

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO *IN SILICO* DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR
SACCHAROMYCES CEREVISIAE A PARTIR DE MATERIAL
HEMICELULÓSICO**

Ariane Swelen Dalsico Silva

Trabalho de Graduação apresentado ao
Departamento de Engenharia Química da
Universidade Federal de São Carlos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Alice Medeiros de Lima

São Carlos – SP

2020

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Alice Medeiros de Lima, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Convidado: Prof. Dr. Adilson José da Silva, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Professora da Disciplina: Prof.^a Dr.^a. Rosineide Gomes da Silva Cruz, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Trabalho de Graduação apresentado no dia 18 de dezembro de 2020 perante a seguinte banca examinadora:

Dedico este trabalho a minha
família e a todos que me ajudaram
ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as oportunidades que colocou em meu caminho.

Aos meus pais, Adriana e Sandro, por todo suporte, amor, carinho, ajuda e preocupação ao longo desses 5 anos de graduação.

Às minhas irmãs Isa e Duda, por todo carinho, amor, incentivo, ajuda e conforto que me deram nos momentos mais difíceis e nos que estive tão distante.

À minha família, em especial, minhas tias, que sempre estiveram presentes na minha vida em todos os momentos, difíceis ou não.

A todos os meus professores, por todos os ensinamentos e, em especial, a minha orientadora Alice e professor Adilson, por toda atenção, dedicação e confiança depositadas em mim.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram ao longo dessa jornada árdua, mas valiosa e desafiadora.

RESUMO

Os materiais lignocelulósicos compreendem resíduos sólidos urbanos, industriais, agrícolas e madeiras que são alvos de várias pesquisas com o objetivo de produzir diversos produtos de maior valor agregado. Sua composição contém uma fração hemicelulósica que ao passar por um pré-tratamento gera açúcares fermentescíveis como a D-xilose que por ação de um microrganismo pode ser convertida em xilitol. Por sua vez, o xilitol é um poliálcool com aplicações na indústria de alimentos e bebidas, na medicina e odontologia, e sua obtenção pela via bioquímica ainda é um desafio. Dentre os microrganismos capazes de produzir xilitol, as leveduras das linhagens dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces* são algumas das mais estudadas. Assim, neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in silico*, utilizando alguns métodos de otimização disponíveis no *software opensource* OptFlux, as modificações genéticas com potencial de aumentar a produção de xilitol a partir de material hemicelulósico no metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual possui um favorável banco de dados e que já é utilizada industrialmente na obtenção de etanol. A maior produção de xilitol foi de 11,96 mmol/gDCW/h obtida com apenas 5 modificações no modelo metabólico da levedura, das quais quatro reações presentes na via da Glicólise foram deletadas e uma reação presente na via de interconversões da Pentose e Glucuronato, a qual contém o metabólito alvo xilitol, foi sub expressada.

Palavras-chave: xilitol. estudo *in silico*. métodos de otimização. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials comprise solid urban, industrial, agricultural and wood residues that are the target of several researches with the objective of producing several products with higher added value. Its composition contains a hemicellulosic fraction that when undergoing a pre-treatment generates fermentable sugars such as D-xylose which, by the action of a microorganism, can be converted into xylitol. In turn, xylitol is a polyalcohol with applications in the food and beverage industry, in medicine and dentistry, and obtaining it biochemically is still a challenge. Among the microorganisms capable of producing xylitol, yeasts from the strains of the genera *Candida*, *Pichia* and *Saccharomyces* are some of the most studied. Thus, in this context, the objective of this work was to evaluate *in silico*, using some optimization methods available in the opensource software OptFlux, the genetic modifications with the potential to increase the production of xylitol from hemicellulosic material in the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which has a favorable database and is already used industrially to obtain ethanol. The highest production of xylitol was 11.96 mmol/gDCW/h obtained with only 5 changes in the metabolic model of yeast, of which four reactions present in the Glycolysis pathway were deleted and one reaction present in the Pentose and Glucuronate interconversions pathway, which contains the target metabolite xylitol, was under-expressed.

Keywords: xylitol. *in silico* study. optimization methods. *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA.....	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Xilitol: Classificação, aplicações, produção e mercado.....	2
2.2 Processos biológicos e seus desafios.....	4
2.3 Metabolismo celular.....	5
2.4 Ferramentas computacionais utilizadas em Engenharia Metabólica.....	8
2.4.1 <i>Software open source</i> OptFlux.....	9
2.5 Dados obtidos na literatura sobre a produção de xilitol em leveduras geneticamente modificadas.....	11
3 METODOLOGIA.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXO A – Códigos implementados no modelo da levedura.....	30
ANEXO B - Guia para otimização no <i>software</i> OptFlux.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras.....	6
Figura 2.2 -	Interconversões da Pentose e Glucuronato da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 3.1 -	Exemplo do emprego de métodos de otimização na geração de redes metabólicas que expressem o fenótipo desejado; (a) Metabolismo do microrganismo original e (b) Metabolismo otimizado para produção de P1.....	15
Figura 4.1 -	Análise da variabilidade do fluxo (FVA) de produto (xilitol) em função do fluxo da biomassa (com condição ambiental).....	16
Figura 4.2 -	Representação das principais vias que englobam as reações estudadas (Via da Glicólise e Interconversões da Pentose e Glucuronato).....	22

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Otimizações para o modelo simplificado.....	17
Tabela 4.2 -	Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações inativas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT EA RK MOMA BPCY X20 G4 O20.....	18
Tabela 4.3 -	Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações reguladas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT EA RUO MOMA BPCY X20 G4 O20.....	18
Tabela 4.4 -	Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações reguladas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT SA ROU MOMA BPCY X20 G4 O20.....	19
Tabela 4.5 -	Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações reguladas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT SA ROU MOMA YIELD X20 G4 O20.....	19

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 -	Sigla no OptFlux, nome, número E.C. e função de cada reação se for inativada (RK) ou sub/super expressada (ROU) no metabolismo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Quadro 4.2 -	Fluxos de consumo e de produção da simulação RK R_ALCD2x, RK R_ENO, RK R_HEX1, RK R_PYRDC, ROU R_XYLK (0,5).....	21

1 INTRODUÇÃO

O xilitol ($C_5H_{12}O_5$), é um poliálcool de cinco carbonos presente em diversas frutas, vegetais, cogumelos, líquens e leveduras. Apresenta uma vasta aplicação nas indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos, além de aplicações médicas e odontológicas. Amplamente conhecido por sua capacidade adoçante, superior à da sacarose, é atualmente o adoçante artificial mais utilizado pela indústria de confeitaria. Em larga escala, esse poliol é produzido pela hidrogenação catalítica da xilose disponível nos hidrolisados lignocelulósicos, e as soluções obtidas seguem para etapas de purificação bastante onerosas para obter o xilitol puro (TAMANINI, *et al.*, 2004). Outra alternativa de se obter xilitol é a partir de um processo biotecnológico, o qual tem como matéria-prima uma porção hemicelulósica rica em xilose e utiliza microrganismos ou enzimas capazes de produzir xilitol. Embora esse processo seja consideravelmente mais barato, quando comparado ao processo químico, a sensibilidade das leveduras utilizadas aos compostos da matéria-prima e a produção em escalas reduzidas são desvantagens consideráveis.

A busca pela produção de xilitol pela via biotecnológica tem sido motivada pela possibilidade de usar condições amenas de pressão e temperatura, pelo uso de xilose impura, e pela ausência de formação de resíduos tóxicos que precisariam ser removidos nas etapas de separação (CUNHA, *et al.*, 2005). Além disso, o crescente interesse comercial e científico no xilitol levou a uma forte demanda por esse produto no mercado global, de mais de 125.000 toneladas por ano, com um valor que é relativamente alto (4,5 – 5,5 \$/ kg para compra a granel por indústrias ou 20 \$/kg em supermercados) fazendo sua proposta atraente para a comercialização (RAVELLA, *et al.*, 2012).

Ainda é um desafio encontrar um processo biológico capaz de produzir xilitol a taxas que apresentem viabilidade técnica e econômica. Por isso, este trabalho teve por objetivo encontrar as vias de utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (amplamente empregada para produção de etanol a partir de hexoses) para produção do xilitol a partir de resíduos hemicelulósicos, uma matéria-prima abundante e não dispendiosa. O estudo envolveu a aplicação de alguns métodos de otimização no modelo do metabolismo da levedura em escala genômica, por meio de um *software* de código aberto, o OptFlux 3.4. Análises adicionais também foram executadas para verificação da influência das modificações genéticas sugeridas pelo método no metabolismo da levedura e na produtividade de xilitol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O xilitol é um produto de alto valor agregado no mercado e de interesse industrial, por isso, pesquisas são realizadas para encontrar um processo biológico eficaz e competitivo para sua produção, visando amenizar condições operacionais e buscando novas alternativas de matérias-primas. Ao longo deste capítulo serão apresentados os principais pontos e o estado da arte relacionados à produção do xilitol por via bioquímica.

