



Escola de Engenharia – Departamento de Informática da Universidade do Minho

Mestrado em Bioinformática

Modelação de Processos Biológicos 2021/2022

Ficha de Trabalho 1

Grupo 4

Carina Filipa Araújo Gonçalves (pg45466)

Cristiana Martins Albuquerque (pg45468)

José Diogo Cruz de Moura (pg45965)

Mariana Martins Gonçalves (pg45472)

Ruben André Pacheco Silva (pg44580)

Rute Salomé Pires de Castro (pg45475)

Exercício 1 - Fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glucose

A primeira fase deste trabalho consiste na dedução dos modelos dinâmicos do processo de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glucose. De seguida são apresentadas as deduções em modo descontínuo (*batch*) e semi-contínuo (*fed-batch*).

a) Modelo dinâmico do processo em modo descontínuo (*batch*):

Como estamos em modo *batch*, assume-se que o volume é constante ao longo do tempo. Por isso:

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

Em modo *batch*, $D = 0$. Logo:

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

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

$$\frac{dE}{dt} = -D \cdot [E] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X]$$

Substituindo os valores de μ_1 , μ_2 e μ_3 , obtemos:

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

$$\frac{dS}{dt} = (-k_1 \cdot \mu_1 - k_2 \cdot \mu_2) \cdot [X] = -0.3 \cdot k_1 \cdot \frac{[S]}{0.2+[S]} \cdot [X] - 0.1 \cdot k_2 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X]$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X] = 0.3 \cdot \frac{[S]}{0.2+[S]} \cdot [X] + 0.1 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] + 0.4 \cdot \frac{[E]}{0.2+[E]} \cdot [X]$$

$$\frac{dE}{dt} = (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = 0.1 \cdot k_3 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] - 0.4 \cdot k_4 \cdot \frac{[E]}{0.2+[E]} \cdot [X]$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} S \\ X \\ E \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_1 & -k_2 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{bmatrix} \cdot [X]$$

b) Modelo dinâmico do processo em modo semi-contínuo (*fed-batch*):

Em modo *fed-batch*, assumimos que ocorre variação do volume de entrada (F_e):

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

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

$$\frac{dX}{dt} = -D \cdot [X] + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [X] + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X]$$

$$\frac{dE}{dt} = -D \cdot [E] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [E] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X]$$

Substituindo os valores de μ_1 , μ_2 e μ_3 , obtemos:

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

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_e}{V} \cdot ([S_e] - [S]) + (-k_1 \cdot \mu_1 - k_2 \cdot \mu_2) \cdot [X] = \frac{F_e}{V} \cdot ([S_e] - [S]) - 0.3 \cdot k_1 \cdot \frac{[S]}{0.2+[S]} \cdot [X] - 0.1 \cdot k_2 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X]$$

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F_e}{V} \cdot [X] + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [X] + 0.3 \cdot \frac{[S]}{0.2+[S]} \cdot [X] + 0.1 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] + 0.4 \cdot \frac{[E]}{0.2+[E]} \cdot [X]$$

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{F_e}{V} \cdot [E] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [E] + 0.1 \cdot k_3 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] - 0.4 \cdot k_4 \cdot \frac{[E]}{0.2+[E]} \cdot [X]$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} S \\ X \\ E \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_1 & -k_2 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 0 & k_3 & -k_4 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{bmatrix} \cdot [X] - \frac{F_e}{V} \cdot \begin{bmatrix} S \\ X \\ E \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \frac{F_e}{V} \cdot [S_e] \\ 0 \\ 0 \\ F_e \end{bmatrix}$$

Exercício 2 - Produção de proteínas recombinadas com *Escherichia coli* (estirpe BL21)

Na segunda parte deste trabalho, foi considerado o processo de produção de proteínas recombinadas com o microrganismo *Escherichia coli* (estirpe BL21). Em condições aeróbias esta bactéria consome glucose (S) e produz biomassa (X), proteína recombinada (P) e acetato (A).

