

Questão 2

2) Os bioprocessos podem ser classificados de acordo com as características como presença ou não de água livre. O que caracteriza um processo de cultivo submerso, em que não há presença de água livre onde estarão presentes os componentes do meio de cultivo líquido e o organismo agente do processo, e um cultivo em estado sólido, onde não está presente água livre e a umidade é mantida entre 30 e 80% para crescimento do agente do processo em um meio de cultivo sólido que pode estar em repouso estático (*batch*) ou agitado (também rotativo).

Os bioprocessos com cultivo submerso podem ser ainda classificados entre aqueles que as células se encontram livres, onde estão presentes os reatores do tipo mecanicamente agitados (tanque agitado) e pneumaticamente agitados (coluna de bolhas e air lift), ou imobilizadas (reatores de leito fixo ou fluidizados).

As formas de operação de um bioprocessos são separadas entre contínua e descontínua. Os processos descontínuos são mais simples de serem operados e podem ser classificados em lote simples e alimentado. Na batelada simples, temos um sistema fechado em que todos os componentes do meio de cultivo e o agente do processo são adicionados ao início do cultivo, que é conduzido sem adição ou retirada de materiais ao longo do processo. As vantagens estão na:

simplicidade de operações; baixo custo de monitoramento do processo; manutenção do assepio do cultivo, por se tratar de um sistema fechado; e menor probabilidade de mutação do agente do processo, já que um menor número de divisões celulares ocorrem e, a cada nova batelada, um novo estoque congelado ou liofilizado pode ser utilizado. No entanto, os cultivos em batelado simples enfrentam desafios na produtividade, já que a depleção de nutrientes leva o organismo agente à inibição do crescimento. Assim, os cultivos não conseguem ser mantidos por longos períodos, sendo necessária a finalização, além de uma frequência alta de ciclos de limpeza e assepio do biorreator, o que traz "tempos mortos" para o processo, encarecendo os custos ao reduzir a produtividade. Já os processos descontínuos em batelado alimentada, vão apresentar um fluxo de entrada de substrato sob uma vazão F . Nestes casos, é possível evitar a inibição do organismo pelas altas concentrações de substrato que podem ocorrer no batelado simples. Desta forma, o substrato será adicionado aos poucos ao longo do processo. Isso é vantajoso também em casos de repressão catabólica, em que o acúmulo de substrato em altas concentrações (como o glicose) pode ocasionar em redirecionamento de fluxo para determinados vias metabólicas (como a fermentação alcoólica em leveduras). Problemas associa-

00

dos os transbordamentos catabólicos também são solucionados por este modo de operação. No transbordamento catabólico, a alta concentração de substrato inicial faz com que o organismo consuma rapidamente o substrato e que cause acúmulo de catabólitos, moléculas intermediárias do catabolismo que podem inibir o crescimento do microorganismo. Outra vantagem da batelada alimentada é o ganho comum em produtividade, já que é possível manter o bioprocesso por tempos mais longos quando comparados com a batelada simples. Desta forma, se mantém o agente do processo realizando a produção do bioproduto desejado.

Nesta modalidade de operação existe também a possibilidade de realizar uma batelada alimentada em estado quase estacionário, ou também chamado de pseudo estacionário. Para esta operação é realizado inicialmente uma batelada simples para atingir velocidade máxima de crescimento (μ) e ocorrer o consumo do substrato até concentração muito próximas de zero. Neste momento se inicia a alimentação seguindo uma vazão que segue a taxa de consumo do substrato, para que o suprimento seja similar a demanda. Ou seja, todo substrato adicionado sendo consumido pelo agente do processo. Isto traz concentrações constantes de substrato próximas de zero e simula o estado estacionário ao manter o μ constante. Também é uma

00

estratégia interessante para manutenção do célula em seu μ_{max} , conferindo alta produtividade.

As desvantagens desse tipo de processo com batch todo alimentado está na necessidade de maior monitoramento e controle de vazões de alimentação, além de maior possibilidade de contaminações por apresentar entrada de materiais.

Nos cultivos contínuos estão presentes vazões de entrada F_e e de saída F . Na entrada é adicionado meio de cultivo e na saída se recolhem as células e o produto. Para esta forma de operação também se inicia com uma batelada simples e após atingir o μ_{max} se iniciam as vazões de entrada e saída para manutenção do estado estacionário. Assim, as concentrações de substrato, produto e célula no reator serão constantes. Este forma de processo permite que o mesmo seja conduzido por longos períodos, evitando tempos mortos e aumentando a produtividade.

