



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ,
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

**ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ
ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *ESCHERICHIA COLI*, ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ**

**STANDARDIZATION AND MODELING OF THE ENZYMATIC
PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS FROM THE
BACTERIUM *ESCHERICHIA COLI*, USING COMPUTATIONAL
TOOLS**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΦΡΑΓΚΙΣΚΑΤΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΟΚΟΣΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ**

ΑΘΗΝΑ 2/10/2024



Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκτελέστηκε και συνεγράφη από τον προπτυχιακό φοιτητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, Φραγκισκάτου Σπυρίδων. Υλοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μηχανική Συστημάτων και Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π. και σε συνεργασία με το Federal University of Toulouse Midi-Pyrénées (Πανεπιστήμιο της Τουλούζης), με επιβλέποντα καθηγητή του Ε.Μ.Π., κύριο Αντώνη Κοκόση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κοκόση, για την εμπιστοσύνη που μου παρείχε και μου ανέθεσε το θέμα, αλλά και για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον διδάκτορα την Σχολής Χημικών Μηχανικών, Στέφανο Ξένιο για τις ουκ ολίγες ώρες που δαπάνησε, ώστε να με καθοδηγήσει και να φανεί αρωγός, σε οποιοδήποτε ζήτημα αφορούσε την εργασία μου. Τέλος, ευχαριστίες θέλω να αποδώσω τόσο στον διδάκτορα της Σχολής Χημικών Μηχανικών, Κωνσταντίνο Μέξη, όσο και την ομάδα IPSEN NTUA, για την άψογη συνεργασία μας.

Ιδιαίτερη και ξεχωριστή μνεία στο σημείο αυτό, επιβάλλεται να γίνει στην διδάκτορα του Πανεπιστημίου της Τουλούζης, Susana María Alonso Villela, η οποία μέσω της διδακτορικής διατριβής της παρείχε λεπτομερέστατες πληροφορίες, για όλα τα δεδομένα που λήφθηκαν από την Τουλούζη και επεξεργάστηκαν στο Ε.Μ.Π..

Φραγκισκάτος Σπυρίδων, Αθήνα, 2024



Περίληψη

Η εγκαθίδρυση μιας οικονομίας που βασίζεται στη βιολογική βάση είναι ένα ζωτικό συστατικό της μετάβασής μας σε μια πιο βιώσιμη και αποδοτική από πλευράς πόρων, κοινωνία. Αυτός ο βιολογικός μετασχηματισμός των συμβατικών κατασκευών έχει τις ρίζες του σε βιοτεχνολογικούς κλάδους όπως η Μεταβολική Μηχανική, η Συνθετική Βιολογία και η Ανάπτυξη Βιοδιεργασιών και θέτει ορισμένους στόχους όπως η προτυποποίηση, η τυποποίηση, η απλοποίηση, η αυτοματοποίηση, η ταχεία δημιουργία πρωτοτύπων και η επέκταση των βιολογικών διεργασιών. Τα τελευταία χρόνια, έχει υιοθετηθεί ένα διεξοδικό πλαίσιο που ονομάζεται κύκλος σχεδίασης-κατασκευής-δοκιμής-μάθησης (DBTL) για την ανακάλυψη, τον σχεδιασμό και την βελτίωση βιομηχανικών συστημάτων και βιοδιεργασιών. Αυτός ο κύκλος επιταχύνει και μειώνει το κόστος ερευνάς, ανάλυσης, βελτιστοποίησης και εκμετάλλευσης των επιθυμητών λύσεων μέσω της επανάληψης των τεσσάρων φάσεων του. Η ανάγκη αξιοποίησης αυτού του κύκλου, συνδυάστηκε ιδανικά με ένα ευρωπαϊκό πρόγραμμα, το Bioindustry 4.0 και δόθηκε η δυνατότητα στην παρούσα εργασία, να προτυποποιηθεί και μοντελοποιηθεί η ενζυμική παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το βακτήριο *Escherichia Coli*.

Στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος Bioindustry 4.0, διάφορα πανεπιστήμια και ερευνητικά ιδρύματα από όλη την Ευρώπη, συνεργάζονται με σκοπό να αναπτύξουν προσεγγίσεις βασισμένες σε δεδομένα, εκμεταλλευόμενα την Τεχνητή Νοημοσύνη (AI) για την βελτιστοποίηση καινοτόμων συστημάτων υποστήριξης λήψης αποφάσεων και ψηφιακών διδύμων, τα οποία θα βελτιώσουν τον σχεδιασμό των βιοδιεργασιών και θα επιτρέψουν τον έλεγχό τους σε πραγματικό χρόνο.

Σε αυτή την γενικότερη λοιπόν προσπάθεια, ένα από τα έργα που κλήθηκε η Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π. να αναλάβει, είναι η δημιουργία του ψηφιακού διδύμου ενός πρότυπου βιοαντιδραστήρα που σχεδιάστηκε και λειτουργείται από το Πανεπιστήμιο της Τουλούζης. Στον αντιδραστήρα αυτόν, αναπτύσσονται καλλιέργειες του βακτηρίου *Escherichia Coli*, με σκοπό την παραγωγή πρωτεϊνών, που συνθέτουν αντίδοτο κατά του τσιμπήματος του σκορπιού.

Στην συγκεκριμένη εργασία, επεξεργάζονται τα δεδομένα που λαμβάνονται από το πανεπιστήμιο της Τουλούζης, και περιλαμβάνουν τρία στάδια πειραμάτων. Αυτά είναι: καλλιέργεια *Escherichia Coli* σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (Batch Phase), καλλιέργεια *Escherichia Coli* σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου (Fed Batch Phase) και καλλιέργεια *Escherichia Coli* σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου με επαγωγή (Fed Batch & Induction Phase). Τα πειράματα που εκτελέστηκαν, εννέα στο σύνολο με ονομασίες BR01 έως BR09, κατηγοριοποιούνται με βάση την θερμοκρασία επαγωγής (28 °C έως 37 °C) και το προϊόν που παράγεται κατά την φάση αυτή.

Αρχικά, γίνεται εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων της εξίσωσης Monod, που περιγράφουν την παραγωγή της βιομάζας με υπόστρωμα γλυκόζης, με χρήση υπολογιστικών εργαλείων και συμπεραίνεται πως αυτές είναι: $\mu_{\max} = 0.87 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0.214 \text{ g/L}$ και $Y_{X/S} = 0.496$. Ακόμη, διερευνάται η επίρεια, τόσο του χρόνου, όσο και της θερμοκρασίας στην παραγωγή της πρωτεΐνης και με γνώμονα τις θεωρήσεις αυτές, προτείνονται κινητικά μοντέλα που περιγράφουν την παραγωγή της. Τα μοντέλα αποτελούν συνδυασμό βιβλιογραφικής έρευνας και χρήσης εμπειρικών εξισώσεων και εξήχθησαν, με χρήση υπολογιστικών εργαλείων, βασιζόμενα στα πειράματα BR02



έως BR07, καθώς σε αυτά τα πειράματα επιτυγχάνεται η παραγωγή πρωτεΐνης. Μελετάται επίσης, η επίδραση της θερμοκρασίας στις κινητικές παραμέτρους της εξίσωσης Monod και πως μεταβάλλεται έτσι η σταθερά ανάπτυξης της βιομάζας στην αλλαγή θερμοκρασίας. Τέλος, από τα κινητικά αυτά μοντέλα προβλέπεται πως η υψηλότερη παραγωγή πρωτεΐνης επιτυγχάνεται, στις 34.5 h επαγωγής και στους 33 °C και ισούται με 42.8 mg/L. Ενώ παράλληλα, η μέγιστη εκλεκτικότητα της γλυκόζης προς την πρωτεΐνη ισούται με $Y_{P/S} = 0.9209$ mg/g και σημειώνεται στις 5.8 h επαγωγής και στους 34.9 °C.



Abstract

Establishing a bio-based economy is a vital component of our transition to a more sustainable and resource-efficient society. This biological transformation of conventional manufacturing is rooted in biotechnological disciplines such as Metabolic Engineering, Synthetic Biology, and Bioprocess Development and sets certain goals such as standardization, simplification, automation, rapid prototyping, and scalability of biological processes. This is achieved by adhering to engineering principles and enabling technologies such as gene editing, DNA synthesis, directed evolution, etc. In recent years, a thorough framework called the design-build-test-learn (DBTL) cycle has been adopted to discover, design, and improve bioengineered systems and bioprocesses. This cycle accelerates and reduces the cost of exploration, analysis, optimization, and exploitation of desired target solutions through iterations of its four phases. The need of using this cycle was ideally combined with a European program, Bioindustry 4.0 and enabled the present work to standardize and model the enzymatic production of recombinant proteins from the bacterium *Escherichia Coli*.

As part of the European plan, Bioindustry 4.0, several universities and research institutes from across Europe are collaborating to develop data-driven approaches exploiting Artificial Intelligence (AI) to optimize innovative decision support systems and digital twins, which will improve the design of bioprocesses and allow their real-time control.

So, in this general effort, one of the projects that the School of Chemical Engineering, N.T.U.A. has to undertake, is the creation of the digital twin of a model bioreactor designed and operated by the University of Toulouse. In this reactor, cultures of the bacterium *Escherichia Coli* are grown, with the aim of producing proteins, which synthesize an antidote against the scorpion sting.

For this thesis, the data obtained from the University of Toulouse are processed and include three stages of experiments. These are: *Escherichia Coli* cultivation in a batch reactor (Batch Phase), *Escherichia Coli* cultivation in a semi-batch reactor (Fed Batch Phase) and *Escherichia Coli* cultivation in a semi-batch reactor with induction (Fed Batch & Induction Phase). The performed experiments, nine in total with designations BR01 to BR09, are categorized based on the induction temperature (28 °C to 37 °C) and the product produced during this phase.

Firstly, the kinetic parameters from Monod equation, that describe the production of biomass with a glucose substrate are estimated, using computational tools, and it's concluded that their values are: $\mu_{\max} = 0.87 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0.214 \text{ g/L}$ and $Y_{X/S} = 0.496$. Furthermore, the influence of both time and temperature on protein production is investigated and based on these considerations, kinetic models describing its production are proposed. These models are a combination of literature research and use of empirical equations and were derived, using computational tools, based on experiments BR02 to BR07, as protein production is achieved in these experiments. Also studied is the effect of temperature on the kinetic parameters of the Monod equation and thus the changes of the biomass growth constant with temperature change. Finally, from these kinetic models it is predicted that the highest protein production is achieved, at 34.5 h of induction and at 33 °C and is equal to 42.8 mg/L. At the same time, the maximum selectivity of glucose to protein is equal to $Y_{P/S} = 0.9209 \text{ mg/g}$ and is noted at 5.8 h of induction and at 34.9 °C.



Περιεχόμενα

Πρόλογος	1
Περίληψη	2
Abstract.....	4
Εισαγωγή & Θεωρητικό υπόβαθρο	7
Κύκλος DBTL.....	7
Bioindustry 4.0.....	8
Χρήση του <i>Escherichia coli</i> ως σύστημα έκφρασης.....	9
Βιοπαραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	11
Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο <i>Escherichia coli</i>	12
Μηχανισμός έκκρισης πρωτεΐνης	12
Επαγωγέας πρωτεΐνης.....	13
Δείκτης επιλογής.....	13
Καθαρισμός.....	14
Μέσα καλλιέργειας.....	14
Συνθήκες καλλιέργειας	15
Παραγωγή μεγάλης κλίμακας.....	15
Αναδόμενες φαρμακευτικές εφαρμογές ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	17
Βιοπαραγωγή τοξινών σκορπιού και αντιδότην	18
Πειραματική Διαδικασία.....	21
Βακτηριακά στελέχη.....	21
Μέσα Καλλιέργειας	22
Εμβολιασμός.....	22
Πλούσιο μέσο (Terrific Broth).....	22
Καθορισμένο μέσο (Minimal Medium).....	23
Διαλύματα γλυκόζης.....	25
Διάλυμα αμπικιλίνης.....	25
Διάλυμα IPTG.....	25
Καλλιέργειες σε φιάλη (Batch mode).....	25
Παραγωγή βιομάζας.....	25
Παραγωγή πρωτεΐνης.....	26
Καλλιέργειες βιοαντιδραστήρα (Fed batch mode)	26
Διάλυμα τροφοδοσίας βιοαντιδραστήρα	26
Πειραματικά Δεδομένα.....	28



Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων & Αποτελέσματα.....	28
Batch phase	29
Fed Batch Phase.....	35
Fed batch & Induction Phase	37
Βασικές φάσεις παραγωγής πρωτεϊνών με τον χρόνο	43
Μηχανισμοί που επηρεάζουν την εξάρτηση από τον χρόνο.....	44
Συνολική περιγραφή	62
Βελτιστοποίηση	67
Συμπεράσματα & Προτάσεις.....	68
Συμπεράσματα	68
Προτάσεις	69
Κατακλείδα	70
Βιβλιογραφία	71
Παράρτημα Α.....	79
Παράρτημα Β.....	87



Εισαγωγή & Θεωρητικό υπόβαθρο

Κύκλος DBTL

Το DBTL (Σχεδιασμός-Κατασκευή-Δοκιμή-Μάθηση) είναι μια κυκλική και επαναληπτική διαδικασία που εφαρμόζεται σε πολλούς επιστημονικούς και τεχνολογικούς τομείς, αλλά ιδιαίτερα στη βιοτεχνολογία και τις βιοδιεργασίες. Ο στόχος του DBTL είναι η συνεχής βελτίωση και βελτιστοποίηση βιολογικών συστημάτων, μέσω μιας μεθοδικής και ελεγχόμενης διαδικασίας ανατροφοδότησης.

Αναλυτικά οι φάσεις του DBTL:

1. Σχεδιασμός

Η φάση του σχεδιασμού περιλαμβάνει την ανάπτυξη μιας στρατηγικής ή υποθέσεων βασισμένων σε επιστημονικές γνώσεις και θεωρίες. Στη βιολογία, αυτό μπορεί να σημαίνει το σχεδιασμό ενός γενετικού κυκλώματος, ενός βιοχημικού μονοπατιού ή μιας γενετικής τροποποίησης που επιδιώκει έναν συγκεκριμένο στόχο.

2. Κατασκευή

Σε αυτή τη φάση, η σχεδιασμένη ιδέα υλοποιείται στην πράξη. Στη βιολογία, αυτό συχνά περιλαμβάνει τη σύνθεση και εισαγωγή του γενετικού υλικού σε οργανισμούς (όπως μικρόβια, φυτά ή ζώα). Τα κύρια βήματα περιλαμβάνουν, την σύνθεση γονιδίων, όπου δημιουργούνται τα απαραίτητα γονίδια ή βιολογικά μόρια, την μεταφορά σε οργανισμό ξενιστή, δηλαδή, το γενετικό υλικό να μεταφερθεί μέσα σε οργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες ή κυτταρικές σειρές και τέλος την καλλιέργεια και ανάπτυξη του συστήματος, που ελέγχεται αν ο οργανισμός εκτελεί την επιθυμητή λειτουργία (π.χ., παραγωγή πρωτεΐνης ή μεταβολίτη).

3. Δοκιμή

Η δοκιμή είναι κρίσιμη για την αξιολόγηση του αν το σύστημα λειτουργεί όπως σχεδιάστηκε. Εδώ, γίνονται πειράματα για να μετρηθεί η αποδοτικότητα, η σταθερότητα και η λειτουργία του βιολογικού συστήματος και συγκρίνονται τα αποτελέσματα με τα αναμενόμενα ή τις θεωρητικές προβλέψεις.

4. Μάθηση

Μετά τη φάση της δοκιμής, οι ερευνητές αναλύουν τα αποτελέσματα για να κατανοήσουν τι λειτουργήσε και τι όχι. Αυτή η φάση είναι εξίσου σημαντική με τις υπόλοιπες, καθώς η γνώση που αποκτάται εδώ οδηγεί σε βελτιώσεις και νέες υποθέσεις για τον επόμενο κύκλο DBTL. Κύριες δραστηριότητες περιλαμβάνουν:

- Ανατροφοδότηση (Feedback): Κατανόηση των λαθών ή των ατελειών στο σύστημα, όπως αν η έκφραση ενός γονιδίου είναι υπερβολικά χαμηλή ή υψηλή.



- Βελτιστοποίηση: Προσαρμογή του σχεδίου για να βελτιωθεί η απόδοση στο επόμενο στάδιο του κύκλου.
- Νέα δεδομένα: Τα νέα δεδομένα που αποκτώνται μπορούν να οδηγήσουν σε πιο εξελιγμένα σχέδια, καθώς και στη δημιουργία νέων υποθέσεων.

Ιδανικά, μετά από κάθε κύκλο DBTL, δημιουργείται νέα γνώση που ανατροφοδοτείται σε έναν επόμενο κύκλο μέσω εναλλακτικών προσεγγίσεων, αναδιατυπωμένων προβλημάτων ή προδιαγραφών για μελλοντικά σχέδια. Με αυτόν τον τρόπο, ο πολυδιάστατος χώρος επίλυσης του αρχικού προβλήματος στενεύει, οδηγώντας σε μειωμένο σύνολο βέλτιστων επιλογών. Η μέχρι σήμερα προσέγγιση του DBTL, επιτρέπει σχεδόν πλήρη αυτοματοποίηση του κύκλου και ενσωματώνει ισχυρά υπολογιστικά στοιχεία όπως η βιολογική μοντελοποίηση, η μηχανική μάθηση και η τεχνητή νοημοσύνη (AI). Ωστόσο, ενώ οι επαναληπτικές διαδικασίες εκτελούνται συνήθως για την ανάπτυξη βιολογικών μονοπατιών, στελεχών και βιοδιεργασιών, το DBTL συχνά παρεκκλίνει λόγω ελλιπών μεθόδων δοκιμής ή παράλειψης του βήματος εκμάθησης. Προηγμένες ωστόσο, υπολογιστικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνεργατικά για να ξεπεραστούν τα σημεία βιολογικής πολυπλοκότητας και συνολικά, διευκολύνουν τις ακριβείς προβλέψεις, ενισχύουν την αξιολόγηση της απόδοσης του συστήματος και επιτρέπουν την υβριδική μάθηση. Αυτές οι «βιοευφυείς» προσεγγίσεις DBTL για την ανέλιξη της προόδου της σύγχρονης βιοτεχνολογίας ενισχύονται στις δύο τελευταίες φάσεις του κύκλου, την δοκιμή και την μάθηση.^[3]

Bioindustry 4.0

Η Βιομηχανική Βιοτεχνολογία (BB) είναι μια βασική τεχνολογία γενικής εφαρμογής (BTΓΕ) για την κυκλική βιο-οικονομία, την ανανέωση της βιομηχανίας και την ευρωπαϊκή αυτονομία στην παραγωγή. Η ανάπτυξή της αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της στρατηγικής της ΕΕ για την επίτευξη κλιματικής ουδετερότητας έως το 2050. Για να γίνει η BB μια σημαντική τεχνολογία παραγωγής, πρέπει να διευρυνθεί η χρήση προηγμένων ψηφιακών τεχνολογιών. Αυτές θα βελτιώσουν την αποδοτικότητα της Έρευνας και Ανάπτυξης (R&D), μειώνοντας τον χρόνο έως την διάθεση στην αγορά και το κόστος. Επιπλέον οι προηγμένες ψηφιακές τεχνολογίες θα προωθήσουν αυτόνομα και ευπροσάρμοστα συστήματα παραγωγής. Για να υποστηριχθεί η ψηφιοποίηση της BB, το πρόγραμμα *BIOINDUSTRY 4.0* θα δημιουργήσει νέες υπηρεσίες που θα παρέχονται από τις ευρωπαϊκές ερευνητικές υποδομές (RI). Αυτές οι υπηρεσίες θα αντιμετωπίσουν αρκετές προκλήσεις, εστιάζοντας στην επιτάχυνση, των βασισμένων σε βιοδιεργασίες, γραμμών παραγωγής. Αξιοποιώντας τις συμπληρωματικές δεξιότητες της κοινοπραξίας του, το *BIOINDUSTRY 4.0* θα αναπτύξει προσεγγίσεις βασισμένες σε δεδομένα, εκμεταλλευόμενο την Τεχνητή Νοημοσύνη (AI) για την βελτιστοποίηση καινοτόμων συστημάτων υποστήριξης λήψης αποφάσεων και ψηφιακών διδύμων, τα οποία θα βελτιώσουν τον σχεδιασμό των βιοδιεργασιών και θα επιτρέψουν τον έλεγχό τους σε πραγματικό χρόνο. Για την ολοκλήρωση αυτών των υπηρεσιών, στο *BIOINDUSTRY 4.0* θα αναπτυχθούν επίσης πρότυπα δεδομένων και μετα-δεδομένων για τη δημιουργία υψηλής ποιότητας, διαλειτουργικών δεδομένων βιοδιεργασιών πολλαπλής κλίμακας, που αποτελούν την τεχνική βάση για αξιόπιστα δίκτυα πληροφόρησης και συσκευές αναλυτικής διεργασίας για να διευκολυνθεί η παρακολούθηση των βιοδιεργασιών, σε πραγματικό χρόνο. Μόλις εφαρμοστούν, αυτές οι υπηρεσίες RI θα παρέχουν στους Χρήστες



πρόσβαση σε προηγμένες τεχνολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μεμονωμένα είτε με ολοκληρωμένο τρόπο, καλύπτοντας ολόκληρους τους αγωγούς R&D. Οι ολοκληρωμένες υπηρεσίες θα παρέχονται από μια κατανεμημένη RI, προσφέροντας στην Ευρώπη ένα μοναδικό δοκιμαστικό περιβάλλον για την ανάπτυξη βιοδιεργασιών και ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε σχέση με τον παγκόσμιο ανταγωνισμό. Για να επιτύχει, το *BIOINDUSTRY 4.0* ενώνει έξι ευρωπαϊκές RIs, μία πολυεθνική εταιρεία, δύο καινοτόμες ευρωπαϊκές μικρομεσαίες επιχειρήσεις και αρκετές ερευνητικές ομάδες, γύρω από ένα φιλόδοξο τετραετές σχέδιο δράσης, που θα υλοποιηθεί σε διαβούλευση με τους φορείς της BB, χρησιμοποιώντας μια στρατηγική συναπόφασης για τον καθορισμό στόχων. ^[2]

Χρήση του *Escherichia coli* ως σύστημα έκφρασης

Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έχει αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό φέροντας μεγάλη εξέλιξη στον τομέα της βιοχημείας. Το ζητούμενο γονίδιο κλωνοποιείται σε έναν διαθέσιμο φορέα έκφρασης και στη συνέχεια μετασχηματίζεται στον κατάλληλο ξενιστή με σκοπό την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η σωστή ανάπτυξη του ξενιστή καθώς και η προέλευση της πρωτεΐνης, δηλαδή αν πρόκειται για ευκαρυωτική ή προκαρυωτική. Η επιλογή του ξενιστή που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης καθορίζει τον σχεδιασμό ολόκληρης της διεργασίας. Στους πιο συνήθεις ξενιστές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιλαμβάνονται τα βακτήρια, οι ζύμες, οι μύκητες και τα φύκη. Ο μικροοργανισμός ο οποίος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή βιομορίων είναι το βακτήριο *Escherichia coli*. Πρόκειται για ένα προκαρυωτικό μικροοργανισμό με κυκλικό DNA ο οποίος ζει στο παχύ έντερο των θερμόαιμων ζώων. Είναι προαιρετικά αναερόβιο ωστόσο μπορεί να αναπτυχθεί και σε αερόβιες συνθήκες. Οι διατροφικές του απαιτήσεις είναι ιδιαίτερα απλές γεγονός που του επιτρέπει να μεταβολίσει μεγάλη ποικιλία πηγών άνθρακα. Έχουν γίνει εκτενείς μελέτες πάνω στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού και έχει διαπιστωθεί ότι περιέχει μεγάλο αριθμό μετασχηματισμένων γενετικών στοιχείων καθώς και κατάλοιπα βακτηριοφάγων. Γνωστά στελέχη του μικροοργανισμού είναι τα *Escherichia coli K* και *Escherichia coli B* και συγκεκριμένα το στέλεχος *BL21* αποτελεί την συνηθέστερη επιλογή για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς παράγει λιγότερο οξικό οξύ το οποίο δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στην κυτταρική ανάπτυξη. Επιπλέον λόγοι που καθιστούν το *Escherichia coli* τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ξενιστή για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών είναι οι υψηλές κυτταρικές πυκνότητες σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επίσης αναπτύσσεται ταχύτατα καθώς υπό βέλτιστες συνθήκες ο χρόνος διπλασιασμού του είναι περίπου 20 λεπτά. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι πρόκειται για γρήγορες εφαρμογές καθώς σε μερικές ώρες έχει επέλθει η στάσιμη φάση. Επιπρόσθετα, τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία της καλλιέργειας είναι φθηνά ενώ παράλληλα επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις του επιθυμητού προϊόντος. Ταυτόχρονα έχει διαπιστωθεί ότι τα στελέχη έκφρασης του *Escherichia coli* είναι εγκεκριμένα από τον FDA (Food and Drug Administration) για την εφαρμογή τους στον φαρμακευτικό τομέα. Όλα αυτά καθιστούν το *Escherichia coli* μία οικονομική, γρήγορη και αποδοτική λύση για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βιομηχανική κλίμακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η



χρήση ανασυνδυασμένου *Escherichia coli* για την παραγωγή της ακετυλάσης της πενικιλίνης η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή ημι-συνθετικών βιοπροϊόντων. Ωστόσο η χρήση ενός συστήματος έκφρασης *Escherichia coli* ως ξενιστή για την παρασκευή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών συναντά ορισμένα εμπόδια. Αρχικά, το *Escherichia coli* όντας προκαρυωτικός μικροοργανισμός δεν έχει την ικανότητα να πραγματοποιήσει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως τα συστήματα αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Επίσης αυτά τα συστήματα έκφρασης δεν έχουν την δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών ενώ δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούν γλυκοζυλίωση. Τέλος, ακόμη και αν τελικά πραγματοποιηθεί η παραγωγή πρωτεΐνης, είναι πιθανή η παραγωγή ενδοτοξινών.

Υπάρχουν πολλοί ξενιστές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, αλλά η προτιμώμενη επιλογή είναι το *Escherichia coli* επειδή είναι εύκολο στην καλλιέργεια, έχει πολύ σύντομο κύκλο ζωής και είναι ευκόλως τροποποιούμενο γενετικά, λόγω της εις βάθος γνώσης του γονιδιώματός του. Το *Escherichia coli* ήταν ο πρώτος ξενιστής που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένου DNA (rDNA) για φαρμακευτικό προϊόν, με την έγκριση της ανθρώπινης ινσουλίνης rDNA της Eli Lilly το 1982. Χρησιμοποιείται επίσης συχνά το *Escherichia coli* ως ξενιστής για την παραγωγή πρωτεϊνών φαρμακευτικού σκοπού, για την μείωση του κόστους παραγωγής. Στον ξενιστή όμως αυτό, αντιμετωπίζονται δύο κύρια προβλήματα: η δυσκολία ή η περιορισμένη έκφραση ενός ξένου γονιδίου και η διαλυτότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά την υπερέκφραση, με τις δομικές, λειτουργικές και βιοχημικές μελέτες των πρωτεϊνών όμως να απαιτούν επαρκή και καλής ποιότητας πρωτεΐνη. Δεν υπάρχει καθολική στρατηγική για την επίλυση αυτού του προβλήματος, αλλά υπάρχουν μερικές μέθοδοι που μπορούν να βελτιώσουν το επίπεδο έκφρασης ή μη έκφρασης ή μειωμένης έκφρασης των ενδιαφερομένων γονιδίων στο *Escherichia coli*. Παράγοντες όπως η δευτεροταγής δομή του mRNA, η έμφυτη ικανότητα μιας πρωτεΐνης να αναδιπλώνεται, η διαλυτότητά της, η επιλεκτική χρήση κωδικονίων, η τοξικότητά της και η ανάγκη της για μετα-μεταφραστική τροποποίηση επηρεάζουν την έκφραση ξένου γονιδίου στο *Escherichia coli*. Τουλάχιστον τέσσερις πρακτικές μπορούν να φανούν χρήσιμες για την αύξηση της έκφρασης και της διαλυτότητας της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης: Αλλαγή του φορέα, αλλαγή της ξενιστικής σειράς και προσθήκη κάποιων χημικών κατά την επαγωγή ή την συν-έκφραση άλλων γονιδίων μπορεί να βοηθήσουν στην κατάλληλη δίπλωση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Αν τα παραπάνω δεν είναι επιτυχή, τότε μπορεί να αλλάξει η αλληλουχία του γονιδίου χωρίς να αλλάξει ο λειτουργικός τομέας. Η αλλαγή της αλληλουχίας του γονιδίου περιλαμβάνει την αφαίρεση της αλληλουχίας κωδικοποίησης του πεπτιδίου σήματος, την βελτιστοποίηση των κωδικονίων σύμφωνα με το *Escherichia coli*, τη διαγραφή υδρόφοβων περιοχών κωδικοποίησης και την πρόληψη της δημιουργίας σταθερής δευτεροταγούς δομής του mRNA μέσω αλλαγής της αλληλουχίας που σχηματίζει δευτεροταγή δομή κ.λπ. Το κύριο θέμα αυτής της ανασκόπησης είναι να περιγράψει διάφορες στρατηγικές για την έκφραση ξένων γονιδίων/πρωτεϊνών στο *Escherichia coli*, με ελάχιστη δυσκολία. Αυτή η ανασκόπηση επισημαίνει τα προβλήματα που συναντήθηκαν και τη γνώση που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια εκτεταμένων έρευνών για την έκφραση και παραγωγή πρωτεϊνών. [4],[101]



Βιοπαραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων-ξενιστών (Πίνακας I). Στη βιο-φαρμακευτική βιομηχανία, κύτταρα θηλαστικών (50%), το βακτήριο *Escherichia coli* (30%) και η μαγιά *Saccharomyces cerevisiae* (18%), γνωστή και ως μαγειρική μαγιά, χρησιμοποιούνται ως κύτταρα ξενιστές για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.^{[5],[6]}

Strain	Protein	Concentration	Production scale
<i>Escherichia coli</i>	Fab	0.1 – 100 mg/L	Shake-flask
<i>Escherichia coli</i>	Nb	1 – 10 mg/L	Shake-flask
<i>Escherichia coli</i>	Nb	10 mg/L	Shake-flask
<i>Escherichia coli</i>	F(ab) ₂	2 g/L	Bioreactor
<i>Escherichia coli</i>	Fab	60 mg/L	Bioreactor 300 L
<i>Bacillus megaterium</i>	scFv	4 mg/L	Bioreactor 3 L
<i>Bacillus subtilis</i>	scFv	9 mg/L	Shake-flask
<i>Bacillus subtilis</i>	scFv	56 mg/L	Bioreactor 3 L
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nb	100 mg/L	Shake-flask
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nb	1 g/L	Bioreactor 10 L
<i>Pichia pastoris</i>	Nb	8 – 18 mg/L	Shake-flask
<i>Pichia pastoris</i>	scFv	1.2 g/L	Shake-flask
<i>Pichia pastoris</i>	Nb	1 g/L	Bioreactor 1500 L
Chinese hamster ovary (CHO)	Nb	100 mg/L	Shake-flask
Chinese hamster ovary (CHO)	mAb	10 g/L	Bioreactor 25 m ³

Πίνακας I - Θραύσματα ανασυνδυασμένων αντισωμάτων που παράγονται σε διαφορετικά κύτταρα-ξενιστές

Τα κύτταρα θηλαστικών όπως το CHO, χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστήματα έκφρασης λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες με χαμηλή ανοσοαπόκριση. Δυστυχώς, το scale-up της διεργασίας είναι δύσκολο καθώς η παραγωγή τους είναι πολύ δαπανηρή, αφού απαιτούν πολύπλοκα και ακριβά μέσα, έχουν χαμηλούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης και ο γενετικός χειρισμός τους είναι πολύπλοκος.^{[7],[15]}

Οι ξενιστές μαγιάς και βακτηρίων ωστόσο χρησιμοποιούνται συχνότερα λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής τους και της ευκολίας της γενετικής τους χειραγώγησης. Οι μαγιές είναι καλύτερες για την παραγωγή σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, εκτελώντας μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, κατά την διάρκεια έκκρισης της πρωτεΐνης από το κύτταρο. Ωστόσο, η υπερέκφραση πρωτεϊνών στο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να προκαλέσει ενδοκυττάρια συσσώρευση και μειωμένες αποδόσεις.^[17]

Από την άλλη τα, θετικά κατά gram, βακτηριακά στελέχη *Bacillus* έχουν την ικανότητα να παράγουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εξωκυτταρικά, γεγονός που επιτρέπει μια οικονομικά αποδοτική διαδικασία καθαρισμού. Ωστόσο, η αποικοδόμηση της μεμβράνης μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από πρωτεάσες, λόγω της αναποτελεσματικής και αργής πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.^[5]



Έτσι το, κατά gram αρνητικό, βακτήριο *Escherichia coli* είναι ο προτιμώμενος ξενιστής για τη μικροβιακή έκφραση συστημάτων για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Το *Escherichia coli* έχει ολόκληρο το γονιδίωμα του μελετημένο και είναι αποδεκτό από τις ρυθμιστικές αρχές φαρμάκων για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.^[18]

Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *Escherichia coli*

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *Escherichia coli* απαιτεί τον ορισμό πολλών βασικών ιδιοτήτων του πλασμιδίου και των συνθηκών καλλιέργειας για την παραγωγή μιας σταθερής πρωτεΐνης εντός του μικροοργανισμού.