2.1 Xilitol: Classificação, aplicações, produção e mercado

O xilitol é classificado pela FDA (*Food and Drug Administration*) como um aditivo do tipo GRAS (*Generally Regarded as Safe*), indicando que o consumo é permitido para atingir o adoçamento necessário; e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como *quantum satis*, podendo ser empregado na quantidade necessária para obter o efeito tecnológico desejado desde que não altere a identidade e a genuinidade do produto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Na indústria de alimentos e bebidas, devido à sua elevada estabilidade química e microbiológica, o xilitol atua, mesmo em baixas concentrações, como conservante de produtos alimentícios, oferecendo resistência ao crescimento de microrganismos e prolongando a durabilidade desses (MUSSATTO, 2012). Além disso, devido à ausência de grupos aldeídos e cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações com aminoácidos (reações de Maillard) responsáveis pelo escurecimento e diminuição do valor nutricional das proteínas, possibilitando seu uso em produtos nos quais essas reações são indesejáveis. Outra propriedade de interesse industrial é seu elevado calor de solução endotérmico (34,8 cal/g), que faz com que o xilitol produza um agradável efeito refrescante na boca quando entra em contato com a saliva, realçando o efeito refrescante de produtos com sabor de menta, como balas e gomas de mascar (MUSSATTO, 2012).

Na indústria farmacêutica, o xilitol pode ser empregado como adoçante ou excipiente na formulação de xaropes, tônicos e vitaminas. Devido aos seus efeitos prebióticos, pode reduzir os níveis de glicose, triglicérides e colesterol no sangue (UR-REHMAN *et al.*, 2015). Park *et al.* (2015) reportaram que o xilitol tem potencial para uso em terapia contra o câncer de pulmão, inibindo a proliferação celular e induzindo a autofagia

das células. Trachootham *et al.* (2017) sugerem que o xilitol apresenta atividade anticancerígena seletiva em células de câncer bucal.

Os processos de produção de xilitol a partir de xilose podem ser químicos ou biológicos. Como mencionado anteriormente, em larga escala, o xilitol é produzido por meio de um processo químico que hidrogena a xilose na presença de catalisador. As condições operacionais desse processo são temperaturas entre 80-140°C e pressão acima de 50 atm (HALLBORN, *et al.*, 1994). Embora ainda se utilize esse processo, trata-se de uma produção não ecológica e com elevado custo de produção por demandar muita energia na etapa de hidrogenação da xilose. Além disso, esse processo requer etapas caras de separação e purificação, tanto para a xilose antes de ser hidrogenada quanto para os subprodutos formados.

Em relação ao processo biológico, estratégias são estudadas para utilizar vários microrganismos ou suas enzimas na produção de xilitol a partir de hemicelulose. Algumas espécies microbianas têm potencial para utilizar a xilose como fonte de carbono e converter em xilitol. Por outro lado, as leveduras produzem o xilitol durante o metabolismo da D-xilose. A xilose redutase requer a coenzima NADPH ou NADH para oxidar xilose a xilitol, ao passo que a xilitol desidrogenase requer a coenzima NAD⁺ para reduzir xilitol a xilulose. A desproporção entre estes cofatores resulta na excreção de xilitol como um subproduto da fermentação da xilose. Essa fermentação pode ser operada sob condições mais amenas e pode atingir rendimentos mais elevados (MATHEW, *et al.* 2018).

Uma dentre as matérias-primas que contém hemicelulose é o material lignocelulósico, definido como um polímero de carboidratos complexos, formados por: celulose (C₆H₁₀O₅)_x, hemicelulose (C₅H₈O₄)_m e lignina (C₉H₁₀O₃(OCH₃))_n (BALAT, 2011). Essa matéria compreende resíduos agrícolas, madeiras, resíduos sólidos urbanos e industriais, e apesar de muitas vezes serem descartados de forma errada, esses resíduos podem ser reutilizados quase sempre através de processos de bioconversão que são capazes de transforma-los em matérias-primas para produções secundárias, ou até mesmo em subprodutos que poderão fornecer energia.

Atualmente, a parcela de resíduos gerada é muito significativa, pois a demanda da produção de bens de consumo vem se tornando cada dia maior, devido ao aumento da população mundial que requer mais alimentos para a sua sobrevivência. Por isso, muitas pesquisas são realizadas sobre esses materiais com o objetivo de aumentar a produção de energia, produtos químicos e alimentos, uma vez que o completo aproveitamento deste material evitaria o aumento da área plantada. Um dos grandes desafios para a aplicação

destes materiais por processos bioquímicos é encontrar microrganismos capazes de processar e produzir os compostos de interesse em taxas que sejam viáveis técnica e economicamente.

Um relatório publicado em 2017 pela Industry Experts, intitulado Xilitol – Uma Visão Geral do Mercado Global (*Xylitol – A Global Market Overview*), apresenta análises sobre o consumo e produção de xilitol no mundo para o período de 2014-2022. O mercado global de xilitol para o ano de 2016 foi estimado em 190,9 mil toneladas métricas, avaliadas em US \$ 725,9 milhões, sendo a previsão até 2022 estimada em 266,5 mil toneladas métricas, avaliadas, em aproximadamente, US \$ 1 bilhão. Acredita-se que esse crescente aumento está impulsionado pela busca dos consumidores por produtos mais saudáveis, sem adição de açúcar e com baixas calorias. Para mais, o relatório apresenta as quatro regiões que segmentam o mercado global de xilitol, sendo elas América do Norte, Europa, Ásia-Pacífico e o resto do mundo. Em relação as empresas produtoras, com três fábricas nos EUA, China e Finlândia, a DuPont Danisco é a empresa líder global na produção de xilitol, além de possuir uma fábrica na Áustria responsável por produzir a xilose, principal matéria-prima do xilitol.

Segundo Mathew, *et al.* (2018), atualmente, o país que mais produz xilitol no mundo é a China, com preço por tonelada variando de US\$ 6.000 a 7.000. A demanda global tem como principais consumidores os Estados Unidos (30%) e a Europa Ocidental (37%). O mercado de xilitol vem apresentando taxas de crescimento anual de cerca de 5%, e por isso evidencia-se a grande necessidade de otimizar e reduzir os custos de produção de xilitol, sendo esse o principal desafio.

2.2 Processos biológicos e seus desafios

Bioprocessos são inerentemente sensíveis às flutuações das condições de processos e necessitam ser rigidamente regulados para manter a produtividade. Várias questões se apresentam como desafios para a indústria biotecnológica hoje, incluindo os aspectos de purificação e estabilização, rendimentos, contaminação, desenvolvimento e *scaleup* de processos.

Historicamente, o controle de processos com culturas de células baseia-se em modelos empíricos com as células tratadas como modelos do tipo "caixa preta". Modelos empíricos puramente descritivos baseados nas medidas da concentração de biomassa e alguns poucos compostos extracelulares, que ignoram completamente a estrutura

intracelular, vem sendo amplamente utilizados na otimização e controle de bioprocessos (ISIDRO, *et al.*, 2013).

O entendimento da interação molecular entre os componentes extra e intracelulares é essencial para projetar o ambiente das células de forma mais eficiente, nomeadamente para otimização da composição do meio de cultura e para desenvolvimento de estratégias de monitoramento e controle que possuem como alvo variáveis de controle intracelular. As redes metabólicas podem ser utilizadas para interpretar dados do *footprinting* metabólico, e para estudar as possibilidades de manipulação do ambiente extracelular para controlar os processos intracelulares (TEIXEIRA, *et al.*, 2011).

De acordo com Garnier (2014), um dos grandes desafios da engenharia química é a aplicação de estratégias de simulação e controle aos vários níveis hierárquicos de sistemas biológicos, desde DNA, RNA, células, tecidos e órgãos até o corpo humano para melhoria da qualidade de vida de pessoas portadoras de distúrbios genéticos. Além da modelagem de sistemas biológicos ser uma tarefa complexa, outro fator que dificulta tal trabalho é a disponibilidade de dados físico-químicos, termodinâmicos e cinéticos de tais sistemas, essenciais para modelagem dos fenômenos envolvidos.

