



**Engenharia Metabólica para a produção de
derivados de ácido xilônico em *E. coli*:
desenvolvimento de uma plataforma
biotecnológica renovável**

Liza Fernandes Moutinho

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Aline Silva Romão Dumaresq, D. Sc.

Paulo Moisés Raduan Alexandrino, M. Sc.

Agosto de 2017

**ENGENHARIA METABÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE
DERIVADOS DE ÁCIDO XILÔNICO EM *E. COLI*:
DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA
BIOTECNOLÓGICA RENOVÁVEL**

Liza Fernandes Moutinho

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Felipe Valle do Nascimento, M.Sc.

Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Wim Maurits Sylvain Degrave, D. Sc.

Orientado por:

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Aline Silva Romão Dumaresq, D.Sc.

Paulo Moisés Raduan Alexandrino, M.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Agosto de 2017

Moutinho, Liza Fernandes.

Engenharia metabólica para a produção de derivados de ácido xilônico em *E. coli*: desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica renovável. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

xi, 73 p.; il.

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017.
Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Aline Silva Romão Dumaresq e Paulo Moisés Raduan Alexandrino.

1. Engenharia Metabólica. 2. *Building block*. 3. Ácido xilônico. 4. FBA. 5. *Escherichia coli*. 6. Projeto Final de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 7. Maria Alice Zarur Coelho, Aline Silva Romão Dumaresq e Paulo Moisés Raduan Alexandrino. I. Engenharia metabólica para a produção de derivados de ácido xilônico em *E. coli*: desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica renovável.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, sem a qual nada na minha vida seria possível.

A meus pais por sempre terem me dado todo o suporte emocional e financeiro para realizar todos os meus sonhos loucos (e os sensatos também). Obrigada por estarem comigo desde sempre, por serem meus exemplos e pelos abraços nos momentos em que não achei que conseguiria (vulgo, todo final de período).

Vivi, mesmo você sendo implicante a maior parte do tempo, obrigada por conversar comigo sempre que precisei, pela amizade, pelo apoio e por embarcar comigo em qualquer parada! Alvim, obrigada também pelas conversas e pelas refeições *gourmet* quando eu não tive tempo de cozinhar.

A meu namorado Matheus, por toda a paciência e apoio nesse último período. Obrigada pela companhia nos fins de semana em que ambos precisávamos estudar, e também naqueles em que só eu precisava. Não teria conseguido sem você!

A meus orientadores, Maria Alice, Aline e Paulo, pelas conversas, pelas críticas, pelos conselhos, pelo conhecimento compartilhado, pelas horas dedicadas a esse projeto e pela orientação. Obrigada pela confiança que depositaram em mim, espero continuar contando com suas colaborações e amizades!

A meus amigos da faculdade, obrigada por enfrentarem comigo todas as dificuldades ao longo desses anos, por partilharem desesperos, conquistas, e por sermos capazes de rir juntos de tudo isso.

A todos os meus amigos, obrigada pela compreensão durante todos esses anos de faculdade e por não desistirem de mim mesmo com a minha ausência habitual.

Aos amigos do ISI, pelos pitacos e ideias no projeto, pelo aprendizado, pelos biscoitos compartilhados, pelos momentos de descontração e pela amizade. Uma parte desse trabalho também é de vocês!

Ao Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras pela infraestrutura sem a qual esse trabalho não seria possível, e também pelo apoio financeiro.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

ENGENHARIA METABÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE ÁCIDO XILÔNICO EM *E. COLI*: DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA BIOTECNOLÓGICA RENOVÁVEL.

Liza Fernandes Moutinho

Agosto, 2017

Orientadores: Prof.^a Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc

Aline Silva Romão Dumaresq, D. Sc.

Paulo Moisés Raduan Alexandrino, M. Sc.

Matérias-primas renováveis ainda são pouco utilizadas em processos industriais para produção de derivados químicos devido ao limitado desenvolvimento de tecnologia renovável, o que torna esses processos pouco competitivos com aqueles que utilizam matérias-primas de origem fóssil. Como uma forma de aumentar o rendimento dos processos, podem ser realizadas coproduções utilizando sistemas biológicos. Nesse contexto, o conceito de plataforma microbiana renovável surge como uma resposta para o desenvolvimento de processos versáteis e competitivos. A Engenharia Metabólica atua como uma forma de unir a utilização de resíduos da indústria de renováveis e realizar a predição do comportamento de maquinarias celulares.

Nesse trabalho foi desenvolvida uma plataforma biotecnológica renovável a partir da xilose, a partir da qual foi realizada a análise *in silico* da produção do *building block* e de um de seus derivados. O micro-organismo escolhido para a modelagem foi a bactéria *Escherichia coli* e o modelo *E. coli core* foi adotado devido a sua simplicidade. Foi feita uma comparação de rendimentos e prospecção tecnológica e o ácido xilônico se mostrou o mais interessante *building block* entre as opções analisadas por possuir os maiores rendimentos e menor número de trabalhos publicados, mostrando potencial de desenvolvimento. A partir de uma análise conjunta das vias metabólicas para obtenção dos compostos e do mercado e aplicações dos mesmos, foram escolhidos como produtos principais para a plataforma: 1,4-butanodiol, 1,2,4-butanotriol, ácido glicólico, ácido lático, ácido málico, ácido succínico. A produção do ácido xilônico e do 1,2,4-butanotriol foram simuladas usando o *software* COBRApy com auxílio do método FBA (Análise de Balanço de Fluxos) resultando na identificação de vários pontos chave para análise: i) o transporte de xilose para o interior da célula, ii) o balanço redox e a atuação da enzima NAD transidrogenase em *E. coli*, iii) o fluxo de carbono a partir do substrato e iv) a respiração celular. Foram feitas propostas de coprodução dos derivados da plataforma que fechassem o balanço redox, resultando em três diferentes vias, todas incluindo o 1,4-butanodiol como coproduto já que a via para sua produção é a única da plataforma que consome cofatores. Sendo assim, o presente trabalho identificou o ácido xilônico como um *building block* interessante para melhor aproveitamento da xilose, além de ser proposta uma plataforma de produção de diversos produtos de interesse comercial. Foi possível também mapear diversos pontos chave a serem analisados nessa via metabólica para o desenvolvimento de uma plataforma otimizada, mostrando a viabilidade da análise por FBA e a importância da Engenharia Metabólica.

Abstract of a Final Project presented to Escola de Química/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Bioprocess Engineering.

**METABOLIC ENGINEERING FOR THE PRODUCTION OF DERIVATIVES OF
XYLONIC ACID IN E. COLI: DEVELOPMENT OF A RENEWABLE
BIOTECHNOLOGICAL PLATFORM**

Liza Fernandes Moutinho

August, 2017

Supervisors: Prof.^a Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc

Aline Silva Romão Dumaresq, D. Sc.

Paulo Moisés Raduan Alexandrino, M. Sc.

Renewable feedstocks are still not much used in industrial processes for the production of chemicals due to the limited development of renewable technology, making these processes not competitive to the ones using fossil feedstocks. To improve processes yields, coproduction using biological systems can be performed. In this matter, the concept of microbial renewable platform arises as an answer to the development of versatile and competitive processes. Metabolic Engineering acts as a way of joining together the use of renewable industry residues and the achievement of the prediction of cells behavior.

In this paper, it was developed a biotechnological renewable platform from xylose, in which it was performed the building block and one of its derivatives production in silico analysis. Escherichia coli was the bacteria selected for the modelling and the model E. coli core was used because of its simplicity. After a yield comparison and technology prospection, xylonic acid was shown as the most interesting building block among the options analyzed for having the greatest yields and fewer publications, which accounts for a development potential. Analyzing altogether metabolic pathways and Market and applications for the compounds, the following were chosen as the main derivatives for the platform: 1,4-butanediol, 1,2,4-butanetriol, glycolic acid, lactic acid, malic acid and succinic acid. The production of xylonic acid and 1,2,4-butanetriol were simulated at COBRAPy with the method of FBA, resulting in the identification of some key points to discuss: i) xylose transport to the intracellular space, ii) redox balance and behavior of the enzyme NAD transhydrogenase in E. coli, iii) carbon flux from the substrate and iv) cellular breathing. It was established some coproduction proposals for the derivatives of the platform in which redox balance was respected, resulting in three different pathways, all of it including 1,4-butanediol as coproduct as the pathway for its production is the only one in the platform that is able to consume cofactors. This paper identified xylonic acid as an interesting building block for the improved use of xylose, and it was suggested a production platform for many commercially interesting products. It was able to map some key points to be analyzed in this metabolic pathway in order to develop an optimized platform, which demonstrate the viability of FBA and the importance of Metabolic Engineering.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Revisão Bibliográfica.....	2
2.1.	Produção química renovável	2
2.2.	Rendimento	3
2.3.	Plataforma microbiana	7
2.3.1.	Metabolismo	8
2.3.1.1.	Enzimas.....	9
2.3.1.2.	Balanço redox	10
2.3.1.3.	Transporte através da membrana plasmática	11
2.4.	Engenharia Metabólica.....	11
2.4.1.	Plataformas <i>in silico</i>	12
3.	Metodologia	13
3.1.	Escolha do <i>building block</i>.....	13
3.2.	Definição da plataforma metabólica.....	15
3.2.1.	Aplicações	16
3.2.2.	Mercado.....	16
3.2.3.	Tecnologia de produção	17
3.3.	Simulação da obtenção do ácido xilônico.....	17
3.3.1.	Crescimento de biomassa dependente de transportadores de xilose	21
3.4.	Estudo das vias que levam aos derivados da plataforma	22
3.4.1.	1,2,4-butanotriol (1,2,4-BTO)	22
3.4.2.	Coprodução de derivados da plataforma metabólica.....	22
4.	Resultados e Discussões.....	24
4.1.	Escolha do <i>building block</i>.....	24

4.2. Definição da plataforma metabólica.....	29
4.2.1. Avaliação do mercado e aplicações dos principais derivados do mapa metabólico	32
4.2.1.1. 1,4-Butanodiol	32
4.2.1.2. 1,2,4-Butanotriol.....	33
4.2.1.3. Ácido Glicólico.....	34
4.2.1.4. Ácido Lático	35
4.2.1.5. Ácido Málico	37
4.2.1.6. Ácido Succínico.....	38
4.2.1.7. Comparação de derivados da plataforma.....	40
4.3. Estudo da plataforma metabólica.....	42
4.3.1. Simulação da obtenção do ácido xilônico	42
4.3.2. Crescimento de biomassa dependente de transportadores de xilose	48
4.3.3. Simulação da obtenção do 1,2,4-butanotriol	50
4.3.4. Propostas de coprodução de derivados da plataforma.....	53
5. Conclusões	59
5.1. Trabalhos futuros.....	61
6. Referências Bibliográficas	62
7. Apêndices.....	66
7.1. Apêndice 1 – Vias metabólicas para os candidatos a <i>building block</i>.....	66
8. Anexos.....	68
8.1. Anexo 1 – Modelo <i>E. coli core</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Esquema da via até o <i>building block</i> (ácido xilônico), a partir da xilose.	17
Figura 3.2 Esquema de transporte de metabólitos.	18
Figura 3.3 Reações adicionadas ao modelo <i>E. coli core</i>	20
Figura 3.4 Esquema da via até o 1,2,4-butanotriol a partir do <i>building block</i> (ácido xilônico). ..	22
Figura 4.1 Esquema geral de vias metabólicas para a produção dos principais <i>building blocks</i> e compostos de interesse estudados.	24
Figura 4.2 Rendimentos para cada um dos candidatos a <i>building block</i>	25
Figura 4.3 Levantamento de artigos nas bases Periódicos CAPES e Scopus.	26
Figura 4.4 Levantamento de patentes do USPTO.	27
Figura 4.5 Comparação de compostos com os quais foram feitas analogias de forma a propor a enzima a ser utilizada para catalisar a reação da lactonase.	30
Figura 4.6 Comparação de compostos com os quais foram feitas analogias de forma a propor a enzima a ser utilizada para catalisar a reação da diol desidratase.	30
Figura 4.7 Mapa da plataforma metabólica, reunindo dados de enzimas, reações e compostos. .	31
Figura 4.8 Dados de importação brasileira do 1,4-butanodiol reportados pela Receita Federal. .	33
Figura 4.9 Dados de importação brasileira do 1,2,4-butanotriol reportados pela Receita Federal.	34
Figura 4.10 Dados de importação brasileira do ácido glicólico reportados pela Receita Federal.	35
Figura 4.11 Dados de importação brasileira do ácido lático reportados pela Receita Federal.	37
Figura 4.12 Dados de importação brasileira do ácido málico reportados pela Receita Federal. ..	38
Figura 4.13 Dados de importação brasileira do ácido succínico reportados pela Receita Federal.	39
Figura 4.14 Divisão de áreas de aplicação, incluindo compostos que possuem aplicações nessas áreas.	41
Figura 4.15 Relação de cada composto com suas aplicações.	42
Figura 4.16 Principais transportadores de xilose para dentro da célula.	45
Figura 4.17 Representação do Escher das enzimas NAD transidrogenase (NADTRHD), NADP transidrogenase (THD2) e NADH desidrogenase (NADH16)	47
Figura 4.18 Esquema da via de coprodução de 1,4-butanodiol, ácido glicólico e ácido lático, conforme a seguinte estequiometria: "2 xilose → 1 (1,4-butanodiol) + 1 Ácido Glicólico + 1 Ácido Lático"	54
Figura 4.19 Esquema da via de coprodução de 1,4-butanodiol e ácido succínico, conforme a seguinte estequiometria: "4 xilose → 3 (1,4-butanodiol) + 1 Ácido Succínico"	55
Figura 4.20 Esquema da via de coprodução de 1,4-butanodiol e ácido málico, conforme a seguinte estequiometria: "5 xilose → 4 (1,4-butanodiol) + 1 Ácido Málico"	56
Figura 4.21 Possibilidades de caminhos metabólicos para obtenção do ácido succínico a partir da glicose.	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 8.1 Grau de redução mais comum para átomos em compostos orgânicos.....	4
Tabela 4.1 Análise comparativa das moléculas candidatas a <i>building block</i>	28
Tabela 4.2 Resumo das reações catalisadas por cada enzima da plataforma.....	29
Tabela 4.3 Resumo de dados de mercado, aplicações e rotas de produção dos derivados da plataforma.	40
Tabela 4.4 Comparação de condições anaeróbica e aeróbica sem restrição de fluxo de oxigênio.	44
Tabela 4.5 Deleção de genes de transportadores de xilose (XylE e XylFGH).	45
Tabela 4.6 Experimento modificando a faixa de fluxo da enzima NAD transidrogenase (NADTRHD).	46
Tabela 4.7 Deleção de genes responsáveis por transportadores de xilose para situação anaeróbica - comparação com HASONA, KIM, et al. (2004).	49
Tabela 4.8 Experimentos relacionados à otimização do 1,2,4-butanotriol (1,2,4-BTO) para um uptake de xilose de 1,33 mmol/g _{DW} .h.	51
Tabela 4.9 Resultado dos rendimentos dos derivados do ácido xilônico na plataforma proposta, balanço de ATP, cofatores e gás carbônico gerados na via metabólica que leva até o composto.57	
Tabela 7.1 Metabólitos contidos no modelo E. coli core, suas identificações dentro das reações descritas na Tabela 7.2 e em qual compartimento os mesmos estão presentes.	68
Tabela 7.2 Reações contidas no modelo E. coli core, como elas são identificadas e quais metabólitos (com suas respectivas estequiometrias) fazem parte das mesmas.....	70

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato, molécula que armazena energia
BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento
COBRA	<i>CO</i> nstraint-Based <i>R</i> econstruction and <i>A</i> nalysis
Código HS	Harmonyzed System
FBA	Análise de Balanço de Fluxo (<i>Flux Balance Analysis</i>)
NAD ⁺	Coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP ⁺	Forma fosforilada da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Forma fosforilada da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NCM	Nomeclatura Comum do Mercosul
Número CAS	Número com registro único no banco de dados do <i>Chemical Abstracts Service</i> , uma divisão da <i>Chemical American Society</i>
Número EC	<i>Enzyme Commission Number</i> : classificação numérica para as enzimas, baseado nas reações químicas que catalisam.
PPP	Via das pentose fosfato
TCA	Ciclo do ácido cítrico, ciclo do ácido tricarbóxico, ou ciclo de Krebs
XylE	Gene que codifica o transportador de xilose que faz simporte de próton
XylFGH	Gene que codifica o transportador de xilose que usa ATP

NOMENCLATURA

Letras Latinas

Símbolo	Descrição	Dimensão
Y	Rendimento	$\frac{m(\text{produto})}{m(\text{substrato})}$
Y ^T	Rendimento termodinâmico	$\frac{m(\text{produto})}{m(\text{substrato})}$
Y ^Q	Rendimento estequiométrico	$\frac{m(\text{produto})}{m(\text{substrato})}$
Y ^{Q,S}	Rendimento da via que considera balanço de NADH, NADPH e ATP	$\frac{m(\text{produto})}{m(\text{substrato})}$

Letras Gregas

Símbolo	Descrição	Dimensão
v	Taxa de reação	m/(V.t)
Δ	Deleção de gene	-
γ	Grau de redução	-

1. Introdução

A economia atual é majoritariamente baseada na utilização do petróleo como matéria-prima para produção de combustíveis e produtos químicos, com aplicações em praticamente todas as áreas. Porém, devido à instabilidade de preços e ao caráter não-sustentável desse tipo de matriz, há esforços voltados ao uso de matéria-prima renovável ao invés das matérias-primas fósseis. O desenvolvimento da biotecnologia se mostra essencial nesse âmbito no sentido de desenvolver bioprocessos mais competitivos com os processos que atualmente predominam no mercado, gerando bioprodutos com características semelhantes aos de origem petroquímica (*drop-in*) ou até mesmo que possuem novas propriedades devido ao caráter da matéria-prima renovável (não *drop-in*).

Devido a impasses tecnológicos, a xilose é o açúcar menos utilizado dentre aqueles presentes nos resíduos renováveis da indústria de etanol e açúcar e de papel e celulose. Por isso, esforços são realizados objetivando a utilização economicamente viável desse resíduo, incluindo o desenvolvimento de micro-organismos capazes de metabolizá-la.

Nesse contexto, a engenharia metabólica tem a função de aumentar o conhecimento sobre micro-organismos em prospecção de forma a aprimorar as vias metabólicas que levam ao produto de interesse. Métodos *in silico* são amplamente utilizados para a predição de modelos metabólicos, sendo o mais simples e abrangente deles o FBA (*Flux Balance Analysis*).

O presente trabalho teve como objetivo o mapeamento de possíveis *building blocks* e seus derivados para fazerem parte de uma plataforma biotecnológica renovável e a definição de pontos chave para análise de uma via metabólica visando a sua otimização. Foram identificados diversos produtos de interesse comercial através de análises de mercado e aplicações e foram mapeadas diversas características da via metabólica das quais é imprescindível obter dados da literatura para a inserção em um modelo, a fim de obter uma predição mais acurada da resposta celular.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Produção química renovável

O petróleo é suscetível a uma grande instabilidade de preços, dependente não só da economia, mas também de questões políticas. Sendo assim, é imprescindível desenvolver tecnologia renovável para que a economia não seja tão dependente de fontes fósseis. É importante também possuir versatilidade de matérias-primas, para que o preço do produto final não dependa de flutuações no preço da matéria-prima (EUROPEAN COMMISSION, 2014). Mas, para que a matéria-prima renovável possa competir em escala industrial com o petróleo, já estabelecido no mercado, é necessário que seja barata, amigável ao meio ambiente e que não compita com alimentos (MOSIER, WYMAN, *et al.*, 2005). Nesse contexto, uma outra vantagem é a possibilidade da utilização de resíduos de matérias-primas renováveis que, por serem resíduos, tem preço acessível e ainda são obtidos após a retirada dos alimentos do campo (ou a partir de espécies vegetais que não servem para a alimentação humana ou animal).

Os monossacarídeos mais abundantes na matéria-prima lignocelulósica (composta de celulose, hemicelulose e lignina) são a glicose e a xilose, correspondendo a 60-70 e 30-40%, respectivamente, de seus hidrolisados (MOSIER, WYMAN, *et al.*, 2005; KIM, HA, *et al.*, 2012). Apesar dessa grande porcentagem de xilose, a maior parte do desenvolvimento de tecnologia renovável é voltado à utilização da glicose, e muitos estudos recentes visam também a utilização do glicerol por ser um rejeito abundante devido à crescente produção de biodiesel.

A xilose é um dos principais açúcares presentes na hemicelulose. É a principal fração não utilizada nas refinarias de açúcar e etanol, além de também ser um resíduo na indústria de papel e celulose, dois setores importantes na economia brasileira. Esse desperdício ocorre devido às dificuldades físicas de acesso à fração hemicelulósica, à baixa fermentabilidade das pentoses (as células normalmente só utilizam essa fonte após esgotamento da glicose, consequência do crescimento diáuxico), à falta de transportadores específicos de pentoses (açúcares C5) e à necessidade do desenvolvimento de micro-organismos capazes de fermentar C5 (AVANTHI, KUMAR, *et al.*, 2016).

A entrada de produtos de fonte renovável no mercado pode ser um desafio, por motivos que vão além do custo mais elevado de produção. Quando um composto é quimicamente equivalente

ao oriundo de fontes fósseis, o mesmo é classificado como *drop-in*. Essas moléculas estão prontas para entrar no mercado, por serem idênticas às já comercializadas, oferecendo, portanto, menor risco financeiro, acesso imediato ao mercado e maior aceitação dos consumidores. Esse é o caso do PET verde da Coca-Cola (Plant Bottle™), onde o etileno glicol responsável por 30% da composição do polímero é produzido a partir do etanol obtido por fermentação de açúcares da cana-de-açúcar, ao invés da utilização da matéria-prima tradicional que consiste em hidrocarbonetos do petróleo. Outro exemplo é o polietileno verde I'm green™ da Braskem, também obtido a partir do etanol da cana-de-açúcar. Por outro lado, quando ocorrem mudanças na matriz de produção, são produzidos compostos quimicamente diferentes dos já existentes. Essas moléculas são consideradas não *drop-in* e, apesar de possivelmente apresentarem propriedades superiores, existe grande resistência da cadeia de valor desse produto de incorporá-lo ao mercado (E4TECH; RE-CORD; WUR., 2015). Dessa forma, quando há o desenvolvimento de um produto não *drop-in*, é necessário além da tecnologia, desenvolver aplicações e preparar o mercado para sua inserção.

2.2. Rendimento

Rendimento pode ser definido como a proporção do material que é recuperada ao final de um processo, ou seja, a matéria que não é perdida ou dissipada para o ambiente (MILFORD, ALLWOOD e CULLEN, 2011). O rendimento de um processo é o critério mais básico e comum para medir a performance de um processo na indústria, por ser fortemente ligado ao custo de produção (WANG e TAMIRAT, 2014).

De forma prática, o rendimento representa o quanto de substrato fornecido a um processo foi transformado em produto. Isso pode ser previsto ao calcular o rendimento teórico, que indica quanto do substrato tem a capacidade de ser incorporado no produto. No entanto, esse cálculo de rendimento normalmente indica um valor mais elevado do que o observado no processo, devido a perdas por processos *downstream*, pelo uso do reagente por outras reações, desviando o fluxo de carbono para outros compostos que não sejam o produto desejado, ou até mesmo o fato da reação não ser completa (PETRUCCI, HARWOOD e HERRING, 2002; WHITTEN, GAILEY e DAVIS, 1992). Em vista disso, uma forma de analisar o rendimento de um processo é calculando o rendimento percentual, dado pela razão entre o rendimento observado experimentalmente e o rendimento teórico calculado.

O rendimento teórico pode ser calculado tanto para processos químicos quanto bioquímicos. Nas duas situações podem ser calculados os rendimentos termodinâmicos, o qual não considera estequiometria, apenas o grau de redução do substrato principal e do produto. Pode ser calculado também o rendimento estequiométrico de processos químicos, onde devem ser explicitados todos os reagentes e produtos do processo e, após balanceados, realizado o cálculo de rendimento considerando a estequiometria entre substrato e produto. O mesmo é aplicado para processos bioquímicos, considerando nesse caso qual foi a via metabólica que levou do substrato ao produto a fim de determinar a estequiometria desses compostos ao final da via. No caso das reações bioquímicas, existem algumas formas adicionais para cálculo de rendimento teórico, que podem considerar, por exemplo, como a célula usaria cofatores em excesso ou se haveria incorporação de CO₂ para a produção de biomassa, entre outros. Todos esses rendimentos são calculados em mol_{produto}/mol_{substrato}, e a conversão para g_{produto}/g_{substrato} pode ser obtida ponderando o valor obtido pelos pesos moleculares de cada um dos compostos. A unidade em g/g (grama/grama) é um bom indicativo para comparar diferentes substratos e produtos e seus potenciais de rendimento.

DUGAR e STEPHANOPOULOS (2011) descreveu algumas formas de calcular o rendimento teórico em processos bioquímicos. Dentre eles, os três mais relevantes para o presente trabalho são: Y^E (rendimento termodinâmico), Y^P (rendimento da via) e Y^{P,G} (rendimento que considera incorporação de NADH na via).

O rendimento termodinâmico (Y^E) leva em conta o grau de redução dos compostos – no caso, considera-se o composto de origem (substrato) e o composto final do processo (produto). Esse rendimento não depende da via utilizada, somente considera o produto e o substrato. Para o cálculo do grau de redução de cada composto é considerado o grau de redução (γ) de cada átomo (Tabela 2.1) de um mol do composto.

Tabela 2.1 Grau de redução mais comum para átomos em compostos orgânicos.

