

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Gabriel Parreiras Duarte

Simulação da Produção de Ácido Succínico por *E. Coli* Geneticamente Modificada Utilizando a Metodologia de Análise dFBA

SÃO CARLOS - SP
2025

Gabriel Parreiras Duarte

**Simulação da Produção de Ácido Succínico por E. Coli Geneticamente Modificada
Utilizando a Metodologia dFBA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de
Engenharia Química da Universidade
Federal de São Carlos, para obtenção do
título de bacharel em Engenharia
Química.

Orientador: Felipe Fernando Furlan

São Carlos-SP
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de [nome do centro]
Programa de Pós-Graduação [nome do programa]

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso do candidato Gabriel Parreiras Duarte, realizada em 18/02/2025:

Prof. Dr. Felipe Fernando Furlan
Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori
Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Me. Gabriel Baioni e Silva
Instituição: Universidade Federal de Itajubá

AGRADECIMENTO

Primeiramente, aos meus pais, que me apoiaram ao longo de toda a minha jornada e sempre me auxiliaram nos momentos de dificuldades e incertezas da vida. Que sempre me proporcionaram oportunidades para crescimento e me incentivaram a sempre correr atrás dos meus sonhos e objetivos de vida.

Aos meus amigos da graduação, que me proporcionaram diversos momentos memoráveis que levarei comigo por toda a minha vida. Que estavam ao meu lado nos momentos de dificuldades, sempre me ajudando a seguir adiante e proporcionando momentos de alegria e conforto.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Fernando Furlan, que me apresentou o tema, me guiando e dando suporte durante ao longo de todo o desenvolvimento e trabalho, sempre com energia e boa vontade para me ensinar e apoiar.

Ao Gabriel Baioni, que me auxiliou com o desenvolvimento do trabalho, sempre me guiando, ensinando e dando sugestões sobre como executar cada etapa e os próximos passos a serem seguidos.

E a Deus, por sempre guiar e me abençoar nos caminhos e decisões que tomei para a minha vida, me protegendo e garantindo que cada dia da vida seja um dia abençoado e iluminado.

RESUMO

O ácido succínico é um composto que se destaca na indústria química pela sua estrutura simplificada que permite ser utilizado em diversos setores. Atualmente é obtido utilizando matéria fóssil como base da produção, mas, com a constante busca pela redução do consumo desta matéria prima, rotas biológicas começaram a ser estudadas cada vez mais, buscando assim, uma indústria mais renovável e sustentável. O presente projeto possui como objetivo analisar, através de simulações e utilizando a metodologia conhecida como *dynamic flux balance analysis* (dFBA), a produção de ácido succínico utilizando a bactéria *E.coli* geneticamente modificada e tendo como substrato o glicerol. Essa análise foi realizada utilizando dados experimentais como referência e, tendo como principal modelo de otimização o algoritmo de Nelder-Mead. A função objetivo foi a otimização do crescimento celular durante a etapa aeróbia do processo e a produção de ácido succínico durante a fase anaeróbia. Juntamente com a análise dFBA, foi utilizado também a metodologia *flux balance analysis* (FBA) a fim de verificar o comportamento da *E.coli* em diferentes meios de cultivo. Os resultados obtidos foram destoantes dos registrados experimentalmente pelo artigo utilizado como base, apresentando um maior crescimento celular e uma menor produção de ácido succínico, em tempos de produção inferiores em ambos os casos. Com essa discrepância entre os valores simulados e os valores experimentais, nota-se que a análise dFBA não se mostrou eficiente na simulação dos processos laboratoriais, sendo necessário um estudo mais aprofundado a fim de verificar a origem destes valores e entender o que poderia ser feito para que os resultados sejam mais precisos e condizentes com a realidade.

PALAVRAS-CHAVE: ácido succínico; simulação; dFBA; *E.coli*, glicerol, Nelder-Mead.

ABSTRACT

Succinic acid is a compound that stands out in the chemical industry due to its simplified structure, which allows its use in various sectors. Currently, it is obtained using fossil-based raw materials as the foundation of production. However, with the ongoing pursuit of reducing fossil resource consumption, biological routes have been increasingly studied, aiming for a more renewable and sustainable industry. This project aims to analyze, through simulations and using the methodology known as dynamic flux balance analysis (dFBA), the production of succinic acid using genetically modified *Escherichia coli* (*E. coli*) with glycerol as the substrate. This analysis was conducted using experimental data as a reference, with the Nelder-Mead algorithm as the primary optimization model. The objective function was the optimization of cell growth during the aerobic phase of the process and the production of succinic acid during the anaerobic phase. Alongside dFBA analysis, the flux balance analysis (FBA) methodology was also employed to assess the behavior of *E. coli* in different culture media. The results obtained deviated from those recorded experimentally in the reference study, exhibiting higher cell growth and lower succinic acid production, with shorter production times in both cases. This discrepancy between the simulated and experimental values indicates that dFBA analysis was not effective in accurately simulating laboratory processes. Therefore, further studies are necessary to determine the origin of these differences and to understand what adjustments could be made to improve the accuracy and reliability of the results.

KEYWORDS: Succinic Acid, simulation, dFBA, *E. coli*, glycerol, Nelder-Mead

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expectativa de crescimento do mercado de Ácido Succínico de 2022 a 2030.	3
Figura 2 – Participação dos diferentes setores industriais no mercado global de ácido succínico.....	4
Figura 3 – Esquematização do simplex para a duplicação do poliedro a partir do ponto (1) de maior valor na função objetivo.....	13
Figura 4 – Ciclo do Ácido Cítrico.....	16
Figura 5 – Resultados do experimento prático de fermentação de dois estágios utilizando glicerol puro	20
Figura 6 - Ajuste dos parâmetros cinéticos para a fase aeróbia.....	31
Figura 7 – Dados simulados e experimentais do crescimento celular com fluxo irrestrito de oxigênio	33
Figura 8 – Crescimento celular com fluxo de oxigênio limitado a metade do valor máximo registrado em fluxo irrestrito.....	33
Figura 9 – Crescimento celular e consumo de componentes no meio salino com fluxo de oxigênio irrestrito.....	35
Figura 10 - Ajuste dos parâmetros cinéticos para a fase anaeróbia	36
Figura 11 – Produção de Ácido Succínico em duas bateladas alimentadas.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção bioquímica do ácido succínico utilizando diferentes microrganismos ..	17
Tabela 2 – Parâmetros Cinéticos do Glicerol para a Simulação da Etapa Aeróbia utilizando a Equação de Monod	31
Tabela 3 – Parâmetros Cinéticos do Acetato para a Simulação da Etapa Aeróbia utilizando a Equação de Monod	31
Tabela 4 – Parâmetros Cinéticos da taxa de consumo de Glicerol para a Simulação da Etapa Anaeróbia utilizando a Equação de Levenspiel.....	36
Figura 1 – Expectativa de crescimento do mercado de Ácido Succínico de 2022 a 2030.	3
Figura 2 – Participação dos diferentes setores industriais no mercado global de ácido succínico.....	4
Figura 3 – Esquematização do simplex para a duplicação do poliedro a partir do ponto (1) de maior valor na função objetivo.....	13
Figura 4 – Ciclo do Ácido Cítrico	16
Figura 5 – Resultados do experimento prático de fermentação de dois estágios utilizando glicerol puro	20
Figura 6 - Ajuste dos parâmetros cinéticos para a fase aeróbia	31
Figura 7 – Dados simulados e experimentais do crescimento celular com fluxo irrestrito de oxigênio	33
Figura 8 – Crescimento celular com fluxo de oxigênio limitado a metade do valor máximo registrado em fluxo irrestrito	33
Figura 9 – Crescimento celular e consumo de componentes no meio salino com fluxo de oxigênio irrestrito.....	35
Figura 10 - Ajuste dos parâmetros cinéticos para a fase anaeróbia	36
Figura 11 – Produção de Ácido Succínico em duas bateladas alimentadas	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dFBA	Dynamic Flux Balance Analysis
DFO	Derivative-Free Optimization
FBA	Flux Balance Analysis
ML	Machine Learning
NLP	Non Linear Programing

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVO	6
2.1. OBJETIVO GERAL	6
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	6
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
3.1. FLUX BALANCE ANALYSIS (FBA)	7
3.1.1. DYNAMIC BALANCE ANALYSIS (DFBA)	8
3.2. OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS	9
3.2.1. PROGRAMAÇÃO LINEAR	10
3.2.1.1. MÉTODO SIMPLEX	11
3.2.2. OTIMIZAÇÃO LIVRE DE DERIVADAS	12
3.2.2.1. MÉTODO DOS POLIEDROS FLEXÍVEIS	12
3.3. GLICEROL	13
3.4. ÁCIDO SUCCÍNICO	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. FERRAMENTAS PARA AS SIMULAÇÕES	18
4.2. MODELOS CINÉTICOS	19
4.2.1. AJUSTES DOS PARÂMETROS	22
4.3. OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO	24

4.3.1. AVALIAÇÃO DO PROCESSO PELA ANÁLISE FBA	25
4.3.2. SIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR AERÓBIO EMPREGANDO DFBA	26
4.4. PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO EM MEIO ANAERÓBIO	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1. CRESCIMENTO CELULAR	31
5.2. PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO	36
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	39
6.1. CONCLUSÕES	39
6.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A - CÓDIGO PYTHON PARA ANÁLISE FBA DO CRESCIMENTO CELULAR	47
APÊNDICE B - CÓDIGO PYTHON PARA ANÁLISE FBA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO	49

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o aumento da preocupação com meio ambiente, e, por consequência, com a substituição do uso de petróleo e gás natural para a produção de compostos químicos, a indústria química teve de buscar novos meios de produção para mitigar e minimizar os impactos ambientais gerados, de tal forma que, os processos bioquímicos passaram a ser cada vez mais viáveis (Bajpai, 2020). A biotecnologia está presente em diversos setores de produção e com diferentes propósitos, recebendo assim, uma classificação conforme sua atuação e seu objetivo, de tal forma que a indústria química recebe a codificação de biotecnologia branca (Kafarski, 2012).

Estima-se que cerca de 60% dos insumos físicos da economia global possam ser produzidos utilizando biotecnologia, sendo dois terços dessa parcela de origem não biológica, como plástico e combustível (McKinsey & Company, 2020). De acordo com uma estimativa de McKinsey & Company (2020) realizada com 400 casos cientificamente viáveis, a aplicação dessas novas tecnologias poderia gerar uma movimentação econômica no mundo de até US\$4 trilhões de dólares por ano nos próximos dez a vinte anos.

A aplicação da biotecnologia no setor químico é capaz de trazer diversos benefícios para o meio ambiente, uma vez que esse tipo de processo se apresenta eficiente no que se diz respeito à utilização de recursos renováveis, baixa produção de resíduos, baixa emissão de dióxido de carbono (gás responsável pelo efeito estufa) e redução no consumo de energia e água (Bajpai, 2020).

A biotecnologia teve um grande crescimento ao longo dos anos, trazendo impacto em diversas áreas e setores, como na produção de alimentos, de medicamentos e diversos produtos químicos. Esse crescimento será impulsionado nos próximos 20 anos, conforme apresentado pela National Intelligence Council (2021), devido à multidisciplinaridade observada ao envolver as áreas de digital, ciência de dados e simulações. Com a aplicação dessas diversas tecnologias, é esperado uma aceleração em relação a descobertas e previsibilidade na produção e design de processos que envolvem a biotecnologia. Além disso, com a inclusão da área digital à biotecnologia, foi possível visualizar, medir, identificar e manipular sistemas biológicos; tratar instruções genéticas no DNA e RNA e aminoácidos de

bactérias para conseguir sintetizar produtos de valor de mercado; coletar, digitalizar e armazenar instruções genéticas e combinar processos complexos biológicos e não-biológicos (National Intelligence Council, 2021).

O ácido succínico é um composto que faz parte da família de ácidos C4-dicarboxílicos, sendo amplamente empregado na indústria alimentícia, química e farmacêutica (Jiang et al., 2017). Atualmente, a produção de ácido succínico é baseada na utilização de fontes de petróleo, uma matéria-prima não renovável e geradora de gases responsáveis pelo efeito estufa. Desse modo, com a busca por meios de se reduzir os impactos ambientais na indústria química, diversas pesquisas e estudos estão sendo desenvolvidos para se avaliar a produção de ácido succínico a partir do ciclo do ácido cítrico, utilizando como substrato a glicose (Sánchez; Bennett; San, 2005) e o glicerol (Li et al., 2017; Soellner, 2015).

O glicerol é um composto orgânico presente em azeites, óleos e é obtido em grandes quantidades durante a produção de biocombustível (Embrapa, 2021). Com o rápido crescimento de biodiesel, a excessiva quantidade de glicerol obtido como subproduto, que pode chegar a 10% (w/w), fez com que o preço do composto orgânico reduzisse de forma significativa, colocando em foco a utilização dessa substância para como matéria-prima para a produção de diversos produtos com valor agregado maior (Li et al., 2017).

O ácido succínico vem ganhando importância nos setores da indústria química, alimentícia e farmacêutica devido à sua gama de aplicações, principalmente no que diz respeito a uma produção industrial mais sustentável e com menor impacto negativo para o meio ambiente, contribuindo assim, para o cumprimento de políticas que visam minimizar os impactos do aquecimento global. Como indício desse crescimento, tem-se o mercado dos Estados Unidos, que, segundo pesquisas, apresenta um indício de crescimento anual (CAGR) de 9,2% no período de 2022 a 2030, assim como mostrado na Figura 1, com grande participação da produção a partir de rotas bioquímicas no lugar de rotas petroquímicas (GRAND VIEW RESEARCH, 2022). No mercado global, a expectativa de CAGR no período de 2021 a 2031 é de 6,8%, de tal forma que, em 2027, o valor anual pode chegar à marca de US\$ 290 milhões (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2021).

