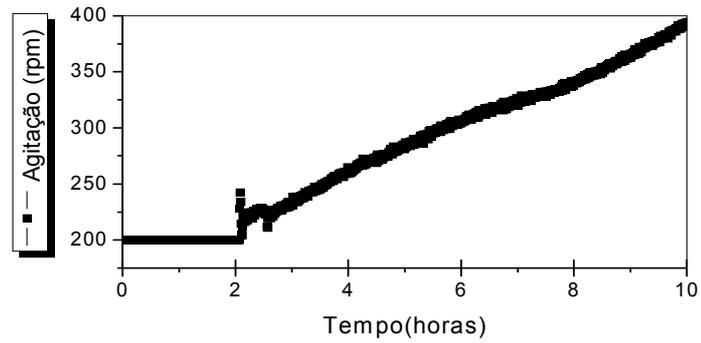


Figura 5.10 Perfis de concentração celular (massa seca), consumo de glicose, densidade ótica (DO: 600 nm), e atividade da enzima em regime batelada, biorreator de 5 L, pH 6,5, 30°C. (Ensaio B1)

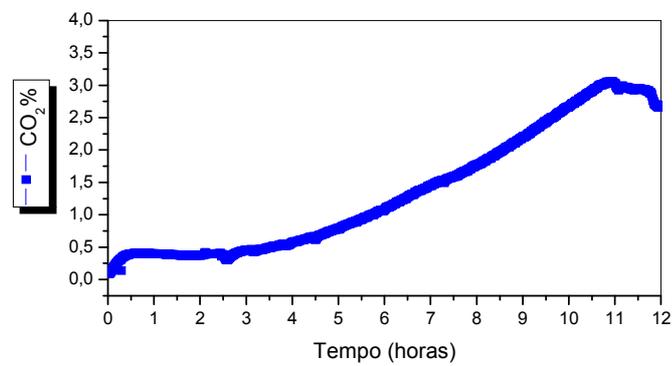
Por outro lado, a velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{max}$ , permaneceu na mesma faixa de valor tanto no shaker como no biorreator. Já atividade enzimática alcançada foi de 156 U/mL em 10h de cultivo comparada com aproximadamente 78 U/mL em 10h e 218 U/mL após 20h de cultivo em câmara rotatória (vide Figura 5.2). As concentrações de ácidos orgânicos e de alcoóis não foram significativas no ensaio B1 (o metabólito com maior concentração, ácido málico, chegou a 0,8 g/L, no máximo).

Na Figura 5.11 observar-se que a produção de gás carbônico durante o cultivo foi significativa, tendo uma velocidade maior durante a fase exponencial do crescimento, como seria de se esperar. Após o final da fase exponencial se observa uma queda na concentração de  $CO_2$ , indicando o esgotamento do substrato. Partindo desse resultado fica claro que esta medida serve como ferramenta para detectar, em tempo real, o fim da fase em batelada simples.

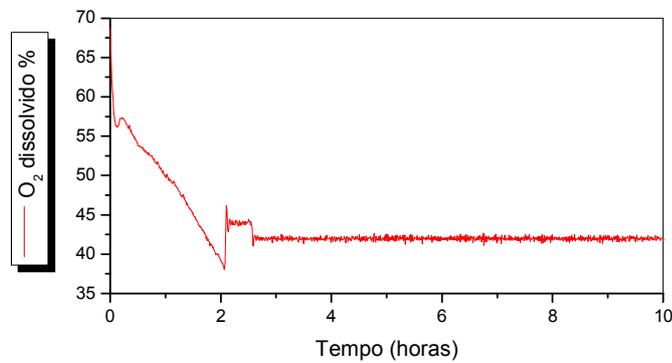
A velocidade de agitação apresenta um aumento ao longo do cultivo, pois o incremento na concentração celular causa um aumento na demanda de oxigênio dissolvido, e para controlar sua concentração em 40% da saturação é necessária uma maior agitação.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.11 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) %  $\text{CO}_2$  nos gases efluentes, (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B1).

### 5.2.2 Ensaio B2: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis

Este cultivo foi realizado nas mesmas condições do cultivo em batelada simples (Ensaio B1). Depois do consumo da glicose inicial (aproximadamente 11h de cultivo), foi dado início à batelada alimentada. Foi implementada uma estratégia de alimentação exponencial, fazendo uso da equação (22), onde se fez a aproximação  $S_0 \approx 0$ , e adotou-se um o valor de  $\mu_{1,0} = \mu_{crit} = \mu_{max} / 3$ . A velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{max}$ , foi obtida dos dados da fase exponencial do cultivo em batelada simples (vide Tabela 5.3).

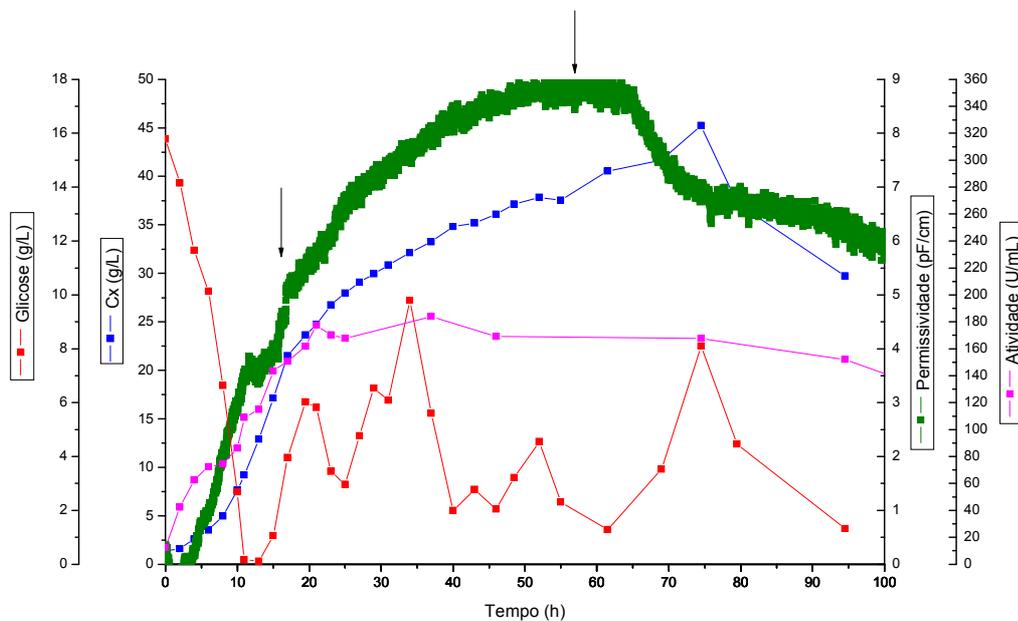


Figura 5.12 Perfis de crescimento celular (massa seca), consumo de glicose, atividade enzimática e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B2). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro.

Na Figura 5.12 mostra-se uma queda na biomassa (sensor FOGALE), quando o valor da glicose era de 0,18 g/L, aproximadamente às 11h de cultivo, indicando o esgotamento da glicose da fase batelada e, portanto, indicando o início da batelada alimentada. Os valores iniciais das constantes da alimentação

exponencial encontram-se na tabela 5.4. Devido a acúmulo de glicose no meio de cultivo, foi necessário mudar os valores das constantes da equação (22) ( $C_1$  e  $C_2$ ).

Às 19h do cultivo o valor da glicose no meio atingiu valores de aproximadamente 6 g/L, razão pela qual foi diminuído o valor de  $C_1$  para 0,01 L/h. Devido ao persistente acúmulo de substrato, às 34h de cultivo foi desligada a alimentação até atingir valores de concentração de glicose inferiores a 1 g/L. Após a segunda fase de esgotamento da glicose, uma nova alimentação foi começada com valores de  $C_1 = 0,01$  L/h e  $C_2 = 0,035$  h<sup>-1</sup> às 41h de cultivo. A partir daí, fica evidente a existência de uma fase estacionária. As concentrações de ácidos orgânicos e de alcoóis não foram significativas (o metabólito com maior concentração, ácido málico, chegou a 0,35 g/L, no máximo). Suspeitas de inibição por algum metabólito produzido, causando o acúmulo de substrato serão confirmadas nos experimentos seguintes.

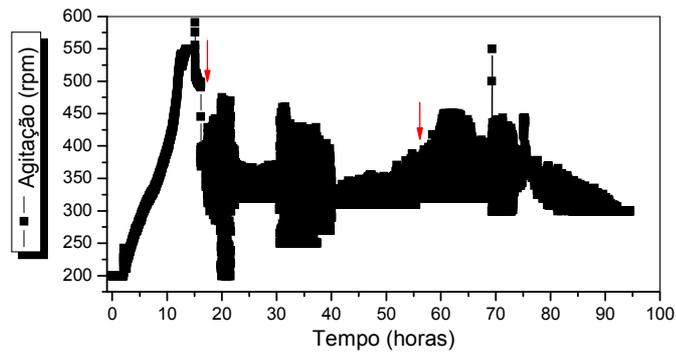
Tabela 5.4. Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de *P. pastoris* recombinante (Ensaio B2).

Ensaio	Alimentação exponencial: $F_{ALIM} = C_1 \exp(C_2(t - t_o))$		Observações
	$C_1$ Inicial (L/h)	$C_2$ Inicial (h <sup>-1</sup> )	
B2	0,03	0,07	Os valores de $C_1$ e $C_2$ foram mudados ao longo do cultivo, com o propósito de evitar acúmulo de glicose no meio. $C_1$ : 0,01 até 0,03 e $C_2$ : 0,035 até 0,07

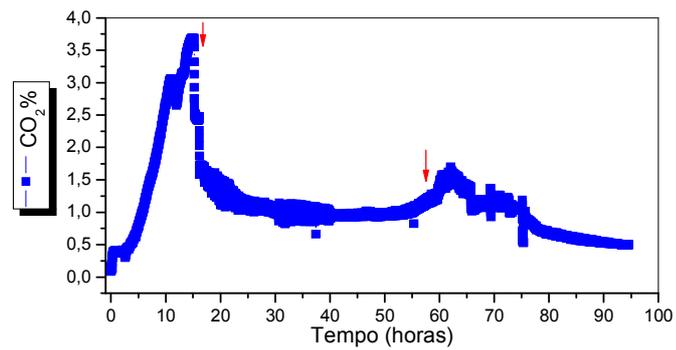
Tabela 5.5. Cultivo de *P. pastoris* em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. (Ensaio B2).