Átomo	γ (grau de redução)
C (carbono)	4
H (hidrogênio)	1
O (oxigênio)	-2
N (nitrogênio)	-3
S (enxofre)	6
P (fósforo)	5

Ao calcular o rendimento termodinâmico, é considerada a razão entre o grau de redução do substrato e do produto, ponderado com o peso molecular de cada um dos compostos. No caso da

produção de etanol a partir da glicose, por exemplo, o rendimento termodinâmico pode ser calculado considerando-se as fórmulas e pesos moleculares da glicose (C₆H₁₂O₆, PM: 180 g/mol) e do etanol (C₂H₆O, PM: 46 g/mol) e é dado por:

$$(Y^E)_{\text{etanol/glicose}} = \left[\frac{Y_{\text{glicose}}}{Y_{\text{etanol}}} \right] \times \frac{PM_{\text{etanol}}}{PM_{\text{glicose}}} \quad (\text{Equação 2.1})$$

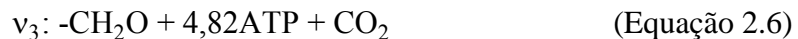
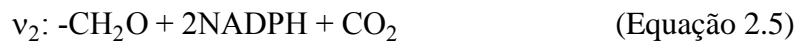
$$(Y^E)_{\text{etanol/glicose}} = \left[\frac{6 \times 4 + 12 \times 1 + 6 \times (-2)}{2 \times 4 + 6 \times 1 + 1 \times (-2)} \right] \times \frac{46 \text{ g/mol}}{180 \text{ g/mol}} \quad (\text{Equação 2.2})$$

$$(Y^E)_{\text{etanol/glicose}} = 0,51 \text{ g/g} \quad (\text{Equação 2.3})$$

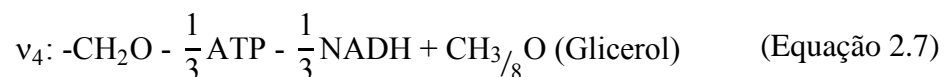
Tanto o rendimento da via (Y^P) quanto o rendimento que considera a incorporação de NADH para produção de glicerol (Y^{P,G}) dependem da via utilizada. O rendimento da via (Y^P) considera quantos mols de produto são gerados para cada mol de xilose para aquela via específica, escrita de forma generalizada com coeficientes reduzidos à fórmula mínima do substrato (CH_nO_n) na Equação 2.4.



Além disso, é incluído em seu cálculo reações para a geração de NADPH e ATP quando os mesmos são necessários para a biossíntese do composto que se deseja obter, representadas respectivamente pelas Equações 2.5 e 2.6.



O Y^{P,G} considera, adicionalmente, o quanto de NADH em excesso foi reoxidado através da reação de produção de glicerol (Equação 2.7), enquanto no cálculo do Y^P é considerado que todo o NADH foi consumido em vias fúteis para a produção de interesse (vias que não levam à produção da molécula de interesse, mas são importantes para o crescimento da célula ou manutenção da homeostasia).



Para ambos os cálculos, é feita a ponderação com os pesos moleculares dos compostos utilizados. Por exemplo, na via de produção de etanol a partir da glicose, tem-se a reação final dada por:



E o rendimento da via é dado pela Equação 2.8, na qual Y é o rendimento estequiométrico dado pela Equação 2.9.

$$(Y^P)_{\text{etanol/glicose}} = Y \times \left[\frac{v_1}{v_1+v_2+v_3} \right] = Y \times \left[\frac{1}{1+\frac{a}{2}-\frac{c}{4,82}} \right] = 0,51 \times \left[\frac{1}{1+\frac{0}{2}-0} \right] = 0,51 \quad (\text{Equação 2.8})$$

$$Y_{\text{etanol/glicose}} = \frac{2 \text{ mol Etanol}}{1 \text{ mol Glicose}} = \frac{(2 \text{ mol}) \times (46 \text{ g/mol})}{(1 \text{ mol}) \times (180 \text{ g/mol})} = 0,51 \text{ g/g} \quad (\text{Equação 2.9})$$

No caso do etanol produzido a partir da glicose, o rendimento da via é o mesmo que o rendimento termodinâmico. Essa igualdade, portanto, não se aplica a casos em que há desbalanceamento. Por exemplo, quando NADH e CO₂ são gerados junto com o produto, o rendimento da via é menor do que o termodinâmico (DUGAR e STEPHANOPOULOS, 2011). Nesse caso específico, o rendimento da via (Y^P) se iguala ao rendimento estequiométrico (Y), já que essa via não consome NADPH nem ATP.

O Y^{P,G} considera que o NADH em excesso na via é reoxidado através da via de produção de glicerol. Esse é um caso específico para *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura onde o glicerol serve como um “dreno” para o NADH. No caso da bactéria *Escherichia coli*, ao invés do glicerol pode ser usado o succinato, resultando em uma equação similar (DUGAR e STEPHANOPOULOS, 2011), a qual será descrita na seção 3.1. Para o cálculo do Y^{P,G} é usada a Equação 2.10, na qual os coeficientes estequiométricos, representados pelas letras minúsculas em ordem alfabética (a, b, c, d, e) antes de cada composto na Equação 2.4, são aqueles obtidos para cada caso específico da produção de um composto.

E assim, de posse dos coeficientes estequiométricos reduzidos, calcula-se o rendimento Y^{P,G} através da Equação 2.10.

$$Y^{P,G} = Y \times \left[\frac{v_1}{v_1+v_2+v_3+v_4} \right] = Y \times \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{a}{2}\right) + \left(\frac{d-c}{4,82}\right) + (3 \times d)} \right] \quad (\text{Equação 2.10})$$

É importante ressaltar que esses cálculos devem ser analisados caso a caso, uma vez que há restrições para o uso de cada uma das equações. Por exemplo, os termos “a/2” e “-c/4,82” da Equação 2.8 só irão fazer parte do cálculo quando houver consumo de NADPH ou de ATP, respectivamente, para a produção de interesse, assim como o termo “3d” da Equação 2.10 só irá estar presente no cálculo quando houver geração de NADH na via.

Uma das vantagens da utilização do rendimento bioquímico é a possibilidade de sua aplicação em qualquer tipo de produção por sistemas microbiológicos, ou seja, podem ser feitas análises de rendimento na produção tanto de biocombustíveis quanto de biossintéticos (produtos químicos sintetizados por sistemas biológicos). Além disso, o cálculo do rendimento de diferentes vias permite a comparação entre elas, guiando a escolha de precursores metabólicos para um determinado processo, ao se considerar qual opção apresenta melhor balanço de energia. Também se torna possível a otimização da seleção do substrato a fim de maximizar o rendimento (DUGAR e STEPHANOPOULOS, 2011).

A eficiência da via (η) é definida como a razão entre o rendimento da via (Y^P) e o rendimento teórico máximo (Y^E), sendo responsável por representar a eficiência da via metabólica em transferir energia do substrato para o produto. Normalmente, vias metabólicas que possuem um balanço positivo de cofatores em sua forma reduzida, ou seja, produzem NADH e NADPH junto com seus produtos, são menos eficientes em termos de rendimento. Já as vias que são balanceadas ou necessitam do fornecimento de cofatores na forma reduzida são mais eficientes, resultando em rendimentos próximos ao máximo teórico (DUGAR e STEPHANOPOULOS, 2011).

2.3. Plataforma microbiana

Uma plataforma química consiste na produção versátil de diversos compostos químicos de interesse, baseada na presença de um *building block* (bloco de construção químico), ou seja, um composto cuja estrutura química revela potencial para sua conversão em inúmeros químicos e materiais de alto valor agregado (NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), 2004). O Departamento de Energia dos Estados Unidos selecionou, numa gama de mais

de 300 substâncias, 12 potenciais químicos de plataforma de fonte renovável. Foram usados como critérios para a seleção a origem em precursores de biomassa (carboidratos, lignina, ácidos graxos e proteínas), processos para a plataforma, *building blocks*, químicos secundários, intermediários e aplicação final, chegando-se a 12 *building blocks* originados de açúcares: ácido succínico, fumárico e málico, ácido furano-2,5-dicarboxílico (FDCA), ácido 3-hidroxiopropiônico (HPA), ácidos aspártico, glucárico, glutâmico, itacônico e levulínico, 3-hidroxi-butirilactona, glicerol, sorbitol e xilitol/arabinitol. Essas plataformas de químicos renováveis podem conter etapas tanto químicas quanto bioquímicas (NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), 2004).

Diversas empresas já trabalham com plataformas biotecnológicas em escala industrial. Um exemplo é a empresa Bioamber, que possui como principal *building block* o ácido succínico, obtido através da fermentação de açúcares do milho. Para a obtenção dos derivados do *building block* são utilizadas etapas químicas. Em um único passo catalítico, a Bioamber transforma o ácido succínico em 1,4-butanodiol (1,4-BDO) e tetraidrofurano (THF), os quais são usados como substitutos *drop-in* em uma ampla gama de aplicações. Também é produzido a partir do ácido succínico o disódio succinato, um importante ingrediente em temperos que pode ser usado como substituto de realçadores de sabor e até mesmo do sal de cozinha (BIOAMBER INC., 2008).

Outro exemplo de plataforma microbiana renovável é o caso da Amyris, que produz o farneseno, composto que pode ser aplicado na área de solventes, emolientes e vitaminas. O processo utiliza uma levedura geneticamente modificada para fermentar açúcares da cana. Uma das grandes vantagens dessa plataforma é a geração de químicos que não podem ser obtidos por processos químicos, além de substituir produtos de origem fóssil com compostos renováveis (AMYRIS, 2017).

2.3.1. Metabolismo

O metabolismo consiste no conjunto de todas as transformações químicas existentes em um organismo. Ele ocorre devido à ação de catalisadores bioquímicos, as enzimas, as quais catalisam uma série de reações que constituem as vias metabólicas. Cada uma dessas transformações altera minimamente o composto em questão, causando a remoção, adição ou transferência de um átomo ou grupo funcional, o que, em conjunto, leva um substrato a se transformar em um produto. Os compostos intermediários nessa via são chamados de metabólitos e podem participar de diferentes etapas em diversas vias distintas (NELSON e COX, 2011).

Existem micro-organismos que funcionam com metabolismo aeróbico, anaeróbico ou são flexíveis entre as duas situações. Metabolismo aeróbico é aquele no qual o oxigênio é oceptor final de elétrons. De forma distinta, o metabolismo anaeróbico não conta com a presença de oxigênio, então outras moléculas devem servir como aceptores finais de elétrons. Isso é o que acontece na fermentação, onde os aceptores finais de elétrons mais comuns são o lactato, o etanol e o acetato (VOET, VOET e PRATT, 2008).

Assim como qualquer ser vivo, os micro-organismos precisam da energia oriunda de substratos para produzir biomassa e exercer suas funções vitais. Para que essa energia seja transferida do substrato (fonte de carbono) até os compostos essenciais para a sobrevivência e funcionamento da célula, é necessário que esses compostos sejam metabolizados. O catabolismo acontece quando moléculas orgânicas são convertidas em produtos finais menores e mais simples, ocorrendo a liberação de energia enquanto uma parte é conservada na forma de ATP e de transportadores de elétrons reduzidos. Já para a formação dos metabólitos maiores e mais complexos é necessário o fornecimento de energia. Esse é o anabolismo, também chamado de biossíntese (NELSON e COX, 2011). Entre as principais vias do metabolismo microbiano estão a glicólise, a via das pentose-fosfato e o ciclo do ácido cítrico. Um dos mais importantes *building blocks* intracelular é o acetil-coA, essencial para a formação de biomassa e diversos outros compostos dentro da célula.

2.3.1.1. Enzimas

O metabolismo e o controle que existe nos sistemas vivos ocorre devido à ação de enzimas, catalisadores bioquímicos de natureza essencialmente proteica (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008). Analogamente ao que ocorre nos processos químicos, as reações bioquímicas dentro da célula de um micro-organismo podem ser realizadas com ou sem a presença de um catalisador, i.e., molécula capaz de elevar a velocidade de conversão de um determinado substrato a um determinado produto. No entanto, as reações biológicas não ocorreriam em velocidade necessária à manutenção da vida sem a presença de enzimas (FOGLER, 1939). As principais vantagens do uso das enzimas frente ao uso de catalisadores químicos nos processos industriais são: sua elevada especificidade (podem catalisar reações a partir de um único substrato, assim como realizar apenas uma reação bioquímica, gerando assim apenas o produto específico desejado, sem a geração de coprodutos), condições brandas (temperatura e pressão) de operação e a redução de rejeitos tóxicos despejados no meio ambiente (COELHO, SALGADO e RIBEIRO, 2008).

As enzimas usualmente apresentam o sufixo “-ase” e podem ser nomeadas de acordo com as reações que catalisam (desidrogenase, desidratase, redutase, liase, etc) e, de forma mais específica, pelo substrato que consomem (álcool desidrogenase, glicerol desidratase, nitrato redutase, etc) (FOGLER, 1939). De forma a padronizar a nomenclatura das enzimas, a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) criou o *Enzyme Commission*, mais conhecido como número EC (*EC number*). A identificação completa de uma enzima específica contém quatro conjuntos de grupos, como por exemplo, EC 1.1.1.27 para a L-lactato desidrogenase, onde os números se tornam cada vez mais específicos para a classificação conforme seu posicionamento (o primeiro número indica classe, ou seja, o tipo de reação que a enzima realiza, o segundo a sub-classe dentro da classe, o terceiro classifica conforme o grupo químico que participa da reação e o quarto identifica a enzima propriamente dita) (IUBMB, 2017).

2.3.1.2. Balanço redox

Para auxiliar na catálise de reações de oxidação-redução e para muitos tipos de processos de transferências de grupos entre substrato e produto de uma enzima, é necessária sua associação a cofatores, que podem ser tanto íons metálicos quanto moléculas orgânicas chamadas de coenzimas. Duas das coenzimas mais comuns são o dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD^+) e seu equivalente fosforilado, o NADP^+ . O NADH e o NADPH , suas respectivas formas reduzidas, agem como transportadores intracelulares de equivalentes redutores (elétrons), envolvendo a transferência de dois átomos de hidrogênio entre substrato e produto e são capazes de se regenerar em reações catalisadas por outras enzimas a fim de participarem de novos ciclos de oxidação e redução (VOET, VOET e PRATT, 2008).

Em condições normais, a quantidade de cofatores oxidados e reduzidos se apresenta balanceada dentro da célula. Desse modo, estão sempre ocorrendo reações que compensem o excesso de uma ou outra forma do cofator (NELSON e COX, 2011). Apesar da semelhança em sua estrutura química, NADH e NADPH normalmente não são intercambiáveis, ambos usam a energia livre da oxidação metabólica, mas o NADH a usa para a síntese de ATP enquanto NADPH a usa para a biossíntese redutora (VOET, VOET e PRATT, 2008). No entanto, em microorganismos como a *Escherichia coli* está presente um conjunto de enzimas, as NAD transidrogenases, capazes de interconverter as formas fosforilada e não fosforilada (NADPH em NADH e NAD^+ em NADP^+ , e vice-versa) (HATEFI e YAMAGUCHI, 1996).

2.3.1.3. Transporte através da membrana plasmática

Toda e qualquer reação que ocorre dentro de células vivas depende da presença tanto da enzima quanto do substrato para ocorrer. Para que haja diferença da concentração de metabólitos entre as regiões intra- e extracelular, as células possuem uma barreira seletiva para a passagem de metabólitos, conhecida como membrana plasmática (ALBERTS, JOHNSON, *et al.*, 2008). Ela é formada por uma bicamada fosfolipídica, concedendo-a caráter anfipático, ou seja, é apolar nas partes externas e internas da bicamada (ácidos graxos), mas polar na região que conecta as duas camadas da membrana (grupo fosfato). Sendo assim, somente conseguem permear a membrana aquelas moléculas que também são apolares (O₂, CO₂, hormônios), ou então pequenas moléculas polares (água, uréia). Para o transporte de moléculas polares maiores ou carregadas, como é o caso de açúcares, ácidos e íons, é necessário o auxílio de proteínas de membrana para que ocorra a troca entre o citoplasma e o meio extracelular. Essas proteínas podem realizar o transporte por meio de difusão facilitada (por meio de proteínas de canal, sem o gasto de energia) ou por transporte ativo, sendo necessária a utilização de energia, normalmente na forma de ATP, para ativar o transporte (ALBERTS, JOHNSON, *et al.*, 2008).

2.4. Engenharia Metabólica

A Engenharia Metabólica tem como objetivo otimizar processos genéticos e regulatórios em células a fim de aumentar a produção celular de uma determinada substância com o menor gasto possível de energia celular. Esse campo de pesquisa proporciona uma abordagem integrada das vias metabólicas com redes de regulação gênica (STEPHANOPOULOS, 2012).

Diversas abordagens podem ser adotadas de forma a prever o metabolismo da célula. Podem ser feitos experimentos *in vitro*, ou seja, usando células vivas fora de seu ambiente natural, em ambiente controlado, ou então experimentos *in silico*, que consistem na modelagem computacional do metabolismo celular. Porém, inicialmente, é mais interessante usar abordagens *in silico*, por ser a abordagem que utiliza menos recursos e insumos, portanto mais barata, e na qual a resposta é obtida mais rapidamente, não sendo necessário o desenvolvimento experimental do micro-organismo.

2.4.1. Plataformas *in silico*

Devido à necessidade de modelar as respostas de micro-organismos a diversos estímulos ou condições nutricionais, são criados modelos de reconstrução genômica, consistindo no mapeamento de todos os genes existentes em uma espécie. O modelo *E. coli* core, por exemplo, contém 95 reações e 72 metabólitos simplificando o metabolismo da célula da linhagem K-12 MG1655 de *E. coli*, e o modelo iJO1366 contém 2.583 reações e 1.136 metabólitos, sendo uma reconstrução mais completa do genoma dessa bactéria (ORTH, CONRAD, *et al.*, 2011).

Apesar de muitos micro-organismos já possuírem seu genoma mapeado, ainda é incipiente a exploração das relações genótipo-fenótipo, ou seja, das respostas celulares que esses genes expressam. Dessa forma, modelagens *in silico* ajudam a prever como a deleção, inserção ou superexpressão de um gene alterarão as saídas (*in vivo*) de produtos das vias metabólicas.

Modelos metabólicos podem ser elaborados e desenvolvidos em COBRA (*Constraint-Based Reconstruction and Analysis*), uma abordagem utilizada para sistemas baseados em restrições. Existem diversos tipos de pacotes onde o COBRA pode ser utilizado, sendo os mais comuns o COBRA Toolbox em Matlab, o COBRApy escrito em linguagem *python* e o COBRA.binary (este pode ser usado em sistema binário em Linux, Windows ou Mac). Diversos métodos podem ser utilizados dentro dessa abordagem, dentre eles o FBA.

A análise de balanço de fluxo (FBA, da sigla em inglês para *Flux Balance Analysis*) é uma estratégia matemática que permite analisar os fluxos existentes em uma determinada via metabólica. Esse estudo permite prever a taxa de crescimento de um micro-organismo ou a taxa de produção de um metabólito de interesse (ORTH, THIELE e PALSSON, 2010).

Esse método do COBRA é cada vez mais usado devido a sua simplicidade e abrangência, requerendo apenas informações de estequiometria das reações e balanço de massa dos metabólitos em estado estacionário. As considerações feitas são as de que ocorre o crescimento no estado estacionário e que o sistema respeita a lei de conservação de massa (toda massa que entra no sistema deve sair). Inicialmente, é determinado um objetivo específico para se chegar numa solução que otimize a função objetivo, usando conceitos de programação linear. Então é computado como o mapa de fluxos deve ser balanceado para que seja atingido um estado de homeostasia (O'BRIEN, MONK e PALSSON, 2015). Dessa forma, é calculado o maior fluxo possível para atingir o objetivo determinado.

O FBA possui limitações no que diz respeito a prever concentrações de metabólitos, já que não se inclui nos cálculos de balanceamento de fluxos os parâmetros cinéticos referentes às reações estudadas. Além disso, normalmente não são considerados efeitos regulatórios, como ativação e inativação de enzimas ou regulação de expressão gênica, o que pode afetar a acurácia da análise. A abordagem apenas contabiliza fluxos no estado estacionário (O'BRIEN, MONK e PALSSON, 2015).

3. Metodologia

3.1. Escolha do *building block*

A fim de identificar o *building block* mais adequado para a construção do chassi microbiano, foram adotadas como premissas que o composto químico deve:

- i) ser passível de obtenção via fermentação da xilose;
- ii) apresentar alto rendimento a partir de xilose;
- iii) apresentar características químicas que permitam a produção de derivados de interesse através de rotas bioquímicas curtas (poucos passos enzimáticos);
- iv) ser inédito – não pertencer a plataforma já existente, isto é, já explorada por alguma empresa.

O levantamento inicial de moléculas candidatas foi feito a partir de relatórios especializados (BNDES, 2014; NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), 2004), em bases de artigos (Google Acadêmico, Science Direct) e patentes (USPTO), visando identificar compostos que pudessem servir como *building blocks* versáteis e/ou originando compostos de interesse econômico e tecnológico. Sendo assim, foram levantados compostos que poderiam servir como *building blocks* e que pudessem partir da xilose.

Após o levantamento de moléculas candidatas, foi feita uma seleção inicial considerando a possibilidade de produzir a molécula a partir de xilose. As moléculas escolhidas foram analisadas comparativamente, elencando o perfil de cada uma para as premissas estabelecidas.

Os derivados químicos existentes (que podem ser obtidos a partir das moléculas candidatas a *building blocks*) foram encontrados em patentes, artigos e em bases de dados de metabólitos,

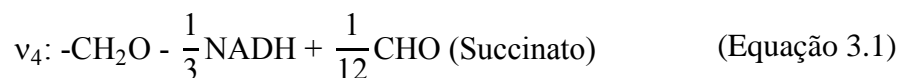
reações bioquímicas e enzimas, como o MetaCyc (CASPI, BILLINGTON, *et al.*, 2016) e o BRENDA (SCHOMBURG, JESKE, *et al.*, 2017). Foram considerados somente os derivados que podem ser obtidos a partir de processo biotecnológico, onde as transformações de substrato a produto são catalisadas por enzimas que fazem parte de uma via metabólica.

Foram calculados três tipos de rendimento para cada molécula candidata a partir da xilose: termodinâmico (Y^T), estequiométrico (Y^Q) e considerando incorporação de NADH na via para produção de succinato ($Y^{Q,S}$). O rendimento termodinâmico (Y^T) segue o descrito por DUGAR e STEPHANOPOULOS (2011), como explicitado na Seção 2.2 desse documento.

Tanto o rendimento estequiométrico (Y^Q) quanto o rendimento que considera a incorporação de NADH para a produção de succinato ($Y^{Q,S}$) dependem da via utilizada para a produção da molécula de interesse. Para calculá-los, foi selecionada a via mais conhecida para cada *building block* em questão (Apêndice 1).

O rendimento estequiométrico considera apenas quantos mols de produto são gerados para cada mol de xilose. Adicionalmente, o $Y^{Q,S}$ considera também o quanto de NADH gerado em excesso na via para a produção de interesse foi incorporado na via de produção de succinato. Para ambos os cálculos, é feita a ponderação com os pesos moleculares dos compostos utilizados.

Para o cálculo do $Y^{Q,S}$ é feita uma analogia com o raciocínio utilizado para a elaboração da Equação 2.10 (Equação 2.10, sendo que ao invés de v_4 ser representada por uma reação para a formação de glicerol, é utilizada no caso desse trabalho a reação para formação de succinato como uma forma de reoxidar o NADH produzido na via (Equação 3.1), devido ao hospedeiro escolhido ser a *E. coli*.



E assim, de posse dos coeficientes estequiométricos reduzidos descritos na Equação 2.4, calcula-se o rendimento $Y^{Q,S}$ através da Equação 3.2.

$$Y^{Q,S} = Y^Q \times \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{a}{2}\right) - \left(\frac{c}{4,82}\right) + (3 \times d)} \right] \quad (\text{Equação 3.2})$$

Para avaliar o grau de novidade do *building block*, foi feita uma prospecção tecnológica, onde foram escolhidas as bases de artigos Periódicos CAPES e Scopus, e como base de patentes o

USPTO. Em cada base de pesquisa, uma estratégia de busca diferente foi selecionada, devido às particularidades de cada uma. Todas as buscas foram feitas no mês de fevereiro de 2017.

No Periódicos CAPES, foi selecionada a busca avançada, onde foram selecionados para ambos os campos de busca os critérios “Qualquer” e “é (exato)”, e o operador booleano utilizado foi o “OR”. Nesse caso, foram escolhidos os dois sinônimos em inglês mais utilizados para o *building block* em questão. O tipo de material foi selecionado como “Artigos”, e não foram especificadas a data de publicação, o idioma nem as datas iniciais e finais.

Para acessar a base de artigos Scopus, é necessário selecioná-la na página inicial do Periódicos CAPES na aba “Base”. Ao acessar a base Scopus, a busca foi feita nos parâmetros “Article title, Abstract, Keywords” (Título do Artigo, Resumo, Palavras-Chave), sem limitação de data de publicação, e o tipo de documento foi limitado a “Article or Review” (Artigo ou Revisão). Um exemplo de *string* de busca utilizado para o ácido levulínico é dado por: “ (“4-Oxopentanoic acid" OR "levulinate" OR "levulinic acid" OR "4-Oxovaleric acid" OR "Acetopropionic acid" OR "Acetylpropionic acid" OR "antithermin”) ”

Na base de patentes do USPTO, foram pesquisadas patentes tanto aprovadas (PatFT) quanto as somente depositadas (AppFT). Para ambos os casos, foi feita a busca avançada procurando por todos os sinônimos tanto no *abstract* (resumo) quanto no *claim* (reivindicações). Um exemplo de *string* utilizado para o ácido levulínico é: “ABST/ (“4-Oxopentanoic acid" OR "levulinate" OR "levulinic acid" OR "4-Oxovaleric acid" OR "Acetopropionic acid" OR "Acetylpropionic acid" OR "antithermin") AND ACLM/ (“4-Oxopentanoic acid" OR "levulinate" OR "levulinic acid" OR "4-Oxovaleric acid" OR "Acetopropionic acid" OR "Acetylpropionic acid" OR "antithermin”)”

Para todos os casos, foi recuperado o número de artigos ou patentes encontrado.

3.2. Definição da plataforma metabólica

Após escolher o ácido xilônico como o potencial *building block* mais interessante para análise, foram pesquisados quais compostos poderiam ser obtidos por via fermentativa tendo como intermediário comum o ácido xilônico.

Para a obtenção dos derivados por via microbiana, foram pesquisados em artigos e patentes relacionados a fermentação do ácido xilônico ou da xilose, atentando nesse último caso para que a via tivesse como intermediário o ácido xilônico. Outra fonte de dados utilizada foi o MetaCyc

(CASPI, BILLINGTON, *et al.*, 2016), onde foram inicialmente pesquisadas vias que contivessem o ácido xilônico, afim de se estabelecer quais ligações poderiam ser feitas com outras vias existentes; essas outras vias foram elucidadas em sequência pelo mesmo método.

Para a identificação de todas as enzimas e reações catalisadas pelas mesmas, foram utilizados as bases de dados metabólicos MetaCyc (CASPI, BILLINGTON, *et al.*, 2016) e BRENDA (SCHOMBURG, JESKE, *et al.*, 2017) e a patente que elucida a via até o 1,4-butanodiol (LIAO e YAN, 2015). No caso da patente encontrada propondo uma via para o 1,2,4-butanotriol e para o 1,4-butanodiol, somente os nomes das enzimas foram citados na via que levava a esses compostos, sem explicitar a reação que elas catalisavam, ou seja, quais compostos e cofatores estavam envolvidos e em que estequiometria e, nesse caso, o banco de enzimas BRENDA auxiliou a propor as reações catalisadas pelas enzimas dessa via.

