

**Adaptação do modelo metabólico IMM904 de *saccharomyces cerevisiae*
para determinação *in silico* dos fluxos de produção de etanol/xilitol
utilizando xilulose**

**Adaptation of *saccharomyces cerevisiae* metabolic model IMM904 for *in silico*
determination of ethanol/xylitol production flows using xylulose**

DOI:10.34117/bjdv5n9-111

Recebimento dos originais: 20/08/2019

Aceitação para publicação: 17/09/2019

Gabriel Silva De Menezes

Aluno de graduação em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Avenida esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia – GO, Brasil. CEP: 74690-900

E-mail: bootsuporte@hotmail.com

Carlos Alberto Galeano Suarez

Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Avenida esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia – GO, Brasil. CEP: 74690-900

E-mail: carlogalen21@ufg.br

Inti Doraci Cavalcanti Montano

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Avenida esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia – GO, Brasil. CEP: 74690-900

E-mail: inti@ufg.br

RESUMO

A viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração (2G) depende do aproveitamento de todas as frações fermentescíveis presentes (celulose e hemicelulose) em etanol. A D-xilulose, (isômero da xilose, principal componente da hemicelulose), pode ser metabolizada pela levedura *S. cerevisiae* produzindo etanol e/ou xilitol, dependendo das condições de cultivo empregadas. Sendo assim, é fundamental identificar as condições de cultivo que favorecem a produção de etanol. Neste trabalho, usando o software OptFlux, foi aplicado o método “parcimonious FBA” ao modelo metabólico em escala genômica iMM904 que foi modificado neste trabalho para estimar os fluxos metabólicos utilizando xilulose como fonte de carbono. Os resultados mostram que é possível prever os fluxos do etanol com erro de 2%, e xilitol com erro de 18%. Foi constatado que para cada fluxo diferente de xilulose existe alguma condição de oxigênio que favorece a seletividade em etanol.

Palavras-chave: OptFlux, etanol 2G, parcimonious FBA, hemicelulose.

ABSTRACT

The economic viability of the production of second generation (2G) ethanol depends on the utilization of all fermentable fractions present (cellulose and hemicellulose) in ethanol. D-xylulose (xylose isomer, main component of hemicellulose) can be metabolized by *S. cerevisiae* yeast to produce ethanol and / or xylitol, depending on the cultivation conditions employed. Thus, it is essential to identify the cultivation conditions that favor the production of ethanol. In this work, using OptFlux software, the “parcimonious FBA” method was applied to the iMM904 genomic scale metabolic model which was modified in this work to estimate metabolic fluxes using xylulose as carbon source. The results show that it is possible to predict ethanol flows with error of 2%, and xylitol with error of 18%. It was found that for each different xylulose flow there is some oxygen condition that favors the selectivity in ethanol.

Keywords: OptFlux, 2G ethanol, parcimonious FBA, hemicellulose

1. INTRODUÇÃO

O etanol é considerado uma importante fonte de energia alternativa, que contribui para amenizar problemas energéticos e ambientais. Muitos estudos e investimentos estão sendo realizados a fim de melhorar o desempenho da produção de etanol. Neste sentido, a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, conhecido como etanol de segunda geração (2G), vem se destacando por apresentar vantagens ambientais e econômicas. Entretanto, a viabilidade econômica desse processo depende do aproveitamento de todas as frações fermentescíveis presentes nos diferentes materiais lignocelulósicos em estudo, permitindo a conversão tanto da celulose (C6) quanto da hemicelulose (C5) em etanol. Após a etapa de hidrólise desses materiais gera-se, principalmente, glicose e xilose, respectivamente. É importante, portanto, que o microrganismo empregado na produção de etanol 2G seja capaz de metabolizar ambos os açúcares (CHENG et al., 2008). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado na produção indústria de bioetanol. Embora esta levedura não seja capaz de fermentar xilose, pode fermentar seu isômero D-xilulose, produzindo etanol e/ou xilitol, dependendo das condições de cultivo empregadas. Sendo assim, é fundamental identificar as condições de cultivo que favorecem a produção de etanol por *S. cerevisiae*. Neste contexto, este projeto tem como objetivo estudar o metabolismo de D-xilulose por *S. cerevisiae* *in silico*, usando o software OptFlux e o modelo metabólico em escala genômica iMM904, modificado a fim de obter os fluxos metabólicos adequados de fornecimento de substrato e oxigênio que proporcionem o melhor ajuste aos dados experimentais de cultivos de *S. cerevisiae*. O modelo ajustado foi utilizado para obter a melhor condição de operação para

favorecer a seletividade etanol/xilitol.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. MODELO METABÓLICO

Para realização das experiências *in silico* foi utilizado o modelo iMM904 reconstruído a partir da escala genômica, totalmente compartimentalizado, da levedura *S. cerevisiae*, contando com 904 genes e 1.412 reações. Todas as reações foram atribuídas a um dos oito locais celulares (espaço extracelular, citosol, mitocôndria, peroxissoma, núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi ou vacúolo) (MO et al., 2009).