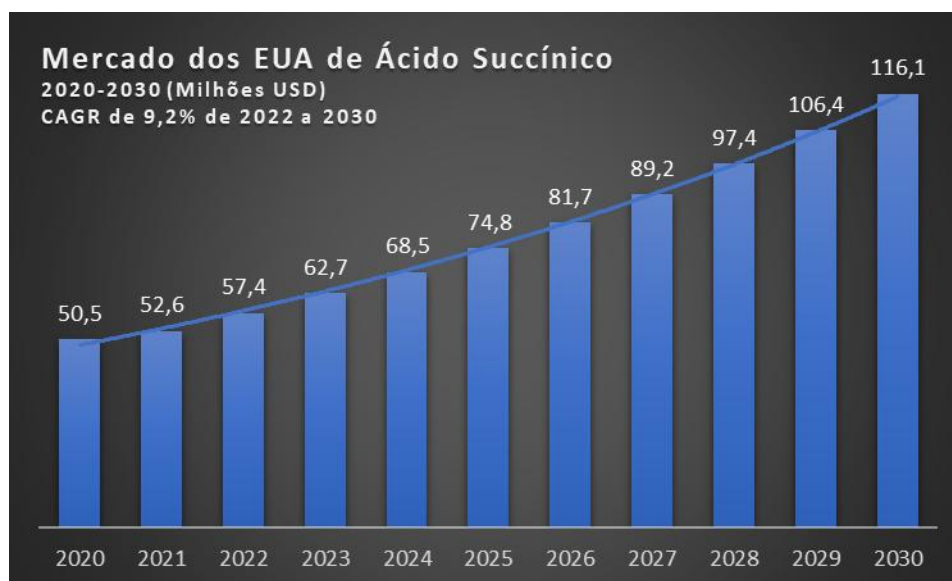


Figura 1 – Expectativa de crescimento do mercado de Ácido Succínico de 2022 a 2030.

Fonte: Adaptado de Grand View Research (2022)

O mercado em que o ácido succínico é empregado é diverso e se aplica a uma gama de indústrias, como apresentado na Figura 2. No mercado de produtos de higiene pessoal e cosméticos, o crescimento é justificado em parte pelo crescimento do veganismo ao redor do mundo e de uma maior conscientização das pessoas no que tange o cuidado e a preservação do meio ambiente, preferindo assim, comprar produtos sustentáveis que não geram impactos negativos no meio ambiente, sendo pelo seu descarte ou pela sua produção (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

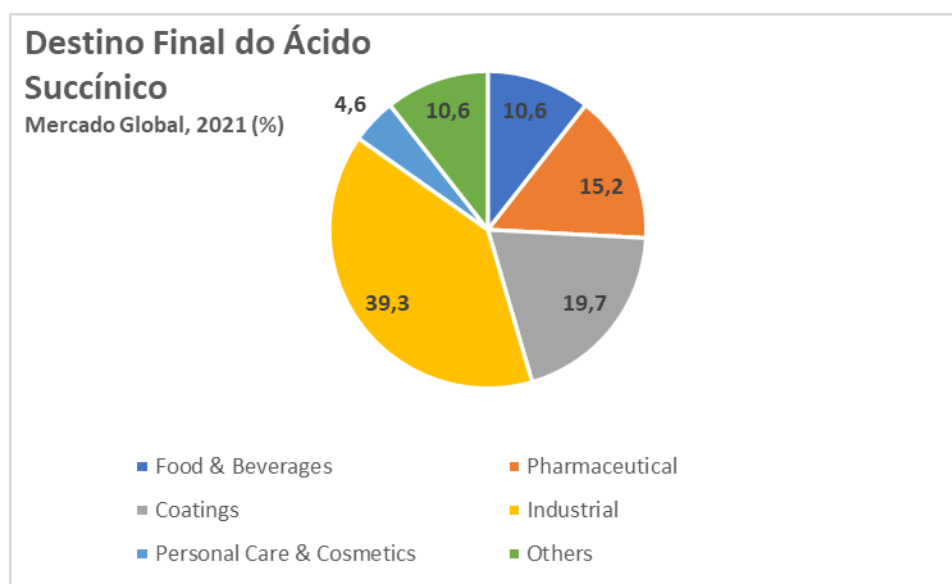


Figura 2 – Participação dos diferentes setores industriais no mercado global de ácido succínico

Fonte: Adaptado de Grand View Research (2022)

Como principais *players* do mercado, é possível destacar empresas multinacionais que possuem unidades de produção no Brasil, tais quais a Basf, a Dow Chemicals, a GC Innovation America e a Corbion (GRAND VIEW RESEARCH, 2022); (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2021). Na América Latina, o Brasil é tido como um dos principais produtores do ácido succínico. Entretanto, o Brasil não apresenta uma produção significativa frente aos países asiáticos, os principais produtores mundiais, que possuíram uma parcela de 30% da produção durante o ano de 2021 (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

Dados comerciais divulgados em estudos da União Europeia em 2013 mostram a diferença de preço entre o ácido succínico produzido utilizando combustíveis fósseis e através de rotas biológicas. De forma geral, o ácido succínico produzido pela rota petroquímica apresentou uma oscilação de valor de USD 2.400,00 a USD 2.600,00 por tonelada, enquanto o composto produzido via rotas biológicas teve uma oscilação de preço de USD 2.860,00 a USD 3.000,00 por tonelada. (Weastra, 2013). Devido à diferença de preço existente, o ácido succínico sustentável possui dificuldade em competir no mercado, de tal maneira que, mesmo que não seja

prejudicial para o meio ambiente, empresas acabam optando pela aquisição desta matéria oriunda da rota petroquímica a fim de minimizar os custos de produção.

Para que o ácido succínico de origem biológica seja capaz de competir no mercado, faz-se necessário a redução do seu valor de venda, e, para isso, a otimização de seus processos produtivos se torna fundamental. A fim de avaliar o comportamento da produção, bem como encontrar mecanismos capazes de reduzir os custos operacionais, a simulação do processo se torna um caminho interessante na busca pela otimização do processo. Entender como as rotas metabólicas e o crescimento do microrganismo se comportam em diferentes cenários, permite que estudos laboratoriais se tornem mais eficientes e eficazes ao se ter dados como base e facilitar a tomada de decisão sobre quais cenários abordar.

Desse modo, este presente projeto possui como intuito simular, a partir da análise dFBA, a produção de ácido succínico a partir da rota fermentativa utilizando a bactéria *E.coli* como microrganismos e utilizando o glicerol como substrato.

2. OBJETIVO

2.1.OBJETIVO GERAL

Realizar a análise, utilizando a metodologia da análise de fluxo metabólico dinâmico (dFBA, dynamic flux balance analysis), da produção de ácido succínico utilizando *E.coli* modificada geneticamente e tendo glicerol como principal substrato do processo.

2.2.OBJETIVO ESPECÍFICOS

- i. Comparar os valores obtidos a partir das simulações com valores obtidos em experimentos realizados em laboratório;
- ii. Identificar possíveis limitantes em experimentos laboratoriais;
- iii. Avaliar o comportamento do crescimento celular e da produção de ácido succínico.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. FLUX BALANCE ANALYSIS (FBA)

A Análise de balanço de fluxo, do inglês Flux Balance Analysis (FBA), é uma aproximação baseada na premissa de que o processo ocorre em estado estacionário para metabólitos internos, amplamente utilizada para o estudo de redes bioquímicas, principalmente em trabalhos que envolvem a reconstrução de redes metabólicas (Orth et al., 2010). Essa metodologia, quando comparada com outras existentes, possui um baixo consumo de dados, mas, em contrapartida, não é capaz de realizar análises que envolvem fenômenos mais complexos nos processos biológicos, como por exemplo na regulação de genes (Liu; Bockmayr, 2020).

A partir dos cálculos realizados pelo FBA, é possível prever a taxa de crescimento de um organismo ou até mesmo a produção de um metabólito de interesse (Orth et al., 2010). Essa metodologia de análise é aplicada em diversos setores da indústria, servindo para prever a produção de compostos metabólicos (Jensen; Keasling, 2018) (Xu; Ye; Liu, 2018), o desenvolvimento de doenças no corpo humano (Nilsson; Nielsen, 2017) e até mesmo entender o metabolismo de plantas (Shameer et al., 2018).

Em relação à estimativa da produção de bioprodutos, a FBA pode ser aplicada para diversos organismos, cada qual possuindo modelos metabólicos para serem utilizados nas simulações, garantindo assim, uma maior precisão dos resultados alcançados (Orth et al., 2010).

Com o avanço da tecnologia, a utilização de *machine learning* (ML) juntamente com a análise FBA passou a ser uma opção na busca de desenvolver métodos de predição mais eficazes, uma vez que a ML é capaz de extrair informações relevantes das fontes de dados e, com isso, aperfeiçoar a interpretação dos resultados obtidos a partir da FBA automatizando o processo (Sahu et al., 2021).

O FBA aplicado ao modelo de *E.coli* pode ser representado por um sistema de equações lineares através de uma matriz estequiométrica para um conjunto de “m” metabólitos e “n” reações, tendo assim a Equação 1.

$$S \cdot \vartheta = 0 \quad (1)$$

Em que “S” é a matriz estequiométrica (m x n) que contém os coeficientes estequiométricos de cada metabólito nas reações e “ ϑ ” é o vetor de fluxos metabólitos

($n \times 1$) que representa a taxa de cada reação.

Para o crescimento celular, a função objetivo do FBA será a maximização deste crescimento, assim como representado pela Equação 2, em que “Z” representa a taxa de crescimento celular e “c” um vetor binário que define quais reações contribuem para o crescimento.

$$\max Z = C^t \cdot \vartheta \quad (2)$$

As principais restrições usualmente impostas na análise FBA referem-se ao limite que cada fluxo de metabólito terá, sendo estes, definidos a partir das condições do meio que será simulado, como por exemplo a presença ou ausência de certos compostos. As restrições são representadas pela Equação 3, em que “ $\vartheta_{\min,i}$ ” e “ $\vartheta_{\max,i}$ ” são, respectivamente, o limite inferior e o limite superior.

$$\vartheta_{\min,i} \leq \vartheta_i \leq \vartheta_{\max,i} \quad \forall i \in \{1, \dots, n\} \quad (3)$$

Para as análises FBA que foram realizadas, a premissa de que o estado do processo é pseudo-estacionário, ou seja, a dinâmica interna da célula é muito mais rápida que as mudanças externas, podendo assim assumir que, o sistema atinge o estado estacionário instantaneamente e, por consequência a concentração dos metabólitos intracelulares não muda ao longo do tempo.

3.1.1. DYNAMIC BALANCE ANALYSIS (dFBA)

Devido ao fato de o método FBA possuir limitações, por assumir a premissa de estado estacionário para metabólitos internos, novas técnicas de análise para simulações foram desenvolvidas a fim de atender diferentes situações referentes ao crescimento de microrganismos. Um desses métodos refere-se ao dFBA, extensão do FBA que permite simular o crescimento de microrganismos ao longo do tempo incorporando a variação temporal nas concentrações de metabólitos e outros fatores dinâmicos, fazendo assim, com que seja possível analisar as mudanças.

A análise dFBA é comumente empregada devido à possibilidade de análise do crescimento diáuxico de microrganismos, por exemplo (Mahadevan et al., 2002). O crescimento diáuxico refere-se a um cultivo em que há a presença de dois compostos de carbono no meio, fazendo com que o microrganismo ali cultivado possa utilizar esses dois substratos para o seu crescimento. A metodologia dFBA pode ser utilizada para a simulação desses casos e para a determinação das dinâmicas do crescimento do microrganismo, por exemplo, em meios de cultivo em que a *E.coli* possui como

substratos a glicose e o acetato (Mahadevan et al., 2002).

Além disso, para que seja possível realizar a análise dFBA, é necessário que seja conhecido os parâmetros cinéticos de cada um dos processos (crescimento celular e produção do ácido succínico). Sem os parâmetros cinéticos, não é possível utilizar a análise dFBA uma vez que, este modelo de análise é baseado na reconstrução da rede metabólica do microrganismo em escala de genoma. Na análise dFBA, há a representação matemática de cada uma das reações metabólicas fundamentais para o processo fermentativo que está ocorrendo, de tal maneira que cada equação é dada por uma coluna da matriz numérica criada e cada linha representa o balanço de cada um dos metabólitos presentes nas reações. Esse modelo numérico permite a criação de restrições representadas como equações de balanço das entradas e saídas de cada reação e com as desigualdades impostas pelos limites do sistema (Orth et al., 2010).

A análise dFBA por sua vez, combina a otimização via FBA junto ao balanço de massa de cada um dos componentes presentes no processo. O balanço de massa, para o crescimento celular, é dado pela Equação 4, em que “X” é a concentração de biomassa e “ μ ” é a taxa específica de crescimento, e pela Equação 5, em que “S” é a concentração do metabólito e “ ϑ_i ” é a taxa específica de consumo ou produção do metabólito.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

$$\frac{dS_i}{dt} = \vartheta_i X \quad (5)$$

3.2. OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

De acordo com Biegler (2010), a otimização, de forma geral baseia-se em, dado um sistema ou processo, encontrar a melhor resolução a partir de restrições determinadas e aplicadas e, para isso, faz-se necessário alguns pontos gerais, tais quais: função objetivo, um modelo preditivo e variáveis do sistema/processo.

Na indústria química, diversos processos estacionários e dinâmicos podem ser descritos através de modelos não-lineares, permitindo analisar cada um dos processos e realizar ajustes que trarão impactos significativos em questão de produção, qualidade e receita (Biegler, 2010). A otimização de processos trata dessas melhorias a partir da aplicação de métodos matemáticos aos modelos que descrevem

o processo estudado. A otimização se baseia em teorias matemáticas rigorosas para encontrar a melhor forma de operação a partir da descrição matemática do que é “melhor”, ou seja, do objetivo da otimização. Assim, ao otimizar o processo, temos a garantia que o ponto encontrado é o melhor possível, ao menos localmente. Vale ressaltar que, como a otimização se baseia no modelo do processo, quanto mais acurado for o modelo melhor será o resultado prático da otimização.

O problema de otimização pode ser descrito por uma função objetivo, para a qual deseja-se encontrar o ponto de mínimo ou máximo, um conjunto de equações que delimitam a região viável do problema, chamado de restrições e as variáveis do processo. Dependendo das características deste problema, métodos numéricos específicos podem ser empregados para sua resolução. O avanço da computação permitiu uma maior capacidade de processamento e de forma mais rápida e permitiu o desenvolvimento de modelos mais eficazes para a otimização, garantindo que programas computacionais de otimização passassem a ser empregados para problemas mais complexos, como por exemplo, controle de processos baseados em otimização, simulações de rotas metabólicas, previsão de produção, modelagem de processos, dentre outras aplicações. (Biegler, 2010).