Concomitante a essa elucidação de compostos passíveis de obtenção microbiana a partir do ácido xilônico, foi feita uma busca por aplicações e mercado desses compostos. Os compostos selecionados ao final tiveram uma sinergia entre a possibilidade de fermentação a partir do *building block* escolhido, aplicações desenvolvidas e um volume de mercado interessante.

3.2.1. Aplicações

As aplicações de cada molécula foram encontradas em patentes e artigos, além de relatórios especializados e fichas técnicas dos produtos. Foi feita uma análise das áreas de aplicação de cada produto, a fim de distinguir quais produtos possuem mais abrangência de aplicações ou são utilizados em áreas de alto valor agregado.

3.2.2. Mercado

Os dados de Mercado foram coletados em relatórios de mercado de fonte aberta, notícias e websites especializados. Os valores são normalmente uma estimativa, e não um número exato, a fim de mostrar uma ordem de grandeza. Para a busca dos produtos, foram utilizados identificadores como o número CAS, NCM (Nomenclatura Comum do Mercosul) e código HS (*Harmonized System*), sendo esse último empregado nos Estados Unidos.

Os dados contidos nos gráficos de preços, volume e valor importado no Brasil foram coletados no website da Receita Federal - Ministério da Fazenda. Foram selecionados os anos entre 2013 e 2015 para a coleta de dados, já que as planilhas da receita federal de 2016 só estavam atualizadas até o mês de fevereiro na data da análise (junho de 2017), não podendo então esses

dados ser representativos do ano de 2016. Na Receita Federal, os dados de importação são separados em diferentes capítulos que dizem respeito aos grupos de produtos contidos em cada um deles. Normalmente, os produtos de interesse da indústria química como ácidos e álcoois estão contidos no Capítulo 29 – Produtos químicos orgânicos. Sendo assim, as planilhas desse capítulo foram investigadas para cada mês de cada ano especificado anteriormente. Usando um software no Excel para auxílio da busca, foram adicionados aos termos de pesquisa todos os nomes existentes para o composto em questão contidos no site do *Chemical Abstracts Service* (Common Chemistry™ - A CAS Solution), onde a busca pode ser feita tanto pelo nome da molécula quanto pelo seu número de registro CAS. Termos correspondentes em português foram incluídos, quando não disponíveis nessa fonte.

3.2.3. Tecnologia de produção

Foram pesquisadas em bases de patentes e artigos as principais rotas tecnológicas para obtenção dos produtos de interesse, ou seja, aqueles com aplicações desenvolvidas e volume de mercado e demanda. Não foi feita uma busca exaustiva para elucidar todas as rotas de produção, mas sim as principais utilizadas, como forma de comparação com a via metabólica proposta. Nas bases de patentes, foram recuperadas as patentes mais relevantes para uma busca considerando termos como “production”, “manufacture”, “process” e “method”, além dos sinônimos mais comuns para o composto em questão.

3.3. Simulação da obtenção do ácido xilônico

Após escolher o ácido xilônico como o *building block* mais interessante para análise, realizou-se a modelagem e otimização da produção do ácido xilônico a partir da xilose, usando a via que passa pela xilonolactona (Figura 3.1).

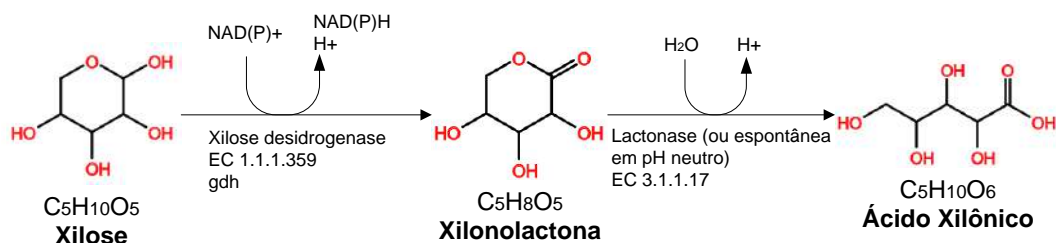


Figura 3.1 Esquema da via até o *building block* (ácido xilônico), a partir da xilose.

Escolheu-se como micro-organismo hospedeiro a bactéria *Escherichia coli*, por ser esse um micro-organismo modelo para estudos genéticos e metabólicos, com genoma amplamente

explorado. Sendo assim, foi selecionado o modelo *E. coli core* (Anexo 1 – Modelo *E. coli core*) como o sistema inicial para a modelagem *in silico* do micro-organismo. Para a modelagem da via metabólica, foi usado o método FBA no COBRApy (EBRAHIM, LERMAN, *et al.*, 2013).

As reações existentes no modelo *E. coli core* não são suficientes para suprir a modelagem desejada, que inclui a via da xilose para o ácido xilônico, passando pela xilonolactona. Essa via não é natural de *E. coli* e não está presente no modelo, nem os metabólitos nela envolvidos. Dessa forma, foi necessário inserir as reações no modelo, lembrando que além da via proposta para a produção do *building block* é necessário adicionar os metabólitos não contidos no modelo *E. coli core*. Os metabólitos podem estar contidos tanto no citoplasma da célula, sendo identificados no código *python* como estando no compartimento “c”, quanto na região exterior à célula, sendo identificados no compartimento “e”. Quando um metabólito sai da célula e passa para o compartimento “e”, é necessário adicionar uma reação de saída do espaço extracelular, ou seja, para uma região fora do sistema de controle, o que significa que o metabólito deixa de estar fisicamente disponível para a célula (Figura 3.2). Em termos práticos, essa situação pode ocorrer por retirada do metabólito do meio. Todos os metabólitos nos quais se tem interesse, ou seja, todos os ácidos orgânicos e álcoois presentes na plataforma proposta, além do substrato (no caso, a xilose), devem possuir no modelo reações de transferência para o meio externo, já que essas moléculas deverão ser transportadas entre o meio externo e o interior da célula.

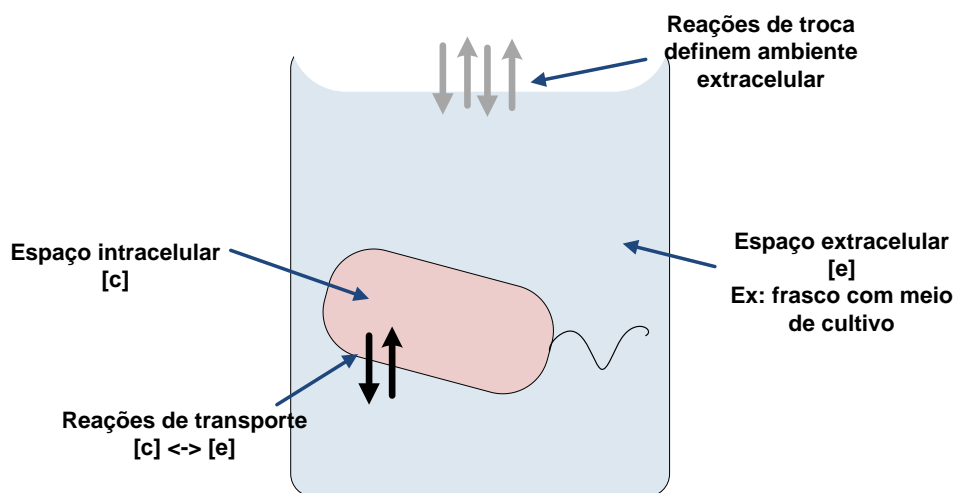


Figura 3.2 Esquema de transporte de metabólitos. Adaptado de (O'BRIEN, MONK e PALSSON, 2015).

A metodologia da elaboração do código em linguagem *python* dentro do *software* COBRA segue o tutorial *Documentation for COBRAPy*, e um exemplo de código usado para adicionar reações, novos metabólitos e conectar metabólitos a essas reações é descrito a seguir:

```
RXT = Reaction('Reação')
    RXT.name = 'nome_da_reação'
    RXT.lower_bound = -1000.
    RXT.upper_bound = 1000.
    RXT.objective_coefficient = 0.0
Metabólito_1 = Metabolite('nome_do_metabólito',
    formula='CnHnOn',
    name='nome_do_metabólito',
    compartment='c')
Metabólito_2 = Metabolite('nome_do_metabólito',
    formula='CnHnOn',
    name='nome_do_metabólito',
    compartment='c')
```

No caso específico em que a reação identificada como RXT é do tipo: $\text{Metabólito}_1 + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Metabólito}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$, as moléculas “Metabólito_1” e “Metabólito_2” são moléculas novas que foram adicionadas ao modelo *E. coli core*, enquanto as moléculas de NADP^+ , NADH e H^+ já eram pré-existentes no modelo *E. coli core*. No caso em que as moléculas seguem essa lógica, é utilizada a seguinte metodologia:

```
RXT.add_metabolites({Metabólito_1: -1.0,
    model.metabolites.get_by_id("nadh_c"): -1.0,
    Metabólito_2: 1.0,
    model.metabolites.get_by_id("nadh_c"): 1.0,
    model.metabolites.get_by_id("h_c"): 1.0})
```

Note que substratos com coeficiente negativo são consumidos (reagentes), enquanto aqueles que possuem coeficientes positivos são produtos da reação. Foram adicionadas no modelo as reações referentes à via que leva da xilose ao ácido xilônico, passando pela xilolactona, além de interligar a xilose com a xilulose 5-fosfato já existente no modelo, objetivando que a xilose seja a

única fonte de carbono utilizada, tanto para a produção dos compostos de interesse quanto para o crescimento de biomassa.

Após essa etapa, com todas as reações adicionadas ao modelo, tem-se um modelo *E. coli core* ligado a duas vias: i) xilose → xilolactona → ácido xilônico e ii) xilose → xilulose → xilulose 5-fosfato. Na primeira reação, o ácido xilônico é o produto que sai da célula, enquanto na segunda reação a xilulose-5-fosfato se liga ao metabolismo da célula, através da via das pentoses fosfato, que leva ao piruvato (Figura 3.3).

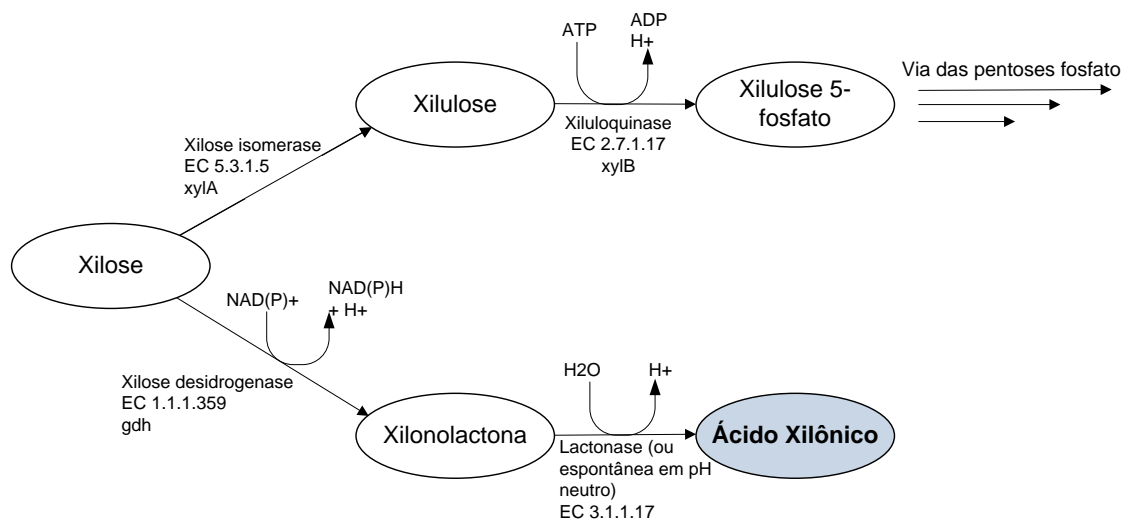


Figura 3.3 Reações adicionadas ao modelo *E. coli core*, sendo a xilulose 5-fosfato integrante da via das pentoses fosfato.

Dessa forma, simulações do comportamento da via foram realizadas com o objetivo de otimizar a produção do ácido xilônico. Documentos com informações sobre os metabólitos, reações e respectivos fluxos foram gerados, os quais foram usados como fonte de informação para as análises. A unidade dos fluxos é em mmol/(g_{DW}.h), sendo mmol=10⁻³mol, g_{DW} = gramas de massa seca e h=hora.

Em todos os experimentos, considerou-se que não havia fluxo de entrada de glicose na célula, ou seja, os limites inferior e superior da reação “EX_glc__D_e” (reação de transporte de glicose) foram igualados a zero. Além disso, também foi uma restrição em todos os testes a saída exclusiva de ácido xilônico da célula, a fim de impedir que esse composto, visto como o produto de interesse nessa etapa, fosse consumido ao invés de produzido. Sendo assim, o limite inferior da reação de transporte do ácido xilônico foi determinado como zero.

Adicionalmente às premissas citadas, em uma primeira simulação a única restrição foi no *uptake* de xilose. Essa restrição foi obtida ao ser determinado o fluxo da reação de troca de xilose entre o meio extracelular e o meio externo ao sistema de controle (ver Figura 3.2), identificada como “EX_xyl_e” e representada por “xyl__D_e <=> ”. Esse valor foi obtido por MACHADO (2016) (não publicado) através de curvas de crescimento em conjunto com curvas de consumo de xilose para a linhagem K-12 MG1655, de *Escherichia coli*. Como a primeira enzima da via (xilose desidrogenase, EC 1.1.1.359) pode atuar usando tanto NAD⁺ quando NADP⁺, foram feitos testes para os dois casos, alterando um cofator pelo outro na reação inserida no modelo.

A partir dessa simulação inicial, diversas condições foram testadas, entre elas restrições nos transportadores de xilose para dentro da célula, nas enzimas NAD transidrogenase (EC 1.6.1.2) e piruvato desidrogenase (EC 1.2.1.-), assim como no *uptake* de oxigênio.

3.3.1. Crescimento de biomassa dependente de transportadores de xilose

Foram feitos testes para o crescimento de biomassa controlando-se a ausência ou presença de cada um dos dois transportadores de xilose mais comuns (XylE e XylFGH), e os dados obtidos foram comparados com a resposta indicada por HASONA, KIM, et al. (2004) usando meio mínimo de xilose:

Hasona et al. compared the growth of *E. coli* strains with deletions in either xylE or xylG (but not both). Deleting xylG reduced aerobic growth on 20mM xylose by 47%, while anaerobic growth decreased by 84% in 60mM xylose. Under the same conditions, a xylE deletion only reduced growth by 9% and 21%, respectively. (KHANKAL, CHIN e CIRINO, 2008, p. 246)

De acordo com a citação acima, ao ser feita a deleção do gene XylG, responsável pelo transporte de xilose através do transportador XylFGH, o crescimento de biomassa em condições aeróbicas seria de 53% e em condição anaeróbica, 16%. Esses valores são obtidos em relação ao crescimento de uma cepa que possua os dois transportadores (experimento controle), nas mesmas condições de cultivo. Já a deleção de XylE faz com que o crescimento seja de 91% e 79%, respectivamente em condições aeróbicas e anaeróbica, em relação ao controle. Devido ao fato da condição anaeróbica ser mais fácil de simular, já que somente há uma condição de entrada de oxigênio que confere essa situação (quando o fluxo de oxigênio é igual a 0), os experimentos *in silico* foram baseados nessa condição, testando, portanto, a exclusão de cada um dos transportadores e comparando com os resultados obtidos experimentalmente por (HASONA, KIM, et al., 2004). A ausência do transportador é indicada na Tabela 4.7 com o símbolo delta precedendo o nome do gene deletado (Δ XylFGH e Δ XylE).

Para tal teste, as reações que levam da xilose até o ácido xilônico foram excluídas, restando apenas as reações originais do modelo *E. coli core* e as reações que ligam a xilose à xilulose-5-fosfato, para que essa fosse a fonte de carbono utilizada para o crescimento de biomassa, ao invés da glicose (fonte de carbono padrão do modelo *E. coli core*). O objetivo da otimização foi definido como a reação de formação de biomassa.

3.4. Estudo das vias que levam aos derivados da plataforma

3.4.1. 1,2,4-butanotriol (1,2,4-BTO)

A metodologia dessa via segue a lógica citada na seção 3.3, sendo neste caso incluídas, além das reações previamente adicionadas, também as reações e metabólitos referentes à parte da via que começa no ácido xilônico e segue até o 1,2,4-butanotriol, tendo como intermediários o 2-deidro-3-deoxi-xilonato e o 3,4-diidroxi-butanal, nessa ordem (Figura 3.4).

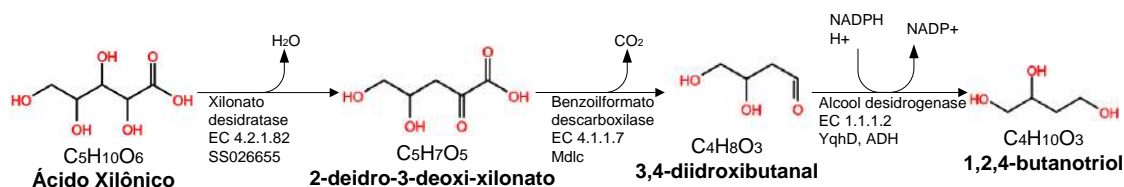


Figura 3.4 Esquema da via até o 1,2,4-butanotriol a partir do *building block* (ácido xilônico).

Como nesse caso é desejado que haja balanceamento de cofatores na via, todos os experimentos são realizados com o uso de NADP⁺ para a enzima xilose desidrogenase (que catalisa a reação de xilose a xilonolactona). O fluxo de ácido xilônico deve ser restrito para saída exclusiva da célula, não permitindo que haja consumo do mesmo para a produção do 1,2,4-butanotriol. Permitindo somente a entrada (e não saída) de xilose por meio do transportador XylFGH são feitos testes de deleção da NAD transidrogenase e da piruvato desidrogenase variando-se o *uptake* de oxigênio.

3.4.2. Coprodução de derivados da plataforma metabólica

Além da via proposta para a otimização do 1,2,4-butanotriol, são feitas outras propostas de vias metabólicas que, com a coprodução de outros compostos, seja neutra em termos de cofatores, ou seja, que o balanço redox em termos de NADH e NADPH seja igual a zero. Considera-se, nesse cálculo, que o micro-organismo hospedeiro (*Escherichia coli*) possui a enzima NAD transidrogenase, capaz de interconverter NADH e NADPH. Nesse caso, pode-se admitir, por

exemplo, que um NADH produzido em uma das reações que levam ao ácido succínico (de 2-oxoglutarato ao succinil-coA) pode ser compensado no balanço redox por um NADPH consumido nas reações que levam ao 1,4-butanodiol (pode ser considerada tanto a reação que leva do 3,4-dihidroxi butanal ao 1,2,4-butanotriol quanto a reação que leva do 4-hidroxi butanal ao 1,4-butanodiol) (Figura 4.7).

Para o cálculo de rendimentos, foi mantida a metodologia explicitada na seção 3.1, sendo alterado apenas o cálculo final de rendimento estequiométrico, onde é necessário ponderar os rendimentos individuais para se obter o rendimento de coprodução. Por exemplo, se uma via qualquer consome 3 mols de substrato para produzir 2 mols do produto A e 1 mol do produto B, teríamos:

$$Y_A^Q = \frac{2 \text{ mols} \times \text{Peso Molecular}_A}{3 \text{ mols} \times \text{Peso Molecular}_{\text{substrato}}} = 0,7 \quad (\text{Equação 3.3})$$

$$Y_B^Q = \frac{1 \text{ mol} \times \text{Peso Molecular}_B}{3 \text{ mols} \times \text{Peso Molecular}_{\text{substrato}}} = 0,4 \quad (\text{Equação 3.4})$$

Dessa forma, o rendimento de coprodução, ou seja, o rendimento dessa via metabólica considerando todos os produtos seria dado por: $Y_{\text{coprodução}}^Q = Y_A^Q + Y_B^Q = 1,1$.

O rendimento que considera a incorporação de NADH para a produção de succinato ($Y^{Q,S}$), por sua vez, deve ser calculado considerando a via já balanceada para a coprodução e multiplicando ao rendimento de coprodução, mostrado acima, pelo termo que considera a utilização do NADH em excesso para produção de succinato, como explicitado na seção 3.1, sendo feita uma analogia com a (Equação 3.2), com a principal diferença sendo a utilização do succinato como “dreno” para o NADH (em *E. coli*) ao invés do glicerol produzido no caso de *S. cerevisiae*.

$$Y_{\text{coprodução}}^{Q,S} = Y_{\text{coprodução}}^Q \times \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{a}{2}\right) - \left(\frac{c}{4,82}\right) + (3 \times d)} \right] \quad (\text{Equação 3.5})$$

O rendimento termodinâmico não foi calculado para a coprodução, devido à deficiência de referências disponíveis.

4. Resultados e Discussões

4.1. Escolha do *building block*

No estudo de possíveis *building blocks*, foram analisadas as vias metabólicas de obtenção dos mesmos, assim como para alguns de seus derivados. Sendo assim, chegou-se na Figura 4.1. Para facilitar a visualização, as vias estão representadas de forma simplificada, com apenas alguns compostos intermediários chave sendo indicados.

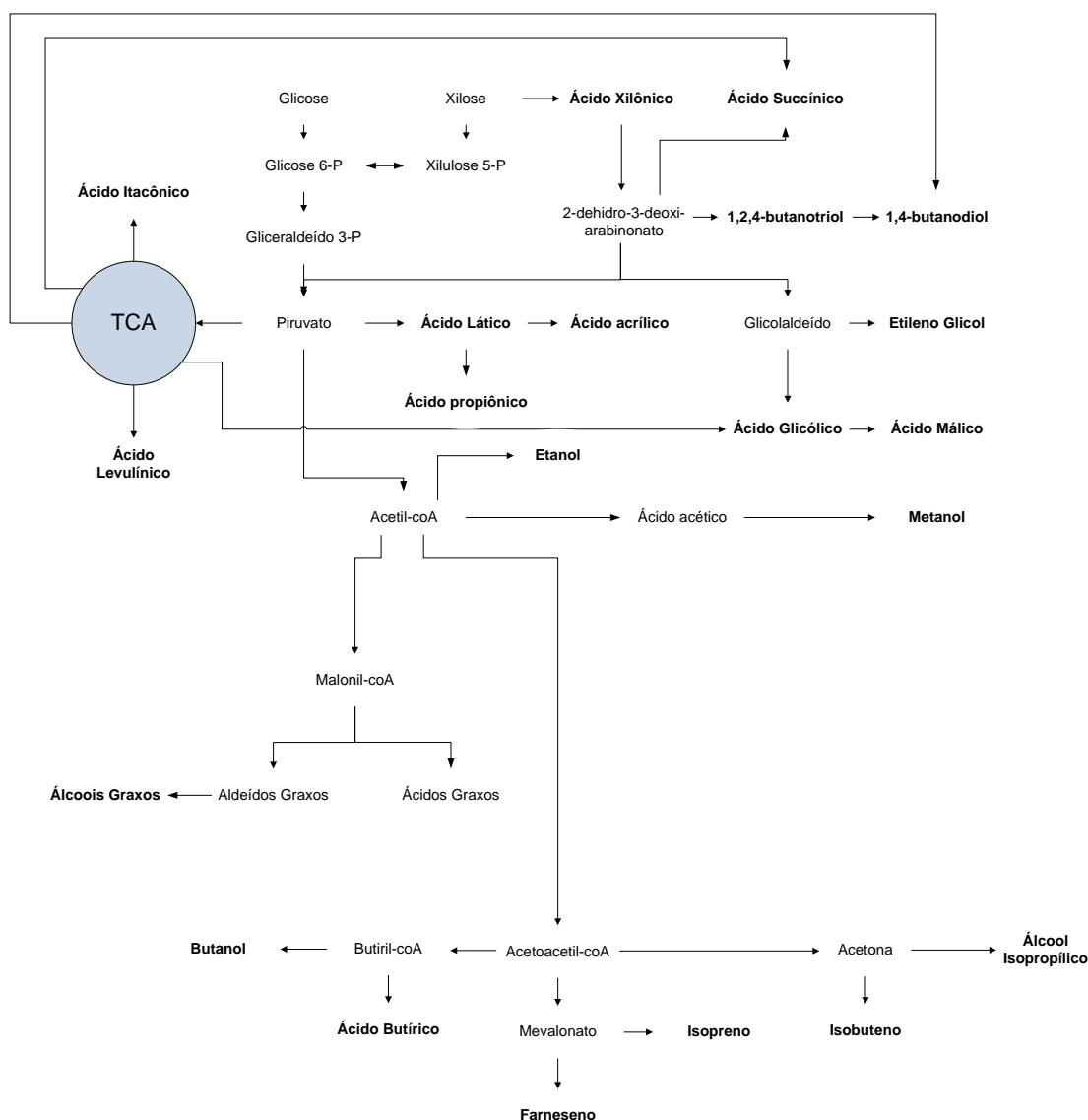


Figura 4.1 Esquema geral de vias metabólicas para a produção dos principais *building blocks* e compostos de interesse estudados.

Após o levantamento bibliográfico realizado, alguns candidatos a blocos de construção foram selecionados:

- Ácido 3-hidroxi propiônico (3-HPA)
- Ácido itacônico
- Ácido levulínico
- Ácido succínico
- Ácido xilônico
- Farneseno

Para cada um dos candidatos a *building block*, foram agrupados em um gráfico os valores dos diferentes tipos de rendimento (Figura 4.2), e em outros dois gráficos os resultados da prospecção tecnológica nas bases de artigos (Figura 4.3) e na base de patentes (Figura 4.4) utilizadas. Os gráficos elaborados permitem a análise simplificada dos dados coletados.

