



## Ficha de Trabalho 1

**Docentes:** Oscar Manuel Lima Dias

**Unidade Curricular:** Modelação de Processos Biológicos

Mestrado em Bioinformática

**Trabalho realizado por:**

Alexandra Coelho (PG45458)

Andreia Gomes (PG45463)

Catarina Ferreira (PG45467)

Daniela Lemos (PG45469)

Grupo 5

[Github](#)

Ano Letivo 2021/2022

13 de maio de 2022

1.

a) Dedução do modelo dinâmico do processo em modo *batch*, para E, X, A e V.

Considerando o processo de fermentação da *Acetobacter* a partir de glicose, foram deduzidas as seguintes equações de modelo dinâmico em modo *batch*. Tendo isto em consideração, foi assumido que não ocorre variação de volume ao longo do tempo.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1\mu_1[X] - k_2\mu_2[X] \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{d[E]}{dt} = -k_1 0.4 \frac{E}{0.7 + E} [X] - k_2 0.2 \frac{E}{0.2 + E} \frac{0.4}{0.6 + A} [X] \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{d[E]}{dt} = -0.4[X]E \left( k_1 \frac{1}{0.7 + E} + k_2 \frac{0.2}{0.6 + A} \frac{1}{0.2 + E} \right)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = \mu_1[X] + \mu_2[X] \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{d[X]}{dt} = 0.4 \frac{E}{0.7 + E} [X] + 0.2 \frac{E}{0.2 + E} \frac{0.4}{0.6 + A} [X]$$

$$\frac{d[A]}{dt} = k_3\mu_2[X] \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{d[A]}{dt} = k_3 0.2 \frac{E}{0.2 + E} \frac{0.4}{0.6 + A}$$

$$\frac{dV}{dt} = 0$$

b) Dedução do modelo dinâmico do processo em modo *fed-batch*, para E, X, A e V.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1\mu_1[X] - k_2\mu_2[X] + \frac{F_e}{V} ([S_0] - [S]) \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{d[E]}{dt} = -k_1 0.4 \frac{E}{0.7 + E} [X] - k_2 0.2 \frac{E}{0.2 + E} \frac{0.4}{0.6 + A} [X] + \frac{F_e}{V} ([S_0] - [S])$$

$$\frac{d[X]}{dt} = \mu_1[X] + \mu_2[X] - \frac{F[X]}{V} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{d[X]}{dt} = 0.4 \frac{E}{0.7 + E} [X] + \left( 0.2 \frac{E}{0.2 + E} \frac{0.4}{0.6 + A} \right) [X] - \frac{F_e[X]}{V}$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_3 \left( 0.4 \frac{E}{0.7 + E} \right) - \frac{F[A]}{V}$$

$$\frac{dV}{dt} = F_e$$

2.

a) Equações do modelo dinâmico do processo para X, S, A, P e V em modo descontínuo (*batch*).

$$\frac{d[X]}{dt} = (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3)[X]$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_1\mu_1 + k_2\mu_2)[X]$$

$$\frac{d[A]}{dt} = (k_3\mu_2 - k_4\mu_3)[X]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{11}\mu_1[X]$$

$$\frac{dV}{dt} = 0$$

$$\mu_1 = \mu_{max_1} \times \frac{[S]}{K_{s_1} + [S]}$$

$$\mu_2 = \mu_{max_2} \times \frac{[S]}{K_{s_2} + [S]}$$

$$\mu_3 = \mu_{max_3} \times \frac{[A]}{K_{s_3} + [A]}$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ P \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ k_{11} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ P \\ V \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

Em modo descontínuo, D = 0, logo:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ P \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ k_{11} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{bmatrix} X$$