Ensaio	$C_x$ (g/l)	Atividade enzimática (U/mL)	U/g <sub>cel</sub> após 10h de cultivo
B2	45,23	184,0	4068,09

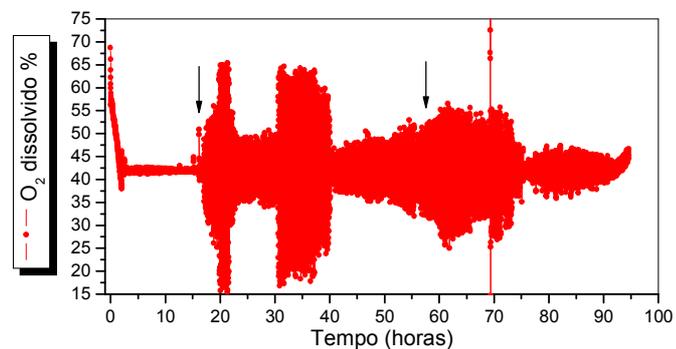
A Figura 5.12 indica claramente que a partir de 22 h de cultivo a atividade enzimática estaciona, dissociando-se inclusive do crescimento celular. Esse comportamento foi observado nos ensaios seguintes, como se reporta nos próximos itens.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.13 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO<sub>2</sub>, (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B2). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro.

A Figura 5.13 mostra os valores da velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido e da porcentagem de dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, com respeito ao tempo de cultivo. Como pode ser visto, a agitação do meio variou entre 200 e 600 rpm para manter a porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido em 40% do seu limite de saturação. Pode-se observar, também, que a produção de gás carbônico aumenta durante todo o cultivo em regime batelada, é dizer, enquanto dura a fase exponencial de crescimento, que termina com o esgotamento da glicose. A partir daí, aproximadamente às 16h do cultivo acontece uma queda no valor do CO<sub>2</sub>, e, o valor da porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido oscila muito (por falhas no sistema de controle automático da agitação no interior do biorreator). Às 17h iniciou-se suplementação de oxigênio puro dentro do biorreator com o propósito de diminuição da agitação por problemas de excesso de espuma.

Aproximadamente às 60h foi desligada a alimentação de oxigênio puro, ocasionando um ligeiro aumento nas variáveis: agitação e CO<sub>2</sub>. Após 75h de cultivo apresenta-se uma queda no valor da porcentagem de dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, e o consumo de oxigênio é desacelerado, indicando que o processo de morte celular se inicia.

### **5.2.3 Ensaio B3: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ constantes**

Neste ensaio a alimentação começou às 11h de cultivo, quando o valor da concentração de glicose era de 0,06 g/L. Foi também implementada uma estratégia de alimentação exponencial (Equação 22), onde adotou-se um valor de  $\mu_{1,0} = \mu_{crit} = \mu_{max} / 2$ . Os valores de  $C_1$  e  $C_2$  foram mantidos constantes até o final do cultivo (ver Tabela 5.6). A velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{max}$ , foi adotada como sendo igual à estimada a partir dos dados da fase exponencial do cultivo em batelada simples (vide Tabela 5.3).

Tabela 5.6. Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de *P. pastoris* recombinante (Ensaio B3).

Ensaio	Alimentação exponencial: $F_{ALIM} = C_1 \exp(C_2(t - t_o))$		Observações
	$C_1$ Inicial (L/h)	$C_2$ Inicial ( $h^{-1}$ )	
B3	0,03	0,12	Os valores de $C_1$ e $C_2$ foram mantidos constantes até o final do cultivo.

A Figura 5.14 mostra o crescimento do microrganismo, junto com o consumo de substrato, biomassa e atividade enzimática. É importante ressaltar que ao longo deste cultivo a alimentação não foi interrompida.

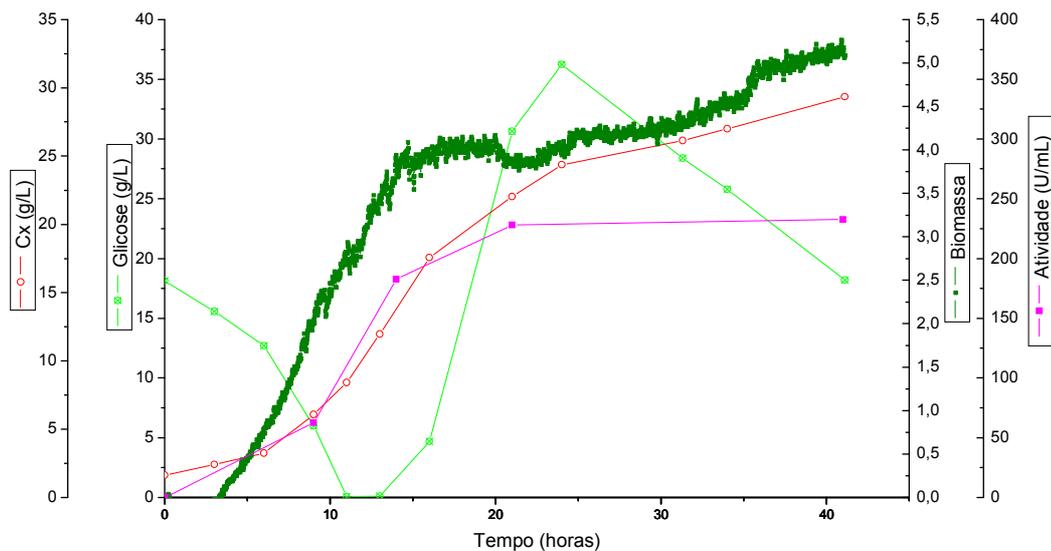


Figura 5.14 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose, atividade enzimática e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B3).

A Figura 5.14 compara o crescimento celular acompanhado medida da produção de biomassa ao longo do tempo, mostrando que com os valores escolhidos das constantes de alimentação  $C_1$  e  $C_2$ , o crescimento celular, depois do começo da alimentação (11h de cultivo), continua o mesmo comportamento apresentado na fase exponencial de crescimento em batelada simples até as 15h do cultivo, atingindo  $\Delta Cx = 16,0$  g/L de massa celular em comparação com  $\Delta Cx = 15,0$  g/L no ensaio B2.

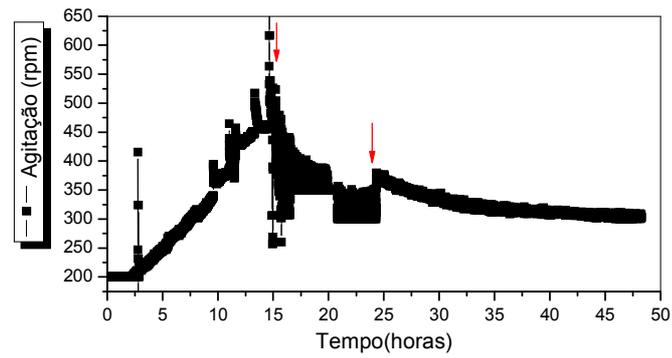
Às 16h de cultivo o valor da glicose estava em 4,7 g/L e às 21h este valor já atingia 30 g/L. Na Figura 5.14 pode-se apreciar que entre as 20 e as 35 horas, o crescimento celular foi muito lento e o acúmulo de glicose foi considerável, motivo pelo qual se deu fim ao cultivo para a implementação de uma nova estratégia de alimentação. Nota-se também que a concentração da glicose caiu após 25h do cultivo, mas o crescimento celular continua numa fase estacionária, portanto, suspeita-se que a glicose está sendo utilizada para a produção de algum metabólito. Um próximo cultivo foi feito para uma análise minuciosa dos metabólitos produzidos.

Tabela 5.7. Cultivo de *P. pastoris* em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. (Ensaio B3).

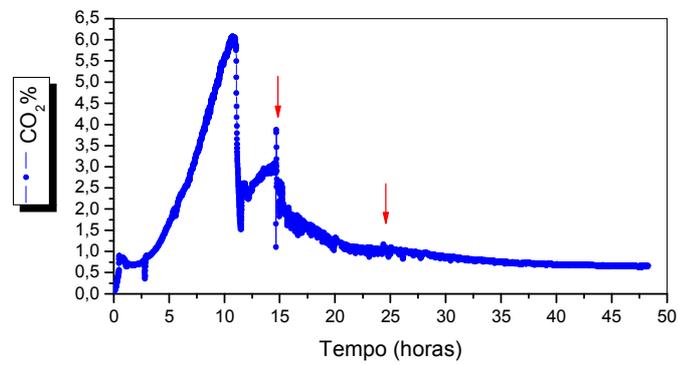
Ensaio	$C_x$ (g/l)	Atividade enzimática (U/mL)	U/g <sub>cel</sub> após 10h de cultivo
B3	29,35	232,51	7921,98

Como pode ser visto na Figura 5.15, a agitação do meio foi incrementada de 200 até 600 rpm para acompanhar a fase exponencial de crescimento e manter a porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido em 40% do seu limite de saturação. Das 15 às 25h de cultivo foi suplementado de oxigênio puro dentro do biorreator com o propósito de diminuir a agitação por problemas de excesso de espuma. Observa-se nesse período grande oscilação no controle automático da agitação e no valor do oxigênio dissolvido.

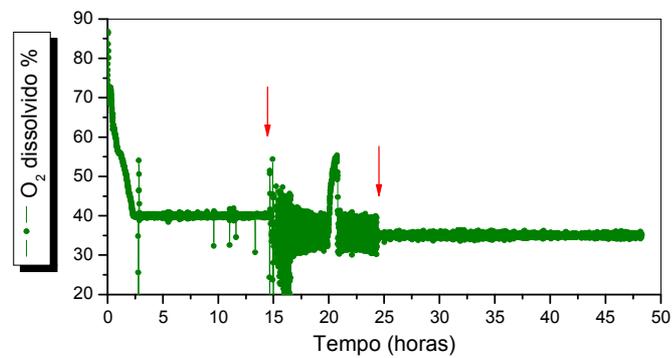
A Figura 5.15 (B) mostra o acompanhamento ao longo do tempo de cultivo do CO<sub>2</sub> produzido, no gás efluente. Observa-se uma queda pronunciada às 11h de cultivo, quando se esgotara a fonte de carbono e tinha-se dado início à fase de alimentação do meio suplementar.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.15 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) %  $\text{CO}_2$ , (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B3). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro.

### 5.2.4 Ensaio B4: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando $\alpha$ -amilase com $C_1$ e $C_2$ variáveis por etapas

Neste ensaio a alimentação começou às 10h de cultivo, quando o valor da glicose atingia os 0,18 g/L. A Tabela 5.8 mostra a estratégia de alimentação utilizada para este cultivo.

Tabela 5.8 Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de *P. pastoris* recombinante (Ensaio B4).