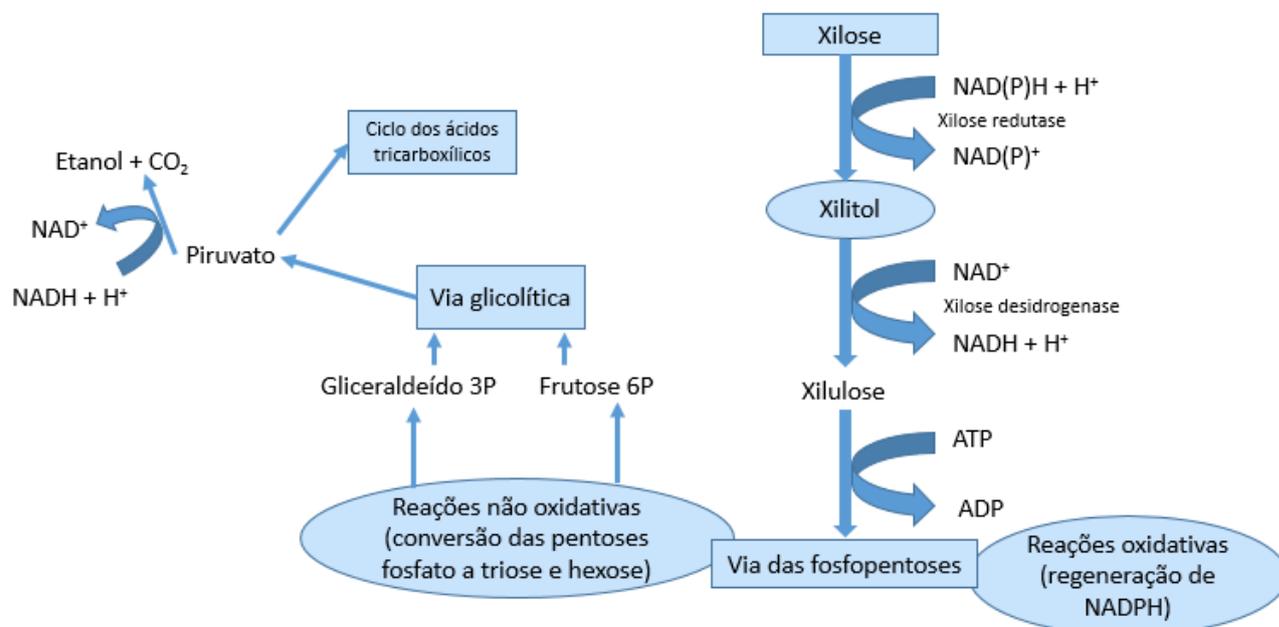
Segundo Charpentier (2002), o futuro da engenharia química requer uma abordagem multidisciplinar e multiescalar para o desenvolvimento e implementação de tecnologias desde a escala molecular até a produção em grande escala, e deve estar apoiada no tripé "processo molecular - produto - processo". Para tanto, o autor afirma a necessidade e indispensabilidade da utilização de algumas ferramentas divididas em três áreas: modelagem molecular, instrumentação científica e técnicas de medição não-invasivas, poderosas ferramentas e capacidades computacionais. Essa mesma necessidade é apontada como desafio e oportunidade para o futuro em Council (2003), onde vários outros desafios da química e engenharia química na fronteira molecular são apontados.

2.3 Metabolismo celular

O metabolismo é o conjunto de todos os processos químicos que ocorrem dentro de uma célula. As redes metabólicas contêm informações críticas a respeito da interação entre as fases extra e intracelulares, o que é essencial para o projeto de estratégias de controle avançadas. No contexto de controle de bioprocessos, é particularmente relevante analisar como as redes metabólicas interagem com o ambiente extracelular. Mesmo para organismos simples, a quantidade de processos químicos possíveis é grande, o que dificulta o tratamento

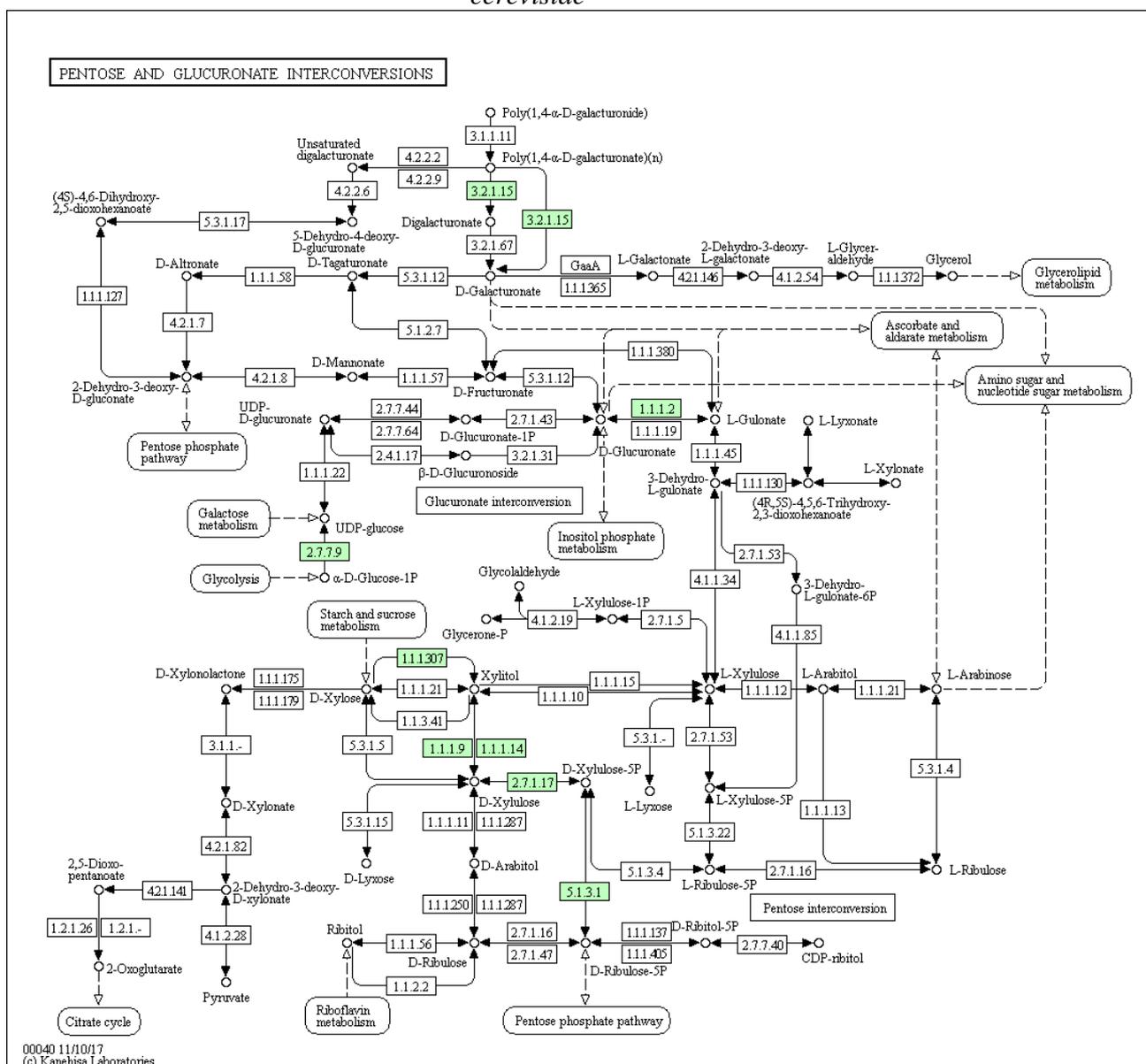
do sistema em nível molecular, dado a complexidade do contexto. Como exemplo, a Figura 2.1 mostra o esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras e a Figura 2.2 mostra as interconversões da pentose e glucuronato da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo apenas uma pequena parte do metabolismo do microrganismo.

Figura 2.1 – Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras



Fonte: Adaptado de Tamanini, *et al.* (2004).

Figura 2.2 – Interconversões da Pentose e Glucuronato da levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Retirado de Kegg Pathway: "Pentose and glucuronate interconversions - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast)", [S.d.].