Existem algumas classes específicas de problemas de otimização, de acordo com a existência e características dos diversos itens que o definem. Por exemplo, se a função objetivo e todas as restrições forem lineares, teremos um problema de programação linear. Esse é o caso que surge da análise de balanço de fluxo, no qual o balanço dos fluxos dá origem a restrições lineares e a função objetivo, linear, normalmente é o crescimento celular ou a produção de algum metabólito. Este caso será tratado em maiores detalhes na próxima seção.

3.2.1. PROGRAMAÇÃO LINEAR

De acordo com Edgar; Himmelblau e Lasdon (2001), a programação linear é uma técnica de otimização amplamente utilizada e uma das mais eficientes. A programação linear refere-se a problemas em que, tanto a função objetivo, quanto as restrições, são lineares. Esses problemas envolvem diversas igualdades e desigualdades, de tal maneira que a solução deve satisfazer todas as restrições impostas, além de atingir um dos pontos extremos da função objetivo, sendo este um valor máximo ou um valor mínimo.

As restrições impostas no problema de otimização possuem como objetivo central delimitar a região em que o ponto ótimo, sendo este de mínimo ou máximo, deve se encontrar, trazendo a resolução mais próxima às condições reais do processo que está sendo analisado e otimizado.

O avanço da tecnologia e da ciência da computação permitiu que problemas mais complexos, com um maior número de variáveis fossem resolvidos com a utilização da programação linear, obtendo uma solução que atenda às restrições impostas de forma mais ágil e eficiente.

3.2.1.1. MÉTODO SIMPLEX

Um dos modelos de programação linear utilizados na resolução de problemas de otimização é o método *simplex*, um método de duas fases para encontrar o ponto de otimização.

No método *simplex*, a primeira fase é responsável por definir a existência ou inexistência de uma solução básica viável, enquanto a segunda fase utiliza da solução existente como ponto inicial da resolução, podendo chegar à conclusão de que o problema a ser otimizado, ou possui uma solução de mínimo valor, ou o mínimo valor encontrado é ilimitado, ou seja, tende ao infinito (Edgar; Himmelblau; Lasdon, 2001).

A função objetivo no método *simplex* é dada pela Equação 6, apresentada abaixo. As variáveis x_n são o conjunto de variáveis de decisão do modelo, enquanto o conjunto de parâmetro c_n são os coeficientes da função objetivo.

$$f = c_1x_1 + c_2x_2 + \dots + c_nx_n \quad (6)$$

A otimização da função objetivo, através da programação linear, pode ser feita a partir da forma-padrão que considera o conjunto de restrições seguindo a linearidade esquematizada a partir da Equação 7 apresentada por Edgar; Himmelblau e Lasdon (2001).

$$\begin{array}{ccccccc} x_1 & & + & a_{1,m+1}x_{m+1} & + & \dots & + & a_{1n}x_n & = & \bar{b}_1 \\ x_2 & & & & & & & & & \\ \vdots & & + & \vdots & & \vdots & & \vdots & & \\ x_m & & + & a_{m,m+1}x_{m+1} & + & \dots & + & a_{mn}x_n & = & \bar{b}_m \\ (-f) & + & \bar{c}_{m+1}x_{m+1} & + & \dots & + & \bar{c}_nx_n & = & -\bar{f} \end{array} \quad (7)$$

A forma canônica por sua vez é dada pela Equação 8.

$$f = \bar{f}, \bar{x}_1 = \bar{b}_1, \dots, \bar{x}_m = \bar{b}_m, x_{m+1} = x_{m+2} = \dots = x_n = 0 \quad (8)$$

A partir da aplicação das fases um e dois apresentadas previamente, é possível garantir que a solução será sempre viável. A partir da solução obtida, é possível realizar testes de otimização a fim de verificar se esta é a solução ótima para as condições e restrições aplicadas (Edgar; Himmelblau; Lasdon, 2001).

3.2.2. OTIMIZAÇÃO LIVRE DE DERIVADAS

A otimização livre de derivadas é uma classe de modelos que não requerem o cálculo de derivadas da função objetivo. Esses modelos, segundo Karasözen (2007), foram desenvolvidos para que fossem solucionados problemas de otimização não-lineares sem restrições em que a derivada da função objetivo não está disponível.

Esses modelos de otimização livre de derivadas são frequentemente utilizados, principalmente no que diz à problemas de otimização industrial, devido ao fato de os dados utilizados serem experimentais e, por conta disso, possuírem incertezas que podem impactar no processo de otimização. Além disso, nesses casos, por se tratarem de processos reais, a definição da função objetivo pode ser muito complexa ou pode não haver derivadas dessa função, inviabilizando demais métodos de otimização (Karasözen, 2007). Diversos códigos de DFO foram desenvolvidos, possibilitando, para modelos de simulação grandes e complexos, métodos de otimização “caixa preta” (Biegler, 2010).

Os códigos DFO são capazes de utilizar métodos de busca direta, métodos os quais são de fácil aplicação e possuem uma gama de problemas e modelos de otimização. Devido ao fato de os métodos de busca direta possuírem critérios de parada que não dependem de derivadas, esses métodos permitem que o ponto de otimização encontrado seja globalmente ótimo, e não apenas localmente ótimo. Entretanto, caso o número de variáveis de decisão aumente, esse método de busca pode se deteriorar, trazendo resultados imprecisos que não condizem com os pontos de otimização da função objetivo analisada (Biegler, 2010).

3.2.2.1. MÉTODO DOS POLIEDROS FLEXÍVEIS

O método dos Poliedros Flexíveis, também conhecido como “*Simplex sequencial*” foi formulado por Spendley, Hext, e Himsworth em 1962. Esse método

seleciona pontos nos vértices de um *simplex* para avaliar a função objetivo do problema de otimização, de tal forma que, caso seja analisado em duas dimensões, o poliedro possui o formato de um triângulo equilátero, enquanto, caso seja analisado em três dimensões, o formato do poliedro será o de um tetraedro

De forma geral, o método *simplex* sequencial constitui na busca pelo ponto de otimização na direção do ponto do poliedro com maior valor para a função objetivo. Nessa direção, o poliedro é duplicado na extremidade oposta ao ponto de maior valor e, em seguida, a análise é feita novamente. Esse processo é executado até que se chegue na região em que se encontra o ponto de otimização da função objetiva analisada. Vale ressaltar que, neste processo, o “passo” de cada iteração é fixo, sendo igual ao tamanho do *simplex* utilizado para a resolução. Em caso de o *simplex* chegar em um ponto em que o tamanho do poliedro não é capaz de se aproximar mais do ponto da otimização, o tamanho do *simplex* será reduzido pela metade para que o processo continue a ocorrer. (Edgar; Himmelblau; Lasdon, 2001). A Figura 3 apresenta de forma esquematizada o *simplex* e a duplicação do primeiro poliedro a partir do ponto 1, ponto o qual possui o maior valor para a função objetivo.

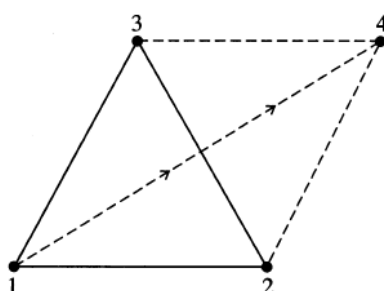


Figura 3 – Esquemática do simplex para a duplicação do poliedro a partir do ponto (1) de maior valor na função objetivo.

Fonte: Edgar, Himmelblau e Lasdon (2001)

Nelder e Mead, em 1965, desenvolveram um sistema mais eficiente e complexo do método *simplex* sequencial que permite que o poliedro possa sofrer alterações em seus lados, havendo expansão e contração de sua forma, de tal forma que, o método proposto, minimiza a função de n variáveis ao utilizar um poliedro de $(n + 1)$ vértices (Edgar; Himmelblau; Lasdon, 2001).

3.3. GLICEROL

O glicerol é um triálcool obtido como subproduto dos processos de produção de etanol e biodiesel amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica,

química e manufatura (Semkiv et al., 2020). Com a busca por combustíveis renováveis e com baixa emissão de carbono na atmosfera, devido aos impactos globais, a produção de etanol e biodiesel aumentou nos últimos anos no intuito de substituir as atuais fontes fósseis utilizadas. Pesquisas indicam que para cada 100 kg de biodiesel produzido, têm-se como subproduto cerca de 10 kg de glicerol puro e, na produção de bioetanol, há uma geração de glicerol de até 10% (w/w) da massa de cana-de-açúcar consumida (Choi, 2008). Por conta do aumento da produção desses combustíveis renováveis, a produção de glicerol bruto aumentou, tornando-se assim, mais abundante no mercado (Ardi; Aroua; Hashim, 2015).

O glicerol bruto pode ser refinado no intuito de transformá-lo em glicerol industrial que pode ser utilizado em diversos setores para produzir produtos de alto valor agregado, entretanto, esse processo de refino é custoso e nem sempre vantajoso (Semkiv et al., 2020). Dessa forma, devido à alta abundância desse composto no mercado por conta da alta na produção de combustíveis renováveis, a necessidade de novas aplicações para essa substância aumenta, fazendo com que diversas pesquisas e estudos surgissem a fim de descobrir novas aplicações para o glicerol bruto. Assim, existe a expectativa de que o glicerol se torne um componente chave na indústria química, de tal forma que, estudos datados de 2020, estimaram que o mercado global desse produto chegaria à marca de cinco bilhões de dólares no ano de 2024 (Semkiv et al., 2020).

Diversos estudos mostram a possibilidade de utilizar o glicerol para fabricar diversos produtos de alto valor agregado no mercado e de importância na busca por um mundo mais sustentável, como por exemplo bioplásticos (Zhu et al., 2013), bioetanol (Choi, 2008) e ácido succínico (Soellner, 2013); (Blankschien et al., 2010); (Li et al., 2017).

O glicerol, desse modo, possui um papel importante no futuro da indústria química no que diz respeito à sustentabilidade da indústria e do mundo, se tornando cada vez mais relevante no atual cenário visto a sua abundância, baixo custo e versatilidade para a produção de produtos de alto valor agregado importantes para o dia a dia das pessoas.

3.4. ÁCIDO SUCCÍNICO

O ácido succínico (ácido butanodióico), $C_4H_6O_4$, aparece naturalmente na natureza, sendo encontrado através de sua forma de éster em tecidos animais,

vegetais, água de nascentes e até mesmo em meteoritos (Othmer, 1997). O ácido succínico é um cristal transparente solúvel em água, etanol e acetona, que possui uma gama de aplicações na indústria química, nos mais diversos setores (Cheng et al., 2012). Suas aplicações estão relacionadas a produção de químicos finos, aditivos de alimentos para a indústria alimentícia, plásticos biodegradáveis e surfactantes, de tal forma que, devido à sua extensa área de aplicação o tornou em um composto químico base promisso e sendo identificado pelo departamento de energia dos Estados Unidos como um dos 12 produtos químicos de plataforma de base biológica com valor agregado (Zhou et al., 2023).

A primeira vez que o ácido succínico foi obtido foi durante o ano de 1550 através da destilação do âmbar por Georgius Agricola (Othmer, 1997). Nos dias de hoje, o ácido succínico é usualmente obtido a partir da via química (gás liquefeito do petróleo) e bioquímica (através da fermentação) (Pinazo et al., 2015).

Uma das principais rotas de produção do ácido succínico é pela via petroquímica, de tal forma que, dentre as rotas disponíveis, a mais simples se refere ao processo de hidrogenação do anidrido maleico em fase líquida (Pinazo et al., 2015), (Othmer, 1997). Para a extração do ácido succínico nesse processo, diversos métodos foram estudados, dentre eles, têm-se a extração, a cristalização seletiva, a destilação após sua desidratação e a esterificação seguida pela fragmentação da mistura (Othmer, 1997). Esse processo, por sua vez, traz impactos negativos para o meio ambiente uma vez que a liberação de gás carbônico, responsável pela intensificação do efeito estufa e, por consequência, do aquecimento global. (Yang et al., 2024). Por conta do impacto ambiental, e por ser contra os acordos ambientais que seguem a redução de emissão de carbono na atmosfera, esse processo de produção começou a ser substituído por rotas menos agressivas ao meio ambiente (Yang et al., 2024). Não apenas esse processo, mas também outros ligados à rota petroquímica, como por exemplo a hidrogenação catalítica do ácido maleico ou do ácido fumárico (Othmer, 1997).

Devido aos impactos negativos gerados ao meio ambiente pela rota petroquímica, juntamente ao elevado preço do barril de petróleo nos dias atuais, estudos por rotas sustentáveis se tornaram mais frequentes, passando a viabilizar cada vez mais esses novos caminhos de obtenção do ácido succínico. (Cheng et al., 2012) (Pinazo et al., 2015).

Um dos meios sustentáveis para a produção do ácido succínico é através da rota fermentativa utilizando biomassa renovável como matéria prima, de tal forma que, nesse processo, ainda existe a vantagem de haver assimilação do dióxido de carbono, gás responsável pelo efeito estufa (Cheng et al., 2012). Um dos processos de fermentação refere-se à obtenção do ácido succínico a partir do ciclo do ácido cítrico (Ciclo TCA ou Ciclo de Krebs) (Mitrea et al., 2024), rota a qual é apresentada através da Figura 4. Visando encontrar caminhos mais eficientes, diversos estudos, relacionado à mudança de genes dos microrganismos, estão sendo desenvolvidos para tentar otimizar o Ciclo TCA e aumentar a produtividade de ácido succínico pela fermentação (Mitrea et al., 2024).