Μηχανισμός έκκρισης πρωτεΐνης

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί έκκρισης που χρησιμοποιούνται συχνά στα στελέχη *Escherichia coli* για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης: Τύπος I και Τύπος II. Ο τύπος I μεταφέρει τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σε μια διαδικασία ενός σταδίου διαμέσου των κυτταροπλασματικών και περιπλασματικών μεμβρανών, στο μέσο καλλιέργειας. Ο τύπος II, είναι μια διαδικασία δύο σταδίων έκκρισης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο περίπλασμα του βακτηρίου, όπου στο πρώτο βήμα η πρωτεΐνη συντίθεται πλήρως στο κυτταρόπλασμα και στο δεύτερο βήμα η πρωτεΐνη μεταφέρεται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο περίπλασμα, που βρίσκεται η αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Η χρήση κάθε μηχανισμού έκκρισης εξαρτάται από τον τύπο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που παράγεται και την επιθυμητή μέθοδο καθαρισμού.^{[19],[20]}

Απέκκριση στο μέσο

Η απέκκριση στο μέσο καλλιέργειας (τύπου I) χρησιμοποιείται για τοξίνες ή ένζυμα υψηλού μοριακού βάρους. Παράγει μερικώς διπλωμένα μόρια με χαμηλή μετάφραση πρωτεΐνης. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να παράγει ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έως και 5% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης.^{[19],[20]}

Αν και η έκκριση πρωτεϊνών στο μέσο είναι πλεονέκτημα για την μεταποιητική διαδικασία, έχει αναφερθεί ότι σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή θραύσματα αντισωμάτων γίνονται ασταθή στο διάλυμα, καθιστώντας κρίσιμη την μεταποιητική διαδικασία για την ελαχιστοποίηση της απώλειας προϊόντος.^[21]

Περιπλασματική έκφραση

Η απέκκριση στο περίπλασμα (τύπου II) χρησιμοποιείται συνήθως για ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, όπου οι δισουλφιδικοί δεσμοί μπορούν να σχηματιστούν σωστά στο οξειδωτικό περιβάλλον του περιπλάσματος. Αυτό ο μηχανισμός επιτρέπει αποδόσεις ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από 0,3% έως 3,8% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης.^{[9],[19],[22]}



Η διαπέραση της εξωτερικής μεμβράνης από οσμωτικό σοκ επιτρέπει την ανάκτηση του περιπλαστικού πρωτεΐνες χωρίς τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Μπορεί να συμβεί η απελευθέρωση περιπλασματικών πρωτεϊνών τυχαία λόγω διαφοράς ωσμωτικής πίεσης λόγω συσσώρευσης πρωτεΐνης στο περίπλασμα ή με λύση σε παλαιότερες καλλιέργειες.^{[20],[23]}

Φορείς ένταξης

Η υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *Escherichia coli* μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό σωμάτων εγκλεισμού. Τα σώματα εγκλεισμού (IB) αποτελούνται από συσσωματώματα πρωτεϊνών που έχουν ξεδιπλωθεί ή δεν έχουν διπλωθεί σωστά. Τα IB σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα του μικροοργανισμού λόγω περιορισμένης διαλυτότητας και έλλειψης κατάλληλων αναδιπλωμένων συστημάτων, αν και έχει αναφερθεί ο σχηματισμός των IB και στο περίπλασμα.^{[14],[16],[22]}

Σε βιομηχανική κλίμακα, τα IB μπορούν να απομονωθούν μετά από διάσπαση των κυττάρων και φυγοκέντρηση και να αποθηκευτούν κατεψυγμένα για αρκετούς μήνες. Τα IB απαιτούν επαναδιαλυτοποίηση και αναδίπλωση της πρωτεΐνης στόχου για να επιτευχθεί η απαιτούμενη βιολογική δραστηριότητα, για θεραπευτικές εφαρμογές.^{[6],[16]}

Επαγωγέας πρωτεΐνης

Η έκφραση πρωτεΐνης μπορεί να ενεργοποιηθεί με τη χρήση υποκινητών. Στο *Escherichia coli* ο γνωστός υποκινητής *lac*, είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος για τη ρύθμιση της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.^[24]

Η επαγωγή κάτω από τον υποκινητή *lac* μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας λακτόζη. Εάν η γλυκόζη και η λακτόζη υπάρχουν στο μέσο, ο προαγωγέας *lac* δεν θα επιτρέψει την έκφραση της πρωτεΐνης μέχρι την μείωση της γλυκόζης. Η επαγωγή συνήθως πυροδοτείται με ισοπρότυλο β-D-τιογαλακτοπυρανοσίδη (IPTG), ένα μη υδρολύσιμο ανάλογο της λακτόζης που δεν μεταβολίζεται από το κύτταρο.^{[24],[25],[26],[27],[28],[29]}

Το IPTG χρησιμοποιείται συνήθως σε ρυθμό 1 mmol/L για ενδοκυτταρικές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και μεταξύ 0,01 και 0,1 mmol/L για πρωτεΐνες που απεκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να προκύψει μεταβολική επιβάρυνση όταν χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις επαγωγέα και θα πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την προσπάθεια βελτιστοποίησης της απόδοσης του προϊόντος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.^{[6],[24]}

Η έκφραση μπορεί να ενεργοποιηθεί με άλλου είδους υποκινητές, όπως η αραβινόζη, θερμοκρασιακοί επαγωγείς, η μεθανόλη και η ανυδροτετρακυκλίνη.^{[30],[31],[32],[33],[34],[35],[36]}

Δείκτης επιλογής

Για να αποφευχθεί η παρουσία κυττάρων χωρίς πλασμίδια, η χρήση αντιβιοτικού και το ανθεκτικό γονίδιο κωδικοποιούνται στο πλασμίδιο. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη



χρησιμοποιείται πιο συχνά στα *Escherichia coli* στελέχη. Άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε στελέχη *Escherichia coli* ως δείκτες επιλογής είναι η καναμυκίνη και η χλωραμφενικόλη.^{[45],[47]}

Καθαρισμός

Ο καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για βιοφαρμακευτικές εφαρμογές περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ακαθαρσιών, για παράδειγμα συστατικά του μέσου καλλιέργειας και του ξενιστή, παραλλαγές του προϊόντος και ισόμορφες πρωτεΐνες.^[48]

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν με μια ετικέτα συγγένειας, η οποία θα επιτρέψει την ανάκτηση της πρωτεΐνης σε μια διαδικασία ενός σταδίου. Η χρήση της ετικέτας εξαισιδίνης (His6-tag) χρησιμοποιείται ευρέως σε πρωτεΐνες που παράγονται στο *Escherichia coli*. Οι πρωτεΐνες με επισήμανση His6 μπορούν εύκολα να καθαριστούν με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) χρησιμοποιώντας μεταλλικά ιόντα Cu^{2+} , Ni^{2+} ή Zn^{2+} .^{[29],[49]}

Για να αυξηθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται εταίροι συνένωσης, όπως: πρωτεΐνη σύνδεσης μαλτόζης (MBP) και μικροτροποποιητής που συσχετιζόμενος με την ουβικιτίνη (SUMO).^{[38],[43],[44],[50],[51]}

Μέσα καλλιέργειας

Η καλλιέργεια του *Escherichia coli* για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών απαιτεί αρκετά θρεπτικά συστατικά για τη διατήρηση της κυτταρικής ανάπτυξης, όπως πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου, απαραίτητα άλατα και μέταλλα για τη βέλτιστη κυτταρική πυκνότητα. Τυπικά, υπάρχουν τρεις τύποι μέσων καλλιέργειας: πλούσιο μέσο, ημικαθορισμένο μέσο και ελάχιστα καθορισμένο μέσο.^[14]

Το Lysogeny Broth (LB) είναι ένα πλούσιο μέσο που χρησιμοποιείται συχνά σε πειράματα εργαστηριακής κλίμακας. Είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και βέλτιστο για την ανάπτυξη στην πρώιμη λογαριθμική φάση, αλλά της μικρής ποσότητας υδατανθράκων που περιέχει, λαμβάνεται χαμηλή κυτταρική πυκνότητα.^{[29],[33],[44],[52],[53],[54],[55]}

Για να διατηρηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού πέρα από τη λογαριθμική φάση και να ληφθούν υψηλές κυτταρικές πυκνότητες, άλλα είδη μέσων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη κυττάρων που φέρουν πλασμίδια, όπως Terrific Broth (TB), μέσα κυκλικής ανάπτυξης και μέσο 2xYT.^{[51],[56],[57],[58],[59],[60],[61],[62]}

Τα ημι-καθορισμένα μέσα περιέχουν ένα μείγμα από πλούσια συστατικά (εκχύλισμα μαγιάς, πεπτόνη, τρυπτόνη) και χημικές ουσίες γνωστών ιδιοτήτων και συγκεντρώσεων. Πολύπλοκα και ημι-καθορισμένα μέσα χρησιμοποιούνται σε παραγωγικές διαδικασίες μεγάλης κλίμακας για την παραγωγή διαφορετικών αντισωμάτων.^{[28],[29],[34],[63],[64],[65],[66],[67]}



Το μειονέκτημα της χρήσης πολύπλοκων και ημι-καθορισμένων μέσων έγκειται στην παραλλαγή που οφείλεται στη χρήση πολύπλοκων συστατικών από παρτίδα σε παρτίδα. Σε αυτή την περίπτωση, η χρήση ελάχιστα καθορισμένου μέσου γίνεται μία εναλλακτική λύση.^[14]

Το καθορισμένο ελάχιστο μέσο αποτελείται από γνωστές χημικές ουσίες. Το μέσο M9 είναι ένα απλά καθορισμένο μέσο που χρησιμοποιείται σε πειράματα εργαστηριακής κλίμακας, αλλά αποδίδει χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας. Το μέσο Riesenbergl είναι πιο πλούσιο σε πηγή αζώτου και αποδίδει υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.^{[68],[69],[70],[71],[72]}

Η βελτιστοποίηση των καθορισμένων συστατικών του μέσου, απαιτείται για να περιέχονται όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τον μικροοργανισμό, στις βέλτιστες συγκεντρώσεις, για την αποφυγή της αναστολής της ανάπτυξης. Οι πηγές αζώτου, τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία είναι απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη και υπάρχουν στα περισσότερα ελάχιστα καθορισμένα μέσα.^{[14],[27],[30],[73],[74],[75],[76],[77]}

Συνθήκες καλλιέργειας

Για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη παραγωγή εκτός από την επιλογή του μέσου καλλιέργειας, οι φυσικές παράμετροι, όπως αερισμός, pH και θερμοκρασία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται σχεδόν εξ ολοκλήρου υπό αερισμένες συνθήκες. Σε μικρή κλίμακα, οι φιάλες ανακίνησης ακανόνιστου σχήματος (baffled shake flasks) εξασφαλίζουν επάρκεια οξυγόνου και οι ταχύτητες ανάδευσης κυμαίνονται από 100 έως 350 rpm. Για το *Escherichia coli*, η έκφραση πρωτεΐνης γίνεται σε pH περίπου ίσο με 7, που μπορεί να διακυμανθεί από 6,5 έως 7,5.^{[6],[29],[78]}

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το *Escherichia coli* είναι 37°C. Για έκφραση πρωτεΐνης, αυτή η θερμοκρασία θα μπορούσε να ευνοήσει τη συσσώρευση πρωτεϊνών λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων τόσο διαμοριακών όσο και ενδομοριακών. Η μείωση της θερμοκρασίας επαγωγής στους 25°C – 30°C θα μπορούσε να μειώσει την πρωτεολυτική αποικοδόμηση και να βελτιωθεί η σταθερότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Βελτιωμένη αναδίπλωση επιτυγχάνεται επίσης σε χαμηλές θερμοκρασίες, αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητα και την ποιότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.^{[6],[14],[18],[24],[79],[80]}

Ο βέλτιστος συνδυασμός θερμοκρασίας έκφρασης και χρόνου επαγωγής εξακολουθεί να υπολογίζεται ωστόσο με δοκιμή και σφάλμα.^[6]

Παραγωγή μεγάλης κλίμακας

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βιομηχανική κλίμακα περιλαμβάνει όχι μόνο εργαστηριακές γνώσεις και καλλιέργειες πιλοτικής κλίμακας, αλλά και γνώση του καθαρισμού και της μεταποιητικής διεργασίας, που εμπλέκονται στην κατεργασία των πολύπλοκων πρωτεϊνών.



Στη βιοφαρμακευτική βιομηχανία, αποδόσεις 2 – 6 g/L μονοκλωνικών αντισωμάτων για τη θεραπεία του καρκίνου και φλεγμονωδών ασθενειών επιτυγχάνονται συνήθως σε καλλιέργειες βιοαντιδραστήρα 25 m³ με κύτταρα θηλαστικών. Έως και 10 g/L αντισωμάτων VHH μπορούν να παραχθούν σε βιοαντιδραστήρες 1,5 m³ με *Pichia pastoris*, που χρησιμοποιούνται για ασθένειες των οστών.^{[7],[9],[17]}

Διαδικασίες καλλιέργειας

Οι αντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου χρησιμοποιούνται για την δημιουργία καλλιεργείων αυξημένης κυτταρικής πυκνότητας (HCDC, >40 g cdw/L), διατηρώντας τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και την επίτευξη υψηλής πρωτεϊνικής παραγωγής. Η ανάπτυξη των κυττάρων μπορεί να είναι βελτιστοποιηθεί με τον έλεγχο των πηγών άνθρακα και των φυσικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, το pH και το διαλυμένο οξυγόνο (DO).^{[13],[16]}

Για να επιτευχθούν οι HCDC, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές στρατηγικές σίτισης: έλεγχος pH-stat, έλεγχος DO-stat, σταθερή σίτιση και ελεγχόμενη σίτιση με ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.^{[71],[72],[81],[82],[83],[84],[85]}

Στον έλεγχο pH-stat, η τροφοδοσία του υποστρώματος συνδέεται με την τροφοδοσία αμμωνίας που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του pH και ενεργοποιείται ταυτόχρονα. Στον έλεγχο DO-stat, το DO χρησιμοποιείται ως παράμετρος για τον έλεγχο της τροφοδοσίας του υποστρώματος και την διατήρηση αναερόβιων συνθηκών, διατηρώντας το DO μεγαλύτερο ή ίσο από την επιθυμητή τιμή.^[13]

Η τροφοδοσία του υποστρώματος μπορεί να διατηρηθεί σταθερή ή να είναι εκθετική για να επιβληθεί ένας σταθερός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Ιδανικά, με μια σταθερή τροφοδοσία, η συνολική βιομάζα θα αυξάνεται γραμμικά και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης θα μειώνεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ με εκθετική τροφοδοσία υποστρώματος οι υψηλές παραγωγικότητες μπορούν να επιτευχθούν σε λιγότερο χρόνο. Ωστόσο, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στις καλλιέργειες σε fed-batch αντιδραστήρες, θα πρέπει να διατηρείται χαμηλότερα από ένα συγκεκριμένο κρίσιμο ρυθμό ανάπτυξης για να αποφευχθεί η παραγωγή ανασταλτικών υποπροϊόντων, όπως το οξικό οξύ, στην περίπτωση των καλλιεργείων *Escherichia coli*.^{[13],[14]}

Σε αεριζόμενες καλλιέργειες, επιπλέον του τρόπου τροφοδοσίας, η μεταφορά οξυγόνου από το μέσο καλλιέργειας στον μικροοργανισμό παίζει κρίσιμο ρόλο. Η μέγιστη βιομάζα που μπορεί να παραχθεί στις καλλιέργειες εξαρτάται από μία βέλτιστη μεταφορά οξυγόνου στον βιοαντιδραστήρα.

Η κλιμάκωση των βιοδιαδικασιών ξεκινά από ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας (1 – 20 L) και αυξάνεται σε αναλογία 1:10 σε πιλοτική κλίμακα (30 – 500 L) και στη συνέχεια σε βιομηχανική κλίμακα (>1000 L), βελτιστοποιώντας τις συνθήκες σε κάθε κλίμακα. Το κοινό κριτήριο για τις βιοδιαδικασίες κλιμάκωσης είναι να διατηρούνται σταθερές ορισμένες παράμετροι. Οι παράμετροι αυτές είναι η ταχύτητα του άκρου της πτερωτής (Vtip), ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου (OUR), η ογκομετρικός συντελεστής μεταφοράς οξυγόνου (kLa), η ισχύς εισόδου ανά μονάδα



όγκου (P/V) και ο αριθμός Reynolds της περωτής. Για τις ζυμώσεις *Escherichia coli*, το καλύτερο κριτήριο είναι να διατηρείται σταθερή η ογκομετρική μεταφορά μάζας ο συντελεστής (kLa) ή ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου.^{[6],[86]}

Διαδικασία μεταποίησης

Η μεταγενέστερη επεξεργασία αντιπροσωπεύει το 50% έως 90% του συνολικού κόστους επεξεργασίας και παίζει μεγάλο ρόλο για την οικονομική βιωσιμότητα ορισμένων διαδικασιών παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Για φαρμακευτικών προϊόντων, η ανάπτυξη διεργασιών παραγωγής και μεταποίησης διεξάγεται γενικά εν παραλλήλω λόγω των περιορισμένων χρονοδιαγραμμάτων της αγοράς.^{[13],[16]}

Η μεταποιητική διαδικασία περιλαμβάνει κυρίως τρία στάδια: ανάκτηση κυττάρων, ανάκτηση πρωτεϊνών και αναδίπλωσή τους, και καθαρισμό. Κάθε διαδικασία εξαρτάται από τη φύση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, τον ξενιστή και τον μηχανισμό παραγωγής και επηρεάζουν την απόδοση και την καθαρότητα.^[63]

Κατά την ανάκτηση των κυττάρων, τα κύτταρα διαχωρίζονται από το υγρό ζύμωσης με φυγοκέντρηση, διήθηση υπό κενό, διήθηση εφαπτομενικής ροής ή μικροδιήθηση.^[9]

Γενικά, σε βιομηχανική κλίμακα, οι πρωτεΐνες παράγονται, είτε στο περίπλασμα του μικροοργανισμού, είτε ως φορείς ένταξης. Το οσμωτικό σοκ χρησιμοποιείται για την ανάκτηση περιπλασματικών πρωτεϊνών και η κυτταρική διάσπαση μέσω εφαρμογής υψηλής πίεσης και ο μύλος σφαιριδίων χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση των σωμάτων εγκλεισμού.^{[6],[16]}

Τα σώματα εγκλεισμού πρέπει να διαλυτοποιηθούν και να αναδιπλωθούν για να ληφθούν οι βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες για φαρμακευτικές εφαρμογές. Οι μετουσιωτικοί και αναγωγικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται συνήθως για τη διαλυτοποίηση των φορέων ένταξης. Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών στο IB μπορεί να ξεκινήσει με οξυγόνο ή με μείγμα αναγωγικών και οξειδωτικών παραγόντων. Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης δεν χρειάζεται για τις περιπλασματικές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.^{[6],[16],[20],[63]}

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι η μέθοδος εκλογής για τη λήψη ανασυνδυασμένων αντισωμάτων υψηλής καθαρότητας. Οι ετικέτες και οι εταίροι συνένωσης πρέπει να εξαλειφθούν από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με ενζυματική ή χημική διάσπαση.^{[21],[29]}

Περαιτέρω καθαρισμός γίνεται με στίλβωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, όπου αφαιρούνται ίχνη ακαθαρσιών, όπως πρωτεΐνες του ξενιστή και παράγοντες διαλυτοποίησης και αναδίπλωσης. Τελικά, ο καθαρισμός του ιού και η φαρμακευτική σύνθεση εξασφαλίζει μακροχρόνια σταθερότητα και διατηρεί τη βιοδραστικότητα της πρωτεΐνης.^[9]

Αναδυόμενες φαρμακευτικές εφαρμογές ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται για τη βιοφαρμακευτική διαδικασία έχουν πολλαπλές εφαρμογές. Στην προκειμένη έρευνά συναντούνται μερικές αναδυόμενες πρωτεΐνες που προέρχονται από δηλητήριο που παράγονται στο *Escherichia coli*, με λίγες από αυτές να παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.



Μερικές ανασυνδυασμένες τοξίνες και ένζυμα παράγονται σε φιάλες ανακίνησης μέσω του περιπλάσματος του κυττάρου ή συνηθέστερα ως σώματα εγκλεισμού με υψηλή αποδόση.^{[37],[38],[39],[54],[87],[88],[89]}

Οι τοξίνες από το δηλητήριο του φιδιού έχουν διερευνηθεί για τη δημιουργία νέων αντιπηκτικών παραγόντων ή για την υποβάθμιση ορισμένων τοξινών για τη θεραπεία καρκινικών όγκων.^{[46],[91]}

Η παραγωγή αντιδότην και αντιαλλεργικών από τις τοξίνες του δηλητηρίου έχει επίσης διερευνηθεί για τη θεραπεία τσιμπημάτων φιδιών, μέλισσας και σφήκας.^{[39],[52],[54]}

Strain	Protein	Concentration, mg/L	Application
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	7 kDa cardiotoxin of <i>Naja naja atra</i> snake	40	Hemolytic activity
<i>E. coli</i> BL21	14 kDa toxin of <i>Crotalus adamanteus</i> snake	1	Antitumor
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	14 kDa toxin of <i>Bothrops jararacussu</i> snake	5	Membrane-damaging activity
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	27 kDa enzyme of <i>Gloydius shedaoensis</i> snake	N. A.	Anticoagulating agent
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	30 kDa enzyme of <i>Gloydius halys</i> Pallas snake	46	Anticoagulating agent
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	48 kDa enzyme of <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i> snake	16	Anticoagulating agent
<i>E. coli</i> BL21	20 kDa enzyme of <i>Deinagkistrodon acutus</i> snake	57	Snake antivenom
<i>E. coli</i> BL21	25 kDa toxin of <i>Vespula vulgaris</i> wasp	15	Wasp antivenom
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	55 kDa enzyme of <i>Apis mellifera</i> bee	50	Bee antivenom
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	24 kDa enzyme of <i>Loxosceles intermedia</i> spider	2	Anticoagulating agent
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	4.7 kDa toxin of <i>Conus marmoreus</i> snail	5.9	Analgesic

Πίνακας II– Φαρμακευτικές χρήσεις τοξίνο-ανασταλτικών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. (N.A.: μη διαθέσιμο)

Βιοπαραγωγή τοξινών σκορπιού και αντιδότην

Οι ανασυνδυασμένες τοξίνες και τα τοξίνο-ανασταλτικά αντισώματα που παράγονται σε μικροβιακούς ξενιστές δίνουν νέες δυνατότητες στη βιοφαρμακευτική βιομηχανία. Παρέχοντας καλύτερη βιοδραστικότητα, υψηλότερη αποτελεσματικότητα ή εναλλακτική θεραπευτική



διαδρομή, αυτά τα νέα φαρμακευτικά προϊόντα συμβάλλουν στα φαρμακευτικά σκευάσματα επόμενης γενιάς.

Δηλητήριο σκορπιού

Η παραγωγή δηλητηρίου σκορπιού μέσω της συμβατικής οδού, απαιτεί είτε πολύ χρόνο είτε μεγάλες ποσότητες σκορπιών να απομακρυνθούν από το οικοσύστημά τους για να ληφθούν υψηλές ποσότητες δηλητηρίου.^{[10],[12]}

Οι τοξίνες του σκορπιού που χρησιμοποιούνται για σκοπούς ανοσοποίησης μπορούν να παραχθούν στο *Escherichia coli* με ελάχιστο έως καθόλου επίδραση της τοξικότητας στο ανοσοποιημένο ζώο (Πίνακας III).

Strain	Protein	Application	Concentration, mg/L
<i>E. coli</i> DH5α	4 kDa toxin of <i>Androctonus mauretanicus</i>	K-channel related applications	0.3
<i>E. coli</i> DH5α	Toxin of <i>Buthus eupeus</i>	Antimicrobial	N. A.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	22 kDa toxin of <i>Buthus martensii</i> Karsch	Na-channel related diseases	1.6
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	80 kDa toxin of <i>Buthus martensii</i> Karsch	Anti-tumor and analgesic	2.5
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	7 kDa SUMO-fusion toxin of <i>Buthus martensii</i> Karsch	Anti-tumor and analgesic	24
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Toxin of <i>Buthus martensii</i> Karsch	Analgesic and antimicrobial	4.2
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	27 kDa toxin of <i>Buthus martensii</i> Karsch	Analgesic	5
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	19 kDa enzyme of <i>Mesobuthus tamulus</i>	Anti-inflammatory	2.8
<i>E. coli</i> AD494 (DE3)	7.5 kDa β-toxin Cssl of <i>Centruroides suffusus suffusus</i>	Research tool	2
<i>E. coli</i> KRX	11 kDa peptide of <i>Hottentotta judaicus</i>	Cardiac pharmaceutical	4.5
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	10 kDa β-toxin of <i>Hottentotta judaicus</i>	Paralysis pharmaceutical	0.3
<i>E. coli</i> DH5α	6.5 kDa toxin of <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	Paralysis pharmaceutical	0.5
<i>E. coli</i> AD494 (DE3)	7.7 kDa toxin of <i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>	Na-channel related diseases	1.5
<i>E. coli</i> XL1-Blue	30 kDa toxin of <i>Tityus discrepans</i>	Anti-cancer	3.5

Πίνακας III– Στελέχη που παράγουν τοξίνες για αντίδοτα στο δηλητήριο του σκορπιού (N.A.: μη διαθέσιμο)



Οι περισσότερες από τις τοξίνες παράγονται στο *Escherichia coli* με μικρή τροποποίηση, συνήθως με την προσθήκη της His6-tag για καθαρισμό. Ορισμένες μελέτες ανέλυσαν τη δραστηριότητα των εκφραζόμενων τοξινών για να προσδιορίσουν την ομοιότητά τους με την φυσική τοξίνη με θετικά αποτελέσματα, αλλά χωρίς καθορισμένη εφαρμογή.^{[47],[59],[90]}

Η ανασυνδυασμένη παραγωγή των τοξινών του σκορπιού *Buthus martensii* Karsch (κινεζικός κόκκινος σκορπιός), έχει μελετηθεί ευρέως για την εφαρμογή της ως αναλγητική και αντικαρκινική βιοδραστικότητα. Διαπιστώθηκε ότι η συνένωση της τοξίνης με μια ετικέτα SUMO αύξησε την παραγωγικότητα της, λαμβάνοντας έως 40% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης.^{[40],[41],[42],[43],[44],[90]}

Αντίδοτο στο δηλητήριο σκορπιού

Η παραγωγή αντιδότην με τις σημερινές τεχνικές, μπορεί να διαρκέσει έως 15 μήνες χωρίς να ληφθούν υπόψη τα βήματα καθαρισμού που απαιτούνται για τη λήψη ενός λειτουργικού φαρμάκου.

Η παραγωγή πλήρως ωριμασμένων αντισωμάτων σκορπιού, μπορεί να είναι δυνατή με την κωδικοποίηση της έκφρασης των αντισωμάτων στο *Escherichia coli* και σίγουρα αποτελεί λιγότερο χρονοβόρα διαδικασία.

Η παραγωγή όλων των αντισωμάτων σκορπιού που ερευνήθηκε μέχρι σήμερα είναι σε εργαστηριακή κλίμακα με πλούσιο μέσο καλλιέργειας, με μόνο μία μελέτη καλλιέργειών σε βιοαντιδραστήρα με ελεγχόμενο μέσο. Η έκφραση στο περίπλασμα του κυττάρου φαίνεται να είναι το καλύτερο για την παραγωγή νανοσωματιδίων, για να επιτευχθούν ενεργά βιομόρια. Η παραγωγή αντισωμάτων αδρανοποίησης του δηλητηρίου δεν έχει μελετηθεί στον βιοαντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να αυξηθούν οι παραγωγικές αποδόσεις στον ξενιστή *Escherichia coli*.

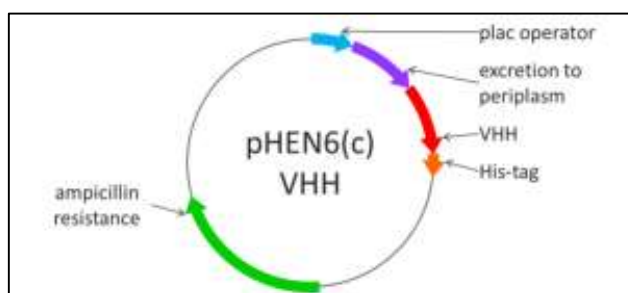
Πειραματική Διαδικασία^[1]

Βακτηριακά στελέχη

Στα πειράματα, τρία παράγωγα του στελέχους *Escherichia coli* K12, το *Escherichia coli* WK6, χρησιμοποιήθηκαν:

- *Escherichia coli* WK6 άγριου τύπου: στέλεχος WK6 άγριου τύπου *Escherichia coli* K12 {Δ(lac-pro), galE, strA, nal; F' lacIq ZΔM15, pro+}.
- *Escherichia coli* WK6/pHEN6/NbF12-10: ένας κλώνος που διαθέτει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pHEN6, με τμήμα cDNA που κωδικοποιεί το θραύσμα του διειδικού VHHF12-VHH10 του νανοσωματιδίου NbF12-10 και προέρχεται από τον τομέα VH μιας τράπεζας λεμφοκυττάρων.^[92]
- *Escherichia coli* WK6/pHEN6/CH10-12: ένας κλώνος που διαθέτει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pHEN6, με τμήμα cDNA που κωδικοποιεί την ανθρωποποιημένη μορφή του διειδικού VHH10-VHH12, του νανοσωματιδίου CH10-12 και προέρχεται ομοίως από τράπεζα λεμφοκυττάρων.^[93]

Τα στελέχη ελήφθησαν από το Therapeutic Molecules and Venom Laboratory του Ινστιτούτου Pasteur στην Τυνησία (Laboratoire de Venins et Biomolécules Thérapeutiques, IPT). Τα ανασυνδυασμένα στελέχη παράγουν το νανοσωματίδιο NbF12-10 και τη χιμαιρική μορφή του, το νανοσωματίδιο CH10-12. Το στέλεχος άγριου τύπου, WK6, χρησιμοποιείται ως αναφορά στην κινητική ανάλυση της παραγωγής βιομάζας. Για το στέλεχος NbF12-10 χρησιμοποιήθηκαν δύο κλώνοι, που ονομάστηκαν NbF12-10 NN και NbF12-10 NO. Η διαφορά μεταξύ των κλώνων είναι η ημερομηνία αναμόρφωσης, που ήταν 24/02/2015 και 15/03/2016 για το NO και το NN, αντίστοιχα. Η δεύτερη αναμόρφωση έλαβε χώρα, λόγω της υποψίας απώλειας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στο στέλεχος NbF12-10 NO. Ο φορέας pHEN6 που προέρχεται από το pBR322 (Εικόνα) χρησιμοποιεί τον επαγωγέα lac για να επάγει την παραγωγή των νανοσωματιδίων στον περιπλασματικό χώρο των βακτηρίων σε διαλυτή μορφή και με ετικέτα εξαστιδίνης (His6). Ο φορέας pHEN6 δίνει επίσης στο στέλεχος την αντίσταση σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη).





Εικόνα 1 - Σχηματική αναπαράσταση του φορέα pHEN6 που χρησιμοποιείται στα στελέχη *Escherichia coli* WK6

Μέσα Καλλιέργειας

Εμβολιασμός

Το εμβόλιο(μικροβιακό μείγμα) παρασκευάστηκε σε στερεή φάση, πρώτα σε αγάρ LB και στη συνέχεια σε υγρή φάση σε ζωμό LB. Οι ενώσεις του Πίνακα IV, με εξαίρεση την αμπικιλίνη, διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό και σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά. Η αμπικιλίνη προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL στα τρυβλία αγάρ LB πριν από την έκχυση και στον ζωμό LB λίγο πριν τον εμβολιασμό.

Compound	Concentration (g/L)	
	LB agar	LB liquid
Yeast extract	5	5
Tryptone or Peptone	10	10
NaCl	10	10
Agar	15	0
Ampicillin (100 g/L)	0.1	0.1

Πίνακας IV - Σύνθεση του μέσου εμβολιασμού

Ένα κρυσταλλίδιο αποψύχθηκε και, χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο άκρο, έγιναν ραβδώσεις σε μια πλάκα αγάρ LB με σταγόνες κρυστόκ. Οι πλάκες επωάστηκαν στους 37°C για 12 ώρες. Μια φιάλη ανακίνησης με διάφραγμα 100 mL που περιέχει 15 mL ζωμού LB εμβολιάστηκαν με μία μόνο παρτίδα της πλάκας αγάρ LB και ύστερα, οι πλάκες επωάστηκαν στους 37°C και 120 rpm για 12 ώρες σε αναδευόμενο επωαστήρα.

Πλούσιο μέσο (Terrific Broth)

Το Terrific Broth (TB) χρησιμοποιήθηκε ως το πλούσιο ή πολύπλοκο μέσο. Το TB παρασκευάστηκε ειδικά για τα ανασυνδυασμένα στελέχη *Escherichia coli*, επιτρέποντας υψηλή απόδοση πλασμιδίων και επέκταση της φάσης ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η τρυπτόνη και το εκχύλισμα μαγιάς ήταν η πηγή των θρεπτικών συστατικών, τα φωσφορικά άλατα καλίου έδρασαν ως ρυθμιστικό του pH και η γλυκερόλη προστέθηκε, ως πρόσθετη πηγή άνθρακα.



Compound	Quantity
K_2HPO_4	2.3 g/L
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	16.4 g/L
Tryptone or Peptone	12 g/L
Yeast extract	24 g/L
Glycerol (100%)	4 mL/L

Πίνακας V – Συστατικά πλουσίου μέσου

Τα ξηρά συστατικά διαλύθηκαν σε 900 mL απεσταγμένου νερού. Προστέθηκε γλυκερόλη και απεσταγμένο νερό έως τελικού όγκου, 1 L. Το διάλυμα αποστειρώθηκε σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά.^[94]

Καθορισμένο μέσο (Minimal Medium)

Το καθορισμένο μέσο καλλιέργειας (MM) παράχθηκε ειδικά για την καλλιέργεια του *Escherichia coli* μέσω του TBI και μπορούσαν έτσι να ληφθούν, έως και 30 g/L βιομάζας. Το MM πρέπει να παρασκευασθεί σε διάφορα βήματα για να αποφευχθεί η καθίζηση ανόργανων ιόντων.^[95]

Ιχνοστοιχεία

Κάθε ιχνοστοιχείο παρασκευάζεται σε πυκνό διάλυμα (Πίνακας VI). Το πυκνό διάλυμα αποστειρώθηκε με ένα φίλτρο 0,22 μm (Sartorius) σε ένα πτυχωμένο φιαλίδιο πενικιλίνης των 100 mL, προηγουμένως αυτοκλεισμένο.

Compound	Concentration (g/L)
$MnSO_4 \cdot H_2O$	20
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	4
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	8
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	2
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4
H_3BO_3	1

Πίνακας VI – Σύνθεση των ιχνοστοιχείων

Άλατα Β

Τα άλατα Β (Πίνακας VII) παρασκευάστηκαν ως πυκνά διαλύματα, εκτός από το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) το οποίο ήταν αραιότερο. Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με ένα φίλτρο 0,22 μm



(Sartorius) σε ένα πτυχωμένο φιαλίδιο πενικιλίνης των 100 mL, που είχε προηγουμένως τοποθετηθεί σε αυτόκλειστο.^[95]

Το pH του διαλύματος θεικού σιδήρου ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ρυθμίστηκε στο 2 με HCl, πριν από την αποστείρωση.

Compound	Concentration (g/L)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 2)	40

Πίνακας VII – Σύνθεση των ιχνοστοιχείων

Θειαμίνη (Βιταμίνη B1)

Ένα μητρικό διάλυμα 10 g/L θειαμίνης ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}^+$, βιταμίνη B1) αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,22 μm (Sartorius) σε ένα φιαλίδιο πενικιλίνης 100 mL πτυχωμένο και προηγουμένως σε αυτόκλειστο. Το διάλυμα θειαμίνης αποθηκεύτηκε, προστατευμένο από το φως, στους 4°C.