2.4 Ferramentas computacionais utilizadas em Engenharia Metabólica

Em meados da década de 90, com o desenvolvimento das técnicas de recombinação do DNA, iniciou-se os estudos para obtenção de organismos geneticamente modificados, originando o campo da engenharia metabólica. O objetivo desse campo é obter células que gerem altos rendimentos do metabólito alvo, e por isso, diversas ferramentas foram desenvolvidas para direcionar os esforços experimentais a partir das quantificações dos fluxos intracelulares, dando vez para os modelos *grey box* em detrimento do conhecido modelo *black box* (MENDES, *et al.*, 2014).

Ferramentas computacionais são utilizadas na engenharia metabólica com o objetivo de extrair e interpretar informações relevantes de um enorme conjunto de dados, tornando modelos metabólicos complexos mais gerenciáveis e possibilitando o desenvolvimento de estratégias de design de rede eficientes. Copeland, *et al.* (2012), realizaram uma revisão de diversas ferramentas desenvolvidas e que são utilizadas em múltiplas áreas relevantes da engenharia metabólica. Essas áreas foram divididas em 7, sendo elas: 1) Esforços de reconstrução metabólica; 2) Rede de visualização; 3) Ácido nucleico e engenharia de proteínas; 4) Análise de fluxo metabólico; 5) Prospecção de vias; 6) Análise de rede pós-estrutural; e 7) Otimização de cultura.

Copeland, *et al.* (2012), explicam detalhadamente cada uma dessas áreas, pontuando as dificuldades, os avanços e as principais ferramentas computacionais criadas ao longo dos últimos anos. Baseado nessa revisão, aborda-se brevemente os princípios de cada área e as principais ferramentas envolvidas.

Iniciando pela área de Esforços de reconstrução metabólica, que tem como princípio descrever a identidade e a função de cada constituinte envolvido no metabolismo do organismo através da união de dados metabólicos e genômicos, tem-se que as principais ferramentas desenvolvidas foram: BLAST (método de alinhamento de sequência, *opensource*); KAAS e PathoLogic (ambos são *softwares*). Essas ferramentas utilizam conjuntamente informações contidas em banco de dados como o KEGG ou BioCyc, auxiliando na geração de uma lista de genes ortólogos preditos. Outras ferramentas também criadas foram: Model SEED; SBML (Linguagem de Marcação de Sistemas Biológicos - do inglês, *Systems Biology Markup Language*-); Gene Ontology (GO); Sequence Ontology (SO), KEGG PATHWAY; MetaCyc; MetRxn; Biochemical, Genetic and Genomic knowledgebase (BiGG), entre outros.

A área de Rede de visualização tem como princípio permitir pesquisas que auxiliem a intuição humana a identificar combinações que não são detectáveis pelos algoritmos computacionais. As principais ferramentas utilizadas são: Cytoscape; GraphViz e Systrip, mas existem outras ferramentas também como: Arcadia; CellNetAnalyzer; JDesigner; CellDesigner; Cell Illustrator, entre outros.

A terceira área, Ácido nucleico e engenharia de proteínas tem como princípio implementar modificações que requerem manipulação direta nas moléculas biológicas. TinkerCell, GenoCAD, VectorNTI, DNASTar Lasergene, são algumas das ferramentas aplicadas nessa área.

A quarta área, Análise de fluxo metabólico (do inglês, *Metabolic flux analysis* - MFA), tem como principal objetivo maximizar a produção celular de um composto de interesse, por meio do estudo e determinação dos fluxos metabólicos *in vivo*. As análises são realizadas conjuntamente com métodos de restrições conhecidos como FBA, MOMA e ROOM, que auxiliam na obtenção das manipulações necessárias para alcançar o fenótipo desejado. Esses métodos serão melhor abordados posteriormente. As principais ferramentas utilizadas nessa área são: o COBRA (caixa de ferramentas para o Matlab) e o OptFlux, plataformas implementadas com procedimentos baseados em restrições, as quais auxiliam na sugestão de estratégias de deleções de genes e reações para otimizar a produção do metabólito de interesse. Outras ferramentas também apresentadas são: FASIMU, Systems Biology Research Toolbox, entre outros.

A quinta área, Prospecção de vias, visa métodos que automatizam o caminho de prospecção, aumentando a praticidade e a comparação de reações bioquímicas obtidas de diferentes bancos de dados. As ferramentas mencionadas são Integrated Microbial Genomes (IMG) e OptStrain. A sexta área, Análise de rede pós-estrutural, visa análises da rede metabólica usando abordagem dinâmica para entender a engenharia metabólica. COPASI, PysCeS e Systems Biology Workbench são as ferramentas mencionadas.

Por último, a sétima área, Otimização da cultura, visa melhorar as condições ambientais do meio de cultura para obter o máximo rendimento do produto de interesse. GrowMatch e BioMet Toolbox, são as ferramentas apresentadas.

2.4.1 Software open source: OptFlux

Como visto, diversas ferramentas computacionais foram criadas para realizar análises de fluxo metabólico, por meio de simulações no fenótipo de microrganismos sob diferentes condições ambientais e genéticas, servindo como apoio para descobertas que

atendessem objetivos industriais. Entretanto, os métodos envolvidos nas análises ficaram por muitos anos restritos a uma certa classe de especialistas da área (ROCHA, *et al.*, 2010).

Em 2010, surge o *software* OptFlux, lançado como o primeiro *software* de código aberto, modular e de plataforma amigável, contendo os principais métodos que auxiliam as tarefas da engenharia metabólica *in silico* (VILAÇA, *et al.*, 2018), reconhecido também como a primeira ferramenta a incorporar otimização, por meio de algoritmos evolucionários/metaheurísticos ou utilizando o algoritmo chamado OptKnock (ROCHA, *et al.*, 2010).

Copeland, *et al.*, 2012, afirmam que o OptFlux possui uma particular vantagem em relação a sua interface, pois permite flexibilidade para especificar os objetivos biológicos e de produção, quando comparado a outras ferramentas como o COBRA. Sobre o algoritmo OptKnock, implementado para realizar uma longa procura a fim de encontrar a melhor estratégia em relação a seleção de genes ou reações no metabolismo, os autores reportam que tem demonstrado bons resultados em relação a produtividade na prática quando comparado a aplicação de métodos heurísticos. Porém, esse algoritmo também apresenta algumas dificuldades de eficiência computacional que podem ser contornadas parcialmente com a simplificação do modelo metabólico.

O OptFlux permite ao usuário carregar modelos metabólicos estequiométricos de um dado organismo que servirá de base para simulações de fenótipo de tipo selvagem e organismos mutantes. As simulações para determinar os fluxos metabólicos a uma dada condição ambiental podem ser conduzidas por diferentes abordagens através da utilização de métodos como: Análise de Equilíbrio de Fluxo (do inglês, *Flux-Balance Analysis*), Minimização do Ajuste Metabólico ou Minimização Regulatória On/Off (do inglês, *Metabolic Adjustment or Regulatory On/Off Minimization*).

Os métodos de otimização disponíveis no *software* são diversos, como Algoritmos de Evolução - EA (do inglês, *Evolutionary Algorithms*) ou Recozimento Simulado (do inglês, *Simulated Annealing*), que serão aplicados para alcançar as melhores deleções ou sub/super expressões para dada função objetivo, que sempre está relacionada a um objetivo industrial. Esses dois métodos meta-heurísticos, em específico, são capazes de fornecer soluções quase completas em um tempo de computação razoável, além de serem flexíveis entre as funções objetivo (como exemplo, funções não lineares). Além disso, o *software* tem implementado a análise de rotas essenciais através do cálculo dos Modos de Fluxo Elementar (do inglês, *Elementary Flux Modes*) e também contém vários métodos de simplificação dos

modelos e operações de pré-processamento que, segundo Rocha, *et al.*, (2010), reduzem o espaço de busca auxiliando os algoritmos de otimização.

Em relação ao formato de arquivo, o OptFlux suporta a importação/exportação para vários formatos, além de também ser compatível com o padrão SBML. Sobre ferramentas de visualização, esse *software* conta com um módulo de visualização que permite a análise da estrutura do modelo, sendo compatível com o layout de informações da ferramenta CellDesigner, possibilitando sobreposição dos resultados das simulações com gráficos do modelo (ROCHA, *et al.*, 2010).

No geral, o OptFlux é um dos melhores *softwares* de código aberto disponíveis gratuitamente, pois naturalmente incita a contribuição de pesquisadores e especialistas da área, além de servir, segundo Rocha, *et al.*, (2010), como uma ponte entre as pesquisas com algoritmos de otimização de deformação e os usuários finais, por meio de sua interface amigável.