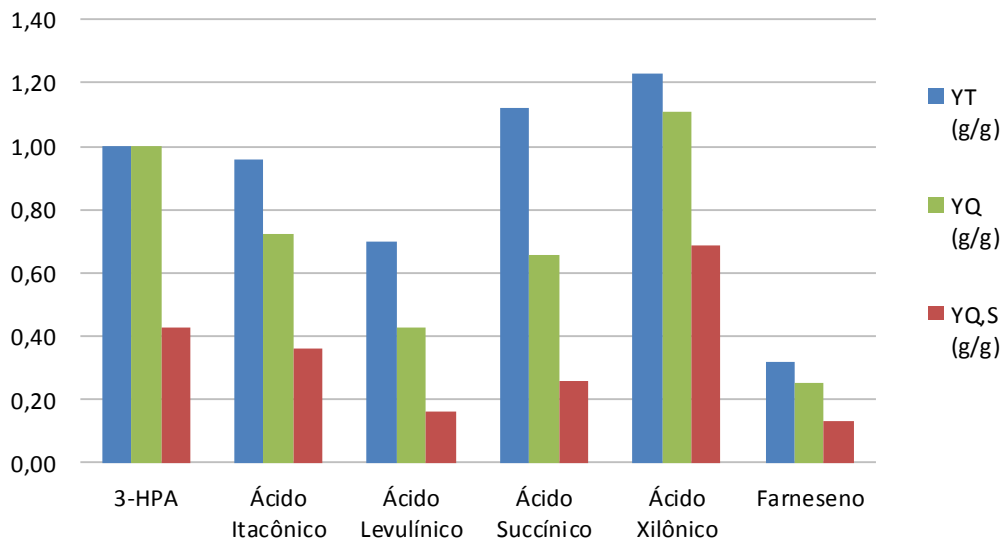


Figura 4.2 Rendimentos para cada um dos candidatos a *building block*.

Sendo Y^T o rendimento máximo teórico (termodinâmico), Y^Q o rendimento estequiométrico dependente da via e Y^{Q,S} o rendimento que considera a reposição de NADPH e ATP por reações que consomem o substrato, além do consumo de NADH excedente na via para a produção de succinato.

Na Figura 4.2 são mostrados os três tipos de rendimento calculados para cada um dos candidatos a *building block* e nota-se que os valores normalmente seguem uma tendência para cada uma das moléculas, sendo o ácido xilônico a molécula que apresenta o maior rendimento para todos os casos calculados.

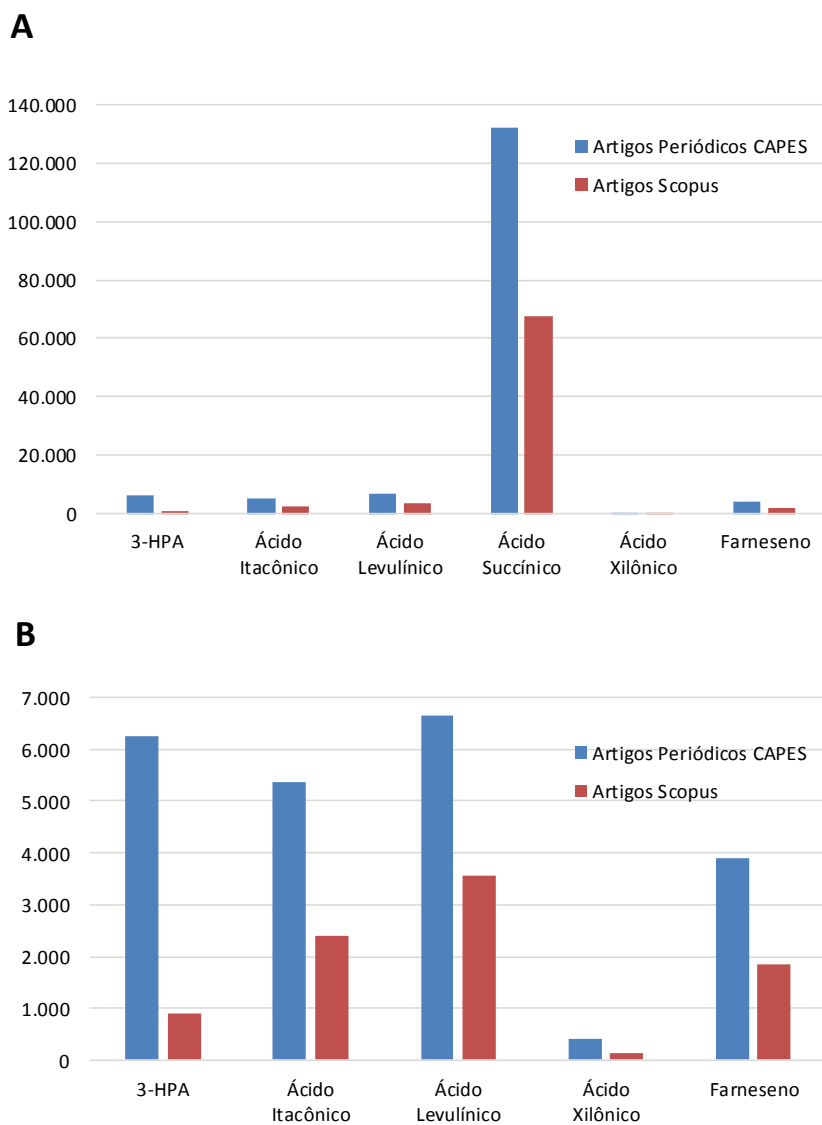


Figura 4.3 Levantamento de artigos nas bases Periódicos CAPES e Scopus. A: todos os candidatos, B: excluindo da análise o ácido succínico.

Na Figura 4.3 foi necessário excluir da análise o ácido succínico, já que esta molécula apresentou um número de resultados em ordem de grandeza muito superior às outras, permitindo assim melhor visualização da análise comparativa.

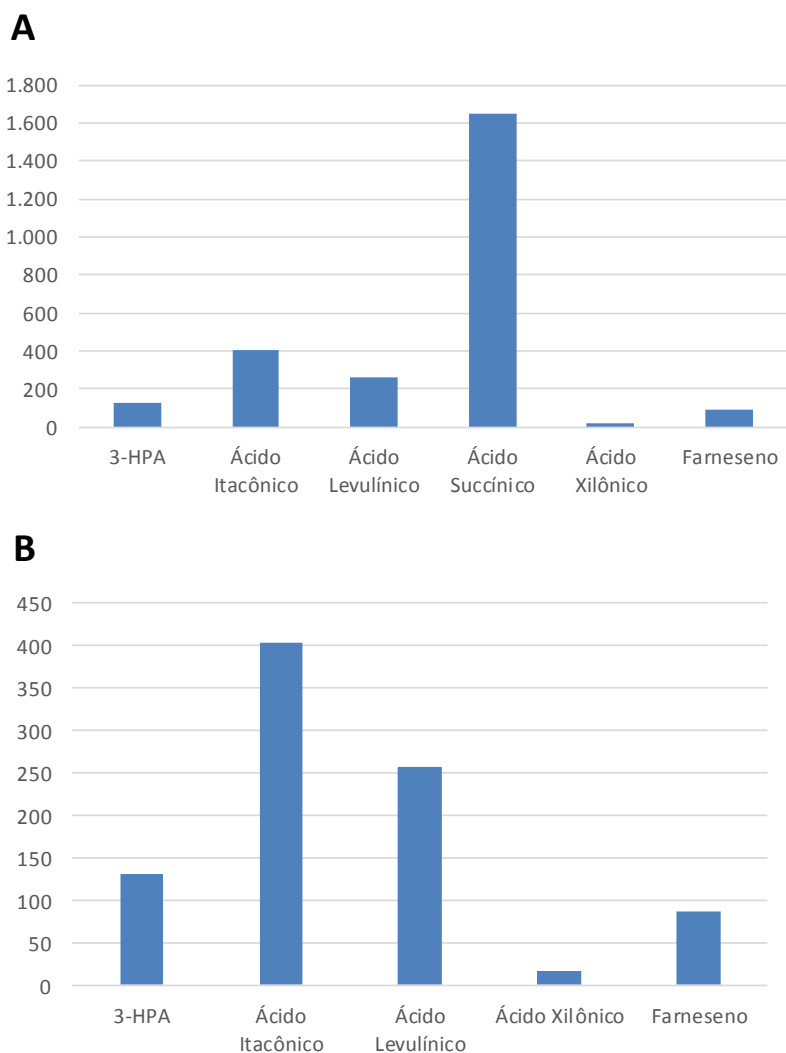


Figura 4.4 Levantamento de patentes do USPTO. A: todos os candidatos, B: excluindo da análise o ácido succínico.

Para todas as bases de pesquisa utilizadas, o ácido xilônico apresentou o menor número de resultados, representando entre 11 e 20% do número de resultados da molécula com segundo menor número de resultados para cada caso: para as bases Periódicos CAPES e USPTO a molécula com a qual se comparou foi o farneseno e para a base Scopus a molécula usada para comparação foi o ácido 3-hidroxipropiônico (3-HPA).

A Tabela 4.1 sintetiza os resultados tanto de rendimento quanto de prospecção tecnológica. É feita uma comparação entre os candidatos a *building block* em relação aos rendimentos obtidos, tanto considerando apenas o potencial de incorporação do substrato principal em produto quanto considerando a via específica escolhida para obter a partir da xilose cada composto em questão. A quantidade de resultados obtidos em cada base de pesquisa (de artigos ou de patentes) é um indício

do volume de pesquisa existente para cada uma das moléculas analisadas, permitindo a elucidação de qual molécula ainda demanda esforços para o desenvolvimento de seu processo de produção ou das aplicações específicas que podem ser dadas a esse composto. O potencial de uma molécula de fazer parte de uma plataforma biotecnológica envolve sua capacidade de gerar diversos outros produtos usando poucos passos metabólicos, e isso também é analisado comparativamente na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Análise comparativa das moléculas candidatas a *building block*.

<i>Building block</i>	Y ^T (g/g)	Y ^Q (g/g)	Y ^{Q,S} (g/g)	Derivados por via bioquímica	Nº de derivados bioquímicos	Artigos Periódicos CAPES	Artigos Scopus	Patentes USPTO
3-HPA	1,00	1,00	0,43	Alanina, 1,3-propanodiol	2	6.242	914	131
Ácido Itacônico	0,96	0,73	0,36	Metacrilato	1	5.380	2.390	403
Ácido Levulínico	0,70	0,43	0,16	2-butanol, γ - valerolactona	2	6.662	3.556	257
Ácido Succínico (BioAmber)	1,12	0,66	0,26	Fumárico, Propiônico, Acrílico, Málico	4	132.287	67.584	1.651
Ácido Xilônico	1,23	1,11	0,69	Etileno glicol, Málico, 1,2,4-butanotriol, 1,4- butanodiol, Lático, Succínico, Glicólico	7	423	136	17
Farneseno (Amyris)	0,32	0,25	0,13	Isopreno	1	3885	1846	87

Sendo: Y^T= rendimento termodinâmico, Y^Q= rendimento estequiométrico, Y^{Q,S}= rendimento que considera incorporação de NADH na via de produção de succinato em *E. coli*.

Apesar do ácido succínico e do farneseno serem interessantes porque permitem a produção de inúmeros derivados a partir de poucos passos, eles já estão sendo trabalhados, respectivamente, pela BioAmber e pela Amyris.

A Tabela 4.1 permite visualizar que o ácido xilônico apresenta tanto os maiores rendimentos quanto o menor número de trabalhos, em ambas as bases de artigos e patentes, indicando que é um químico interessante para ser desenvolvido a partir da fermentação da xilose. Além de ser gerado por uma via com menor número de passos (apenas duas enzimas são necessárias para transformar a xilose em ácido xilônico), não precisando passar pelo piruvato e entrar no ciclo do ácido cítrico (TCA, ou ciclo de Krebs), também apresenta resultados promissores quanto a rendimento. Adicionalmente, o ácido xilônico é o candidato a *building block* que mais possui derivados obtidos por rota fermentativa. O fato de ser um químico pouco estudado indica que ainda há muito a ser desvendado, tornando-o um importante alvo de investigação.

4.2. Definição da plataforma metabólica

As reações propostas para obtenção de derivados do *building block* por via fermentativa estão descritas na Tabela 4.2, enquanto o mapa metabólico das vias foi elucidado na Figura 4.7.

Tabela 4.2 Resumo das reações catalisadas por cada enzima da plataforma.

Número EC	Nome da Enzima	Reação catalisada
1.1.1.359	Xilose desidrogenase	Xilose + NAD(P) ⁺ → Xilonolactona + NAD(P)H + H ⁺
3.1.1.17	Lactonase ¹	Xilonolactona + H ₂ O → Ácido Xilônico ¹ + H ⁺
4.2.1.82	Xilonato desidratase	Ácido Xilônico → 2-deidro-3-deoxi-xilonato + H ₂ O
4.1.2.28	2-deidro-3-deoxi arabinonato aldolase	2-deidro-3-deoxi-xilonato → Glicolaldeído + Piruvato
1.2.1.21	Glicolaldeído desidrogenase	Glicolaldeído + NAD ⁺ + H ₂ O → Ácido Glicólico + NADH + 2H ⁺
1.1.99.14	Glicolato desidrogenase	Ácido Glicólico + NAD ⁺ → Glioxilato + NADH + H ⁺
1.2.1.-	Piruvato desidrogenase	Piruvato + NAD ⁺ + coA → Acetil-coA + NADH + CO ₂
1.2.1.51	Piruvato desidrogenase	Piruvato + NADP ⁺ + coA → Acetil-coA + NADPH + CO ₂
2.3.3.9	Malato sintase	Glioxilato + Acetil-coA + H ₂ O → Ácido Málico + coA + H ⁺
1.1.1.27	L-lactato desidrogenase	Piruvato + NADH + H ⁺ → Ácido Láctico + NAD ⁺
1.1.1.28	D-lactato desidrogenase	Piruvato + NADH + H ⁺ → Ácido Láctico + NAD ⁺
4.2.1.141	2-ceto-3-deoxi-xilonato desidratase	2-deidro-3-deoxi-xilonato → 2,5-dioxopentanoato + H ₂ O
1.2.1.26	Alfa-cetoglutarato semialdeído desidrogenase	2,5-dioxopentanoato + H ₂ O + NADP ⁺ → 2-oxoglutarato + NADPH + 2H ⁺
1.2.4.2	2-oxoglutarato desidrogenase	2-oxoglutarato + NAD ⁺ + coA → succinil-coA + NADH + CO ₂
6.2.1.5	Succinil-coA sintetase	Succinil-coA + ADP + P ₁ → Ácido Succínico + ATP + coA
4.1.1.7	Benzoilformato descarboxilase	2-deidro-3-deoxi-xilonato → 3,4-diidroxi-butanal + CO ₂
1.1.1.2	Alcool desidrogenase	3,4-diidroxi-butanal + NADPH + H → 1,2,4-BTO + NADP ⁺
4.2.1.28	Diol desidratase ²	1,2,4-BTO + NADPH + H → 4-hidroxi-butanal + NADP ⁺
1.1.1.2	Alcool desidrogenase	4-hidroxi-butanal + NADPH + H → 1,4-BDO + NADP ⁺

¹Compostos em negrito representam o *building block* e seus derivados na plataforma proposta.

Algumas enzimas tiveram seus substratos e produtos adaptados de substratos e produtos análogos, devido à ausência de uma enzima específica para a catálise dos compostos em questão. Nas Figuras 4.5 e 4.6 são demonstradas as estruturas dos compostos análogos, de forma a ilustrar como essas enzimas poderiam ser propostas para catalisar a reação pertencente à via metabólica em questão.

¹ Essa enzima foi adaptada a partir da reação análoga “glucono-1,5-lactona + H₂O = gluconato” catalisada pela gluconolactonase, já que a xilonolactona é também identificada como xilono-1,5-lactona.

² Essa enzima foi adaptada a partir da reação análoga “propano-1,2-diol = propanal + H₂O” catalisada pela propanodiol desidratase, considerando que a estrutura que sofre modificação do 1,2,4-butanotriol é semelhante à estrutura do propano 1,2-diol.

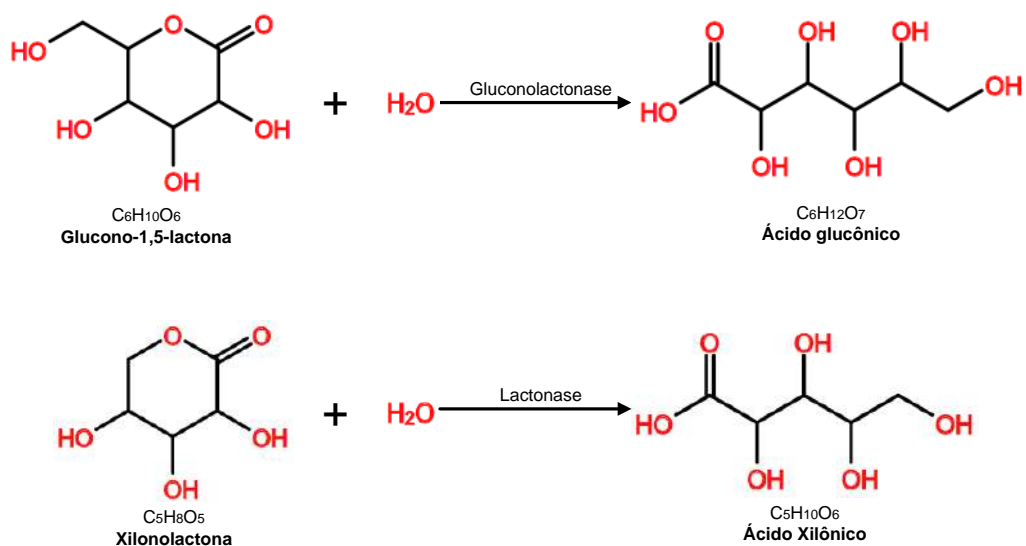


Figura 4.5 Comparação de compostos com os quais foram feitas analogias de forma a propor a enzima a ser utilizada para catalisar a reação da lactonase.

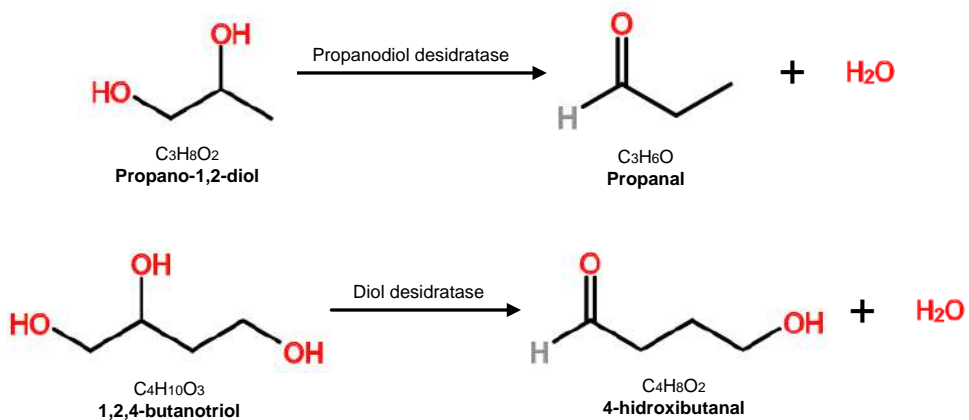


Figura 4.6 Comparação de compostos com os quais foram feitas analogias de forma a propor a enzima a ser utilizada para catalisar a reação da diol desidratase.

A união de todas as vias metabólicas utilizadas para o desenho da plataforma proposta a partir da xilose, tendo como *building block* o ácido xilônico é descrita na Figura 4.7.

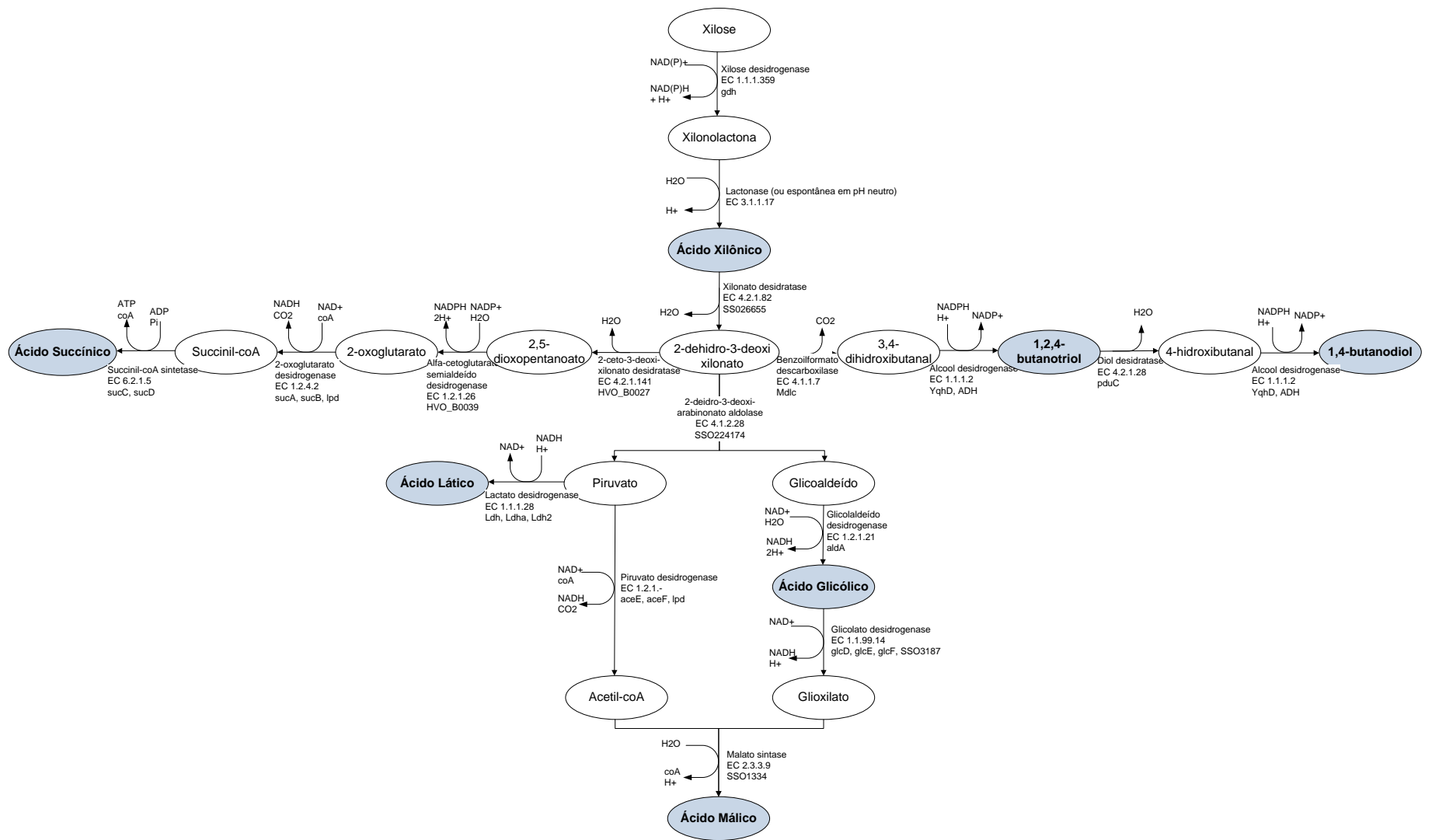


Figura 4.7 Mapa da plataforma metabólica, reunindo dados de enzimas, reações e compostos.

4.2.1. Avaliação do mercado e aplicações dos principais derivados do mapa metabólico

4.2.1.1. 1,4-Butanodiol

O 1,4-butanodiol, comumente chamado de 1,4-BDO, é classificado como um álcool, mais especificamente como um diol por conter duas hidroxilas, e como um glicol, pelo fato dessas hidroxilas estarem localizadas em carbonos diferentes. É identificado pela IUPAC como butano-1,4-diol, assim como por outros nomes como 1,4-butileno glicol, tetrametileno glicol, 1,4-diidroxibutano, e pelo código HS 29053925 e número CAS 110-63-4.

Esse composto é principalmente usado como um intermediário químico para vários polímeros, solventes ou química fina, os quais são empregados como plastificantes de poliéster, tintas, revestimentos e adesivos. A maior aplicação do 1,4-butanodiol ultimamente tem sido para a produção do tetraidrofurano (THF), o qual é usado para produzir o poli-tetrametileno éter glicol (PTMEG), uma matéria-prima importante para as fibras spandex, usadas nos produtos da LYCRA® (uma marca agora pertencente à empresa INVISTA).

Outra utilização significativa do 1,4-butanodiol é a sua reação com ácido tereftálico objetivando a produção de polibutileno tereftalato (PBT), aplicação que corresponde a aproximadamente 25% da demanda mundial de 1,4-butanodiol. Essa resina sintética tem propriedades que permitem seu uso em moldagem por injeção, como em disjuntores e bobinas de ignição de automóveis, e em conectores e tomadas para partes elétricas.

O próximo maior mercado para o 1,4-butanodiol são as produções de poliuretano (PU) e gama-butirolactona (GBL), a qual é principalmente usada na manufatura da N-metil-pirrolidona (NMP), um importante solvente usado no processamento petroquímico e em plásticos de engenharia, por exemplo. GBL, por sua vez, pode ser usado como solvente ou como um intermediário na síntese de herbicidas e outras pirrolidonas.

Todas essas aplicações contribuem para uma demanda global de 2 milhões de toneladas por ano, comandada principalmente pela demanda por fibras e polímeros renováveis. A capacidade instalada é de 3,2 milhões de toneladas por ano, com plantas majoritariamente instaladas na China, algumas nos Estados Unidos e na Europa. Os preços, volumes e valores de importação no Brasil são descritos na Figura 4.8.

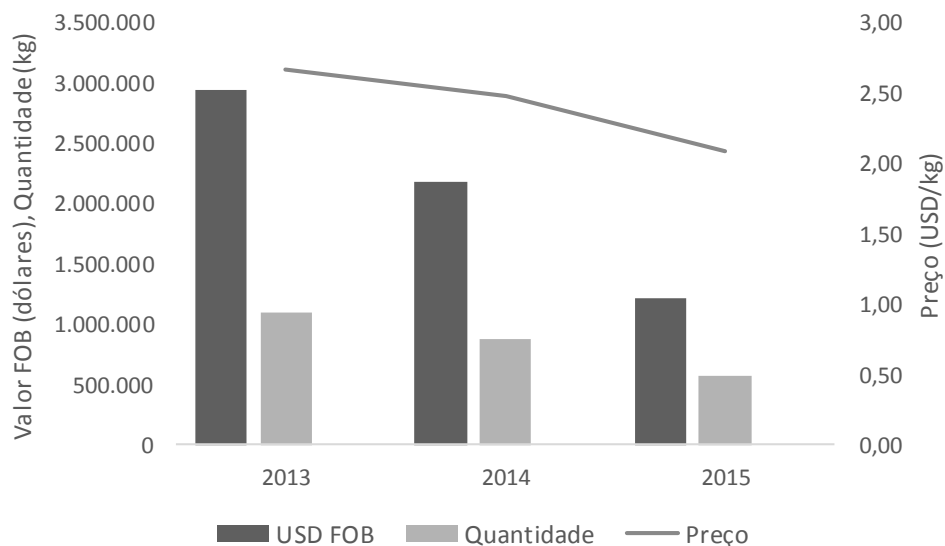


Figura 4.8 Dados de importação brasileira do 1,4-butanodiol reportados pela Receita Federal.