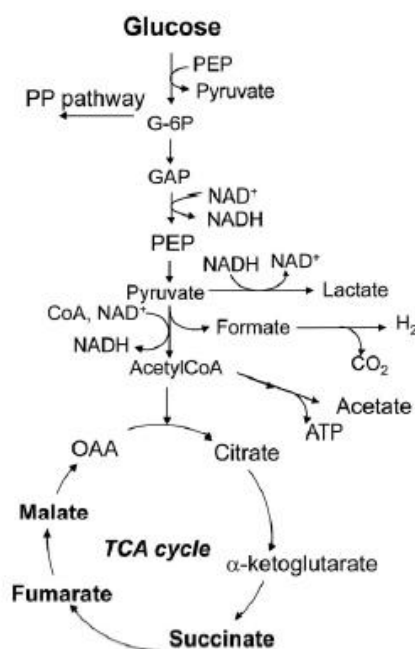


Figura 4 – Ciclo do Ácido Cítrico

Fonte: Adaptada de Thakker et al. (2011)

Mesmo sendo mais vantajoso no quesito de impacto ambiental, a rota bioquímica de produção ainda é um processo em estudo e desenvolvimento, que ganhou foco nos últimos anos e vem cada vez mais sendo estudada a fim de encontrar maneiras mais eficientes e lucrativas para que as empresas possam começar a implementar esse processo em suas indústrias (Cheng et al., 2012).

Para a rota bioquímica, existem diversas pesquisas relacionadas aos microrganismos que podem ser utilizados para o processo fermentativo, bem como

os substratos que podem servir como matéria-prima durante o processo. Isso garante uma maior diversidade e permite que uma gama de biorefinarias possam implementar em seus processos a produção do ácido succínico a partir de subprodutos de seus processos, que, previamente, possivelmente eram descartadas ou revendidas a outras empresas para usarem como matéria-prima de seus processos ou para queima e geração de energia elétrica (Mitrea et al., 2024). A Tabela 1 apresenta alguns dos microrganismos e dos substratos que podem ser utilizados no processo fermentativo de obtenção do ácido succínico.

Tabela 1 – Produção bioquímica do ácido succínico utilizando diferentes microrganismos

Microrganismo	Substrato
<i>A. succinogenes</i>	Glicose
<i>A. succinogenes</i>	Palha do milho
<i>A. succinogenes</i>	Fibra do milho hidrolisada
<i>A. succinogenes</i>	Bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado
<i>A. succinogenes</i>	Soro de leite
<i>A. succinogenes</i>	Resíduos de cascas de frutas cítricas hidrolisados
<i>A. succiniciproducens</i>	Glicose
<i>A. succiniciproducens</i>	Soro de leite
<i>A. succiniciproducens</i>	Glicerol
<i>M. succiniciproducens</i>	Glicose
<i>M. succiniciproducens</i>	Soro de leite
<i>M. succiniciproducens</i>	Madeira hidrolisada
<i>E. coli</i>	Glicose
<i>E. coli</i>	Glicerol
<i>E. coli</i>	Frutose
<i>E. coli</i>	Xilose
<i>E. coli</i>	Bagaço de Cana
<i>E. coli</i>	Sorbitol
<i>S. cerevisiae</i>	Glicose
<i>S. cerevisiae</i>	Glicerol
<i>S. cerevisiae</i>	Sacarose
<i>C. glutamicum</i>	Glicose
<i>B. fragilis</i>	Glicose
<i>F. succinogenes</i>	Casca de laranja
<i>F. succinogenes</i>	Palha de trigo

Fonte: Adaptado de Mitrea et al. (2024) e Cheng et al. (2012).

A diversidade de microrganismos e de substratos que podem ser utilizados na produção de ácido succínico abre uma gama de pesquisas a fim de descobrir novos caminhos e rotas de produção, bem como meios para deixar os processos já existentes mais eficientes e viáveis em escala industrial. Além disso, uma alta

diversidade no número de substratos, permite aqueles que antes tratados como resíduos de processos e vendidos a um baixo valor, possam ser utilizados de maneira mais eficiente para a produção de um composto, o ácido succínico, que possui maior valor agregado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. FERRAMENTAS PARA AS SIMULAÇÕES

Para a realização das simulações para a produção do ácido succínico a partir da rota fermentativa, utilizando a *E.coli* como microrganismo, foi utilizado a linguagem de programação Python. A linguagem em questão possui bibliotecas que permitem a simulação e otimização do processo de crescimento da bactéria e da produção do composto de interesse. A biblioteca Cobra (*Constraints-Based Reconstruction and Analysis*) é uma ferramenta amplamente utilizada para realizar modelagens e análises de redes metabólicas. Com essa ferramenta, é possível aplicar a análise dFBA proposta neste projeto, a fim de modelar e obter resultados a partir da simulação da produção de ácido succínico pela rota fermentativa utilizando a *E.coli* geneticamente modificada.

Para essa modelagem, foi utilizado o modelo metabólico iAF1260 da *E.coli*., uma vez que, este modelo é um dos mais conhecidos para este microrganismo por apresentar os seguintes pontos abordados por Feist et al. (2007):

- Representação abrangente do metabolismo central;
- Foco em condições aeróbias e anaeróbias;
- Representação detalhada do transporte de metabólitos e troca de meio;
- Compatibilidade com dFBA;
- Menor complexidade computacional.

A biblioteca Scipy, por ser vez, possui como funcionalidade principal resolver problemas matemáticos e científicos, sendo fundamental para a computação científica em Python. Para as simulações realizadas, a principal aplicação desse pacote foi a integração das equações diferenciais ao longo do tempo. Esse processo é realizado a partir da função “solve_ivp” contida na biblioteca. Além disso, a biblioteca possui o método minimize, que inclui diversos métodos de otimização de problemas sem restrições e com restrições de igualdade e desigualdade não-lineares. Para o ajuste dos modelos cinéticos aos dados experimentais obtidos na literatura,

empregou-se o método Nelder-Mead, ou políedros flexíveis, que é livre de derivadas e facilmente aplicado a problemas dinâmicos.

Para que seja possível realizar a manipulação de números e a criação de gráficos com os metabólitos da fermentação, foram utilizadas, respectivamente, as bibliotecas "numpy" e "matplotlib".

4.2. MODELOS CINÉTICOS

O desenvolvimento do estudo em questão inicialmente se dá pela definição das constantes cinéticas dos modelos de crescimento que serão utilizados a fim de determinar a produção de ácido succínico utilizando como substrato o glicerol puro.

Os modelos cinéticos foram obtidos utilizando como base dados experimentais obtidos por Li et al. (2018), no qual os autores estudaram a produção de ácido succínico utilizando uma cepa de *E.coli* geneticamente modificada em uma fermentação de dois estágios, tendo como substratos o glicerol puro e o acetato de sódio.

O experimento utilizado refere-se à uma fermentação em meio M9, dividindo-se em duas etapas, aeróbia com o crescimento celular e anaeróbia para a produção do ácido succínico. A etapa aeróbia utiliza o glicerol puro e o acetato de sódio como substrato e o processo ocorre em aproximadamente 28 horas. Ao longo do experimento são medidas as concentrações de célula e de ambos os substratos. Após o término da fase aeróbia, inicia-se a fase anaeróbia, procedimento o qual dura cerca de 103 horas e apenas a concentração dos substratos e do ácido succínico produzido são medidas. A concentração de biomassa não é aferida uma vez que, durante o início dessa fase, é adicionado carbonato de magnésio, impedindo assim, a averiguação da concentração de células por espectrofotometria durante essa fase. Devido à ausência da concentração de células ao longo da fase anaeróbia, foi assumido que o crescimento e a morte celular são desprezíveis, premissas fundamentais para as simulações realizadas em Python. Os resultados obtidos por Li et al. (2018) são apresentados na Figura 5.

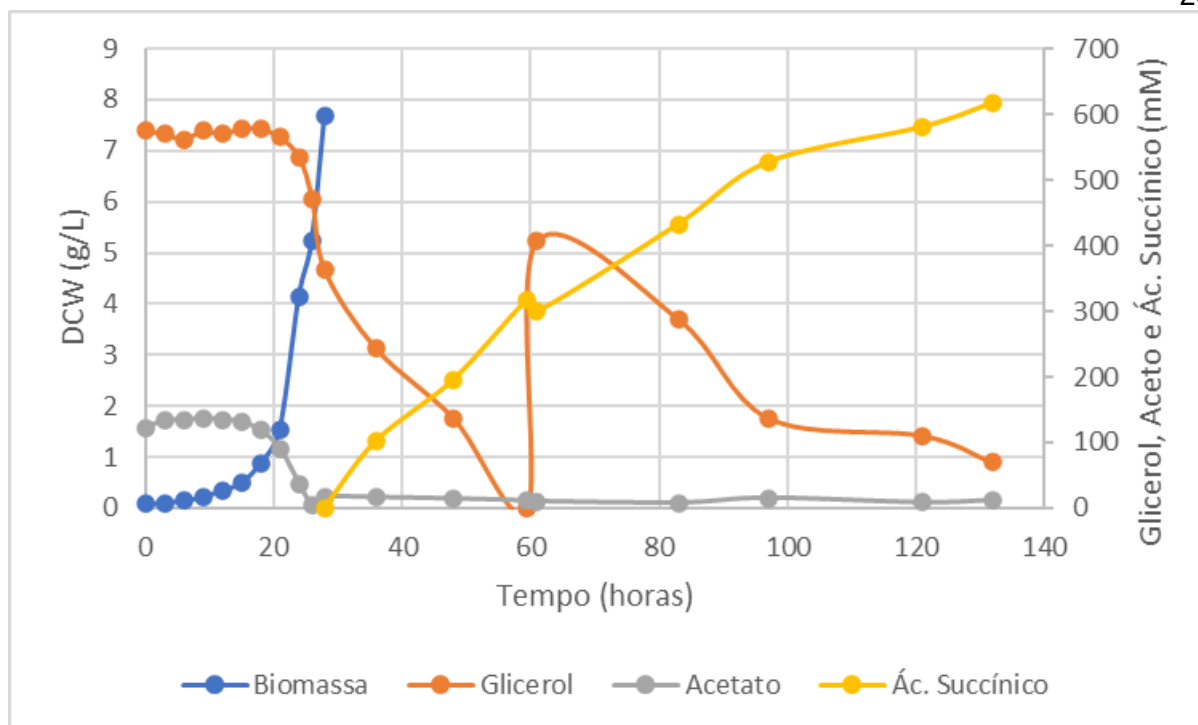


Figura 5 – Resultados do experimento prático de fermentação de dois estágios utilizando glicerol puro

Fonte: Adaptado de Li et al. (2018)

Com os dados experimentais de Li et al. (2018), foi possível chegar nas constantes cinéticas que foram utilizadas para a simulação do processo de produção de ácido succínico. Devido ao fato de a fase aeróbia possuir dois substratos, foi necessário adaptar a equação que dita o crescimento celular, equação a qual utiliza das constantes de crescimento máxima a partir do glicerol e do acetato, de tal forma que o crescimento máximo é dado pela soma da taxa de crescimento máximo de cada um dos substratos. As equações utilizadas para dois substratos são baseadas no trabalho de Gómez-Ríos et al. (2022) e são apresentadas através das Equações 9-12.

A Equação 9 apresenta a taxa de crescimento celular no tempo a partir da concentração celular (X), do crescimento específico associado a cada substrato (μ_{gly} e μ_{act}), a constante de morte celular (k_d), a taxa volumétrica de entrada na alimentação (F) e a taxa de diluição (D). As Equações 10 e 11 determinam o crescimento específico associado a cada substrato presente (glicerol e acetato) a partir do máximo crescimento específico associada a cada substrato ($\mu_{gly,max}$ e $\mu_{act,max}$), das concentrações de cada substrato (C_{gly} e C_{act}) e das constantes de saturação de

Monod de cada substrato (K_{gly} e K_{act}). A Equação 12 define o crescimento específico de todo o processo (μ_{kin}) durante a etapa aeróbia em que há a presença de ambos os substratos.

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu_{gly} + \mu_{act} - k_d) - \left(\frac{F}{D}\right)X \quad (9)$$

$$\mu_{gly} = \frac{\mu_{gly,max} C_{gly}}{K_{gly} + C_{gly}} \quad (10)$$

$$\mu_{act} = \frac{\mu_{act,max} C_{act}}{K_{act} + C_{act}} \quad (11)$$

$$\mu_{kin} = \mu_{gly} + \mu_{act} \quad (12)$$

A partir das premissas adotadas, em que a taxa de morte celular é desprezível e que não há alimentação por se tratar de um processo em batelada, é possível chegar na Equação 13 que descreve a taxa de crescimento celular ao longo do tempo.

$$\frac{dX}{dt} = X \mu_{kin} \quad (13)$$

A fim de avaliar os resultados obtidos, foi utilizado como referência a sobreposição da curva com os pontos experimentais e o valor do máximo crescimento celular específico obtido no trabalho de Li et al. (2018).

Para obter os parâmetros cinéticos da etapa anaeróbia, foi necessário considerar que o processo acontece em duas bateladas, assim como apresentado previamente na Figura 5, devido ao fato de o substrato principal, glicerol, se esgotar durante a primeira parte da batelada alimentada, sendo necessário a adição deste para continuar o experimento. A taxa de consumo de substrato (r_s) é representada na Equação 14 é dada por três fatores:

- Taxa de crescimento celular: razão entre o crescimento celular (r_x) e o rendimento de células a partir do substrato (Y_{XS}).
- Taxa de formação do produto: razão entre a formação de produto (r_p) e o rendimento de produto a partir do substrato (Y_{PS})
- Taxa de consumo de substrato para manutenção: dada pelo produto entre o coeficiente de manutenção (m_s) e a concentração celular (X).

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{XS}} + \frac{r_p}{Y_{PS}} + m_s X \quad (14)$$

Para a simulação, foi considerada a premissa de que não há crescimento celular

na etapa anaeróbia, por não haver dados experimentais do artigo utilizado como base, e que a taxa de manutenção celular é desprezível frente à taxa de formação de produto. Assim, a taxa de consumo de substrato é dada pela Equação 15.

$$r_s = \frac{r_p}{Y_{PS}} \quad (15)$$

Ao longo das simulações, foi notado que há uma inibição do processo por produto, de tal forma que foi necessário utilizar o Modelo de Levenspiel, dado pela Equação 16, para se obter os parâmetros cinéticos da produção de ácido succínico durante a fase anaeróbia que ocorre em bateladas alimentadas.