Ensaio	Alimentação exponencial: $F_{ALIM} = C_1 \exp(C_2(t - t_o))$		Observações
	$C_1$ Inicial (g/L)	$C_2$ Inicial (h <sup>-1</sup> )	
B4 (Etapa 1)	0,02	0,12	$C_2$ foi mantido constante até o final da etapa, enquanto $C_1$ foi mudado com o propósito de evitar acúmulo de glicose no meio. $C_1$ : 0,01 até 0,02
B4 (Etapa 2)	0,01	0,07	$C_1$ foi mantido constante até o final da etapa, enquanto $C_2$ foi mudado com o propósito de evitar acúmulo de glicose no meio. $C_2$ : 0,033 até 0,07

A análise dos resultados mostrados na Figura 5.16 indica que o crescimento celular na fase batelada alimentada (etapa 1) apresentou um comportamento exponencial limitado por  $\mu_{crit} = 0,12 \text{ h}^{-1}$  até as 15h de cultivo. Às 17h a concentração de glicose no biorreator atingiu 4,3 g/L e o sensor de biomassa (FOGALE) mostrou uma pequena queda na medição das células viáveis, então o parâmetro  $C_1$  foi diminuído para 0,01, esta mudança não mostrou melhoria no acúmulo do substrato, atingindo 6,6 g/L de glicose às 19h. Assim, fica claro que, conforme seria de se esperar, a sensibilidade do sistema frente ao parâmetro  $C_1$  é pequena. A sintonia do perfil de alimentação deve utilizar o parâmetro do termo exponencial,  $C_2$ , deixando  $C_1$  em um valor constante. O critério  $\mu_{crit} = \mu_{max}/2 = 0,12 \text{ h}^{-1}$  levou a acúmulo de glicose no meio, sendo portanto um limite superior para  $C_2$ .

O esgotamento da glicose foi alcançado após 20h de cultivo, interrompendo-se a alimentação até um novo esgotamento do substrato. A partir daí,

começa a etapa 2 de alimentação com  $C_1=0,01$  e  $C_2=0,07$  (22 a 42h de cultivo) chegando-se aos mesmos resultados de acúmulo de fonte de carbono, o que sugere a presença de algum metabólito inibitório no caldo de cultivo.

Observa-se, novamente, que a expressão da enzima se interrompe pouco após as 20 h de cultivo.

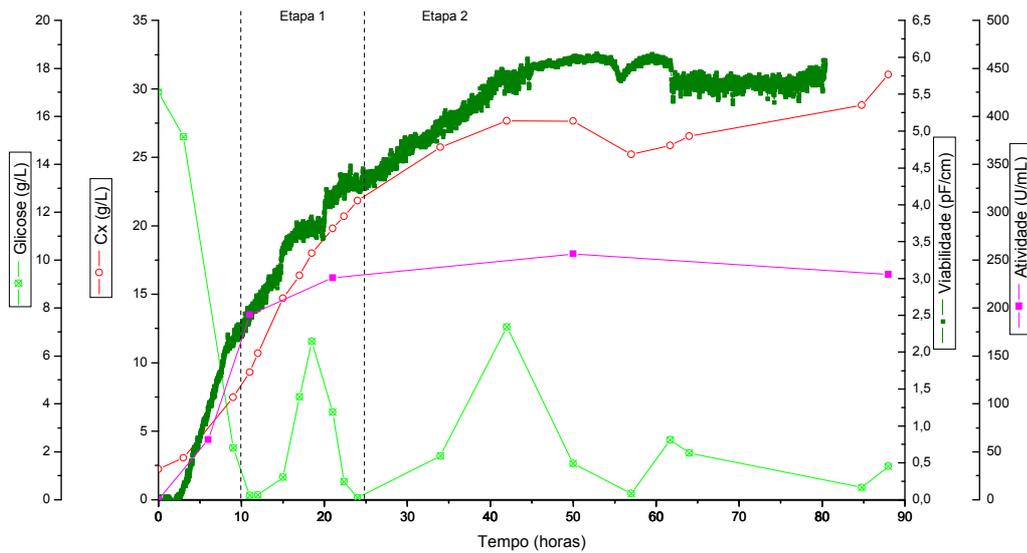
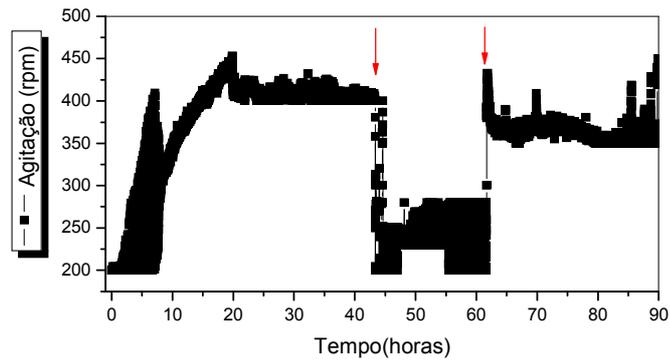


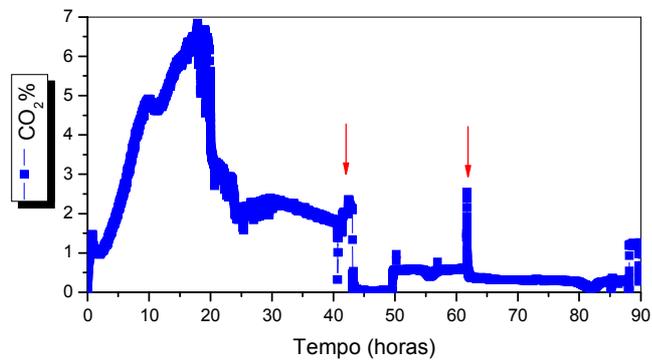
Figura 5.16 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B4).

Tabela 5.9 Cultivo de *P. pastoris* em biorreator, meio YPD com 20 g/l de glicose, 30°C. Massa celular e atividade enzimática (no meio e específica) medidas no final do cultivo. (Ensaio B4).

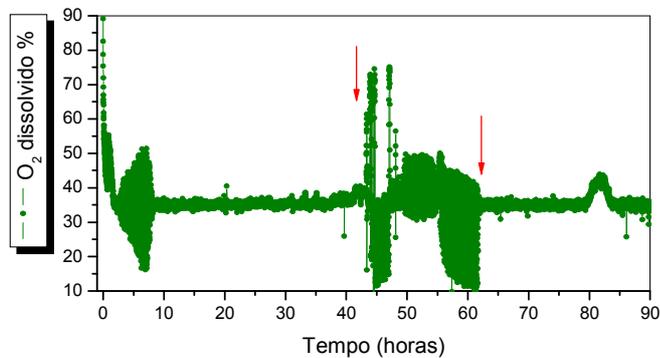
Ensaio	$C_x$ (g/l)	Atividade enzimática (U/mL)	U/g <sub>cel</sub> após 10h de cultivo
B4	31,04	256,3	8257,09



(A)



(B)



(C)

Figura 5.17 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) %  $\text{CO}_2$ , (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B4). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro.

A Figura 5.17 mostra os valores da velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido e da porcentagem de dióxido de carbono,  $\text{CO}_2$ , com respeito ao tempo de cultivo. A Figura 5.18 mostra cromatogramas das amostras coletadas neste cultivo.

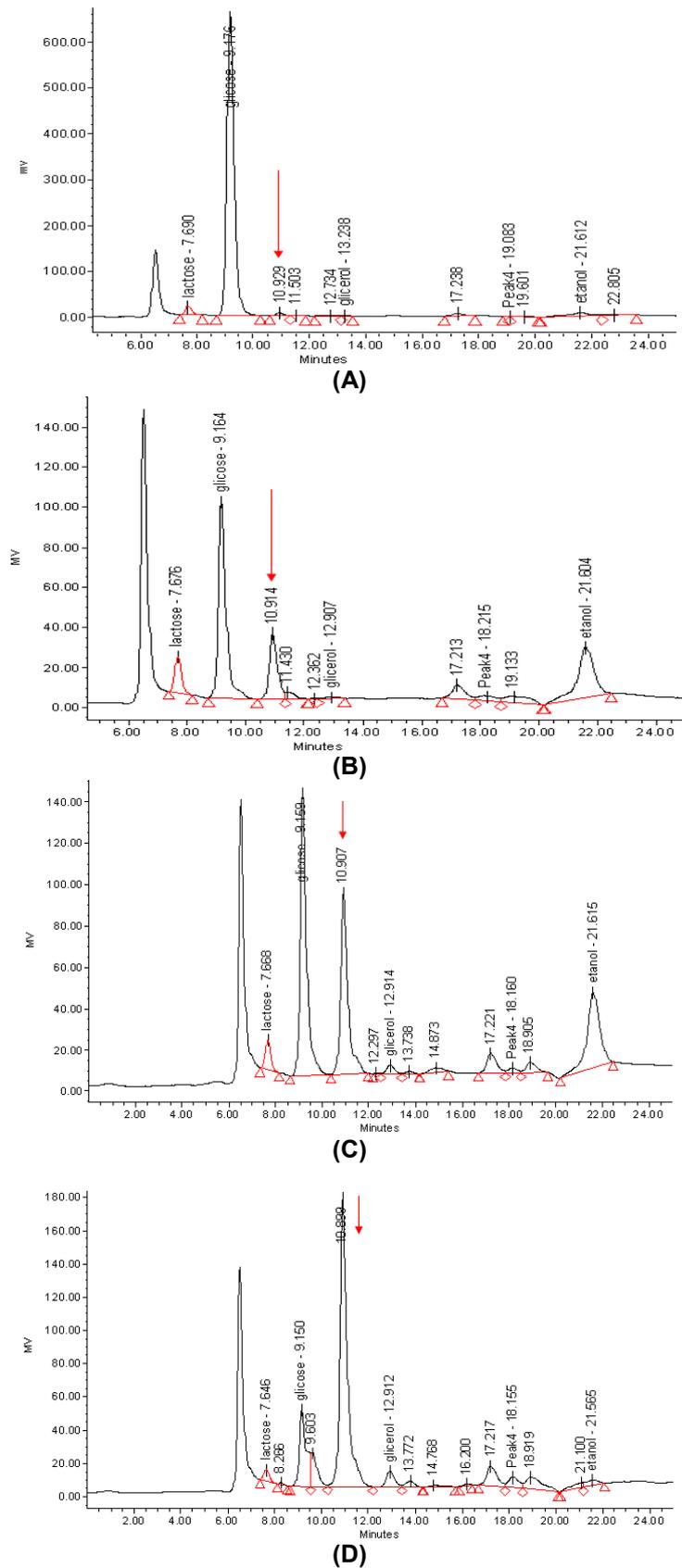


Figura 5.18 Cromatogramas das amostras coletadas em: (A) 3h, (B) 9h, (C) 21h, (D) 50h. (Ensaio B4)

Como se pode observar na Figura 5.18(A) não foi detectado nenhum composto no tempo de retenção de 10,9 min no começo do cultivo. As Figuras 5.18 (B), (C) e (D) mostram a evolução do aumento de um pico neste tempo de retenção ao longo do cultivo. Portanto, acredita-se que o metabólito assinalado com a seta vermelha pode ser um inibidor do crescimento celular.