4.2.1.2. 1,2,4-Butanotriol

O 1,2,4-butanotriol, muitas vezes identificado como 1,2,4-BTO ou 1,2,4-BT, pode ser chamado também de 1,2,4-triidroxibutano ou butano-1,3,4-triol. Esse álcool é classificado como um triol, por possuir 3 hidroxilas. Seu número CAS é 3068-00-6.

É usado na formação do 1,2,4-butanotriol trinitrato (BTTN), um material energético usado como substituto da nitroglicerina por ser menos sensível ao choque, mais estável termicamente e menos volátil (FROST e NIU, 2011), o que aumenta a segurança da sua fabricação e amplia seus possíveis usos. Apesar do mercado do BTTN para explosivos ser relativamente pequeno, há intenção de utilizá-lo como vasodilatador no tratamento da angina, também como um substituto da nitroglicerina. Nesse caso, as vantagens do BTTN são a sua resistência à degradação por enzimas e a possibilidade de serem gerados enantiômeros puros (D-BTTN ou L-BTTN), minimizando a quantidade de produtos degradados pela enzima nitrato redutase.

Além disso, possui aplicação difundida na medicina, amplamente como intermediário de agentes bioativos, como o beta-acaridial feromônio. Alguns de seus derivados mais comuns são o ácido 3,4-diidroxibutanóico, usado entre outras aplicações, na fabricação de um medicamento de controle do colesterol (Crestor®) e o 3,4-diidroxibutanal.

Outros usos para o 1,2,4-butanotriol são como ingrediente no aumento da intensidade de cor e potencial adesivo na revelação de fotos, agente de proteção de superfícies de tecidos específicos e agente de ligação cruzada em cadeias poliméricas.

A demanda mundial do 1,2,4-butanotriol é estimada em 10 toneladas por ano e sua capacidade de produção era de 7 toneladas por ano em 2006, mas foi inaugurada uma planta na China de 50 toneladas por ano, aumentando a capacidade total.

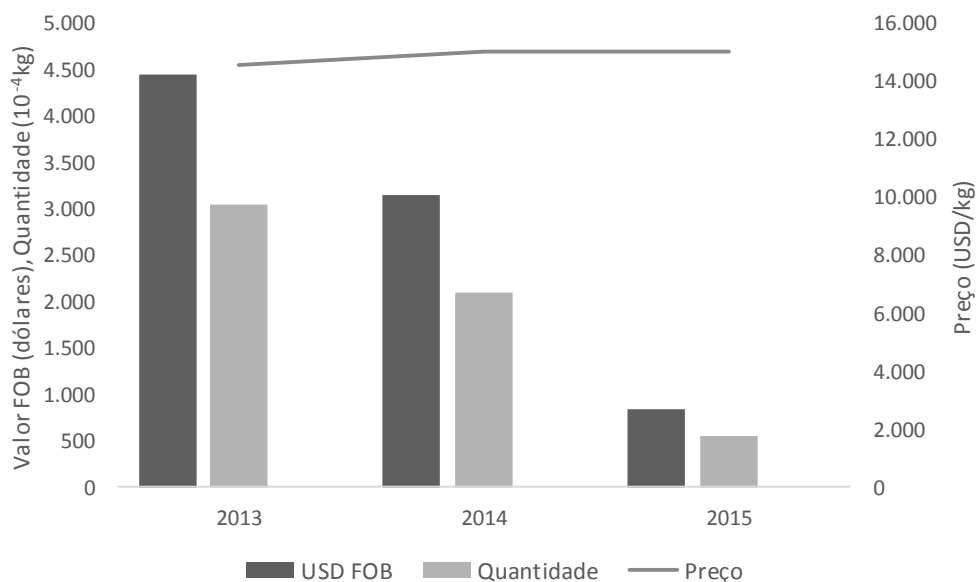


Figura 4.9 Dados de importação brasileira do 1,2,4-butanotriol reportados pela Receita Federal.

4.2.1.3. Ácido Glicólico

O ácido glicólico, ou ácido 2-hidroxiacético, segundo a IUPAC, pode ser também identificado como ácido glicol, ácido hidroxiacético ou ácido dicarbonoso, ou por seu código HS 29181990 ou número CAS 79-14-1.

Por possuir dupla funcionalidade (álcool e ácido), esse composto configura um importante intermediário orgânico. Sua principal aplicação é na área de cosméticos, por ser uma molécula pequena capaz de penetrar na pele com facilidade. Auxilia a afrouxar as ligações que mantem as células epiteliais conectadas, permitindo que as células mortas sejam eliminadas de forma mais efetiva.

Além disso, o ácido glicólico tem a capacidade de quelar sais metálicos e possui funções específicas em outros segmentos, como por exemplo, o de remoção de ferrugem e gordura e o de suturas médicas e garrafas PET.

Há um aumento de uso nos últimos anos do ácido glicólico em produtos de limpeza doméstica devido a sua capacidade de formar complexos com sais de água pesada, remoção de espumas de sabão e sua compatibilidade com surfactantes, fragrâncias, corantes e agentes biocidas.

Na indústria têxtil, esse composto pode ser usado como agente corante ou de curtimento. No processamento de alimentos, como aromatizante e preservativo. O ácido glicólico também possui aplicações em adesivos e plásticos. O poli (ácido lático-co-ácido glicólico), mais conhecido como PLGA, é um copolímero sintetizado pela copolimerização de dois diferentes monômeros, sendo eles o ácido glicólico e o ácido lático, e possui aplicações na medicina como nanocápsulas capazes de liberar a droga de forma mais específica e eficaz.

A capacidade de produção do ácido glicólico pode ser estimada pela capacidade da planta da Dupont, líder majoritária do mercado desse produto. A planta, situada nos Estados Unidos, possui capacidade de 87.000 toneladas por ano. A demanda de ácido glicólico em 2013 era de aproximadamente 50.000 toneladas por ano e a expectativa é de que chegue a 104.000 toneladas por ano em 2020. O preço de importação brasileira foi estimado em 1,90 USD/kg em 2015, como observado na Figura 4.10.

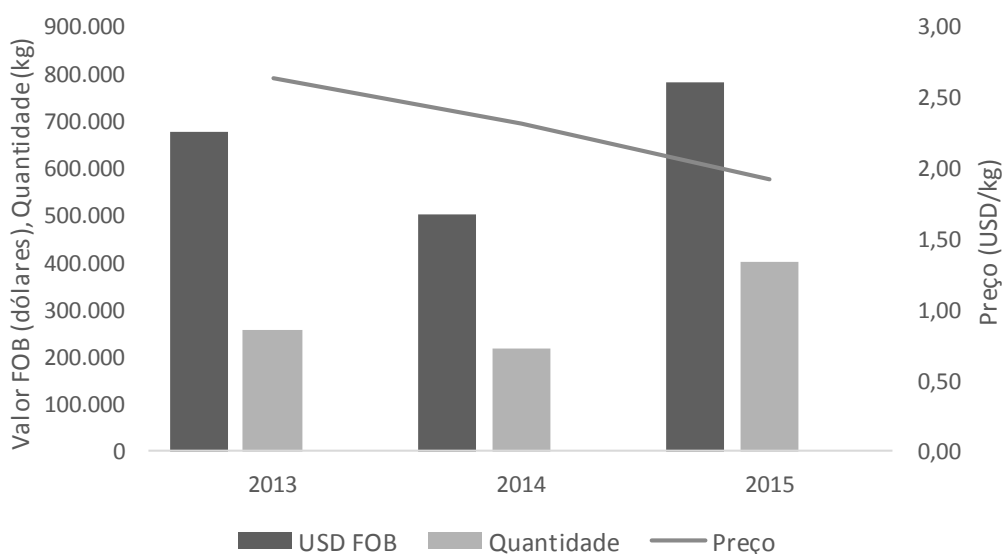


Figura 4.10 Dados de importação brasileira do ácido glicólico reportados pela Receita Federal.

4.2.1.4. Ácido Lático

O ácido lático, também identificado como ácido 2-hidroxiopropanóico ou lactato, possui número CAS 50-21-5 e código HS 29181110. É um composto com dupla funcionalidade (ácido carboxílico e

álcool) que atua em vários processos bioquímicos. Sua principal forma de obtenção é a através da fermentação láctica.

Por apresentar sabor neutro e atividade antimicrobiana, uma das principais aplicações do ácido láctico é na indústria de alimentos e bebidas. É usado como conservante para vegetais em conserva (azeitona, pepino e cebola, por exemplo) e em molhos para salada. Como agente de acidificação, pode ser empregado em produtos lácteos e como regulador da acidez em refrigerantes e sucos. Pode também ser usado na massa com levedo como fermento natural. Na forma de lactato de sódio e potássio, prolonga o tempo de prateleira de carnes, aves e peixes, além de controlar contaminação por bactérias e proteger o sabor da carne.

Também como regulador de pH, é empregado na indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo adicionalmente um agente bacteriostático para a pele e agindo no sequestro de íons metálicos. Devido a sua grande capacidade de bioincorporação, é um forte candidato como componente de biomateriais como parafusos e suturas reabsorvíveis.

O ácido láctico é o principal monômero do poli-ácido láctico (PLA), considerado um bioplástico renovável e compostável. Em conjunto com o ácido glicólico, o ácido láctico pode ser usado também para a fabricação do copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), descrito anteriormente nesse texto na seção referente ao ácido glicólico.

Além dessas aplicações, o ácido láctico é amplamente utilizado na indústria quando se necessita de acidez, como na produção de couro e têxteis e no revestimento de automóveis. É também conhecido por sua propriedade de descalcificação, tendo aplicação em produtos de limpeza doméstica. Nesse mesmo campo, atua como agente bacteriano natural em desinfetantes.

A demanda global de ácido láctico foi aproximadamente 715.000 toneladas em 2013 e há estimativas de que seja da ordem de 1.960.000 toneladas por ano em 2020. A capacidade de produção conhecida é de 800.000 toneladas por ano, sendo a maior parte das plantas nos Estados Unidos e na China, e uma planta menor instalada no Japão.

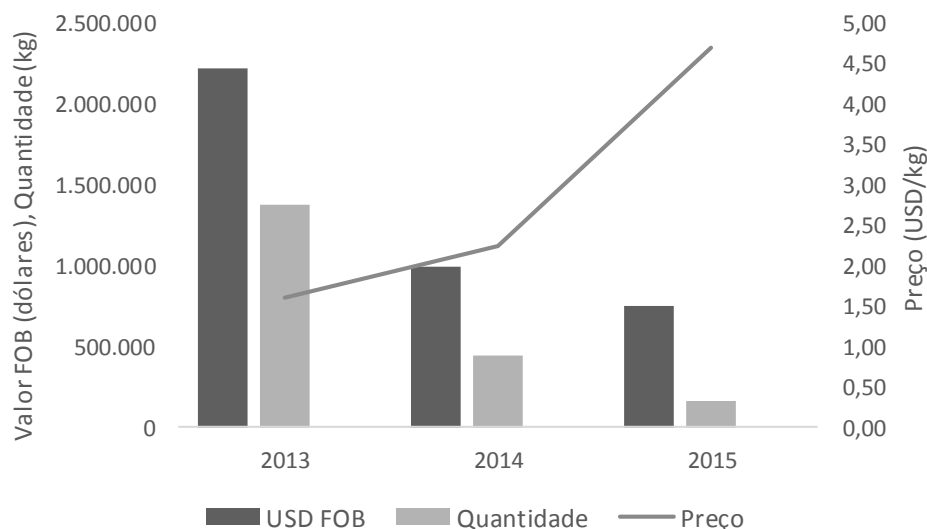


Figura 4.11 Dados de importação brasileira do ácido láctico reportados pela Receita Federal.

4.2.1.5. Ácido Málico

Identificado pela IUPAC como ácido 2-hidroxi-butanodióico, o ácido málico é um ácido dicarboxílico, mais especificamente um ácido-1,4. Também pode ser chamado de ácido hidroxi-succínico, ácido 1-hidroxi-1,2-etanodicarboxílico, entre outros nomes, e é classificado com o código HS 29181960 e número CAS 6915-15-7.

A maior parte do mercado do ácido málico se direciona para a indústria de alimentos e bebidas. Isso se deve principalmente a suas propriedades de controle de micro-organismos, ajuste de pH (acidulante), melhoramento de sabor e por apresentar um sabor agradável de maçã. Nesses segmentos, o ácido málico é usado principalmente como aditivo e preservativo, sendo uma alternativa ao ácido cítrico. Especificamente na indústria de alimentos, esse composto pode ser usado como um suplemento, fornecendo energia e reduzindo a dor muscular crônica, quando consumido nos limites recomendados.

Outro importante uso dessa molécula é em produtos de cuidados pessoais, como um aditivo em produtos para o cuidado com a pele. Possui propriedades esfoliantes e também atua como controlador de pH, aumentando o pH da pele e melhorando sua saúde e aparência.

Outros usos menos expressivos incluem limpeza de metais, galvanoplastia, saneamento, tratamento de águas e tratamento têxtil.

O ácido málico também é visto como um *building block*, podendo ser precursor do 1,4-butanodiol e seus derivados, derivados da pirrolidona e polímeros de poli-ácido málico (PMA). Esses últimos são

materiais atóxicos, não imunogênicos, e biodegradáveis produzidos naturalmente por alguns fungos filamentosos, mas normalmente como moléculas de cadeia curta. A produção em escala ainda é comprometida devido ao seu alto custo, mas possui propriedades interessantes principalmente para as áreas farmacêuticas e de nanoquímica, podendo ser um material inicial para micelas, micro-esferas, biocápsulas, biogéis, cristais líquidos e materiais de revestimento.

O mercado de ácido málico tem uma demanda total de mais de 70.000 toneladas por ano, com uma capacidade de 100.000 toneladas por ano. Os preços no Brasil se mantêm estáveis nos últimos 3 anos dos quais foi possível obter os dados (Figura 4.12).

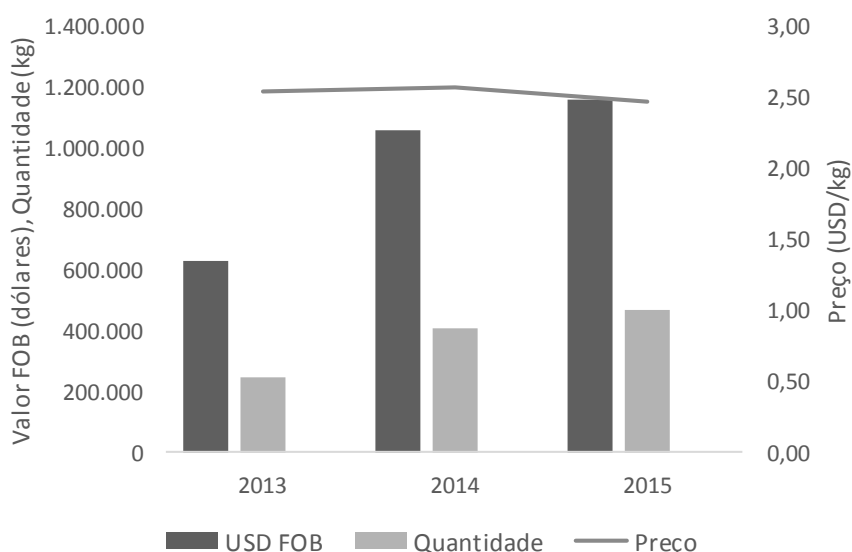


Figura 4.12 Dados de importação brasileira do ácido málico reportados pela Receita Federal.

4.2.1.6. Ácido Succínico

Ácido 1,2-etanodicarboxílico, ácido 1,4-butanodióico e succinato são outras formas de identificar o ácido succínico. Seu HS code é citado como 29171930 e o número CAS é 110-15-6.

Na área industrial, pode ser usado para a produção de polímeros como PBS (polibutileno succinato) e PBST (polibutileno succinato cotereftalato), além do 1,4-butanodiol, e como intermediário na fabricação de corantes e perfumes, entre outros. Pode substituir o ácido adípico e o anidrido ftálico como plastificante para polímeros e em resinas alquídicas. O ácido succínico é usado também em revestimentos, solventes, lubrificantes, agentes descongelantes e plásticos de engenharia.

Na indústria farmacêutica, o ácido succínico é usado como material precursor de drogas com diversos tipos de ação, como sedativos, descongestionantes, contraceptivos e anticarcinogênico (succinato de cálcio ativo). Também é usado na preparação da vitamina A e como antídoto para substâncias tóxicas.

Na indústria alimentícia, essa molécula encontra aplicação como aromatizante em bebidas e bolos, podendo ser encapsulada em microcápsulas, e conservante em ração para cachorros. Outras funções são o amolecimento de pães, a preservação de frango contra o agente patogênico *Salmonella* e a síntese do amido modificado. Um de seus derivados, o succinato de sódio, é usado como intensificador de sabor.

Outros usos do ácido succínico são na galvanização química de metais, na anodização do alumínio e no banho de gavanoplastia elétrica. Pode atuar também como inibidor de corrosão e para a fabricação de adesivos e revestimentos em pó.

A demanda de ácido succínico começou a aumentar a partir de 2014, com o surgimento de plantas industriais de produção renovável, passando de 100.000 toneladas por ano em 2014 para 160.000 toneladas por ano em 2016. A capacidade de produção é estimada de acordo com o que foi reportado das plantas dos principais produtores de ácido succínico (BioAmber, Reverdia, Myriant e Succinity). Esse valor chega a 197.000 toneladas por ano, com a maior parte dessa capacidade instalada nos Estados Unidos, seguido por Tailândia, Canadá e Europa (Itália, Espanha, França e Alemanha). O preço do ácido succínico variou bastante nos últimos anos, caindo drasticamente de 2014 a 2015 por conta da redução no custo de produção associado às plantas renováveis (Figura 4.13).

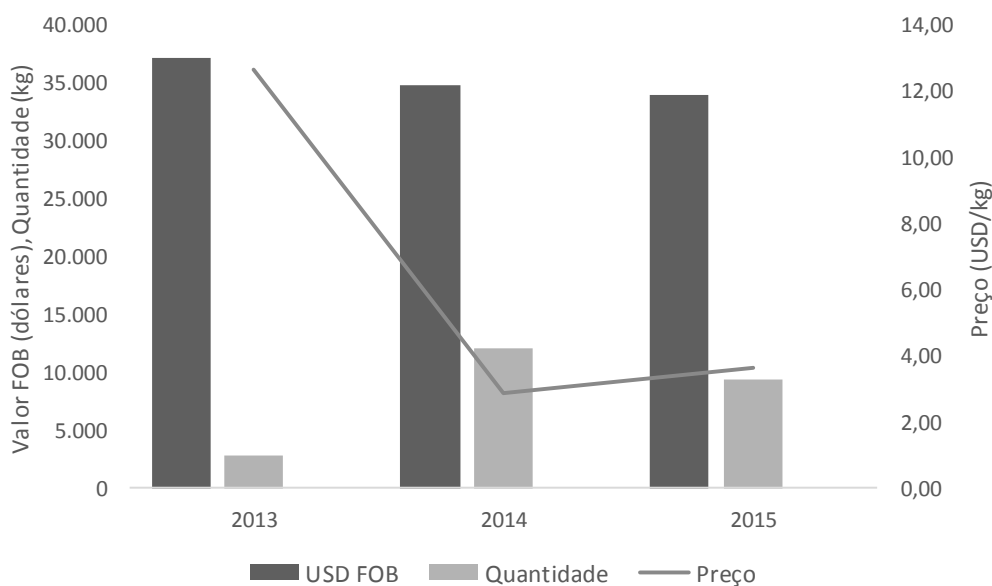


Figura 4.13 Dados de importação brasileira do ácido succínico reportados pela Receita Federal.

4.2.1.7. Comparação de derivados da plataforma

Como uma forma de reunir todos os dados referentes ao mercado de cada produto escolhido para fazer parte da plataforma, foi elaborada a Tabela 4.3. Algumas informações importantes podem ser analisadas, como o tamanho de mercado (definido pela demanda), a capacidade que a indústria global possui de suprir essa demanda e a possibilidade de inserção dos produtos em áreas de aplicação menos específicas (de menor valor agregado), o que é definido por preços mais competitivos.

Tabela 4.3 Resumo de dados de mercado, aplicações e rotas de produção dos derivados da plataforma.

Produto	Demanda (tons/ano)	Capacidade de produção (tons/ano)	Preço em 2015 (USD/kg)	Principais usos	Principal rota de produção
1,4-butanodiol	2.000.000	3.200.000	2,10	THF, PBT, PU, GBL	Esterificação do anidrido maleico + Hidrogenação
1,2,4-butanotriol	10	50	15.000	BTTN, compostos bioativos	Hidrogenação catalítica do ácido málico
Ácido Glicólico	50.000	87.000	1,90	Cosméticos, produtos de limpeza, PLGA	Carbonilação do formaldeído
Ácido Lático	715.000	445.000	4,70	Conservante, controle de pH, PLA e PLGA	Fermentação da glicose
Ácido Málico	70.000	100.000	2,50	Flavorizante, preservativo, ajuste de pH, 1,4-BDO, PMA	Hidratação do ácido fumárico
Ácido Succínico	200.000	197.000	3,65	PBS, PBST, 1,4-BDO	Fermentação da glicose

Para a maioria dos produtos analisados, ocorre *overcapacity*, ou seja, é relatada uma capacidade de produção maior do que a demanda para aquele produto. Quando isso acontece, é desvantajoso para empresas interessadas em adentrar o mercado daquele produto abrir uma nova planta, pois a possibilidade de suprir o mercado com as plantas existentes já é uma realidade e, portanto, a competição seria muito mais forte. Somente no caso do ácido lático é notada uma capacidade de produção muito inferior à demanda atribuída ao mesmo. No entanto, é importante enfatizar que as capacidades de produção se alteram constantemente com o fechamento de plantas existentes e com a abertura de novas plantas, portanto a *overcapacity* para um produto deve ser cuidadosamente analisada.

Uma comparação entre as áreas de aplicação dos compostos que fazem parte da plataforma proposta é feita na Figura 4.14, na qual é possível notar que praticamente todos os compostos estudados podem

encontrar aplicações na área de polímeros, devido à amplitude e versatilidade de compostos usados nessa área. Também pode ser constatado que o ácido láctico é o composto que possui maior abrangência de aplicações, sendo utilizado em praticamente todas as áreas, excluindo a militar. Isso se deve a ampla gama de propriedades como biocompatibilidade, sabor neutro, atividade antimicrobiana, além de ser regulador de pH e compostável.

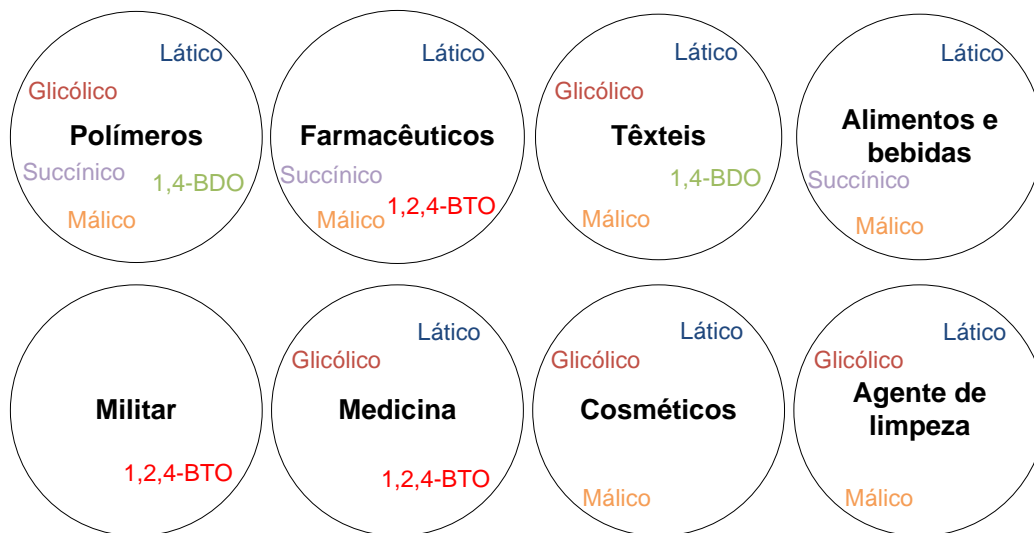


Figura 4.14 Divisão de áreas de aplicação, incluindo compostos que possuem aplicações nessas áreas.

A Figura 4.15 permite uma visualização mais imediata dessa mesma informação, podendo ser realizada a análise tanto de quais são as áreas de aplicação em que um determinado composto pode ser utilizado quanto de quais compostos estão inseridos nas áreas específicas reportadas nesse trabalho. A quantidade de linhas que sai de cada informação (produto ou área de aplicação) indica a relevância dessa informação no que concerne sua abrangência.