Άλατα A

Τα άλατα A (Πίνακας VIII) διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό, σε περίπου 75% του τελικού επιθυμητού όγκου.

Compound	Concentration (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	8
K_2HPO_4	8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.046
NH_4Cl	0.13
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.75

Πίνακας VIII – Σύνθεση των αλάτων A

Ένα διάλυμα 100 g/L κιτρικού οξέος παρασκευάστηκε σε όγκο ισοδύναμο με τα 3/50 του τελικού επιθυμητού όγκου. Τα ιχνοστοιχεία και τα άλατα B προστέθηκαν σε συγκέντρωση 1 mL ανά λίτρο τελικού όγκου, με τη σειρά που φαίνεται στον Πίνακα II-3 και στον Πίνακα II-4. Ενώ, προστέθηκε το θειικό μαγνήσιο σε συγκέντρωση 2 mL ανά λίτρο τελικού όγκου.

Το κιτρικό διάλυμα προστέθηκε στα άλατα A και το pH ρυθμίστηκε στο 6,8 με διάλυμα αμμωνίας. Το διάλυμα έφτασε στον τελικό επιθυμητό όγκο και αποστειρώθηκε σε αυτόκλειστο για 20 λεπτά στους 121°C. Η θειαμίνη προστέθηκε σε συγκέντρωση 1 mL ανά λίτρο πριν από τον εμβολιασμό.



Διαλύματα γλυκόζης

Η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα για τις καλλιέργειες σε καθορισμένο μέσο (MM) σε φιάλη ανακίνησης και στις καλλιέργειες στον βιοαντιδραστήρα. Ένα διάλυμα γλυκόζης στα 300 g/L παρασκευάστηκε με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά. Η συγκέντρωση του διαλύματος προσδιορίστηκε, μετά την αποστείρωση σε αυτόκλειστο, με ενζυματικό αναλυτή και HPLC. Η πυκνότητα του διαλύματος μετρήθηκε με ένα πυκνόμετρο (DE40 densitometer, Mettler Toledo) και χρησιμοποιείται για τους υπολογισμούς μάζας.^[96]

Διάλυμα αμπικιλίνης

Λόγω της αντοχής τους στα αντιβιοτικά, οι καλλιέργειες ανασυνδυασμένων στελεχών συμπληρώθηκαν με αμπικιλίνη. Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 100 g/L αμπικιλίνης με 70% αιθανόλη και φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0,22 μm υπό στρωτή ροή. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε παρτίδες του 1 mL στους -20°C.

Διάλυμα IPTG

Η ισοπρόπυλο β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη (IPTG) χρησιμοποιήθηκε ως ο επαγωγέας του οπερονίου lac για την έκφραση των περιπλασματικών πρωτεϊνών. Ένα διάλυμα 1 mol/L IPTG παρασκευάστηκε με απεσταγμένο νερό και φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0,22 μm (Sartorius) υπό στρωτή ροή. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε παρτίδες των 2 mL στους -20°C.

Καλλιέργειες σε φιάλη (Batch mode)

Οι καλλιέργειες σε φιάλη ανακίνησης πραγματοποιήθηκαν, είτε με πλούσιο μέσο (TB), είτε με καθορισμένο μέσο (MM). Η παραγωγή βιομάζας καταγράφηκε κατά την κυτταρική ανάπτυξη και κατά την έκφραση πρωτεΐνης. Αντίθετα, η παραγωγή πρωτεΐνης ελέγχθηκε στο τέλος της καλλιέργειας.

Το πλούσιο μέσο, ενισχύθηκε με 1 g/L γλυκόζης και το καθορισμένο μέσο, με 10 g/L. Οι καλλιέργειες με τα ανασυνδυασμένα στελέχη συμπληρώθηκαν με 100 μg/mL αμπικιλίνης. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες ανακίνησης με διάφραγμα όγκου 2 L που περιείχαν 330 mL μέσου καλλιέργειας.

Παραγωγή βιομάζας

Οι καλλιέργειες σε TB και MM εμβολιάστηκαν με 1 mL μικροβιακού διαλύματος και πραγματοποιήθηκαν στους 37°C και στις 120 rpm σε θερμοκοιτίδα ανακίνησης (Infors HT). Οπτική πυκνότητα, ξηρό βάρος κυττάρων βιομάζας και υπολεμματική γλυκόζη παρακολούθηθηκαν μέχρι να επιτευχθεί η στατική φάση.



Παραγωγή πρωτεΐνης

Οι καλλιέργειες σε TB και MM εμβολιάστηκαν με 1 mL εμβολιασμού και διατηρήθηκαν στους 37°C και στις 120 rpm σε θερμοκοιτίδα ανακίνησης (Infors HT). Η έκφραση πρωτεΐνης προκλήθηκε με προσθήκη 1 mM IPTG όταν το οι καλλιέργειες έφτασαν τις 0,6 AU σε κυψελίδα 10 mm (ή 0,12 AU σε κυψελίδα 2 mm) σε TB. Η θερμοκρασία τροποποιήθηκε στους 28°C με βηματική επιβολή και οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν υπό ανάδευση, για 12 έως 16 ώρες.

Καλλιέργειες βιοαντιδραστήρα (Fed batch mode)

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε έναν πλήρως εξοπλισμένο βιοαντιδραστήρα και ακολούθησαν τρεις φάσεις: κυτταρική ανάπτυξη σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, κυτταρική ανάπτυξη σε αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου και κυτταρική ανάπτυξη σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με επαγωγή. Οι δύο πρώτες φάσεις, διεξήχθησαν στους 37°C, ενώ η επαγωγή πραγματοποιήθηκε σε μια περιοχή από 28°C έως 37°C, ανάλογα με το πείραμα.

Η διαλείπουσα φάση, ξεκίνησε με 1,5 L ελεγχόμενου μέσου, με 7,5 έως 12,5 g/L γλυκόζης και ο εμβολιασμός του αντιδραστήρα έγινε με 100 έως 200 mL μικροβιακού μείγματος σε ελεγχόμενο μέσο, με 5 g/L γλυκόζης. Κατά την εξάντληση του γλυκόζης, ξεκίνησε μια εκθετική τροφοδοσία, επιβάλλοντας ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $\approx 0,38 \text{ h}^{-1}$, που είναι περίπου το ήμισυ του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Escherichia coli* WK6 όταν καλλιεργείται σε πλούσιο μέσο.

Η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ξεκίνησε όταν προστέθηκε IPTG στην καλλιέργεια, κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης τροφοδοσίας. Η έκφραση πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη 1 mM IPTG όταν η βιομάζα έφτασε στα 21 με 30 g cdw/L (Εικόνα 2). Κατά την επαγωγή, η θερμοκρασία τροποποιήθηκε (28 έως 37°C) και η τροφοδοσία διαλύματος ορίστηκε στα 4,5 g/h γλυκόζης, που επέβαλε ως αποτέλεσμα ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μικρότερο από $0,05 \text{ h}^{-1}$.

Διάλυμα τροφοδοσίας βιοαντιδραστήρα

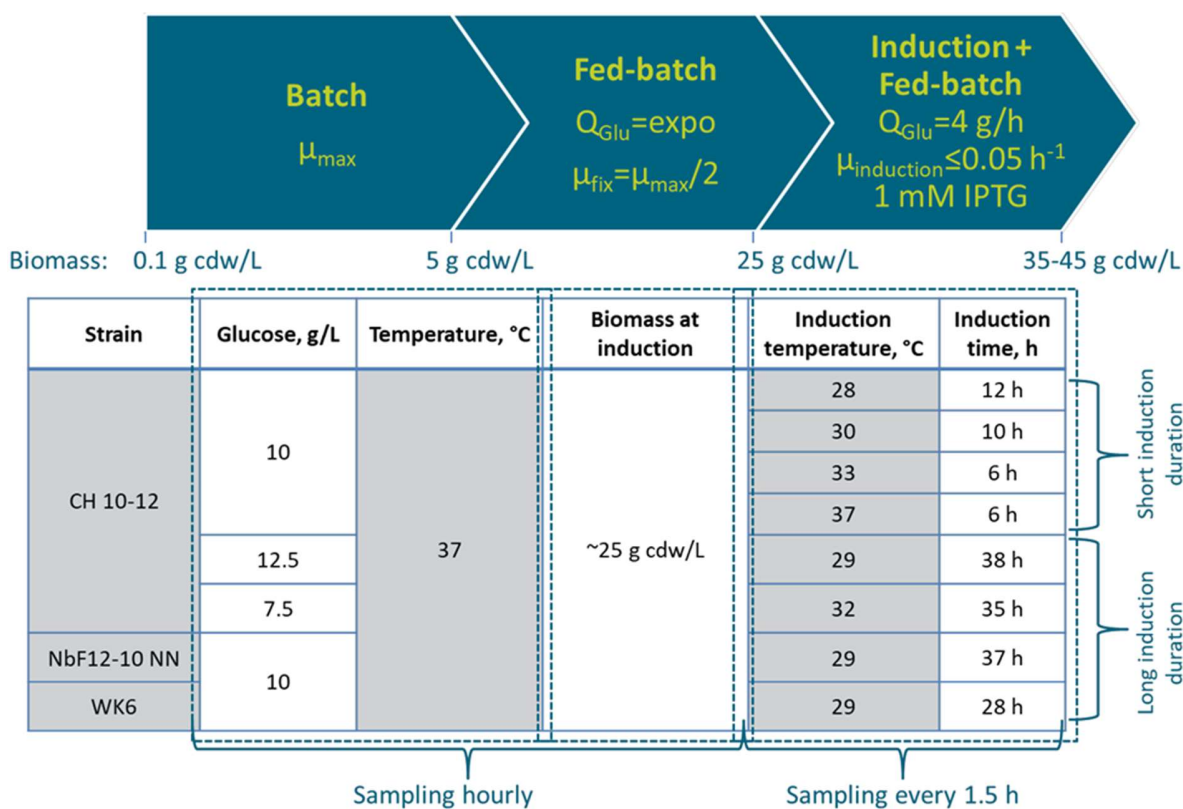
Κατά την ημιδιαλείπουσα φάση των καλλιεργειών του βιοαντιδραστήρα, το διάλυμα τροφοδοσίας περιείχε γλυκόζη, άλατα και ιχνοστοιχεία για τη διατήρηση των μεταβολικών αναγκών του στελέχους. Η σύνθεση του διαλύματος τροφοδοσίας βασίστηκε στις μελέτες του Manon, με τις συγκεντρώσεις αλάτων και ιχνοστοιχείων να προσαρμόζονται για διάλυμα γλυκόζης 300 g/L.^[95]

Για την παρασκευή του διαλύματος τροφοδοσίας, άλατα και ιχνοστοιχεία (από συμπυκνωμένα διαλύματα) προστέθηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα IX, με εξαίρεση τη θειαμίνη, σε διάλυμα γλυκόζης 300 g/L. Το διάλυμα αποστειρώθηκε σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά. Η θειαμίνη προστέθηκε στο διάλυμα τροφοδοσίας πριν ξεκινήσει η φάση. Το pH δεν ρυθμίστηκε για να αποφευχθεί η καθίζηση μεταλλικών ιόντων, και τελικά το pH του διαλύματος μετρήθηκε 2,4.

Compound	Quantity
Glucose	300 g/L
H ₃ PO ₄ (85%)	0.96 mL/L
K ₂ HPO ₄	3.2143 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.3857 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0143 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1586 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1586 g/L
1000x MnSO ₄ ·H ₂ O	0.45 mL/L
1000x Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.24 mL/L
1000x CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.19 mL/L
1000x CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.37 mL/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.031 g/L
1000x H ₃ BO ₃	0.98 mL/L
1000x Thiamine	3.42 mL/L

Πίνακας IX – Σύνθεση του διαλύματος τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα

Η τροφοδοσία ελεγχόταν με τη διακριτοποίηση του εκθετικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης που ισοδυναμεί με $0,38 \text{ h}^{-1}$ και προγραμματίστηκε ως μια σειρά γραμμικών τροφοδοτήσεων για 4,5 ώρες.



Εικόνα 2 – Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των πειραμάτων ημιδιαλείπουσας φάσης



Πειραματικά Δεδομένα

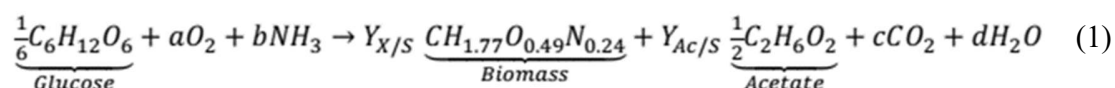
Τα πειραματικά δεδομένα, που ελήφθησαν από το Πανεπιστήμιο της Τουλούζης, παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α. Πιο αναλυτικά, αυτά περιέχουν τις μετρήσεις για τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης, της βιομάζας και της πρωτεΐνης στον χρόνο, αλλά και τις μετρήσεις της θερμοκρασίας, της παροχής και του όγκου του αντιδραστήρα.^[1]

Batch ref.	Objectives	Strain	Culture medium	Induction conditions (Temperature – duration)	[Glc] at the start of batch mode	[Glc] in feed solution
BR01	Control for sampling strategy and feed profiles	<i>E. coli</i> WK6	Defined minimal medium	/	10 g/L	286 g/L
BR02	Induction of protein at 25 g cdw/L at different temperatures	<i>E. coli</i>	Defined minimal medium	28°C – 12 h	10 g/L	298 g/L
BR03		CH10-12	minimal medium	30°C – 10 h	10 g/L	298 g/L
BR04				33°C – 6 h	10 g/L	326 g/L
BR05				37°C – 6 h	10 g/L	326 g/L
BR06		Induction of protein at 30 g cdw/L for long induction times	<i>E. coli</i>	Defined minimal medium	29°C – 38 h	12.5 g/L
BR07		CH10-12	minimal medium	32°C – 35 h	7.5 g/L	305 g/L
BR08	Induction of protein at 25 g cdw/L	<i>E. coli</i> NbF12-10 NN	Defined minimal medium	29°C – 37 h	10 g/L	305 g/L
BR09	Control with induction	<i>E. coli</i> WK6	Defined minimal medium	29°C – 28 h	10 g/L	305 g/L

Πίνακας X – Συνθήκες καλλιέργειας κάθε πειράματος

Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων & Αποτελέσματα

Η γενική σχέση, που περιγράφει την παραγωγή της βιομάζας είναι:



Όπου a,b,c,d οι στοιχειομετρικοί συντελεστές, $Y_{X/S}$ η εκλεκτικότητα του υποστρώματος (γλυκόζη) σε βιομάζα και $Y_{Ac/S}$ η εκλεκτικότητα του υποστρώματος σε ακετικό οξύ (παραπροϊόν). Η σύσταση της βιομάζας θεωρείται πως παραμένει σταθερή σε κάθε φάση της διαδικασίας.^[1]



Batch phase

Τα ισοζύγια μάζας της βιομάζας και της γλυκόζης, για αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με θεώρηση τέλει ανάμιξης, προκύπτουν από τις κάτωθι διαφορικές εξισώσεις^{[1],[96]}:

$$\frac{dX}{dt} = r_X - r_e \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_S + r_m \quad (3)$$

Δεδομένου ότι η διάρκεια των πειραμάτων είναι σχετικά μικρή και ότι η γλυκόζη βρίσκεται συνεχώς σε περίσσεια, οι ρυθμοί συντήρησης (r_m) και οξείδωσης (r_e) της βιομάζας είναι αμελητέοι. Συνεπώς τα ισοζύγια ορίζονται ως εξής;

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

$$\frac{dS}{dt} = -r_S \quad (5)$$

$$r_X = \mu \cdot X \quad (6)$$

$$r_S = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (7)$$

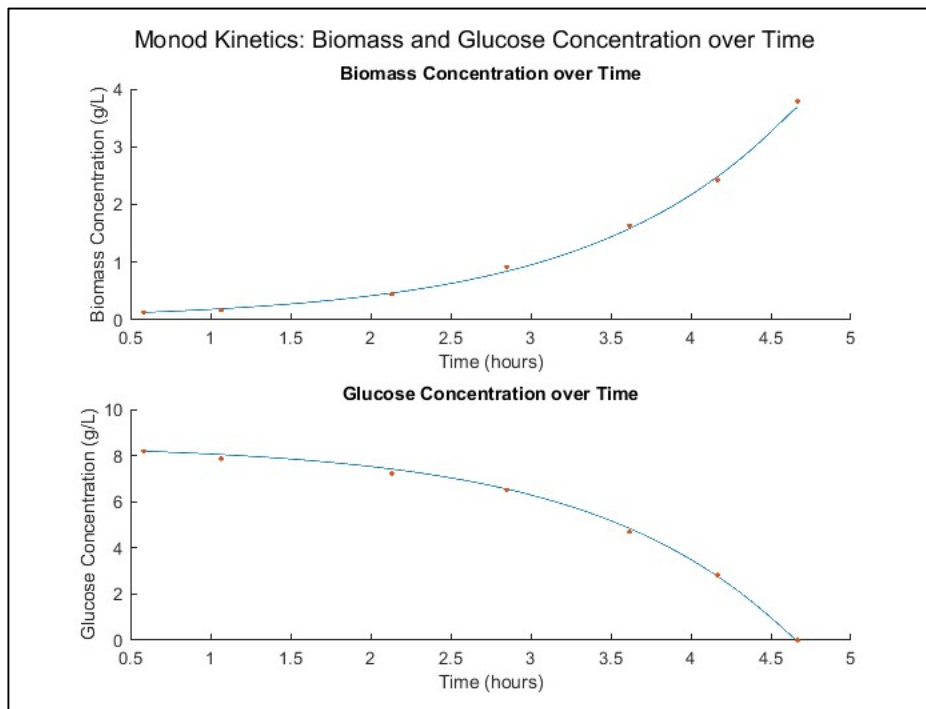
Όπου μ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας και $Y_{X/S}$ η εκλεκτικότητα του υποστρώματος.

Για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης θεωρείται πως ικανοποιείται από την εξίσωση Monod,

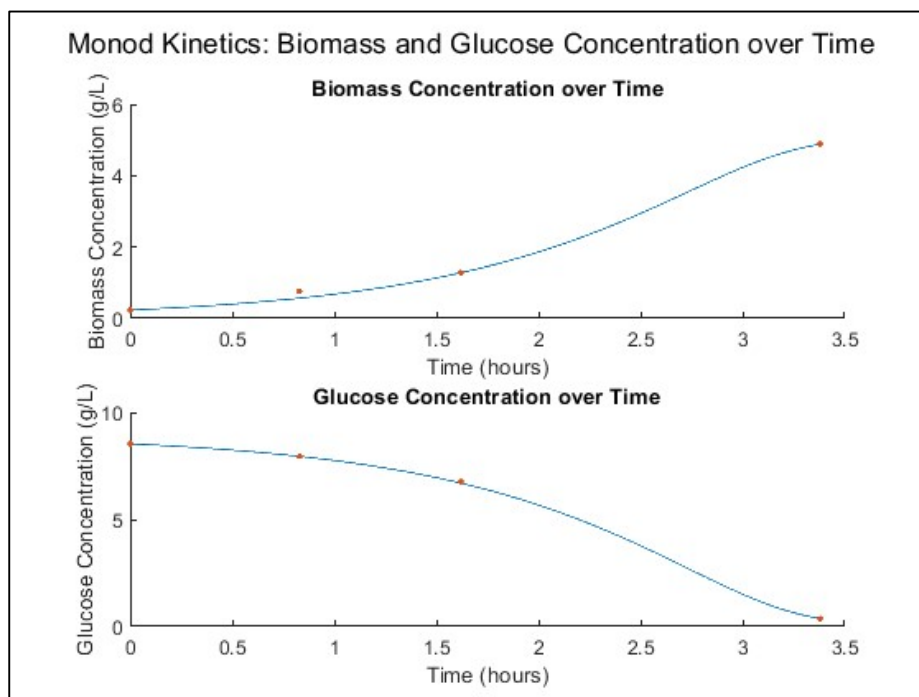
$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (8)$$

καθώς η εξίσωση αυτή λαμβάνει ευρεία εφαρμογή σε περιπτώσεις καλλιιεργειών μικροοργανισμών και δη *Escherichia coli*.^[97]

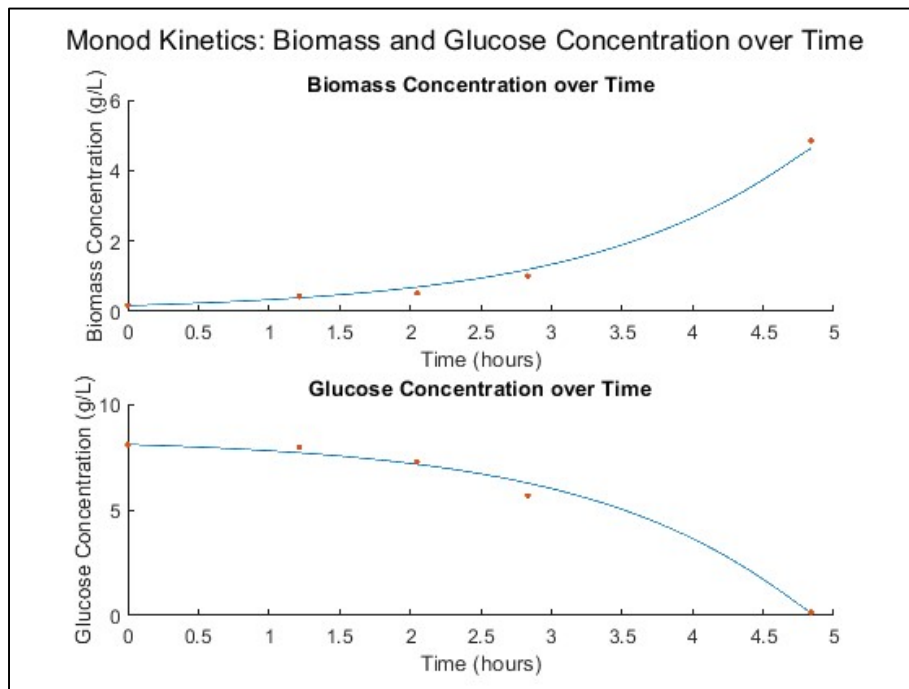
Ο προσδιορισμό των παραμέτρων μ_{max} , K_s και $Y_{X/S}$ για κάθε ένα από τα δεδομένα πειράματα πραγματοποιήθηκε με την χρήση του υπολογιστικού εργαλείου matlab, με τον κώδικα να επισυνάπτεται στο Παράρτημα Β. Τα πλεονεκτήματα του κώδικα αυτού, είναι πως έχει την ικανότητα να υπολογίζει παραμέτρους χωρίς να απαιτούνται αρχικές τιμές και επίσης δύναται ο πειραματιστής να μεταβάλλει το μέγεθος της απόκλισης των υπολογισμένων μετρήσεων με τις πραγματικές, ώστε να μεταβληθεί ο υπολογιστικός χρόνος.



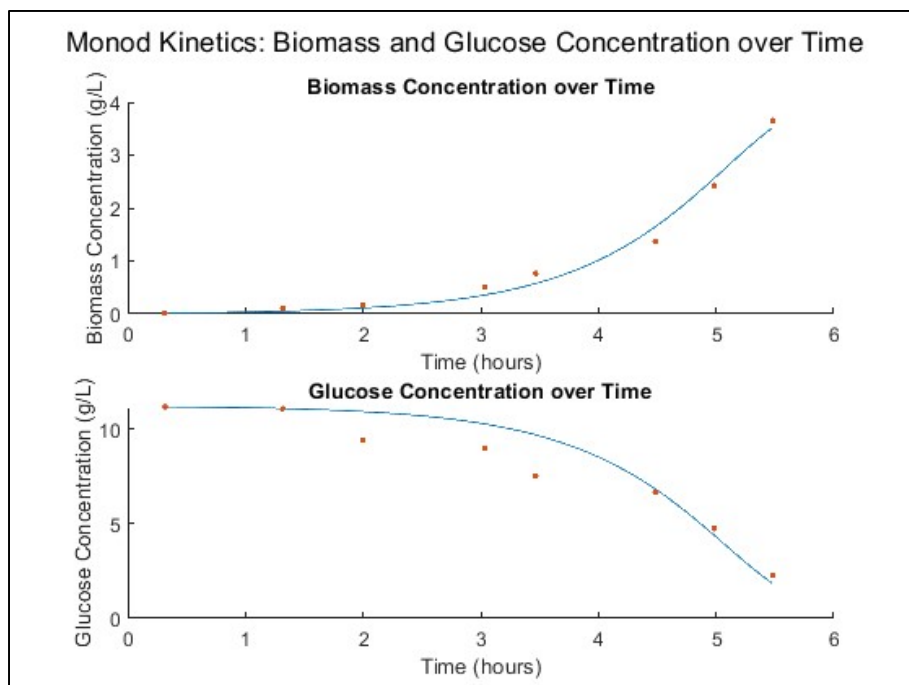
Γράφημα 1 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR01. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



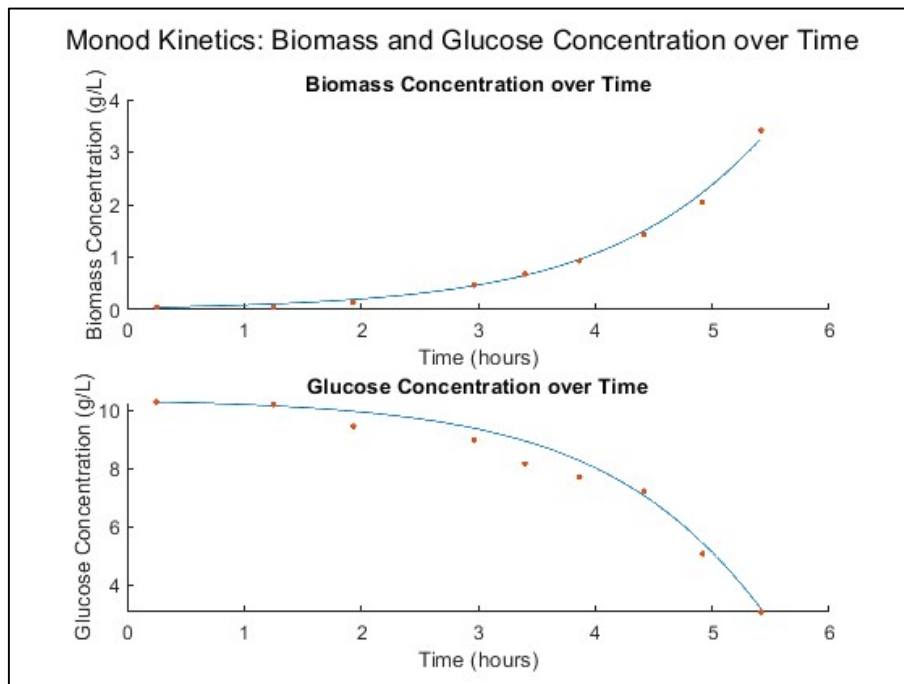
Γράφημα 2 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



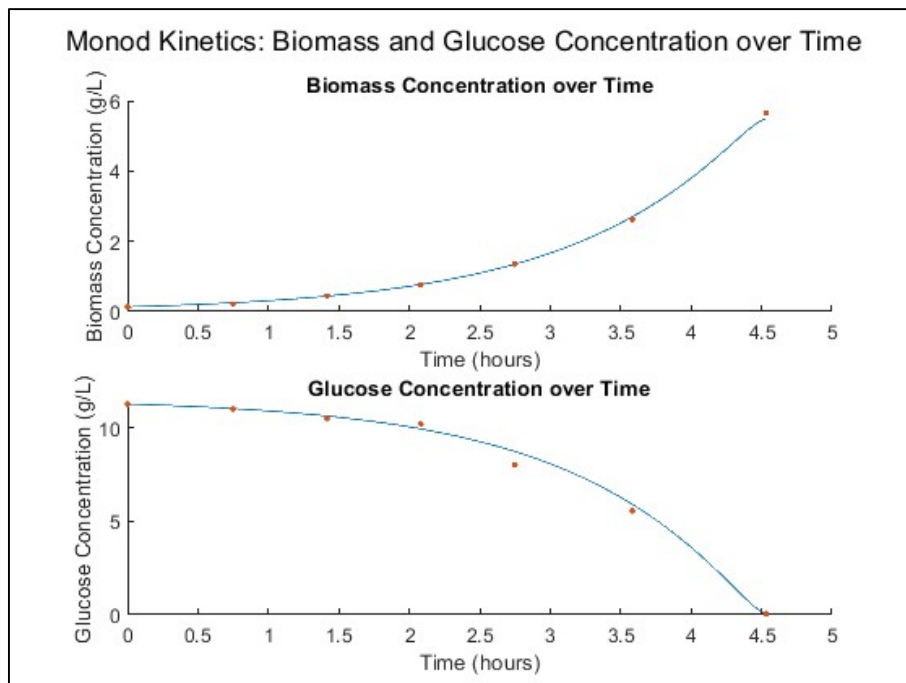
Γράφημα 3 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



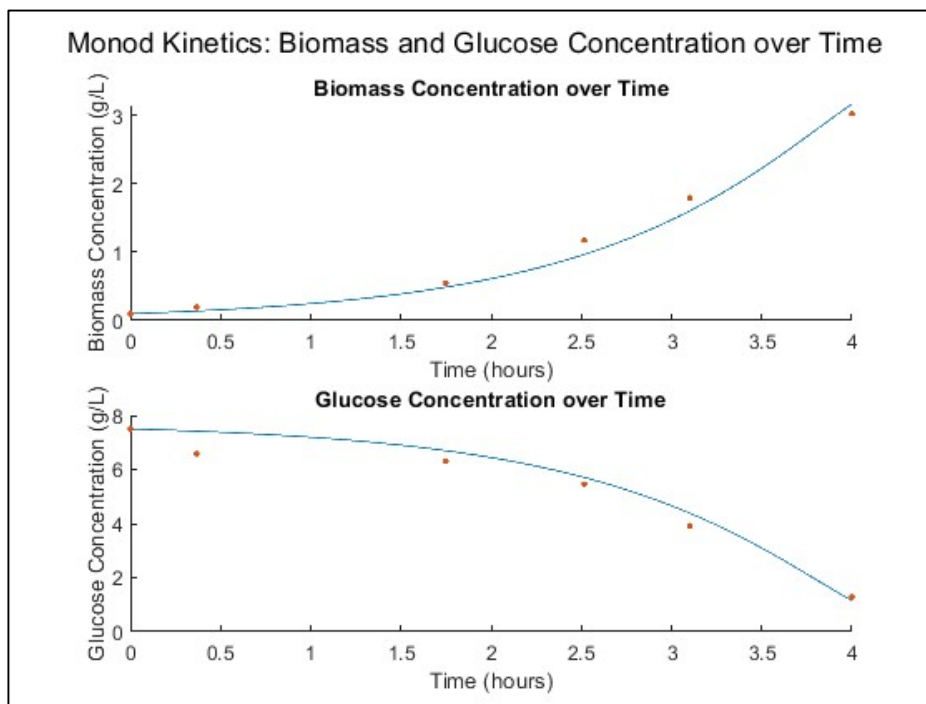
Γράφημα 4 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



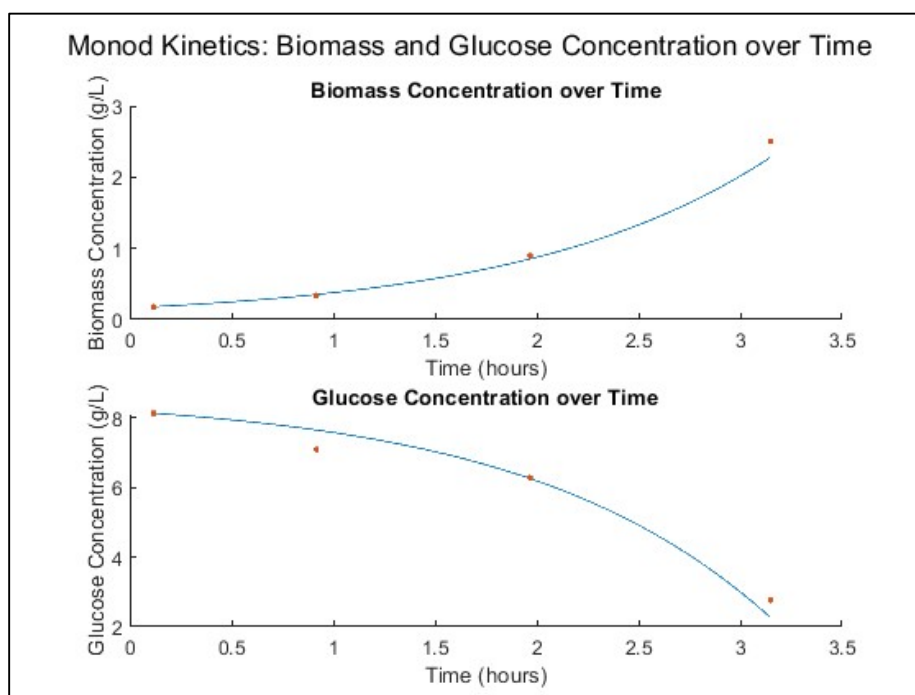
Γράφημα 5 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR05. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



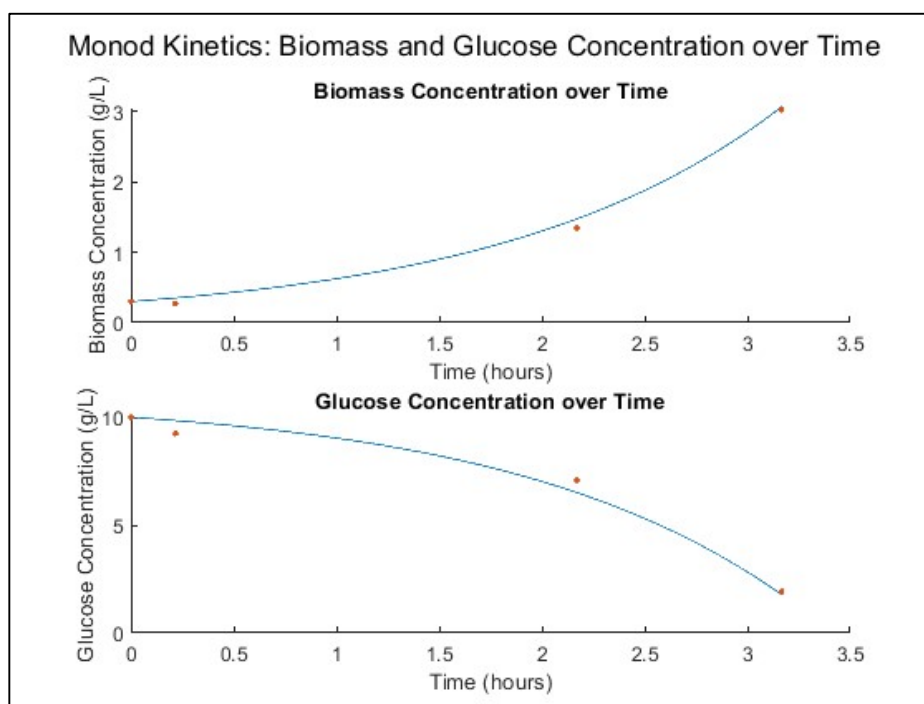
Γράφημα 6 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 7 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 8 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR08. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 9 – Συγκέντρωση βιομάζας και γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα BR09. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)

	μ_{\max}	K_s	$Y_{x/s}$
BR01	0.84	0.0395	0.432
BR02	1.08	0.9634	0.558
BR03	0.78	0.5108	0.559
BR04	1.06	0.0493	0.406
BR05	0.83	0.0817	0.446
BR06	0.97	0.2444	0.493
BR07	1.08	0.9133	0.479
BR08	0.93	0.1685	0.390
BR09	0.73	0.0183	0.331

Πίνακας XI – Συγκεντρωτικές εκτιμήσεις των παραμέτρων της κινητικής Monod, καθώς και τις εκλεκτικότητας για όλα τα πειράματα

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει πως οι μέσες τιμές για κάθε παράμετρο είναι:

$$\mu_{\max} = 0.92 \pm 0.13 \text{ h}^{-1}, K_s = 0.1824 \text{ g/L}, Y_{x/s} = 0.455 \pm 0.07 \text{ g/g}$$



Ωστόσο και για την μετέπειτα επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, είναι απαραίτητο να υπάρχει μία τριάδα παραμέτρων η οποία θα μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα πειράματα χωρίς μεγάλες αποκλίσεις. Η τριάδα αυτή βρέθηκε με την μέθοδο της δοκιμής και σφάλματος, δοκιμάζοντας διάφορα σετ τιμών εντός των ευρών που καταγράφονται στον πίνακα XI και ορίζεται ως:

$$\mu_{\max} = 0.87 \text{ h}^{-1}, K_s = 0.214 \text{ g/L}, Y_{x/s} = 0.496 \text{ g/g}$$

Fed Batch Phase

Τα ισοζυγία μάζας της βιομάζας και της γλυκόζης, για αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου με θεώρηση τέλει ανάμιξης, προκύπτουν από τις κάτωθι διαφορικές εξισώσεις [96]:

$$\frac{dX}{dt} = r_X - \frac{F(t)}{V_R} \cdot X \quad (9)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F(t)}{V_R} \cdot (S_o - S) - r_S \quad (10)$$

$$\frac{dV_R}{dt} = F(t) \quad (11)$$

$$r_X = \mu \cdot X \quad (12)$$

$$r_S = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (13)$$

Όπου μ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας, $Y_{X/S}$ η εκλεκτικότητα του υποστρώματος.