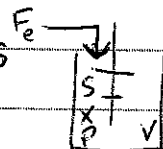
Reatores do tipo quémostat são ~~utilizados~~ utilizados e é importante ressaltar que reatores tubulares são frequentemente empregados para esse tipo de condução de processo. Os desafios enfrentados por este tipo de processo estão na possibilidade alta de contaminação e alta probabilidade de mutação pelo maior número de divisões celulares. Além disso, ocorre a ~~possibilidade~~ possibilidade do fenômeno de lavagem (wash out) que ocorre quando a vazão de alimentação do substrato é maior do que a capacidade do agente de assimilar o mesmo.

Isso reduz a taxa de crescimento e as células são removidas em maior quantidade do que são geradas no reator. Estratégias para evitar isso são os cultivos contínuos com reciclo de células (internos ou externos). Esse tipo de condução permite acúmulo de células e pode ser usado para cultivos em altas densidades celulares, o que se assemelha aos cultivos em batelada alimentada, que também atingem altas densidades celulares.

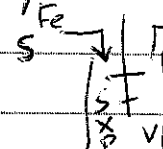
Para o equacionamento destes modos de operação (batelada simples, alimentada e contínuo) devemos considerar as características de cada processo, conforme ilustrado abaixo para biorreator tanque agitado.



batelada simples



batelada alimentada



Contínuo

O equacionamento geral de balanço de massas segue quando calcularmos o balanço de substrato (S), biomassa (X) e produto (P) ao longo do processo considerando o volume e as taxas de diluição (F/V), que dependem das vazões de entrada (F_e) e saída (F), quando presentes. Ou seja; Acúmulo = Entra - Sai + gerado - consumido. Para a batelada simples, não estão presentes vazões de entrada e saída. Logo, catamos estes termos de equações gerais para [S], [X] e [P].

Para substrato, temos que o mesmo não é gerado, mas sim consumido de acordo com a taxa de consumo (q_s) que apresente valor negativo por estar relacionada a diminuições do mesmo. Sendo assim:

$$\frac{dS}{dt} = -q_s X$$

Para produto, temos que o mesmo, em geral, não é consumido, salvo determinados casos, sendo apenas gerado. Para esse caso, temos que o balanço de massas vai ocorrer de acordo com a taxa de formação de produto (q_p). Sendo:

$$\frac{dP}{dt} = q_p X$$

Para biomassa, temos que a mesma é apenas gerada de acordo com a taxa específica de crescimento (μ). Onde:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Nos cultivos em batelada alimentada, o volume de meio não é constante já que temos ~~essa~~ vazão de entrada, o que traz uma taxa de diluição, D , de acordo com a vazão (F/v). Isso é vantajoso também em casos onde ocorre anoxia por vazão de injeção de ar, o que reduz o volume de meio no reator para cultivos em batelada simples. No balanço de massas, devemos então considerar a entrada de substrato para o mesmo, e temos que considerar a saída pelo taxa de diluição para $[S]$, $[X]$ e $[P]$. Em

caso que a concentração do substrato na alimentação é alta, essa saída pode ser desconsiderada (dos cálculos). Mes considerando a mesma, temos:

$$\text{Para Substrato: } \frac{dS}{dt} = -q_s + D(S_0 - S)$$

$$\text{Para Produto: } \frac{dP}{dt} = q_p - DP$$

$$\text{Para biomassa: } \frac{dX}{dt} = \mu - DX$$

Nos cultivos contínuos, não ocorre acúmulo, i.e. que, conforme citados, as concentrações são constantes com vazões de entrada e saída. Considerando o acúmulo = 0, na equação geral. Temos:

$$\text{Para Substrato: } q_s X = D(S_0 - S)$$

$$\text{Para Produto: } q_p X = DP$$

$$\text{Para Biomassa: } \mu = D$$

No estado estacionário, o μ será igual a taxa de diluição (F/V).

Questões 3

3) Os fenômenos de transporte são importantes em bioprocessos pois influenciam na disponibilidade de nutrientes para o agente do processo, além de garantirem otimizações de eficiência, disponibilizando os nutrientes de acordo com a demanda.

