

ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS EM *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DE D-XILULOSE COMO FONTE DE CARBONO UTILIZANDO OPTFLUX

I. D. CAVALCANTI-MONTANO¹, C. A. G. SUAREZ¹, R. SOUSA Jr¹, R. C. GIORDANO¹,
E. C. FERREIRA², T. C. ZANGIROLAMI¹ e I. ROCHA²

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

² Universidade do Minho, IBB - Centro de Engenharia Biológica

E-mail para contato: roberto@ufscar.br

RESUMO – A viabilidade econômica da produção de etanol 2G depende da eficiente fermentação da fração hemicelulósica por *S. cerevisiae*. A D-xilulose, isômero da xilose e principal componente da hemicelulose do bagaço, pode ser convertida pela levedura em biomassa, etanol, xilitol ou outros metabólitos. A otimização da produção de etanol requer a análise do metabolismo da xilulose. Modelos metabólicos permitem efetuar simulações de sistemas biológicos, viabilizando o estudo *in silico* das respostas celulares perante perturbações ambientais e genéticas. Uma das técnicas mais usadas para estudos deste tipo é a Análise do Balanço de Fluxos Metabólicos (do inglês, FBA). Neste trabalho, usando o software OptFlux, foi aplicado o método “parcimonious FBA” ao modelo iND750 para estimar os fluxos metabólicos em condições de aerobiose e anaerobiose, utilizando xilulose como fonte de carbono. Os resultados das simulações foram comparados a dados experimentais e o modelo foi ajustado adicionando restrições de expressão em fluxos metabólicos da via pentose fosfato e de formação de biomassa. A produção de etanol só foi observada na condição anaeróbia, com favorecimento da seletividade para baixos fluxos de xilulose.

1. INTRODUÇÃO

Uma abundante e promissora fonte de energia para a obtenção do etanol é a biomassa lignocelulósica. A hidrólise de lignocelulósicos gera majoritariamente glicose e xilose, sendo este último o açúcar mais abundante na hemicelulose. A levedura *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar xilose. No entanto, pode fermentar a xilulose obtida pela isomerização de xilose pela enzima glicose isomerase. Essa fermentação gera etanol e/ou xilitol como produtos principais. A formação de ambos é determinada pelos fluxos metabólicos na rede de reações intracelulares, em particular aquelas que integram as vias de assimilação de pentoses (Via Pentose Fosfato - VPF). O desenvolvimento de um processo para conversão eficiente de xilose/xilulose em etanol/xilitol por *S. cerevisiae* depende do estudo detalhado da assimilação desses açúcares na VPF.

Modelos metabólicos permitem efetuar simulações de sistemas biológicos, viabilizando o estudo *in silico* das respostas celulares perante perturbações ambientais e genéticas. Uma das técnicas mais usadas para o estudo destes modelos é a metodologia de Análise de Balanço de Fluxos Metabólicos (FBA), que tipicamente otimiza a produção de biomassa. Mais

recentemente, foi proposto o método “parcimonious FBA” (pFBA), que trabalha no espaço de soluções ótimas do FBA, selecionando a resposta que minimiza a soma de todos os fluxos. Este método tende a estimar melhor os fluxos metabólicos do microrganismo (Gonçalves *et al.*, 2012). Neste trabalho, o modelo metabólico para *S. cerevisiae* iND750 foi adequado para representar o metabolismo da xilulose. Experiências *in silico* usando o software OptFlux foram realizadas e comparadas com os dados experimentais de cultivos em batelada de *S. cerevisiae*, com o propósito de avaliar/validar o modelo assim como estabelecer relações entre o fluxo de assimilação de xilulose e a seletividade na produção de etanol em relação a xilitol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo metabólico: Para realização das experiências *in silico* foi utilizado o modelo iND750 reconstruído a partir da escala genômica, totalmente compartimentalizado, da levedura *S. cerevisiae*, contando com 750 genes e 1149 reações (Duarte *et al.*, 2004).

Software: foi usado o OptFlux v3.0.3, software modular e de fonte aberta, destinado a apoiar as tarefas da engenharia metabólica *in silico*, permitindo o uso de modelos metabólicos estequiométricos para simulação do fenótipo de organismos de tipo selvagem e mutante, utilizando métodos de pFBA, dentre outros (Rocha *et al.*, 2010).