Κατά την κυτταρική ανάπτυξη στον αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου, παράγεται η απαιτούμενη ποσότητα βιομάζας περίπου 28 g/L υπό σταθερό ρυθμό ανάπτυξης, με σκοπό την έναρξη της παραγωγής της πρωτεΐνης. Οι συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα θερμοκρασιακά παραμένουν ίδιες για όλα τα πειράματα (37 °C), ενώ η τροφοδοσία του διαλύματος γλυκόζης ελεγχόταν με το σύστημα πρόσληψης (MFCS) και μία, προηγουμένως βαθμονομημένη, περισταλτική αντλία. Ένας εκθετικός έλεγχος προγραμματίστηκε στο σύστημα παροχής και άρχισε να λειτουργεί, με την εξάντληση της γλυκόζης στην πρότερη φάση.

Οι χρονικές εξισώσεις του όγκου των αντιδραστήρων για τα πειράματα BR02 έως BR09 καθόσον αφορούν σχετικά μικρές μεταβολές του όγκου, μπορούν να προσομοιωθούν από εξισώσεις 2^{ου} βαθμού:

$$V_R(t) = c_1 \cdot t^2 + c_2 \cdot t + c_3 \quad (14)$$

$$F(t) = 2 \cdot c_1 \cdot t + c_2 \quad (15)$$



Οι συντελεστές των άνωθεν εξισώσεων υπολογίζονται μέσω παλινδρόμησης των δεδομένων όγκου από των αντιδραστήρα.

	c ₁	c ₂	c ₃
BR02	0.0085	0.0296	1.60
BR03	0.0118	0.0090	1.66
BR04	0.0111	0.0153	1.65
BR05	0.0170	0.0204	1.64
BR06	0.0163	0.0393	1.70
BR07	0.0115	0.0151	1.74

Πίνακας XII – Συντελεστές χρονικών εξισώσεων όγκου και παροχής για τα όλα τα πειράματα

Ο συντελεστής c₃ καθορίζεται εξαρχής στην παλινδρόμηση και ισούται με την αρχική τιμή του όγκου του αντιδραστήρα στην ημιδιαλείπουσα φάση.

Να τονιστεί στο σημείο αυτό πως η χρονική εξέλιξη του όγκου στο 7^ο πείραμα είναι εκθετικής μορφής μέχρι περίπου τα 2 L. Στην συνέχεια η παροχή είναι σταθερή και ίση με 70 ml/h.

Λύνοντας την διαφορική εξίσωση του ισοζυγίου μάζας της βιομάζας, προκύπτει:

$$\left\{ \begin{array}{l} X(t) = \frac{c_3 \cdot X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}}{c_1 \cdot t^2 + c_2 \cdot t + c_3}, F \neq \text{constant} \quad (16) \\ X(t) = \frac{V_{R0} \cdot X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}}{V_{R0} + F \cdot t}, F = \text{constant} \quad (17) \end{array} \right.$$

Όπου X₀ η συγκέντρωση της βιομάζας και V_{R0} ο όγκος του αντιδραστήρα, κατά την έναρξη της ημιδιαλείπουσας φάσης.

Ύστερα υπολογίζονται οι ρυθμοί ανάπτυξης μέσω παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα:

	μ (h ⁻¹)
BR02	0.415
BR03	0.391
BR04	0.442
BR05	0.416
BR06	0.462
BR07 _a	0.464
BR07 _b	0.057

Πίνακας XIII – Τιμές ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για τα διάφορα πειράματα. (Οι δείκτες α και β χρησιμοποιούνται για να περιγραφθούν οι διαφορετικοί ρυθμοί ανάπτυξης στο πείραμα 7, λόγω της μεταβολής της παροχής)



Όπως παρατηρείται επιτυγχάνεται ο σκοπός των πειραματιστών ο ρυθμός ανάπτυξης να είναι περίπου ίσος του μεγίστου ρυθμού ανάπτυξης από την διαλείπουσα φάση ($\mu_{\max} \approx 0.87$).

Fed batch & Induction Phase

Με την παραγωγή της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας, προστίθενται στον αντιδραστήρα, 1 g του επαγωγέα IPTG με σκοπό την έναρξη της παραγωγής της πρωτεΐνης. Πλέον, οι συνθήκες της θερμοκρασίας μεταβάλλονται και η τροφοδοσία της γλυκόζης παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της φάσης αυτής. Στόχος των πειραματιστών ήταν η γλυκόζη να εισερχόταν στον αντιδραστήρα με ρυθμό μεγαλύτερο από 3 g/h.

	T (°C)	F (ml/h)	C _{glucose} (g/ml)
BR02	28	10.5	0.298
BR03	30	10.5	0.298
BR04	33	31.0	0.326
BR05	37	31.0	0.326
BR06	29	17.0	0.305
BR07	32	17.0	0.305

Πίνακας XIV – Θερμοκρασία αντιδραστήρα και τιμές παροχής και συγκέντρωσης εισόδου της γλυκόζης για κάθε πείραμα

Τα ισοζύγια μάζας της βιομάζας, της γλυκόζης και της πρωτεΐνης, διαμορφώνονται ως εξής^{[96],[98]}:

$$\frac{dX}{dt} = r_X - \frac{F}{V_R} \cdot X \quad (18)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V_R} \cdot (S_o - S) - r_S \quad (19)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P - \frac{F}{V_R} \cdot P \quad (20)$$

$$\frac{dV_R}{dt} = F = \text{constant} \quad (21)$$

$$r_X = \mu_{ind} \cdot X \quad (22)$$

$$r_S = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S,ind}} \quad (23)$$

$$r_P = a \cdot \mu_{ind} \cdot X \quad (24)$$

Όπου μ_{ind} ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας, $Y_{X/S,ind}$ η εκλεκτικότητα του υποστρώματος κατά την επαγωγή και a ο συντελεστής ανάπτυξης της πρωτεΐνης.



Με βάση τα πειραματικά δεδομένα, παρατηρείται πως σε όλη την χρονική έκταση της επαγωγής η συγκέντρωση της γλυκόζης εντός του αντιδραστήρα είναι πολύ μικρή (σχεδόν μηδενική) και παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις. Για τον λόγο αυτό μπορεί να θεωρηθεί πως ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης είναι μηδενικός και άρα σταθερός ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας. Στόχος των πειραματιστών ήταν αυτός να παραμένει μικρότερος από 0.05 h^{-1} . Άρα η εξίσωση 18 πλέον ολοκληρώνεται και η συγκέντρωση της βιομάζας ισούται με:

$$X(t) = \frac{V_{Ro} \cdot X_o \cdot e^{\mu \cdot t}}{V_{Ro} + F \cdot t} \quad (25)$$

Με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιώντας το προφίλ των συγκεντρώσεων της βιομάζας στον χρόνο, υπολογίζονται οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης της βιομάζας και παρουσιάζονται παρακάτω:

	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$RE_X \%$
BR02	0.0234	1%
BR03	0.0252	3%
BR04	0.0392	2%
BR05	0.0308	2%
BR06	0.0148	4%
BR07	0.0175	3%

Πίνακας XV - Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας και μέσο σχετικό σφάλμα των υπολογισμένων τιμών βιομάζας, από τις πειραματικές, για κάθε πείραμα.

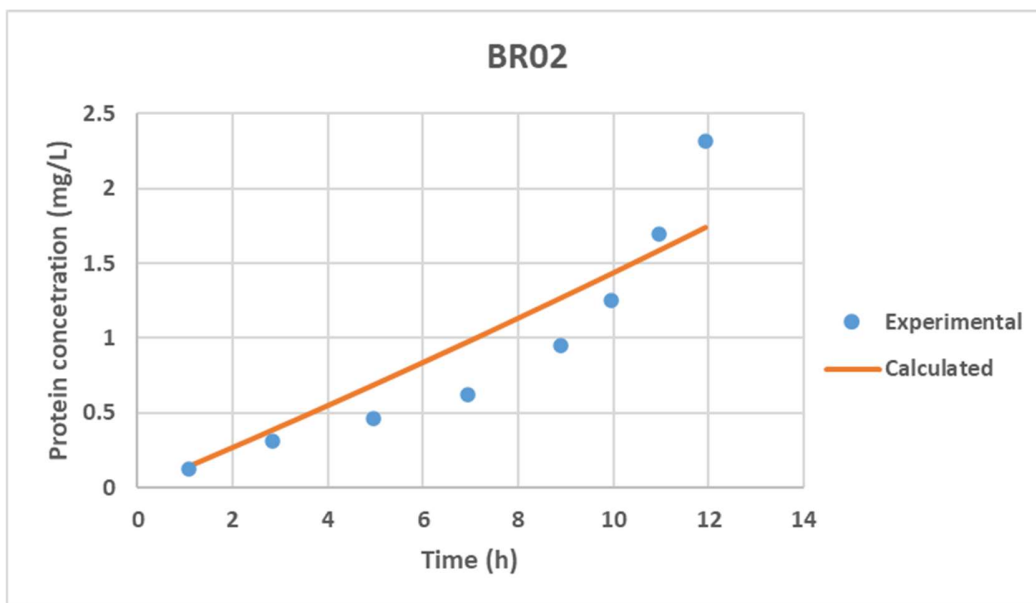
Όπως γίνεται αντιληπτό επιβεβαιώνεται και πειραματικά πως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός κατά την διάρκεια κάθε πειράματος στην φάση της επαγωγής.

Βάσει της βιβλιογραφίας, ως επί των πλείστων, προτείνεται ο συντελεστής ανάπτυξης της πρωτεΐνης α , να παραμένει σταθερός στον χρόνο.^[98]

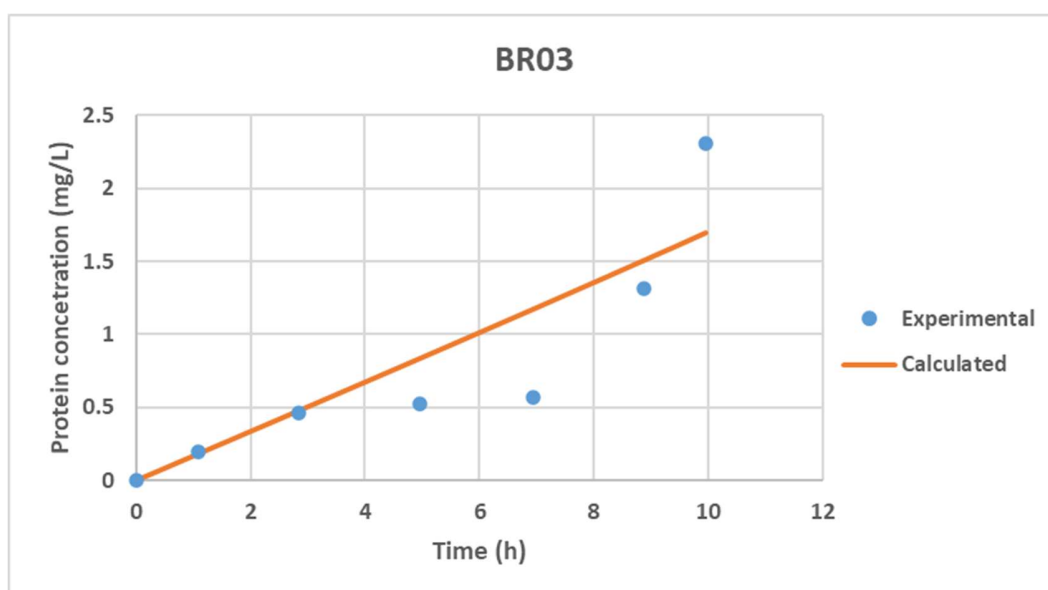
Με την προϋπόθεση αυτή η εξίσωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης μπορεί να βρεθεί αναλυτικά από τις εξισώσεις 20, 24 και 25 και ισούται:

$$P(t) = \frac{\alpha \cdot V_{Ro} \cdot X_o \cdot e^{\mu \cdot t}}{V_{Ro} + F \cdot t} \quad (26)$$

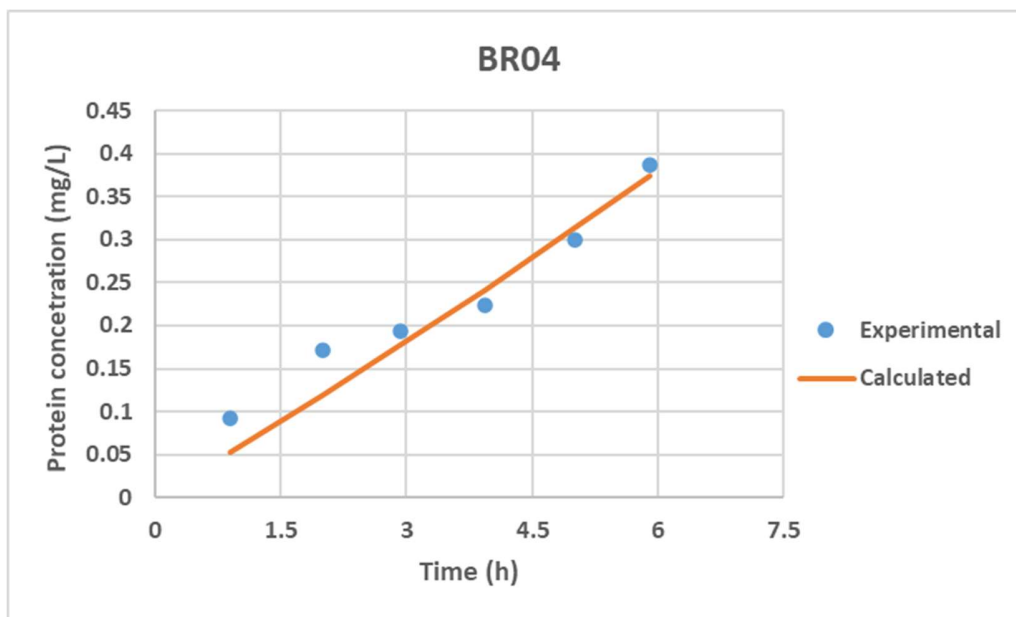
Στα κάτωθι διαγράμματα παρουσιάζονται τα διαγράμματα παραγωγής πρωτεΐνης για κάθε πείραμα με σταθερό α .



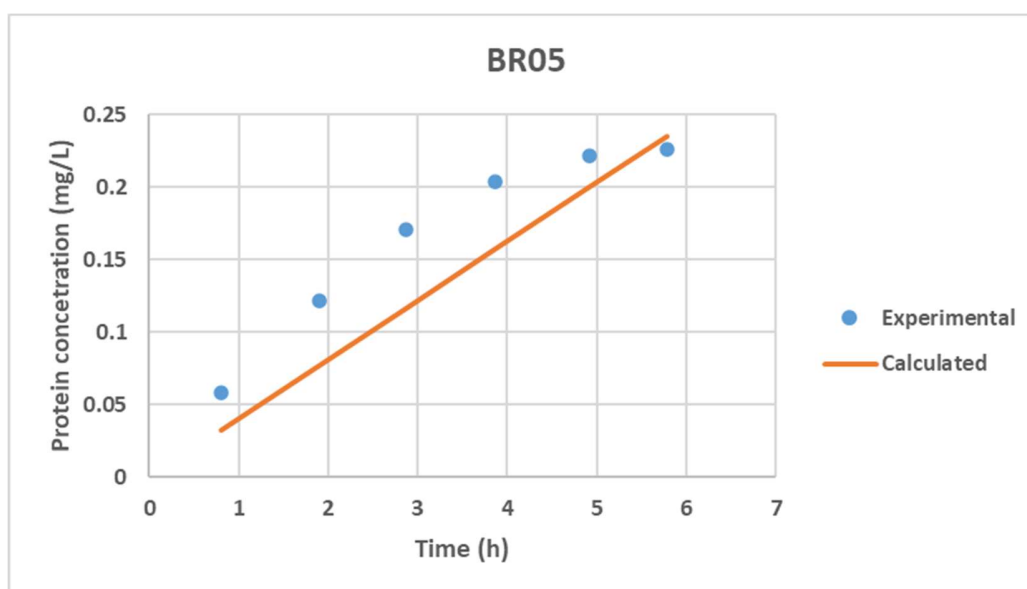
Γράφημα 10 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με σταθερό α , για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



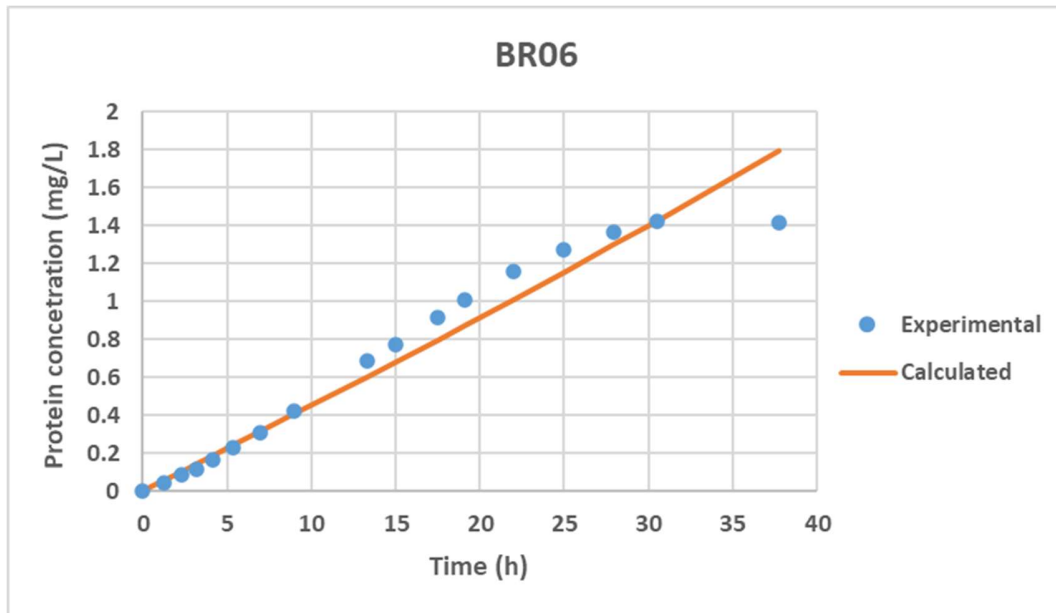
Γράφημα 11 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με σταθερό α , για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



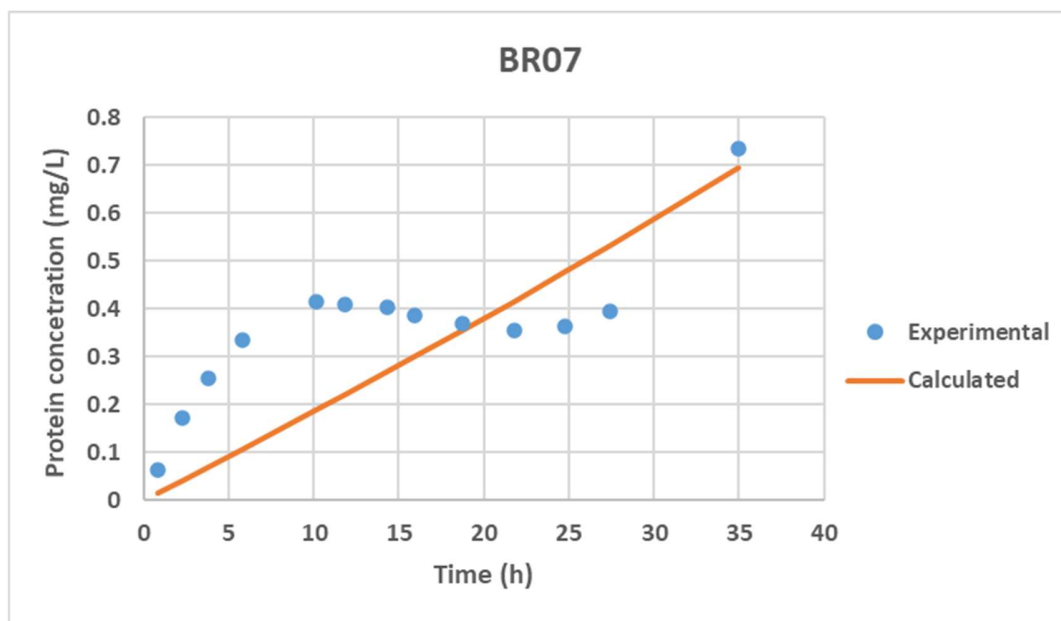
Γράφημα 12 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με σταθερό α , για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 13 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με σταθερό α , για το πείραμα BR05. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 14 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με σταθερό α , για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 15 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με σταθερό α , για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)

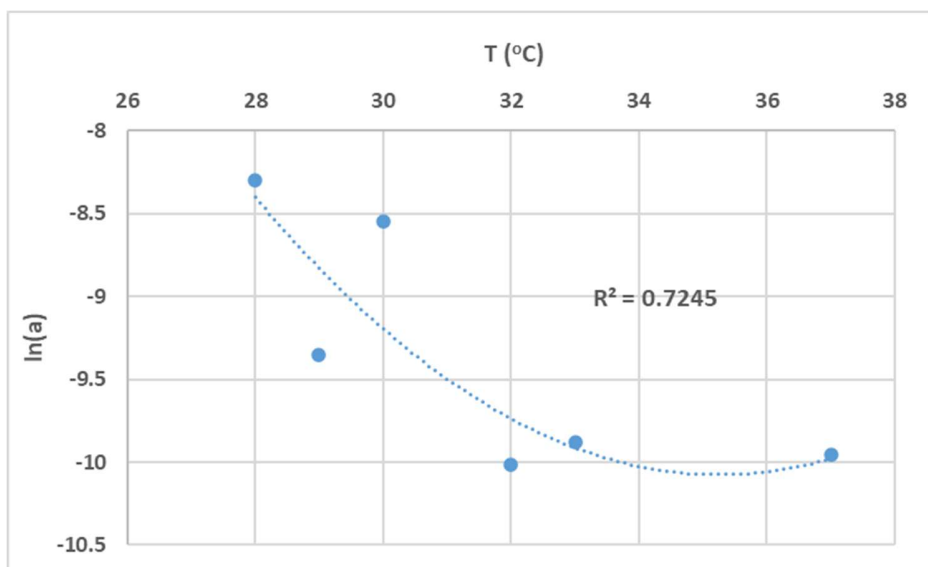


Όπως είναι ορατό, η υπόθεση του σταθερού συντελεστή παραγωγής πρωτεΐνης a καταρρίπτεται, αφού δεν μπορούν να προβλεφθούν ούτε οι αλλαγές στην κλίση που παρουσιάζουν τα πειραματικά δεδομένα και ούτε κατά συνέπεια οι αλλαγές στην κυρτότητά τους. Τα μόνα πειράματα που το μοντέλο αυτό είναι εφαρμόσιμο με σχετική αξιοπιστία είναι το 4^ο και το 5^ο.

Η εξίσωση που περιγράφει το a στην περίπτωση αυτή βασισμένη σε μοντέλα τύπου εξισώσεων Arrhenius είναι:

$$a(T) = e^{0.0319 \cdot T^2 - 2.2478 \cdot T + 29.547} \quad (27)$$

Όπου T η θερμοκρασία εκτέλεσης του εκάστοτε πειράματος.



Γράφημα 16 – Συντελεστής παραγωγής της πρωτεΐνης a , συναρτήσει της θερμοκρασίας. (Ως γραμμή απεικονίζεται η λογαριθμική μορφή της εξίσωσης 27 και ως σημεία το a κάθε πειράματος)

Από τα παραπάνω προκύπτει πως ο συντελεστής a δεν μπορεί να παραμένει σταθερός, αλλά να αποτελεί συνάρτηση τόσο της θερμοκρασίας, όσο και του χρόνου. Όπως παρατηρείται τόσο βιβλιογραφικά όσο και από τα εκτελεσμένα πειράματα, η ταχύτητα σύνθεσης πρωτεϊνών αλλάζει με την πάροδο του χρόνου.

Θα μπορούσε επίσης, να ελεγχθεί αν η παραγωγή πρωτεΐνης, επηρεάζεται για παράδειγμα από την συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH. Σε όλα όμως τα πειράματα, αυτοί οι παράγοντες παραμένουν σταθεροί, πλην του 6^{ου} που η συγκέντρωση του οξυγόνου εμφανίζει ελαφριά μείωση. Άρα δεν μπορεί να δοκιμαστεί αυτή η υπόθεση και συνεπώς η παραγωγή πρωτεΐνης θεωρείται ανεξάρτητοι από αυτούς.



Παρουσιάζεται παρακάτω ποια είναι η εξάρτηση της παραγωγής πρωτεϊνών από το χρόνο στη διαδικασία καλλιέργειας του *Escherichia coli* και πώς η ταχύτητα σύνθεσης πρωτεϊνών αλλάζει με την πάροδο του χρόνου.

Βασικές φάσεις παραγωγής πρωτεϊνών με τον χρόνο

Φάση Προσαρμογής (Lag Phase)

Μετά την εισαγωγή του επαγωγέα, ο *Escherichia coli* προσαρμόζεται στο νέο περιβάλλον και δεν παρατηρείται σημαντική παραγωγή πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Στην περίοδο αυτή, η παραγωγή πρωτεϊνών συνήθως είναι χαμηλή, καθώς τα κύτταρα δεν είναι ακόμα πλήρως μεταβολικά ενεργά.^{[99],[100]}

Φάση Εκθετικής Ανάπτυξης (Exponential Growth Phase)

Τα κύτταρα αναπτύσσονται γρήγορα, και η μεταβολική δραστηριότητα είναι στο αποκορύφωμά της. Αυτή είναι η φάση της μέγιστης σύνθεσης πρωτεϊνών. Η παραγωγή πρωτεϊνών ακολουθεί την καμπύλη ανάπτυξης της βιομάζας, με υψηλή ταχύτητα σύνθεσης λόγω της ενεργής μεταβολικής δραστηριότητας.^{[99],[100]}

Η παραγωγή πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε υψηλό μεταβολικό φορτίο, καθώς τα κύτταρα προσπαθούν να αναπτυχθούν και να παράγουν πρωτεΐνες ταυτόχρονα. Η μέγιστη παραγωγή συνήθως συμβαίνει στη μέση της φάσης εκθετικής ανάπτυξης, όταν τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά αλλά δεν είναι ακόμα σε έλλειψη θρεπτικών ουσιών.^{[99],[100]}

Φάση Στασιμότητας (Stationary Phase)

Μετά από ένα ορισμένο σημείο, ο ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας επιβραδύνεται λόγω εξάντλησης θρεπτικών ουσιών, συσσώρευσης αποβλήτων ή έλλειψης οξυγόνου. Τα κύτταρα εισέρχονται σε φάση στασιμότητας όπου η ανάπτυξη είναι ελάχιστη ή σταματά. Σε αυτή τη φάση, η παραγωγή πρωτεϊνών μπορεί να συνεχίζεται, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματική. Το μεταβολικό φορτίο της παραγωγής πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει καταπόνηση στα κύτταρα, μειώνοντας την ικανότητά τους να διατηρούν υψηλά επίπεδα σύνθεσης πρωτεϊνών. Η αφυδάτωση και η διάσπαση πρωτεϊνών μπορεί επίσης να συμβούν, μειώνοντας περαιτέρω την απόδοση της παραγωγής πρωτεΐνης. Παρατηρείται άρα, σταθερότητα στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης.^{[99],[100]}

Φάση Μείωσης (Decline Phase)

Τα κύτταρα αρχίζουν να πεθαίνουν λόγω σοβαρής έλλειψης θρεπτικών ουσιών, υψηλών επιπέδων τοξικών υποπροϊόντων ή συσσώρευσης αποβλήτων. Σε αυτό το σημείο, η σύνθεση πρωτεϊνών μειώνεται δραματικά, καθώς η μεταβολική ικανότητα των κυττάρων έχει εξαντληθεί και η



διάσπαση εμφανίζεται εντονότερα. Η απόδοση της παραγωγής έτσι μειώνεται και η συγκέντρωση φθίνει.^{[99],[100]}

Μηχανισμοί που επηρεάζουν την εξάρτηση από τον χρόνο

Χρόνος ενεργοποίησης πρωτεϊνοσύνθεσης

Στα συστήματα ανασυνδυασμένων *Escherichia coli*, η παραγωγή πρωτεϊνών συνήθως ενεργοποιείται με την προσθήκη ενός επαγωγέα (IPTG για τα παρόντα πειράματα) σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Πρώιμη ενεργοποίηση, μπορεί να προκαλέσει υψηλό μεταβολικό φορτίο καθώς τα κύτταρα προσπαθούν να αναπτυχθούν και να παράγουν πρωτεΐνες ταυτόχρονα, οδηγώντας σε χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Εάν ενεργοποιηθεί πολύ νωρίς, ο μηχανισμός παραγωγής πρωτεϊνών μπορεί να μην είναι πλήρως λειτουργικός.^{[99],[100]}

Η βέλτιστη ενεργοποίηση, επιτυγχάνεται όταν τα κύτταρα είναι ενεργά και μεταβολικά δραστήρια και η καλύτερη στιγμή είναι συχνά όταν η καλλιέργεια φτάνει σε μέτρια πυκνότητα (OD600 περίπου 0.5–0.6). Σε αυτό το σημείο, τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά και το φορτίο της παραγωγής πρωτεϊνών είναι λιγότερο πιθανό να βλάψει σοβαρά την ανάπτυξη.

Ενεργοποιώντας την ωστόσο πολύ αργά, μπορεί να επιφέρει χαμηλότερους ρυθμούς παραγωγής πρωτεΐνης, καθώς τα κύτταρα μεταβαίνουν σε φάση στασιμότητας και είναι λιγότερο μεταβολικά ενεργά.

Μεταβολικό φορτίο

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επιβαρύνει τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, καταναλώνοντας ενέργεια και πόρους που διαφορετικά θα χρησιμοποιούνταν για ανάπτυξη και συντήρηση. Με την πάροδο του χρόνου, αυτό το μεταβολικό φορτίο γίνεται πιο σημαντικό, λόγω εξάντλησης πόρων (ATP, αμινοξέα) και συσσώρευσης αποβλήτων, όπως ακετικό οξύ, ειδικά σε καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας, οδηγώντας σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της αποτελεσματικότητας της σύνθεσης πρωτεϊνών.^{[99],[100]}

Καταπόνηση κυττάρων και διάσπαση πρωτεϊνών

Καθώς τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση στασιμότητας και βιώνουν καταπονήσεις (περιορισμός θρεπτικών ουσιών, έλλειψη οξυγόνου, συσσώρευση τοξικών αποβλήτων), μπορεί να αρχίσουν να διασπών λανθασμένες ή υπερβολικές πρωτεΐνες.^{[99],[100]}

Τα πρωτεολυτικά συστήματα μπορεί να γίνονται πιο ενεργά σε αυτή τη φάση, μειώνοντας τα επίπεδα λειτουργικής πρωτεΐνης με την πάροδο του χρόνου.



Συγκέντρωση και τοξικότητα επαγωγέα

Η συγκέντρωση του επαγωγέα έχει κομβικό ρόλο, καθώς ενώ μεγάλες συγκεντρώσεις αυξάνουν την ταχύτητα σύνθεσης πρωτεϊνών, με την πάροδο του χρόνου αυξάνουν την τοξικότητα και παρατεταμένη έκθεση της καλλιέργειας σε αυτόν, οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο και τον τερματισμό της παραγωγής πρωτεΐνης. [99],[100]

Φαινόμενα μεταφοράς

Τα φαινόμενα μεταφοράς στην αρχή του πειράματος της επαγωγής εμποδίζουν την πλήρη δράση του επαγωγέα (IPTG), με αποτέλεσμα να εντείνεται η φάση προσαρμογής. Με το πέρας του χρόνου, αυτά εξαλείφονται και οι υπόλοιποι παράγοντες κρίνουν την πρωτεϊνοσύνθεση. [99],[100]

Ωστόσο, τα δεδομένα πειράματα λόγω της σύντομης χρονικής τους διάρκειας, παρουσιάζουν κυρίως τις πρώτες δύο φάσεις (προσαρμογή και εκθετική ανάπτυξη).

Θα πρέπει να γίνουν περισσότερα πειράματα σε μεγαλύτερα εύρη χρόνου, ώστε να αποδειχθεί εν τοις πράγμασι, αυτές οι θεωρήσεις. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται μοντέλα που περιγράφουν την επήρεια του χρόνου κι της θερμοκρασίας στα εύρη των δεδομένων πειραμάτων, δηλαδή στις φάσεις της προσαρμογής και της κυτταρικής ανάπτυξης.