~~Os fenômenos de transporte, especialmente os~~ Além disso, garantir a homogeneização do cultivo, evitando zonas de gradiente, vão otimizar o mesmo e dependem dos estudos associados aos fenômenos de transporte.

A transferência de massa gás-líquido é crucial nos processos em que o agente necessita de oxigênio e para isso são empregados bioprocessos agitados, mecanicamente ou pneumaticamente. A taxa de transferência de massa gás-líquido para o oxigênio (N_{O_2}), ou seja, a taxa com que o O_2 vai difundir e solubilizar no líquido, depende do coeficiente de transferência de massa gás-líquido (K_L) e da relação de área interfacial e volume das bolhas (a) formadas pela injeção de ar e agitação (no caso de processos agitados mecanicamente). O $K_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de massa gás-líquido, e uma medida de extrema importância em processos aerobios. O $K_L a$ é influenciado pela vazão de ar, agitação (em processos agitados mecanicamente), viscosidade do líquido (que afeta a formação das bolhas) e temperatura. A temperatura influencia o $K_L a$ de várias formas, como aumentando a ~~taxa~~ taxa de difusão com maiores temperaturas, nos diminui-

do a solubilidade do oxigênio O_2 com esse aumento de temperatura. Além de a temperatura influenciar na ~~densidade~~ viscosidade do líquido e com isso na área e volume das bolhas.

Os reatores agitados mecanicamente, como o tanque agitado ("Stirred tank reactor" - STR), se caracterizam por apresentar impulsores que farão a agitação, o que promove quebre das bolhas de ar ^{que estarão} ~~depois~~ logo acima de onde estão sendo injetadas. A quebra das bolhas de ar diminui o volume e aumentam a área interfacial das bolhas, o que favorece a transferência gás-líquido. Os impulsores podem ser do tipo radiais (tipo Rushton) que apresentam formato de pás para quebre das bolhas com muita eficiência. Trazem mais transferência de massa gás-líquido, mas também promovem maior cisalhamento. Os impulsores, ou impelidores, axiais apresentam um formato de hastes náuticas e promovem boa mistura e homogeneização, mas com menor transferência de oxigênio e menor cisalhamento. A escolha dos impulsores, depende ^{do} do agente do processo que pode apresentar maior ou menor demanda de oxigênio, e maior ou menor suscetibilidade ao cisalhamento.

Os reatores agitados pneumaticamente apresentam ~~reatores~~ injeção de ar para promover a agitação e não apresentam componentes móveis no reator. Uma vantagem nesses casos está na limpeza e assepsia mais eficiente pela ausência desses componentes. Existem dois tipos principais de reatores agitados pneumática-

mente: coluna de bolhas e "air lift".

Nos reatores coluna de bolhas a injeção de ar é feita pela base com o escoamento das bolhas sendo aleatório. Já nos reatores do tipo "airlift", a injeção de ar é regulada por colunas que fazem o direcionamento das mesmas em um fluxo definido. Isso aumenta a eficiência da agitação pelo movimento das bolhas e pode também aumentar o tempo de residência, o que é positivo para a transferência de massa gás-líquido.

O cálculo de potência é essencial para manter a agitação de um processo aerado, seja mecanicamente ou pneumaticamente.

O cálculo de potência de um processo agitado mecanicamente vai depender de fatores como a densidade do líquido (ρ), a velocidade de agitação dos impulsos (N) e o diâmetro das pás dos impulsores (D) e o número de potência (N_p). Sendo a potência (P) calculada como:

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5$$

O cálculo para processos agitados pneumaticamente vai diferir pelo fato de a potência depender majoritariamente de vazão de ar (Q) e do variação de pressão (ΔP). A variação de pressão vai depender da profundidade do reator que influencia diretamente no tempo de residência das bolhas e na agitação. Logo, temos:

$$P = Q \cdot \Delta P$$

Para os processos que são agitados mecanicamente pode se citar também a dissipação dos res-