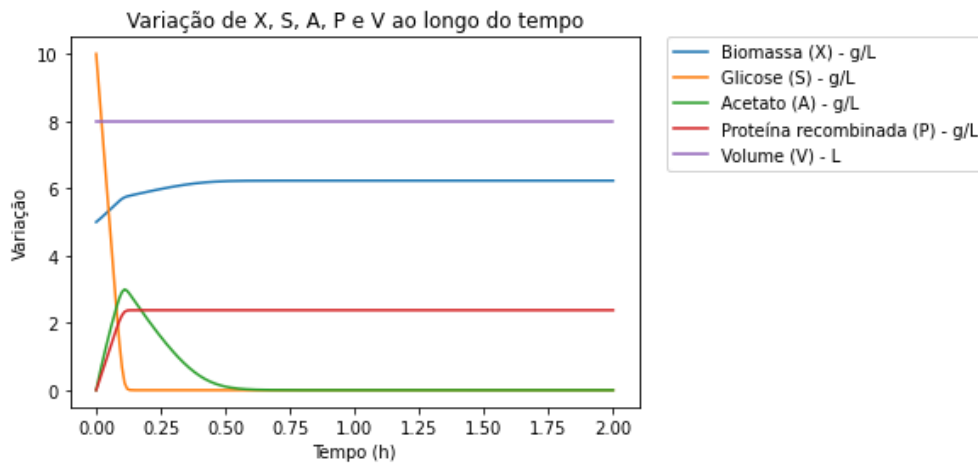
b) Implementação do modelo em a) e a sua integração para um período de 2 horas de fermentação, considerando os valores iniciais de 5 g/L, 10 g/L, 0 g/L, 0 g/L, 8 L para X, S, A, P e V respetivamente.

A partir do script desenvolvido em Python, utilizando a rotina *scipy.integrate.ode*, o integrador *lsoda* e o método *bdf* é possível executar o Gráfico 1. Este permite observar a

formação de proteína recombinante e de biomassa em função da quantidade de acetato e de substrato disponível ao longo de 2 horas num modelo *batch*, no qual o volume é constante.

Após a análise do gráfico, é possível verificar que existe um consumo praticamente imediato da glicose, em menos de 15 minutos, o que conduz a uma produção acentuada de acetato, que começa a decrescer aquando da falta de glicose, uma vez que passa a ser o único substrato disponível para a produção da biomassa. Ocorre também um aumento da proteína recombinante, que estabiliza na ausência de glicose, o que indica a sua necessidade para a produção desta. Por sua vez, é notório um ligeiro aumento da biomassa que é posteriormente estabilizada na falta de acetato. Em contrapartida, o volume mantém-se constante durante todo o processo de fermentação, o que vai de encontro com o esperado visto que se trata de um processo em *batch*.

Estas conclusões coincidem com o esperado tendo em conta as equações estequiométricas do sistema.



**Gráfico 1:** Gráfico que representa a variação da concentração dos reagentes e produtos numa fermentação em *batch* da estirpe BL21 da *E. coli* ao longo do tempo. São avaliadas 5 componentes: Biomassa (azul), Glicose (amarelo), Acetato (verde), Proteína recombinante (vermelho) e volume (lilás).

c) Equações do modelo dinâmico do processo para X, S, A, P e V em modo semi-contínuo (*fed-batch*).

$$D = \frac{F_e}{V}$$

$$\frac{d[X]}{dt} = (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3)[X] - D[X]$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_1\mu_1 + k_2\mu_2)[X] + D([S_e] - [S])$$

$$\frac{d[A]}{dt} = (k_3\mu_2 - k_4\mu_3)[X] - D[A]$$

$$\mu_1 = \mu_{max_1} \times \frac{[S]}{K_{s_1} + [S]}$$

$$\mu_2 = \mu_{max_2} \times \frac{[S]}{K_{s_2} + [S]}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{11}\mu_1[X] - D[P]$$

$$\mu_3 = \mu_{max_3} \times \frac{[A]}{K_{s_3} + [A]}$$

$$\frac{dV}{dt} = F_e$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ P \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 & 0 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ k_{11} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ P \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ D \cdot S_e \\ 0 \\ 0 \\ F_e \end{bmatrix}$$