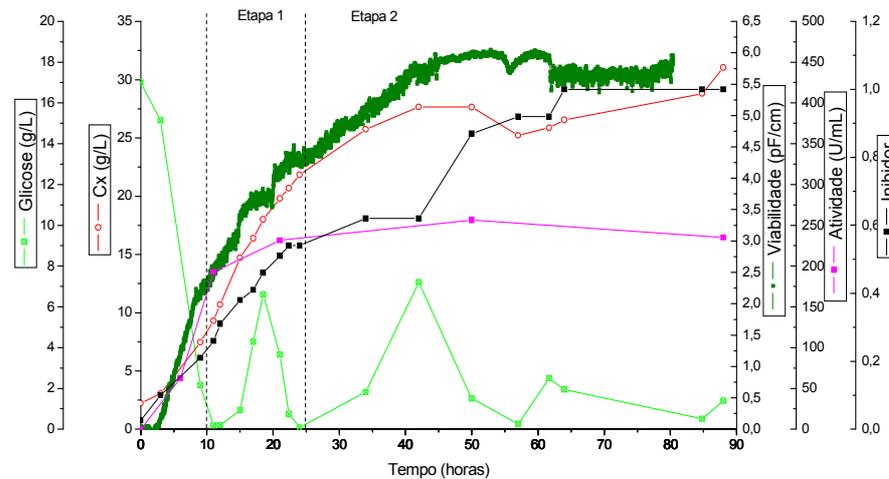


Figura 5.19 Comparação dos perfis de crescimento celular, consumo de glicose e variação da permissividade em regime batelada alimentada com a produção do produto inibidor. (Ensaio B4).

A figura 5.19 mostra a evolução da altura normalizada do pico desse composto ao longo do tempo, comparada com a evolução da glicose e da massa celular. Pode-se ver claramente nessa figura que o produto inibidor é associado ao crescimento celular, sendo produzido desde o começo do cultivo. No início da etapa 2 (quando a glicose foi esgotada) mostra-se uma diminuição na produção deste composto, já nas 40h de cultivo quando a glicose atinge valores altos, a produção aumentou consideravelmente ocasionando uma fase estacionária no crescimento celular. Portanto, altos valores na concentração de glicose no meio de cultivo levam a alta produção do produto inibidor. Enquanto à atividade enzimática (vide Figura 5.20), acredita-se que altos níveis do composto inibidor presentes no caldo de cultura estejam inativando-a a partir das 20h de cultivo.

O composto não identificado foi coletado e liofilizado para posteriores análises por espectrometria de massas.

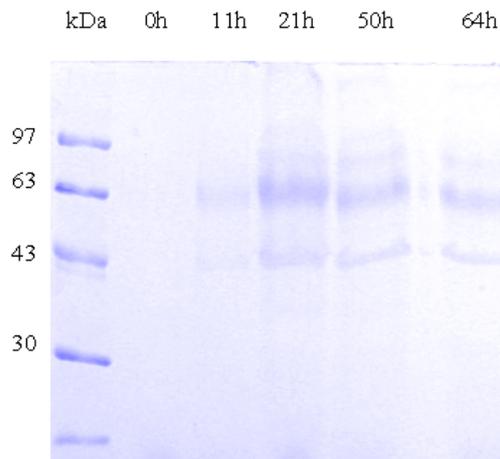


Figura 5.20 SDS-PAGE das proteínas totais no meio de cultivo (Ensaio B4).  
A  $\alpha$ -amilase tem ao redor de 60 kDa.

### 5.2.5 Ensaio B6: Cultivo em batelada alimentada, *P. pastoris* expressando PGA com $C_1$ constante e $C_2$ variável

Ensaio em câmara rotativa expressando a enzima PGA indicaram que há expressão de uma proteína na faixa de massa molar da enzima, mas não se observou atividade enzimática intra- ou extracelular. Uma possível razão para esse fato seria uma glicosilação indesejada da proteína recombinante, em cujo sítio ativo há uma serina amino-terminal com papel essencial na catálise.

Este cultivo foi realizado utilizando o meio YPD (vide Tabela 4.2) com a adição de 2,5 nM de  $\text{CaCl}_2$ , devido à influência de íons de cálcio sobre a atividade da PGA de *B. megaterium* (Yang et al., 2006). O cultivo foi começado com uma concentração de glicose de 20 g/L, pH de 6,5 e volume inicial de 4 L. O oxigênio dissolvido foi controlado em 40% da saturação. Foi implementada uma estratégia de alimentação exponencial (Equação 22), onde adotou-se um valor de  $\mu_{1,0} = \mu_{crit} = \mu_{max} / 4$ . O valor de  $C_1$  foi mantido constante até o final do cultivo (ver Tabela 5.10). A velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{max}$ , foi estimada na fase exponencial da etapa do cultivo em batelada, sendo igual a  $0,23 \text{ h}^{-1}$ .

Fazendo uma comparação entre *P. pastoris* expressando  $\alpha$ -amilase e *P. pastoris* expressando PGA, pode-se observar que o  $\mu_{max}$  alcançado foi igual nos dois casos, portanto, demonstrou-se que cinética de crescimento é semelhante em ambos casos.

Tabela 5.10. Valores iniciais das constantes de alimentação exponencial utilizadas na cultura de *P. pastoris* recombinante (Ensaio B6).

Ensaio	Alimentação exponencial: $F_{ALLIM} = C_1 \exp(C_2(t - t_o))$		Observações
	$C_1$ Inicial (L/h)	$C_2$ Inicial ( $h^{-1}$ )	
B3	0,02	0,06	$C_1$ foi mantido constante até o final do cultivo. $C_2$ foi mudado ao longo do cultivo.

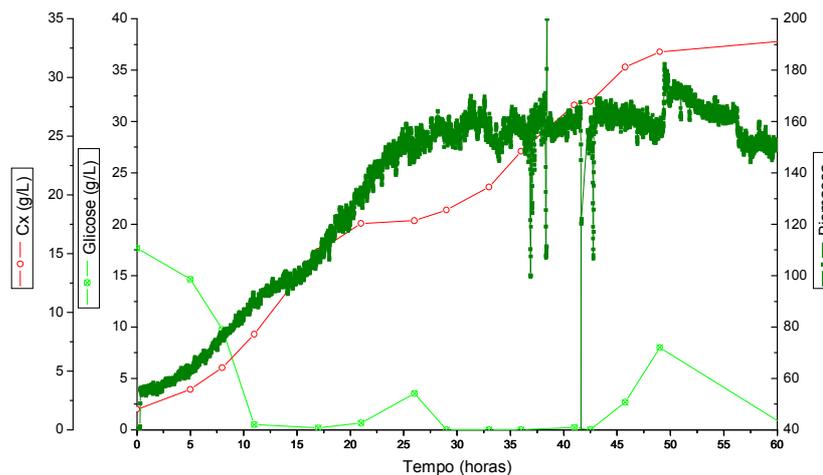


Figura 5.21 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose e variação da permissividade em regime batelada alimentada (Ensaio B6).

Neste ensaio a alimentação começou às 11h de cultivo, quando o valor da concentração de glicose era de 0,4 g/L. Na Figura 5.21 mostra-se que foi atingida uma concentração celular aproximadamente de 35 g/L e que foi possível controlar a concentração de glicose no caldo de cultivo realizando variações no parâmetro  $C_2$ . Já a leitura do sensor de biomassa FOGALE se viu afetada a partir das 36h devido a uma queda de energia, mostrando discrepâncias com os dados offline de massa celular.

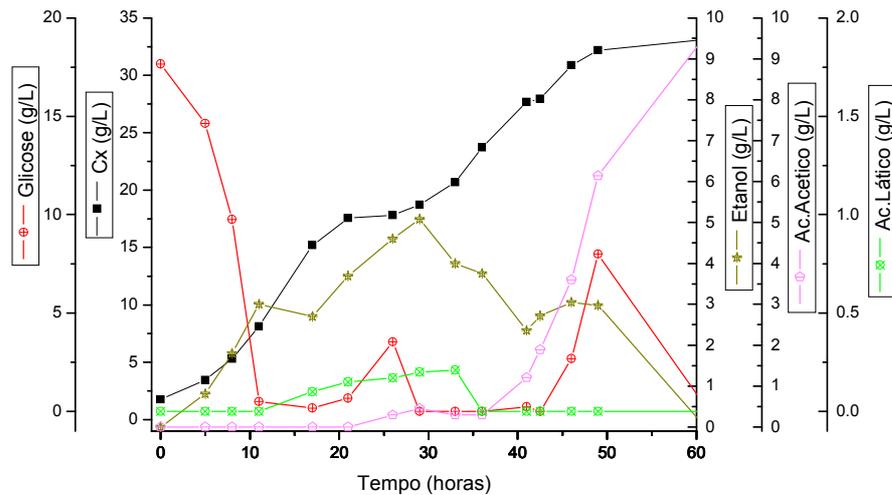


Figura 5.22. Metabólitos produzidos por *P. pastoris* expressando PGA no cultivo em batelada alimentada (Ensaio B6).

Na Figura 5.22 podem ser vistos os metabólitos produzidos por *P. pastoris* durante o cultivo. Em maior proporção encontra-se o ácido acético, com um pico de 9 g/L, seguido pelo etanol, com 5 g/L. O etanol passa a ser consumido após 30 h de cultivo. Já a alta concentração de ácido acético acredita-se é a responsável pela diminuição do crescimento celular na etapa final do cultivo.