2.5 Dados obtidos na literatura sobre a produção de xilitol em leveduras geneticamente modificadas

Altos rendimentos de xilitol são difíceis de obter por meio da fermentação natural de xilose pelas leveduras, pois uma parte do xilitol produzido é posteriormente empregada no metabolismo para crescimento celular, manutenção e redução de cofatores (HALLBORN, *et al.*, 1994). Por esse motivo, muitos estudos são realizados com o objetivo de modificar geneticamente microrganismos para atingir maiores rendimentos.

Hallborn, *et al.*, (1991), realizou um estudo sobre a produção de xilitol a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. O gene que codifica a xilose redutase (XLY1) foi transferido da levedura *Pichia stipitis* CBS 6054 para a *Saccharomyces cerevisiae*. A produtividade específica de xilitol obtida na fermentação realizada em batelada, sendo a glicose o substrato base e uma solução de xilose-glicose (19:1) como alimento, foi de 0,08 g/g de células/hora e o rendimento obtido foi de mais de 95%. Segundo os autores, rendimentos de xilitol próximos de 100% são possíveis de obter em condições aeróbicas com a levedura recombinante, pois o alto valor da constante de equilíbrio termodinâmico entre a xilose e o xilitol favorece a produção de xilitol.

Handumrongkul, *et al.*, (1998), clonaram o gene que codifica a xilose redutase (xyl1) da levedura *Candida guilliermondii* ATCC 20118 e expressaram na levedura *Pichia*

pastoris. Como resultado, sob condições aeróbias, foi possível produzir o máximo de 7,8 g/L de xilitol.

Lee, *et al.*, (2000), expressaram o gene que codifica a xilose redutase da levedura *Pichia stipitis* na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A cepa recombinante pôde produzir 0,95 g de xilitol a cada 1 g de xilose, com uma concentração de xilitol de até 21 g/L, na presença de glicose como co-substrato e cofator de regeneração.

Chung, *et al.*, (2002), integraram também o gene que codifica a xilose redutase (XYL1) no cromossomo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir de 2 vetores diferentes. A produção obtida foi de 0,90 g de xilitol/g de xilose e a concentração final de xilitol, para o vetor que produziu o melhor resultado, foi de 78,1 g/L.

Nair e Zhao (2010), utilizaram a levedura *Escherichia coli* modificada por meio da eliminação da formação de L-arabinitol para produzir xilitol. A conversão de xilose em xilitol foi a partir de um hidrolisado hemicelulósico e a pureza obtida foi próxima de 100 %.

Li, *et al.*, (2013), utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante com os genes xilanase, β -xilosidase e xilose redutase para converter diretamente xilano a xilitol. O rendimento obtido foi de 0,71 g de xilitol/g de xilano.

Zhang, *et al.*, (2014), recombinaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* integrando o gene (YZJ015) que codifica a xilose redutase no fungo *Neurospora crassa*, mantendo o gene original que codifica o xilitol desidrogenase. A produtividade obtida foi de 1,01 g de xilitol/g de xilose, com glicerol como co-substrato a uma temperatura de 45 °C.

Kogje e Ghosalkar (2016), fizeram um estudo comparativo da produção de xilitol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada com a super expressão de genes da xilose redutase (XR) obtidos de outros microrganismos como a *Candida tropicalis*, *Pichia stipitis* e *Neurospora crassa*. Além dessas modificações, outra modificação avaliada foi a super. expressão do gene endógeno que codifica a aldose redutase (GRE3), já contido no metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A maior produtividade específica obtida foi a partir da levedura com super expressão do gene GRE3, com valor de 34 mg de xilitol /g de xilose/h.

Dasgupta, *et al.*, (2019), super expressaram o gene endógeno XR_{KS} na levedura *Kluyveromyces marxianus* IPE453t e obtiveram um rendimento de 0,61 g de xilitol/ g de xilose.

Em resumo, embora os estudos apresentados utilizem diferentes leveduras para produção de xilitol, a maioria modificou geneticamente os microrganismos por meio da integração ou super expressão dos genes que codificam a xilose redutase (XR), uma vez que

a XK se converte diretamente em xilitol, metabólito de interesse. Entretanto, outros estudos também utilizaram modificações em outras vias, super expressando o gene GRE3 ou eliminando a formação de L-arabinitol. Ademais, muitos estudos apresentam a *Saccharomyces cerevisiae* como a levedura utilizada para a produção de xilitol, reforçando a importância do presente trabalho em encontrar novas reações/genes que podem ser deletados ou super/sub expressados no metabolismo da levedura, a fim de aumentar a produção de xilitol.

3 METODOLOGIA

O metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é conhecido e disponível na base de dados KEGG (“KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, [S.d.]), e amplamente utilizado em pesquisas de diversas áreas em todo o mundo. As análises foram feitas utilizando o *software* open source OptFlux versão 3.4 (ROCHA *et al.*, 2010). O modelo do metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtido pelo repositório interno do próprio *software*, como iND750, proposto por Duarte (2004), contendo 1149 reações internas, 116 reações de troca, 116 metabólitos externos, 943 internos e uma função objetivo de biomassa. Analisando o modelo, observou-se a necessidade de realizar 2 modificações, sendo elas a adição da reação de conversão de D-xilose em D-xilulose e a modificação da reação de conversão de xilitol em D-xilulose, tornando a mesma reversível. Essas modificações foram feitas no código xml em linguagem SBML do modelo por meio do editor de texto e de código fonte Notepad⁺⁺ (*software* de distribuição livre conhecido por suportar várias linguagens de programação e por rodar sob o sistema Microsoft Windows). As partes inseridas no código xml do modelo encontram-se no Apêndice A. Após as modificações, o modelo passou a contar com 1151 reações internas, mantendo 116 reações de troca.

A condição ambiental para crescimento da levedura foi obtida por meio de um levantamento bibliográfico sobre a composição do material lignocelulósico de diferentes fontes, como bagaço da cana de açúcar, palha de arroz, palha de sorgo e palha da cana de açúcar, e condições de aeração já utilizadas em crescimentos de leveduras. Os trabalhos levantados foram dos autores Skoog (1987), Silva (1996), Aguiar (2002), Arruda (2011) e Arruda (2016). Os principais açúcares presentes eram xilose, glicose, arabinose e xilulose. Baseado nos valores encontrados no levantamento, propôs-se diversas condições ambientais variando os açúcares, suas proporções e a condição de aeração. Com as condições

ambientais, realizou-se simulações em *WildType* (levedura selvagem) com o modelo modificado a fim de encontrar a condição ambiental que melhor gerava o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Após os testes com o modelo modificado para adequação da condição ambiental, prosseguiu-se para a simplificação do modelo metabólico da levedura por meio do *plug-in Simplification* no *software* OptFlux.

O *software* OptFlux permite realizar simulações de fenótipos, ou seja, determinar os valores dos fluxos para as reações presentes no modelo, dadas as condições ambientais e as condições genéticas. As condições ambientais permitem definir fluxos para reações de captação e, assim, definir o meio onde a célula está crescendo. As condições genéticas definem modificações genéticas sobre as cepas originais, permitindo simular tanto o tipo selvagem (não são definidas modificações genéticas) e mutantes (onde diferentes tipos de modificações podem ser impostos, incluindo deleções de genes e super/sub expressão).

De posse do modelo simplificado, realizou-se otimizações com três métodos de restrição diferentes disponíveis: FBA – Análise do Balanço de Fluxo (do inglês, *Flux Balance Analysis*), MOMA – Minimização do Ajuste Metabólico (do inglês, *Minimization Of Metabolic Adjustment*) e ROOM – Mecanismo Regulador Liga/Desliga (do inglês, *Regulatory On/Off Mechanism*) para identificar as mutações que melhoram o fenótipo desejado.