Οι εξισώσεις για τον συντελεστή a , θα πρέπει να έχουν δύο οριζόντιες ασύμπτωτες ευθείες ώστε να εμφανίζονται αντίστοιχα οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές του συντελεστή, αλλά και να διαθέτουν και ένα σημείο καμπής, που να προσομοιάζει αυτό των πειραματικών δεδομένων για την παραγωγή της πρωτεΐνης. Να εμφανίζουν δηλαδή έναν σιγμοειδή χαρακτήρα.

Εξισώσεις που καλύπτουν τις παραπάνω προϋποθέσεις, είναι:

$$a(t, T) = a_{max}(T) \cdot (1 - e^{-c_1(T) \cdot t^2 - c_2(T)}) \quad (28)$$

$$a(t, T) = a_{max}(T) \cdot e^{-\frac{c_1(T)}{t^2} - \frac{c_2(T)}{t} \pm c_3(T)} \quad (29)$$

$$a(t, T) = a_{max}(T) \cdot \frac{c_1(T) \cdot t^2 - c_2(T) \cdot t}{c_1(T) \cdot t^2 - c_2(T) \cdot t + c_3(T)} \quad (30)$$

Όπου c_1, c_2, c_3 και $a_{max} > 0$.

Από αυτές τις εξισώσεις, με διάφορες δοκιμές προκύπτει πως καμία εξίσωση δεν παρουσιάζει ικανή ακρίβεια για να μελετηθεί παραπάνω. Οι δοκιμές γίνονται με χρήση ελάχιστων τετραγώνων για κάθε πείραμα ξεχωριστά, χωρίς να υπάρχει στο συγκεκριμένο σημείο συσχέτιση των συντελεστών κάθε μέτρησης με τις υπόλοιπες.

Με προσθήκη ενός ακόμη όμως χρονικού όρου, στην εξίσωση 28 και άρα,

$$a(t, T) = a_{max}(T) \cdot (1 - e^{-c_1(T) \cdot t^2 + c_2(T) \cdot t - c_3(T)}) \quad (31)$$

παρατηρείται πως τα πειράματα περιγράφονται ικανοποιητικά.



Η πιθανότερη εξήγηση για αυτό είναι πως τα πειράματα της επαγωγής, δεν αρχίζουν στο βέλτιστο σημείο και έτσι η επιβραδύνεται ο ρυθμός παραγωγής της πρωτεΐνης με την εισαγωγή του επαγωγέα, σε κάποιες περιπτώσεις, για να αποσυμφορηθεί το κύτταρο από τις μεταβολικές απαιτήσεις.

Από τις εξισώσεις 28 και 31 προκύπτει η αναλυτική έκφραση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης η οποία έχει ως εξής:

$$P(t) = \frac{a_{max} \cdot V_{Ro} \cdot X_o}{2 \cdot \sqrt{c_1} \cdot (V_{Ro} + F \cdot t)} \cdot \left\{ -\sqrt{\pi} \cdot \mu \cdot e^{\frac{(c_2 + \mu)^2}{4 \cdot c_1} - c_3} \cdot \left[\operatorname{erf} \left(\frac{2 \cdot c_1 \cdot t - c_2 - \mu}{2 \cdot \sqrt{c_2}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{-c_2 - \mu}{2 \cdot \sqrt{c_2}} \right) \right] + 2 \cdot \sqrt{c_1} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1) \right\} \quad (32)$$

Έπειτα με χρήση των ελαχίστων τετραγώνων και επαναληπτικής διαδικασίας στο Matlab, εξήχθησαν οι βέλτιστες θερμοκρασιακές εξισώσεις, τα προτεινόμενα μοντέλα, για τους συντελεστές της εξίσωσης.

Αρχικά, θεωρήθηκαν απλές εξισώσεις για τους συντελεστές c_1, c_2, c_3 και σχέση τύπου Arrhenius, για το a_{max} . Οι εξισώσεις αυτές είναι εμπειρικές και αποτελούν τις συνηθέστερες στην βιβλιογραφία. Αυτές είναι:

$$a_{max}(T) = a_{max,o} \cdot e^{-k_1 \cdot T} \quad (33)$$

$$c_1(T) = k_1 \cdot e^{-\frac{k_2}{T}} \quad (34)$$

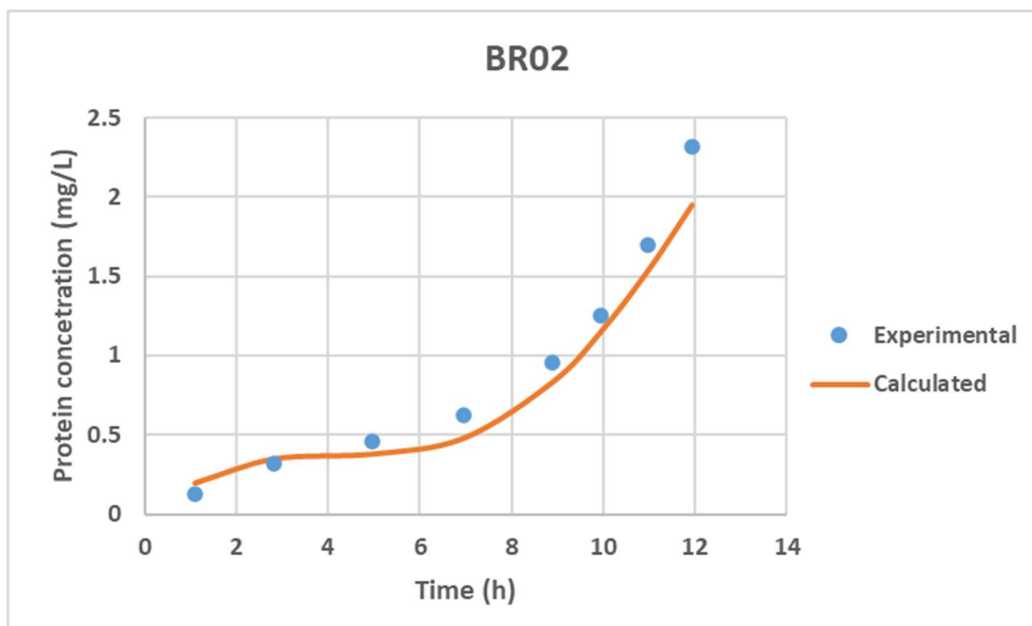
$$c_2(T) = k_1 \cdot e^{-\frac{k_2}{T}} \quad (35)$$

$$c_3(T) = \frac{k_1}{k_2 + T} \quad (36)$$

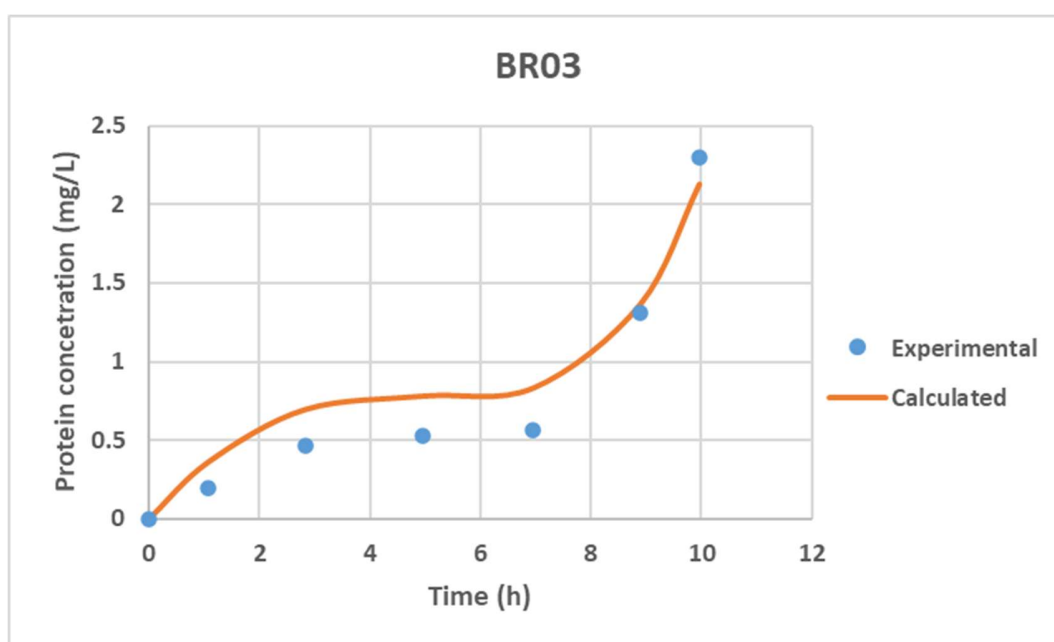
	$a_{max,o}$	k_1	k_2
a_{max}	1.6593E-01	1.4979E+02	-
c_1	-	9.1301E-16	8.7462E+02
c_2	-	1.4404E-13	7.9602E+02
c_3	-	2.5267E-01	-2.7737E+01

Πίνακας XVI – Συντελεστές εξισώσεων 33 έως 36

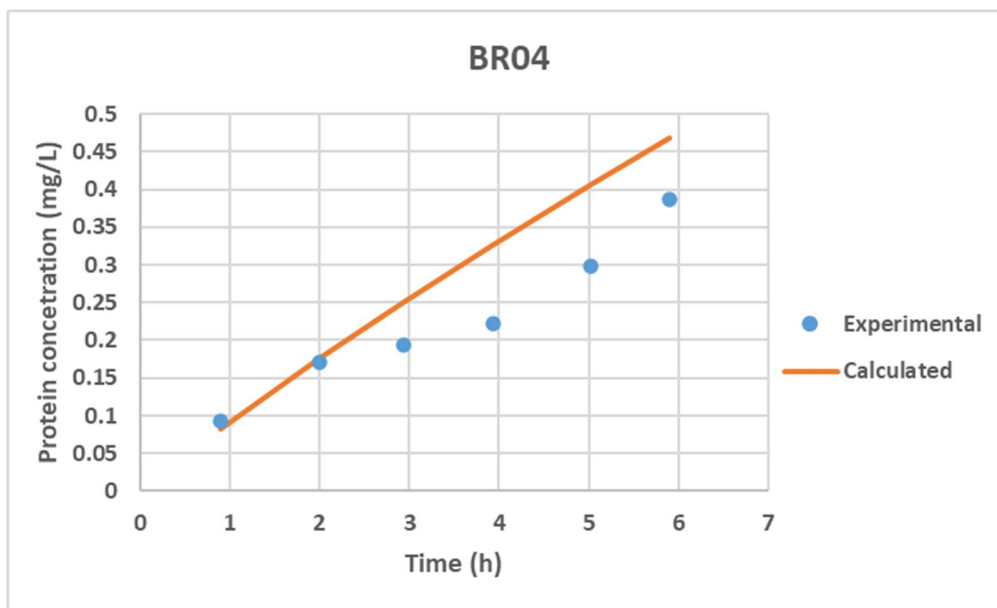
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα παραγωγής πρωτεΐνης με βάση το μοντέλο των απλών εξισώσεων για όλα τα πειράματα με το 6^ο πείραμα να χρησιμοποιείται ως δοκιμαστικό, δηλαδή σε αυτό να εφαρμόζεται το εξαγόμενο μοντέλο, για να φανεί η αξιοπιστία του.



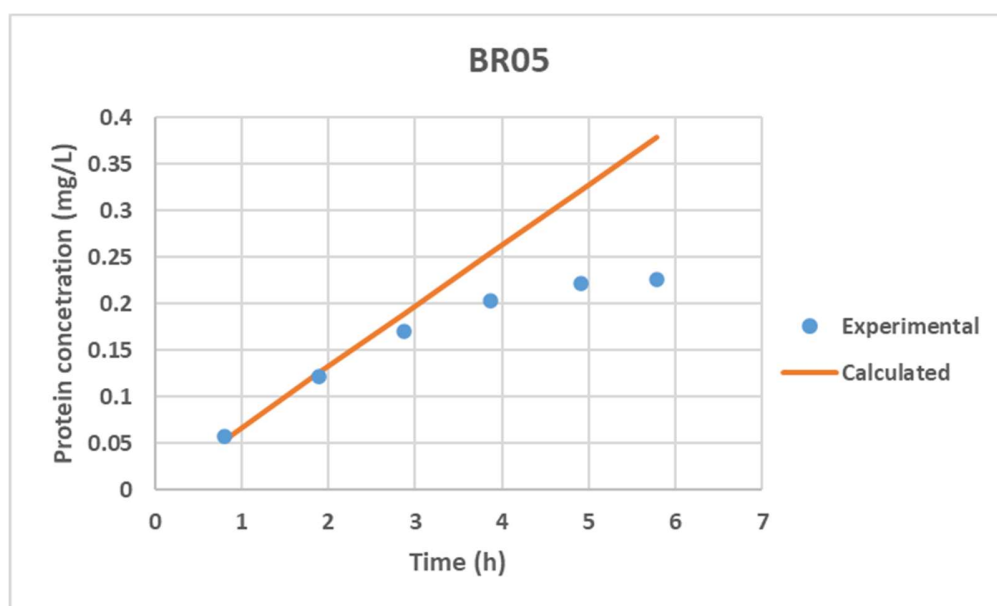
Γράφημα 17 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 1^ο μοντέλο, για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



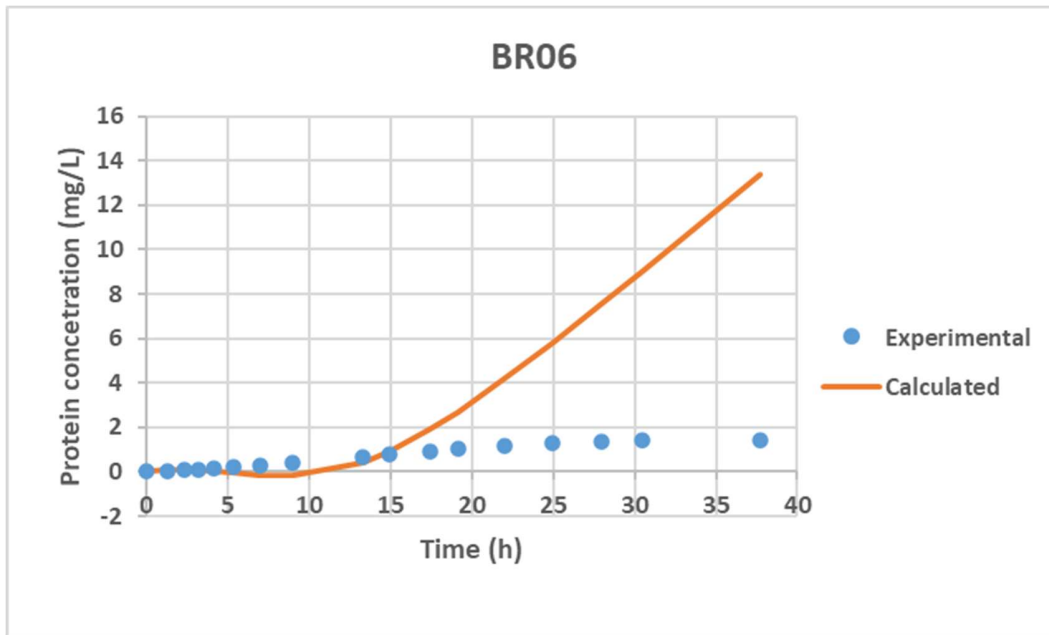
Γράφημα 18 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 1^ο μοντέλο, για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



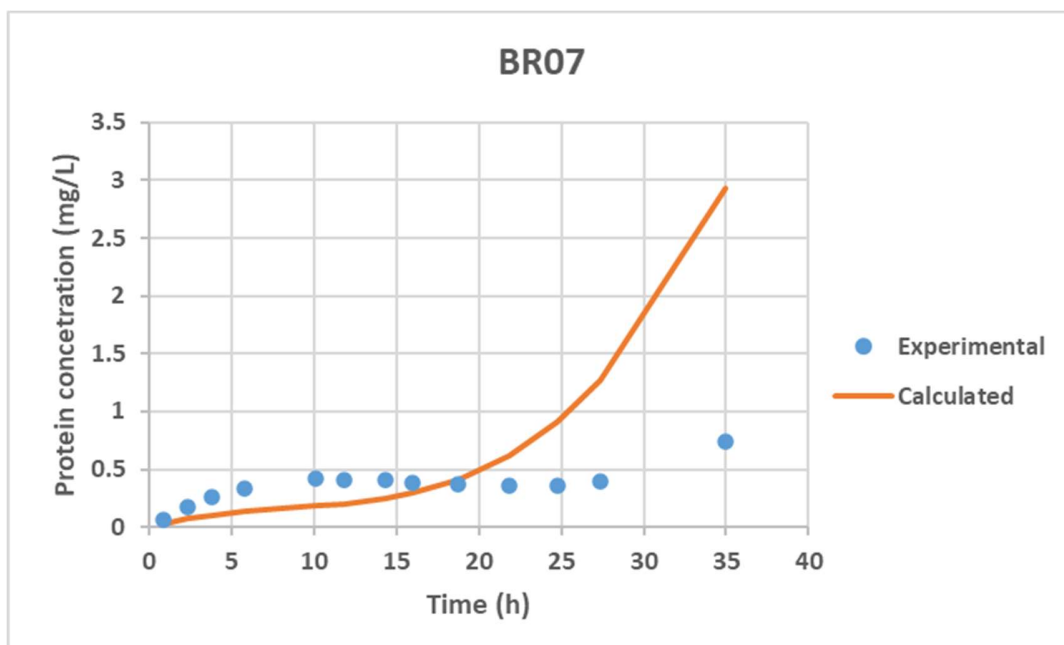
Γράφημα 19 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 1^ο μοντέλο, για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 20 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 1^ο μοντέλο, για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 21 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 1^ο μοντέλο, για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 22 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 1^ο μοντέλο, για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Παρατηρείται, πως το συγκεκριμένο μοντέλο βρίσκει εφαρμογή με σχετικά καλή ακρίβεια στα πειράματα με μικρή χρονική διάρκεια, ενώ μετά τις 15 ώρες επαγωγής, δηλαδή στο 6^ο και το 7^ο πείραμα, το μοντέλο αποκλίνει κατά πολύ από τις πειραματικές τιμές.

Συνεπώς έγινε η παραδοχή, πως απαιτούνται πιο σύνθετες εξισώσεις που να περιγράφουν τους συντελεστές της εξίσωσης 31, ενώ μόνο ο συντελεστής a_{max} παραμένει στην υπόθεση της σχέσης τύπου Arrhenius.

Αυτές οι εξισώσεις που συνθέτουν το 2^ο μοντέλο είναι:

$$a_{max} = a_{max,o} \cdot e^{-\frac{k_1}{T}} \quad (37)$$

$$c_1 = \frac{e^{\frac{k_1}{T} + k_2}}{c_2 - k_3 \cdot a_{max}} \quad (38)$$

$$c_2 = k_3 \cdot e^{\frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2}{T}} \quad (39)$$

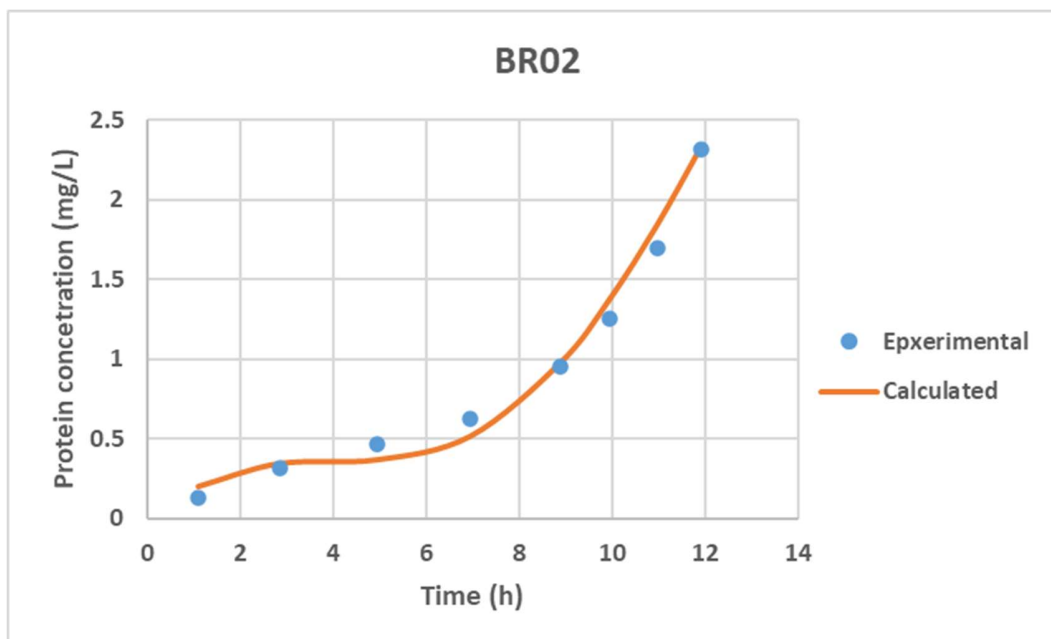
$$c_3 = \ln\left(\frac{a_{max}}{k_1 \cdot T + k_2}\right) \quad (40)$$

Στο μοντέλο αυτό, ομοίως με το προηγούμενο το 6^ο πείραμα χρησιμοποιείται ως δοκιμαστικό. Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους. Πρώτον το πείραμα είναι ένα από τα δύο στα οποία δεν εμφανίζεται σημείο καμπής στην παραγωγή της πρωτεΐνης και είναι επιθυμητό, το μοντέλο αν εκπαιδευτεί σε μετρήσεις που διαθέτουν, ώστε να μπορεί να το προβλέπει και δεύτερον έχει πολλά πειραματικά σημεία, πράγμα που σημαίνει πως ένα ικανό μοντέλο θα μπορεί να προσομοιάσει τα περισσότερα.

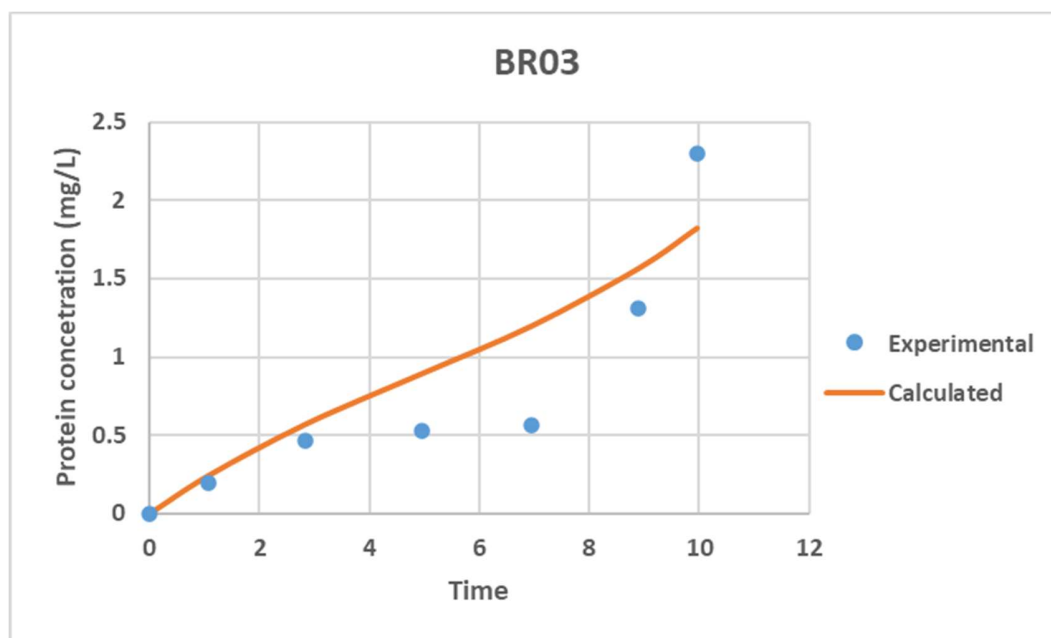
	$a_{max,o}$	k_1	k_2	k_3
a_{max}	7.5760E-02	1.2337E+02	-	-
c_1	-	1.6825E+03	-6.4646E+01	7.5110E-01
c_2	-	3.2159E+04	-1.4652E+03	2.3429E+04
c_3	-	2.3760E-04	-6.1582E-03	-

Πίνακας XVII – Συντελεστές εξισώσεων 37 έως 40

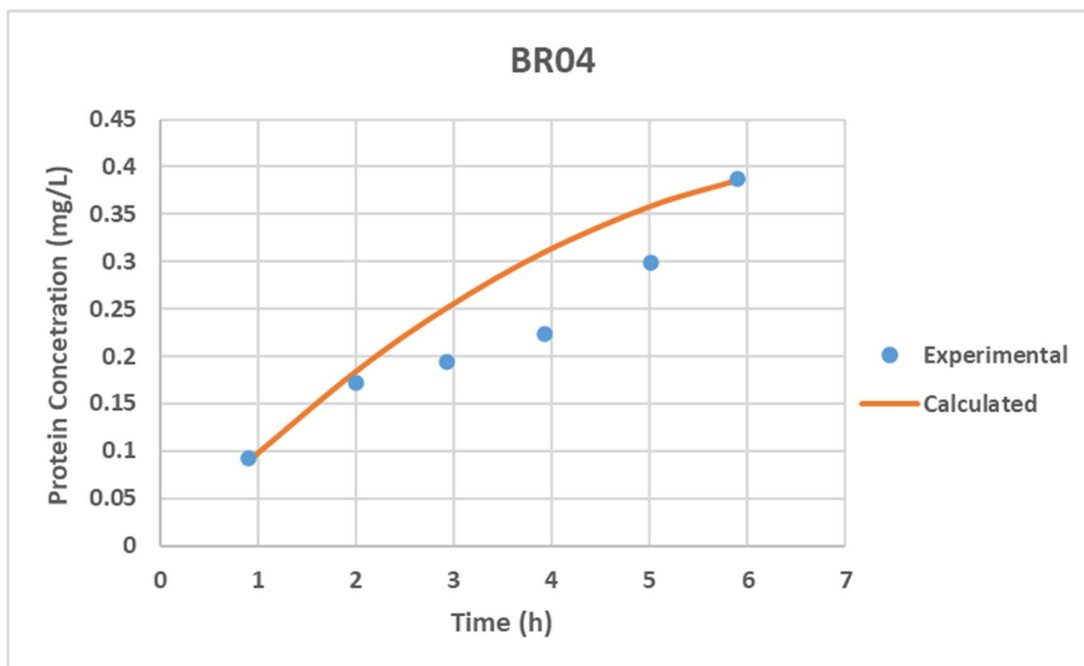
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα παραγωγής πρωτεΐνης με βάση το 2^ο μοντέλο για όλα τα πειράματα.



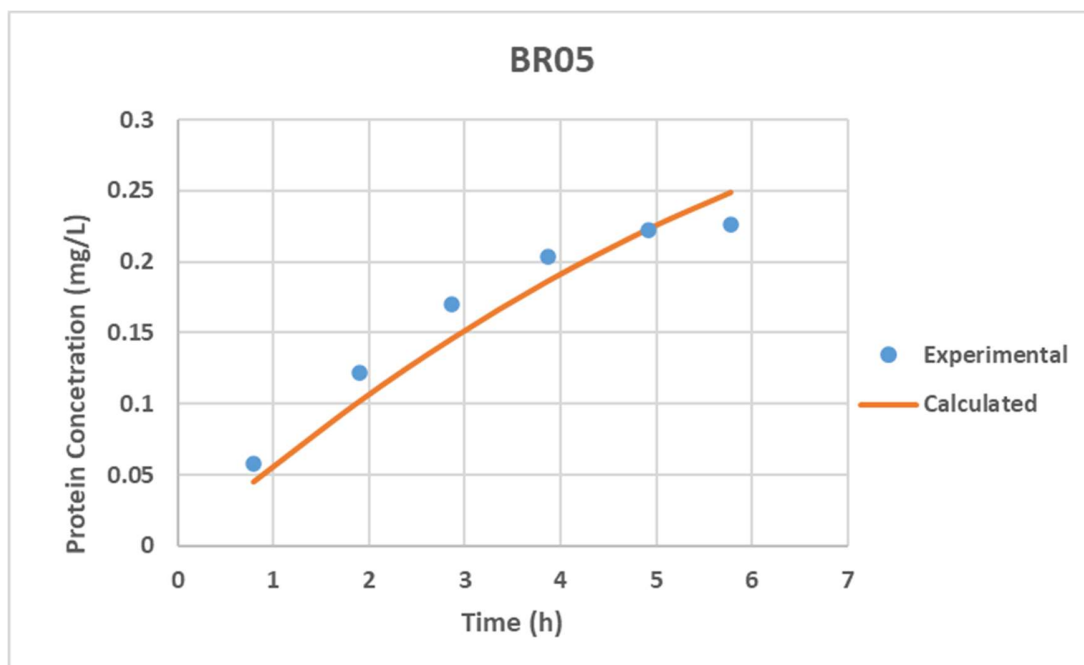
Γράφημα 23 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 2^ο μοντέλο, για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



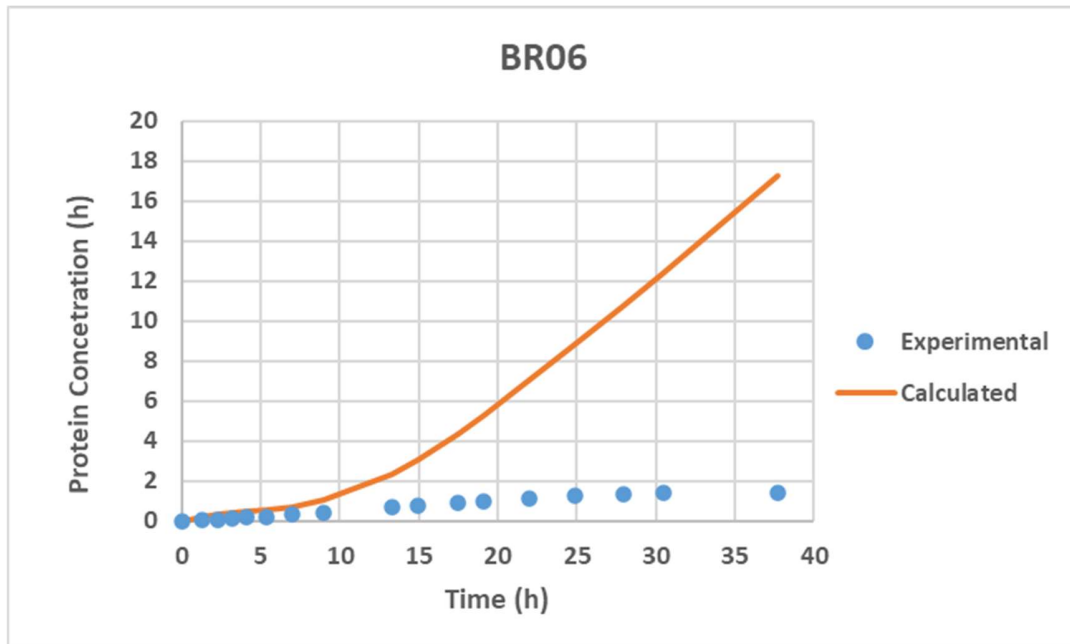
Γράφημα 24 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 2^ο μοντέλο, για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



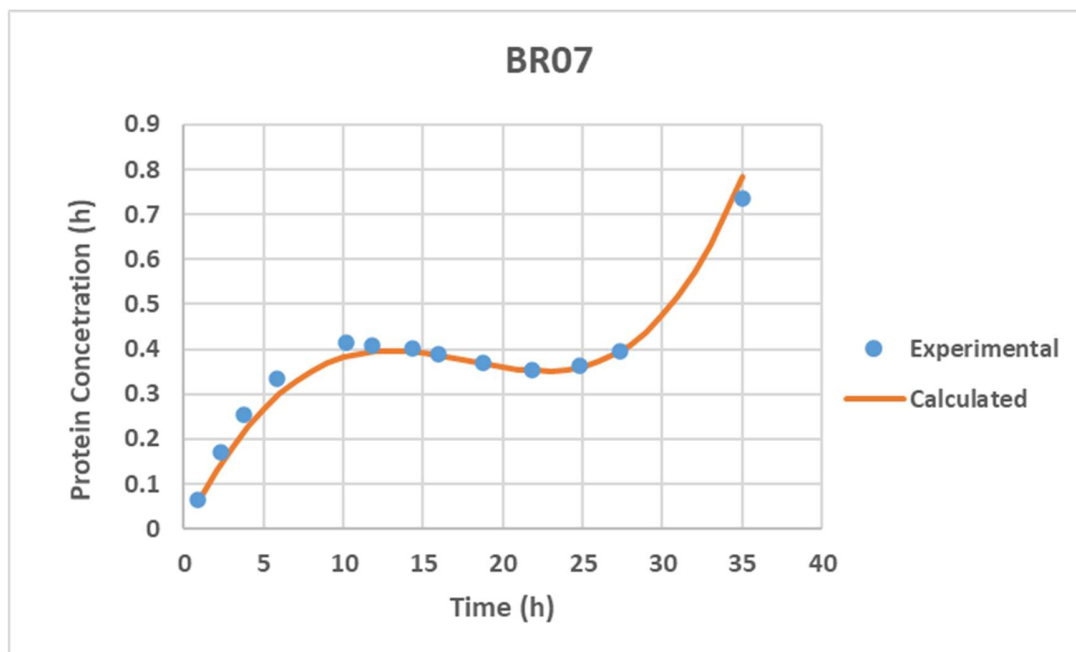
Γράφημα 25 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 2^ο μοντέλο, για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 26 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 2^ο μοντέλο, για το πείραμα BR05. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 27 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 2^ο μοντέλο, για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 28 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 2^ο μοντέλο, για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Όπως και στο προηγούμενο μοντέλο και σε αυτό δεν υπάρχει πλήρης κάλυψη των πειραμάτων. Στο παρόν ωστόσο μοντέλο, τα πειράματα 2,3,5 και 7 περιγράφονται αρκετά ικανοποιητικά, ενώ στο πείραμα 4 δεν εντοπίζεται σημείο καμπής. Όταν όμως το 2^ο μοντέλο εφαρμόζεται στο πείραμα 6, τότε αυτό αποτυγχάνει. Τα παραπάνω οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι, το πείραμα 6 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον τρόπο υπολογισμού των εξισώσεων κάθε συντελεστή του μοντέλου και οι εξισώσεις αυτές πιθανότατα να είναι τόσο, πολύπλοκες που εμφανίζεται το φαινόμενο του υπερορισμού στα δεδομένα.

Προκύπτει έτσι το 3^ο μοντέλο, που χρησιμοποιεί το πείραμα 3 ως δοκιμαστικό, αφού είναι ένα από τα πειράματα με τις λιγότερες μετρήσεις, με το μειονέκτημα ωστόσο ότι αποβάλλεται ένα σετ δεδομένων με σημείο καμπής από την διαδικασία εκπαίδευσης του μοντέλου.