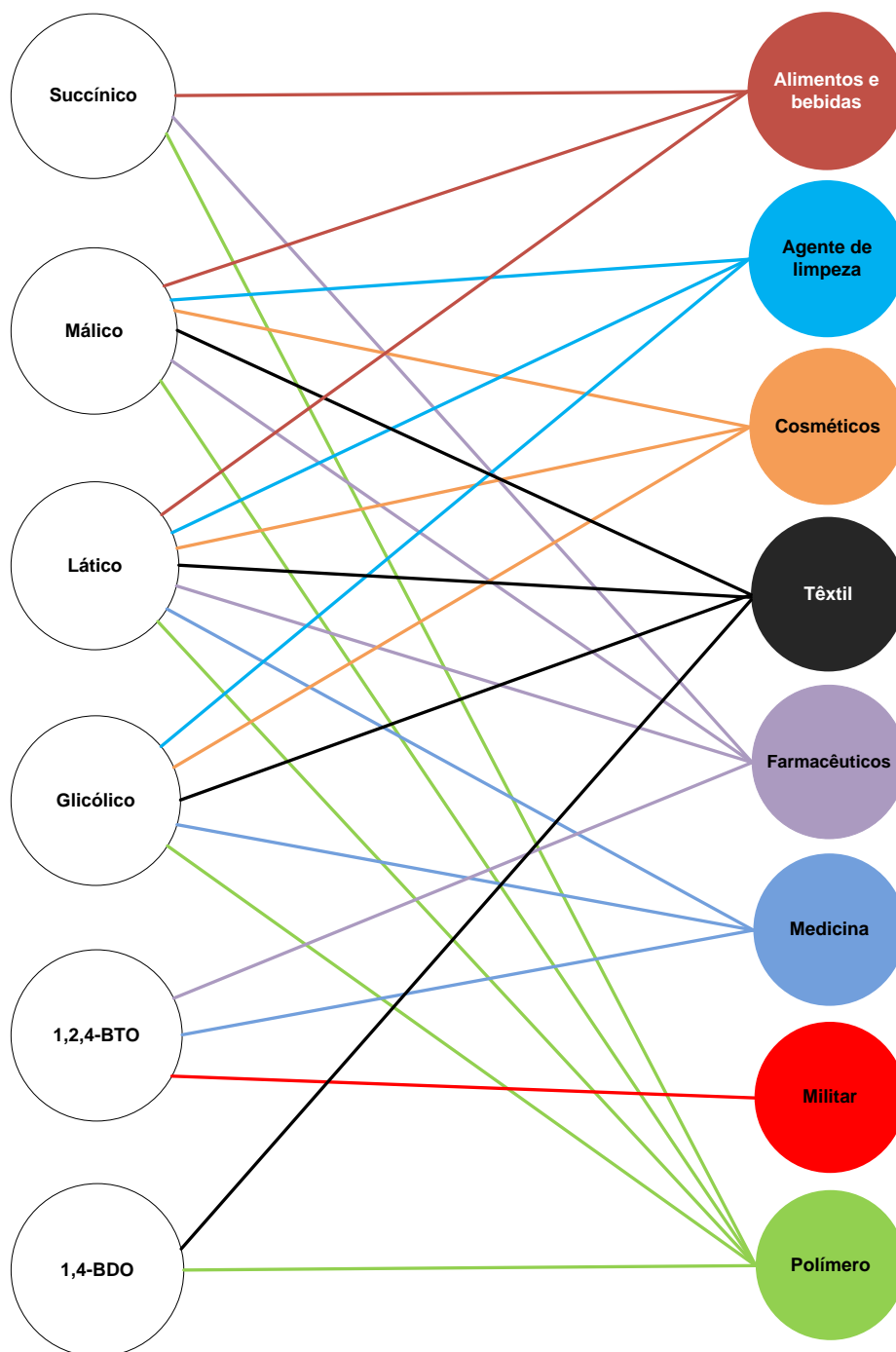


Figura 4.15 Relação de cada composto com suas aplicações.

4.3. Estudo da plataforma metabólica

4.3.1. Simulação da obtenção do ácido xilônico

Após a inserção das reações no modelo, algumas simulações tendo como função objetivo a produção de ácido xilônico foram realizadas. Essa modelagem inicial levantou alguns questionamentos sobre a via escolhida:

i) De que forma a xilose é transportada para dentro da célula?

ii) Qual a influência da enzima NAD transidrogenase na produção de biomassa?

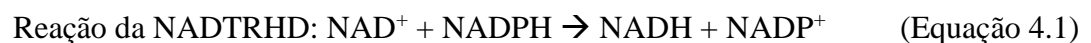
iii) Qual o fluxo de saída esperado para o gás carbônico?

iv) Por que há a formação de ácido fórmico ao se tentar diminuir o fluxo de CO₂ produzido pela célula?

E foram criadas algumas propostas de respostas:

i) Existem dois transportadores de xilose principais, codificados pelos genes Xyle e XylFGH. XylFGH é um transportador que consome ATP para o transporte, enquanto Xyle ocasiona o simporte (quando duas substâncias são transportadas na mesma direção) de próton e xilose (SUMIYA, DAVIS, *et al.*, 1995). A literatura menciona o transportador codificado por XylFGH como sendo mais utilizado em situações de baixas concentrações de xilose, e, adicionalmente, KHANKAL, CHIN e CIRINO (2008) demonstraram que mesmo em situações de saturação de xilose, XylFGH se mostra mais ativo.

ii) A transformação de NADPH e NAD⁺ em NADP⁺ e NADH é realizada pela NAD transidrogenase (NADTRHD) (Equação 4.1), mas também é uma das funções exercida pelo crescimento de biomassa. Essa última reação está descrita como “Biomass Objective Function with GAM” na Tabela 8.2, Anexo 1 – Modelo *E. coli core*, onde pode ser checada a similaridade na interconversão de cofatores. Sendo assim, quando o objetivo do modelo não é mais o crescimento de biomassa, a abordagem matemática entende que não é preciso tanto esforço computacional para realizar essa interconversão de cofatores pela reação de produção de biomassa, já que existe uma reação bem mais simples que realiza a mesma função. Portanto, esse fluxo é desviado para a reação da NAD transidrogenase, fazendo com que o fluxo na reação de produção de biomassa fique zerado.



iii) Não é interessante que o fluxo de saída de CO₂ da célula tenha um valor mais alto que o fluxo que se deseja priorizar (no caso, o da produção de ácido xilônico), já que isso significa que a célula estaria perdendo carbono na forma de CO₂ ao invés de direcionar o fluxo de carbono para a produção do composto de interesse.

iv) Devem ser investigadas as reações que levam ao formato e o porquê de seus fluxos terem aumentado com a deleção da enzima piruvato desidrogenase.

Inicialmente, foi analisada a influência do uso de NAD⁺ ou NADP⁺ como cofator para a enzima xilose desidrogenase (EC 1.1.1.359). Simulações objetivando comparar essas duas condições, em situações tanto aeróbica quanto anaeróbica, foram realizadas e o resultado pode ser visto na Tabela 4.4. O valor do *uptake* de xilose, ou seja, o fluxo de xilose para dentro da célula foi obtido por MACHADO (2016) (não publicado) a partir de um experimento utilizando a linhagem MG1655 de *E. coli* em meio rico de xilose.

Tabela 4.4 Comparação de condições anaeróbica e aeróbica sem restrição de fluxo de oxigênio.

Restrições			Fluxos resultantes (mmol/g _{DW} .h)							
<i>Uptake</i> de O ₂ (mmol/g _{DW} .h)	<i>Uptake</i> de xilose (mmol/g _{DW} .h)	Cofator XYD ¹	O ₂	Ácido xilônico	CO ₂	H ⁺	Formato	Etanol	Succinato	
0	1,33	NAD ⁺	0	0,83	0	1,66	0,83	0,83	0	
0	1,33	NADP ⁺	0	0,83	-0,83	2,49	0	0	0,83	
-	1,33	NAD ⁺	-0,66	1,33	0	1,33	0	0	0	
-	1,33	NADP ⁺	-0,66	1,33	0	1,33	0	0	0	

¹ Cofator utilizado na modelagem da enzima xilose desidrogenase (EC 1.1.1.359), a qual transforma xilose em xilonolactona.

A partir dessa simulação inicial, diversas condições foram testadas, entre elas restrições nos transportadores de xilose para dentro da célula, na enzima NAD transidrogenase (EC 1.6.1.2), assim como no *uptake* de oxigênio.

Sendo assim, algumas suposições foram testadas:

i) A presença de XyleE ou de XylFGH como único transportador de xilose presente foram testadas (Tabela 4.5). Posteriormente, foi definido como uma restrição que o transportador XylFGH só poderia ter entrada de xilose através do mesmo (e não a sua saída), enquanto o transportador XyleE não foi restringido nessa etapa (foram definidos os limites máximos para reação reversível).

ii) A reação da enzima NAD transidrogenase foi considerada nula, como se tivesse sido feito a deleção desse gene, na Tabela 4.6. Além dessa situação, foram testadas faixas de fluxo para essa enzima.

iii) Diferentes condições de *uptake* de oxigênio foram testadas, além da deleção da enzima piruvato desidrogenase.

Note que fluxos negativos representam entrada do metabólito na célula, enquanto fluxos positivos indicam saída do metabólito. Essa notação é válida para todos os resultados.

Tabela 4.5 Deleção de genes de transportadores de xilose (XylE e XylFGH).

Restrições			Fluxos resultantes (mmol/g _{DW} .h)				
Uptake de xilose (mmol/g _{DW} .h)	Transportador de xilose ¹	Cofator XYD ²	O ₂	Ácido xilônico	CO ₂	H ⁺	H ₂ O
1,33	ΔXylFGH	NADP ⁺	-3,11	0,786	2,72	0,786	2,72
1,33	ΔXylE	NADP ⁺	-3,44	0,712	3,09	0,712	3,09
1,33	ΔXylFGH	NAD ⁺	-3,11	0,786	2,72	0,786	2,72
1,33	ΔXylE	NAD ⁺	-3,44	0,712	3,09	0,712	3,09

¹ "ΔXylFGH" indica deleção do gene XylFGH (ausência do transportador XylFGH) e "ΔXylE" indica deleção do gene XylE (ausência do transportador XylE).

² Cofator utilizado na modelagem da enzima xilose desidrogenase (EC 1.1.1.359), a qual transforma xilose em xilonolactona.

Em alguns casos, não descritos na Tabela 4.5, a restrição parcial do fluxo dos transportadores de xilose não influencia na produção de ácido xilônico nem de biomassa. A restrição desses fluxos apenas causa o balanceamento dos mesmos a fim da entrada de xilose na célula ser igual à restrição imposta pela reação de "xyl__D_e => " (disponibilidade de xilose para a célula). Foi notada nas simulações a saída de xilose do sistema por meio do transportador XylFGH, o que pode ocorrer devido à necessidade de produzir ATP para o resto das reações, o que não é uma estratégia celular realista. A tendência quando a célula precisa sintetizar ATP é de que isso seja feito através de reações da via que produzam esse composto. Caso esse cenário não seja possível, a alternativa adotada seria produzir esse ATP que falta na célula através da ação da ATP sintase. Assim, o transporte de xilose para fora da célula, além de não ser adequado por conta da produção errônea de ATP por meio desse transportador, não faz sentido biologicamente, já que a célula estaria desperdiçando uma parte do substrato que poderia ser utilizado para gerar os compostos de interesse e/ou produzir biomassa.

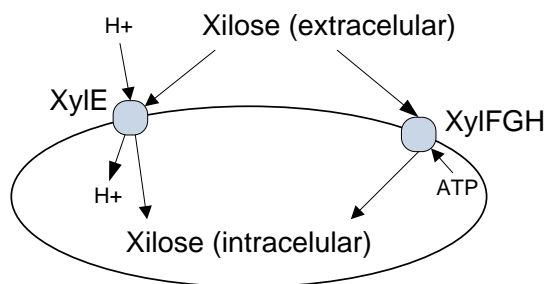


Figura 4.16 Principais transportadores de xilose para dentro da célula.

Como a enzima NAD transidrogenase tem a mesma função de balanceamento de cofatores controlada pela reação de produção de biomassa, foram realizados os experimentos discriminados na Tabela 4.6, de forma a simular o comportamento da produção de biomassa sem a presença (ou com baixa atividade catalítica) da NAD transidrogenase (identificada no modelo como NADTRHD).

Tabela 4.6 Experimento modificando a faixa de fluxo da enzima NAD transidrogenase (NADTRHD).

Restrições			Fluxos resultantes (mmol/g _{DW} .h)										
<i>Uptake</i> de xilose (mmol/g _{DW} .h)	Faixa da NADTRHD ¹	Cofator XYD ¹	NADTRHD ²	THD ² ³	NADH ¹⁶ ⁴	Ácido xilônico	Biomassa	O ₂	NH ₄	Fosfato inorgânico	CO ₂	H+	H ₂ O
1,33	0	NAD ⁺	0	0	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	0-0,5	NAD ⁺	2,34E-11	0	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	0,5-1,0	NAD ⁺	0,5	0,5	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	1,0-2,0	NAD ⁺	1	1	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	2,0-4,0	NAD ⁺	2	2	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	4,0-4,5	NAD ⁺	4	4	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	0	NADP ⁺	0	0	1,06	0,87	0,05	-0,53	-0,28	-0,19	0,15	1,88	0,52
1,33	0-0,5	NADP ⁺	0,5	0	1,16	1,04	0,03	-0,58	-0,17	-0,12	0,10	1,68	0,33
1,33	0,5-1,0	NADP ⁺	1	0	1,26	1,22	0,01	-0,63	-0,07	-0,05	0,04	1,47	0,13
1,33	1,0-2,0	NADP ⁺	1,33	0	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	2,0-4,0	NADP ⁺	2	0,67	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-
1,33	4,0-4,5	NADP ⁺	4	2,67	1,33	1,33	0	-0,66	-	-	-	1,33	-

¹ Limites inferior e superior do fluxo da enzima NAD transidrogenase.

² Cofator utilizado na modelagem da enzima xilose desidrogenase (EC 1.1.1.359), a qual transforma xilose em xilonolactona.

³ Enzima NAD transidrogenase.

⁴ Enzima NADP transidrogenase.

⁵ Enzima NADH desidrogenase (ubiquinona-8 & 3 prótons).

O modelo apresenta resultados diferentes ao serem usados os diferentes cofatores (NAD⁺ ou NADP⁺) para a enzima xilose desidrogenase (EC 1.1.1.359), que catalisa a reação representada na (Equação 4.2.



Quando NAD⁺ é utilizado, a enzima NAD transidrogenase (NADTRHD) se mantém no menor fluxo possível para a faixa estabelecida, e a enzima NADP transidrogenase (THD2) apresenta o mesmo fluxo para cada caso, fechando o ciclo de NADH e NADPH, servindo apenas como uma bomba de prótons para o interior da célula, enquanto a enzima NADH desidrogenase (NADH16) é a única responsável por reoxidar o NADH gerado na reação catalisada pela xilose desidrogenase. A Figura 4.17 representa as reações catalisadas por essas enzimas.

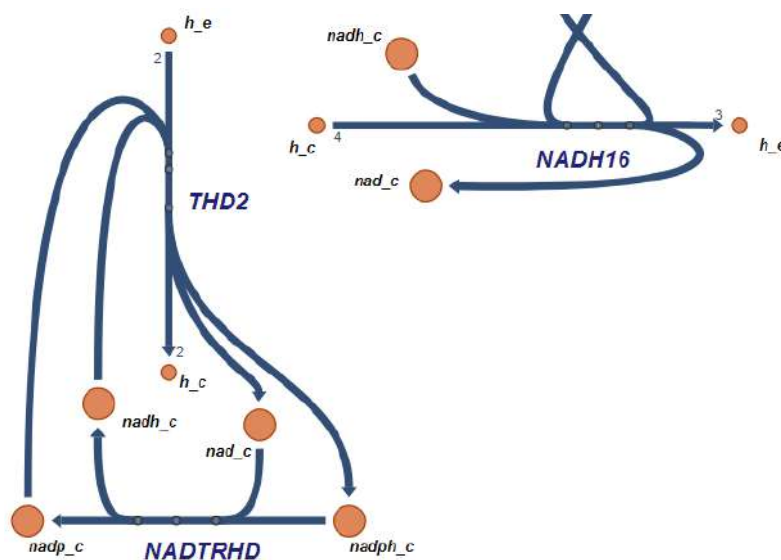
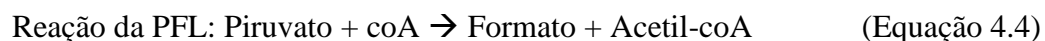


Figura 4.17 Representação do Escher (KING, DRAGER, *et al.*, 2015) das enzimas NAD transidrogenase (NADTRHD), NADP transidrogenase (THD2) e NADH desidrogenase (NADH16), significativamente responsáveis pelo balanço de cofatores no modelo *E. coli core* (Anexo 1 – Modelo *E. coli core*).

Já no caso do NADP⁺ sendo utilizado como cofator necessário para a ação da xilose desidrogenase, a NADTRHD apresenta o maior fluxo que se permite devido às restrições, pois é necessário reoxidar o NADPH gerado na catálise da xilose desidrogenase pela ação dessa enzima, já que a NADH16 somente é responsável pela reoxidação do NADH, e não do NADPH. É possível notar também que nesse caso ocorre crescimento de biomassa enquanto a NADTRHD não é suficiente para reoxidar todo o NADPH e parte dessa função é realizada pela equação de produção de biomassa. Além disso, a THD2 age de forma a suprir o balanceamento de NADP⁺ em excesso nos casos em que o fluxo pela NADTRHD ultrapassa o necessário para a reoxidação do NADPH gerado na reação da xilose desidrogenase.

Outros experimentos foram realizados a fim de identificar enzimas que produzissem CO₂, para que o fluxo por elas pudesse ser controlado. A enzima piruvato desidrogenase (PDH) foi identificada como a maior responsável pela geração de CO₂ no modelo. Ao ser realizada a deleção do fluxo que passa pela PDH (piruvato desidrogenase), enzima que leva o piruvato a acetil-coA (Equação 4.3), ocorre a ativação da enzima PFL (piruvato formato liase), ativa em condições anaeróbicas. Essa última é responsável pela produção de formato (Equação 4.4). Normalmente está presente na célula a enzima FDH (formato desidrogenase), responsável por metabolizar o formato, gerando CO₂ (Equação 4.5). No entanto, a FDH não está presente no modelo *E. coli core*, fazendo com que o formato gerado não seja transformado em CO₂, causando um acúmulo de formato no sistema e gerando um fluxo de saída de formato. É criada então uma situação irreal, já que normalmente o formato não irá sair da célula, mas sim o gás carbônico produzido na quebra dessa molécula.



A fim de obter uma resposta mais acurada em relação a produção de CO₂, o ideal seria realizar a modelagem com o modelo iJO1366, por ser um mapeamento completo do genoma de *E. coli*, possuindo, portanto, a reação da FDH.

4.3.2. Crescimento de biomassa dependente de transportadores de xilose

Seguindo a metodologia descrita na seção 3.3.1, foi criada a Tabela 4.7 de forma a comparar as simulações para o crescimento de biomassa com o descrito por HASONA, KIM *et al.* (2004). Não foi possível estabelecer o fluxo de xilose utilizado no artigo, somente havia uma indicação da concentração de xilose no meio para situação aeróbica (20mM) e anaeróbica (60mM). Essa escolha das diferentes concentrações para as diferentes condições de entrada de oxigênio por HASONA, KIM, *et al.* (2004) foi percebida de forma qualitativa nas simulações, ao ser impossível rodar o modelo para condições de fluxo de xilose menores que 4,5 mmol/(g_{DW}.h) para a deleção do gene XylFGH e menores que 6,5 mmol/(g_{DW}.h) para a deleção do gene XylE. Esse resultado demonstra que há uma concentração extracelular mínima de xilose (relacionada com a capacidade de sua entrada na célula, ou seja, o fluxo de xilose) para a qual a

célula consegue estar balanceada em termos de metabólitos e de energia, respeitando a lei de conservação de massas (uma imposição no FBA).

Dessa forma, foram estabelecidos vários fluxos de xilose diferentes, sendo a faixa escolhida para as simulações definida por restrições da própria simulação. O menor valor da faixa é o mínimo de xilose que permite o balanceamento do modelo, enquanto o maior valor foi determinado ao se obter uma porcentagem do controle igual à obtida anteriormente. O objetivo foi encontrar em qual situação a diminuição de produção de biomassa, dependente da deleção de cada um dos transportadores de xilose, se igualaria à descrita por HASONA, KIM, et al. (2004). Portanto, os resultados devem ser comparativos para um mesmo fluxo de xilose.

Tabela 4.7 Deleção de genes responsáveis por transportadores de xilose para situação anaeróbica - comparação com HASONA, KIM, et al. (2004).

Condição ¹	Fluxo Xilose	Biomassa Resultado ²	% do Controle	Biomassa (Hasona) ³	% do Controle (Hasona)
Controle 45	4,5	0,493	-	-	-
Controle 50	5,0	0,548	-	-	-
Controle 55	5,5	0,603	-	-	-
Controle 60	6,0	0,658	-	-	-
Controle 65	6,5	0,713	-	-	-
Controle 70	7,0	0,768	-	-	-
Controle 80	8,0	0,877	-	-	-
Controle 90	9,0	0,987	-	-	-
Controle 100	10,0	1,097	-	-	-
Controle 200	20,0	2,193	-	-	-
Controle 400	40,0	4,386	-	-	-
Controle 600	60,0	6,580	-	-	-
$\Delta XylFGH$ 45	4,5	0,009	2%	0,079	16%
$\Delta XylFGH$ 50	5,0	0,020	4%	0,088	16%
$\Delta XylFGH$ 55	5,5	0,031	5%	0,097	16%
$\Delta XylFGH$ 60	6,0	0,043	6%	0,105	16%
$\Delta XylFGH$ 65	6,5	0,054	8%	0,114	16%
$\Delta XylFGH$ 70	7,0	0,065	9%	0,123	16%
$\Delta XylFGH$ 80	8,0	0,088	10%	0,140	16%
$\Delta XylFGH$ 90	9,0	0,111	11%	0,158	16%
$\Delta XylFGH$ 100	10,0	0,133	12%	0,175	16%
$\Delta XylFGH$ 200	20,0	0,359	16%	0,351	16%
$\Delta XylFGH$ 400	40,0	0,812	19%	1,053	16%

Condição ¹	Fluxo Xilose	Biomassa Resultado ²	% do Controle	Biomassa (Hasona) ³	% do Controle (Hasona)
Δ XylFGH 600	60,0	1,264	19%	0,007	16%
Δ XylE 65	6,5	6,46E-05	0%	0,563	79%
Δ XylE 70	7,0	0,007	1%	0,606	79%
Δ XylE 80	8,0	0,022	2%	0,693	79%
Δ XylE 90	9,0	0,036	4%	0,780	79%
Δ XylE 100	10,0	0,050	5%	0,866	79%
Δ XylE 200	20,0	0,193	9%	1,733	79%
Δ XylE 400	40,0	0,479	11%	3,465	79%
Δ XylE 600	60,0	0,765	12%	5,198	79%

¹As condições testadas estão divididas entre as situações controle (presença dos dois transportadores de xilose), " Δ XylFGH" (ausência do transportador XylFGH) e " Δ XylE" (ausência do transportador XylE). A numeração ao lado de cada uma dessas situações é um representativo do fluxo de xilose utilizado na simulação, sendo o conjunto de condição e fluxo o identificador utilizado para os documentos de cada simulação.

²Indica o valor do fluxo de biomassa obtido na simulação para a condição correspondente.

³Indica o valor do fluxo de biomassa que seria obtido para as condições de deleção de gene de cada transportador, para cada fluxo de xilose, segundo HASONA, KIM, *et al.*, 2004.

Os resultados das simulações indicam uma tendência inversa da importância dos transportadores de xilose descrita por HASONA, KIM, *et al.* (2004), sendo a diminuição na produção de biomassa causada pela deleção do XylE na simulação maior do que aquela causada pela deleção do XylFGH (para um mesmo fluxo de xilose). A comparação do modelo com a resposta obtida por HASONA, KIM, *et al.* (2004) mostrou que o modelo proposto ainda precisa da incorporação de outros transportadores de xilose, ou que existem mecanismos de regulação desses transportadores na célula não contabilizados pelo FBA, já que não se obteve na simulação os mesmos resultados comparado com os dados experimentais. Além disso, o transporte de xilose pode ocorrer por transportadores promíscuos de glicose ou até mesmo através da membrana (sendo essa forma de difusão extremamente lenta). Dessa forma, seria interessante investigar mais a fundo a forma como a xilose é transportada para dentro da célula de *E. coli*, já que o uso eficiente da xilose é imprescindível para aumentar o potencial competitivo dos processos renováveis (STEPHANOPOULOS, 2007).

4.3.3. Simulação da obtenção do 1,2,4-butanotriol

Apesar deste ser o composto com menor volume de mercado, escolheu-se o 1,2,4-butanotriol (1,2,4-BTO) para exemplificar a simulação da obtenção dos derivados do *building block*, por conta de ser uma via com balanço redox fechado (o NADPH produzido na reação que transforma a xilose em xilolactona é compensado pelo NADPH consumido na reação de 3,4-diidroxiбутanal a 1,2,4-butanotriol). O estudo para a obtenção do 1,2,4-butanotriol (1,2,4-BTO) resultou nos experimentos descritos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 Experimentos relacionados à otimização do 1,2,4-butanotriol (1,2,4-BTO) para um *uptake* de xilose de 1,33 mmol/g_{DW}.h.

Restrições de fluxos (mmol/g _{DW} .h)							Fluxos resultantes (mmol/g _{DW} .h)*						
Entrada O ₂	Entrada Xilônico	Transporte Xilônico	XylE ¹	XylFGH ²	PDH ³	NADTRHD ⁴	Biomassa	BTO ⁵	O ₂	CO ₂	Formato	Acetato	Etanol
-	0	0	-	-	-	-	0	1,33	0	1,33	-	-	-
-	0	0	-	0-1000	-	-	0	0,72	-3,05	3,77	-	-	-
-	0-1000	0	-	-	-	-	0	1,33	0	1,33	-	-	-
-	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	4,06E-13	0,642	-3,44	4,08	-	-	-
-	0-1000	0-1000	-	0-1000	0	0	0	0,221	-3,7	2,07	3,7	-	-
-3,0-0	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	4,63E-13	0,501	-3	3,5	-	0,573	-
-2,5-0	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	4,06E-13	0,34	-2,5	2,84	-	1,23	-
-2,0-0	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	3,48E-13	0,179	-2	2,18	-	1,88	-
-1,0-0	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	5,15E-13	-0,954	-1	-0,954	3,81	2,9	0,903
-3,43-0	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	4,06E-13	0,64	-3,43	4,07	-	0,0112	-
0	0-1000	0-1000	-	0-1000	-	0	0	-2,23	0	-2,23	5,94	2,97	2,97

* Fluxos negativos indicam entrada do metabólito no sistema, enquanto números positivos indicam sua saída.

¹ Transportador de xilose com simporte de próton.

² Transportador de xilose com uso de ATP.

³ Enzima piruvato desidrogenase.

⁴ Enzima NAD transidrogenase.

⁵ Saída de 1,2,4-butanotriol do sistema.

Ao contrário do que ocorre na simulação para a produção do ácido xilônico, ao não restringir o fluxo de oxigênio, a simulação para o 1,2,4-butanotriol não apresenta fluxo para esse gás, considerando, portanto, que a célula está trabalhando anaerobicamente. Essa situação é possível devido ao balanço de cofatores, que permite a ausência de receptores finais de elétrons externos. Ao se trabalhar com processos anaeróbicos, por não haver o oxigênio presente para ser o aceptor final de elétrons, outros compostos deverão ser formados para incorporar esses elétrons. Dessa forma, uma estratégia adotada é a de direcionar o fluxo para a produção de outros metabólitos de interesse que também sirvam como aceptores de elétrons, colaborando assim para o balanceamento redox da célula (DE GRAEF, ALEXEEVA, *et al.*, 1999).