a) Modelo dinâmico do processo em modo *batch*

Como estamos em modo batch, o volume é constante ao longo do tempo. Temos então que:

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

Em modo *batch*, $D = 0$. Logo:

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

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

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

$$\frac{dP}{dt} = -D \cdot [P] + (k_{11} \cdot \mu_1) \cdot [X] = (k_{11} \cdot \mu_1) \cdot [X]$$

Substituindo os valores de μ_1 , μ_2 e μ_3 , obtemos:

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

$$\frac{dS}{dt} = (-k_1 \cdot \mu_1 - k_2 \cdot \mu_2) \cdot [X] = -0.25 \cdot k_1 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] - 0.55 \cdot k_2 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X]$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X] = 0.25 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] + 0.55 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] + 0.25 \cdot \frac{[A]}{0.4+[A]} \cdot [X]$$

$$\frac{dA}{dt} = (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = 0.55 \cdot k_3 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] - 0.25 \cdot k_4 \cdot \frac{[A]}{0.4+[A]} \cdot [X]$$

$$\frac{dP}{dt} = (k_{11} \cdot \mu_1) \cdot [X] = 0.25 \cdot k_{11} \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X]$$

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

b) Implementação em MATLAB da alínea a)

Dadas equações determinadas anteriormente, implementou-se o modelo deduzido em MATLAB. O objetivo principal consiste em obter a variação de X, S, A, P e V ao longo do tempo para 7 horas de fermentação, considerando como valores iniciais 7 g/L, 12 g/L, 0 g/L, 0 g/L e 9 L de X, S, A, P e V, respectivamente. O script utilizado para a resolução deste problema encontra-se nos ficheiros *Alinea_b_batch.m* e *Alinea_b_ode_batch.m*.

O modelo obtido na alínea anterior foi implementado em *Alinea_b_batch.m*, uma função que recebe como argumentos o tempo e as concentrações de biomassa, substrato, proteína recombinada, acetato e volume. O modelo utiliza a matriz gerada anteriormente pela função *fedbatch*, recorrendo ao solver *odes23s* (*Solve nonstiff differential equations*) (*Alinea_b_ode_batch.m*). Posteriormente, através do mesmo, é realizado um gráfico (**Figura 1**) em que podem ser observadas as concentrações de biomassa, glucose, acetato, proteína recombinante (g/L) e volume (L) ao longo do tempo (em horas).

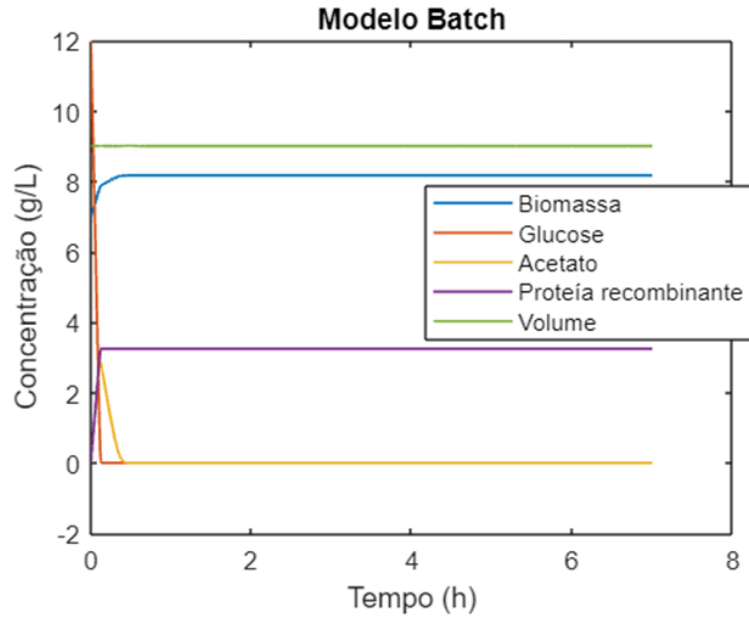


Figura 1. Variação da concentração de reagentes e produtos em função do tempo (fermentação em *batch*).