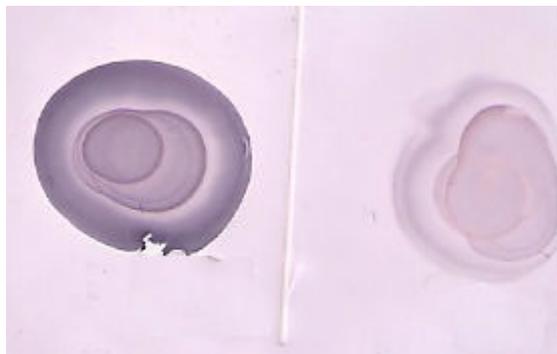
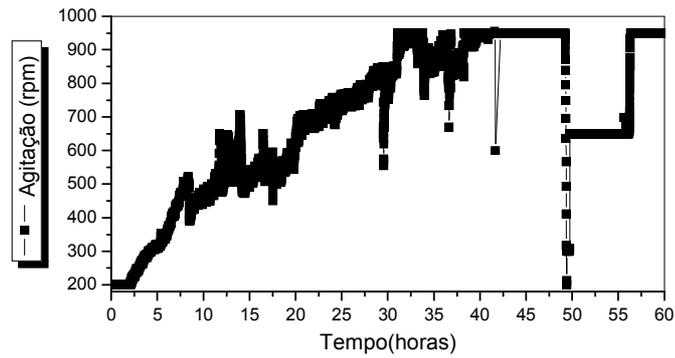
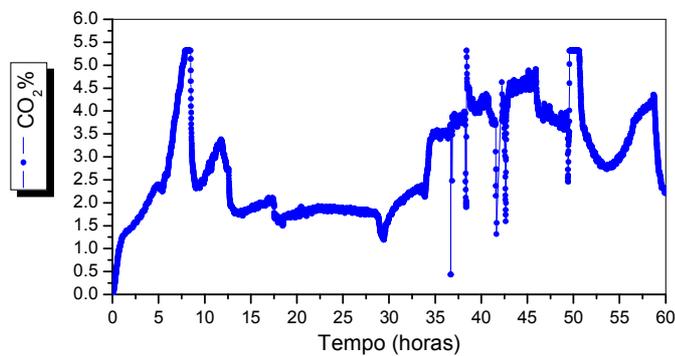


Figura 5.23. Reação de imunodeteção (Western blot) para a confirmação da expressão e secreção da enzima recombinante. O controle positivo (esquerda) foi realizado com PGA secretada de *B. megaterium* selvagem.

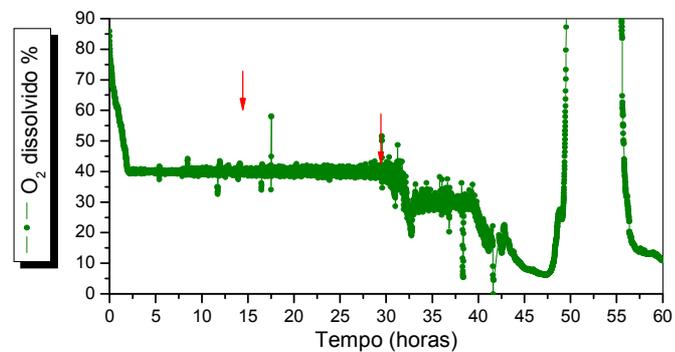
Não foi detectada atividade enzimática em nenhuma das amostras coletadas neste cultivo. Este resultado foi atribuído ao efeito da glicosilação, que é uma modificação pós traducional que a levedura *Pichia pastoris* faz (como já mencionado na seção 2.1), essa modificação explicaria a completa ausência de atividade da enzima.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.24 Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados. (A) velocidade de agitação, (B) % CO<sub>2</sub>, (C) concentração de oxigênio dissolvido. (Ensaio B6). As setas mostram o início e o final da suplementação de oxigênio puro.

Uma ferramenta importante para a confirmação da expressão de uma proteína recombinante é a detecção pelo processo de imunodetecção (western blott). Para a reação de western blott foi utilizado o anticorpo anti-subunidade  $\beta$  recombinante de PGA de *B. megaterium*, produzido em no laboratório de biologia

molecular do DEQ-UFSCar utilizando-se anticorpo anti-sub-unidade Beta. O anticorpo utilizado, reconheceu a PGA secretada no meio de cultura concentrado da levedura recombinante confirmando a expressão (ver Figura 5.23).

A Figura 5.24 mostra os valores da velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido e da porcentagem de dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, com respeito ao tempo de cultivo. Como pode ser visto, a agitação do meio variou entre 200 e 950 rpm para manter a porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido em 40% do seu limite de saturação. A produção de gás carbônico durante o cultivo foi significativa, tendo uma velocidade maior durante a fase exponencial do crescimento, como seria de se esperar. Após o final da fase exponencial se observa uma queda na concentração de CO<sub>2</sub>, indicando o esgotamento do substrato. Pode-se observar, também, que a partir de 30h de cultivo devido a quedas na energia elétrica a medição dos equipamentos ficou afetada, apresentando oscilações nas medições.

#### **5.2.6 Ensaio B5: Cultivo em batelada simples, meio BSM com 40 g/L Glicose**

Foram realizados dois cultivos em biorreator de 5L utilizando o meio sintético de crescimento BSM (vide Tabela 4.3). Após 24h de inoculação do reator o cultivo foi terminado devido a que o microorganismo não apresentou crescimento celular. Acredita-se que o meio de cultivo utilizado apresenta deficiência de algum nutriente essencial para o crescimento deste microorganismo recombinante.

### **5.3. Estimativa de parâmetros cinéticos**

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Roberto de Campos Giordano ( LaDABio) vem há anos estudando a modelagem, otimização, automação e controle de biorreatores para cultivo de vários microrganismos e células, como uma de suas principais linhas de pesquisa. Neste contexto, diferentes algoritmos estão já disponíveis no LaDABio. Entre eles o algoritmo *Simulated Annealing* (SA),

que é um método global estocástico para otimização, combinado com o algoritmo local de Levenberg Marquardt (MONTERA et al., 2008). O algoritmo SA “escapa” de mínimos locais em direção ao mínimo global, desde que haja número suficiente de iterações. Os algoritmos estão implementados em MatLab.

Utilizando os algoritmos *Simulated Annealing* (SA) e Levenberg Marquardt (LM) foi ajustado um modelo de crescimento e produção (equações 13 a 17) com termos de morte e manutenção. As cinéticas de crescimento empregadas foram definidas usando a equação de Monod, aqui também incluindo diferentes formas de inibição pelo metabólito indesejado (equações 18(a) a 18(e)).

### 5.3.1 Ajuste dos dados do ensaio em batelada simples (Ensaio B1) utilizando Monod sem inibição como cinética de crescimento.

O conjunto de dados do ensaio B1 (ensaio em batelada) foi utilizado para estimativa dos valores dos parâmetros por meio do ajuste aos dados experimentais obtidos neste cultivo. Os dados do ensaio B2 (ensaio em batelada alimentada) foram utilizados para validação. Na Tabela 5.11, são apresentados os resultados do ajuste do modelo de Monod (equação 18(d)) aos dados do experimento B1.

Tabela 5.11. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod.

$\mu_{\max} (h^{-1})$	$K_S(g/L)$	$K_D(h^{-1})$	$Y_{X/S}$	$m(h^{-1})$
0,18	0,24	0,0016	0,49	0,0

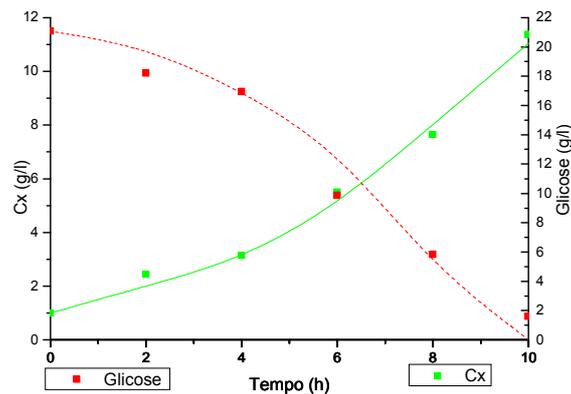


Figura 5.25. Ajuste do modelo de Monod ao cultivo Ens1. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto que as linhas, os valores preditos pelo modelo.

A Figura 5.25 apresenta os resultados do ajuste do modelo, comparando os valores simulados com os experimentais para o cultivo em batelada (experimento B1). Os valores obtidos pelo modelo acompanham muito bem os dados experimentais. Observa-se ainda que não foi necessário alterar as condições iniciais da simulação para obter um bom ajuste.

A Figura 5.26 mostra os resultados obtidos na simulação para o ensaio B3. Observa-se que o modelo de Monod descreve qualitativamente os perfis durante a fase descontínua do cultivo. O consumo de glicose é um pouco mais lento que o previsto pelo modelo, enquanto que a curva de crescimento celular é bem representada até 15h de ensaio.

A partir deste tempo, os valores experimentais de concentração de glicose são sempre superiores aos valores previstos pelo modelo, enquanto que os valores simulados de concentração celular estão sempre acima dos valores experimentais. Esta falta de ajuste pode ser explicada pelo fato do modelo não considerar outros nutrientes como fontes de carbono (incluindo produtos do metabolismo que podem ser fonte não-preferencial quando se aproxima o esgotamento da glicose), além do fato de o modelo não incluir termos de inibição.

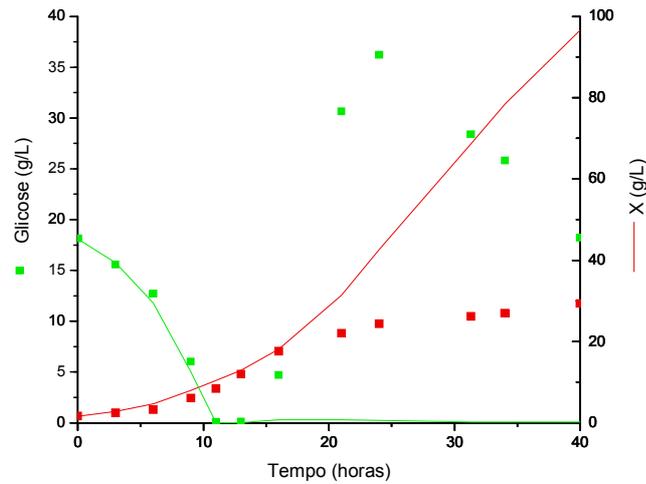


Figura 5.26 Validação do modelo proposto para o cultivo de *Pichia pastoris* em batelada alimentada, utilizando os parâmetros calibrados a partir dos dados do ensaio B1. Os símbolos representam os valores experimentais e as linhas, os valores preditos pelo modelo. Modelo de Monod sem inibição.

### 5.3.2 Ajuste dos dados do ensaio em batelada alimentada (Ensaio B3) utilizando Monod com inibição como cinética de crescimento.

Os dados do ensaio em batelada alimentada (ensaio B3) foram utilizados para estimativa dos valores dos parâmetros cinéticos. Devido a que o cultivo apresenta uma inibição do crescimento celular depois da fase da batelada simples, a estimativa do parâmetro correspondente à inibição ( $K_i$ ) para as equações 18(a) a 18(d) é realizada levando em conta a fase de alimentação. Na Tabela 5.12, são apresentados os resultados do ajuste dos modelos empregados aos dados do experimento B3.

Tabela 5.12 Valores estimados pelo SA dos parâmetros dos modelos de Monod com inibição.