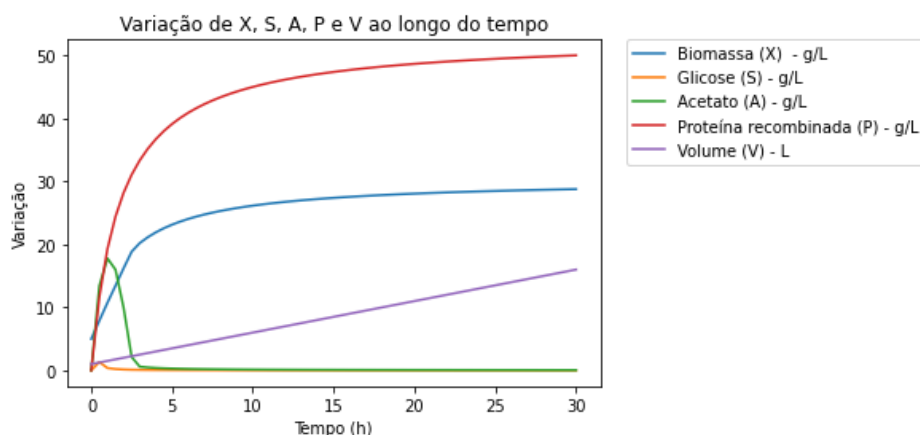
d) Implementação do modelo em c) e a sua integração para um período de 30 horas de fermentação com um perfil de alimentação constante de 0.5 L/h, considerando os valores iniciais de 5 g/L, 0 g/L, 0 g/L, 0 g/L, 1 L para X, S, A, P e V respectivamente e uma concentração de 250 g/L na solução de alimentação.

A partir do script desenvolvido em Python, tal como na alínea b), foi obtido o Gráfico 2 para o modelo *fed-batch* ao longo de 30 horas.

Com base na análise do gráfico foi possível constatar um consumo mais lento da glicose quando comparado com o modelo *batch*, atingindo valores de zero ao fim de cerca de uma hora, o que significa que está a ser consumida ao mesmo tempo que é introduzida no reator (este é continuamente “alimentado”).

Quanto ao acetato, este não é consumido de forma tão abrupta como no modelo anterior. Isto acontece uma vez que a produção de biomassa pode ser obtida por duas vias: pelo consumo da glicose (crescimento oxidativo e/ou fermentativo) e pelo consumo do acetato (crescimento oxidativo), fazendo com que este diminua a sua concentração de forma mais lenta, de modo que a célula seja capaz de estabilizar a produção de biomassa conforme a quantidade de glicose que é fornecida.

No entanto, a maior diferença entre os modelos *batch* e *fed-batch* é observada no crescimento constante de três variáveis: a biomassa, a proteína recombinante e o volume. Um aumento de volume é evidenciado no gráfico devido a presença de um fluxo de entrada de 0.4 L/h. Em relação à proteína recombinante, dado que ela apenas é produzida durante o crescimento oxidativo na presença de glicose, e está constantemente a ser fornecida ao reator, isto resulta num aumento da sua produção e, consequentemente, da sua concentração. Desta forma, tendo por base que a biomassa pode ser produzida por ambos os processos, oxidativo e fermentativo, a sua concentração irá aumentar em conformidade com o passar do tempo.