2.2. SOFTWARE

Foi usado o OptFlux v3.3.3, 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 vários métodos, dentre eles o pFBA (parsimonious FBA) que trabalha no espaço de soluções ótimas do FBA, selecionando a resposta que minimiza a soma de todos os fluxos (ROCHA et al., 2010).

2.3. DADOS EXPERIMENTAIS

Dados experimentais foram obtidos por CAVALCANTI-MONTANO, et al. 2013 com uma linhagem de *S. cerevisiae* selvagem adaptada ao crescimento em xilulose. Foi utilizado meio mínimo, contendo 5,0 g/L de KH₂PO₄, 2,0 g/L de MgSO₄.7H₂O, 1,5 g/L de uréia e 14 g/L (cultivo anaeróbio). Os dados experimentais utilizados para cálculo dos fluxos foram considerados durante a fase exponencial (9h de cultivo). Sabemos que é importante usar dados em condições pseudo-estacionárias, no entanto, não foram encontrados na literatura dados de cultivos contínuos ou mesmo em batelada alimentada usando xilulose pura (isenta de glicose e com baixa quantidade de xilose). A realização neste trabalho de experimentos contínuos ou em batelada alimentada utilizando xilulose como substrato torna-se inviável, no momento, pois o preço da xilulose é bastante elevado e a quantidade necessária para os experimentos é grande, considerando que o menor reator disponível no laboratório é de 1L. Porém, verificou-se a ocorrência de prolongada fase exponencial nos cultivos em batelada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O modelo iMM904 foi construído para o metabolismo de hexoses, por tanto, para simulações do metabolismo de xilulose foi necessário fazer a inclusão de algumas reações (ver Figura 1) utilizando o editor de código fonte Notepad++.

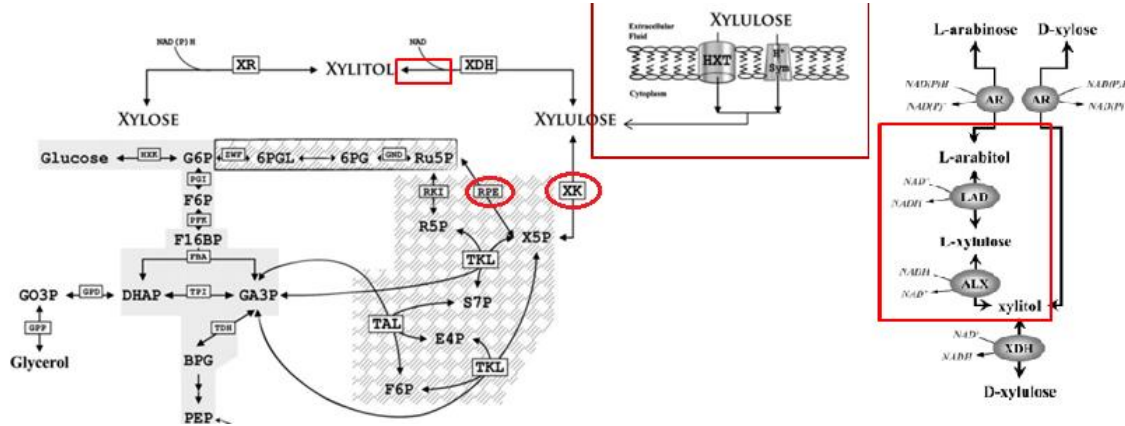


Figura 1 – Modificações do modelo: utilização de xilulose, produção de xilitol, adição da via L-arabinose para produção de L-arabitol (quadrados). Reações subexpressadas para ajuste do modelo metabólico: XK e RPE (círculos).

O “modelo modificado sem ajuste” foi utilizado para realizar experiências *in silico* e os resultados foram comparados com os fluxos metabólicos obtidos experimentalmente (Tabela 1). Pode-se observar que a predição do fluxo da biomassa é bastante acertada (1,85% de erro); os fluxos de CO₂ e etanol foram superiores aos dados experimentais (erro de 38% e 48,4% respectivamente) e os fluxos de xilitol (99,9% de erro) e arabitol estão abaixo dos dados esperados.