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{C_s + K_s} \left(1 - \frac{C_p}{K_i}\right)^n \quad (16)$$

Vale ressaltar que a utilização do Modelo de Levenspiel possui como objetivo encontrar um melhor resultado para os parâmetros cinéticos, uma vez que o trabalho de Li et al. (2018) não faz menção de haver inibição por produto durante o processo de produção. Como base para avaliar os resultados, foi utilizado a sobreposição da curva com os pontos experimentais e o valor do rendimento de produto a partir do substrato do trabalho de Li et al. (2018).

Devido ao fato de o processo de produção do ácido succínico ocorrer através de bateladas alimentadas, foi necessário levar em consideração a diluição que ocorre ao se inserir mais substrato no processo entre cada batelada. Por conta disso, para a simulação da segunda batelada, foi levado em consideração o balanço de massa da biomassa e do ácido succínico.

4.2.1. AJUSTES DOS PARÂMETROS

Para realizar os ajustes dos parâmetros, foi utilizada a função *minimize* da biblioteca *scipy.optimize* responsável por encontrar o ponto mínimo da função objetivo em múltiplas dimensões. Para a utilização dessa função, foi necessário fornecer previamente alguns argumentos, dentre eles, a função objetivo a ser otimizada, os valores iniciais de cada variável da função objetivo, o método a ser utilizado para a otimização e os limites inferiores e superiores de cada variável.

Como método de otimização, foi utilizado o método de Nelder-Mead, de tal maneira que não foi necessário calcular as derivadas da função objetivo, permitindo

uma execução mais simples, requerendo apenas um maior poder computacional para a resolução do processo de otimização.

Para a otimização dos parâmetros cinéticos, o objetivo era minimizar o erro quadrado entre os valores que estavam sendo simulados e os valores experimentais extraídos do trabalho utilizado como referência para este estudo. As Equações 17 e 18 apresentam as funções objetivo para a obtenção dos parâmetros cinéticos do crescimento celular e da produção de ácido succínico respectivamente.

$$\min Z = \sum_{i=0}^t \left(\frac{C_{x,sim}(t_i) - C_{x,exp}(t_i)}{3} \right)^2 + \left(\frac{C_{sgly,sim}(t_i) - C_{sgly,exp}(t_i)}{45} \right)^2 + \left(\frac{C_{sacet,sim}(t_i) - C_{sacet,exp}(t_i)}{60} \right)^2 \quad (17)$$

$$\min Z = \sum_{i=0}^t \left(\frac{C_{P,sim}(t_i) - C_{P,exp}(t_i)}{1} \right)^2 + \left(\frac{C_{sgly,sim}(t_i) - C_{sgly,exp}(t_i)}{0,25} \right)^2 \quad (18)$$

Em que, “Z” é o erro quadrado a ser minimizado e $C_{i,sim}$ as concentrações simuladas pelo código e $C_{i,exp}$ as concentrações experimentais para a biomassa, os substratos e o ácido succínico. Como é possível notar, cada termo foi ponderado com uma escala diferente com o intuito de ajustar a curva simulada aos pontos experimentais ao minimizar o erro quadrado associado a cada concentração.

As restrições impostas em ambos os códigos se referem aos limites que cada parâmetro ajustado, a fim de se obter resultados possíveis na realidade. Abaixo são apresentados os limites impostos para o código referente ao crescimento celular:

- Taxas máximas de crescimento (μ_{max_gly} e μ_{max_acet}): devem estar entre 0,01 e 0,3 para glicerol e 0,001 e 0,3 para acetato.
- Constantes de saturação (K_{s_gly} e K_{s_acet}): variam entre 0,01 e 5 para glicerol e 0,1 e 5 para acetato.
- Rendimentos (Y_{XS_gly} e Y_{XS_acet}): os valores são limitados entre 0,01 e 1,0 para glicerol e 0,0001 e 0,8 para acetato.
- Concentração inicial de biomassa (C_x): deve estar entre 0,005 e 8 g/L.
- Concentração inicial de glicerol (C_{s_gly}): varia entre 300 e 1000 mM.
- Concentração inicial de acetato (C_{s_acet}): limitada entre 5 e 150 mM.

Abaixo são apresentados os limites impostos para o código referente à produção de ácido succínico:

- Taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\max}$): deve estar entre 0,01 e 0,3h⁻¹;
- Constante de saturação do substrato (k_s): deve variar entre 0,01 e 5 mM;
- Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato (Y_{PS}): deve estar entre 0,01 e 1,0;
- Constante de inibição pelo produto (k_i): deve variar entre 0,0001 e 2000 mM;
- Expoente de inibição pelo produto (n): deve estar entre 0,01 e 2;
- Concentração inicial do produto (C_p): deve variar entre 0 e 400 mM;
- Concentração inicial do substrato (C_s): deve estar entre 362 e 400 mM.

Esse processo foi realizado para ajustar os parâmetros na obtenção dos parâmetros cinéticos de crescimento de biomassa e na produção de ácido succínico, respectivamente as etapas aeróbia e anaeróbia.

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos do processo anaeróbio, foi implementado um “*multi-start*” a fim de melhorar o processo de otimização e permitir que a curva se sobreponha aos pontos de uma maneira mais precisa. De forma geral, o “*multi-start*” é capaz de partir de pontos aleatórios e otimizá-los. Ao realizar uma comparação destes valores, é possível garantir que será utilizado o que se encaixa melhor com os dados experimentais utilizados como referência. Este método foi utilizado devido à possibilidade de o problema possuir mais de um mínimo local, e assim, ao partir de diferentes pontos, aumenta-se a probabilidade de se encontrar o mínimo global da função objetivo.

4.3. OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO

A otimização do cultivo foi feita em duas etapas, iniciando pela fase aeróbia, onde há o crescimento celular, seguido para segunda fase que representa as bateladas alimentadas realizadas por Li et al. (2018), em estado anaeróbio, para a produção do ácido succínico.

Durante as análises realizadas por FBA e por dFBA, para as fases aeróbia e anaeróbia, foi realizada a remoção e superexpressão de genes para simular as condições realizadas no trabalho utilizado como referência que utiliza cepas de *E.coli* MLB/pTrc99a-*pck*. Nessa cepa utilizada, foram removidos os genes *pflB*⁻, responsável pela conversão de piruvato em ácido fórmico, e *ldhA*⁻, responsável pela conversão de D-Lactato em piruvato, enquanto o gene superexpressado foi o *pck* do MG1655 responsável pela conversão de ATP e oxaloacetato em ADP e em fósforo piruvato .

Foram realizadas análises com e sem a remoção e superexpressão destes genes, a fim de verificar o impacto que geram na produção final.

4.3.1. AVALIAÇÃO DO PROCESSO PELA ANÁLISE FBA

A fim de avaliar o comportamento de cada uma das simulações que foram realizadas (aeróbia e anaeróbia), foi criado um código para que fosse possível realizar a análise FBA de cada fase. Os códigos criados se encontram no Apêndice A e no Apêndice B, respectivamente para o crescimento celular e para a produção de ácido succínico.

Para a análise FBA do crescimento celular, o objetivo era maximizar a concentração de biomassa no meio. As análises realizadas possuíam como objetivo secundário avaliar o comportamento do crescimento frente a diferentes cenários, sendo eles: o fluxo intracelular de oxigênio; o fluxo intracelular de cada um dos substratos; a necessidade dos componentes presentes no meio salino utilizado pelo trabalho experimental tomado como base e os efeitos gerados pela remoção e superexpressão de genes da *E.coli*.

Para a análise da produção de ácido succínico, a função objetivo utilizada refere-se a maximizar a produção de succinato. Além disso, outras análises foram realizadas a fim de observar o comportamento da produção frente a diferentes cenários, sendo eles: a presença de fluxo intracelular de dióxido de carbono; a necessidade de algum composto do meio salino para a produção; os impactos gerados pela remoção e supressão dos genes do microrganismo e a presença de subprodutos no processo, principalmente, o etanol.

A partir das simulações em FBA, foi possível averiguar quais compostos poderiam impactar durante a análise dFBA para cada uma das condições de aeração, verificando a possível limitação de crescimento celular ou de produção de ácido succínico na ausência de compostos que poderiam não ter sido mencionados ou especificados durante o trabalho de Li et al. (2018), impedindo que as simulações pudessem ocorrer.

Além disso, com a ajuda da análise FBA, foi possível averiguar a possível presença de outros produtos que não foram abordados no trabalho experimental e, com isso, acompanhar graficamente sua produção durante a análise dFBA.

4.3.2. SIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR AERÓBIO EMPREGANDO dFBA

A fase aeróbia foi determinada pela equação de Monod aplicada a cada um dos substratos, representada de forma geral pela Equação 19. A equação de Monod dita a taxa de crescimento específica celular (μ), a partir da taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max}$) obtida pela Equação 12; do rendimento do crescimento celular a partir do consumo de substrato (Y_{xs}), pela concentração de cada um dos substratos (S); pela concentração celular (X) e pela constante de saturação de Monod de cada substrato (K_s).

$$\mu = \frac{\frac{\mu_{\max}}{Y_{xs}} S}{K_s + S} \quad (19)$$

Nesta equação de Monod, devido ao fato de a simulação ser realizada através do consumo de substrato e não levando em consideração o crescimento celular em si, foi o consumo específico de substrato representado na Equação 19, representado pelo termo $\frac{\mu_{\max}}{Y_{xs}}$.

Para simular o meio salino utilizado por Li et al. (2018), foi considerado fluxo intracelular das seguintes substâncias: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; NaCl ; MgSO_4 ; CaCl_2 ; NH_4Cl ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; CoCl_2 e H_3BO_4 . Para a determinação do meio, não foi fornecido a concentração inicial de cada um destes compostos, sendo apenas inserido um limite inferior bastante negativo para o fluxo intracelular deste composto, sendo que fluxos negativos significam que o composto está entrando na célula. Dessa forma, nenhum destes compostos se tornou limitante no processo de crescimento. Vale ressaltar que nenhum dos compostos apresenta em suas soluções aquosas íons que possam inibir o crescimento celular. Além disso, o trabalho de Li et al. (2018) também faz uso de extrato de levedura, mas, por conta de limitações existentes no modelo iAF1260, será utilizado o cloreto de amônia como fonte de nitrogênio para o crescimento celular. Na análise dFBA realizada, não foi considerado os aminoácidos e outros compostos presentes no extrato de levedura utilizado por Li et al. (2018) devido ao fato de a *E.coli* não necessitar destes para o seu crescimento.

A fim de avaliar se algum dos compostos presentes no meio salino está sendo limitante no processo de crescimento celular no meio aeróbio realizado por Li et al. (2018), foi realizado um balanço de massa dos compostos, considerando a

concentração inicial fornecida em seu trabalho. Esta concentração inicial foi utilizada única e exclusivamente com o objetivo de definir o balanço de massa para estes compostos, não interferindo, portanto, no resultado final do crescimento celular. A partir deste balanço de massa, é possível verificar se algum dos compostos teve um consumo maior do que a quantidade fornecida no meio salino inicial, ao apresentar uma concentração negativa no gráfico plotado exclusivamente para este balanço.

Em relação à taxa de aeração utilizada para a simulação, foram considerados dois cenários. O primeiro meio de aeração apresenta um fluxo intracelular irrestrito de oxigênio, de tal forma que não haja restrição no crescimento por conta da falta de aeração no meio. O segundo cenário de aeração refere-se à metade do valor máximo de fluxo intracelular de oxigênio observado a partir da primeira simulação, de tal forma que, a *E.coli* não estará consumindo o máximo de oxigênio que seria capaz. Essa abordagem foi realizada pois não haviam informações suficientes para determinar a taxa de transferência de massa do oxigênio para a fase aquosa e nem a taxa de absorção de oxigênio pelo microrganismo.

Definidos os limites dos fluxos de transferência de compostos externos para o interior da célula, foi possível realizar a simulação da etapa aeróbia empregando o dFBA. Nessa simulação, a cada etapa da resolução numérica do sistema de equações diferenciais, a equação de Monod é empregada para atualizar o limite inferior do fluxo dos substratos, glicerol e acetato. Após isso, realiza-se a otimização do crescimento celular, restrito a esses fluxos, para determinar o crescimento celular e a produção de metabólitos associada ao crescimento. Isso é realizado partindo-se do pressuposto que a cada instante a célula irá se adaptar às condições externas para maximizar seu crescimento. Uma vez obtidos os fluxos que maximizam o crescimento celular, esses fluxos são empregados para calcular os balanços materiais e as derivadas das concentrações, que serão empregadas na próxima iteração da integração numérica.

Para o crescimento celular, foi utilizado o método *simplex* juntamente com FBA a fim de realizar a otimização do cultivo. No sistema de otimização foi considerado apenas o crescimento celular como objetivo principal, visando maximizar este valor. Os demais fluxos presentes, como a absorção de oxigênio pela célula, o consumo de ambos os substratos (glicerol e acetato) e o tempo de fermentação não foram otimizados neste trabalho. A Equação 20 apresenta a função objetivo da análise dFBA

realizada, em que, a otimização possui como intuito maximizar a taxa de crescimento celular. A Equação 21, por sua vez, apresenta a variação da concentração celular ao longo do tempo.

$$\max Z = \vartheta_{biomassa} \quad (20)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \vartheta_{biomassa} \cdot C_x \quad (21)$$

Para realizar a otimização, foram impostas restrições de não-negatividade, assim como apresentado pela Equação 22.

$$X, C_{s_gly}, C_{s_acet} > 0 \quad (22)$$

Além disso, foram impostas restrições em relação aos fluxos intracelulares de glicerol, acetato, oxigênio e de cada componente do meio salino, assim como apresentado pelas Equações 23, 24, 25 e 26 respectivamente.

$$\vartheta_{gly} \geq -\mu_{gly} C_x \quad (22)$$

$$\vartheta_{acet} \geq -\mu_{acet} C_x \quad (23)$$

$$\vartheta_{Oxigênio} \geq -50 \quad (24)$$

$$-100 \leq \vartheta_i \leq 100 \quad (25)$$

Os valores utilizados nas restrições dos fluxos de oxigênio e de cada um dos íons do meio salino foram escolhidos a fim de mostrar que não há restrição ou limitação do fluxo, desse modo, não se tornando um agente limitador do processo.