Dados experimentais: Resultados experimentais foram obtidos no DEQ-UFSCar com uma linhagem de *S. cerevisiae* selvagem adaptada ao crescimento em xilulose. Cultivos em batelada foram realizados em biorreator tipo tanque agitado, com volume de operação de 1 litro, em condições aeróbias e anaeróbias, a 31°C e pH 5,0. Foi utilizado meio mínimo, contendo 5,0 g/L de KH_2PO_4 , 2,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,5 g/L de uréia. A concentração de D-xilulose foi 28 g/L para cultivo aeróbio e 14 g/L para cultivo anaeróbio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Considerando que o modelo original iND750 foi construído para o metabolismo de hexoses, a representação do metabolismo de xilulose exigiu que as seguintes modificações fossem introduzidas: i) inclusão de reação irreversível para o transporte de xilulose do espaço extracelular para o interior da célula; ii) representação da reação de conversão de xilitol em xilulose como reversível; iii) inclusão de duas reações da via L-arabinose para produção de L-arabitol, espécie com capacidade de ser excretada para o meio extracelular.

Para calibrar o modelo na condição de cultivo aeróbio, foram utilizados os fluxos de substratos e metabólitos calculados para as 14h de cultivo (fase exponencial). Já para validação, foram usados os fluxos calculados para as 16h e 22h de cultivo. Foram realizadas experiências *in silico* utilizando o módulo disponível no software OptFlux para sub/sobre expressar as vias metabólicas consideradas chave para o ajuste do modelo metabólico aos dados experimentais. As reações que foram objeto deste estudo foram: (i) formação de biomassa (Biomass_SC4_bal), (ii) formação de xilitol a partir de xilulose (XYLTD_D) e (iii) reação de transporte de xilitol para o espaço extracelular (XYLTt).

A Figura 1a apresenta o comportamento dos metabólitos ao subexpressar a reação Biomass_SC4_bal. Ao diminuir o valor do fluxo de biomassa, observou-se uma queda no valor da mesma, assim como um aumento no valor dos fluxos de xilitol, CO_2 e acetato. O

valor correspondente aos 50% da reação Biomass_SC4_bal foi selecionado por apresentar resultados mais próximos aos dados experimentais. Com a porcentagem do fluxo de biomassa definida, foi realizada a subexpressão da reação XYLTD_D (ver Figura 1b). Os fluxos de xilitol e CO₂ diminuíram e verificou-se um leve aumento no fluxo de biomassa. Foi selecionado o valor correspondente a 30% da reação XYLTD_D por apresentar resultados mais próximos aos dados experimentais. Como as simulações não apresentavam produção de arabitól e sim produção excessiva de xilitol, foi restringida também a reação XYLTD em 80%, de forma a representar melhor os fluxos experimentais de xilitol e arabitól. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos nas simulações de ajuste e validação do modelo modificado em condições de aerobiose. Não houve produção de etanol nesta condição.

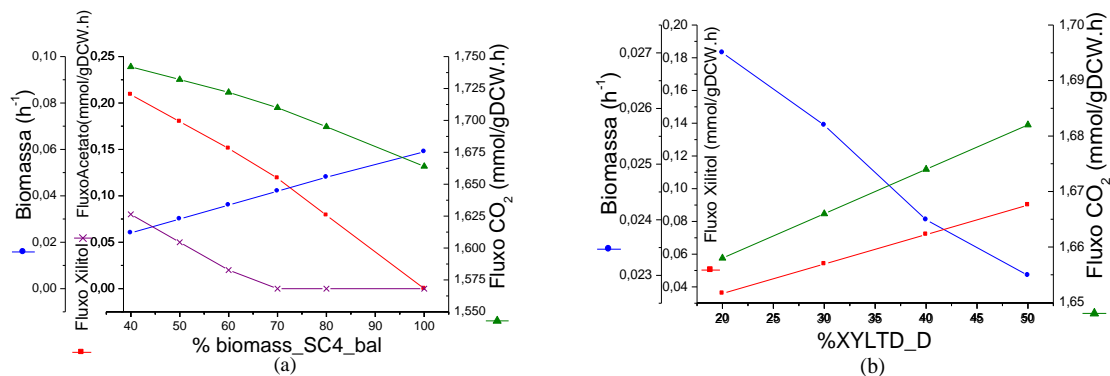


Figura 1 – Comportamento dos metabólitos (aeróbio) ao subexpressar uma via metabólica. (a) Biomass_SC4_bal (biomassa), (b) XYLTD_D (xilitol desidrogenase).