Tabela 1 – Comparação de dados experimentais e simulados (anaerobiose). Condições ambientais: xilulose 0,88 mmol/gDCW.h e oxigênio 0,0 mmol/gDCW.h

	AJUSTE (mmol/gDCW.h)		
	Experimental (9h)	Modelo modif. (sem ajuste)	Modelo modif. (ajustado)
Biomassa (h⁻¹)	0,0054	0,0053	0,00083
Xilitol	0,27	0,0001	0,22
Arabitol	0,18	0,0	0,0
CO₂	1,0	1,38	1,06
Etanol	0,93	1,38	0,95

Com o objetivo de calibrar o modelo aos dados experimentais de etanol e xilitol foi realizado um “ajuste” utilizando uma ferramenta de Optflux para sub/sobre expressão de reações. As reações modificadas foram: subexpressão da reação de formação de xilulose 5 fosfato (XK) em 80% e subexpressão da reação de formação de ribulose 5 fosfato a partir de xilulose 5 fosfato (RPE) em 50% (ver Figura 1). Na Tabela 1 são apresentados os valores simulados do “modelo modificado ajustado”. Observou-se que os valores de CO₂/etanol/xilitol ficaram mais próximos aos experimentais obtendo erros de 6 /2,15 /18 (%) respectivamente. Para produção de etanol 2G é fundamental identificar as condições de cultivo que favorecem a produção de etanol. Neste contexto, foi realizado um estudo *in silico* testando vários níveis de xilulose e oxigênio com o intuito de encontrar as melhores condições que favoreçam a seletividade para o etanol. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nas simulações de limitação de oxigênio utilizando os modelos ajustados. Para valores de oxigênio em torno de 0,05 mmol/gDW.h e xilulose de 0,78 mmol/gDW.h houve diminuição do fluxo de xilitol, sem afetar significativamente a produção de etanol, favorecendo a seletividade em etanol.

Tabela 2 – Simulações com vários níveis de oxigênio e xilulose para modelo ajustado (em mmol/gDCW.h)

ENTRADAS		RESPOSTAS			
Fonte de C	O ₂	Biomassa	EtOH	Xilitol	Seletividade EtOH/Xil
Xilu(-1,18)	-0,25	0,014	1,28	0,23	5,57
	-0,1	0,009	1,39	0,23	6,04
	-0,05	0,007	1,36	0,27	5,04
Xilu (-0,88)	-0,25	0,009	0,95	0,18	5,28
	-0,1	0,005	1,05	0,18	5,83
	-0,05	0,003	1,07	0,18	5,94
Xilu (-0,78)	-0,25	0,001	0,84	0,15	5,6
	-0,1	0,003	0,94	0,16	5,9
	-0,05	0,001	0,97	0,16	6,1

4. CONCLUSÕES

Com o modelo anaeróbio e as modificações impostas (modelo ajustado) foram obtidos valores de etanol e xilitol muito próximos aos dados experimentais. Todavia, o modelo anaeróbio não apresentou produção de arabitól, que foi constatada experimentalmente e a taxa de biomassa caiu consideravelmente. Variações no oxigênio disponível no começo das

simulações apresentaram importantes variações na seletividade para etanol, valendo a pena ressaltar que a condição de oxigênio que poderíamos chamar de “ótima” muda com o fluxo de xilulose disponível.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo No 427572/2016-9).

REFERÊNCIAS

CAVALCANTI-MONTANO ID, SUAREZ CAG, SOUSA RJr, GIORDANO RC, FERREIRA EC, ZANGIROLAMI TC e ROCHA I, Análise dos fluxos metabólicos em *saccharomyces cerevisiae* a partir de d-xilulose como fonte de carbono utilizando Optflux. *XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)*, 2013.

CHENG, K. K.; CAI, B. Y.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOU, Y. J.; GE, J. P.; XU, J. M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 105–109, 2008.

MO ML, PALSSON BØ, HERRGÅRD MJ, Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. *BMC Systems Biology*, v. 3, n. 1, 2009.

ROCHA I, MAIA P, EVANGELISTA P, VILACA P, SOARES S, PINTO JP, NIELSEN J, PATIL KR, FERREIRA EC, ROCHA M, OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. *BMC Syst Biol*, v. 4, p. 45, 2010.

Os autores agradecem ao CNPq (Processo 427572/2016-9).