Através do gráfico obtido podemos verificar que o volume mantém-se constante, dado que estamos perante o modelo de *batch*. Relativamente à glucose e ao acetato, observou-se que a sua concentração decresce abruptamente num curto espaço de tempo (cerca de 1 hora), uma vez que vão ser utilizados para a produção dos produtos, enquanto que a biomassa e a proteína recombinante mantêm-se constantes após um aumento inicial de concentração, concordante com a fase estacionária (onde o número de células tende a estabilizar) e ao consumo de glucose para a produção de biomassa, respetivamente.

c) Modelo dinâmico do processo em modo *fed-batch*

A partir das equações do modelo dinâmico do processo, procedemos à dedução do modelo no modo *fed-batch*. Aqui, o volume é um caudal F_e de uma solução de glucose que se encontra a uma concentração S_e .

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

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

$$\frac{dX}{dt} = -D \cdot [X] + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [X] + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X]$$

$$\frac{dA}{dt} = -D \cdot [A] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [A] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X]$$

$$\frac{dP}{dt} = -D \cdot [P] + (k_{11} \cdot \mu_1) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [P] + (k_{11} \cdot \mu_1) \cdot [X]$$

Substituindo os valores de μ_1 , μ_2 e μ_3 , obtemos:

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

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_e}{V} \cdot ([S_e] - [S]) + (-k_1 \cdot \mu_1 - k_2 \cdot \mu_2) \cdot [X] = \frac{F_e}{V} \cdot ([S_e] - [S]) - 0.25 \cdot k_1 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] - 0.55 \cdot k_2 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X]$$

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F_e}{V} \cdot [X] + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [X] + 0.25 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] + 0.55 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] + 0.25 \cdot \frac{[A]}{0.4+[A]} \cdot [X]$$

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{F_e}{V} \cdot [A] + (k_3 \cdot \mu_2 - k_4 \cdot \mu_3) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [A] + 0.55 \cdot k_3 \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X] - 0.25 \cdot k_4 \cdot \frac{[A]}{0.4+[A]} \cdot [X]$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{F_e}{V} \cdot [P] + (k_{11} \cdot \mu_1) \cdot [X] = -\frac{F_e}{V} \cdot [P] + 0.25 \cdot k_{11} \cdot \frac{[S]}{0.3+[S]} \cdot [X]$$

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

d) Implementação em MATLAB da alínea c)

Dadas as equações obtidas na alínea anterior, procedeu-se à implementação do modelo em MATLAB, disponível nos ficheiros *Alinea_d_fedbatch.m* e *Alinea_d_ode_fedbatch.m*. O objetivo principal consiste em obter a variação de X, S, A, P e V ao longo do tempo para 20 horas de fermentação, com um perfil de alimentação constante de 0.7L/h, considerando como valores iniciais 4 g/L, 0 g/L, 0 g/L, 0 g/L e 8 L de X, S, A, P e V, respectivamente, e uma concentração de 350 g/L na solução de alimentação.

O modelo obtido na alínea anterior foi implementado em *Alinea_d_fedbatch.m*, uma função que recebe como argumentos o tempo e as concentrações de biomassa, substrato, proteína recombinada, acetato e volume, com um caudal F_e de 0,7 de uma solução de glucose com concentração S_e (350 g/L), com D como o caudal a dividir pelo volume. O modelo utiliza a matriz gerada anteriormente pela função *fedbatch*, recorrendo ao solver *odes23s* (*Solve nonstiff differential equations*) (*Alinea_d_ode_fedbatch.m*). Posteriormente, através do mesmo, é realizado um gráfico em que podem ser observadas as concentrações de biomassa, glucose, acetato, proteína recombinante (g/L) e volume (L) em função do tempo (20h de fermentação).