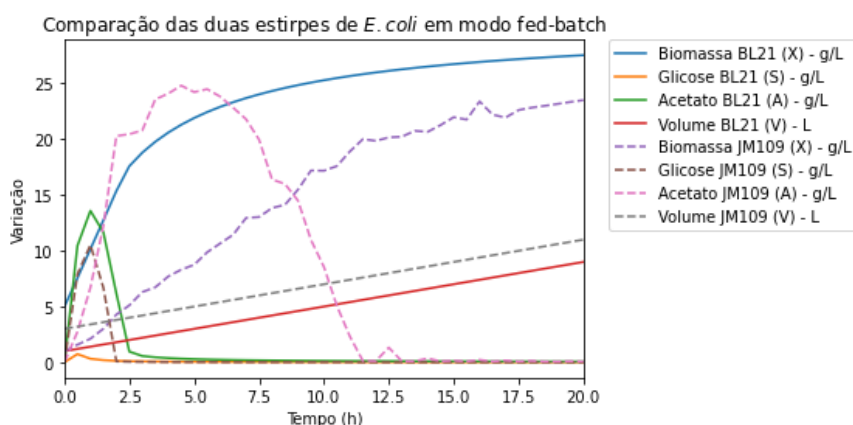
**Gráfico 2:** Gráfico que representa a variação da concentração dos reagentes e produtos numa fermentação em fed-batch da estirpe BL21 da *E. coli* ao longo do tempo. São avaliadas 5 componentes: Biomassa (azul), Glicose (amarelo), Acetato (verde), Proteína recombinante (vermelho) e volume (lilás).

e) Comparação da nova estirpe de *E. coli* (JM109) com a estirpe inicial (BL21). Estimação dos parâmetros  $K_2$ ,  $\mu_{max_2}$  e  $K_{s_2}$ .

Tendo por base os resultados obtidos na alínea anterior em relação à estirpe BL21 (reação *fed-batch*) e os dados obtidos de forma experimental para a estirpe JM109, obtivemos o Gráfico 3 que compara as diferenças entre os dois modelos.

Inicialmente, a glicose serve como substrato para a produção de acetato e proteína recombinante. Contudo, quando atinge valores próximos de zero, inicia-se o processo de crescimento oxidativo em acetato, em que este assume-se como substrato da reação para a produção de biomassa.

Assim, verifica-se que a estirpe JM109 consome de forma mais lenta a glicose, o que tem como consequência uma produção mais lenta de biomassa. Relativamente ao consumo de acetato, este também é mais lento para este modelo, sendo utilizado como substrato para a produção de biomassa quando não existe glicose no sistema. A quantidade de biomassa produzida pela estirpe JM109 é menor quando comparada com a da estirpe BL21, o que pode indicar que as estirpes se adaptaram a um determinado tipo de substrato e têm maior dificuldade em crescer na ausência deste.



**Gráfico 3:** Gráfico que compara as variações dos reagentes e dos produtos em função do tempo, numa fermentação em fed-batch de duas estirpes de *E. coli* (BL21 (traço contínuo) e JM109 (tracejado)). Para cada estirpe foram avaliadas a biomassa (azul - BL21; lilás - JM109), a glicose (amarelo - BL21; castanho - JM109), o acetato (verde - BL21; rosa - JM109) e o volume (vermelho - BL21; cinzento - JM109)

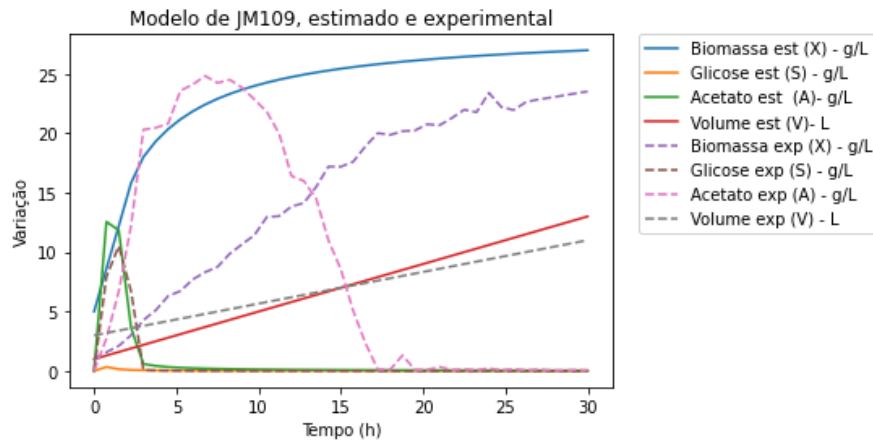
De modo a formular o problema de otimização utilizou-se o algoritmo “simulated annealing”, de forma a otimizar os parâmetros  $K_2$ ,  $\mu_{max_2}$  e  $K_{s_2}$ , com a finalidade de minimizar a função objetivo, ou seja, a distância entre o modelo e os dados experimentais fornecidos.