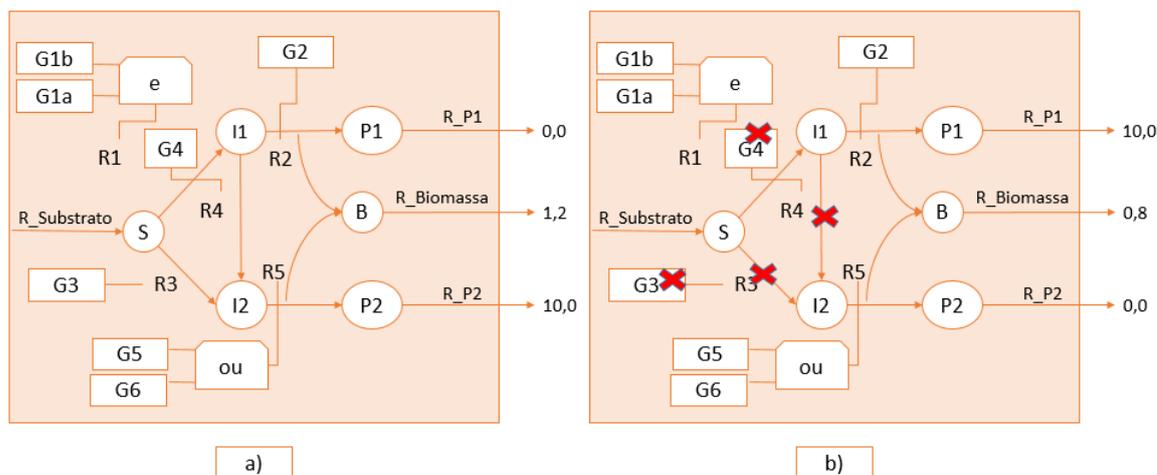
O método FBA utiliza programação linear (LP) para calcular os valores de fluxo das reações e pode ser usado para realizar as simulações tanto em tipo selvagem quanto mutantes. A solução por esse método visa maximizar o fluxo que representa a formação de biomassa, pois constatou-se que isso seria uma boa representação do comportamento natural dos microrganismos em diversas circunstâncias, mas pode-se realizar simulações com esse método para maximizar ou minimizar qualquer fluxo do modelo. Por outro lado, os métodos MOMA e ROOM são mais adequados para simulações de microrganismos mutantes, pois esses métodos calculam a solução com distância mínima (MOMA) ou com um número mínimo de mudanças (ROOM) em relação a solução original do tipo selvagem (FBA). O MOMA utiliza uma formulação de Programação Quadrática e o ROOM é implementado tanto com a Formulação MILP - Programação Mista Linear e Inteira (do inglês, *Mixed Integer Linear Programming*) quanto com um relaxamento LP do original Problema MILP (ROCHA *et al.*, 2010).

As funções objetivo podem ser de vários tipos, como maximização/minimização de Rendimento Acoplado de Biomassa-Produto - BPCY (do inglês, *Biomass-Product Coupled*

Yield), maximização/minimização de Rendimento do Produto com Biomassa Mínima - YIELD (do inglês, *Product Yield with Minimum Biomass*), maximização/minimização de Valores de Fluxo, minimização da Soma dos Valores de Fluxo ou a minimização do Número de Deleções (do inglês, *knockouts*). Cada função objetivo possui uma configuração própria, que inclui a seleção dos fluxos a serem utilizados na computação do valor da função.

A Figura 3.1 mostra um exemplo simples de uma rede que foi otimizada utilizando-se o método FBA (GONÇALVES *et al.*, 2012). Na Figura 3.1 (a) temos os fluxos indicando que o produto P2 é produzido, enquanto não se tem a produção P1. Supondo-se que desejasse produzir P1, a função objetivo é definida como a maximização da produção de P1, e o resultado da otimização é mostrado na Figura 3.1 (b). Nota-se que a produção de P1 foi atingida deletando-se os genes F3 e G4 e as reações R4 e R5. Desta forma, podemos conhecer os genes alvos de modificação, o que reduz o esforço laboratorial e reduz custos na realização de experimentos.

Figura 3.1 – Exemplo do emprego de métodos de otimização na geração de redes metabólicas que expressem o fenótipo desejado; (a) Metabolismo do microrganismo original e (b) Metabolismo otimizado para produção de P1



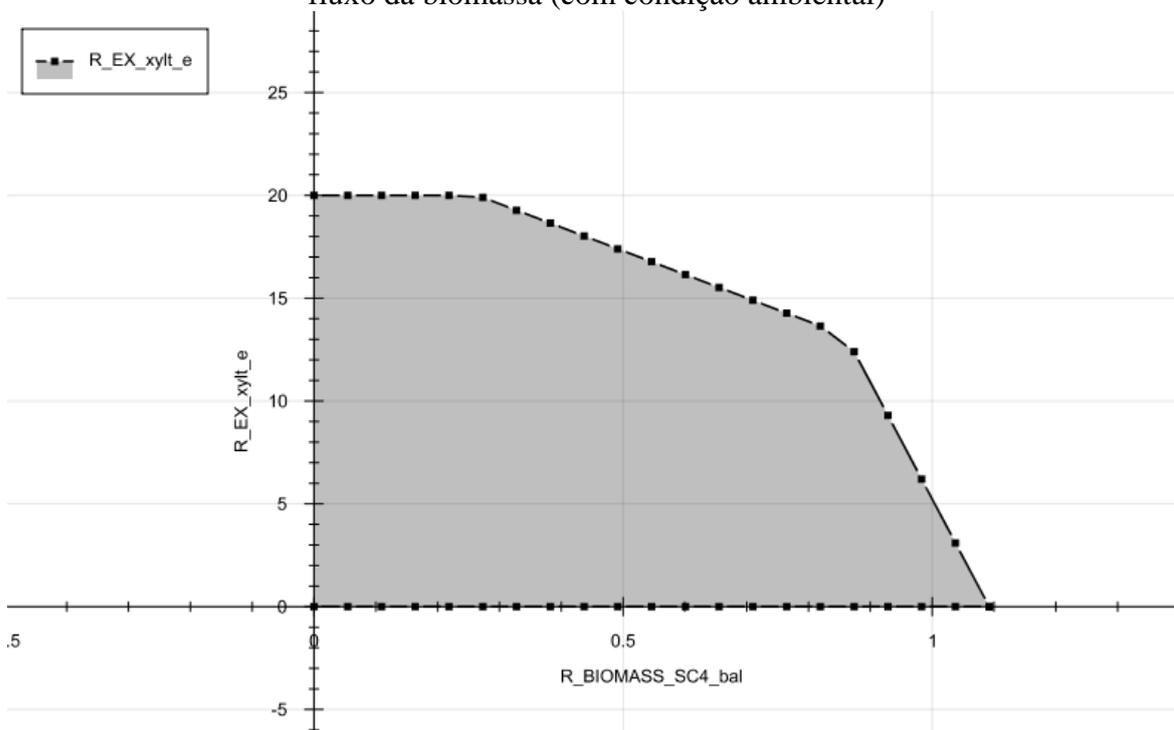
Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.*, (2012).

Com a rede metabólica responsável pela produção do composto de interesse (no caso, o xilitol) reduzida, análises adicionais foram realizadas de modo a indicar as possíveis modificações genéticas a serem feitas para obter o fenótipo desejado. Essas modificações genéticas também serão analisadas *in silico* utilizando-se o *software* OptFlux, e os fluxos intra e extracelular obtidos e avaliados quanto ao ganho na produtividade do metabólito de interesse (xilitol). Desta forma, pode-se prever biologicamente a magnitude das perturbações ocasionadas pelas modificações genéticas (como a deleção de genes) na distribuição de fluxos metabólicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a partir do modelo modificado e simplificado (contendo 760 reações internas, 116 reações de troca, 116 metabólitos externos e 492 internos) da levedura *S. cerevisiae*, fez-se a análise da variabilidade do fluxo - FVA (do inglês, *flux variability analysis*) no *software* OptFlux. Calculando os limites de fluxos (do inglês, *flux limits*) das reações, assim como as reações que possuem fluxo zero (do inglês, *zero-flux*), pôde-se obter um gráfico que apresenta o fluxo máximo de xilitol em relação ao fluxo de biomassa em uma dada condição ambiental. A condição ambiental implementada para essa e todas as demais análises foi um consumo (*lower bound*) de 20 mmol/gDCW/h para o substrato xilose, 4 mmol/gDCW/h para o substrato glicose e 20 mmol/gDCW/h para o oxigênio – aerobiose. A Figura 4.1 representa o gráfico gerado, no qual verifica-se que o valor de fluxo máximo teórico de xilitol que pode ser obtido está próximo de 20 mmol/gDCW/h, caso todo o substrato fosse direcionado para sua produção, sem formação de biomassa.

Figura 4.1 – Análise da variabilidade do fluxo (FVA) de produto (xilitol) em função do fluxo da biomassa (com condição ambiental)



Fonte: Elaborado pela autora.