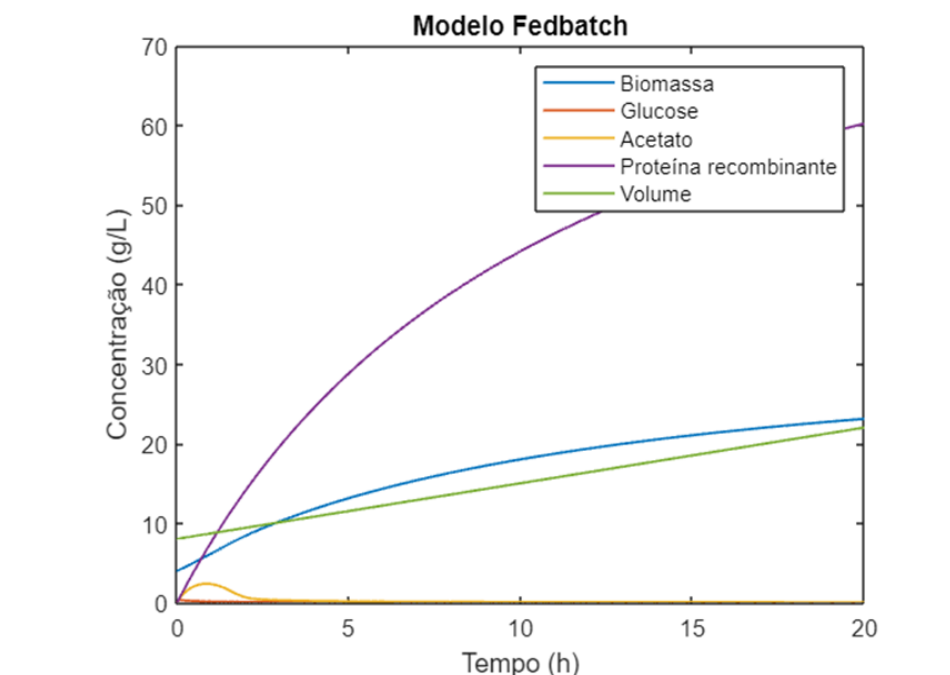


Figura 2. Variação da concentração de reagentes e produtos em função do tempo (fermentação em *fedbatch*).

A partir da **Figura 2** podemos observar uma variação do volume ao longo do tempo, concordante com o modo fed-batch. Em relação ao substrato observou-se um pequeno aumento na sua concentração, sendo depois totalmente consumido nas primeiras horas de reação. A partir desta hora observa-se também um aumento abrupto na concentração de biomassa e proteína recombinante. Relativamente ao acetato, observa-se um aumento na concentração deste até à primeira hora, após a qual se observa uma diminuição, concluindo-se que este também é consumido, visto que a glucose não é suficiente. Tal como anteriormente, a concentração de biomassa e proteína recombinante tende a estabilizar ao longo do tempo, visto que as células entram em fase estacionária.

e) Nova estirpe de *E. coli* (estirpe JM109) e estimação de parâmetros

Através dos dados experimentais fornecidos acerca do comportamento da nova estirpe de *E. coli* (JM109) e dos dados obtidos através das alíneas anteriores para a estirpe BL21, foi realizado um gráfico (**Figura 3**) (*Alinea_e_plot.m*) a fim de observarmos as possíveis diferenças entre as duas estirpes, uma vez que possuem comportamentos diferentes. É possível observar que a estirpe BL21 tem uma maior variação de volume ao longo do tempo (dada pelo declive da reta). Relativamente ao consumo de acetato, a estirpe experimental (JM109) é mais lenta a consumir. Relativamente ao substrato (glucose), a estirpe BL21 consome glucose de forma mais rápida.