Και σε αυτή την περίπτωση εμπειρικές εξισώσεις χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στον συντελεστή a_{max} στην εξίσωση Arrhenius ο εκθετικός όρος έχει πλέον πολυωνυμική μορφή.

Οι εξισώσεις που συνθέτουν το 3^ο μοντέλο είναι:

$$a_{max} = a_{max,o} \cdot e^{k_1 \cdot T^2 + k_2 \cdot T} \quad (41)$$

$$c_1 = |k_1 \cdot T^3 + k_2 \cdot T^2 + k_3 \cdot T + k_4| \quad (42)$$

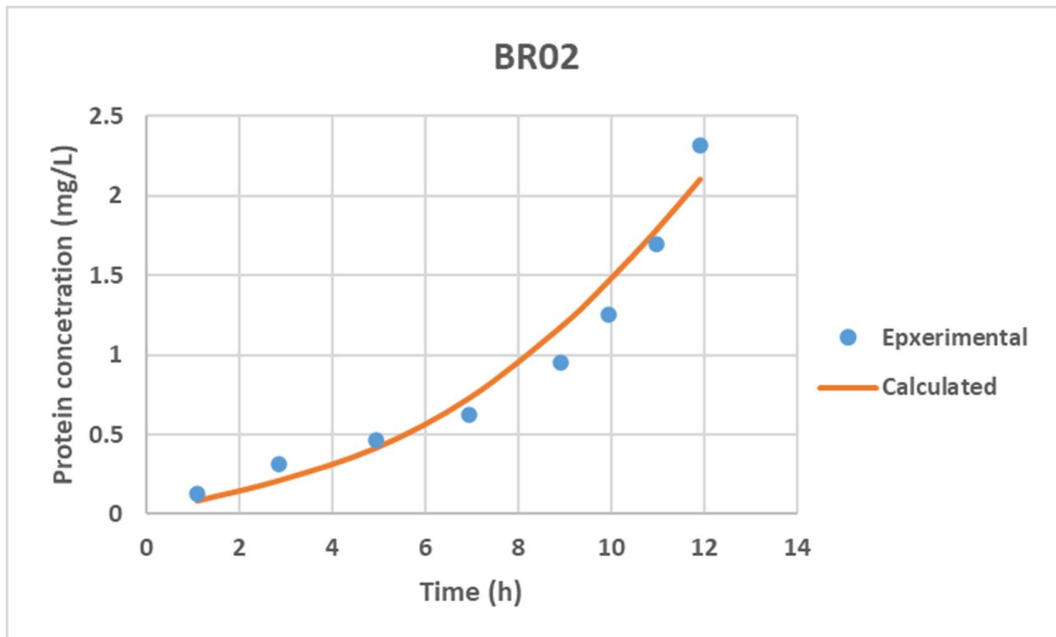
$$c_2 = |k_1 \cdot T^3 + k_2 \cdot T^2 + k_3 \cdot T + k_4| \quad (43)$$

$$c_3 = \frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2 + a_{max}}{T} + k_3 \quad (44)$$

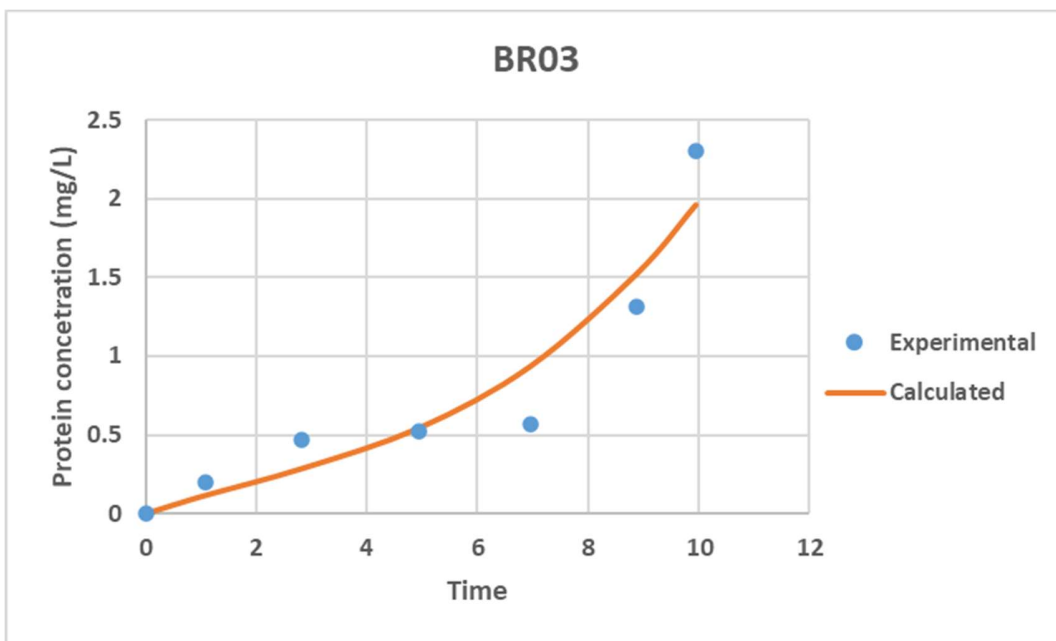
	$a_{max,o}$	k_1	k_2	k_3	k_4
a_{max}	2.149740E-19	-3.062000E-02	2.127810E+00	-	-
c_1	-	-4.964468E-04	4.868787E-02	-1.583450E+00	1.708132E+01
c_2	-	-2.066500E-03	2.019275E-01	-6.540607E+00	7.024986E+01
c_3	-	4.962185E+03	-2.772727E+02	3.839120E+00	-

Πίνακας XVIII – Συντελεστές εξισώσεων 41 έως 44

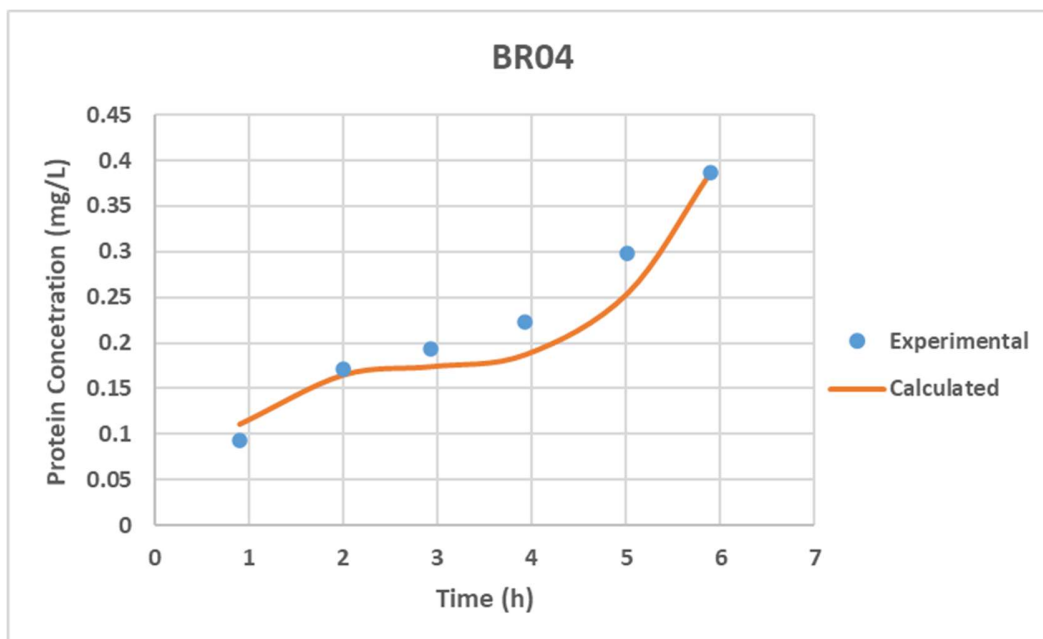
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα παραγωγής πρωτεΐνης με βάση το 3^ο μοντέλο για όλα τα πειράματα.



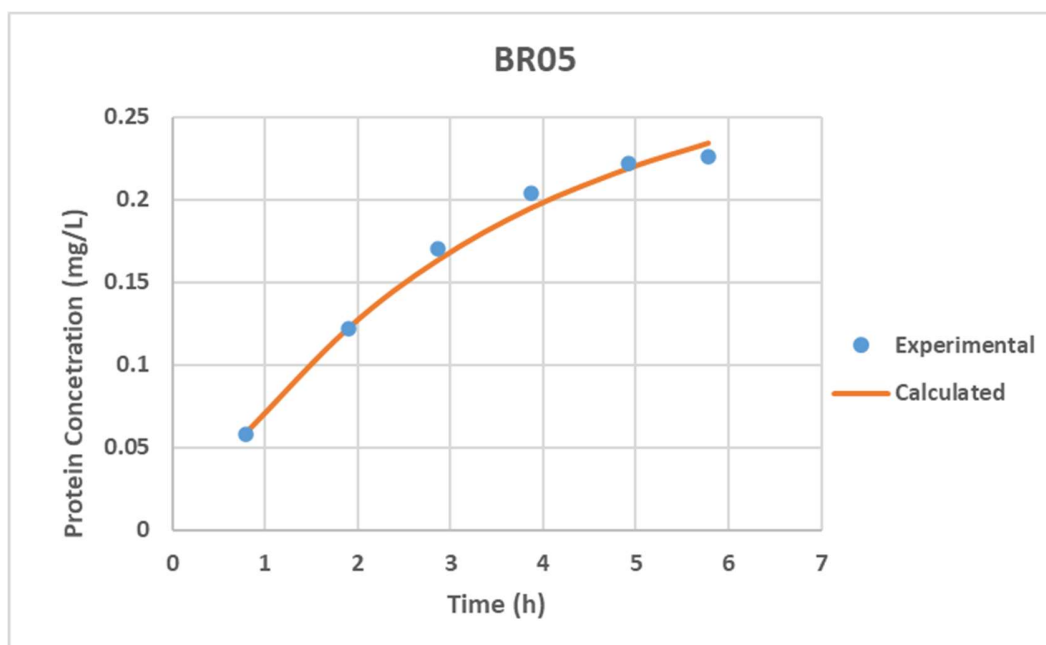
Γράφημα 29 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 3^ο μοντέλο, για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



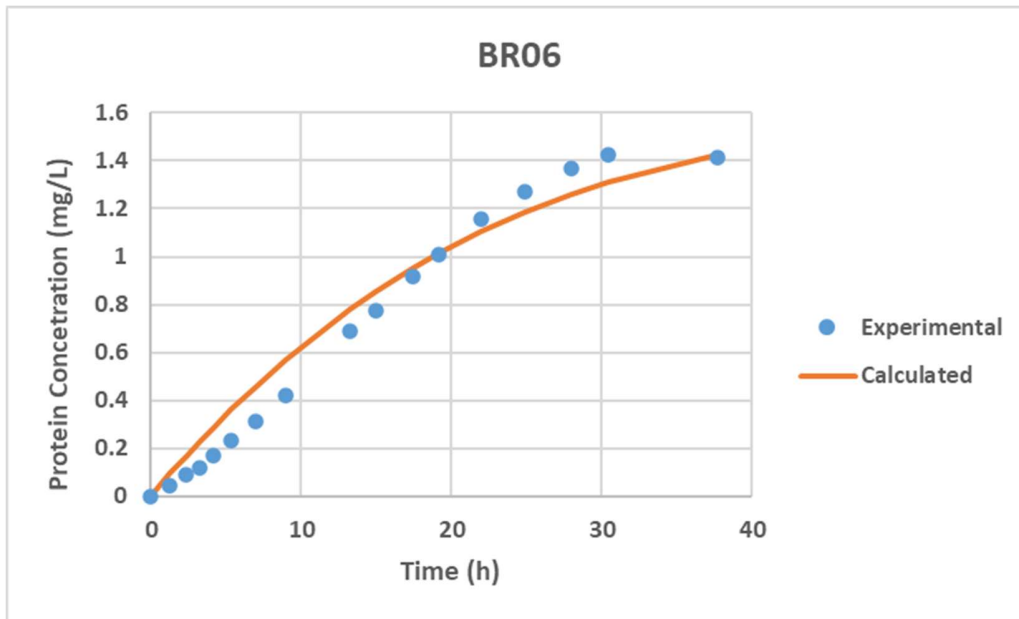
Γράφημα 30 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 3^ο μοντέλο, για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



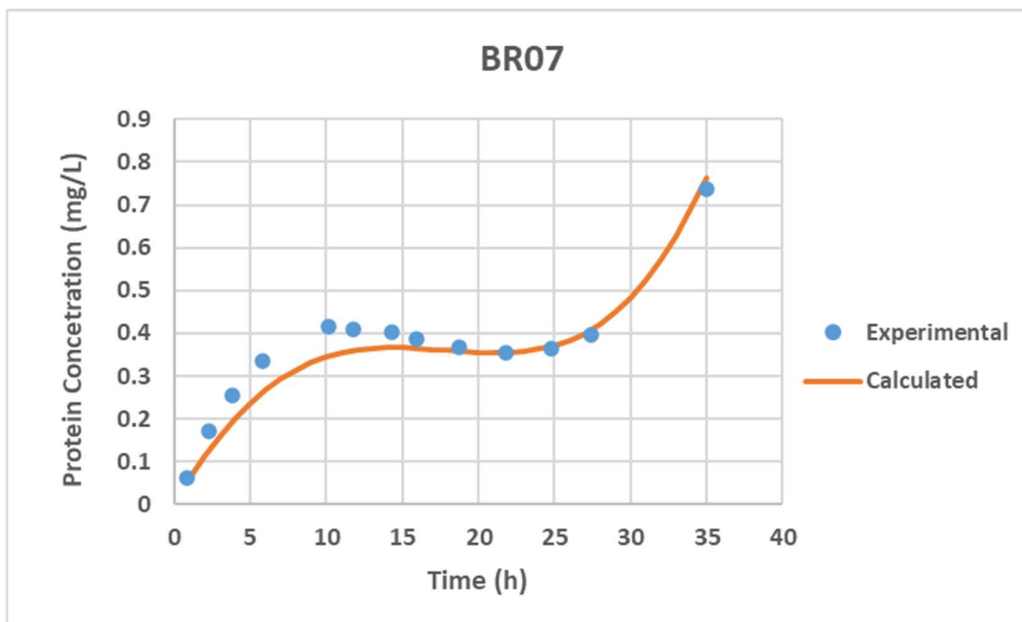
Γράφημα 31 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 3^ο μοντέλο, για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 32 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 3^ο μοντέλο, για το πείραμα BR05. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 33 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 3^ο μοντέλο, για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 34 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 3^ο μοντέλο, για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Με το μοντέλο αυτό φαίνεται πως περιγράφονται πολύ ικανοποιητικά όλα τα πειράματα, ενώ μόνο στο 2^ο, ενώ φαίνεται πως υπάρχει σημείο καμπής, δεν εμφανίζεται στα δεδομένα του μοντέλου. Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα αλλά και στο γεγονός πως για να εξαχθεί ένα συνολικό μοντέλο ευρείας εφαρμογής, υπάρχουν σε όλα τα πειράματα μικρές αποκλίσεις. Παρακάτω, παρουσιάζεται συγκριτικός πίνακας αποκλίσεων των υπολογισμένων τιμών και των πειραματικών, μεταξύ του μοντέλου, αυτού με τον μεταβαλλόμενο συντελεστή a , του επομένου μοντέλου και της βιβλιογραφικής υπόθεσης, ότι το a παραμένει σταθερό σε όλη την διάρκεια κάθε πειράματος.

Ένα ακόμη μοντέλο με απλούστερες εξισώσεις εξήχθη από τα πειραματικά δεδομένα, χωρίς όμως να περιλαμβάνει το πείραμα 5 στην θερμοκρασία δηλαδή των 37 °C. Αυτό γίνεται με την λογική πως ελλείπει πειραμάτων μεταξύ 33 °C και 35 °C δεν μπορεί να προκαταλαμβάνεται η συμπεριφορά της βιομάζας και κατά συνέπεια η παραγωγή πρωτεΐνης με απόλυτη ακρίβεια.

Έτσι προκύπτει το 4^ο μοντέλο εύρους θερμοκρασιών από 28 °C έως 33 °C, με τις εξής εξισώσεις να το αποτελούν:

$$a_{max} = a_{max,o} \cdot e^{-\frac{k_1}{T}} \quad (45)$$

$$c_1 = \left| \frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2}{T} + k_3 \right| \quad (46)$$

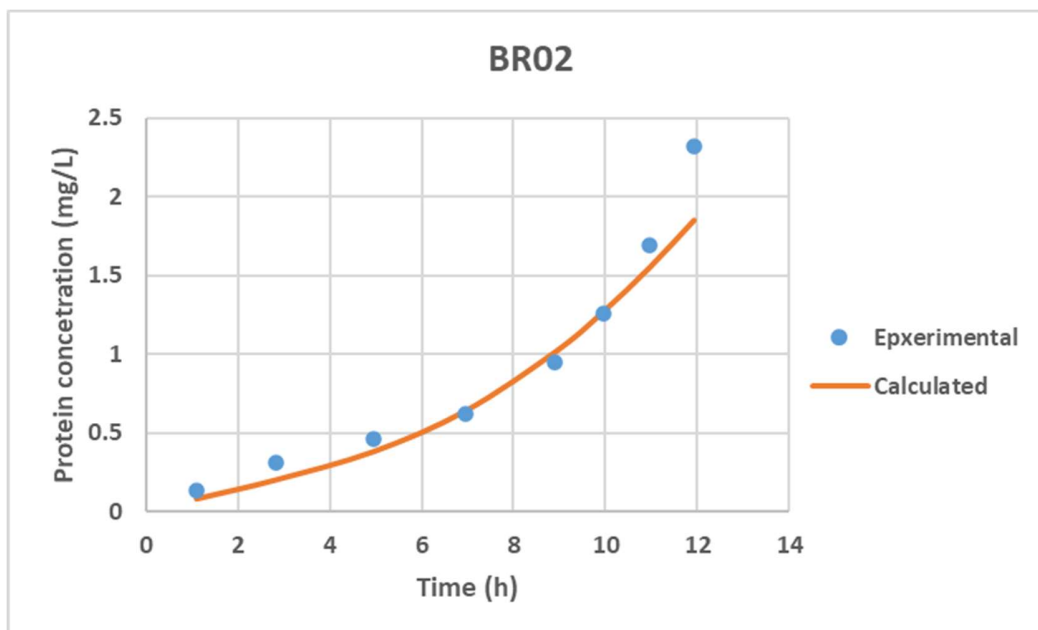
$$c_2 = \left| \frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2}{T} + k_3 \right| \quad (47)$$

$$c_3 = k_1 \cdot T^2 + k_2 \cdot T + k_3 \quad (48)$$

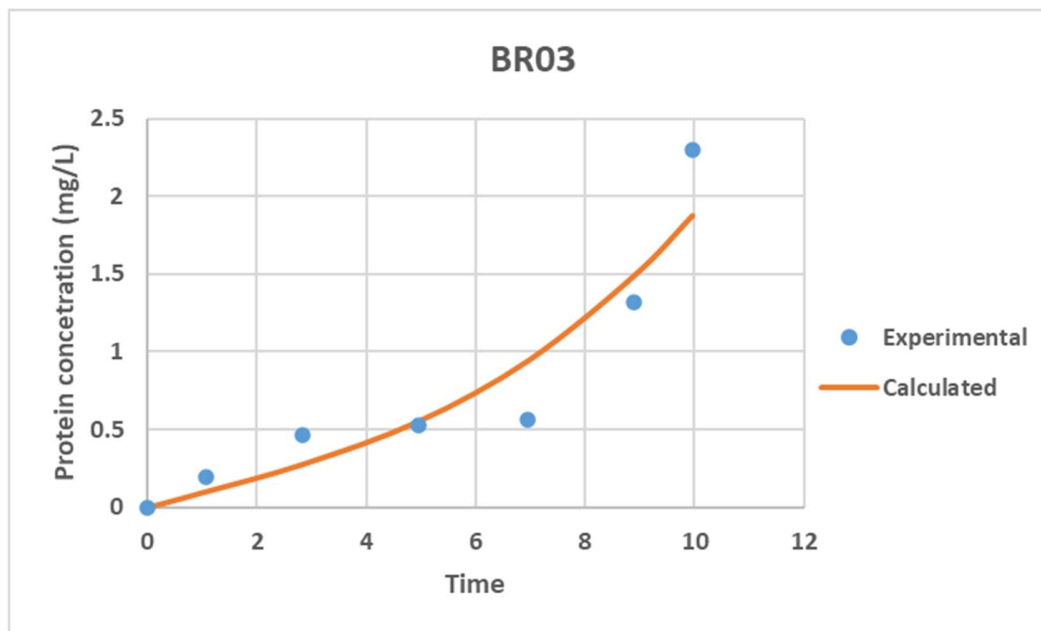
	$a_{max,o}$	k_1	k_2	k_3
a_{max}	3.71805E+00	2.43672E+02	-	-
c_1	-	2.40785E+03	-1.57968E+02	2.58447E+00
c_2	-	9.63838E+03	-6.34169E+02	1.04155E+01
c_3	-	9.37400E-03	6.13180E-01	1.01032E+01

Πίνακας XIX – Συντελεστές εξισώσεων 44 έως 48

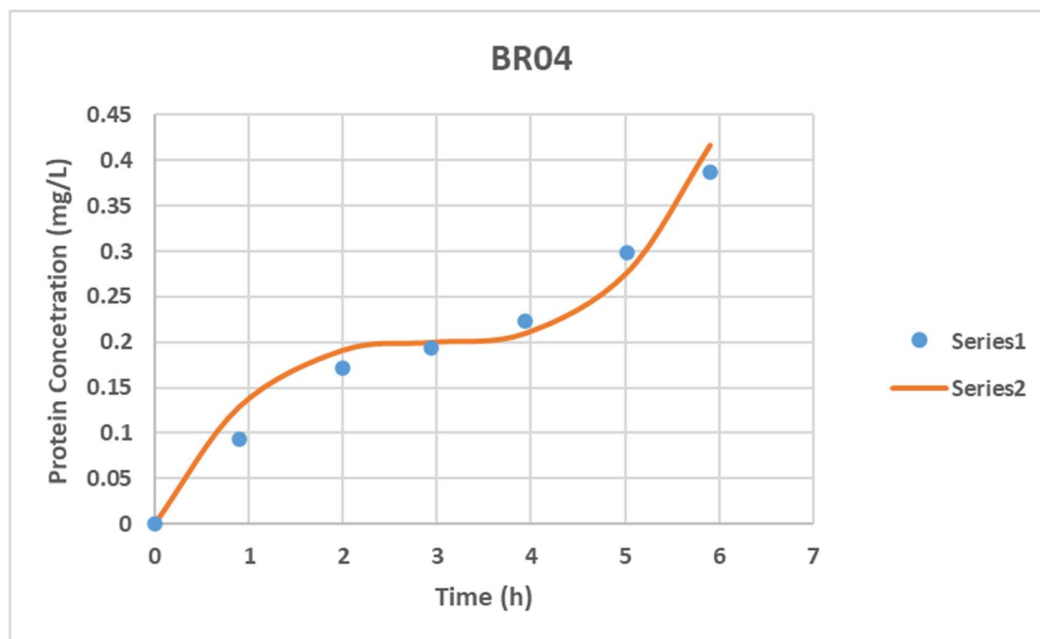
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα παραγωγής πρωτεΐνης με βάση το 5^ο μοντέλο για όλα τα πειράματα. Να σημειωθεί πως και σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιείται το 3^ο πείραμα ως δοκιμαστικό.



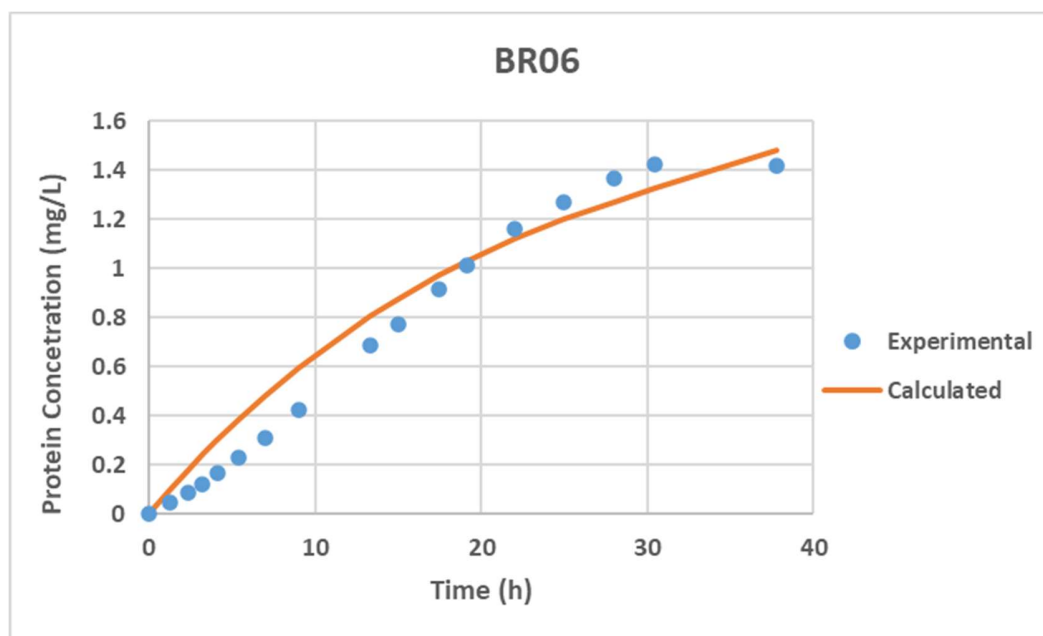
Γράφημα 35 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 4^ο μοντέλο, για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



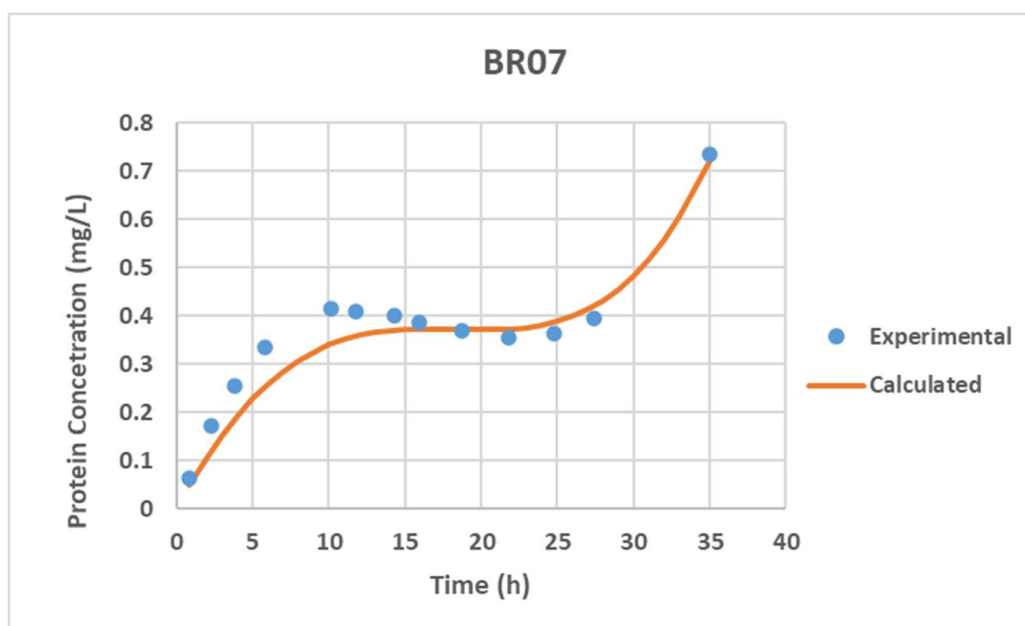
Γράφημα 36 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 4^ο μοντέλο, για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 37– Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 4^ο μοντέλο, για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 38 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 4^ο μοντέλο, για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 39 – Συγκέντρωση πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου με μεταβαλλόμενο α , με βάση το 4^ο μοντέλο, για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)

Ομοίως με το 3^ο μοντέλο και το 4^ο, παρουσιάζει πολύ καλή ακρίβεια σε όλα τα πειράματα.

	T (oC)	REP%		
		Constant a	Model 3	Model 4
BR02	28	27%	19%	16%
BR03	30	36%	30%	27%
BR04	33	11%	11%	7%
BR05	37	21%	3%	-
BR06	29	12%	12%	11%
BR07	32	42%	11%	13%

Πίνακας XX – Συγκεντρωτικές τιμές σφαλμάτων για την θεώρηση σταθερού συντελεστή α και των μοντέλων 3 & 4

Πράγματι και τα δύο μοντέλα παρέχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία έναντι του βιβλιογραφικού συντελεστή α , ενώ οι τιμές των σφαλμάτων, όπως φαίνεται και στα άνωθεν γραφήματα, έχουν ακόμη χαμηλότερο μέγεθος, στις μετρήσεις από χρόνους μεγαλύτερους των τεσσάρων με πέντε ωρών.

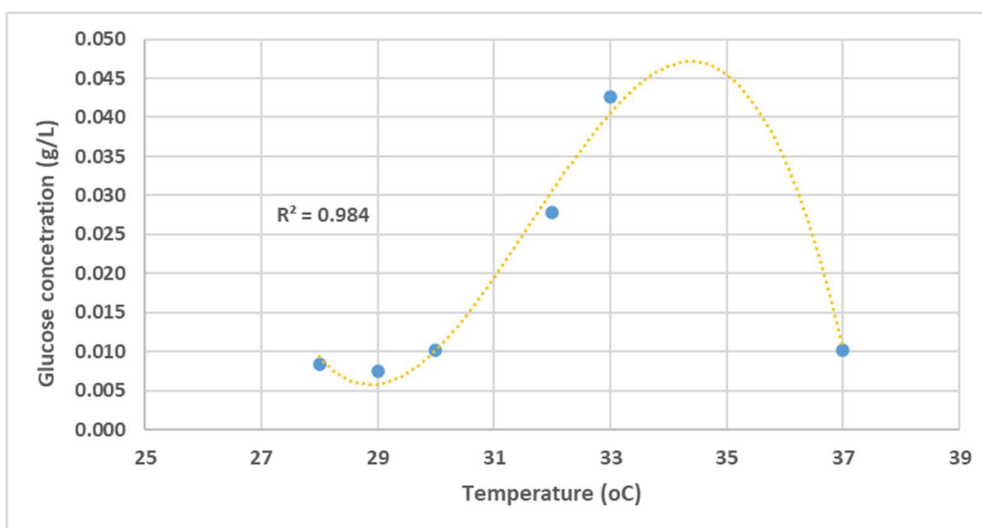
Συνολική περιγραφή

Αφού εξήχθη το μοντέλο της παραγωγής της πρωτεΐνης, λύνονται έπειτα όλα τα ισοζύγια μάζας, ώστε να περιγράψει συνολικά η διεργασία των τριών φάσεων και μετέπειτα να βρεθεί το ιδανικό σημείο λειτουργίας με σκοπό την μέγιστη παραγωγή σε πρωτεΐνη.

Αρχικά με βάση τις μετρήσεις για την συγκέντρωση της γλυκόζης στην φάση της επαγωγής, εξάγεται με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η συνάρτηση $S_{ind}(T)$, που πρακτικά αποτελεί την συσχέτιση της μέσης τιμής γλυκόζης στον αντιδραστήρα κάθε πειράματος με την θερμοκρασία.

Αυτή είναι:

$$S_{ind}(T) = -4.953 \cdot 10^{-4} \cdot T^3 + 4.701 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 - 1.476 \cdot T + 15.351 \quad (49)$$



Γράφημα 40 – Εξάρτηση συγκέντρωσης γλυκόζης με την θερμοκρασία κατά την επαγωγή

Έχοντας υπολογίσει το βέλτιστο σει παραμέτρων στην παραγωγή της βιομάζας στους 37 °C ($\mu_{max} = 0.87$, $K_s = 0.214$), πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο αυτό επηρεάζεται με την προσθήκη του επαγωγέα και την μεταβολή της θερμοκρασίας.

Με βάση την βιβλιογραφία η παράμετρος K_s με την θερμοκρασιακά υφίστανται ανεπαίσθητες μεταβολές, ενώ είναι ανεξάρτητο της παρουσίας ή όχι επαγωγέα. Αντίθετα την μεγαλύτερη μεταβολή φαίνεται να την παρουσιάζει η παράμετρος μ_{max} .^{[96],[101]}

Διάφορα μοντέλα περιγράφουν την μεταβολή της παραμέτρου αυτής, ωστόσο με βάση τα δεδομένα πειράματα, μόνο σε ένα πείραμα, στο 5^ο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία παραμένει σταθερή πριν και μετά την επαγωγή, άρα μόνο από αυτό εξάγεται ένα συμπέρασμα για την επίρεια του επαγωγέα.



Συνεπώς, μια απλή σχέση εφαρμόζεται για να περιγράψει τα παραπάνω:

$$\mu_{max,ind,37^{\circ}C} = \mu_{max,37^{\circ}C} \cdot c_{ind} \quad (50)$$

Όπου,

$$\mu_{max,ind} = \mu_{ind} \cdot \frac{K_s + S_{ind}}{S_{ind}} \quad (51)$$

Με το παράγοντα της επαγωγής να υπολογίζεται $c_{ind} = 0.775$.

Ύστερα αφού υπολογίζεται το θεωρητικό μ , χωρίς να περιλαμβάνεται η θερμοκρασιακή εξάρτηση, για κάθε μέτρηση στην επαγωγή, όπου:

$$\mu_{ind,theo} = \frac{\mu_{max} \cdot c_{ind} \cdot S_{ind}}{K_s + S_{ind}} \quad (52)$$

Ενώ προστίθεται και ένας διορθωτικός όρος στην από πάνω σχέση, που έχει ως σκοπό να μεταδώσει το οποιοδήποτε σφάλμα ή όποια συνθήκη είναι διαφορετική στα εκάστοτε πειράματα και δεν γνωρίζει ο πειραματιστής από την διαλείπουσα φάση, στην ημιδιαλείπουσα και εν τέλει στην επαγωγή, με αυτό να ισούται:

$$f_{correction} = \frac{\mu_{max}}{\mu_{max,exp}} \quad (53)$$

Όπου $\mu_{max,exp}$ ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας, που υπολογίστηκε για κάθε πείραμα στην διαλείπουσα φάση και παρουσιάζεται στον πίνακα XI.