Posteriormente, deu-se início as otimizações descritas na Tabela 4.1. As otimizações variaram quanto aos métodos e funções objetivo, de modo que suas nomenclaturas foram determinadas como, primeiramente, “OPT” de *optimization* (otimização em inglês), em

seguida o método de otimização: “EA” (*Evolutionary Algorithms*) ou “SA” (*Simulated Annealing*), o tipo de “knockout” (nocaute) das reações: “RUO” – Reações Sub/Super expressadas (do inglês, *Reactions Under/Over Expression*) ou “RK” – Reações Deletadas (do inglês, *Reactions Knockout*), o método de restrição: “MOMA” (*Minimization of Metabolic Adjustment*) ou “ROOM” (*Regulatory On-Off Minimization Method*), a função objetivo: “BPCY” (*Biomass-Product Coupled Yield*) ou “YIELD” (*Product Yield with Minimum Biomass*) sendo o produto de interesse xilitol, e, por fim a condição ambiental com as proporções de Xilose (X), Glicose (G) e Oxigênio (O).

Tabela 4.1 – Otimizações do modelo simplificado

Nº.	Identificação	Executou?	Tempo de otimização	Tempo de simplificação	nº de soluções
1	OPT EA RK MOMA BPCY X20 G4 O20	Sim	1h:5min	2h:39min	66
2	OPT EA RK ROOM BPCY X20 G4 O20	Não	-	-	-
3	OPT EA RUO MOMA BPCY X20 G4 O20	Sim	1h:5min	2h:39min	27
4	OPT EA RUO ROOM BPCY X20 G4 O20	Não	-	-	-
5	OPT SA RUO MOMA BPCY X20 G4 O20	Sim	17h:28min	3h:48min	89
6	OPT SA RUO ROOM BPCY X20 G4 O20	Não	-	-	-
7	OPT SA RUO MOMA YIELD X20 G4 O20	Sim	1h:44min	0h:16min	87

Fonte: Elaborado pela autora.

Analisando a aplicabilidade dos testes apresentados na Tabela 4.1 acima, verificou-se que todas as otimizações com o método de restrição “ROOM” não puderam ser executadas. Isso pode ter ocorrido por problemas no *software*, uma vez que a otimização atingia uma certa porcentagem de execução, mas após um tempo travava e não era possível finalizar a mesma. Por outro lado, observou-se que as otimizações que puderam ser executadas tiveram tempos de otimização e simplificação pequenos, quando comparados com otimizações realizadas com o modelo metabólico da levedura completo que apresentam tempo de execução variando de 18 h – 35 h, exceto pelo 5º teste que não apresentou o mesmo comportamento. Esse fato observado pode ser característico da utilização do modelo metabólico da levedura já simplificado, e mesmo que o modelo seja reduzido, verificou-se que isso não afetou os resultados das otimizações, pois pôde-se gerar altos números de soluções que levam a produção de xilitol.

Para as 4 otimizações executadas, realizou-se a simulação de todas as soluções obtidas para verificar como cada uma delas refletia na produção de xilitol. As otimizações que tinham a função objetivo “BPCY” tiveram que ser avaliadas uma a uma, pois por se

tratar de uma função que multiplica o valor da biomassa obtida com o valor obtido do produto de interesse (xilitol), um alto valor da função “BPCY” na solução não significava um alto valor de produto, por não ser diretamente proporcional. Por outro lado, a otimização com a função objetivo “YIELD” reflete diretamente o aumento de produção do produto de interesse, uma vez que, uma solução com alto valor da função “YIELD”, resultava em um maior valor de produto (xilitol).

Os dados obtidos e tratados para cada uma das otimizações constam nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 a seguir.

Tabela 4.2 – Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações inativas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT EA RK MOMA BPCY X20 G4 O20

Soluções	Reações inativas	Valor da Biomassa	M_xylt_e (Xilitol)
1	R_PUNP2; R_ALCD2x; R_FBA3_R_PFK_3; R_ACOAH; R_ACGSm; R_FDNG	0,592	4,963
2	R_EX_asn_L_e; R_ALCD2x; R_FBA3_R_PFK_3; R_FDNG	0,723	4,841
3	R_PUNP3; R_ALCD2x; R_FBA3_R_PFK_3; R_ACOAH; R_EX_thymd_e	0,714	4,841
4	R_ALCD2x; R_FBA3_R_PFK_3; R_ACOAH	0,493	4,830
5	R_ACACT6p; R_ALCD2x; R_FBA3_R_PFK_3; R_FAS100ACPm_R_FAS120ACPm_R_FAS80ACPm_L_R_ACOATAm; R_FDNG; R_3C4MOPtm_R_OMCDCm	0,675	4,780

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4.3 – Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações reguladas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT EA RUO MOMA BPCY X20 G4 O20

Soluções	Reações Reguladas	Valor da Biomassa	M_xylt_e (Xilitol)
1	R_NADH2_u6cm (0,25); R_ENO (0,5); R_PYRDC (0,25)	0,472	3,829
2	R_HSDxi (0,125); R_ENO (0,5); R_PYRDC (0,25); R_FA140ACPHi_R_FA140ACPtm (0,25)	0,462	3,565
3	R_PUNP3 (2,0); R_FBA3_R_PFK_3 (0,25); R_PYRDC (0,5); R_RNDR4 (8,0)	0,871	3,500

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4.4 – Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações reguladas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT SA ROU MOMA BPCY X20 G4 O20

Soluções	Reações Reguladas	Valor da Biomassa	M_xylt_e (Xilitol)
1	R_ALCD2x (0,03125); R_CYSTGL (0,03125)	0,432	2,610
2	R_EX_h2o_e (0,5)	0,201	2,453
3	R_PYRDC (0,03125)	0,209	2,232

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4.5 – Soluções que resultaram em maior produção de xilitol contendo as reações reguladas, o valor de biomassa e de xilitol produzidos, referentes a otimização OPT SA ROU MOMA YIELD X20 G4 O20

Soluções	Reações Reguladas	Valor da Biomassa	M_xylt_e (Xilitol)
1	R_ALCD2x (0,03125); R_ENO (0,03125); R_FBA3; R_PFK_3 (0,03125); R_PUNP7 (0,03125); R_XYLK (0,5); R_IPPS (2,0)	0,268	9,99
2	R_ALCD2x (0,03125); R_ENO (0,03125); R_HEX1 (0,03125); R_XYLK (0,5)	0,209	9,99
3	R_FAO181p_odd (0,03125); R_ALCD2x (0,03125); R_ENO (0,03125); R_HEX1 (0,03125); R_XYLK (0,5); R_IPPS (2,0)	0,208	9,99
4	R_ALCD2x (0,03125); R_ENO (0,03125); R_PUNP7 (0,03125); R_HEX1 (0,03125); R_XYLK (0,5); R_IPPS (2,0)	0,206	9,99
5	R_FAO181p_odd (0,03125); R_ALCD2x (0,03125); R_ENO (0,03125); R_ALCD2irm (0,125); R_XYLK (0,5); R_IPPS (2,0)	0,181	9,99

Fonte: Elaborado pela autora.

Avaliando os resultados das simulações das soluções de cada otimização, verificou-se que a última otimização, OPT SA ROU MOMA YIELD X20 G4 O20, apresentou o melhor resultado em relação a produtividade de biomassa e do produto de interesse (xilitol), com um valor de 9,99 mmol/gDCW/h de xilitol. Por outro lado, as simulações das outras otimizações geraram bons resultados para a produtividade de biomassa, mas para o produto de interesse os valores foram muito baixos quando comparados ao de melhor resultado.

As 5 soluções simuladas da otimização OPT SA ROU MOMA YIELD X20 G4 O20 apresentaram o mesmo valor para a produtividade de xilitol, sendo que a primeira solução apresentou o maior resultado para a biomassa e a quinta o menor. Analisando as reações reguladas em cada uma delas, observou-se que algumas se repetem em todas como: R_ALCD2x, R_ENO, R_XYLK e R_IPPS, reguladas com os mesmos valores, enquanto outras reações são específicas de cada solução como: R_FBA3; R_PFK_3, R_PUNP7, R_HEX1 e R_FAO181p_odd.

Comparando o valor de xilitol obtido (9,99 mmol/gDCW/h) com o valor máximo que pode ser produzido (~20 mmol/gDCW/h), apresentado na análise de FVA (Figura 4.1), tem-se valores muito distantes. Observando o gráfico, verifica-se que com uma produção de aproximadamente 0,2 mmol/gDCW/h de biomassa, dever-se-ia produzir aproximadamente 20 mmol/gDCW/h de xilitol, mas analisando todos os metabólitos produzidos nessas simulações, observou-se que junto a produção de xilitol, produziu-se também acetaldeído, de maneira que parte do substrato estaria sendo direcionada para essa produção, ao invés da produção de xilitol.