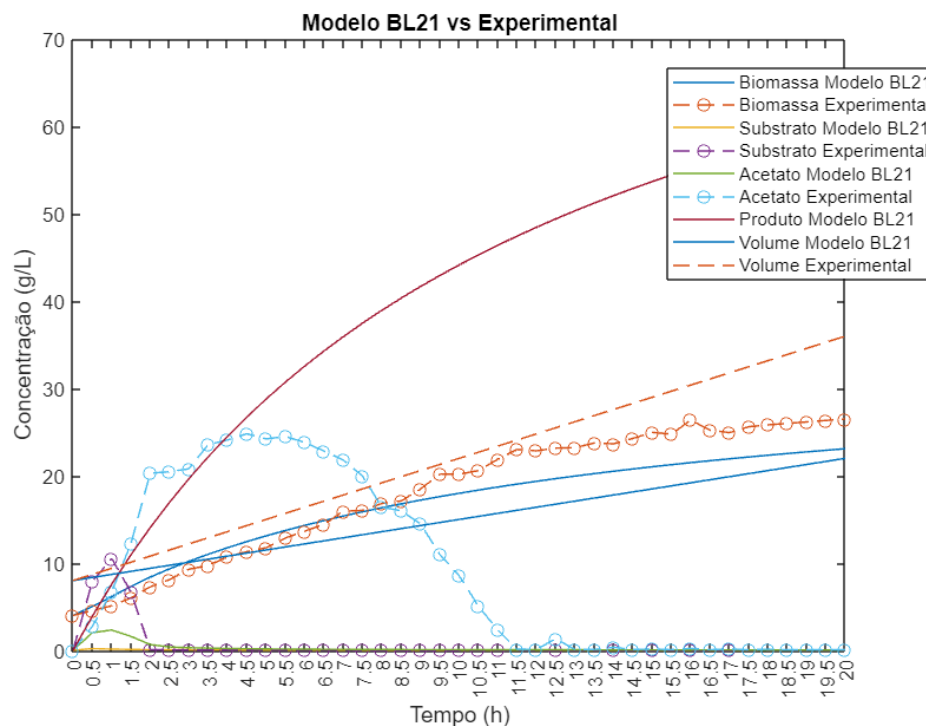


Figura 3. Variação da concentração de reagentes e produtos em função do tempo das duas estirpes (fermentação em *fedbatch*).

De seguida, foram estimados os parâmetros k_4 , u_{max2} e ks_3 . Para tal, a função obtida na alínea d) foi alterada de forma a tornar possível a estimação destes parâmetros (*Alinea_e_fedbatch.m*, *Alinea_e_Erro.m* e *Alinea_e_Simul.m*). O problema foi formulado a partir dos dados experimentais dados (*dados_exp_4.xlsx*) para o substrato e biomassa, onde foi determinado o erro da função (ficheiro). Os valores obtidos para os parâmetros k_4 , u_{max2} e ks_3 foram 5,7448, 6,0125 e 3,0195, respetivamente. A **Figura 4** compara a variação das concentrações de reagentes e produtos do modelo estimado e do modelo experimental. Através do gráfico podemos concluir que houve um maior consumo de glucose e acetato no modelo experimental, enquanto que a produção de biomassa se manteve igual.