Curiosamente, ao se deletar o gene responsável pela NAD transidrogenase concomitantemente com a imposição de situação anaeróbica, o sistema passa a consumir 1,2,4-BTO para produzir formato, acetato e etanol. O mesmo ocorre para a situação de pouca disponibilidade de oxigênio, onde a faixa se situa entre 1 mmol/(g_{DW}.h) de entrada de oxigênio na célula e a situação anaeróbica. Essa é uma situação irreal, já que o 1,2,4-butanotriol não é um substrato para o sistema, e sim o produto que se deseja aumentar a produção. Nesse caso, o comportamento do FBA pode ser explicado pelo desbalanceamento de cofatores gerado pela ausência da NAD transidrogenase, o qual precisa ser compensado nas reações de geração desses produtos, que são normalmente associados à fermentação anaeróbica.

O fluxo de oxigênio que proporcionou a maior produção de 1,2,4-butanotriol foi o de 3,43 mmol/(g_{DW}.h). Pode-se observar na Tabela 4.8 que, no único experimento em que foi deletada a enzima piruvato desidrogenase, ocorre, além da diminuição do fluxo de CO₂ e aparecimento de um fluxo de formato, a diminuição do fluxo de 1,2,4-butanotriol (0,221mmol/(g_{DW}.h)) mmol se comparado com a situação com as mesmas condições exceto a deleção da piruvato desidrogenase (0,642 mmol/(g_{DW}.h)).

4.3.4. Propostas de coprodução de derivados da plataforma

Foi analisado como a produção dos compostos poderiam ser combinadas, e calculado em que proporção isso ocorreria de forma que o fluxo de cofatores consumidos para a produção de um químico fosse compensado pela geração de cofatores na via que leva ao seu coproduto. No caso desse trabalho, foi considerado somente o balanço de NADH por conta da presença da enzima NAD transidrogenase na *E. coli*, que transformaria o NADPH em NADH. Como a única via de produção que possui um saldo líquido de consumo de cofatores é a que leva ao 1,4-butanodiol, esse produto foi incluído em todos os casos de coprodução propostos. A produção do ácido láctico foi sempre associada à produção do ácido glicólico, por haver uma bifurcação na via que quebra um composto de 5 carbonos (2-deidro-3-deoxi-xilonato) em um composto de 2 carbonos (glicaldeído) e um de 3 carbonos (piruvato), levando respectivamente ao ácido glicólico e ao ácido láctico. A interdependência da coprodução desses dois produtos leva a um balanço redox fechado para essa via (coprodução de ácido láctico e ácido glicólico), impossibilitando a utilização do ácido láctico para consumir cofatores gerados nas vias que levam aos outros produtos nos casos de propostas de coprodução. Para o ácido glicólico foi possível estabelecer uma via para sua produção isolada, considerando que o piruvato pode ser levado ao ácido glicólico se incorporado no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), passando pelo *shunt* do glioxilato. Algumas propostas de vias para coprodução de derivados da plataforma que conferem com o balanço redox fechado para a célula são descritas nas Figuras 4.18, 4.19 e 4.20, nas quais a intensidade do fluxo é representada pela espessura da linha que representa a reação.

É imprescindível levar em conta que o presente estudo não considera as etapas de purificação dos químicos de interesse, o que poderia tornar algumas propostas de coprodução inviáveis economicamente devido ao alto custo de separação dos coprodutos gerados na fermentação.

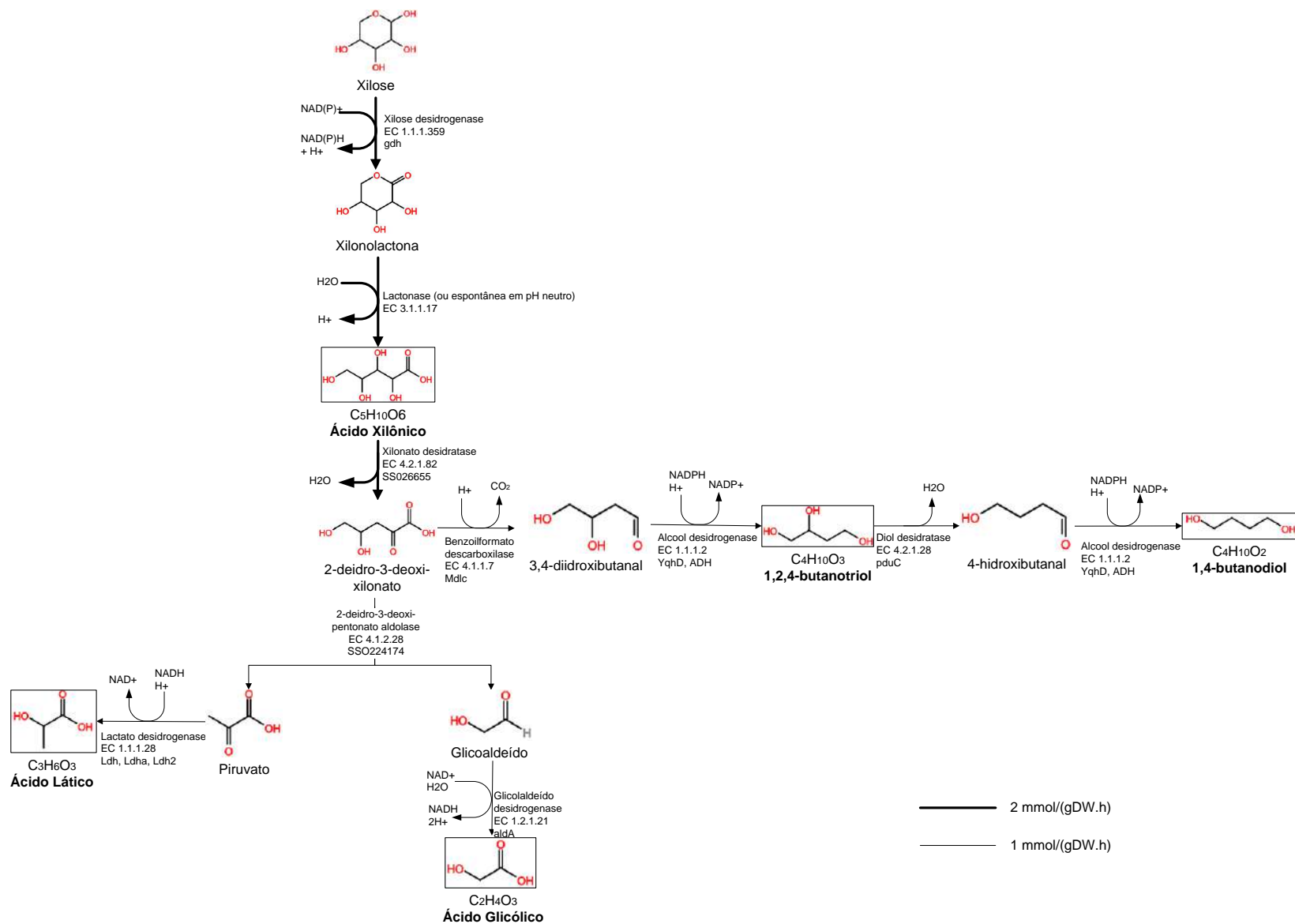


Figura 4.18 Esquema da via de coprodução de 1,4-butanodiol, ácido glicólico e ácido láctico, conforme a seguinte estequiometria: "2 xilose → 1 (1,4-butanodiol) + 1 Ácido Glicólico + 1 Ácido Láctico". A espessura das linhas que representam cada reação indica uma proporção entre fluxos.

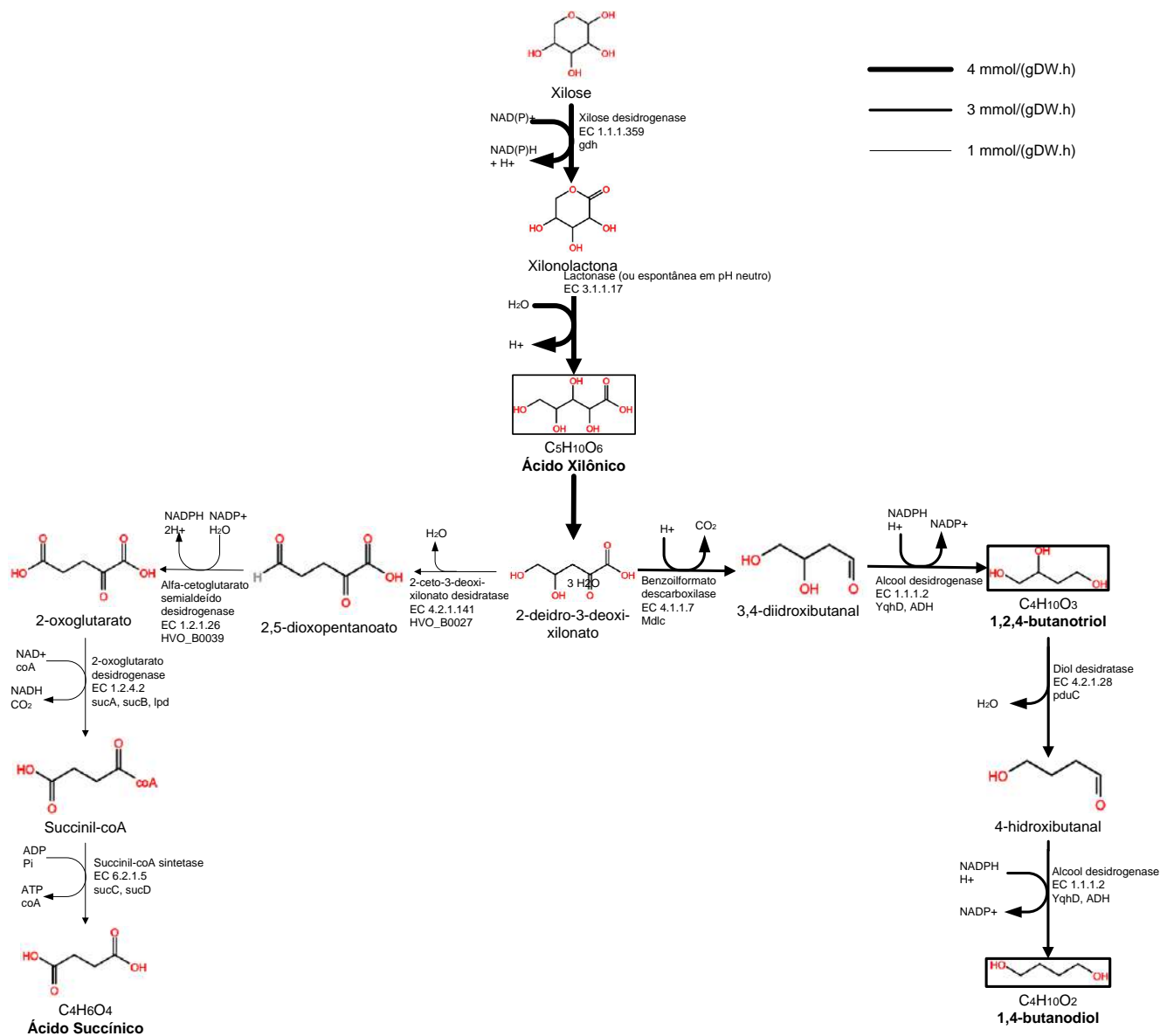


Figura 4.19 Esquema da via de coprodução de 1,4-butanodiol e ácido succínico, conforme a seguinte estequiometria: "4 xilose → 3 (1,4-butanodiol) + 1 Ácido Succínico". A espessura das linhas que representam cada reação indica uma proporção entre fluxos.

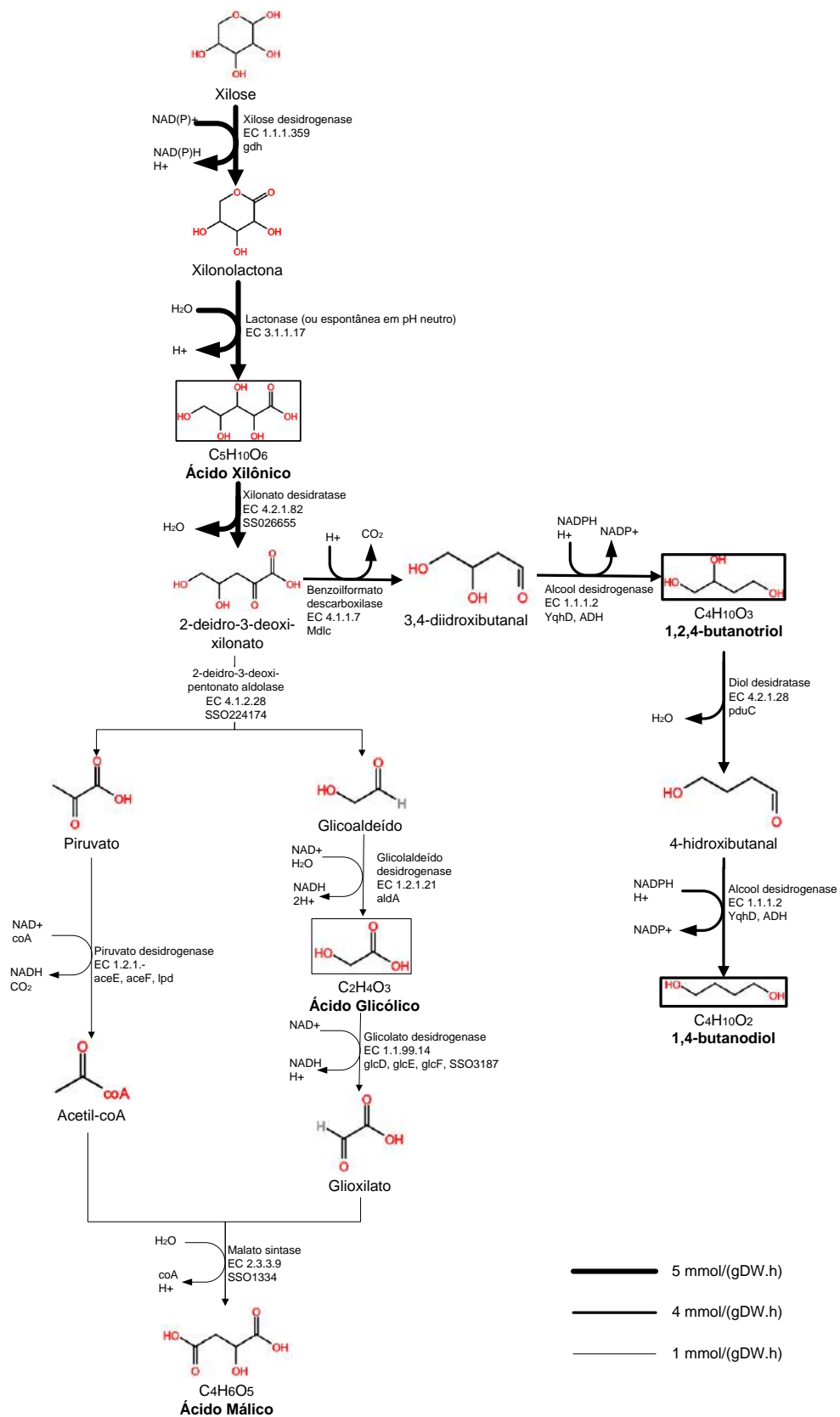


Figura 4.20 Esquema da via de coprodução de 1,4-butanodiol e ácido málico, conforme a seguinte estequiometria: "5 xilose → 4 (1,4-butanodiol) + 1 Ácido Málico". A espessura das linhas que representam cada reação indica uma proporção entre fluxos.

As vias propostas de coprodução consideram como premissa o balanço de cofatores, portanto os coeficientes a (NADPH) e d (NADH) da Equação 3.5 serão iguais a zero em todos os casos. Sendo assim, se houver a produção de ATP ($ATP = c$), o termo " $-(c/4,82)$ " se tornará zero também, já que o mesmo só é válido para ($c < 0$). Dentre as vias propostas, não ocorreu nenhum caso de consumo de ATP, porém é possível assumir que o rendimento cairia pouco, já que esse termo colabora com uma pequena parcela para o denominador da Equação 3.5, ao contrário da contribuição que os termos correspondentes ao NADH (3d) e ao NADPH (a/2) impõe à equação.

A Tabela 4.9 ilustra como, no caso em que se considera a incorporação de NADH ($Y^{Q,S}$), a coprodução causa um aumento no rendimento da via em relação à produção de apenas um composto da plataforma isolado. Por exemplo, o rendimento da coprodução de 1,4-butanodiol com ácido málico ($Y^{Q,S}_{\text{coprodução}} = 0,66$) é maior do que o rendimento de cada um dos compostos isolados ($Y^{Q,S}_{1,4\text{-BDO}} = 0,54$ e $Y^{Q,S}_{\text{ácido málico}} = 0,26$). No entanto, quando se olha para o rendimento estequiométrico (Y^Q), o cenário pode ser invertido, apresentando rendimentos maiores para a produção isolada de um dos compostos ao ser comparado com o rendimento de coprodução ($Y^Q_{\text{coprodução}} = 0,66$; $Y^Q_{1,4\text{-BDO}} = 0,60$; $Y^Q_{\text{ácido málico}} = 0,89$). Isso se deve ao fato de que o balanço neutro de cofatores existente nas vias de coprodução é suficiente para gerar um melhor aproveitamento das funções celulares (no caso estudado, a produção de químicos de interesse).

Tabela 4.9 Resultado dos rendimentos dos derivados do ácido xilônico na plataforma proposta, balanço de ATP, cofatores e gás carbônico gerados na via metabólica que leva até o composto. Todos os resultados são baseados em 1 mol de xilose como substrato.

Produtos	$^1Y^T$ (g/g)	$^2Y^Q$ (g/g)	$^3Y^{Q,S}$ (g/g)	ATP	NADH	NADPH	CO ₂
1,4-BDO	0,55	0,60	0,54	0	0	-1 ⁵	1
1,2,4-BTO	0,71	0,71	0,71	0	0	0	1
Ácido Glicólico	1,69	1,01	0,30	0	4	0	1
Ácido Lático	1,00	-	-	-	-	-	-
Ácido Glicólico + Ácido Lático	- ⁴	1,11	0,69	0	0	1	0
Ácido Málico	1,49	0,89	0,26	0	3	1	1
Ácido Succínico	1,12	0,79	0,28	1	1	2	1
1 (1,4-BDO) + 1 (Glicólico) + 1 (Lático)	-	0,85	0,85	0	0	0	0,5
4 (1,4-BDO) + 1 (Málico)	-	0,66	0,66	0	0	0	1
3 (1,4-BDO) + 1 (Succínico)	-	0,65	0,65	0,25	0	0	1

¹ Rendimento termodinâmico, em grama de produto por grama de xilose. Não considera a estequiometria, somente o grau de redução dos compostos.

² Rendimento estequiométrico (depende da via utilizada), em grama de produto por grama de xilose.

³ Rendimento que considera utilização de NADH em excesso para produção de succinato, em grama de produto por grama de xilose.

⁴ Campos com hífen (-) indicam que aquele valor específico não foi calculado.

⁵ Números negativos indicam consumo do composto especificado.

É possível notar na Tabela 4.9 que o rendimento termodinâmico (Y^T) para o 1,4-BDO é menor do que o rendimento estequiométrico (Y^Q), apesar do rendimento termodinâmico ser considerado uma forma de cálculo para o rendimento máximo teórico. Essa particularidade se deve à forma como o rendimento termodinâmico é calculado, considerando o grau de redução dos compostos. Normalmente o grau de redução do substrato é maior do que do produto, mas nesse caso específico, $\gamma_{1,4-BDO} > \gamma_{xilose}$ e, por isso, há uma diminuição no valor do rendimento termodinâmico.

Os rendimentos termodinâmicos das coproduções não foram calculados devido à ausência de referências na literatura indicando como o cálculo deve ser feito. No entanto, o racional utilizado para o caso do ácido succínico detalhado por ROMÃO-DUMARESQ (2016) (não publicado), o qual é descrito a seguir, pode indicar uma alternativa para calcular o rendimento termodinâmico em casos onde se tem coprodução. O ácido succínico pode ser produzido a partir da glicose por três caminhos metabólicos diferentes: via redutora ou via oxidativa do ciclo do ácido cítrico (TCA, ou ciclo de Krebs) ou passando pelo *shunt* do glioxilato, como ilustrado na Figura 4.21.

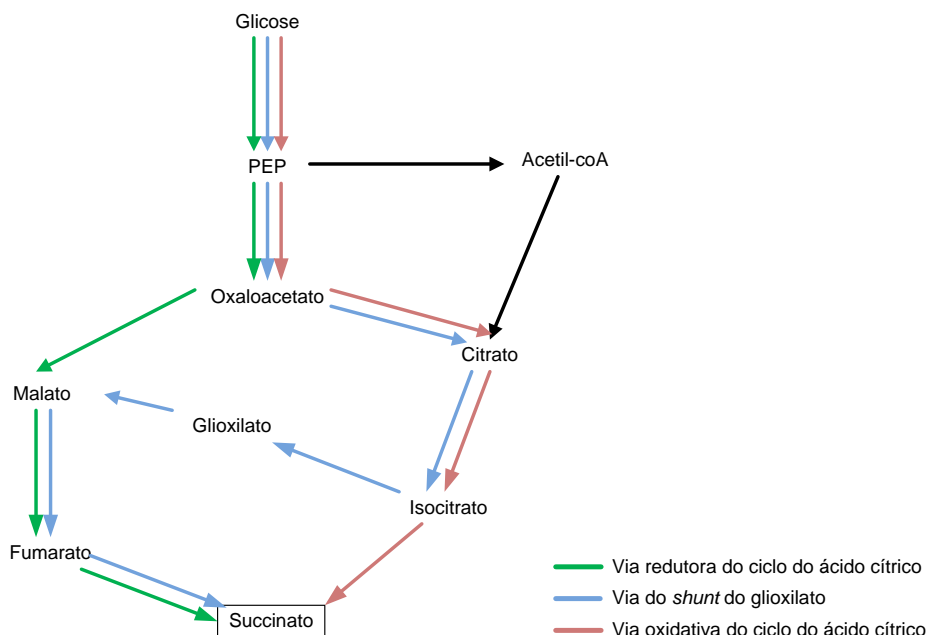


Figura 4.21 Possibilidades de caminhos metabólicos para obtenção do ácido succínico a partir da glicose.

Considerando uma proporção entre eles que respeite o balanço de cofatores (70% pela via redutora, 25,5% pela via oxidativa e 4,5% pelo *shunt* do glioxilato) o rendimento estequiométrico

(Y^Q) calculado apresenta o valor de 1,12. Note que ao ser efetuado o cálculo de rendimento termodinâmico (Y^T), obtém-se exatamente o mesmo valor (Equação 4.6).

$$Y^T = \frac{\text{Grau de redução}_{\text{glicose}}}{\text{Grau de redução}_{\text{ácido succínico}}} \times \frac{PM_{\text{ácido succínico}}}{PM_{\text{glicose}}} = \frac{24}{14} \times \frac{118,09 \text{ g/mol}}{180,16 \text{ g/mol}} = 1,12 \quad (\text{Equação 4.6})$$

Esses valores de rendimentos serem iguais indica que o rendimento termodinâmico é aquele obtido quando existe o máximo de aproveitamento das vias celulares. Sendo assim, esse estudo fez-nos acreditar que ao mapear todos os caminhos existentes na célula para se obter os produtos das vias de coprodução e descobrir a proporção desses caminhos para um balanço neutro de cofatores, seria possível obter um valor indicativo do rendimento termodinâmico (Y^T) para a coprodução ao calcular o rendimento estequiométrico (Y^Q) da via.

5. Conclusões

- O ácido xilônico se mostrou o melhor candidato dentre os potenciais *building blocks* analisados nesse trabalho. Esse composto possui o maior rendimento para todos os casos calculados (Y^T : 1,23; Y^Q : 1,11; $Y^{Q,S}$: 0,69). Além disso, possui o maior número de derivados por rota fermentativa. O número de artigos e patentes publicadas foram os menores, demonstrando que a pesquisa nesse composto ainda é incipiente, o que torna interessante o desenvolvimento de trabalhos ao redor desse químico.
- Uma plataforma renovável deve possuir como derivados produtos que possuam alta demanda e preços competitivos. A análise de mercado e aplicações dos produtos selecionados para a presente plataforma mostrou que as principais áreas de aplicações são em polímeros, cosméticos, agentes de limpeza, na medicina, nas indústrias têxtil, farmacêutica e de alimentos e bebidas. É importante também avaliar a versatilidade de aplicações atribuída a cada composto, uma vez que sua produção não deva ser dependente da prosperidade econômica de somente um setor. Nesse contexto, o ácido láctico se mostrou o composto mais versátil entre os analisados, seguido pelos ácidos málico e glicólico.
- A modelagem da via metabólica proposta para o *building block* foi capaz de elucidar os principais pontos de análise que devem ser observados nessa via, sendo eles o transporte de substrato (xilose) para o interior da célula, assim como o transporte de qualquer metabólito que necessite estar nos dois compartimentos (intra e extracelular), o balanço de

cofatores dentro do micro-organismo e como ocorre a respiração celular (de forma aeróbica ou anaeróbica).

- A modelagem para o 1,2,4-butanotriol levantou questionamentos similares aos feitos para o caso do ácido xilônico, mas com particularidades envolvendo uma das premissas feitas para a sua produção, que consiste no balanceamento redox do sistema. É necessário estabelecer de forma sensata as restrições a fim de não causar situações irreais, como o consumo do produto para o balanceamento do modelo.
- Uma análise baseada no FBA não considera regulação das enzimas, portanto deve-se levar em conta que os resultados indicam o balanceamento matemático dos fluxos, considerando todas as reações do modelo. Sendo assim, por mais que seja improvável uma certa enzima ser superexpressa *in vivo*, existe a possibilidade *in silico* disso acontecer se houver a necessidade de produzir ou consumir algum metabólito que a mesma inclui em sua catálise.
- A plataforma metabólica abre espaço para inúmeras possibilidades de produção, incluindo coprodução de produtos onde uma das premissas seja o balanço fechado de cofatores. A escolha dos metabólitos deve considerar suas potenciais aplicações, tamanho de mercado, potenciais empresas parceiras ou competidoras, a existência de produtos de fonte fóssil com os quais será estabelecida uma competição (no caso de produtos *drop-in*) e a dificuldade que o produto terá para entrar no mercado, mesmo apresentando propriedades inovadoras e superiores (se for não *drop-in*).
- A Engenharia Metabólica possui diversas ferramentas capazes de auxiliar no desenvolvimento de plataformas biotecnológicas aperfeiçoadas, aumentando as chances de que a plataforma seja economicamente competitiva com as formas de produção já existentes no mercado. Nesse contexto, a Análise de Balanço de Fluxos (FBA) é uma estratégia interessante para uma análise preliminar, permitindo a seleção de casos específicos para serem estudados mais profundamente por meio de outras abordagens que permitam maior entendimento dos fenômenos que envolvem o metabolismo de micro-organismos.