Equação	$K_i$ (g/L)
18(a)	7,0
18(b)	15,0
18(c)	6,0

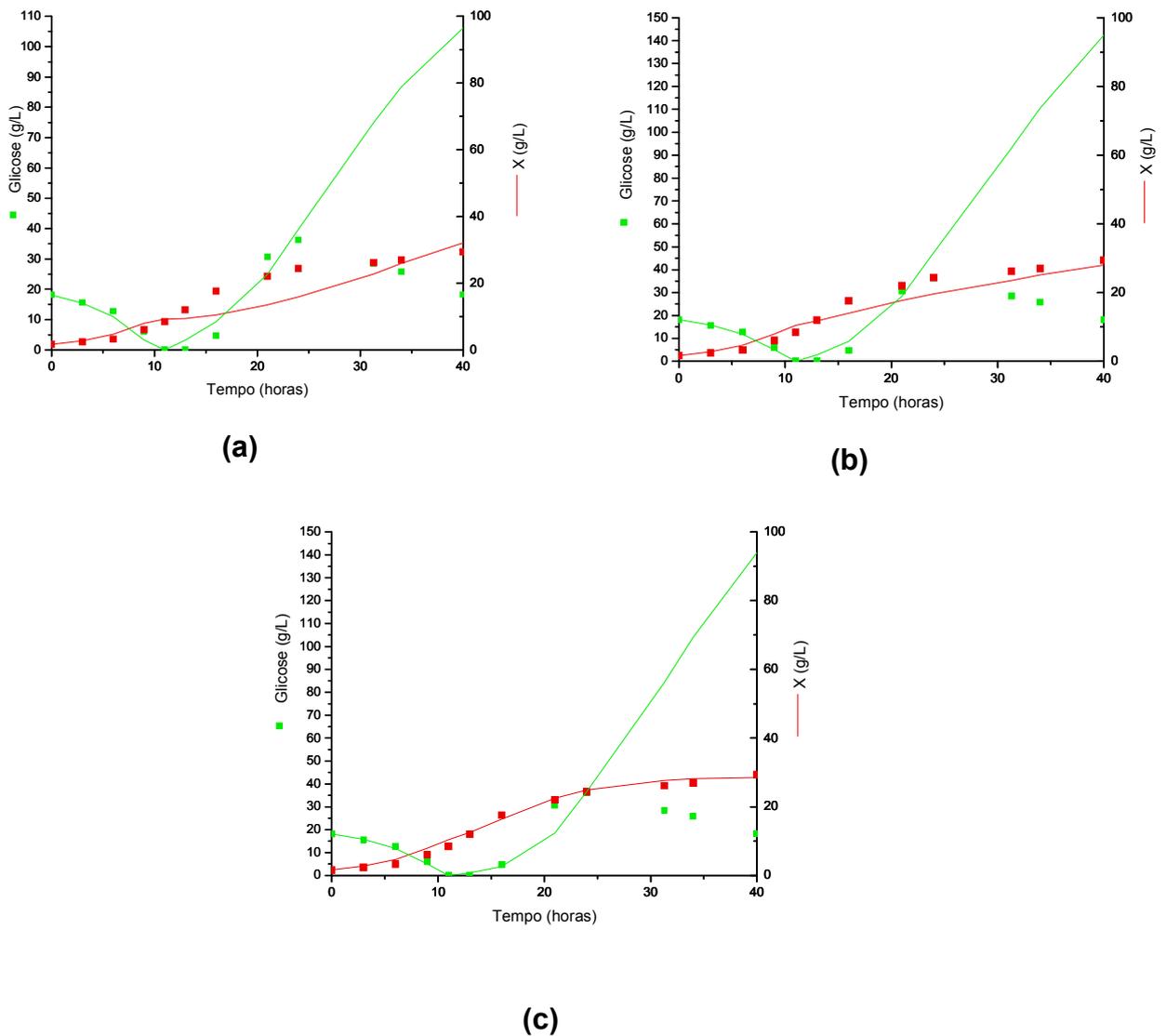


Figura 5.27 Ajuste dos modelos de Monod com inibição (cultivo B3). Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto que as linhas, os valores preditos pelo modelo. (a) Equação 18(a), (b) Equação 18(b) e (c) Equação 18(c).

A Figura 5.27 apresenta os resultados do ajuste dos modelos cinéticos com inibição, comparando os valores simulados com os experimentais para o cultivo em batelada alimentada (experimento B3). Pode-se ver que em todos os ajustes obtidos, a concentração de substrato tem um bom ajuste até as 25h de cultivo, a partir deste tempo, os valores simulados para a concentração de glicose são sempre superiores aos valores experimentais desta variável.

A equação 18(c) apresentou um ajuste melhor em comparação com o ajuste obtido com as equações 18(a) e 18(b) no referido a concentração celular. Observa-se que o modelo da equação 18(c) descreve bem o perfil experimental da

biomassa, sendo esta equação escolhida para fazer parte do modelo matemático para o cálculo do controle ótimo (vide item 5.4).

#### 5.4 Controle Ótimo

Foi desenvolvido um programa de simulação utilizando o pacote computacional MATLAB onde foram resolvidas as equações do modelo matemático (equações 13 a 17) e as equações da teoria do controle ótimo (Anexo).

Neste caso, a variável de controle é a taxa de diluição, e deseja-se otimizar a produção de células em um reator operado em regime batelada alimentada. Para este propósito foi considerada a cinética de crescimento: Monod (equação 18(d)).

O objetivo do controle ótimo é maximizar a concentração celular num tempo final conhecido. O índice de desempenho é, então, dado por:

$$J = X(t_f) \quad (26)$$

Como era de se esperar, o perfil ótimo da taxa de diluição utilizando a equação de Monod como cinética de crescimento (equação 18(d)) recaiu em um controle *bang-bang*, onde a variável de controle vai do valor mínimo ao máximo. Na Figura 5.28 pode-se observar que a vazão é inicialmente igual a zero. Quando a fase em batelada termina, isto é, quando a glicose é esgotada, esta passa a ser máxima até atingir o volume de trabalho do reator (ou o tempo final de cultivo). Isto acontece devido à ausência de termos inibitórios no modelo que restrinjam o valor da concentração de glicose no caldo de cultivo, permitindo valores elevados desta variável. Pode-se também observar que comparando as figuras 5.26 e 5.29, ao utilizar o algoritmo de controle ótimo são atingidas maiores densidades celulares, alcançando aproximadamente 20 g/L a mais no mesmo período de tempo. É importante ressaltar, entretanto, que o modelo cinético utilizado não é consistente com os dados experimentais na etapa final do cultivo e, portanto, os resultados previstos pela simulação, a partir de 15 h de corrida, estão mascarados pela discrepância estrutural do modelo (que não inclui termos de inibição).

Neste caso, os valores máximo e mínimo da variável de controle são conhecidos e dependem da bomba utilizada para fazer a alimentação ( $D_{min}=0$  e  $D_{max}=0.02$ ). Já a Figura 5.29 mostra a concentração celular contra o tempo, podendo-se observar que concentração celular apresenta um grande aumento.

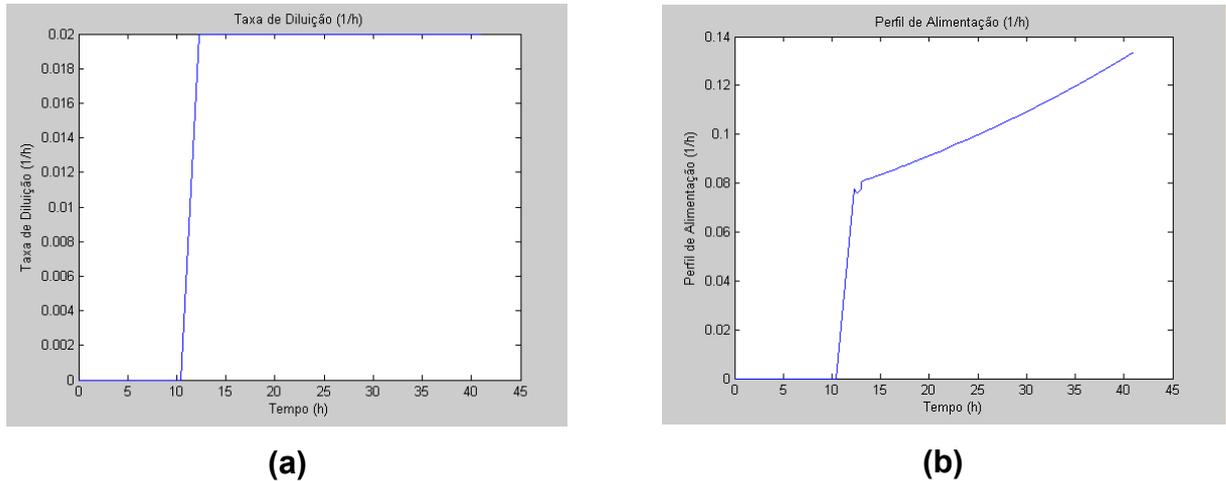


Figura 5.28 Aplicação do Controle ótimo utilizando o modelo de Monod (a) Taxa de diluição (b) Fluxo volumétrico de alimentação.

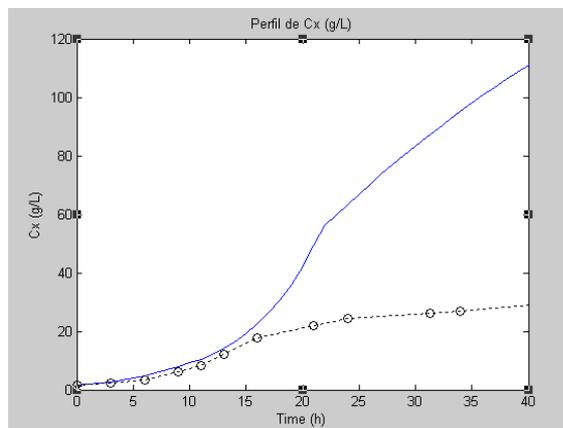


Figura 5.29 Aplicação do Controle ótimo utilizando o modelo de Monod. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto que as linhas, os valores preditos pelo modelo.

A Figura 5.28 mostra que o perfil fornecido pela solução do problema de controle ótimo é do tipo “bang-bang”, não sendo observado nenhum arco singular ao longo da corrida. De fato, esse resultado é consistente, como se demonstra no Anexo: não há solução fisicamente significativa para a equação de singularidade (a.12) em toda a trajetória do sistema.

No caso de haver inibição pelo produto, a equação (a.12) poderá ter soluções para  $S$  dentro do domínio factível dessa variável (vide a matriz indicada no

Anexo, equação a.17). Entretanto, como ainda não foi possível identificar o produto do metabolismo M, maior candidato a principal inibidor da levedura, propõe-se que a solução desse problema seja feita na continuidade deste trabalho.

## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram não só implementar as ferramentas necessárias para determinar estratégias ótimas de alimentação do biorreator, mas, também, agregar dados para uma melhor compreensão do cultivo da levedura, seu metabolismo, cinética de crescimento celular e de produção da enzima.