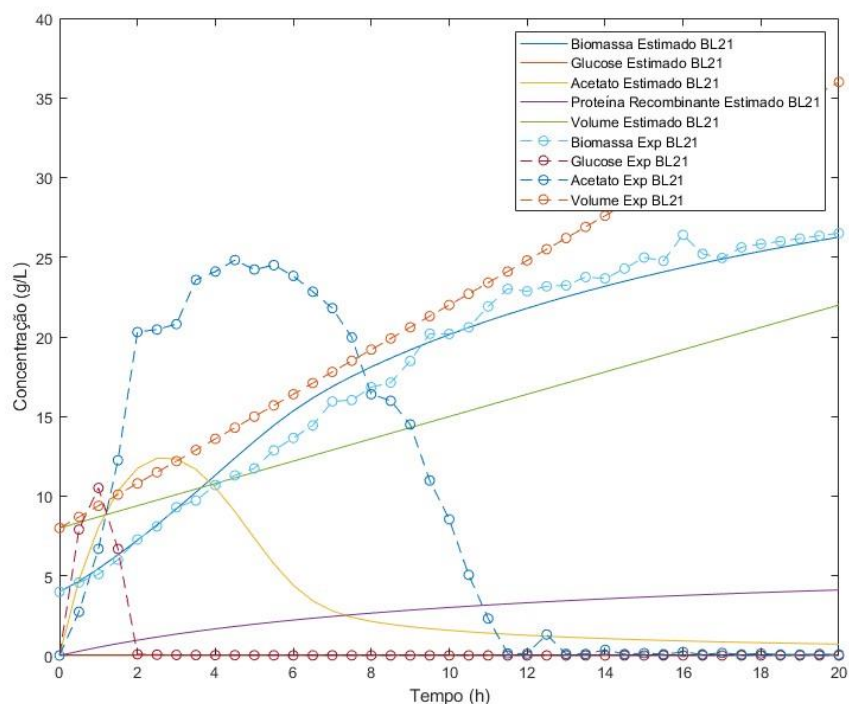


Figura 4. Variação da concentração de reagentes e produtos em função do tempo no modelo estimado e experimental (fermentação em *fedbatch*).

f) Sensibilidade dos parâmetros k_4 , u_{max2} e ks_3

A sensibilidade do modelo a determinados parâmetros permite saber os parâmetros para os quais o modelo é mais sensível, ou seja, determinar os parâmetros mais importantes para o modelo em determinadas condições. Deste modo, uma sensibilidade positiva significa que o aumento do parâmetro irá provocar um aumento na concentração de substrato ou biomassa, enquanto que um valor negativo provoca uma diminuição na concentração (para uma diminuição do parâmetro).

Para o cálculo das sensibilidades, foi necessário obter as derivadas parciais em ordem ao parâmetro, k_4 , u_{2max} e Ks_3 , de uma derivada da concentração em função do tempo (*Alinea_f_Sensibilidade.m*). Na **Figura 5** podemos observar que o parâmetro k_4 não influencia as variáveis X e S , visto que as suas derivadas são iguais a zero. De forma semelhante, o parâmetro ks_3 não tem influência na variável S . Em relação ao parâmetro ks_3 para a variável S , como esta representa uma sensibilidade positiva, conclui-se que um aumento no parâmetro ks_3 irá provocar um aumento na produção de biomassa (X).