4.4. PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO EM MEIO ANAERÓBIO

Para a simulação da produção de ácido succínico, assim como no processo de obtenção dos parâmetros cinéticos, foi utilizado o Modelo de Levenspiel adaptado através da adição do rendimento do produto em relação ao consumo do substrato (Y_{PS}) conforme representado pela Equação 26. A adição do termo se deve ao fato, de, assim como para a simulação do crescimento celular utilizando a equação de Monod, a simulação é realizada a partir do consumo de substrato e não levando em consideração a produção de ácido succínico em si.

$$\mu = \frac{\frac{\mu_{max}}{Y_{PS}} C_s}{C_s + K_s} \left(1 - \frac{C_p}{K_i}\right)^n \quad (26)$$

Diferentemente do processo aeróbio, em que acontece em um meio salino, o processo anaeróbio foi simulado desconsiderando este meio, uma vez que, durante o trabalho de Li et al. (2018), após a conclusão do crescimento celular, a solução foi centrifugada e as células foram isoladas, de tal forma que, para o processo de produção de ácido succínico, o meio utilizado não continha os mesmos compostos do processo aeróbico, havendo apenas dióxido de carbono, sendo borbulhado constantemente, a fim de manter um meio anaeróbio. Dessa forma, a simulação ocorreu na ausência de oxigênio, de tal forma que os únicos compostos presentes no início da simulação foram a biomassa obtida a partir da simulação aeróbia e o glicerol como substrato. Devido à baixa concentração de acetato no trabalho de Li et al. (2018) este substrato foi desconsiderado.

Assim como na obtenção dos parâmetros cinéticos para a produção de ácido succínico, a segunda batelada levou em consideração a diluição que acontece ao se adicionar mais glicerol ao meio. No trabalho de Li et al. (2018), durante o processo anaeróbio, não foi detectado a produção de etanol, de tal forma que, para a análise dFBA realizada, foi monitorado a produção deste composto, a fim de verificar se a simulação apresenta o mesmo comportamento do experimento realizado em laboratório.

A fim de verificar se há crescimento ou morte celular durante o processo de produção do ácido succínico, o crescimento celular também foi monitorado durante a análise dFBA. De forma geral, foi adotado a premissa de que, em condições anaeróbias, não há crescimento celular da *E.coli* e que, no tempo decorrido do experimento simulado, a taxa de morte celular poderia ser desprezada por apresentar um baixo valor.

Novamente, o limite inferior do fluxo de entrada do glicerol na célula foi atualizado a cada etapa da integração do sistema de equações diferenciais empregando o modelo de Levenspiel. Uma vez determinado esse fluxo, o FBA foi realizado empregando, como função objetivo, a maximização da produção de ácido succínico, dado que o crescimento celular foi desprezível nessa etapa. A Equação 27 apresenta a função objetivo da análise dFBA realizada, em que, a otimização possui como intuito maximizar a taxa de produção de ácido succínico. A Equação 28, por sua vez, apresenta a variação da concentração de ácido succínico ao longo do tempo.

$$\max Z = \vartheta_{\text{ácido succínico}} \quad (27)$$

$$\frac{dc_p}{dt} = \vartheta_{\text{ácido succínico}} \cdot C_p \quad (28)$$

Para realizar a otimização, foram impostas restrições de não-negatividade, assim como apresentado pela Equação 29.

$$C_p, C_{s_gly} > 0 \quad (29)$$

Além disso, foram impostas restrições em relação aos fluxos intracelulares de glicerol, dióxido de carbono e oxigênio, assim como apresentado pelas Equações 30, 31 e 32 respectivamente.

$$\vartheta_{gly} \geq -\mu_{gly} C_x \quad (30)$$

$$\vartheta_{CO_2} \geq -50 \quad (31)$$

$$\vartheta_{Oxigênio} = 0 \quad (32)$$

O valor utilizado na restrição do fluxo de dióxido de carbono foi escolhido a fim de mostrar que não há restrição ou limitação do fluxo, desse modo, não se tornando um agente limitador do processo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CRESCIMENTO CELULAR

Os parâmetros cinéticos para a equação de Monod ajustados são apresentados na Tabela 2 e na Tabela 3, para os substratos glicerol e acetato, respectivamente. Estes valores foram obtidos utilizando como base os valores experimentais obtidos por Li et al. (2018) em seu trabalho, de tal forma que o ajuste realizado é representado no gráfico da Figura 6.

Tabela 2 – Parâmetros Cinéticos do Glicerol para a Simulação da Etapa Aeróbia utilizando a Equação de Monod

$\mu_{\max \text{ gly}} (\text{h}^{-1})$	$K_s (\text{mmol/L})$	$Y_{XS \text{ gly}} (\text{mol/mol})$
$7,422 \times 10^{-2}$	$1,096 \times 10^{-2}$	$1,458 \times 10^{-2}$

Fonte: Elaborada pelo Autor

Tabela 3 – Parâmetros Cinéticos do Acetato para a Simulação da Etapa Aeróbia utilizando a Equação de Monod

$\mu_{\max \text{ act}} (\text{h}^{-1})$	$K_s (\text{mmol/L})$	$Y_{XS \text{ act}} (\text{mol/mol})$
$1,507 \times 10^{-1}$	$9,343 \times 10^{-1}$	$3,903 \times 10^{-2}$

Fonte: Elaborada pelo Autor

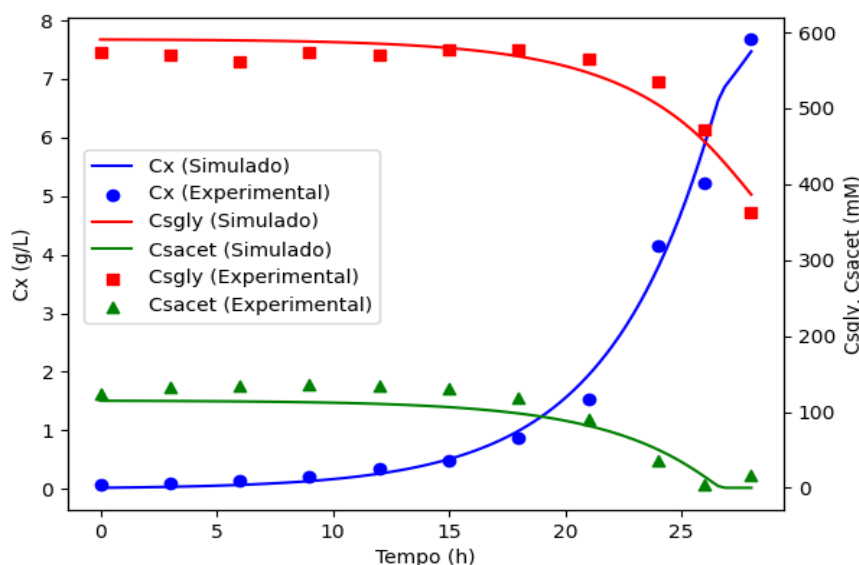


Figura 6 - Ajuste dos parâmetros cinéticos para a fase aeróbia

Fonte: Elaborada pelo Autor

É possível verificar pelos parâmetros cinéticos obtidos que o acetato, mesmo sendo o substrato em menor concentração no meio, é o que apresenta maior conversão em biomassa, além de apresentar uma maior taxa de crescimento máxima frente ao glicerol, o substrato que apresenta maior concentração.

Ao se comparar o valor da taxa de crescimento máxima do processo de crescimento celular da *E.coli* obtida por Li et al. (2018) em seu trabalho, com a registrada pela determinação dos parâmetros cinéticos, percebe-se que houve uma discrepância de aproximadamente 6,6% para mais. Essa dissonância de valores pode ter como origem as premissas adotadas para a determinação dos parâmetros cinéticos, bem como a imprecisão da obtenção dos dados experimentais através do gráfico disponibilizado no trabalho de Li et al. (2018). Vale ressaltar que a taxa máxima de crescimento é dada pela soma dos valores de cada um dos substratos, assim como mostrado na Equação (7).

Não foi possível realizar uma comparação dos valores da constante de saturação de Monod e dos rendimentos, uma vez que o artigo utilizado como base não disponibilizou tais dados.

Com estes parâmetros cinéticos, foi possível realizar a simulação do crescimento celular empregando o dFBA, considerando dois cenários de aeração, sendo eles, fluxo intracelular irrestrito de oxigênio e fluxo restrito à metade do valor máximo (10,4 mmol/h) de fluxo de oxigênio apresentado durante as simulações. O gráfico obtido para cada um dos cenários é representado através da Figura 7 e Figura 8, respectivamente para fluxo irrestrito e fluxo limitado.

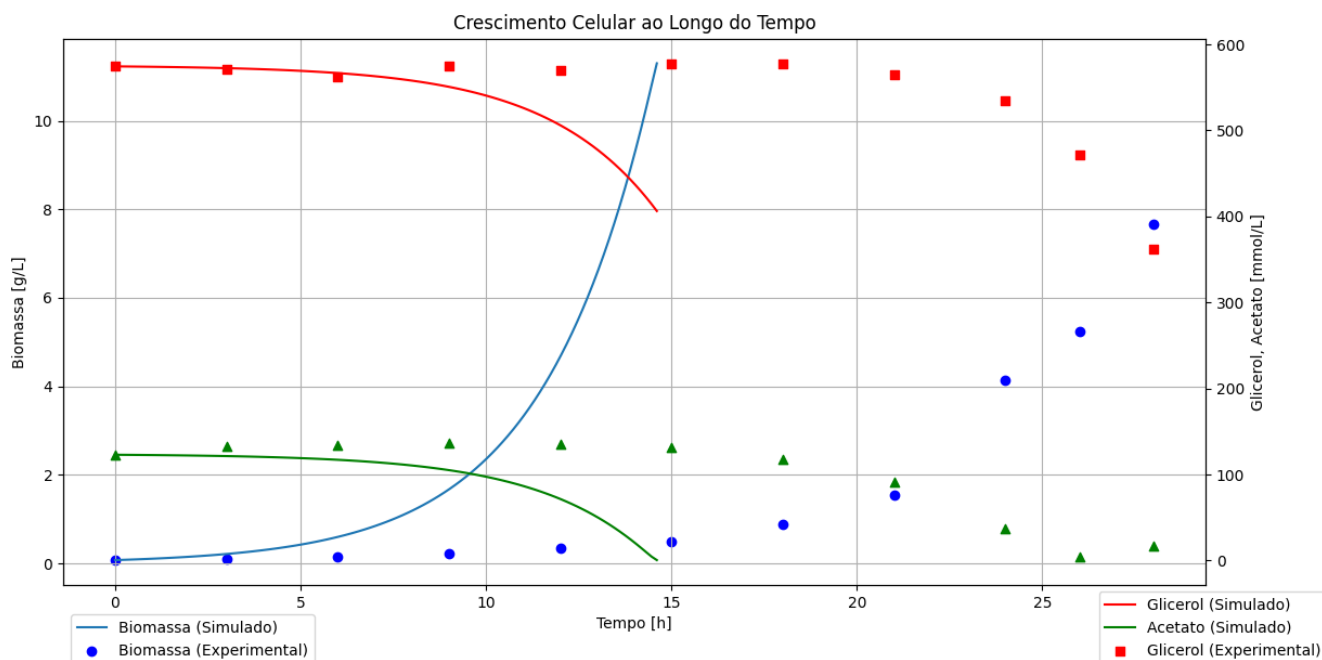


Figura 7 – Dados simulados e experimentais do crescimento celular com fluxo irrestrito de oxigênio

Fonte: Elaborada pelo Autor

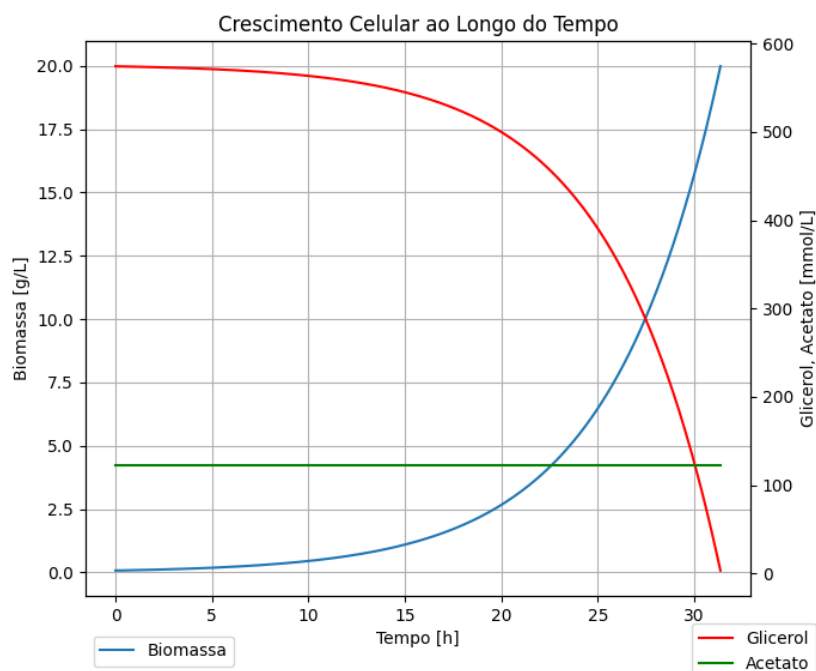


Figura 8 – Crescimento celular com fluxo de oxigênio limitado a metade do valor máximo registrado em fluxo irrestrito

Fonte: Elaborada pelo Autor

A partir do gráfico obtido no cenário de fluxo irrestrito de oxigênio, é possível verificar que o comportamento de crescimento de biomassa e consumo de substratos

se mostrou condizente com o obtido no trabalho de Li et al. (2018) (Figura 5). Além disso, verifica-se que o acetato foi o primeiro substrato a ser consumido por completo, algo esperado ao se considerar o fato de apresentar uma taxa de crescimento máxima, quando havia abundância de oxigênio para a célula utilizar. Entretanto, percebe-se que o crescimento celular obtido através da análise dFBA foi cerca de 52,2% maior do que o registrado experimentalmente, alcançando uma concentração final de 11,7 g/L. Além disso, a velocidade de crescimento foi maior do que o apresentado em experimento laboratorial, sendo cerca de 14 horas mais curto. Este resultado pode ter como justificativa o fato de as análises em dFBA realizadas apresentarem um cenário ideal de crescimento, diferentemente do ambiente experimental em laboratório, e, por conta disso, pode ter sido mais eficiente que a realidade. Outra hipótese é o crescimento celular em laboratório estar sendo limitado por outro composto presente no meio de cultivo, possibilidade esta que não foi considerada no presente estudo.