$$\min \left( \sum_{i=1}^p (X_{exp} - X)^2 + \sum_{i=1}^p (S_{exp} - S)^2 + \sum_{i=1}^p (A_{exp} - A)^2 + \sum_{i=1}^p (V_{exp} - V)^2 \right)$$

Depois de obtidos os parâmetros executando o algoritmo ( $K_2 = 0.5000000413745578$ ,  $\mu_{max_2} = 0.7999999793126232$ ,  $K_{s_2} = 25.999999793122857$ ), conseguimos fazer a aproximação do modelo aos dados experimentais, como se pode observar no gráfico.

A partir da análise do gráfico, observa-se que os picos das concentrações do acetato e da glicose estimados são muito inferiores comparando com os picos das concentrações obtidas nos dados experimentais. Relativamente à biomassa, verifica-se um aumento contínuo quer nos valores estimados quer nos experimentais, mas nestes últimos vemos um crescimento inferior. É possível ainda constatar um pequeno desvio dos valores do volume. Para além disso, apresenta uma velocidade de formação e de consumo mais rápida nos parâmetros estimados.

A título de conclusão, verifica-se que os dados experimentais não se assemelham aos estimados podendo ser devido a erros experimentais aquando da recolha de dados.



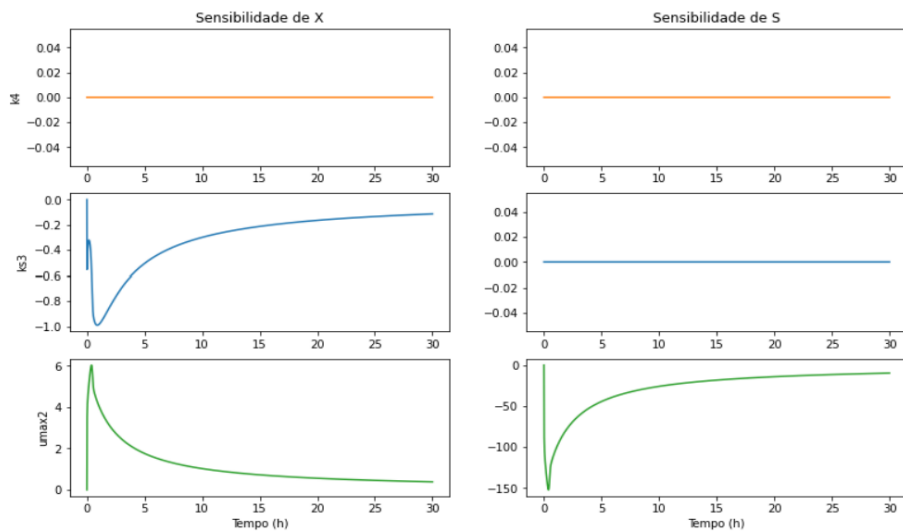
**Gráfico 4:** Gráfico que compara as variações dos reagentes e produtos ao longo do tempo, numa fermentação em fed-batch entre os valores estimados (traço contínuo) e experienciais (tracejado) da estirpe JM109 de *E. coli*. Foram avaliadas a biomassa (azul - estimado; lilás - experimental), a glicose (amarelo - estimado; castanho - experimental), o acetato (verde - estimado; rosa - experimental) e o volume (vermelho - estimado; cinzento - experimental)

f) Sensibilidades ao longo do tempo das variáveis X e S aos parâmetros  $k_4$ ,  $\mu_{max2}$  e  $K_{s3}$ .