Dos estudos realizados experimentalmente, pode-se concluir que:

Confirmou-se que a expressão da enzima heteróloga com o promotor *PGK1* de *Pichia pastoris* é de fato associada ao crescimento celular. Entre os metabólitos mais importantes produzidos em câmara rotativa estão etanol, ácido málico e fórmico, que são consumidos após o esgotamento da glicose. Aparentemente, a presença desses catabólitos não causa efeito significativo sobre a produção da enzima, que, como se esperava em um sistema de expressão constitutiva, tem sua velocidade significativamente reduzida após o esgotamento da glicose. *P. pastoris* teve preferência por seis aminoácidos: Glu, Asp, Met, Ile, Phe, Arg.

Experimentos realizados em biorreator mostraram que cultivos de *Pichia pastoris* com controle do oxigênio dissolvido minimizam a produção de metabólitos presentes em cultivos em câmara rotativa (etanol, ácido fórmico, entre outros.), obtendo-se valores mais elevados do fator de conversão  $Y_{x/s}$  (de 0,18 em câmara rotativa a 0,49 em biorreator) e, portanto, permitindo alcançar maiores densidades celulares em menos tempo. As velocidades específicas máximas de crescimento foram da ordem de  $\mu_{\max} = 0,2-0,3 \text{ h}^{-1}$  para cultivos em câmara rotativa e em biorreator.

Constatou-se, em cultivos em biorreator, a secreção pela levedura de um metabólito inibidor do crescimento e, portanto, da produção da alfa-amilase. A velocidade de produção desse composto aumenta em presença de altas concentrações de glicose. Esse inibidor pode ter sido a razão para que não fossem alcançadas atividades enzimáticas maiores em cultivos em biorreator: a atividade específica alcançada em câmara rotativa foi, tipicamente, de 43833 U/g<sub>célula</sub>, enquanto que em biorreator alcançou 13684 U/g<sub>célula</sub>. Tentativas iniciais de

caracterização desse composto por diferentes técnicas (GS-MS/MS, infravermelho, RMN) não foram ainda bem sucedidas, e prosseguirão nos próximos meses.

Sensor de capacitância (FOGALE) apresentou excelente desempenho para inferir tanto a densidade ótica quanto a concentração celular nos cultivos de *P. pastoris* recombinante, fornecendo medidas confiáveis e representativas do crescimento e do estado da célula, apresentando assim grande potencial para uso no controle ótimo em malha fechada da vazão de alimentação em cultivos batelada alimentada.

Ensaio em câmara rotativa expressando a enzima PGA indicaram que há expressão de uma proteína na faixa de massa molar da enzima, mas não se observou atividade enzimática intra- ou extracelular. Uma possível razão para esse fato seria uma glicosilação indesejada da proteína recombinante, em cujo sítio ativo há uma serina amino-terminal com papel essencial na catálise.

Das simulações realizadas para obter ajustes dos parâmetros cinéticos e perfis de controle ótimo, pode-se concluir que:

O algoritmo *Simulated Annealing* (SA) mostrou-se robusto, apresentando bom desempenho no ajuste de parâmetros cinéticos de Monod e do fator de conversão célula/glicose em cultivo de *P. pastoris* recombinante em batelada. Em cultivo em batelada alimentada os modelos incluindo um termo de inibição mostraram melhores ajustes comparados com o modelo de Monod sem inibição. Dentre os modelos com inibição testados, o melhor ajuste foi obtido com o modelo cinético de Monod com inibição não-competitiva.

A otimização dinâmica realizada com base na teoria do controle ótimo, em malha aberta, e utilizando modelos cinéticos simplificados da literatura, levou a resultados promissores quando aplicados, em simulações computacionais, à maximização da concentração celular final de cultivos em batelada alimentada.

Era esperado que o ajuste do crescimento celular e consumo de glicose obtidos utilizando modelos cinéticos simplificados presentes na literatura, que não levam em consideração outros nutrientes como fontes de carbono, não fosse perfeito. Contudo, os modelos foram capazes de descrever comportamentos inibitórios com boa precisão.

Uma vez identificado o metabólito produzido em grande quantidade pela levedura, o modelo cinético levando em conta a inibição por esse produto poderá ser reparametrizado e, então, utilizado pelo algoritmo desenvolvido neste

trabalho, para definir perfil ótimo de alimentação de meio suplementar que possa ser validado experimentalmente.

Finalmente, esses perfis de alimentação obtidos teoricamente deverão no futuro ser validados mediante a implementação destes no programa LabView 7, de monitoramento e controle do biorreator. Os resultados obtidos nessas validações poderão ser utilizados para o reajuste dos modelos empregados. Novos modelos cinéticos poderão ser acoplados aos algoritmos de otimização já desenvolvidos.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, A.; GOTTSCHLING, D. E.; KAISER, C. **Methods in Yeast Genetics: A laboratory course manual**. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, p. 113-114. 1997.

ARAÚJO, J. **Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris***. 100f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2008.

ALMEIDA, J. R. M.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the phosphoglycerate kinase (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, p. 725-737, 2005.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw Hill, 1986.

BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. **Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual**. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, 2000.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2º parte – A Fermentação. **Fermentação.indd** v. 26, p. 46-54, 2007.

CHIRUVOLU, V.; CREGG, J. M.; MEAGHER, M. M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, p. 277-283, 1997.

CEREGHINO, G. P. L. et al. Production of recombinant proteins in fermenter culture of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CREGG, J. M. *Pichia* Protocols (Methods in Molecular Biology). 2.ed. Editora Humana Press. 2007.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, G. P. L. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 45-66, 2001.

CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnol.**, v. 16, p.23-52, 2000.

CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host for transformations. **Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, v. 11, p. 905-910, 1993.

D'ANJOU, M. C.; DAUGULIS, A. J. A model-based feeding strategy for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnol Technique**, v. 11, p. 865-868, 1997.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

DE SCHUTTER, K. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*, a methylotrophic yeast. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 561-6, 2009.

GALDINO, A. S. Clonagem e expressão de uma  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido. 159f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2008.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 334-361, 1998.

GUPTA, R. et al. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HANG et al. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p.185–188, 2009.

HARTNER, F. S. et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Res**, v. 36, p. e76-e76, 2008.

HOU, J. P.; POOLE, J. W. The amino acid nature of ampicillin and related penicillins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 1510-1515, 1969.

IEMMA, M. R. C. **Clonagem e expressão de penicilina G acilase de *B.megaterium* em *Bacillus megaterium* e em *Pichia pastoris***. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos / Departamento de Engenharia Química, 2009. Relatório Científico de Pós-Doutorado.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4.. ed. Editora Sarvier, 2006.

ILLANES, A. et al. Production of penicillim G acylase from *Bacillus megaterium* in complex and defined media. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 263-270, 1994.

JAHIC, M. et al. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v. 24, p. 385–393, 2002.

Kern A, Hartner FS, Freigassner M, Spielhofer J, Rumpf C, Leitner L, Frohlich KU, Glieder A (2007) *Pichia pastoris* "just in time" alternative respiration *Microbiology* 153:1250-1260. Seguir modelo de Referência de artigo de revista. Referências com mais de 3 autores, indicar o primeiro e a expressão et al.

LEDEBOER, A. M. et al. Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*. **Nucl. Acids Res.**, v. 13, p. 3063-3082, 1985.

LULI, G.W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1004-1011, 1990.

MACAULEY-PATRICK S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249–270, 2005.

MONTERA, L. et al. A heuristic search for optimal parameter values of three biokinetic growth models for describing batch cultivations of *S. pneumoniae* in bioreactors. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 5027, p. 359-368, 2008.

MORAES, L. M. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; OLIVER, S. G. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express  $\alpha$ -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 1067–76, 1995.

NGUYEN, T. L. T.; GHEEWALA, S. H.; GARIVAIT, S. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 4135–4142, 2007.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. 2. ed. Kluwer Academic/Plenum Press, 2003.

RAMIREZ, W. F. **Process Control and Identification**. Academic Press, 1994.

REIS, G. B. et al. Control of fed-batch yeast cultivation using a capacitance sensor. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROCESS SYSTEMS ENGINEERING – PSE 2009, 10., Salvador, 2009.

ROCHA, I. **Model-based strategies for computer-aided operation of recombinant *E.coli* fermentation**. 100f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2003.

SAVIDGE, T. A.; COLE, M. Penicillin acylase (bacterial). **Methods in Enzymology**, v. 43, p. 705-721, 1975.

SAVIDGE, T. A. **Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins**. In: **Biotechnology of Industrial Antibiotics**, Marcel Dekker, 1984.

SHEWALE, J. G.; SIVARAMAN, H. Penicillin acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. **Proc. Biochem.**, v. 24, p. 146-154, 1989.

TEBBANI, S.; DUMUR, D.; HAFIDI, G. Open-loop optimization and trajectory tracking of a fed-batch bioreactor. **Chem. Eng. and Process.**, v. 47, p. 1933-1941, 2008.

TSCHOPP, J. F.; et al. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol.**, v. 5, p. 1305-1308, 1987.

VEIGA, A.; ARRABACA, J. D.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Cyanide resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 239–245, 2003.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, Brasil 2001. p. 91-144. (Biotecnologia na Produção de Alimentos, v.4).

YANG, Y. et al. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into growth medium using *Bacillus megaterium*. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 36, 2006.

YUAN, W. et al. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. **J. Cell. Sci.**, v. 110, p. 1935-1945, 1997.

WALKER, G. M. Yeast Metabolism. In: *Yeast Physiology and Biotechnology*, 2000, Wiley, Scotland, pp. 203-264.