Em relação ao cenário com limitação do fluxo de absorção de oxigênio pela célula, percebe-se que, com aeração restrita, a célula não realiza consumo de acetato, de tal maneira que o único substrato a ser consumido é o glicerol, resultando em um crescimento celular mais lento e uma menor produção de biomassa. É possível inferir que esse comportamento de menor produção observado se deve ao fato de apenas o glicerol ser consumido, ou seja, apenas um substrato estar disponível para o crescimento celular. Esse comportamento de menor produção em um meio com limitação de oxigênio também foi observado através da análise FBA realizada, reforçando assim, o resultado obtido.

Ao se considerar ambos os cenários, percebe-se que a observação realizada por Li et al. (2018) em seu trabalho, referente à um maior crescimento celular na presença de acetato, foi observada também através da análise dFBA realizada neste estudo. Em relação ao rendimento do crescimento celular pelo consumo dos substratos combinados, é possível perceber que o rendimento com fluxo de absorção irrestrito de oxigênio pela célula é de 0,039 mol/mol, valor inferior ao encontrado na literatura.

Como mencionado previamente, junto à análise do crescimento celular e do consumo de substrato, também foi observado na simulação utilizando a análise dFBA o consumo de cada um dos compostos presentes no meio de cultivo utilizado para o

crescimento do microrganismo. A Figura 9 apresenta a concentração de cada um dos compostos ao longo do tempo.

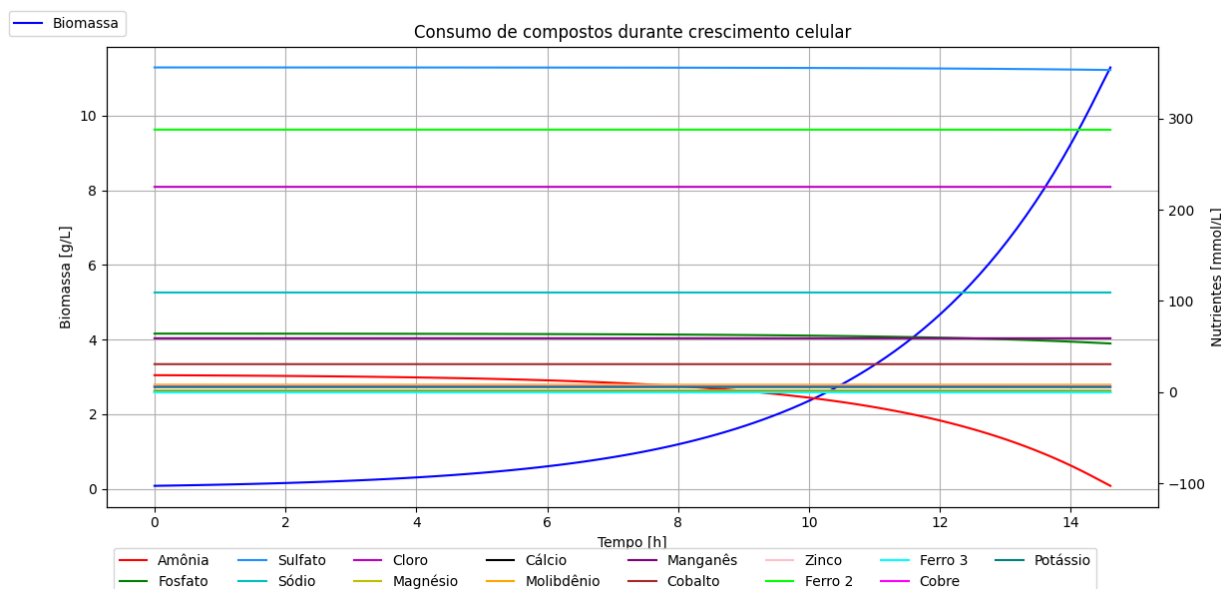


Figura 9 – Crescimento celular e consumo de componentes no meio salino com fluxo de oxigênio irrestrito

Fonte: Elaborada pelo Autor

De maneira geral, ao se analisar o gráfico com as concentrações de cada composto do meio salino ao longo do tempo, percebe-se que o principal composto a ser consumido durante o crescimento celular foi a amônia. Não apenas foi o composto que apresentou um maior consumo, mas, conforme indicado pelo gráfico, aparenta ser o reagente limitante do processo, uma vez que foi consumido a mais do que apresentado no meio salino utilizado por Li et al. (2018).

Os demais compostos apresentaram um fluxo de absorção intracelular baixo comparado à amônia ou aos substratos, o que resulta em sua variação diminuta de suas concentrações ao longo de todo o processo. Mas, assim como observado em ambas as análises, FBA e dFBA, a ausência desses componentes inviabiliza o crescimento celular, sendo compostos fundamentais para a produção de biomassa.

Ao longo das análises em FBA e dFBA realizadas, foi observado também o comportamento do crescimento celular caso os genes removidos e o gene superexpressado não tivessem sido modificados. De maneira geral, a remoção e superexpressão destes genes não alterou os resultados obtidos, de tal maneira que é possível inferir que não houve um bloqueio ou favorecimento das rotas do ciclo TCA que estes genes fazem parte. Ao se analisar as rotas que estes genes estão

presentes, nota-se que outros genes compõem essas rotas, de tal forma que, para inviabilizar este caminho, seria necessário remover os demais genes presentes.

5.2. PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

Os parâmetros cinéticos para a equação de Levenspiel são apresentados na Tabela 4. Estes valores foram obtidos utilizando como base os valores experimentais obtidos por Li et al. (2018) em seu trabalho, de tal forma que o ajuste realizado é representado no gráfico da Figura 10.

Tabela 4 – Parâmetros Cinéticos da taxa de consumo de Glicerol para a Simulação da Etapa Anaeróbia utilizando a Equação de Levenspiel

$\mu_{\max \text{ gly}} (\text{h}^{-1})$	$K_s (\text{mmol/L})$	$Y_{PS} (\text{mol/mol})$	C_i	n
$1,383 \times 10^1$	$1,000 \times 10^{-5}$	$8,864 \times 10^{-1}$	$3,537 \times 10^2$	$2,000 \times 10^0$

Fonte: Elaborada pelo Autor

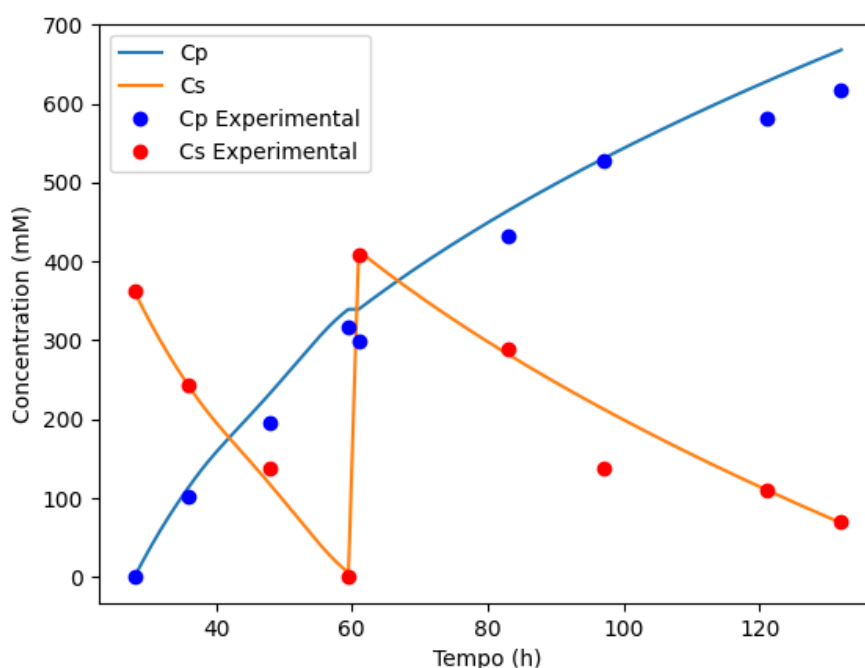


Figura 10 - Ajuste dos parâmetros cinéticos para a fase anaeróbia

Fonte: Elaborada pelo Autor

Com estes parâmetros cinéticos, foi possível realizar a simulação da produção de ácido succínico. O gráfico obtido para cada um dos cenários é representado através

da Figura 11 apresentada abaixo. Vale lembrar que esses gráficos foram obtidos considerando o fluxo de consumo de glicerol pela célula e a técnica FBA para previsão dos metabólitos gerados, considerando para isso a maximização da produção de ácido succínico como função objetivo do FBA.

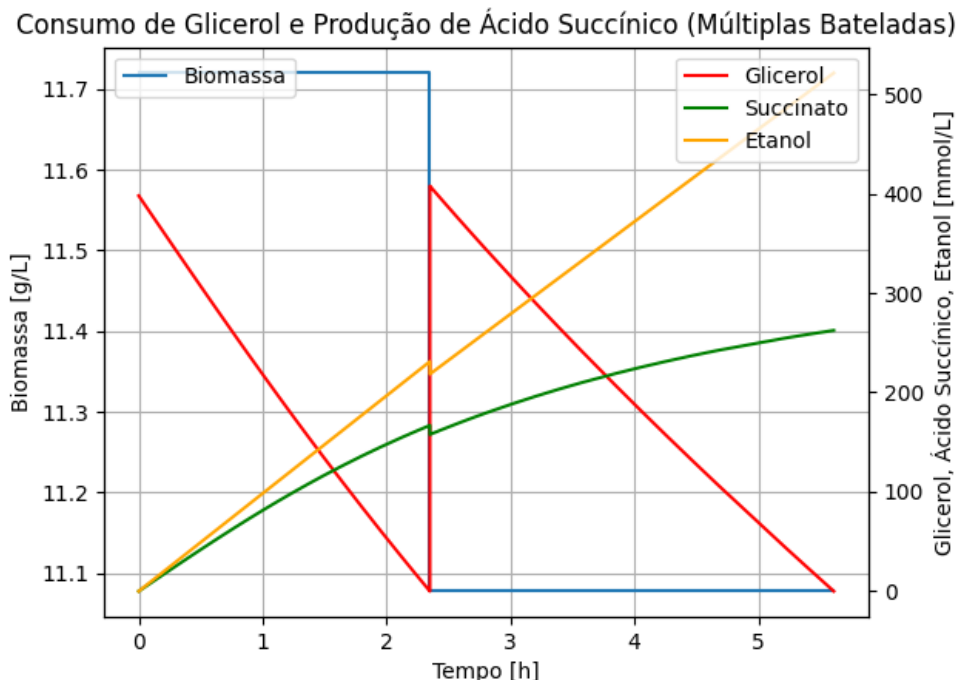


Figura 11 – Produção de Ácido Succínico em duas bateladas alimentadas

Fonte: Elaborada pelo Autor

É possível verificar, ao analisar o gráfico apresentado na Figura 9, que a produção de ácido succínico foi 57,4% inferior ao registrado no trabalho de Li et al. (2018), atingindo uma concentração final de apenas 262,3 mmol/L. Essa observação possivelmente se dá pelo fato de haver também a produção de etanol ao longo do cultivo, fato não observado no artigo utilizado como referência. Essa produção foi verificada tanto através da análise FBA, quanto através da análise dFBA. De forma geral, não se sabe ao certo o motivo de o artigo utilizado como base não apresentar a produção de etanol ao longo do cultivo, uma vez que, outros trabalhos (Thakker, 2012) indicam haver etanol como subproduto do processo, mesmo que, em uma proporção diferente da registrada pela análise dFBA feita neste estudo.

Além da produção de ácido succínico ser inferior ao do trabalho utilizado como base, a duração do cultivo também foi inferior, cerca de 98 horas a menos do que o registrado por Li et al. (2018).

Devido ao fato de haver produção de etanol, o rendimento de produção de

ácido succínico a partir do consumo de substrato foi 62,9% inferior ao do trabalho utilizado como base, apresentando um valor de 0,326 mol/mol. Esses resultados indicam que o FBA não foi capaz de representar a produção de ácido succínico a partir do glicerol pela *E. coli*. Nesse sentido, serão necessários estudos mais aprofundados para verificar se as condições empregadas na simulação, como limites inferiores dos fluxos ou a função objetivo considerada foram responsáveis por esses erros nas predições.

A partir da análise do gráfico, é possível perceber que não houve crescimento da *E.coli* durante a fase anaeróbia, assim como apresentado pelo artigo e assumido nas premissas para equacionamento do processo. A variação na concentração apresentada pelo gráfico se deve à diluição realizada entre as bateladas do processo. Vale ressaltar que a ausência de variação de biomassa na fase anaeróbia foi observada tanto na análise dFBA, quanto na análise FBA.

Assim como na fase aeróbia, não foram notadas alterações no resultado da análise dFBA devido à remoção ou superexpressão dos genes modificados na cepa da *E.coli* utilizada no trabalho de Li et al. (2018).

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pela análise dFBA, é possível concluir que, de forma geral, a metodologia de análise dFBA foi capaz de simular o comportamento de crescimento celular da *E.coli* em meio anaeróbico, mas, não foi capaz de realizar o mesmo para a produção de ácido succínico.

Mesmo que a análise dFBA seja capaz de realizar a otimização dos processos biológicos a partir da reconstrução das redes metabólicas do microrganismo, ela não foi capaz de prever com exatidão a produção do material de interesse deste trabalho, o ácido succínico, havendo uma imprecisão elevada frente aos dados experimentais obtidos no trabalho utilizado como referência para este estudo.