Tabela 1 – Comparação dos fluxos experimentais e simulados (aeróbio).

	AJUSTE (mmol/gDCW.h)		VALIDAÇÃO (mmol/gDCW.h)			
	Experimental (14h)	Simulado	Experimental (16h)	Simulado	Experimental (22h)	Simulado
Biomassa (h⁻¹)	0,024	0,026	0,023	0,025	0,018	0,023
Xilitol	0,04	0,043	0,046	0,044	0,06	0,041
Arabitól	0,009	0,01	0,0085	0,01	0,0074	0,009
Acetato	0,0	0,47	0,0	0,456	0,0	0,417
CO₂	1,64	1,67	1,3	1,61	1,27	1,48
Xilulose	0,74		0,72		0,66	
Uréia	0,1		0,09		0,08	

No caso do experimento anaeróbio, foram utilizados, para ajustar o modelo, os fluxos calculados com os dados obtidos em 9h de cultivo, enquanto que para validação foram usados os fluxos calculados para as 7h e 11h de cultivo. Foi subexpressada a formação de biomassa. Diferente do caso aeróbio, o valor correspondente aos 90% da reação Biomass_SC4_bal foi escolhido pelo fato dos fluxos simulados apresentarem um ajuste melhor aos experimentais.

As validações realizadas com valores de fluxo de xilulose inferiores ao utilizado no ajuste (ou seja, em tempos maiores de cultivo), que apresentaram melhor concordância com os fluxos experimentais. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos. A seletividade em etanol é favorecida com a diminuição do fluxo de xilulose.

Tabela 2 – Comparação de dados experimentais e simulados (anaeróbio).

	AJUSTE (mmol/gDCW.h)		VALIDAÇÃO (mmol/gDCW.h)			
	Experimental (9h)	Simulado	Experimental (7h)	Simulado	Experimental (11h)	Simulado
Biomassa (h⁻¹)	0,0054	0,013	0,0043	0,018	0,0065	0,0088
Etanol	0,93	0,95	0,79	1,27	0,66	0,63
Xilitol	0,27	0,19	0,27	0,24	0,0	0,1
Arabitol	0,18	0,0	0,23	0,0	0,07	0,0
Acetato	0,07	0,05	0,07	0,06	0,04	0,03
CO₂	1,0	1,06	1,3	1,42	0,7	0,7
Succinato	0,0	0,01	0,088	0,002	0,0	0,0
Xilulose	0,88		1,18		0,58	
Uréia	0,025		0,025		0,025	

4. CONCLUSÕES

Com o modelo aeróbio e as restrições impostas aos fluxos de biomassa e xilitol foram obtidos resultados muito próximos aos dados experimentais. Todavia, o modelo aeróbio apresentou produção de acetato, que não foi constatada experimentalmente. Já o modelo anaeróbio, simulado com restrição à formação de biomassa, apresentou boas previsões para os fluxos de etanol, CO₂ e xilitol, embora não tenha previsto a formação de arabitol e tenha sobre-estimado o fluxo de formação de biomassa. Apesar desses problemas, o balanço de carbono nos tempos escolhidos para os cálculos de fluxos utilizados nas simulações em Optflux apresentou uma recuperação de 90%. Experimentos adicionais e análises complementares serão realizados visando confirmar a formação de acetato e arabitol.

5. REFERÊNCIAS

- DUARTE, N.C.; HERRGARD, M.J.; PALSSON, B. Reconstruction and Validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a Fully Compartmentalized Geno-Scale Metabolic Model. *Genome Res*, 14(7), p.1298-1309, 2004.
- GONÇALVES, E.; PEREIRA, R.; ROCHA, I.; ROCHA, M. Optimization Approaches for the In Silico Discovery of Optimal Targets for Gene Over/Underexpression. *Journal of Computational Biology*, v. 19, p. 102-114, 2012.
- ROCHA, I.; MAIA, P.; EVANGELISTA, P.; VILACA, P.; SOARES, S.; PINTO, J. P.; NIELSEN, J.; PATIL, K. R.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, M. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. *BMC Syst Biol*, v. 4, p. 45, 2010.

Os autores agradecem à FCT/Capes, ao CNPq e à FAPESP.