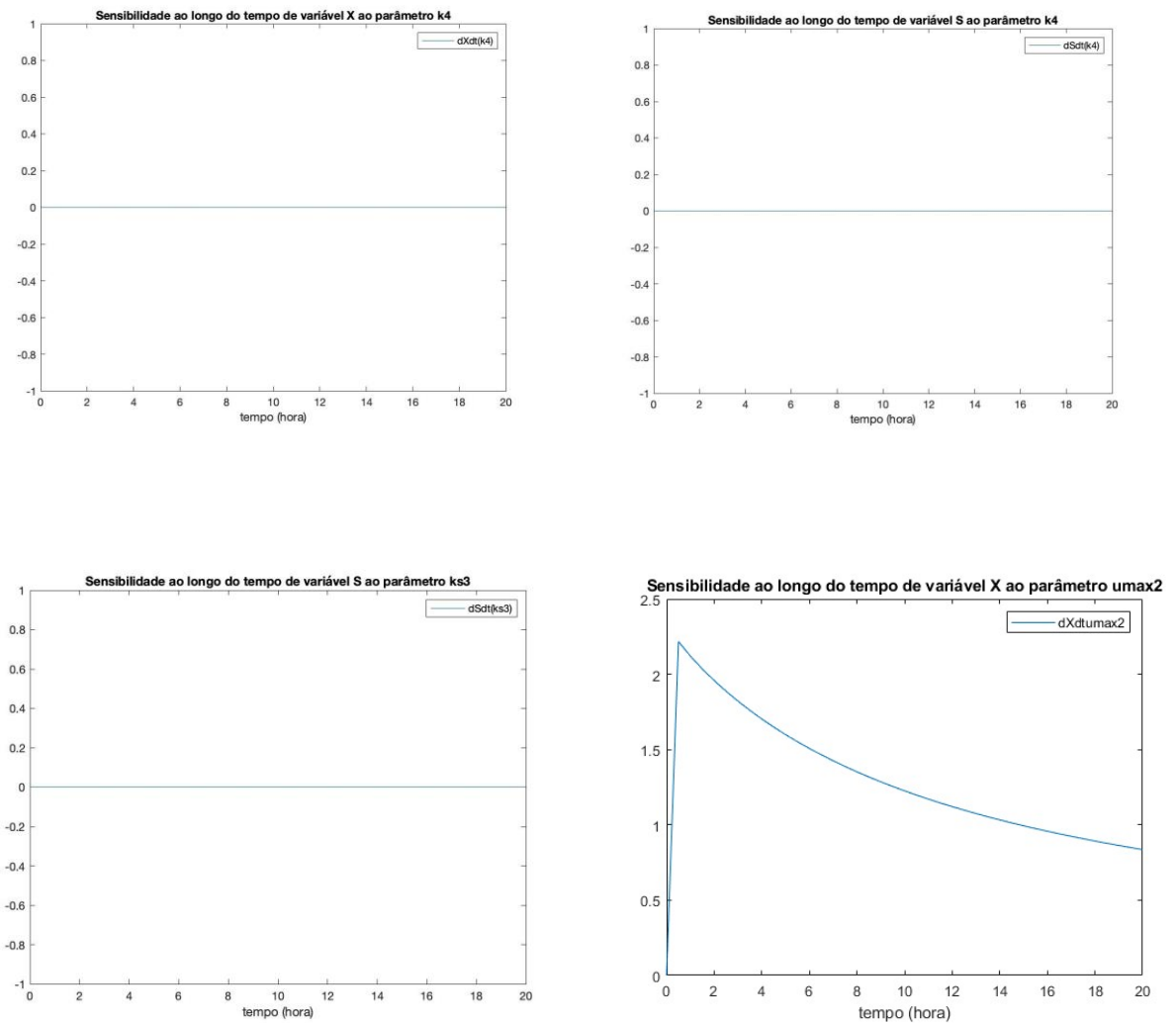


Figura 5 - Sensibilidades dos parâmetros k_4 , μ_{max2} , K_{s3} às variáveis correspondentes a biomassa (X) e substrato (S) em função do tempo (em horas).

g) Estados estacionários e sua classificação

Por último, procedeu-se à derivação do sistema em quimiostato, onde se considerou um caudal de entrada F_e igual ao anterior (0,7 L/h) e um volume fixo igual a 6L. As derivadas do sistema encontram-se no ficheiro *Alinea_g_Modelo.m*, enquanto que os pontos estacionários e a matriz Jacobiana do sistema encontram-se em *Alinea_g_EstadosEst.m* e *Alinea_g_Jacobiano.m*, respetivamente, onde foram determinados o determinante e o traço da matriz de modo a classificar os estados estacionários. O ponto estacionário determinado corresponde ao ponto $(X; S; A; P) = (33,6372; 0.0301; 0.0849; 86,7439)$. Para este ponto, o valor do determinante corresponde a 2366,9, enquanto que o traço apresenta um valor de -1375,1. Como o determinante é positivo e o traço é negativo, estamos perante um ponto estacionário estável. Para valores de X maiores que zero, foi determinado o ponto

estacionário $(0, 350, 0, 0)$, com um determinante de valor -0.0011 e traço 0.3326 , sendo, por isso, um ponto instável (sela).