## ANEXO: SOLUÇÃO DO PROBLEMA DE CONTROLE ÓTIMO

Deseja-se maximizar a concentração celular no tempo final em um biorreator operado em batelada alimentada. O comportamento dinâmico do sistema descrito nas equações 13 a 17 pode ser representado utilizando a nomenclatura do capítulo 3:

$$\frac{dx}{dt} = \dot{x} = \underline{f}(x) + \underline{g}(x) \cdot u \quad (\text{a.1})$$

Onde  $\underline{x}(t)$ , o vetor de variáveis de estado de dimensão  $n$ , no tempo  $t$ .  $\underline{f}(x)$  e  $\underline{g}(x)$  são vetores do modelo matemático:

$$x = \begin{bmatrix} X \\ S \\ M \end{bmatrix}$$

$$f = \begin{bmatrix} (\mu - k_d) \cdot X \\ -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m\right) \cdot X \\ \beta \cdot \mu \cdot X \end{bmatrix} \quad (\text{a.2})$$

$$g = \begin{bmatrix} -X \\ (S_{ALIM} - S) \\ -M \end{bmatrix}$$

$$u = D$$

As restrições para a variável de controle são:

$$u \min \leq u \leq u \max \quad (\text{a.3})$$

onde:  $u \min = 0$  e  $u \max = \frac{F_{\max}}{V}$

As condições iniciais estão dadas por:

$$\begin{aligned} X(0) &= X_0 \\ S(0) &= S_0 \\ M(0) &= M_0 \end{aligned} \tag{a.4}$$

O objetivo deste problema de controle é maximizar a concentração celular no tempo final, assim, o índice de desempenho é dado pela equação 26. Para a maximização deste funcional é necessário a utilização princípio do máximo de Pontryagin, expressado em termos do Hamiltoniano:

$$H = \underline{\lambda}^T \cdot (\underline{f}(\underline{x}) + \underline{g}(\underline{x}) \cdot u) \tag{a.5}$$

O Hamiltoniano pode ser reescrito:

$$H = \psi(\underline{x}, \underline{\lambda}) + u \cdot H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) \tag{a.6}$$

Onde:

$$\psi(\underline{x}, \underline{\lambda}) = \underline{\lambda}^T \cdot \underline{f}(\underline{x})$$

$$H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) = \underline{\lambda}^T \cdot \underline{g}(\underline{x}) \tag{a.7}$$

Substituindo as equações a.2 nas equações a.7, obtém-se:

$$\psi(\underline{x}, \underline{\lambda}) = \lambda_1 \cdot (\mu - k_d) \cdot X - \lambda_2 \cdot \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot X + \lambda_3 \cdot (\beta \cdot \mu \cdot X) \tag{a.8}$$

$$H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) = \lambda_1 \cdot (-X) + \lambda_2 \cdot (S_{ALIM} - S) + \lambda_3 \cdot (-M) \tag{a.9}$$

O princípio mínimo para o controle ótimo requer:

$$\text{Se } H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) \geq 0 \text{ então } u = u_{\min}$$

$$\text{Se } H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) \leq 0 \text{ então } u = u_{\max}$$

$$\text{Se } H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) = 0 \text{ então } u = u_{\text{sing}}$$

No intervalo de controle singular,  $H_u$  é igual a zero, e, portanto, suas derivadas também devem ser zero:

$$\lambda_1 \cdot (-X) + \lambda_2 \cdot (S_{ALIM} - S) + \lambda_3 \cdot (-M) = 0 \quad (\text{a.10})$$

$$\frac{dH_u}{dt} = 0 \quad (\text{a.11})$$

Para determinar a primeira derivada de  $H_u$  (equação a.11) com respeito ao tempo, utilizam-se colchetes de Lie, conforme descrito em Ramirez 1994.

$$\frac{dH_u}{dt} = \lambda^T \cdot [f, g](x) = 0 \quad (\text{a.12})$$

Onde:

$$([f, g](x))_i = \sum_{j=1}^n (f_j \cdot \frac{\partial g_i}{\partial x_j} - g_j \cdot \frac{\partial f_i}{\partial x_j})$$

A variável de controle no intervalo de controle singular pode ser determinada diferenciando-se  $H_u$  com relação ao tempo até que  $u(t)$  apareça explicitamente na derivada. A segunda derivada de  $H_u$  pode ser obtida utilizando colchetes de Lie:

$$\frac{d^2 H_u}{dt^2} = \lambda^T \cdot [f, [f, g]](x) + \lambda^T \cdot [g, [f, g]](x) \cdot u = 0 \quad (\text{a.13})$$

Onde:

$$([f, [f, g]]_i) = \sum_{j=1}^n (f_j \cdot \frac{\partial [f, g]_i}{\partial x_j} - [f, g]_j \cdot \frac{\partial f_i}{\partial x_j})$$

$$([g, [f, g]]_i) = \sum_{j=1}^n (g_j \cdot \frac{\partial [f, g]_i}{\partial x_j} - [f, g]_j \cdot \frac{\partial g_i}{\partial x_j})$$

Em termos matriciais temos:

$$[f, g](x) = \begin{vmatrix} \frac{\partial g_1}{\partial x_1} & \frac{\partial g_1}{\partial x_2} & \frac{\partial g_1}{\partial x_3} \\ \frac{\partial g_2}{\partial x_1} & \frac{\partial g_2}{\partial x_2} & \frac{\partial g_2}{\partial x_3} \\ \frac{\partial g_3}{\partial x_1} & \frac{\partial g_3}{\partial x_2} & \frac{\partial g_3}{\partial x_3} \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \end{vmatrix} - \begin{vmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \frac{\partial f_1}{\partial x_3} \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \frac{\partial f_2}{\partial x_3} \\ \frac{\partial f_3}{\partial x_1} & \frac{\partial f_3}{\partial x_2} & \frac{\partial f_3}{\partial x_3} \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} g_1 \\ g_2 \\ g_3 \end{vmatrix}$$

As condições necessárias para a otimização são:

*Equação de Euler-Lagrange (equação 7):*

$$\begin{aligned} \dot{\lambda}_1 &= \lambda_1 \cdot (\mu - k_d) - \lambda_2 \cdot \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) + \lambda_3 \cdot (\beta \cdot \mu) - \lambda_1 \cdot u \\ \dot{\lambda}_2 &= \lambda_1 \cdot \left( \frac{\partial \mu}{\partial S} \right) \cdot X - \lambda_2 \cdot \left( \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial S} \right) \cdot X + \lambda_3 \cdot \beta \cdot \frac{\partial \mu}{\partial S} \cdot X - \lambda_2 \cdot u \quad (\text{a.14}) \\ \dot{\lambda}_3 &= \lambda_1 \cdot \left( \frac{\partial \mu}{\partial M} \right) \cdot X - \lambda_2 \cdot \left( \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial M} \right) \cdot X + \lambda_3 \cdot \beta \cdot \frac{\partial \mu}{\partial M} \cdot X - \lambda_3 \cdot u \end{aligned}$$

*Condição de Transversalidade para tempo final fixo ( $t_f$ ) e ponto final livre (equação 9):*

$$\lambda_1(t_f) \cdot = 1$$

$$\lambda_2(t_f) \cdot = 0$$

$$\lambda_3(t_f) \cdot = 0$$

O seguinte algoritmo foi usado para determinar a política de controle ótimo:

- Assumir um valor da variável de controle.
- Integrar as equações do modelo matemático para diante no tempo até alcançar o tempo final.
- Integrar as equações dinâmicas de co-estado para trás no tempo desde  $t_f$  (equação a.14). Calcular a concentração de substrato no arco singular

com a equação a.12 (que está transcrita ao final deste anexo, como equação a.15). A ação do controle é calculada a partir da equação a.13. Quando a variável de controle exceda o valor das restrições das fronteiras, a nova variável de controle é o valor da fronteira excedida.

*Cinética de Monod sem inibição: Demonstração de que o perfil ótimo é “Bang-Bang”*

No caso particular da ausência de inibição pelo produto, pode-se facilmente demonstrar que não há valores de  $S$  que definam um arco singular. As equações (a.15) e (a.16), na próxima página, mostram que a única raiz de (a.12) seria  $S = S_{lim}$ , o que não tem sentido físico para um cultivo real em batelada alimentada. Dessa forma, o perfil ótimo de alimentação é do tipo “banf-bang”, como se mostra no item 5.4.

Equação (a.15a):

$$\frac{dH_u}{dt} = \lambda^T \cdot \left[ \begin{array}{l} -(\mu_{\max} * S / (K_s + S) - kd) * X + (\mu_{\max} * S - kd * K_s - kd * S) / (K_s + S) * X - \mu_{\max} * K_s * X / (K_s + S)^2 * (Salim - S) \\ -(\mu_{\max} * S / (K_s + S) / Y_{XS} - m) * X - (\mu_{\max} * S + m * Y_{XS} * K_s + m * Y_{XS} * S) / (K_s + S) / Y_{XS} * X + \mu_{\max} * K_s * X / (K_s + S)^2 / Y_{XS} * (Salim - S) \\ -\alpha * \mu_{\max} * X * K_s / (K_s + S)^2 * (Salim - S) \end{array} \right] = 0$$

Simplificando (a.15a), obtém-se a equação (a.15b):

$$\frac{dH_u}{dt} = \begin{bmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \end{bmatrix} \cdot \left[ \begin{array}{l} -\mu_{\max} * K_s * X / (K_s + S)^2 * (Salim - S) \\ \mu_{\max} * K_s * X / (K_s + S)^2 / Y_{XS} * (Salim - S) \\ -\alpha * \mu_{\max} * X * K_s / (K_s + S)^2 * (Salim - S) \end{array} \right] = 0 \quad (\text{a.15b})$$

Resolvendo, chega-se a (a.15c):

$$\frac{dH_u}{dt} = \lambda_1 * (-\mu_{\max} * K_s * X / (K_s + S)^2 * (Salim - S)) + \lambda_2 * (\mu_{\max} * K_s * X / (K_s + S)^2 / Y_{XS} * (Salim - S)) + \lambda_3 * (-\alpha * \mu_{\max} * X * K_s / (K_s + S)^2 * (Salim - S)) = 0$$

Finalmente, reagrupando obtém-se a equação (a.16):

$$(Salim - S) * \left( -\lambda_1 + \frac{\lambda_2}{Y_{XS}} - \lambda_3 \alpha \right) = 0 \quad (\text{a.16})$$

Para o caso de cinética de Monod com inibição pelo produto (equação 18c) a equação (a.12) fica:

$$\frac{dH_u}{dt} = \lambda^T \cdot \left[ \begin{array}{l} \mu_{\max} * X * (-K_s * K_i * Salim + K_s * S * K_i + K_s * P * Salim - 2 * K_s * S * P - S^2 * P) / (K_s + S)^2 / K_i \\ - \mu_{\max} * X * (-K_s * K_i * Salim + K_s * S * K_i + K_s * P * Salim - 2 * K_s * S * P - S^2 * P) / (K_s + S)^2 / K_i / Y_{XS} \\ \alpha * \mu_{\max} * X * (-K_s * K_i * Salim + K_s * S * K_i + K_s * P * Salim - 2 * K_s * S * P - S^2 * P) / (K_s + S)^2 / K_i \end{array} \right] = 0 \quad (\text{a.17})$$

Resolvendo, chega-se a:

$$\frac{dH_u}{dt} = \frac{(\mu_{\max} * X * (-K_s * K_i * Salim + K_s * S * K_i + K_s * P * Salim - 2 * K_s * S * P - S^2 * P))}{(K_s + S)^2 * K_i} * (\lambda_1 - \frac{\lambda_2}{Y_{XS}} + \lambda_3 \alpha) = 0$$

Logo, no arco singular, os valores de S são as raízes da seguinte equação:

$$S^2 + (2 * K_s - \frac{K_s * K_i}{P}) * S - (K_s - \frac{K_s * K_i}{P}) * Salim = 0$$