Após determinar as derivadas parciais, procedeu-se ao cálculo da sensibilidade das variáveis X e S nos parâmetros  $K_4$ ,  $\mu_{max2}$ ,  $K_{s3}$ , visível no gráfico 5. A evolução da variável a ser estudada vai ser influenciada de forma diferente caso a sensibilidade seja negativa ou positiva.

Desta forma, se a variável X (biomassa) em relação ao parâmetro  $\mu_{max2}$ , apresentar uma sensibilidade positiva, isto significa que se o valor do parâmetro  $\mu_{max2}$  for aumentado, a produção de biomassa sofrerá um aumento. Em contrapartida, se a sensibilidade de um parâmetro for negativa, como podemos observar para o parâmetro  $K_{s3}$ , um aumento neste valor causará uma diminuição na produção de biomassa. Para a variável S verifica-se uma sensibilidade negativa do parâmetro  $\mu_{max2}$  resultando numa diminuição do substrato ao longo do tempo, e uma indiferença no parâmetro  $K_{s3}$ , concluindo-se que não é influenciado por este.

Por fim, também é possível apurar, com base no gráfico, que o parâmetro  $K_4$  não influencia as variáveis X e S.



**Gráfico 5:** Sensibilidade dos parâmetros  $k_4$ ,  $K_{s3}$ ,  $\mu_{max2}$  às variáveis X e S em função do tempo. A amarelo estão sinalizadas as sensibilidades de X e S a  $k_4$ . A azul estão representadas as sensibilidades das variáveis ao parâmetro  $K_{s3}$ . Por fim, a verde vê-se a variação da sensibilidade das variáveis a  $\mu_{max2}$ .

g) Derivação do sistema em quimiostato, considerando o caudal de entrada  $F_e$  igual ao usado no modo semi-contínuo e assumindo, um o volume fixo e igual a 6 L.

Para caracterização do sistema foram introduzidas as condições iniciais. Usou-se a função `spicy.optimize.solve` para determinar os estados estacionários (através do cálculo das raízes das equações definidas para o modelo), seguida do cálculo do jacobiano (pelo método *Jacobian* do package *numdiffertools*) e respetivo traço e determinante (através das funções `np.trace` e `np.linalg.det` do package *numpy*).



Sem Biomassa

Ponto:

[0 250 0 0]

Jacobiano:

$$\begin{bmatrix} 1.16347489 & 0 & 0 & 0 \\ -20.44729546 & -0.08333333 & 0 & 0 \\ 8.15542698 & 0 & -0.08333333 & 0 \\ 4.98603909 & 0 & 0 & -0.08333333 \end{bmatrix}$$

Traço:

0.9134748853780739

Determinante:

-0.0006733072253350833

Existe Biomassa

Ponto:

[3.03290997e + 01 2.10359950e - 02 1.09369399e - 01 5.30905082e + 01]

Jacobiano:

$$\begin{bmatrix} -7.87450406e - 13 & 5.58045937e + 01 & 1.07167167e + 01 & 0 \\ -6.86851260e - 01 & -9.57135289e + 02 & 0 & 0 \\ 3.00507338e - 04 & 3.85713629e + 02 & -6.84774194e + 01 & 0 \\ 1.45873404e - 01 & 2.04180222e + 02 & 0 & -8.33333333e - 02 \end{bmatrix}$$

Traço:

-1025.6960415915084

Determinante:

455.06474690441826

Com base nestes valores é possível aferir a estabilidade do sistema nos estados estacionários para as situações em que não há biomassa e em que o valor da biomassa é maior que 0.

Deste modo, podemos concluir que na ausência de biomassa o ponto estacionário em causa é um ponto sela, logo instável, uma vez que o traço é positivo e o determinante negativo, pertencendo ao 4º quadrante. Relativamente à situação onde há presença de biomassa o ponto estacionário é estável, nomeadamente um nodo estável, visto que se encontra no 2º quadrante, ou seja, traço negativo e determinante positivo.