5.1. Trabalhos futuros

O presente trabalho não foi capaz de permitir a compreensão de todos os quesitos relacionados com a otimização da plataforma metabólica. Outros aspectos que poderiam ser explorados a fim de se obter um modelo mais robusto para o caso em questão são listados abaixo:

- Simular o caso da plataforma proposta usando o modelo iJO1366 para *E. coli*. Dessa forma, estudos mais completos sobre o metabolismo desse micro-organismo poderão ser realizados e uma predição com maior acurácia em relação ao comportamento real da célula poderá ser criada.
- Ainda é necessário validar o modelo, alimentando-o com dados experimentais de fermentação. Na linhagem MG1655 de *Escherichia coli* será inserido o gene codificante para a xilose desidrogenase. Espera-se que esse gene já seja suficiente para a inserção da via até o ácido xilônico, já que a etapa que leva a xilonolactona até esse ácido pode ocorrer também de forma espontânea em pH neutro. O pH ótimo para *Escherichia coli* se situa entre 6 e 7.
- Modelos que considerem regulação de enzimas podem ser aplicados de forma a prever com maior precisão a resposta microbiana. Podem ser usadas abordagens, por exemplo, em que a via possui em pontos de bifurcação enzimas alostéricas (reguladas por modificações não-covalentes), configurando importantes pontos de regulação.
- Além da expansão de outras possibilidades de derivados para a plataforma proposta nesse trabalho, serão propostas novas plataformas com outros *building blocks* e outros derivados de interesse comercial. Será feita a análise dessas plataformas e a subsequente otimização das mesmas, a fim de mapear diversas oportunidades competitivas de serem empregadas em empresas com interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos renováveis.

6. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5. ed. New York: Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008. ISBN 978-0-8153-4r05.

AMYRIS. Amyris, 2017. Disponível em: <<http://farnesene.net/>>. Acesso em: 23 Jul 2017.

AVANTHI, A. et al. Bioconversion of hemicelluloses of lignocellulosic biomass to ethanol: an attempt to utilize pentose sugars. **Biofuels**, v. 22, n. 47, Nov 2016. ISSN 1759-7269.

BIOAMBER INC. Bioamber, 2008. Disponível em: <https://www.bio-amber.com/bioamber/en/products#succinic_acid>. Acesso em: 23 Jul 2017.

BNDES. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira. Relatório 4 - Químicos com base em fontes renováveis**. Rio de Janeiro. 2014.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, 2016. Disponível em: <<https://metacyc.org/>>. Acesso em: fev. 2017.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. [S.l.]: EPUB, 2008. 288 p.

COMMON Chemistry™ - A CAS Solution. Disponível em: <<http://www.commonchemistry.org/>>. Acesso em: 20 Maio 2017.

DE GRAEF, M. R. et al. The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 8, p. 2351-2357, 1999.

DOCUMENTATION for COBRAPy. Disponível em: <<http://cobrapy.readthedocs.io/en/latest/index.html>>. Acesso em: 23 Maio 2017.

DUGAR, D.; STEPHANOPOULOS, G. Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. **Nature Biotechnology**, Cambridge, Massachusetts, USA, v. 29, n. 12, p. 1074-1078, December 2011.

E4TECH; RE-CORD; WUR. **From the Sugar Platform to biofuels and biochemicals**. Final report for the European Commission, p. 30. 2015. (contract No. ENER/C2/423-2012/SI2.673791).

EBRAHIM, A. et al. COBRApy: COntstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. **Systems Biology**, La Jolla, CA, USA, v. 7, n. 74, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. **BIO-TIC - Overcoming hurdles for innovation in industrial biotechnology in Europe - Biobased chemical building blocks summary**. CORDIS - Community Research and Development Information Service. [S.l.]. 2014.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013, 1939. ISBN 978-85-216-1716-7.

FROST, J. W.; NIU, W. **Microbial synthesis of D-1,2,4-butanetriol**. US2011/0076730, 31 March 2011.

GOOGLE Acadêmico. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/>>. Acesso em: Janeiro-Julho 2017.

HASONA, A. et al. Pyruvate Formate Lyase and Acetate Kinase Are Essential for Anaerobic Growth of Escherichia coli on Xylose. **Journal of Bacteriology**, Gainesville, Florida, USA, v. 186, n. 22, p. 7593–7600, Nov. 2004.

HATEFI, Y.; YAMAGUCHI, M. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a model for utilization of substrate binding energy for proton translocation. **FASEB Journal**, v. 10, n. 4, p. 444-52, Mar 1996.

IUBMB. Enzyme Nomenclature. **Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse**, 2017. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 12 Maio 2017.

KHANKAL, R.; CHIN, J. W.; CIRINO, P. C. Role of xylose transporters in xylitol production from engineered Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, University Park, PA, United States, v. 134, p. 246-252, February 2008.

KIM, S. R. et al. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, University of Illinois at Urbana-Champaign, v. 30, n. 5, p. 274-82, May 2012.

KING, Z. A. et al. Escher: A Web Application for Building, Sharing, and Embedding Data-Rich Visualizations of Biological Pathways. **PLoS Comput Biol**, La Jolla, CA, USA, v. 11, n. 8, 2015. ISSN e1004321.

KWAK, S.; JIN, Y.-S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microbial Cell Factories**, Urbana, IL, USA, v. 16, n. 82, 2017.

LIAO, J. C.; YAN, Y. **Production of 1,4-butanediol by recombinant microorganisms**. US 9,200,288 B2, 1 Dec 2015.

MACHADO, A. C. D. O. **Não publicado**. Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras. Rio de Janeiro. 2016.

MILFORD, R. L.; ALLWOOD, J. M.; CULLEN, J. M. Assessing the potential of yield improvements, through process scrap reduction, for energy and CO₂ abatement in the steel and aluminium sectors. **Resources, Conservation and Recycling**, Cambridge, UK, v. 55, p. 1185–1195, May 2011.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Purdue University, v. 96, p. 673–686, 2005.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). **Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. U.S. Department of Energy. [S.l.]. 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Sarvier, 2011. ISBN 978-85-363-2418-0.

O'BRIEN, E. J.; MONK, J. M.; PALSSON, B. O. Using Genome-Scale Models to Predict Biological Capabilities. **Cell**, The Danish Technical University, v. 161, n. 5, p. 971–987, 21 May 2015.

ORTH, J. D. et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. **Molecular Systems Biology**, La Jolla, CA, USA, v. 7, n. 535, 2011.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, La Jolla, CA, USA, v. 28, n. 3, p. 245-248, March 2010.

PETRUCCI, R. H.; HARWOOD, W. S.; HERRING, F. G. **General Chemistry: Principles and Modern Applications**. 8. ed. [S.l.]: Prentice Hall, 2002. ISBN 0130143294.

RECEITA Federal - Ministério da Fazenda. Disponível em: <<http://idg.receita.fazenda.gov.br/dados/resultados/comercio-exterior/importacoes-de-produtos-dos-capitulos-01-a-99-da-ncm>>. Acesso em: Maio 2017.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S. **Não publicado**. Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras. Rio de Janeiro. 2016.

SCHOMBURG, I. et al. The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. **Journal of Biotechnology**, Article in Press, 2017. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/>>. Acesso em: Junho 2017.

SCIENCE Direct. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: Janeiro-Julho 2017.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. **Metabolic Engineering**, Cambridge, v. 1, p. 1-11, 1999.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 801-804, 2007.

STEPHANOPOULOS, G. Synthetic Biology and Metabolic Engineering. **ACS synthetic biology**, v. 1, n. 12, p. 514-525, 2012.

SUMIYA, M. et al. Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene xylF, in Escherichia coli. **Receptors Channels**, v. 3, n. 2, p. 117-28, 1995.

USPTO. Disponível em: <<https://www.uspto.gov/>>. Acesso em: Janeiro - Julho 2017.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica - A vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. ISBN 978-85-363-1347-4.

WANG, F.-K.; TAMIRAT, Y. Process yield analysis for autocorrelation between linear profiles. **Computers & Industrial Engineering**, Taipei, Taiwan, v. 71, p. 50-56, February 2014.

WHITTEN, K. W.; GAILEY, K. D.; DAVIS, R. E. **General Chemistry**. 4. ed. [S.l.]: Saunders College Publishing, 1992. ISBN 0030723736.

7. Apêndices

7.1. Apêndice 1 – Vias metabólicas para os candidatos a *building block*

Tabela 7.1 Vias que levam da xilose ao candidato a *building block*, utilizadas para o cálculo de rendimentos.

Building block	Vias a partir da xilose ¹	Números EC	Principais enzimas envolvidas	Principais intermediários	Fonte
Ácido 3-hidroxi propiônico (3-HPA)	<i>3-hydroxypropanoate cycle</i>	1.2.1.- 2.1.3.d 1.2.1.75	piruvato desidrogenase acetil-coA carboxiltransferase malonil-coA redutase	Piruvato, acetil-coA, malonil-coA, 3-oxopropanoato	MetaCyc
Ácido itacônico	<i>itaconate biosynthesis</i>	6.4.1.1 2.3.3.1/2.3.3.16 4.2.1.3 4.1.1.6	piruvato carboxilase citrato sintase aconitase cis-aconitato descarboxilase	Piruvato, oxaloacetato, citrato, cis-aconitato	MetaCyc e BRENDA
Ácido levulínico	<i>TCA cycle I (prokaryotic)</i> <i>3-oxoadipate degradation</i>	6.4.1.1 2.3.3.1/2.3.3.16 4.2.1.3 4.2.1.3 1.1.1.42 1.2.4.2 22.3.1.174 2.8.3.6	piruvato carboxilase citrato sintase aconitase aconitato hidratase isocitrato desidrogenase 2-oxoglutarato desidrogenase ceto adipil-coA tiolase ceto adipato:succinil-coA transferase	Piruvato, oxaloacetato, citrato, cis-aconitato, isocitrato, 2-oxoglutarato, succinil-coA, 3-oxoadipil-coA, 3-oxoadipato	MetaCyc
Ácido succínico	<i>TCA cycle I (prokaryotic)</i>	6.4.1.1 2.3.3.1/2.3.3.16 4.2.1.3 4.2.1.3 1.1.1.42 1.2.4.2 6.2.1.5	piruvato carboxilase citrato sintase aconitase aconitato hidratase isocitrato desidrogenase 2-oxoglutarato desidrogenase succinil-coA sintetase	Piruvato, oxaloacetato, citrato, cis-aconitato, isocitrato, 2-oxoglutarato, succinil-coA	MetaCyc
Ácido xilônico	<i>xylose degradation III</i>	1.1.1.179 3.1.1.-	Xilose desidrogenase Lactonase	Xilonolactona, ácido xilônico	MetaCyc

		2.3.1.9	acetil-coA acetiltransferase		
		2.3.3.10	hidroximetil glutaril-coA sintase		
		1.1.1.34	hidroximetil glutaril-coA redutase		
	<i>mevalonate pathway I</i>	2.7.1.36	mevalonato quinase	acetoacetil-coA,	
Farneseno		2.7.4.2	fosfomevalonato quinase	mevalonato, isopentenil	MetaCyc
		4.1.1.33	difosfomevalonato descarboxilase	difosfato, dimetilalil	
		5.3.3.2	isopentenil difosfato isomerase	difosfato, farnesil difosfato	
	<i>trans, trans-farnesyl</i>	2.5.1.1	geranil difosfato sintase		
	<i>diphosphate biosynthesis</i>	2.5.1.10	farnesil difosfato sintase		
	<i>farnesene biosynthesis</i>	4.2.3.46	farneseno sintase		

¹Todas as vias aqui propostas (exceto para o ácido xilônico) partem do piruvato ou do acetil-coA. As principais vias para a obtenção desses dois compostos a partir da xilose são a degradação da xilose levando a xilulose 5-fosfato, a qual entra na via das pentoses fosfato gerando o gliceraldeído 3-fosfato, o qual é metabolizado na glicólise levando a piruvato. O piruvato é metabolizado a acetil-coA pela piruvato desidrogenase (EC 1.2.1.-). Na base de dados MetaCyc essas vias são identificadas como: *xylose degradation I*, *pentose phosphate pathway* e *glycolysis* (CASPI, BILLINGTON, *et al.*, 2016).

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Modelo *E. coli* core

Tabela 8.1 Metabólitos contidos no modelo *E. coli* core, suas identificações dentro das reações descritas na Tabela 8.2 e em qual compartimento os mesmos estão presentes.

Nome do metabólito	Identificador	Compartimento ¹
3-Phospho-D-glyceroyl phosphate	13dpg_c	c
D-Glycerate 2-phosphate	2pg_c	c
3-Phospho-D-glycerate	3pg_c	c
6-Phospho-D-gluconate	6pgc_c	c
6-phospho-D-glucono-1,5-lactone	6pgl_c	c
Acetate	ac_c	c
Acetate	ac_e	e
Acetaldehyde	acald_c	c
Acetaldehyde	acald_e	e
Acetyl-CoA	accoa_c	c
cis-Aconitate	acon_C_c	c
Acetyl phosphate	actp_c	c
ADP	adp_c	c
2-Oxoglutarate	akg_c	c
2-Oxoglutarate	akg_e	e
AMP	amp_c	c
ATP	atp_c	c
Citrate	cit_c	c
CO2	co2_c	c
CO2	co2_e	e
Coenzyme A	coa_c	c
Dihydroxyacetone phosphate	dhap_c	c
D-Erythrose 4-phosphate	e4p_c	c
Ethanol	etoh_c	c
Ethanol	etoh_e	e
D-Fructose 6-phosphate	f6p_c	c
D-Fructose 1,6-bisphosphate	fdp_c	c
Formate	for_c	c
Formate	for_e	e
D-Fructose	fru_e	e
Fumarate	fum_c	c
Fumarate	fum_e	e
Glyceraldehyde 3-phosphate	g3p_c	c
D-Glucose 6-phosphate	g6p_c	c

Nome do metabólito	Identificador	Compartimento¹
D-Glucose	glc__D_e	e
L-Glutamine	gln__L_c	c
L-Glutamine	gln__L_e	e
L-Glutamate	glu__L_c	c
L-Glutamate	glu__L_e	e
Glyoxylate	glx_c	c
H2O	h2o_c	c
H2O	h2o_e	e
H+	h_c	c
H+	h_e	e
Isocitrate	icit_c	c
D-Lactate	lac__D_c	c
D-Lactate	lac__D_e	e
L-Malate	mal__L_c	c
L-Malate	mal__L_e	e
Nicotinamide adenine dinucleotide	nad_c	c
Nicotinamide adenine dinucleotide - reduced	nadh_c	c
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nadp_c	c
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced	nadph_c	c
Ammonium	nh4_c	c
Ammonium	nh4_e	e
O2	o2_c	c
O2	o2_e	e
Oxaloacetate	oaa_c	c
Phosphoenolpyruvate	pep_c	c
Phosphate	pi_c	c
Phosphate	pi_e	e
Pyruvate	pyr_c	c
Pyruvate	pyr_e	e
Ubiquinone-8	q8_c	c
Ubiquinol-8	q8h2_c	c
alpha-D-Ribose 5-phosphate	r5p_c	c
D-Ribulose 5-phosphate	ru5p__D_c	c
Sedoheptulose 7-phosphate	s7p_c	c
Succinate	succ_c	c
Succinate	succ_e	e
Succinyl-CoA	succoa_c	c
D-Xylulose 5-phosphate	xu5p__D_c	c

¹ O compartimento “c” indica que o composto está no espaço intracelular (ou citoplasma), enquanto o compartimento “e” indica que o composto está no espaço extracelular, ou seja, na região exterior à membrana plasmática.

Tabela 8.2 Reações contidas no modelo *E. coli core*, como elas são identificadas e quais metabólitos (com suas respectivas estequiometrias) fazem parte das mesmas.

Nome da reação	ID da reação	Equação
acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)	ACALD	acald_c + coa_c + nad_c <=> accoa_c + h_c + nadh_c
R acetaldehyde reversible - transport	ACALDt	acald_e <=> acald_c
acetate kinase	ACKr	ac_c + atp_c <=> actp_c + adp_c
aconitase (half-reaction A, Citrate hydro-lyase)	ACONTa	cit_c <=> acon_C_c + h2o_c
aconitase (half-reaction B, Isocitrate hydro-lyase)	ACONTb	acon_C_c + h2o_c <=> icit_c
R acetate reversible transport via proton - symport	ACt2r	ac_e + h_e <=> ac_c + h_c
adenylate kinase	ADK1	amp_c + atp_c <=> 2.0 adp_c
2-Oxoglutarate dehydrogenase	AKGDH	akg_c + coa_c + nad_c --> co2_c + nadh_c + succoa_c
R 2 oxoglutarate reversible transport via - symport	AKGt2r	akg_e + h_e <=> akg_c + h_c
alcohol dehydrogenase (ethanol)	ALCD2x	etoh_c + nad_c <=> acald_c + h_c + nadh_c
ATP maintenance requirement	ATPM	atp_c + h2o_c --> adp_c + h_c + pi_c
ATP synthase (four protons for one ATP)	ATPS4r	adp_c + 4.0 h_e + pi_c <=> atp_c + h2o_c + 3.0 h_c
Biomass Objective Function with GAM	Biomass_Ecoli_core	1.496 3pg_c + 3.7478 accoa_c + 59.81 atp_c + 0.361 e4p_c + 0.0709 f6p_c + 0.129 g3p_c + 0.205 g6p_c + 0.2557 gln__L_c + 4.9414 glu__L_c + 59.81 h2o_c + 3.547 nad_c + 13.0279 nadph_c + 1.7867 oaa_c + 0.5191 pep_c + 2.8328 pyr_c + 0.8977 r5p_c --> 59.81 adp_c + 4.1182 akg_c + 3.7478 coa_c + 59.81 h_c + 3.547 nadh_c + 13.0279 nadp_c + 59.81 pi_c
R CO2 transporter via - diffusion	CO2t	co2_e <=> co2_c
citrate synthase	CS	accoa_c + h2o_c + oaa_c --> cit_c + coa_c + h_c
cytochrome oxidase bd (ubiquinol-8: 2 protons)	CYTBD	2.0 h_c + 0.5 o2_c + q8h2_c --> h2o_c + 2.0 h_e + q8_c
R D lactate transport via proton - symport	D_LACt2	h_e + lac__D_e <=> h_c + lac__D_c
enolase	ENO	2pg_c <=> h2o_c + pep_c
ETOHt2r	ETOHt2r	etoh_e + h_e <=> etoh_c + h_c
Acetate exchange	EX_ac_e	ac_e -->
Acetaldehyde exchange	EX_acald_e	acald_e -->
2-Oxoglutarate exchange	EX_akg_e	akg_e -->
CO2 exchange	EX_co2_e	co2_e <=>

Nome da reação	ID da reação	Equação
Ethanol exchange	EX_etoh_e	etoh_e -->
Formate exchange	EX_for_e	for_e -->
D-Fructose exchange	EX_fru_e	fru_e -->
Fumarate exchange	EX_fum_e	fum_e -->
D-Glucose exchange	EX_glc__D_e	glc__D_e <=>
L-Glutamine exchange	EX_gln__L_e	gln__L_e -->
L-Glutamate exchange	EX_glu__L_e	glu__L_e -->
H+ exchange	EX_h_e	h_e <=>
H2O exchange	EX_h2o_e	h2o_e <=>
D-lactate exchange	EX_lac__D_e	lac__D_e -->
L-Malate exchange	EX_mal__L_e	mal__L_e -->
Ammonia exchange	EX_nh4_e	nh4_e <=>
O2 exchange	EX_o2_e	o2_e <=>
Phosphate exchange	EX_pi_e	pi_e <=>
Pyruvate exchange	EX_pyr_e	pyr_e -->
Succinate exchange	EX_succ_e	succ_e -->
fructose-bisphosphate aldolase	FBA	fdp_c <=> dhap_c + g3p_c
fructose-bisphosphatase	FBP	fdp_c + h2o_c --> f6p_c + pi_c
formate transport in via proton symport	FORt2	for_e + h_e --> for_c + h_c
formate transport via diffusion	FORti	for_c --> for_e
fumarate reductase	FRD7	fum_c + q8h2_c --> q8_c + succ_c
R Fructose transport via PEPPyr PTS-f6p - generating	FRUpts2	fru_e + pep_c --> f6p_c + pyr_c
fumarase	FUM	fum_c + h2o_c <=> mal__L_c
R Fumarate transport via proton symport-2 - H	FUMt2_2	fum_e + 2.0 h_e --> fum_c + 2.0 h_c
glucose 6-phosphate dehydrogenase	G6PDH2r	g6p_c + nadp_c <=> 6pgl_c + h_c + nadph_c
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	g3p_c + nad_c + pi_c <=> 13dpg_c + h_c + nadh_c
D-glucose transport via PEP:Pyruvate PTS	GLCpts	glc__D_e + pep_c --> g6p_c + pyr_c

Nome da reação	ID da reação	Equação
glutamine synthetase	GLNS	$atp_c + glu_L_c + nh4_c \rightarrow adp_c + gln_L_c + h_c + pi_c$
GLNabc	GLNabc	$atp_c + gln_L_e + h2o_c \rightarrow adp_c + gln_L_c + h_c + pi_c$
glutamate dehydrogenase (NADP)	GLUDy	$glu_L_c + h2o_c + nadp_c \rightleftharpoons akg_c + h_c + nadph_c + nh4_c$
glutaminase	GLUN	$gln_L_c + h2o_c \rightarrow glu_L_c + nh4_c$
glutamate synthase (NADPH)	GLUSy	$akg_c + gln_L_c + h_c + nadph_c \rightarrow 2.0 glu_L_c + nadp_c$
R L glutamate transport via proton - symport-reversible	GLUt2r	$glu_L_e + h_e \rightleftharpoons glu_L_c + h_c$
phosphogluconate dehydrogenase	GND	$6pgc_c + nadp_c \rightarrow co2_c + nadph_c + ru5p_D_c$
R H2O transport via - diffusion	H2Ot	$h2o_e \rightleftharpoons h2o_c$
isocitrate dehydrogenase (NADP)	ICDHyr	$icit_c + nadp_c \rightleftharpoons akg_c + co2_c + nadph_c$
Isocitrate lyase	ICL	$icit_c \rightarrow glx_c + succ_c$
D-lactate dehydrogenase	LDH_D	$lac_D_c + nad_c \rightleftharpoons h_c + nadh_c + pyr_c$
malate synthase	MALS	$accoa_c + glx_c + h2o_c \rightarrow coa_c + h_c + mal_L_c$
R Malate transport via proton symport-2 - H	MALt2_2	$2.0 h_e + mal_L_e \rightarrow 2.0 h_c + mal_L_c$
malate dehydrogenase	MDH	$mal_L_c + nad_c \rightleftharpoons h_c + nadh_c + oaa_c$
malic enzyme (NAD)	ME1	$mal_L_c + nad_c \rightarrow co2_c + nadh_c + pyr_c$
malic enzyme (NADP)	ME2	$mal_L_c + nadp_c \rightarrow co2_c + nadph_c + pyr_c$
NADH dehydrogenase (ubiquinone-8 & 3 protons)	NADH16	$4.0 h_c + nadh_c + q8_c \rightarrow 3.0 h_e + nad_c + q8h2_c$
NAD transhydrogenase	NADTRHD	$nad_c + nadph_c \rightarrow nadh_c + nadp_c$
R ammonia reversible - transport	NH4t	$nh4_e \rightleftharpoons nh4_c$
R o2 - transport-diffusion	O2t	$o2_e \rightleftharpoons o2_c$
pyruvate dehydrogenase	PDH	$coa_c + nad_c + pyr_c \rightarrow accoa_c + co2_c + nadh_c$
phosphofructokinase	PFK	$atp_c + f6p_c \rightarrow adp_c + fdp_c + h_c$
pyruvate formate lyase	PFL	$coa_c + pyr_c \rightarrow accoa_c + for_c$
glucose-6-phosphate isomerase	PGI	$g6p_c \rightleftharpoons f6p_c$
phosphoglycerate kinase	PGK	$3pg_c + atp_c \rightleftharpoons 13dpg_c + adp_c$
6-phosphogluconolactonase	PGL	$6pgl_c + h2o_c \rightarrow 6pgc_c + h_c$
phosphoglycerate mutase	PGM	$2pg_c \rightleftharpoons 3pg_c$

Nome da reação	ID da reação	Equação
R phosphate reversible transport via - symport	Plt2r	$h_e + pi_e \rightleftharpoons h_c + pi_c$
phosphoenolpyruvate carboxylase	PPC	$co2_c + h2o_c + pep_c \rightarrow h_c + oaa_c + pi_c$
phosphoenolpyruvate carboxykinase	PPCK	$atp_c + oaa_c \rightarrow adp_c + co2_c + pep_c$
phosphoenolpyruvate synthase	PPS	$atp_c + h2o_c + pyr_c \rightarrow amp_c + 2.0 h_c + pep_c + pi_c$
phosphotransacetylase	PTAr	$accoa_c + pi_c \rightleftharpoons actp_c + coa_c$
pyruvate kinase	PYK	$adp_c + h_c + pep_c \rightarrow atp_c + pyr_c$
R pyruvate transport in via proton - symport	PYRt2	$h_e + pyr_e \rightleftharpoons h_c + pyr_c$
ribulose 5-phosphate 3-epimerase	RPE	$ru5p_D_c \rightleftharpoons xu5p_D_c$
ribose-5-phosphate isomerase	RPI	$r5p_c \rightleftharpoons ru5p_D_c$
R succinate transport via proton symport-2 - H	SUCct2_2	$2.0 h_e + succ_e \rightarrow 2.0 h_c + succ_c$
succinate transport out via proton antiport	SUCct3	$h_e + succ_c \rightarrow h_c + succ_e$
succinate dehydrogenase (irreversible)	SUCDi	$q8_c + succ_c \rightarrow fum_c + q8h2_c$
succinyl-CoA synthetase (ADP-forming)	SUCOAS	$atp_c + coa_c + succ_c \rightleftharpoons adp_c + pi_c + succoa_c$
transaldolase	TALA	$g3p_c + s7p_c \rightleftharpoons e4p_c + f6p_c$
R NAD - P-transhydrogenase	THD2	$2.0 h_e + nadh_c + nadp_c \rightarrow 2.0 h_c + nad_c + nadph_c$
transketolase	TKT1	$r5p_c + xu5p_D_c \rightleftharpoons g3p_c + s7p_c$
transketolase	TKT2	$e4p_c + xu5p_D_c \rightleftharpoons f6p_c + g3p_c$
triose-phosphate isomerase	TPI	$dhap_c \rightleftharpoons g3p_c$