10 de julho

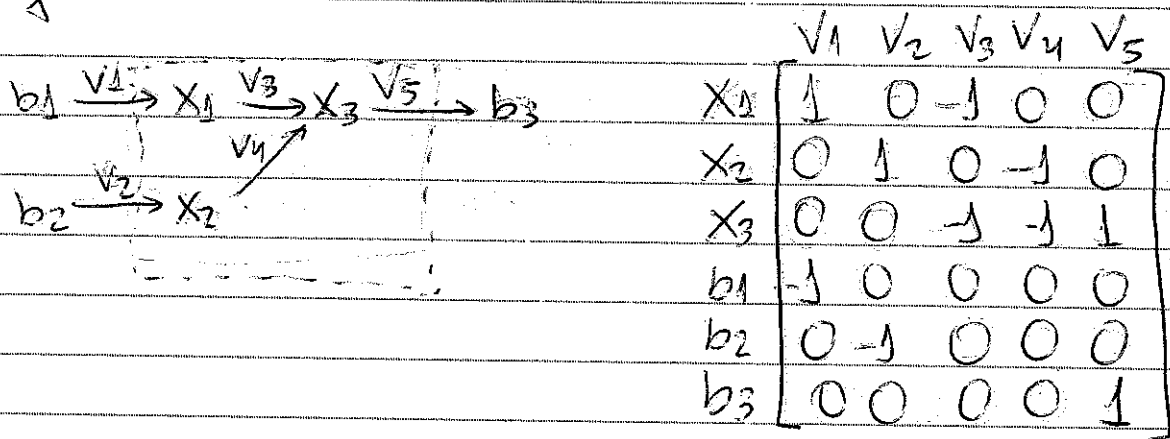
nos pelo fluxo laminar (menores taxas de agitação) ou turbulento (maiores taxas de agitação). A determinação do fluxo nesses casos é calculada em função do número de Reynolds (Re).

Para bioprocessos, o escalonamento é essencial e permite a aplicação industrial com produções em maiores escalas. Para aumentar o volume de um cultivo, aumentar sua dimensão, é necessário que determinados parâmetros sejam mantidos para que o aumento de escala não resulte em um processo de menor rendimento e eficiência. Para isso, usamos os critérios de ~~exp~~ extrapolação de escala. Para processos agitados mecanicamente é importante a manutenção do kLa e da razão entre potência e volume (P/V). Já nos processos agitados pneumaticamente, é importante a manutenção da razão de vazão por volume (Q/V).

Questão 1

D) A modelagem matemática aplicada a bioprocessos é de extrema importância para otimizar a obtenção de bioprodutos, tornando possível simular diferentes condições de cultivo e genéticas do organismo que influenciam na produção e rendimento. Para isso, modelos simples podem ser utilizados que ~~podem~~ vão considerar apenas a entrada de um único substrato limitante e a saída de um produto, considerando a estequiometria das reações. Esses modelos chamados de caixas pretas, pois não consideram as diversas reações que ocorrem dentro da célula para a conversão de interesse. Isso faz com que os mesmos não tenham ^{alta} capacidade preditiva e se simplificam no balanço de massas. Já nos modelos "cinzas" pode se considerar a entrada de mais de um substrato (glicose e amônia, por exemplo) e saída de mais de um produto, além de serem considerados os metabólitos intracelulares. Isso traz maior capacidade preditiva. Já nos modelos "coloridos", conhecidos o que chamamos de mapas metabólicos, pois vão considerar uma rede de reações que melhoram a capacidade preditiva do modelo. No entanto, para essa modelagem são ~~precisam~~ necessárias dados ômicos (genômicos, transcriptômicos, metabolômicos e proteômicos) integrados e o uso de algoritmos ~~complexos~~ e servidores para análise de um vasto volume de dados. Com esta introdução, podemos citar os tipos de modelagem que podem ser feitos nesse no

delos citados. A modelagem estequiométrica é um tipo de modelagem que considera a estequiometria das reações metabólicas do organismo. Frequentemente são utilizados as matrizes estequiométricas que são colunas de ~~reacções~~ ^{reacções} (v) e linhas de metabólitos extra (b) e intracelulares (x) organizados em uma ~~red~~ estrutura matricial. Os valores que correlacionam o metabólito e a reação são valores relacionados a estequiometria que podem ser negativos quando se tratar de um reagente ou positivo quando se tratar de um produto. Considerando relações estequiométricas 1:1 conforme ilustrado abaixo, temos a seguinte matriz estequiométrica:



A partir da modelagem estequiométrica seguinte, não são considerados as velocidades das reações. Isso pode ser considerado transpondo vetores de velocidade às colunas de matriz.

Quando consideramos a modelagem estequiométrica para modelos complexos de redes metabólicas, se faz necessário o uso de bancos de dados públicos que vão apresentar os dados e informações importantes citados anteriormente.