Αρα συνολικά προσθέτοντας και την θερμοκρασιακή εξάρτηση, προκύπτει πώς:

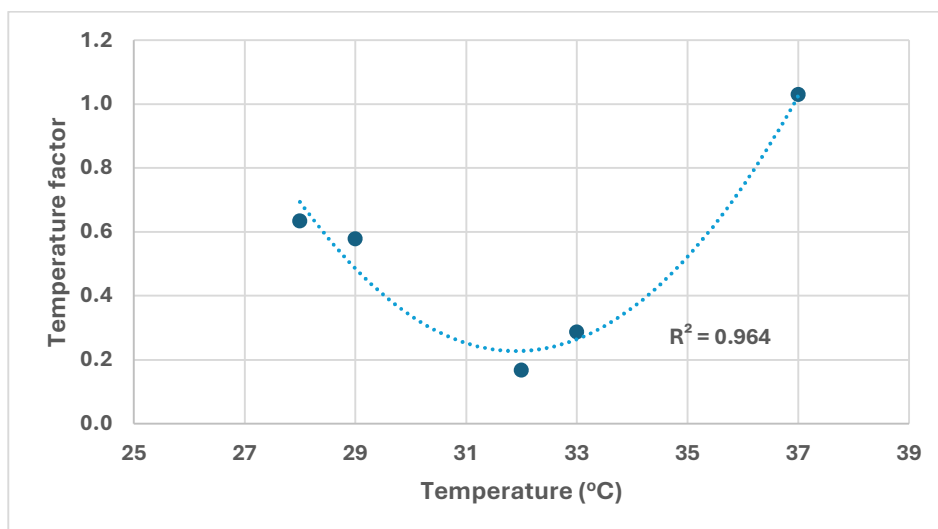
$$\mu_{ind} = \mu_{ind,theo} \cdot f_{correction} \cdot G(T) = \tilde{\mu}_{ind,theo} \cdot G(T) \quad (54)$$

$$\Leftrightarrow G(T) = \frac{\mu_{ind}}{\mu_{ind,theo}} \quad (55)$$

Όπου $G(T)$, ο θερμοκρασιακός παράγοντας.

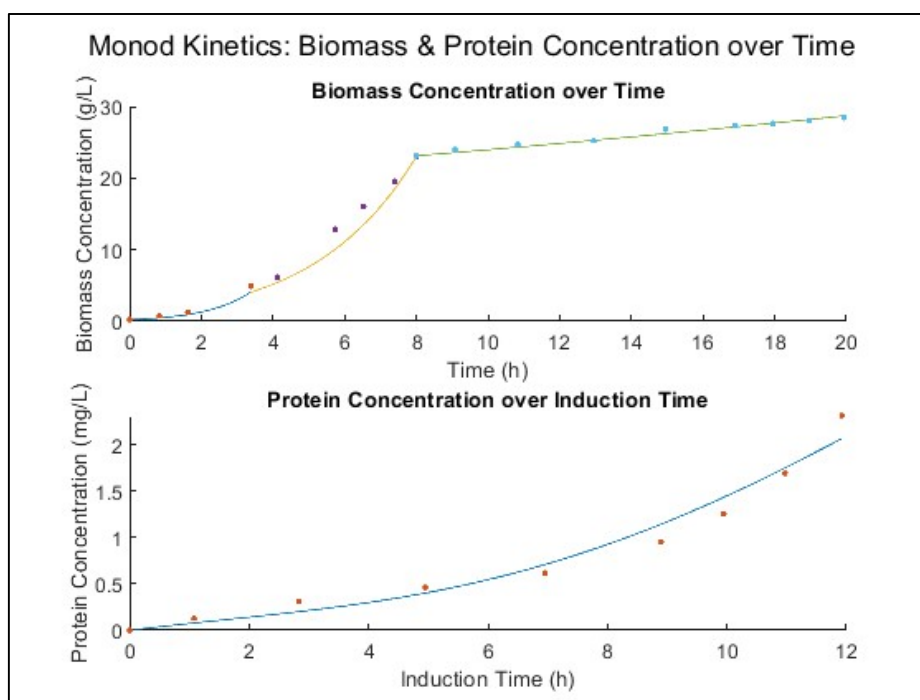
Με την χρήση των ελαχίστων τετραγώνων, υπολογίζεται η $G(T)$ ως:

$$G(T) = 3.2028 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 - 2.0513 \cdot T + 33.0845 \quad (56)$$

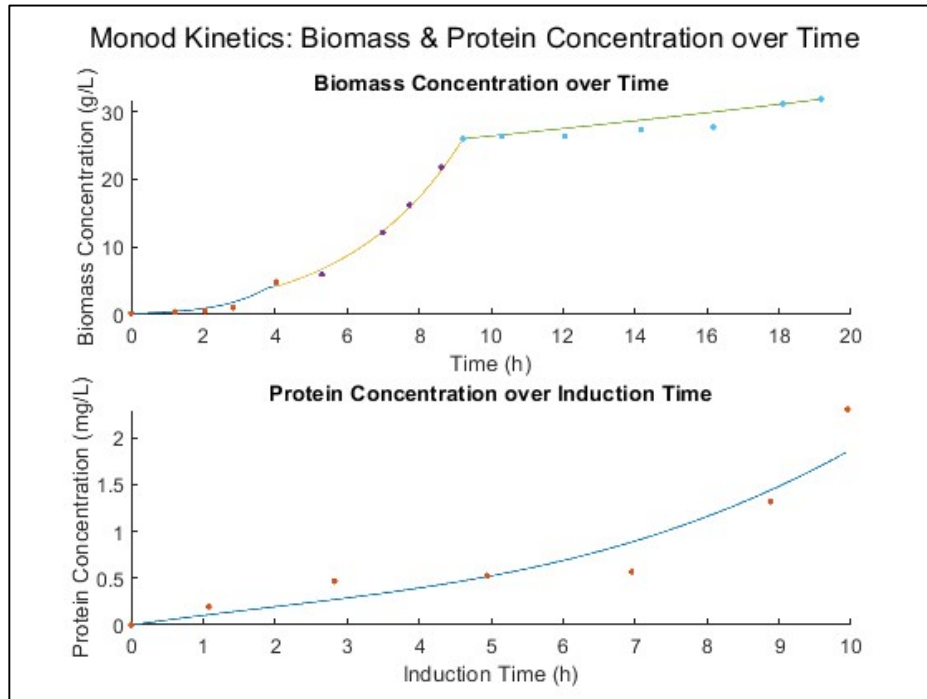


Γράφημα 41 – Επίρεια της θερμοκρασίας στα πειράματα της επαγωγής

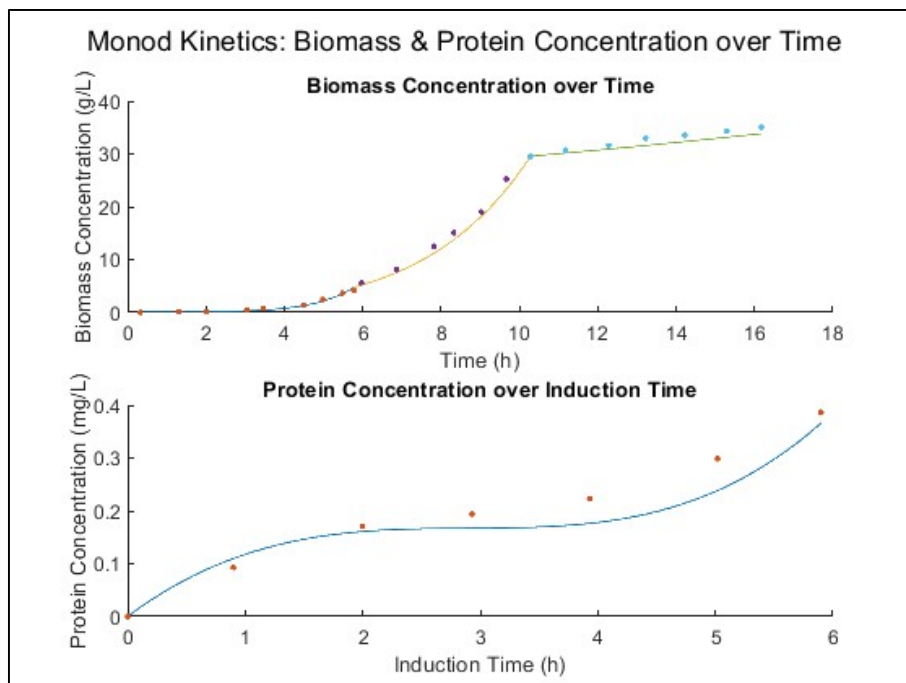
Συνεπώς τα πειράματα BR02 έως BR07 μπορούν πλέον να περιγραφούν πλήρως και παρουσιάζονται κάτωθεν:



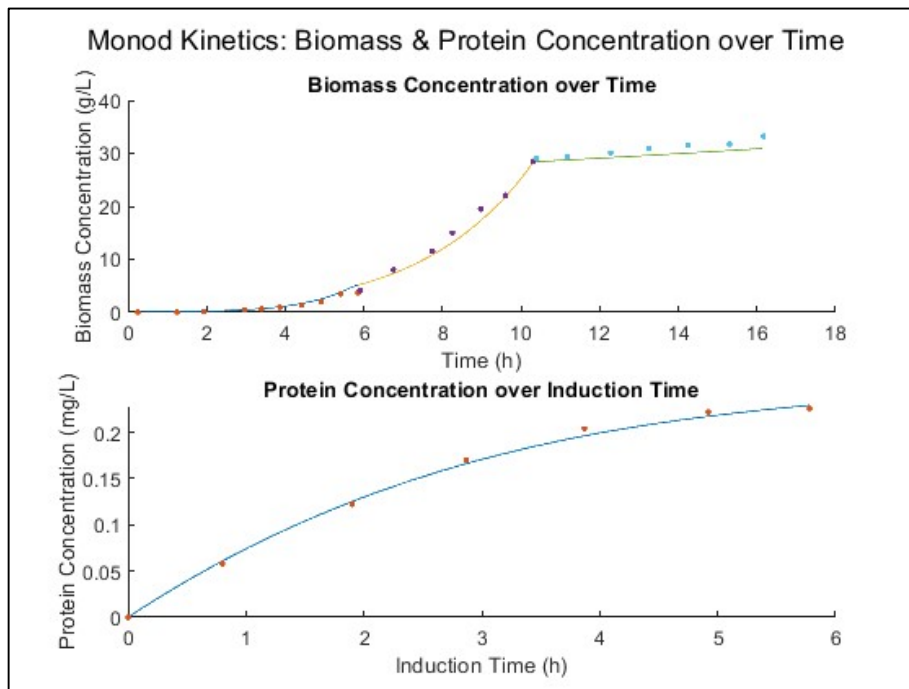
Γράφημα 42 – Συγκέντρωση βιομάζας και πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου, για το πείραμα BR02. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



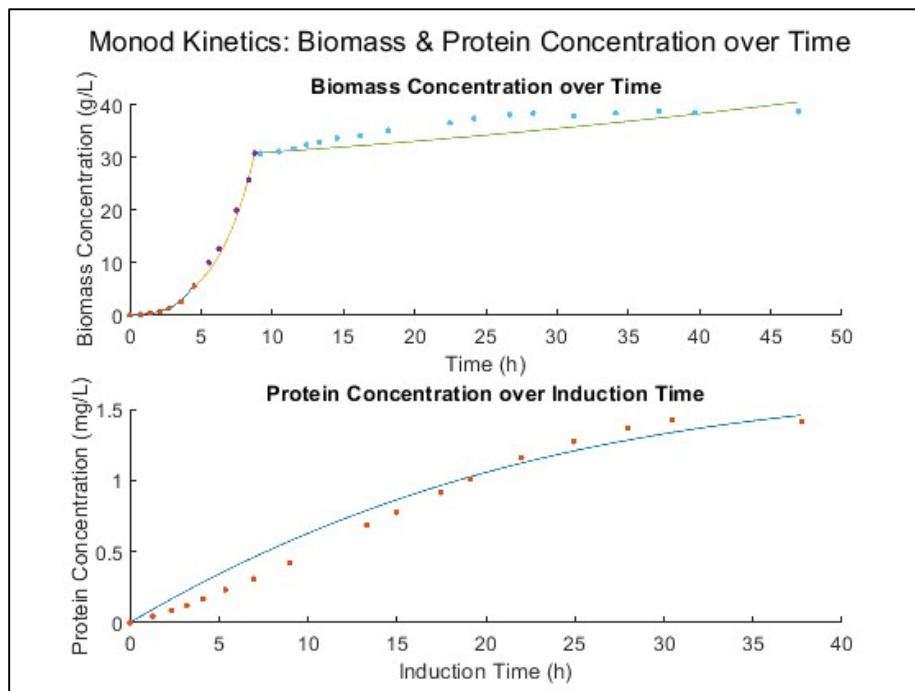
Γράφημα 43 – Συγκέντρωση βιομάζας και πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου, για το πείραμα BR03. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



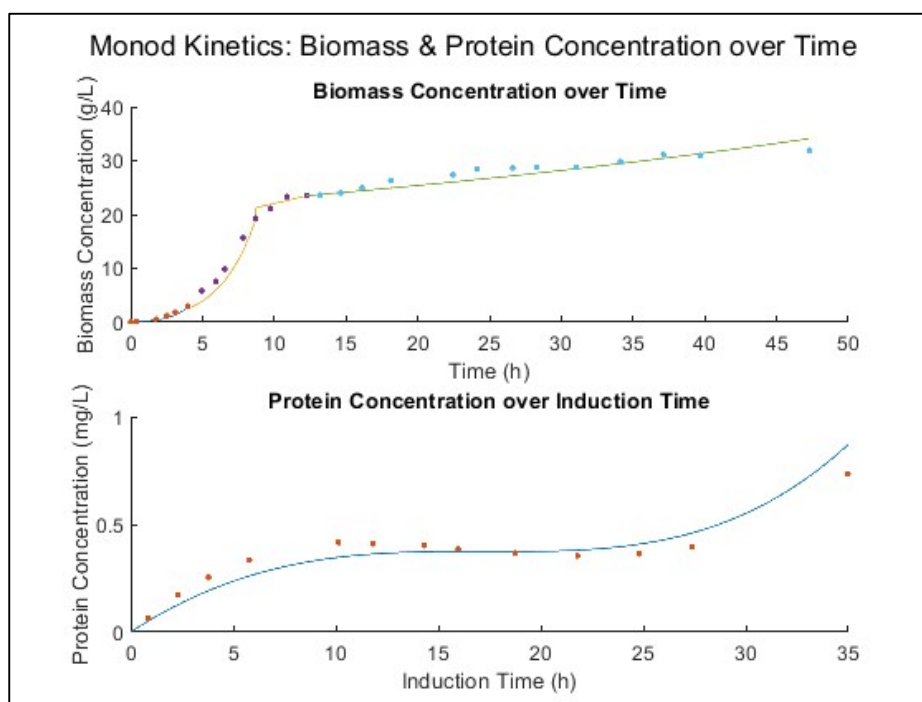
Γράφημα 44 – Συγκέντρωση βιομάζας και πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου, για το πείραμα BR04. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 45 – Συγκέντρωση βιομάζας και πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου, για το πείραμα BR05. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 46 – Συγκέντρωση βιομάζας και πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου, για το πείραμα BR06. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)



Γράφημα 47 – Συγκέντρωση βιομάζας και πρωτεΐνης συναρτήσει του χρόνου, για το πείραμα BR07. (Ως γραμμή απεικονίζονται τα υπολογιστικά δεδομένα και ως σημεία οι πειραματικές μετρήσεις)

Βελτιστοποίηση

Για να βρεθούν τα βέλτιστα σημεία λειτουργίας, μέσω της χρήσης του Matlab, λύνεται η εξίσωση της παραγωγής της πρωτεΐνης για όλα τα εύρη παροχών (10.5 ml/h έως 17 ml/h), θερμοκρασιών (28 °C έως 37 °C) και χρόνου επαγωγής (5.8 h έως 36 h). Για αρχική τιμή βιομάζας στον αντιδραστήρα κατά την επαγωγή, ορίζονται τα 25 g/L, ενώ η γλυκόζη εισέρχεται με συγκέντρωση 300 g/L. Η εκλεκτικότητα $Y_{X/S,ind}$ γίνεται υπόθεση, καθώς τα δεδομένα για την πορεία της συγκέντρωσης της γλυκόζης κάθε στιγμή είναι ελλιπή, πως ισούται με:

$$Y_{X/S,ind} = Y_{X/S} \cdot c_{ind} \quad (57)$$

Ο αρχικός όγκος του αντιδρώντος διαλλείματος ορίζεται στα 1,9 L και ο μέγιστος στο 80% του όγκου του αντιδραστήρα, δηλαδή στα 2,4 L.

Λύνοντας το ισοζύγιο μάζας της γλυκόζης κατά την επαγωγή, εξίσωση 19, και σε συνδυασμό με την εξίσωση της συγκέντρωσής της βιομάζας στον χρόνο (εξίσωση 25), προκύπτουν οι μέγιστες διάρκειες επαγωγής κατά τις οποίες η βιομάζα παράγεται γραμμικά στον χρόνο. Πέραν από αυτούς



τους χρόνους, η συγκέντρωση παραμένει πρακτικά σταθερή και κατά συνέπεια δεν αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Αυτοί ισούνται με:

$$t_{max} = \frac{\ln\left(\frac{\mu_{ind} \cdot X_0 \cdot V_{R0}}{Y_{X/S,ind} \cdot F}\right)}{\mu_{ind}} \quad (58)$$

Από αυτή την ανάλυση προκύπτει πως, η μέγιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης που μπορεί να επιτευχθεί είναι 42.8 mg/L και σημειώνεται στις 34.5 h επαγωγής, στους 33 °C με παροχή στα 58.7 ml/h.

Ενώ παράλληλα, η μέγιστη εκλεκτικότητα της γλυκόζης προς την πρωτεΐνη ισούται με $Y_{P/S} = 0.9209$ mg/g και σημειώνεται στις 5.8 h επαγωγής, στους 34.9 °C με παροχή στα 17 ml/h.

Συμπεράσματα & Προτάσεις

Συμπεράσματα

Από την συνολική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, προκύπτει πως οι κινητικές παράμετροι, βάσει της εξίσωσης Monod, που περιγράφουν την παραγωγή βιομάζας με υπόστρωμα γλυκόζης, όπου η βιομάζα είναι το βακτήριο *Escherichia Coli*, είναι:

$$\mu_{max} = 0.87 \text{ h}^{-1}, K_s = 0.214 \text{ g/L}, Y_{x/s} = 0.496 \text{ g/g}$$

Ακόμη, η εξίσωση που περιγράφει καλύτερα τον ειδικό συντελεστή παραγωγής της πρωτεΐνης, a , βασισμένη στις μεταβολικές διεργασίες που σημειώνονται εντός του κυττάρου του *Escherichia Coli* (βλέπε: §Βασικές φάσεις παραγωγής πρωτεϊνών με τον χρόνο & §Μηχανισμοί που επηρεάζουν την εξάρτηση από τον χρόνο), είναι:

$$a(t, T) = a_{max}(T) \cdot (1 - e^{-c_1(T) \cdot t^2 + c_2(T) \cdot t - c_3(T)}) \quad (31)$$

Με τις εκφράσεις που περιγράφουν τους συντελεστές της εξίσωσης 31, να είναι:

- 3^ο Μοντέλο (28 °C έως 37 °C):

$$a_{max} = a_{max,0} \cdot e^{k_1 \cdot T^2 + k_2 \cdot T} \quad (41)$$

$$c_1 = |k_1 \cdot T^3 + k_2 \cdot T^2 + k_3 \cdot T + k_4| \quad (42)$$

$$c_2 = |k_1 \cdot T^3 + k_2 \cdot T^2 + k_3 \cdot T + k_4| \quad (43)$$

$$c_3 = \frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2 + a_{max}}{T} + k_3 \quad (44)$$



- 4^ο Μοντέλο (28 °C έως 33 °C):

$$a_{max} = a_{max,0} \cdot e^{-\frac{k_1}{T}} \quad (45)$$

$$c_1 = \left| \frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2}{T} + k_3 \right| \quad (46)$$

$$c_2 = \left| \frac{k_1}{T^2} + \frac{k_2}{T} + k_3 \right| \quad (47)$$

$$c_1 = k_1 \cdot T^2 + k_2 \cdot T + k_3 \quad (48)$$

Με τις τιμές κάθε παραμέτρου, να αναφέρονται στους πίνακες XVIII και XIX, για το 3^ο και το 4^ο μοντέλο αντίστοιχα.

Επιπλέον, υπολογίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης, κατά την διάρκεια της επαγωγής για τις διάφορες θερμοκρασίας, με εξίσωση:

$$S_{ind}(T) = -4.953 \cdot 10^{-4} \cdot T^3 + 4.701 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 - 1.476 \cdot T + 15.351 \quad (49)$$

Ενώ ταυτόχρονα, προσδιορίζεται και η σχέση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά την επαγωγή, που ισούται:

$$\mu_{ind} = G(T) \cdot \frac{\mu_{max} \cdot c_{ind} \cdot S_{ind}}{K_s + S_{ind}} \quad (59)$$

Όπου,

$$G(T) = 3.2028 \cdot 10^{-2} \cdot T^2 - 2.0513 \cdot T + 33.0845 \quad (56).$$

Από τα εξαχθέντα μοντέλα, προκύπτει πως η μέγιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης που μπορεί να επιτευχθεί είναι 42.8 mg/L και σημειώνεται στις 34.5 h επαγωγής, στους 33 °C με παροχή στα 58.7 ml/h. Παράλληλα, η μέγιστη εκλεκτικότητα της γλυκόζης προς την πρωτεΐνη ισούται με $Y_{P/S} = 0.9209$ mg/g και σημειώνεται στις 5.8 h επαγωγής, στους 34.9 °C με παροχή στα 17 ml/h.

Προτάσεις

Διάφορες ιδέες και προτάσεις για μελλοντικές έρευνες, προκύπτουν με βάση αυτή την εργασία. Αρχικά σε μια μελλοντική έρευνα θα πρέπει να διερευνηθούν, μεγαλύτερα εύρη θερμοκρασιών και το σημαντικότερο, μεγαλύτερα εύρη διάρκειας επαγωγής, καθώς στην προκειμένη, η έλλειψη



των παραπάνω αποτέλεσε τροχοπέδη για την εύρεση μοντέλων γενικότερης μορφής και ικανών να προβλέψουν περισσότερα πειράματα υπό άλλες συνθήκες. Ακόμη, θα πρέπει σε λοιπά μεταγενέστερα πειράματα, οι τιμές των κρίσιμων παραμέτρων (συγκεντρώσεις, θερμοκρασία), να μετριοούνται on-time στον αντιδραστήρα και όχι ανά καθορισμένα τακτά χρονικά διαστήματα που συνέβαινε στα δεδομένα πειράματα και το σημαντικότερο κάθε πείραμα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία να επαναλαμβάνεται πάνω από μία φορές, για να εντοπίζονται τα πειραματικά σφάλματα και αν προκύπτουν περισσότερα προς ανάλυση δεδομένα. Συνάμα, γίνεται αναγκαία και η καταγραφή και άλλων παραμέτρων όπως η ενεργειακή κατανάλωση, συγκεντρώσεις άλλων ουσιών, κλπ., για να γίνεται πιο εμπειριστατωμένη ανάλυση.

Θα μπορούσε επίσης, να χρησιμοποιηθεί ένα από τα προτεινόμενα μοντέλα για την εκπαίδευση οποιουδήποτε αλγορίθμου τεχνητής νοημοσύνης για προσομοίωση πολλών αντιδραστήρων υπό διάφορες συνθήκες και με χρήση και άλλων στελεχών πέραν του *Escherichia Coli*, αφού τα μοντέλα δύνανται να περιγράψουν κάθε διαδικασία έκφρασης πρωτεΐνης. Ως επέκταση της δουλειάς θα μπορούσε να είναι η χρήση ενός ή περισσότερων όρων των διαφορικών σαν βαθμό ελευθερίας αφήνοντας τεχνικές μηχανικής μάθησης να επιλέξουν την καταλληλότερη εκδοχή.

Μια άλλη επίσης πειραματική διαδικασία, θα μπορούσε να αφορά τον έλεγχο και η επίρεια άλλων εν δυνάμει επαγωγέων, στην καλλιέργεια του *Escherichia Coli*, πέραν του IPTG.

Κατακλείδα

Ολοκληρώνοντας, τα παρόντα εξηγμένα μοντέλα, είναι ένας συνδυασμός μηχανιστικών και εμπειρικών μοντέλων. Μηχανιστικών μοντέλων γιατί περιγράφουν τις διεργασίες του κυττάρου με βάση θεμελιώδεις αρχές, όπως η ισορροπία μάζας και τα φαινόμενα μεταφοράς της, και περιλαμβάνουν διαφορικές εξισώσεις και βιοχημικές αντιδράσεις και χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των δυναμικών συστημάτων, και εμπειρικών μοντέλων, καθώς η αδυναμία πλήρους κατανόησης του συνόλου των φαινομένων που εκτυλίσσονται μέσα στον μικροοργανισμό, οδηγεί σε προσθήκη εξισώσεων καθαρά εξαρτημένων από τα πειραματικά δεδομένα.

Με την χρήση των μοντέλων αυτών, αλλά και σε συνδυασμό, με τις τεχνικές μηχανικής μάθησης, μπορούν να προκύψουν ακόμη ακριβέστερα, πληρέστερα και εξ' ολοκλήρου μηχανιστικά μοντέλα.

Η χρήση αυτών των μηχανιστικών μοντέλων στις βιοδιεργασίες θα παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα στην κατανόηση, στην βελτιστοποίηση, μέσω της ακριβούς παρακολούθησης των παραμέτρων της διαδικασίας, και τον έλεγχο τους, αφού συμβάλλουν στην ανάπτυξη συστημάτων αυτόματου ελέγχου. Αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων με χαμηλότερο κόστος, καθώς επιτρέπουν την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του συστήματος και τη λήψη τεκμηριωμένων αποφάσεων σε κάθε στάδιο της διαδικασίας. Τα μοντέλα μπορούν να μειώσουν την ανάγκη για εκτεταμένα πειράματα, καθώς μπορούν να αποτελέσουν βάση για την δημιουργία του ψηφιακού διδύμου του βιοαντιδραστήρα και να παρέχουν έτσι, προσομοιώσεις που μπορούν να αντικαταστήσουν την πραγματική δοκιμή τις διεργασίας.



Βιβλιογραφία

- [1] Susana María Alonso Villela, Thesis, “Production optimization of recombinant scorpion antivenom through biotechnological pathway: study of temperature of induction and modeling of biokinetics on E. coli strains”, INSA Toulouse, June 2020.
- [2] <https://cordis.europa.eu/project/id/101094287> , Last update: 23 December 2022.
- [3] Carbonell P., Jervis A.J., Robinson C.J. et al, “An automated Design-Build-Test-Learn pipeline for enhanced microbial production of fine chemicals” *Communications Biology* **1**, article no. 66, 2018.
- [4] Gopal Jee Gopal, Awanish Kumar, “Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli”, Springer Science & Business Media New York 2013, Published online: 30 July 2013.
- [5] A. Lakowitz, T. Godard, R. Biedendieck, and R. Krull, “Mini review: Recombinant production of tailored bio-pharmaceuticals in different Bacillus strains and future perspectives,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 126, pp. 27–39, May 2018.
- [6] N. K. Tripathi, “Production and Purification of Recombinant Proteins from Escherichia coli,” *ChemBioEng Rev.*, vol. 3, no. 3, pp. 116–133, Jun. 2016.
- [7] T. Schirrmann, L. Al-Halabi, S. Dübel, and M. Hust, “Production systems for recombinant antibodies.,” *Front. Biosci.*, vol. 13, no. 6, pp. 4576–94, May 2008.
- [8] A. de Marco, “Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, no. 1, p. 26, 2009.
- [9] P. A. Marichal-Gallardo and M. M. Álvarez, “State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: Process trends in design and validation,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 28, no. 4, pp. 899–916, Jul. 2012.
- [10] D. M. Candido and S. Lucas, “Maintenance of scorpions of the genus Tityus Koch (Scorpiones, Buthidae) for venom obtention at Instituto Butantan, São Paulo, Brazil,” *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 1, pp. 86–97, 2004.
- [11] S. Tobassum, H. M. Tahir, M. T. Zahid, Q. A. Gardner, and M. M. Ahsan, “Effect of Milking Method, Diet, and Temperature on Venom Production in Scorpions,” *J. Insect Sci.*, vol. 18, no. 4, pp. 1–7, Jul. 2018.
- [12] O. Ozkan, S. Adigüzel, C. Ates, I. Bozyigit, and A. Filazi, “Optimization of antiscorpion venom production,” *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 12, no. 3, pp. 390–399, 2006.
- [13] L. Yee and H. W. Blanch, “Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of Escherichia coli.,” *Biotechnology. (N. Y.)*, vol. 10, no. 12, pp. 1550–6, Dec. 1992.



- [14] C.-J. Huang, H. Lin, and X. Yang, “Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, Mar. 2012.
- [15] B. V. Ayyar, S. Arora, and S. S. Ravi, “Optimizing antibody expression: The nuts and bolts,” *Methods*, vol. 116, pp. 51–62, Mar. 2017.
- [16] K. Graumann and A. Premstaller, “Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems,” *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 2, pp. 164–186, Feb. 2006.
- [17] S. K. Gupta and P. Shukla, “Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production: A Review,” *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. Jul, pp. 1–17, Jul. 2017.
- [18] T. W. Overton, “Recombinant protein production in bacterial hosts,” *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 5, pp. 590–601, May 2014.
- [19] M. A. Blight, C. Chervaux, and I. B. Holland, “Protein secretion pathway in *Escherichia coli*,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 5, no. 5, pp. 468–74, Oct. 1994.
- [20] F. J. M. Mergulhão, D. K. Summers, and G. A. Monteiro, “Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 23, no. 3, pp. 177–202, May 2005.
- [21] S. S. J. Leong and W. N. Chen, “Preparing recombinant single chain antibodies,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 63, no. 6, pp. 1401–1414, Mar. 2008.
- [22] F. Baneyx and M. Mujacic, “Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 11, pp. 1399–1408, 2004.
- [23] A. Skerra and A. Pluckthun, “Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*,” *Science (80-.)*, vol. 240, no. 4855, pp. 1038–1041, May 1988.
- [24] R. S. Donovan, C. W. Robinson, and B. R. Glick, “Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter,” *J. Ind. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 145–154, Mar. 1996.
- [25] R. J. Carvalho, J. Cabrera-Crespo, M. M. Tanizaki, and V. M. Gonçalves, “Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 3, pp. 683–694, 2012.
- [26] B. J. Hoffman, J. A. Broadwater, P. Johnson, J. Harper, B. G. Fox, and W. R. Kenealy, “Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) Process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein,” *Protein Expression and Purification*, vol. 6, no. 5, pp. 646–654, 1995.
- [27] A. C. L. Horta et al., “On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: Assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures,” *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 32, no. 4, pp. 821–829, 2015.



- [28] B. V. Kilikian, I. D. Suárez, C. W. Liria, and A. K. Gombert, “Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction,” *Process Biochem.*, vol. 35, no. 9, pp. 1019–1025, 2000.
- [29] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. APR, pp. 1–17, Apr. 2014.
- [30] M. Nadri, I. Trezzani, H. Hammouri, P. Dhurjati, R. Longin, and J. Lieto, “Modeling and observer design for recombinant *Escherichia coli* strain,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 28, no. 4, pp. 217–225, 2006.
- [31] M. P. DeLisa, J. Li, G. Rao, W. a Weigand, and W. E. Bentley, “Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 65, pp. 54–64, 1999.
- [32] A. Cockshott and I. Bogle, “Modelling the effects of glucose feeding on a recombinant *E-coli* fermentation,” *Bioprocess Eng.*, vol. 20, pp. 83–90, 1999.
- [33] G. Korte, U. Rinas, H.-A. Kracke-Helm, and K. Schügerl, “Structured model for cell growth and enzyme production by recombinant *Escherichia coli*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 2, pp. 185-188., May 1991.
- [34] X. Hua et al., “Kinetics of High Cell Density Fed-batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* Producing Human-like Collagen,” *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 14, no. 2, pp. 242–247, Apr. 2006.
- [35] J. Boldrini-França et al., “Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 23, pp. 9971–9986, 2015.
- [36] A. O. O’Reilly, A. R. Cole, J. L. S. Lopes, A. Lampert, and B. A. Wallace, “Chaperone-mediated native folding of a β -scorpion toxin in the periplasm of *Escherichia coli*,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 1, pp. 10–15, 2014.
- [37] O. H. P. Ramos, A. K. Carmona, and H. S. Selistre-de-Araujo, “Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 28, no. 1, pp. 34–41, 2003.
- [38] A. M. Morgon et al., “Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacinlike metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom,” *Biochimie*, vol. 128–129, pp. 8–19, 2016.
- [39] Z. Le, X. Li, P. Yuan, P. Liu, and C. Huang, “Orthogonal optimization of prokaryotic expression of a natural snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Sinonatrix annularis*,” *Toxicon*, vol. 108, pp. 264–271, 2015.
- [40] J. H. Shao *et al.*, “Cloning, expression, and pharmacological activity of BmK AS, an active peptide from scorpion *Buthus martensii* Karsch,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 30, no. 1, pp. 23–29, 2008.



- [41] Y. F. Liu *et al.*, “Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii karsch* in *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 27, no. 2, pp. 253–258, 2003.
- [42] M. Turkov *et al.*, “In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 10, no. 1, pp. 123–131, 1997.
- [43] P. Cao *et al.*, “Expression and purification of an antitumor-analgesic peptide from the venom of *Mesobuthus martensii* Karsch by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 26, no. 5, pp. 1240–1244, 2010.
- [44] T. Han *et al.*, “A novel expression vector for the improved solubility of recombinant scorpion venom in *Escherichia coli*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 482, no. 1, pp. 120–125, 2017.
- [45] P. G. Roberto *et al.*, “Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 37, no. 1, pp. 102–108, 2004.
- [46] R. J. Ward, A. H. C. De Oliveira, R. K. Bortoleto, J. C. Rosa, V. M. Faça, and L. J. Greene, “Refolding and purification of bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 21, no. 1, pp. 134–140, 2001.
- [47] S. Banerjee, E. V. Curto, M. Beckman, G. B. Brown, J. Zhong, and N. R. Krishna, “Expression of functional scorpion neurotoxin Lqg-V in *E. coli*,” *Peptides*, vol. 27, no. 1, pp. 49–54, 2006.
- [48] A. L. Tscheliessnig, J. Konrath, R. Bates, and A. Jungbauer, “Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing - methods and applications,” *Biotechnol. J.*, vol. 8, no. 6, pp. 655–670, Jun. 2013.
- [49] S. Hamilton, J. Odili, M. D. Pacifico, G. D. Wilson, and J. M. Kupsch, “Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment,” *Hybrid. Hybridomics*, vol. 22, no. 6, pp. 347–355, 2003.
- [50] J. E. Cantu-Bustos *et al.*, “Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the metal-binding protein CusF,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 121, pp. 61–65, 2016.
- [51] C. Legros *et al.*, “Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins,” *Vaccine*, vol. 20, no. 5–6, pp. 934–942, Dec. 2001.
- [52] T. Dudler *et al.*, “High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1165, no. 2, pp. 201–210, 1992.
- [53] K. Tokugawa, T. Ishii, K. Nakamura, H. Masaki, and T. Uozumi, “A model system for the continuous production of a heterologous protein using a novel secretion promoting factor which operates in *Escherichia coli*,” *J. Biotechnol.*, vol. 37, no. 1, pp. 33–37, Sep. 1994.