Para que seja capaz de simular com exatidão um processo biológico, é necessário conhecer com a máxima precisão possível as condições experimentais em que o cultivo acontecerá, garantindo que haja uma redução de erros e incertezas por conta de premissas que devem ser assumidas para que o processo de otimização e simulação ocorra.

De maneira geral, é possível concluir que existe a possibilidade de se simular a produção de ácido succínico através de rotas fermentativas utilizando como substrato o glicerol, fazendo com que a emissão de gases do efeito estufa seja reduzida ao substituir a produção petroquímica pela biológica. Entretanto, é necessário que mais estudos sejam desenvolvidos a fim de otimizar a simulação da produção de ácido succínico utilizando microrganismos, a fim de obter resultados mais satisfatórios e condizentes com dados experimentais.

6.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Para futuros trabalhos, é sugerido utilizar mais artigos que avaliam a produção e ácido succínico utilizando a *E.coli* como microrganismo e o glicerol como substrato, a fim de verificar se os resultados obtidos são similares em condições diferentes de cultivo, podendo assim, avaliar de forma mais eficaz a precisão da análise dFBA para a predição da produção deste produto através desta rota fermentativa. Sugere-se dar preferência a estudos com meio definido, visto que estes podem ser representados de forma mais precisa nas simulações.

Além disso, trabalhos futuros também poderão realizar diferentes otimizações dentro do processo, a fim de verificar a relação ideal entre o tempo de crescimento celular e o tempo de produção do ácido succínico, possibilitando até mesmo, um rendimento maior para o processo.

REFERÊNCIAS

ARDI, M.S.; AROUA, M.K.; HASHIM, N. Awanis. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 42, p. 1164-1173, Fevereiro 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.091>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114009162>. Acesso em: 13 set. 2024.

BIEGLER, Lorenz T. **Nonlinear Programming: Concepts, Algorithms, and Applications to Chemical Processes**. [S. l.]: MOS-SIAM Series on Optimization, 2010.

BAJPAI, Pratima. **Biotechnology in the Chemical Industry: Towards a Green and Sustainable Future**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020. 229 p. ISBN 978-0-12-818402-8.

BLANKSCHEN, Matthew D. et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of succinate from glycerol. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 12, ed. 5, p. 409-419, Setembro 2010. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.06.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717610000698>. Acesso em: 14 set. 2024.

CHENG, Ke-Ke et al. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 6, p. 302-318, Junho 2012. DOI <https://doi.org/10.1002/bbb.1327>. Disponível em: <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bbb.1327>. Acesso em: 18 ago. 2024.

CHOI, Won J. Glycerol-Based Biorefinery for Fuels and Chemicals. **Recent Patents on Biotechnology**, [s. l.], v. 2, ed. 3, p. 173-180, 2008. DOI 10.2174/187220808786241006. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/37825>. Acesso em: 14 set. 2024.

EDGAR, Thomas F.; HIMMELBLAU, David M.; LASDON, Leon S. **Optimization of Chemical Processes**. 2. ed. [S. l.]: McGraw-Hill, 2001.

EMBRAPA. **Glicerol**. [S. l.], 8 dez. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/p-d-e-i/biodiesel/glicerol>. Acesso em: 16 maio 2024.

FEIST, Adam M. et al. A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. **Molecular Systems Biology**, [s. l.], v. 3, 2007. DOI 10.1038/msb4100155. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17593909/>. Acesso em: 24 out. 2024.

GÓMEZ-RÍOS, David et al. Tuning of fed-batch cultivation of Streptomyces clavuligerus for enhanced Clavulanic Acid production based on genome-scale dynamic modeling. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 185, Julho 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108534>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X22002030>. Acesso em: 18 out. 2024.

GRAND VIEW RESEARCH. **Succinic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Petro-based, Bio-based), By End Use (Food & Beverages, Pharmaceuticals, Industrial), By Region (North America, Europe, APAC, CSA, MEA), And Segment Forecasts, 2022 - 2030**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/succinic-acid-market#>. Acesso em: 22 set. 2024.

KAFARSKI, P., 2012. Rainbow code of biotechnology. Chemik 66.

KARASÖZEN, Bülent. Survey of trust-region derivative free optimization methods. **American Institute of Mathematical Sciences**, [s. l.], v. 3, ed. 2, 2007. DOI 10.3934/jimo.2007.3.321. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265974989_Survey_of_trust-region_derivative_free_optimization_methods. Acesso em: 16 dez. 2024.

JENSEN, Michael Krogh; KEASLING, Jay D. **Synthetic Metabolic Pathways**. [S. l.: s. n.], 2018.

JIANG, Min et al. Progress of succinic acid production from renewable resources: Metabolic and fermentative strategies. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 245, p. 1710-1717, 2017.

LI, Qing et al. Efficient anaerobic production of succinate from glycerol in engineered *Escherichia coli* by using dual carbon sources and limiting oxygen supply in preceding aerobic culture. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 231, p. 75-84, 2017.

LI, Qing et al. Production of succinate from simply purified crude glycerol by engineered *Escherichia coli* using two-stage fermentation. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], v. 5, ed. 1, 24 ago. 2018. DOI 10.1186/s40643-018-0227-3. Disponível em: <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-018-0227-3>. Acesso em: 9 set. 2024.

LIU, Lin; BOCKMAYR, Alexander. Regulatory dynamic enzyme-cost flux balance analysis: A unifying framework for constraint-based modeling. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 501, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110317>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519320301727>. Acesso em: 31 jul. 2024.

MAHADEVAN, Radhakrishnan et al. Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in Escherichia coli. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 83, ed. 3, p. 1331-1340, Setembro 2002. DOI [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73903-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73903-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349502739039>. Acesso em: 15 set. 2024.

McKinsey and Company, 2020. In: Chui, M., Evers, M., Zheng, A., Nisbet, T., McKinsey & Company, The Bio Revolution: Innovations transforming economies, societies, and our lives, New York.

MITREA, Laura et al. Succinic acid – A run-through of the latest perspectives of production from renewable biomass. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, 15 fev. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25551>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024015822>. Acesso em: 20 ago. 2024.

NATIONAL INTELLIGENCE COUNCIL. The Future of Biotech. Estados Unidos, 2021. Disponível em: <https://www.dni.gov/files/images/globalTrends/GT2040/NIC-2021-02494--Future-of-Biotech--Unsourced--14May21.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2024.

NILSSON, Avlantz; NIELSEN, Jens. Genome scale metabolic modeling of cancer. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 43, p. 103-112, Setembro 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717616302129>. Acesso em: 11 ago. 2024.

ORTH, J.D., Thiele, I., Palsson, B.Ø., 2010. What is flux balance analysis?. **Nat. Biotechnol.** 28 (3), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>.

OTHMER, Kirk. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. 4. ed. [S. l.: s. n.], 1997. v. 22.

PINAZO, José M. et al. Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes. **Catalysis Today**, [s.

I.], v. 239, 1 jan. 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.035>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586114004064>. Acesso em: 18 ago. 2024.

SAHU, Ankur et al. Advances in flux balance analysis by integrating machine learning and mechanism-based models. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 19, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.004>. Disponível em: [https://www.csbj.org/article/S2001-0370\(21\)00335-4/fulltext](https://www.csbj.org/article/S2001-0370(21)00335-4/fulltext). Acesso em: 11 ago. 2024.

SÁNCHEZ, Ailen M.; BENNETT, George N.; SAN, Ka-Yiu. Efficient Succinic Acid Production from Glucose through Overexpression of Pyruvate Carboxylase in an Escherichia coli Alcohol Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase Mutant. **Biotechnology Progress**, [S. l.], p. 358-365, 2005.

SEMKIV, Marta V. et al. 100 Years Later, What Is New in Glycerol Bioproduction?. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 38, ed. 8, p. 907-916, Agosto 2020. DOI 10.1016/j.tibtech.2020.02.001. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(20\)30027-5](https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(20)30027-5). Acesso em: 13 set. 2024.

SHAMEER, Sanu et al. Computational analysis of the productivity potential of CAM. **Nature Plants**, [s. l.], v. 4, p. 165-171, 26 fev. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41477-018-0112-2>. Acesso em: 11 ago. 2024.

SOELLNER, S. Evolution of pyruvate kinase-deficient Escherichia coli mutants enables glycerol-based cell growth and succinate production. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 115, 2015.

THAKKER, Chandresh et al. Succinate production in Escherichia coli. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 7, p. 213-224, 20 set. 2011. DOI <https://doi.org/10.1002/biot.201100061>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201100061>.

Acesso em: 19 ago. 2024.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Succinic Acid Market Insights, 2021-2031**. [S. l.], Setembro 2021. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/succinic-acid.html>. Acesso em: 22 set. 2024.

WEASTRA, S.R.O. **WP 8.1. Determination of market potential for selected platform chemicals. Itaconic acid, Succinic acid, 2,5-Furandicarboxylic acid**. 7th Framework Programme of the European Union, Knowledge based Bio-Economy, Collaborative Project, Towards a sustainable bio-industry Biotechnology for renewable chemicals and innovative downstream processes. 2013.

XU, Nan; YE, Chao; LIU, Liming. Genome-scale biological models for industrial microbial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, p. 3439-3451, 1 mar. 2018.

YANG, Yan et al. Progress on production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* – New opportunities for cheap biomass and waste gas utilization. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 434, 1 jan. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965262304163X>. Acesso em: 19 ago. 2024.

ZHOU, Shuzhen et al. Hydrolysis of lignocellulose to succinic acid: a review of treatment methods and succinic acid applications. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [s. l.], v. 6, 2023. DOI <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02244-5>. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-022-02244-5>. Acesso em: 18 ago. 2024.

ZHU, Chengjun et al. Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 130, ed. 1, 5 out. 2013. DOI

<https://doi.org/10.1002/app.39157>.

Disponível

46
em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.39157>. Acesso em: 14 set. 2024.

APÊNDICE A - CÓDIGO PYTHON PARA ANÁLISE FBA DO CRESCIMENTO CELULAR

```
import cobra
from cobra.io import load_model

# Importando o modelo
# Deixar o terminal na mesma pasta que o arquivo
model = load_model('iAF1260')

with model:
    model.genes.b0903.knock_out() # pflB
    model.genes.b1380.knock_out() # ldhA

def overexpress_gene(model, gene_id, factor=2): # pck
    gene = model.genes.get_by_id(gene_id)
    for reaction in gene.reactions:
        reaction.upper_bound *= factor
        reaction.lower_bound *= factor

overexpress_gene(model, 'b3403')

# Definindo os limites das reações de nutrientes
for reaction in model.exchanges:
    reaction.lower_bound = 0

nutriente = {'EX_nh4_e': [-100, 100],
             'EX_pi_e': [-100, 100],
             'EX_so4_e': [-100, 100],
             'EX_na1_e': [-100, 100],
             'EX_cl_e': [-100, 100],
             'EX_mg2_e': [-100, 100],
             'EX_ca2_e': [-100, 100],
             'EX_hdcea_e': [0, 100],
             'EX_ocdca_e': [0, 100],
             'EX_ocdcea_e': [0, 100],
             'EX_glc__D_e': [0, 0],
             'EX_mobd_e': [-100, 100],
             'EX_mn2_e': [-100, 100],
             'EX_cobalt2_e': [-100, 100],
```

```

    'EX_zn2_e': [-100, 100],
    'EX_fe2_e': [-100, 100],
    'EX_fe3_e': [0,100],
    'EX_cu2_e': [-100, 100],
    'EX_k_e': [-100, 100],
    'EX_ppa_e': [0, 100]}

for i, j in nutriente.items():
    model.reactions.get_by_id(i).bounds = j

# Definindo limites de outras reações
model.reactions.EX_o2_e.lower_bound = -1000
model.reactions.EX_glyc_e.lower_bound = -100
model.reactions.EX_ac_e.lower_bound = -100
model.reactions.EX_ac_e.upper_bound = 0

# Resolvendo o modelo
model.objective = model.reactions.BIOMASS_Ec_iAF1260_core_59p81M
solution = model.optimize()

# Imprimindo os fluxos das reações que começam com 'EX_'
for i in model.reactions:
    if i.id.startswith('EX_') and solution.fluxes[i.id] > 1 * 10**-5:
        print(i.id, ' ', solution.fluxes[i.id])
print('BIOMASS ', solution.fluxes['BIOMASS_Ec_iAF1260_core_59p81M'])

print('-----')

# Imprimindo os fluxos das reações que começam com 'EX_'
for i in model.reactions:
    if i.id.startswith('EX_') and solution.fluxes[i.id] < 0:
        print(i.id, ' ', solution.fluxes[i.id])

```

APÊNDICE B - CÓDIGO PYTHON PARA ANÁLISE FBA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

```

import cobra
from cobra.io import load_model

# Importando o modelo
# Deixar o terminal na mesma pasta que o arquivo
model = load_model('iAF1260')

with model:
    model.genes.b0903.knock_out() # pflB
    model.genes.b1380.knock_out() # ldhA

def overexpress_gene(model, gene_id, factor=2): # pck
    gene = model.genes.get_by_id(gene_id)
    for reaction in gene.reactions:
        reaction.upper_bound *= factor
        reaction.lower_bound *= factor

overexpress_gene(model, 'b3403')

# Definindo os limites das reações de nutrientes
for reaction in model.exchanges:
    reaction.lower_bound = 0

# Definindo limites de outras reações
model.reactions.EX_o2_e.lower_bound = 0
model.reactions.EX_glyc_e.lower_bound = -1000
#model.reactions.EX_ac_e.lower_bound = -1000
model.reactions.EX_etoh_e.upper_bound = 0

model.objective = model.reactions.EX_succ_e
solution = model.optimize()

# Imprimindo os fluxos das reações que começam com 'EX_'
for i in model.reactions:
    if i.id.startswith('EX_') and solution.fluxes[i.id] > 1 * 10**-5:
        print(i.id, ' ', solution.fluxes[i.id])

```

```
print('BIOMASS ', solution.fluxes['BIOMASS_Ec_iAF1260_core_59p81M'])
```

```
print('-----')
```

```
# Imprimindo os fluxos das reações que começam com 'EX_'
```

```
for i in model.reactions:
```

```
    if i.id.startswith('EX_') and solution.fluxes[i.id] < 0:
```

```
        print(i.id, ' ', solution.fluxes[i.id])
```