Nos dias de hoje, um volume grande de dados (os "big data") estão disponíveis em diversos bancos como o NCBI, Uniprot, KEGG e etc.

Neste contexto, um ponto de partida importante é o modelo metabólico em escala genômica (Genome Scale metabolic model - GSMM) que são representações do metabolismo de célula a partir do seu genoma, que pode ser alimentada com diversos dados ômicos. Retornando para a modelagem estequiométrica é possível realizar a análise de fluxos metabólicos usando o método FBA (Flux balance analysis) que analisa o balanço de fluxo com dados estequiométricos. Softwares como o Matlab para modelagem matemática pode ser usado como ferramenta COBRA para realizar a análise FBA. Com esta análise é possível fazer estudos técnicos de rendimento de biomassa ou de produto estabelecendo restrições, como determinando o rendimento máximo de biomassa e restringindo a produção de metabólitos ou o carbono restringindo consumo, e determinando o rendimento máximo de um produto. Com esse ferramenta é possível por exemplo comparar valores técnicos de rendimento em diferentes fontes de carbono ou partindo de rotas metabólicas heterologas distintas. Esse poder preditivo orienta de forma eficiente a escolha da formulação de meio de cultivo e modificações genéticas que pode ser realizadas, por exemplo.

~~Os resultados, para os dados~~ Nestes tipos de análise também é frequentemente utilizada a uni-

de de carbomol (C-mol), o que facilita os cálculos estequiométricos. No caso, 1 carbomol consiste em massa molar por carbono. A glicose por exemplo que tem uma massa molar de 180g/mol, terá 30 carbomol já que apresenta 6 carbonos.

Conforme citado previamente, a modelagem estequiométrica não considera as velocidades de reações. Para isso a modelagem cinética vai consistir em análises de sensibilidade que consideram importantes coeficientes como o coeficiente de elasticidade, que calcula quanto os níveis de metabólitos influenciam cineticamente na enzima. Enquanto os coeficientes de controle de fluxo e de concentração consideram como os níveis ~~concentrações~~ de enzima influenciam o fluxo e a concentração dos metabólitos. Essa análise de controle de fluxo é especialmente útil para determinar alvos, como enzimas, de mutação para otimizar o fluxo metabólico favorecendo o bioproduto de interesse. Para essas análises ~~cinéticas~~ o software COPASI, assim como o BRENDA (que ~~reúne~~ ^{reúne} dados cinéticos para diversas enzimas), podem ser utilizados.

Os GSMN após montados são validados por dados experimentais que podem incluir ensaios de marcação isotópica para quantificar e rastrear os fluxos metabólicos. Bancos de dados como o REGG pathway ~~contêm os dados~~ ~~reúne~~ ~~reúne~~ vão reunir representações metabólicas úteis para estudos e identificação de pontos do metabolismo para otimização.

Para se determinar um bom GSMN é necessário partir

de dados genômicos de qualidade, sem lacunas ou com incompletude de reações, um dos grandes desafios de ~~engenharia~~ engenharia metabólica.

Para isso, o sequenciamento, montagem e anotação são de extrema importância. O sequenciamento traz os fragmentos de DNA que correspondem à sequência do genoma de um organismo ~~ou~~ ou de um conjunto (como em metagenomas, obtidos de amostras ambientais correspondendo a comunidades microbianas). Esta ~~em~~ etapa por si só já é útil para fins de identificação e outros. No entanto, para outras aplicações, a montagem do genoma é essencial.

A montagem consiste em organizar os fragmentos de DNA (contigs) obtidos do sequenciamento para formar a estrutura completa do genoma.

A união de contigs forma os scaffolds e assim a montagem é realizada, trazendo informações mais precisas da sequência e de estrutura do genoma, o que permite a aplicação de estudos mais avançados, como ~~os~~ estudos evolutivos. Já a anotação por fim consiste na determinação de funcionalidade dos sequências, o que traz informações relacionadas aos genes presentes no genoma e seus produtos finais como RNA's e proteínas que desempenham as funções no célula e formam o metabolismo. Para aplicações em engenharia metabólica é extremamente importante ter um genoma bem sequenciado, montado e anotado, o que permite as modelagens metabólicas citadas anteriormente.

O sequenciamento de DNA apresentou um grande

marco em 2003 com o sequenciamento do genoma humano sendo completo. Esse projeto impulsionou o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento para atingir o que temos hoje. O sequenciamento nesse época partir do método de Sanger ainda que vai sendo em muitos casos substituído pelas novas tecnologias.