- [54] S. Kischnick *et al.*, “Bacterial fermentation of recombinant major wasp allergen Antigen 5 using oxygen limiting growth conditions improves yield and quality of inclusion bodies,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 47, no. 2, pp. 621–628, 2006.
- [55] M. A. Palaiomylitou, K. A. Matis, A. I. Zouboulis, and D. A. Kyriakidis, “A kinetic model describing cell growth and production of highly active, recombinant ice nucleation protein in *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 78, no. 3, pp. 321–332, 2002.
- [56] Y. P. Khasa, A. Khushoo, and K. J. Mukherjee, “Enhancing toxic protein expression in *Escherichia coli* fed-batch culture using kinetic parameters: Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a model system,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 115, no. 3, pp. 291–297, 2013.
- [57] K. E. Conrath *et al.*, “Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 10, pp. 2807–12, Oct. 2001.
- [58] M. Darvish, M. Behdani, M. A. Shokrgozar, K. Pooshang-Bagheri, and D. Shahbazzadeh, “Development of protective agent against *Hottentotta saulcyi* venom using camelid single domain antibody,” *Mol. Immunol.*, vol. 68, no. 2, pp. 412–420, 2015.
- [59] C. Legros, E. Feyfant, F. Sampieri, H. Rochat, P. E. Bougis, and M. F. Martin-Eauclaire, “Influence of a NH₂-terminal extension on the activity of KTX2, a K⁺ channel blocker purified from *Androctonus australis* scorpion venom,” *FEBS Lett.*, vol. 417, no. 1, pp. 123–129, 1997.
- [60] N. Aubrey, C. Devaux, P. Y. Sizaret, H. Rochat, M. Goyffon, and P. Billiald, “Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, no. 3, pp. 617–628, 2003.
- [61] C. Devaux, E. Moreau, M. Goyffon, H. Rochat, and P. Billiald, “Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin Aahl from the venom of the scorpion *Androctonus australis* hector,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 268, no. 3, pp. 694–702, 2001.
- [62] P. Billiald, G. Motta, and D. J. Vaux, “Production of a functional anti-scorpion hemocyanin scFv in *Escherichia coli*,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 317, no. 2, pp. 429–438, 1995.
- [63] S. Vemula, R. Thunuguntla, A. Dedaniya, S. Kokkiligadda, C. Palle, and S. R. Ronda, “Improved production and characterization of recombinant human granulocyte colony stimulating factor from *E. coli* under optimized downstream processes,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 108, pp. 62–72, 2015.
- [64] G. Ravi, K. Ella, and M. Lakshmi Narasu, “Development of pilot scale production process and characterization of a recombinant multiepitope malarial vaccine candidate FALVAC-1A expressed in *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 61, no. 1, pp. 57–64, 2008.
- [65] C.-K. Kim, J.-H. Choi, S.-B. Lee, S.-M. Lee, and J.-W. Oh, “Expression and Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Fed-Batch Culture of *Escherichia coli*,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2425–2435, 2014.



- [66] E. Toksoy Öner, B. Kirdar, Z. I. Önsan, and K. Ö. Ülgen, “Modeling of the induced expression for high-level production of a foreign protein by recombinant *E. coli* under the control of the T7 phage promoter,” *Process Biochem.*, vol. 39, no. 3, pp. 315–323, 2003.
- [67] N. Nancib, R. Mosrati, and J. Boudrant, “Modelling of batch fermentation of a recombinant *Escherichia coli* producing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on a complex selective medium,” *Chem. Eng. J.*, vol. 52, no. 2, 1993.
- [68] F. Miao and D. S. Kompala, “Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modeling,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 40, no. 7, pp. 787–796, 1992.
- [69] F. Miao and D. S. Kompala, “Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a t7 promoter .2. 2-Stage continuous cultures and model simulations,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 42 (1), pp. 74–80, 1993.
- [70] D. M., C. H., W. W., V. J., R. G., and B. W., “Generic model control of induced protein expression in high cell density cultivation of *Escherichia coli* using on-line GFP-fusion monitoring,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 24, no. 2, pp. 83–91, 2001.
- [71] M. Kangwa, V. Yelemane, A. N. Polat, K. D. D. Gorrepati, M. Grasselli, and M. FernándezLahore, “High-level fed-batch fermentative expression of an engineered *Staphylococcal* protein A based ligand in *E. coli*: purification and characterization,” *AMB Express*, vol. 5, no. 1, p. 70, Dec. 2015.
- [72] A. Schmideder, J. H. Cremer, and D. Weuster-Botz, “Parallel steady state studies on a milliliter scale accelerate fed-batch bioprocess design for recombinant protein production with *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, no. 6, pp. 1426–1435, 2016.
- [73] D. Levisauskas, V. Galvanauskas, S. Henrich, K. Wilhelm, N. Volk, and A. Lübbert, “Modelbased optimization of viral capsid protein production in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 25, no. 4, pp. 255–262, 2003.
- [74] K.-M. Lee, C.-H. Rhee, C.-K. Kang, and J.-H. Kim, “Statistical medium formulation and process modeling by mixture design of experiment for peptide overexpression in recombinant *Escherichia coli*,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 135, no. 1, pp. 81–110, Oct. 2006.
- [75] E. Franco-Lara, V. Galvanauskas, N. Volk, and A. Lübbert, “Model-Based Optimization of the Cultivation Process for Recombinant Virus Capsid Proteins in *E. coli*,” *IFAC Proc. Vol.*, vol. 34, no. 5, pp. 299–303, 2001.
- [76] L. F. Vallejo *et al.*, “Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*,” *J. Biotechnol.*, vol. 94, no. 2, pp. 185–194, 2002.
- [77] X. M. Yang, “Optimization of a cultivation process for recombinant protein production by *Escherichia coli*,” *J Biotechnol*, vol. 23, no. 3, pp. 271–289, 1992.



- [78] C. Sieblist, M. Jenzsch, M. Pohlscheidt, and A. Lübbert, “Insights into large-scale cell-culture reactors: I. Liquid mixing and oxygen supply,” *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 12, pp. 1532–1546, 2011.
- [79] M. N. Baeshen *et al.*, “Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 953–962, Jul. 2015.
- [80] A. de Marco, “Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 1, p. 125, Dec. 2015.
- [81] J. Ruiz *et al.*, “Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields,” *Process Biochem.*, vol. 44, no. 9, pp. 1039–1045, Sep. 2009.
- [82] J. Ruiz, G. González, C. de Mas, and J. López-Santín, “A semiempirical model to control the production of a recombinant aldolase in high cell density cultures of *Escherichia coli*,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 55, no. 2, pp. 82–91, 2011.
- [83] M. Jenzsch, R. Simutis, and A. Luebbert, “Generic model control of the specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* cultivations,” *J. Biotechnol.*, vol. 122, no. 4, pp. 483–493, 2006.
- [84] A. C. L. Horta *et al.*, “Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 35, no. 8, pp. 1269–1280, 2012.
- [85] D. Calleja, J. Kavanagh, C. de Mas, and J. López-Santín, “Simulation and prediction of protein production in fed-batch *E. coli* cultures: An engineering approach,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, no. 4, pp. 772–782, 2016.
- [86] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, “Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 2, pp. 153–176, 2009.
- [87] T. K. S. Kumar *et al.*, “Cloning, direct expression, and purification of a snake venom cardiotoxin in *Escherichia coli*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 219, no. 2, pp. 450–456, 1996.
- [88] K. Sun *et al.*, “Expression, purification and characterization of a novel recombinant SVTLE, ragkihpin-2, from *Gloydius halys* Pallas venom gland in *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 136, pp. 7–13, 2017.
- [89] R. Nian, L. Tan, and W. S. Choe, “Polyethyleneimine-mediated chemical extraction of cytoplasmic his-tagged inclusion body proteins from *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 2, pp. 417–425, 2008.
- [90] Y. J. Fu, B. F. Chai, W. Wang, H. Zhi, L. T. Yin, and A. H. Liang, “Expression and purification of the BmK Mm2 neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch and its biological activity test,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 38, no. 1, pp. 45–50, 2004.
- [91] M. Suntravat, Y. Jia, S. E. Lucena, E. E. Sánchez, and J. C. Pérez, “CDNA cloning of a snake venom metalloproteinase from the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus*



adamanteus), and the expression of its disintegrin domain with anti-platelet effects,” *Toxicon*, vol. 64, pp. 43–54, 2013.

[92] I. Hmila *et al.*, “A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming,” *FASEB J.*, vol. 24, no. 9, pp. 3479–3489, Sep. 2010.

[93] H. Kraïem, “Développement de méthodes de contrôle-qualité pour deux facteurs de croissance et un fragment d’anticorps : «Mise au point et optimisation de tests immunobiochimiques et fonctionnelles in vivo et in vitro»,” Institut Pasteur de Tunis, Unimed Laboratories, Institut National de Sciences Appliquées et de Technologie, 2018.

[94] K. D. Tartof and C. A. Hobbs, “Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones,” *Bethesda Res. Lab. Focus*, vol. 9, no. 12, 1987.

[95] Y. Manon, “Etude de milieux de culture complexes et évolutifs par développement de mesures physiques en ligne,” Institut National des Sciences Appliquées, 2012.

[96] Gerasimos Lyberatos and Stavros Pavlou, “Introduction to Biochemical Engineering”, Tziola Publications, chapter 6, pages 163-172, 2021.

[97] Yu Liu, “Overview of some theoretical approaches for derivation of the Monod equation”, Springer-Verlag 2006

[98] Stefan Gnoth, Marco Jenzsch, Rimvydas Simutis, Andreas Lübbert, 10th International IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology, “Product Formation Kinetics In A Recombinant Protein Production Process”, Preprints Vol.1, June 4-6, 2007, Cancún, Mexico 197 Proceedings Vol.1, June 4-6, 2007, Cancún, Mexico.

[99] Glick, B. R., & Pasternak, J. J., “Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA” ,4th ed., ASM Press., 2010, chapters 11-13.

[100] Nielsen, J., & Villadsen, J., “Bioreaction Engineering Principles”, Springer, 1994.

[101] K. Kovarova , A. J. B. Zehnder, T. Egli, “American Society for Microbiology Temperature-Dependent Growth Kinetics of Escherichia coli ML 30 in Glucose-Limited Continuous Culture”, *Journal Of Bacteriology*, Aug. 1996, p. 4530–4539 Vol. 178, No. 15.

[102] Korkolenjos Charilaos, Thesis, “Study of Factors Affecting the Production of a Thermostable B-Glycosidase from Transformed E.Coli B121 Bacterial Strain”, N.T.U.A. 2020.



Παράρτημα Α

Process	Real Time (h)	Process Time (h)	Glucose (g/L)	Biomass (g/L)	Protein (mg/L)	Temperature (°C)	Inductor (g)	Label
Batch	0.58	0.58	8.190	0.130	0.000	37	0	BR01
	1.07	1.07	7.870	0.170	0.000	37	0	BR01
	2.13	2.13	7.220	0.448	0.000	37	0	BR01
	2.85	2.85	6.510	0.918	0.000	37	0	BR01
	3.62	3.62	4.700	1.634	0.000	37	0	BR01
	4.17	4.17	2.820	2.423	0.000	37	0	BR01
	4.67	4.67	0.012	3.788	0.000	37	0	BR01
Fed Batch	5.32	0.29	0.013	4.262	0.000	37	0	BR01
	5.87	0.84	0.014	5.306	0.000	37	0	BR01
	6.90	1.87	0.012	6.507	0.000	37	0	BR01
	7.60	2.57	0.009	7.907	0.000	37	0	BR01
	8.13	3.10	0.016	10.907	0.000	37	0	BR01
	8.60	3.57	0.012	11.643	0.000	37	0	BR01
	9.07	4.04	0.014	12.773	0.000	37	0	BR01
	9.43	4.40	0.008	14.710	0.000	37	0	BR01
	9.80	4.77	0.004	16.871	0.000	37	0	BR01
	10.08	5.05	0.000	17.890	0.000	37	0	BR01
Batch	0.00	0.00	8.530	0.238	0.000	37	0	BR02
	0.83	0.83	7.950	0.758	0.000	37	0	BR02
	1.62	1.62	6.760	1.282	0.000	37	0	BR02
	3.38	3.38	0.365	4.888	0.000	37	0	BR02
Fed Batch	4.12	0.73	0.005	6.175	0.000	37	0	BR02
	5.73	2.35	0.005	12.871	0.000	37	0	BR02
	6.53	3.15	0.005	16.071	0.000	37	0	BR02
	7.40	4.02	0.005	19.550	0.000	37	0	BR02
	8.00	4.62	0.000	23.071	0.000	37	0	BR02
Fed Batch & Induction	8.20	0.00	0.008	23.100	0.000	28	1	BR02
	9.28	1.08	0.008	23.982	0.131	28	1	BR02
	11.03	2.83	0.008	24.714	0.315	28	1	BR02
	13.15	4.95	0.008	25.246	0.462	28	1	BR02
	15.15	6.95	0.008	26.813	0.621	28	1	BR02



	17.10	8.90	0.008	27.314	0.952	28	1	BR02
	18.15	9.95	0.008	27.654	1.255	28	1	BR02
	19.17	10.97	0.008	28.039	1.696	28	1	BR02
	20.13	11.93	0.008	28.418	2.319	28	1	BR02
Batch	0.00	0.00	8.094	0.168	0.000	37	0	BR03
	1.22	1.22	7.947	0.425	0.000	37	0	BR03
	2.05	2.05	7.273	0.521	0.000	37	0	BR03
	2.83	2.83	5.661	1.004	0.000	37	0	BR03
	4.04	4.84	0.458	4.250	0.000	37	0	BR03
Fed Batch	5.30	1.26	0.295	5.957	0.000	37	0	BR03
	7.00	2.96	0.004	12.129	0.000	37	0	BR03
	7.73	3.69	0.004	16.207	0.000	37	0	BR03
	8.62	4.58	0.004	21.775	0.000	37	0	BR03
	9.22	5.18	0.004	26.000	0.000	37	0	BR03
Fed Batch & Induction	9.42	0.00	0.007	26.000	0.000	30	1	BR03
	10.50	1.08	0.007	26.333	0.196	30	1	BR03
	12.25	2.83	0.007	26.333	0.465	30	1	BR03
	14.37	4.95	0.007	27.318	0.527	30	1	BR03
	16.37	6.95	0.007	27.736	0.567	30	1	BR03
	18.30	8.88	0.007	31.154	1.314	30	1	BR03
	19.37	9.95	0.007	31.881	2.302	30	1	BR03
Batch	0.32	0.32	11.200	0.017	0.000	37	0	BR04
	1.32	1.32	11.100	0.104	0.000	37	0	BR04
	2.00	2.00	9.420	0.175	0.000	37	0	BR04
	3.03	3.03	8.990	0.511	0.000	37	0	BR04
	3.47	3.47	7.530	0.764	0.000	37	0	BR04
	4.48	4.48	6.690	1.370	0.000	37	0	BR04
	4.98	4.98	4.760	2.429	0.000	37	0	BR04
	5.48	5.48	2.280	3.654	0.000	37	0	BR04
Fed Batch	5.97	0.20	0.013	5.611	0.000	37	0	BR04
	6.87	1.10	0.012	8.061	0.000	37	0	BR04
	7.82	2.05	0.359	12.568	0.000	37	0	BR04
	8.32	2.55	0.139	15.096	0.000	37	0	BR04
	9.03	3.26	0.012	19.029	0.000	37	0	BR04
	9.67	3.90	0.011	25.254	0.000	37	0	BR04
	10.28	4.51	0.006	29.529	0.000	37	0	BR04



Fed Batch & Induction	10.28	0.00	0.002	29.529	0.000	33	1	BR04
	11.18	0.90	0.002	30.714	0.093	33	1	BR04
	12.28	2.00	0.002	31.586	0.171	33	1	BR04
	13.22	2.93	0.002	32.961	0.194	33	1	BR04
	14.22	3.93	0.002	33.563	0.223	33	1	BR04
	15.30	5.02	0.002	34.348	0.299	33	1	BR04
	16.18	5.90	0.002	35.051	0.387	33	1	BR04
Batch	0.25	0.25	10.300	0.048	0.000	37	0	BR05
	1.25	1.25	10.200	0.043	0.000	37	0	BR05
	1.93	1.93	9.460	0.133	0.000	37	0	BR05
	2.97	2.97	8.980	0.465	0.000	37	0	BR05
	3.40	3.40	8.170	0.682	0.000	37	0	BR05
	3.87	3.87	7.710	0.928	0.000	37	0	BR05
	4.42	4.42	7.240	1.430	0.000	37	0	BR05
	4.92	4.92	5.080	2.205	0.000	37	0	BR05
	5.42	5.42	3.080	3.411	0.000	37	0	BR05
Fed Batch	5.90	0.05	0.600	4.086	0.000	37	0	BR05
	6.75	0.90	0.012	8.025	0.000	37	0	BR05
	7.75	1.90	0.159	11.518	0.000	37	0	BR05
	8.25	2.40	0.012	14.979	0.000	37	0	BR05
	8.97	3.12	0.011	19.461	0.000	37	0	BR05
	9.60	3.75	0.008	22.096	0.000	37	0	BR05
	10.32	4.47	0.015	28.429	0.000	37	0	BR05
Fed Batch & Induction	10.38	0.00	0.007	29.000	0.000	37	1	BR05
	11.18	0.80	0.007	29.314	0.058	37	1	BR05
	12.28	1.90	0.007	30.064	0.122	37	1	BR05
	13.25	2.87	0.007	30.938	0.170	37	1	BR05
	14.25	3.87	0.007	31.510	0.204	37	1	BR05
	15.30	4.92	0.007	31.732	0.222	37	1	BR05
	16.16	5.78	0.007	33.224	0.226	37	1	BR05
Batch	0.00	0.00	11.260	0.134	0.000	37	0	BR06
	0.75	0.75	11.000	0.218	0.000	37	0	BR06
	1.42	1.42	10.500	0.440	0.000	37	0	BR06
	2.08	2.08	10.200	0.763	0.000	37	0	BR06
	2.75	2.75	8.020	1.346	0.000	37	0	BR06
	3.58	3.58	5.560	2.623	0.000	37	0	BR06



	4.53	4.53	0.069	5.647	0.000	37	0	BR06
Fed Batch	5.55	0.93	0.009	10.064	0.000	37	0	BR06
	6.25	1.63	0.013	12.721	0.000	37	0	BR06
	7.50	2.88	0.014	20.014	0.000	37	0	BR06
	8.33	3.71	0.007	25.857	0.000	37	0	BR06
	8.78	4.16	0.000	30.889	0.000	37	0	BR06
Fed Batch & Induction	9.18	0.00	0.008	30.889	0.000	29	1	BR06
	10.46	1.28	0.008	31.204	0.046	29	1	BR06
	11.51	2.33	0.008	31.779	0.088	29	1	BR06
	12.40	3.22	0.008	32.486	0.121	29	1	BR06
	13.31	4.13	0.008	32.954	0.168	29	1	BR06
	14.56	5.38	0.008	33.732	0.231	29	1	BR06
	16.15	6.97	0.008	34.175	0.310	29	1	BR06
	18.15	8.97	0.008	35.254	0.422	29	1	BR06
	22.48	13.30	0.008	36.646	0.687	29	1	BR06
	24.15	14.97	0.008	37.489	0.774	29	1	BR06
	26.65	17.47	0.008	38.161	0.915	29	1	BR06
	28.31	19.13	0.008	38.475	1.010	29	1	BR06
	31.18	22.00	0.008	37.925	1.158	29	1	BR06
	34.11	24.93	0.008	38.521	1.271	29	1	BR06
	37.15	27.97	0.008	38.843	1.368	29	1	BR06
39.65	30.47	0.008	38.645	1.423	29	1	BR06	
46.93	37.75	0.008	38.810	1.415	29	1	BR06	
Batch	0.00	0.00	7.500	0.100	0.000	37	0	BR07
	0.37	0.37	6.580	0.198	0.000	37	0	BR07
	1.75	1.75	6.300	0.549	0.000	37	0	BR07
	2.52	2.52	5.460	1.175	0.000	37	0	BR07
	3.10	3.10	3.920	1.796	0.000	37	0	BR07
	4.00	4.00	1.290	3.026	0.000	37	0	BR07
Fed Batch	4.95	0.67	0.015	5.819	0.000	37	0	BR07
	5.92	1.64	0.015	7.639	0.000	37	0	BR07
	6.55	2.27	0.015	9.857	0.000	37	0	BR07
	7.82	3.54	0.015	15.671	0.000	37	0	BR07
	8.72	4.44	0.015	19.332	0.000	37	0	BR07
	9.72	5.44	0.015	21.168	0.000	37	0	BR07
	10.87	6.59	0.015	23.350	0.000	37	0	BR07



	12.28	8.00	0.015	23.508	0.000	37	0	BR07
Fed Batch & Induction	13.19	0.87	0.028	23.661	0.064	32	1	BR07
	14.62	2.30	0.028	24.039	0.172	32	1	BR07
	16.12	3.80	0.028	25.029	0.255	32	1	BR07
	18.12	5.80	0.028	26.257	0.335	32	1	BR07
	22.45	10.13	0.028	27.400	0.416	32	1	BR07
	24.12	11.80	0.028	28.461	0.409	32	1	BR07
	26.62	14.30	0.028	28.682	0.402	32	1	BR07
	28.29	15.97	0.028	28.786	0.387	32	1	BR07
	31.07	18.75	0.028	28.804	0.369	32	1	BR07
	34.12	21.80	0.028	29.800	0.354	32	1	BR07
	37.12	24.80	0.028	31.125	0.363	32	1	BR07
	39.70	27.38	0.028	31.012	0.395	32	1	BR07
47.30	34.98	0.028	31.936	0.736	32	1	BR07	
Batch	0.00	0.00	10.000	0.180	0.000	37	0	BR08
	0.12	0.12	8.130	0.180	0.000	37	0	BR08
	0.92	0.92	7.090	0.339	0.000	37	0	BR08
	1.97	1.97	6.280	0.896	0.000	37	0	BR08
	3.15	3.15	2.760	2.505	0.000	37	0	BR08
Fed Batch	4.12	0.40	0.017	4.480	0.000	37	0	BR08
	5.08	1.36	0.015	7.143	0.000	37	0	BR08
	5.95	2.23	0.015	10.171	0.000	37	0	BR08
	7.03	3.31	0.012	14.404	0.000	37	0	BR08
	7.75	4.03	0.011	17.982	0.000	37	0	BR08
	8.37	4.65	0.008	22.189	0.000	37	0	BR08
	9.17	5.45	0.031	25.664	0.000	37	0	BR08
Fed Batch & Induction	9.20	0.00	0.016	25.500	0.000	29	1	BR08
	10.25	1.05	0.016	26.595	0.051	29	1	BR08
	11.68	2.48	0.016	28.685	0.104	29	1	BR08
	12.78	3.58	0.016	28.020	0.149	29	1	BR08
	14.25	5.05	0.016	28.955	0.192	29	1	BR08
	16.97	7.77	0.016	29.565	0.245	29	1	BR08
	22.52	13.32	0.016	32.415	0.286	29	1	BR08
	24.17	14.97	0.016	32.430	0.289	29	1	BR08
	25.67	16.47	0.016	31.800	0.292	29	1	BR08
	27.13	17.93	0.016	34.120	0.295	29	1	BR08



	30.17	20.97	0.016	34.980	0.306	29	1	BR08
	33.17	23.97	0.016	35.960	0.331	29	1	BR08
	35.83	26.63	0.016	36.245	0.372	29	1	BR08
	38.53	29.33	0.016	35.940	0.437	29	1	BR08
	46.53	37.33	0.016	38.565	0.792	29	1	BR08
Batch	0.00	0.00	10.000	0.300	0.000	37	0	BR09
	0.22	0.22	8.150	0.274	0.000	37	0	BR09
	1.35	1.35	6.780	0.697	0.000	37	0	BR09
	2.17	2.17	7.080	1.346	0.000	37	0	BR09
	3.17	3.17	1.930	3.026	0.000	37	0	BR09
Fed Batch	4.38	0.78	0.029	5.062	0.000	37	0	BR09
	5.35	1.75	0.029	8.643	0.000	37	0	BR09
	6.35	2.75	0.022	12.064	0.000	37	0	BR09
	7.22	3.62	0.035	15.771	0.000	37	0	BR09
	8.25	4.65	0.030	19.104	0.000	37	0	BR09
	8.87	5.27	0.031	21.089	0.000	37	0	BR09
Fed Batch & Induction	9.57	0.70	0.020	21.793	0.000	29	1	BR09
	10.30	1.43	0.020	22.929	0.000	29	1	BR09
	11.42	2.55	0.020	22.746	0.000	29	1	BR09
	12.88	4.02	0.020	24.125	0.000	29	1	BR09
	14.07	5.20	0.020	24.575	0.000	29	1	BR09
	15.53	6.67	0.020	25.068	0.000	29	1	BR09
	18.20	9.33	0.020	25.900	0.000	29	1	BR09
	23.78	14.92	0.020	27.375	0.000	29	1	BR09
	25.35	16.48	0.020	28.114	0.000	29	1	BR09
	26.90	18.03	0.020	28.143	0.000	29	1	BR09
	28.37	19.50	0.020	29.461	0.000	29	1	BR09
	31.40	22.53	0.020	29.884	0.000	29	1	BR09
	34.40	25.53	0.020	29.384	0.000	29	1	BR09
	35.92	27.05	0.020	30.129	0.000	29	1	BR09
36.97	28.10	0.020	30.196	0.000	29	1	BR09	

Πίνακας Α1 – Πειραματικά δεδομένα όπως αυτά ελήφθησαν από το πανεπιστήμιο της Τουλούζης



index	tin (h)	duration (h)	F (ml/h)	ind	feed-label
feed 1	5.03	2.60	17.0	0	BR-01
feed 2	7.63	1.84	31.0	0	BR-01
feed 3	9.47	0.61	60.0	0	BR-01
feed 4	10.08	0.50	31.0	0	BR-01
feed 5	3.38	2.03	21.2	0	BR-02
feed 6	5.41	0.62	45.8	0	BR-02
feed 7	6.03	0.38	58.0	0	BR-02
feed 8	6.41	0.28	67.1	0	BR-02
feed 9	6.69	0.22	74.5	0	BR-02
feed 10	6.90	0.18	80.8	0	BR-02
feed 11	7.08	0.15	86.5	0	BR-02
feed 12	7.23	0.13	91.6	0	BR-02
feed 13	7.36	0.12	96.2	0	BR-02
feed 14	7.48	0.44	99.3	0	BR-02
feed 15	8.20	12.28	10.0	1	BR-02
feed 16	4.84	2.03	21.2	0	BR-03
feed 17	6.86	0.62	45.8	0	BR-03
feed 18	7.49	0.38	58.0	0	BR-03
feed 19	7.87	0.28	67.1	0	BR-03
feed 20	8.14	0.22	74.5	0	BR-03
feed 21	8.36	0.18	80.8	0	BR-03
feed 22	8.54	0.15	86.5	0	BR-03
feed 23	8.69	0.13	91.6	0	BR-03
feed 24	8.82	0.55	96.6	0	BR-03
feed 25	9.42	10.53	31.0	1	BR-03
feed 26	5.77	2.03	21.2	0	BR-04
feed 27	7.80	0.62	45.8	0	BR-04
feed 28	8.42	0.38	58.0	0	BR-04
feed 29	8.80	0.28	67.1	0	BR-04
feed 30	9.08	0.22	74.5	0	BR-04
feed 31	9.29	0.18	80.8	0	BR-04
feed 32	9.47	0.15	86.5	0	BR-04
feed 33	9.62	0.13	91.6	0	BR-04
feed 34	9.75	0.12	96.2	0	BR-04
feed 35	9.87	0.44	99.3	0	BR-04
feed 36	10.28	6.20	31.0	1	BR-04
feed 37	5.85	2.03	21.2	0	BR-05
feed 38	7.88	0.62	45.8	0	BR-05
feed 39	8.50	0.38	58.0	0	BR-05
feed 40	8.88	0.28	67.1	0	BR-05



feed 41	9.16	0.22	74.5	0	BR-05
feed 42	9.37	0.18	80.8	0	BR-05
feed 43	9.55	0.15	86.5	0	BR-05
feed 44	9.70	0.13	91.6	0	BR-05
feed 45	9.83	0.55	96.6	0	BR-05
feed 46	10.38	6.04	31.0	1	BR-05
feed 47	4.62	0.17	33.6	0	BR-06
feed 48	4.79	0.63	36.0	0	BR-06
feed 49	5.42	0.51	45.7	0	BR-06
feed 50	5.92	0.43	55.4	0	BR-06
feed 51	6.35	0.37	65.2	0	BR-06
feed 52	6.72	0.32	74.9	0	BR-06
feed 53	7.04	0.29	84.6	0	BR-06
feed 54	7.32	0.26	94.3	0	BR-06
feed 55	7.58	0.24	104.1	0	BR-06
feed 56	7.82	0.22	113.8	0	BR-06
feed 57	8.03	0.20	123.5	0	BR-06
feed 58	8.23	0.19	133.2	0	BR-06
feed 59	8.42	0.17	142.9	0	BR-06
feed 60	8.59	0.17	152.7	0	BR-06
feed 61	9.18	38.22	17.0	1	BR-06
feed 62	4.28	0.64	15.9	0	BR-07
feed 63	4.92	0.94	26.6	0	BR-07
feed 64	5.86	0.68	37.3	0	BR-07
feed 65	6.54	0.52	48.0	0	BR-07
feed 66	7.06	0.45	58.8	0	BR-07
feed 67	7.51	0.37	69.5	0	BR-07
feed 68	7.88	0.33	80.2	0	BR-07
feed 69	8.21	0.31	90.9	0	BR-07
feed 70	8.52	0.3	101.7	0	BR-07
feed 71	8.82	0.21	112.4	0	BR-07
feed 72	9.03	0.2	123.1	0	BR-07
feed 73	9.23	0.15	133.8	0	BR-07
feed 74	9.38	2.85	67.4	0	BR-07
feed 75	12.32	35.13	17.0	1	BR-07
feed 76	3.72	2.03	21.2	0	BR-08
feed 77	5.75	0.62	45.8	0	BR-08
feed 78	6.37	0.38	58.0	0	BR-08
feed 79	6.75	0.28	67.1	0	BR-08
feed 80	7.03	0.22	74.5	0	BR-08
feed 81	7.24	0.18	80.8	0	BR-08



feed 82	7.42	0.15	86.5	0	BR-08
feed 83	7.57	0.13	91.6	0	BR-08
feed 84	7.70	0.12	96.2	0	BR-08
feed 85	7.82	0.44	99.3	0	BR-08
feed 86	9.20	37.33	31.0	1	BR-08
feed 87	3.60	2.03	21.2	0	BR-09
feed 88	5.63	0.62	45.8	0	BR-09
feed 89	6.25	0.38	58.0	0	BR-09
feed 90	6.63	0.28	67.1	0	BR-09
feed 91	6.91	0.22	74.5	0	BR-09
feed 92	7.12	0.18	80.8	0	BR-09
feed 93	7.30	0.15	86.5	0	BR-09
feed 94	7.45	0.13	91.6	0	BR-09
feed 95	7.58	0.55	96.6	0	BR-09
feed 96	8.87	28.28	31.0	1	BR-09

Πίνακας A2 – Ογκομετρικές ροές κάθε πειράματος

Παράρτημα Β

```
clear;clc;

x=[];
s=[];
t=[];
REx=[];
REs=[];
xm = [...];           % Experimental biomass concentration
sm = [...];           % Experimental glucose concentration
tm = [...];           % Time
meanb = [...];        % Random initial values for  $\mu_{max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$ 
stb = [meanb];
for k=1:3
b(:,k)=abs(normrnd(meanb(k), 10*stb(k),[1000,1]));
end
for d=1:10^7
for i=1:length(b)
fx=@(t,x,s) b(i,1)*x*s/(b(i,2)+s);
fs=@(t,x,s) -b(i,1)*x*s/(b(i,2)+s)/b(i,3);
t(1)=tm(1);
x(1)=xm(1);
s(1)=sm(1);
h=0.001;
tfinal=tm(end);
n=ceil((tfinal-t(1))/h);
for j=1:n
```




```

t(j+1)=t(j)+h;
k1x=fx(t(j), x(j), s(j));
k1s=fs(t(j), x(j), s(j));
k2x=fx(t(j)+h/2,x(j)+h/2*k1x,s(j)+h/2*k1s);
k2s=fs(t(j)+h/2,x(j)+h/2*k1x,s(j)+h/2*k1s);
k3x=fx(t(j)+h/2,x(j)+h/2*k2x,s(j)+h/2*k2s);
k3s=fs(t(j)+h/2,x(j)+h/2*k2x,s(j)+h/2*k2s);
k4x=fx(t(j)+h, x(j)+h*k3x, s(j)+h*k3s);
k4s=fs(t(j)+h, x(j)+h*k3x, s(j)+h*k3s);
x(j+1)=x(j)+h/6*(k1x+2*k2x+2*k3x+k4x);
s(j+1)=s(j)+h/6*(k1s+2*k2s+2*k3s+k4s);
end
dt = round((tm-t(1))/(h)+1);
REx(i) = max((abs(x(dt)-xm).^2));
REs(i) = max((abs(s(dt)-sm)./sm));
RE(i) = (REx(i)+REs(i))/2;
if (REx(find(RE==min(RE)))<=... & REs(find(RE==min(RE)))<=... & s(dt(end))>=0)
%Values of maximum errors
b_final = b(i,:);
disp(["d=" d])
disp(["b_final=" b_final])
disp(["REx=" REx(find(RE==min(RE))])])
disp(["REs=" REs(find(RE==min(RE))])])
break
end
end
arr(d) = min(RE);
arr2(d)= REx(find(RE==min(RE)));
arr3(d)= REs(find(RE==min(RE)));
B(d,:) = b(find(RE==min(RE)),:);
if d > 1
if arr(d) < arr(d-1)
k_new=find(RE==min(RE));
meanb=b(k_new,:);
else
k_new=find(arr==min(arr));
meanb=B(k_new,:);
end
stb = [meanb(1)/4 meanb(2)/2 meanb(3)/4];
b=[];
for k=1:3
b(:,k)=abs(normrnd(meanb(k), stb(k),[100,1]));
end
if i<100
break
end
end
RE=[];
REx=[];
REs=[];
disp(d)
disp(arr(d))
end
% Plot the solutions
subplot(2, 1, 1);

```



```
hold on
plot(t,x,'-')
plot(tm,xm,'.')
title('Biomass Concentration over Time');
xlabel('Time (hours)');
ylabel('Biomass Concentration (g/L)');
hold off
subplot(2, 1, 2);
hold on
plot(t, s, '-');
plot(tm,sm,'.');
title('Glucose Concentration over Time');
xlabel('Time (hours)');
ylabel('Glucose Concentration (g/L)');
hold off
sgtitle('Monod Kinetics: Biomass and Glucose Concentration over Time');
```