Sanger:

O sequenciamento de Sanger é um método que é baseado na terminação de cadeias de DNA. Inicialmente feito em eletroforese em gel mais comum, mas hoje com a eletroforese em capilar, esta técnica ganhar maior agilidade e menor custo. Sendo ainda uma técnica eficaz para o sequenciamento de pequenos moléculas de DNA, o que não se aplica a melhorias dos sequenciamentos genômicos.

Com isso, as tecnologias de sequenciamento de nova geração surgiram, as NGS, que são os sequenciamentos Illumina e 454 Pyrosequencing.

Illumina:

Nesta técnica, a base é o sequenciamento em tempo real por síntese. Os custos são menores e é uma técnica que permite sequenciamento eficaz de genomas.

Pyrosequenciamento 454:

Nesta técnica, é detectado por luz a liberação do pirofosfato (PPi). Embora seja uma técnica eficaz e realizada também em tempo real, os custos com os reagentes são altos, o que trouxe desuso para

o mesmo.

PacBio:

Este tipo de sequenciamento em tempo real permite a leitura de longas sequências, grandes contigs grandes que facilitam a montagem do DNA.

Nanopore:

É o sequenciamento que utiliza ~~uma~~ a passagem de moléculas de DNA por nanoporos e é especialmente útil ~~na~~ para análises de campo, já que permite o uso de equipamentos portáteis.

A montagem dos genomas pode ser realizada a partir de duas metodologias: montagem com uso de genoma de referência e montagem "De novo".

Na montagem com o uso de genoma de referência é possível partir de sequências de um genoma próximo do organismo estudado para guiar a montagem dos contigs. Isso facilita a montagem de regiões estruturais que apresentam sequências repetitivas, como centrômeros e telômeros. Já a montagem "De novo" não parte de nenhuma sequência de referência, montando o DNA do gene. As montagens dos contigs nos dois casos usam ferramentas computacionais como o Megathit na montagem De Novo e o Bowtie na montagem por genoma de referência.

A montagem utilizando fragmentos de DNA mais longos é sempre favorecida, mas depende das ferramentas de sequenciamento como o PacBio, anteriormente citado; ~~isso encarece os custos do sequenciamento. Por isso, técnicas híbridas, usando fragmentos~~ Isso encarece os custos do sequenciamento. Por isso, técnicas híbridas, usando fragmentos

longos e curtos, partindo do sequenciamento com a técnica Illumina, e muito utilizado.

Para genomas complexos e metagenomas pode se ressaltar também a técnica de sequenciamento "Shot-gun" que usa a fragmentação dos sequências de DNA para serem sequenciadas. Essas sequências curtas são montadas usando softwares específicos.

O papel de bioinformática neste contexto é de extrema importância, quando se diz respeito a genômica. Já que os ferramentas computacionais que irão trazer a possibilidade de recriar as rotas e anotações dos genomas, bem como a modelagem matemática aplicada a bioprocessos em um contexto holístico do metabolismo. Essas etapas são essenciais para ~~o desenvolvimento~~ a escolha do agente do bioprocesso e as possíveis modificações genéticas que podem ser realizadas. A construção da cepa já conta as novas tecnologias da biologia sintética (assembly e CRISPR-Cas) para uma montagem eficiente e otimizada. A testagem desses processos experimentalmente é importante para validar o modelo e parâmetros como a marcação isotópica com análise por LC-MSMS podem ser utilizados. Os testes também incluem não só testes que forneçam a análise de fluxo, mas também a quantificação dos metabólitos de interesse por GC-MS / LC-MSMS ou por técnicas de fluorescência, colorimetria, etc que podem ser mais ágeis e permitir a triagem em larga escala (HTS). ~~dados~~. A respeito dos testes e demais informações de ~~dados~~ bancos de dados públicos podem

alimentar o modelo e fazer o aprendizado de máquina ("machine learning"). Ferramentas computacionais como redes neurais artificiais podem melhorar o modelo inicial, melhorando a capacidade preditiva e assim guiando novas iterações para redesenho. Esse ciclo "Design-Build-test-Learn" (Desenho-Constroção-Teste-Aprendizagem) é a base da engenharia metabólica e se baseia na modelagem matemática aplicada a bioprocessos.