Baseado nesses resultados, iniciou-se um estudo sobre as reações sugeridas pelas soluções apresentadas nas Tabelas de 4.2 a 4.5. Quatro reações importantes foram identificadas na via da Glicólise/Glicogênese, são elas: R_ALCD2x; R_ENO; R_HEX1 e R_PYRDC. Outra reação identificada foi a R_XYLK, presente na via de interconversões da Pentose e Glucuronato (do inglês, *Pentose and Glucuronate Interconversions*). O Quadro 4.1 apresenta a sigla no OptFlux, o nome, o número E.C. (do inglês, *Enzyme Commission Numbers* – que representa a enzima responsável por catalisar a reação segundo esse sistema de classificação) e a função de cada reação se for inativada (RK) ou sub/super expressada (ROU) no metabolismo da levedura.

Quadro 4.1 – Sigla no OptFlux, nome, número E.C. e função de cada reação se for inativada (RK) ou sub/super expressada (ROU) no metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Sigla no OptFlux	Nome da reação	Número E.C.	Função no metabolismo se for RK ou ROU
R_ALCD2x	Álcool Desidrogenase (NADP ⁺)	(1.1.1.2)	bloqueia ou diminui a formação de etanol gerando mais acetaldeído
R_ENO	Enolase	(4.2.1.11)	bloqueia ou diminui a formação de piruvato, acetil-CoA e etanol
R_HEX1	Hexoquinase	(5.4.2.2)	bloqueia ou diminui a produção de α -D-glicose e β -D-glicose
R_PYRDC	Piruvato Descarboxilase	(4.1.1.1)	impede que o piruvato siga na formação de acetaldeído e etanol
R_XYLK	Xiluloquinase	(2.7.1.17)	direciona a produção de xilitol por meio de D-ribulose-5P -> D-ribulose -> D-arabitol -> D-xilulose -> D-xilitol (Via de interconversões da Pentose e Glucuronato)

Fonte: Elaborado pela autora.

Baseado nessas análises e nos resultados das otimizações verificou-se que as reações R_ALCD2x; R_ENO; R_HEX1 e R_PYRDC eram sub expressadas com valores muito baixos (0,03125), próximos de zero, enquanto que a reação R_XYLK era sub expressada

com um valor de 0,5. Realizou-se, então, uma simulação inativando (RK) as reações R_ALCD2x; R_ENO; R_HEX1 e R_PYRDC e sub expressando (ROU) apenas a reação R_XYLK, com o valor de (0,5). Como visto no Quadro 4.1, a inativação ou sub expressão das reações que estão presentes na via da Glicólise não afeta o caminho para a produção de xilitol. Na verdade, contribuem para concentrar e direcionar o fluxo para a sua produção, assim como a sub expressão da reação presente na via de interconversões da Pentose e Glucuronato. A Figura 4.2, apresenta as principais vias que englobam essas reações estudadas, sendo possível observar o impacto de cada reação se forem inativadas ou sub/super expressadas pelos métodos RK e ROU, respectivamente, comprovando as análises apresentadas no Quadro 4.1.

O resultado da simulação realizada foi de 11,96 mmol/gDCW/h de xilitol produzido, com um valor para a produção de biomassa de aproximadamente 0,79 mmol/gDCW/h. O Quadro 4.2 apresenta os fluxos de consumo e de produção dessa simulação.

Quadro 4.2 - Fluxos de consumo e de produção da simulação RK R_ALCD2x, RK R_ENO, RK R_HEX1, RK R_PYRDC, ROU R_XYLK (0,5)

Consumos		
Sigla do metabólito	Nome do metabólito	Valor
M_glc__D_e	D-Glicose	4,00
M_nh4_e	Amônia	6,48
M_o2_e	Oxigênio	20,00
M_pi_e	Fosfato	0,16
M_so4_e	Sulfato	2,13
M_xyl__D_e	D-Xilose	20,00
Produção		
Sigla do metabólito	Nome do metabólito	Valor
M_cys__L_e	L-Cisteína	2,07
M_h_e	H ⁺	1,91
M_h2o_e	Água	31,22
M_co2_e	Dióxido de carbono	29,65
M_xylt_e	Xilitol	11,96

Fonte: Elaborado pela autora com dados obtidos pelo *software* OptFlux.

Observando o Quadro 4.2, verifica-se a atuação da inativação das reações mencionadas anteriormente, uma vez que não há produção de etanol e acetaldeído. Além disso, o valor de fluxo de xilitol obtido é maior que o gerado pela melhor solução otimizada, sendo necessário apenas inativar quatro reações e sub expressar uma. Também, como visto na análise FVA, apresentada na Figura 4.1, para uma produção de biomassa de aproximadamente 0,8 mmol/gDCW/h dever-se-ia produzir 14 mmol/gDCW/h de xilitol, estando o valor obtido (11,96 mmol/gDCW/h) muito próximo, enquanto que em relação ao fluxo máximo de xilitol (~20 mmol/gDCW/h), o valor obtido corresponde a apenas 40%. Essa distância entre o valor máximo e o obtido incitam a ideia de que outras modificações podem ser estudadas com o objetivo de aumentar a produção de xilitol.

No geral, os resultados obtidos foram satisfatórios tanto quanto a produtividade do produto de interesse que é o xilitol, quanto a outros parâmetros como produção de biomassa e tempo de processamento das otimizações para o modelo metabólico da levedura simplificado.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Por meio desse trabalho foi possível estudar e verificar a aplicabilidade da utilização do modelo metabólico simplificado da levedura e através dele realizar as otimizações necessárias para encontrar as modificações genéticas que produzissem o maior valor do produto alvo, o xilitol.

A maior produção de xilitol foi de 11,96 mmol/gDCW/h obtida com apenas 5 modificações no modelo metabólico da levedura, a deleção de quatro reações presentes na via da Glicólise (Álcool desidrogenase; Enolase; Hexoquinase; Piruvato descarboxilase) e a sub expressão de uma reação presente na via de interconversões da Pentose e Glucuronato (Xiluloquinase), a qual contém o metabólito alvo, o xilitol.

Além disso, constatou-se a funcionalidade do *software open source* OptFlux quanto aos métodos de otimização e restrição, funções objetivo e diversas ferramentas de análise que estão disponíveis, fora a facilidade da interface amigável e as informações disponíveis na literatura. Quanto a robustez e custo operacional, o cálculo das otimizações com o modelo metabólico simplificado apresentou custo operacional baixíssimo, pois o tempo de cálculo gasto com otimização foi de aproximadamente 25% em relação ao tempo total das otimizações, para a maioria dos testes aplicados.

Para trabalhos futuros, sugere-se realizar as modificações encontradas no presente trabalho *in vivo*; avaliar os modos elementares do modelo metabólico da levedura *Saccharomyces cerevisiae*; efetuar cálculos com o modelo dinâmico da levedura; e avaliar outros microrganismos *in silico* para produção de xilitol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR JR, Wilson B. *et al.* Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *C. guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 1, p. 49-59, 2002.

ARRUDA, Priscila V. **Ampliação de escala da produção biotecnológica de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy conversion and management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

CHARPENTIER, Jean-Claude. The triplet “molecular processes–product–process” engineering: the future of chemical engineering?. **Chemical Engineering Science**, Festschrift in Honour of Dr Winn van Swaij. v. 57, n. 22-23, p. 4667–4690, 2002.

CHUNG, Yun-Seung *et al.* Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, n. 6, p. 809-816, 2002.

COPELAND, Wilbert B. *et al.* Computational tools for metabolic engineering. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 3, p. 270-280, 2012.

COUNCIL, National Research. **Beyond the Molecular Frontier: Challenges for Chemistry and Chemical Engineering**. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <<https://www.nap.edu/catalog/10633/beyond-the-molecular-frontier-challenges-for-chemistry-and-chemical-engineering>>. Acesso em: 29 nov 2020.

CUNHA, Mario A. A. *et al.* Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 61–70, 2005.

DASGUPTA, Diptarka *et al.* Xylitol Production from Lignocellulosic Pentosans: A Rational Strain Engineering Approach toward a Multiproduct Biorefinery. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 4, p. 1173-1186, 2019.

DUARTE, Natalie C.; HERRGÅRD, Markus J.; PALSSON, Bernhard Ø. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. **Genome research**, v. 14, n. 7, p. 1298-1309, 2004.

EXPERTS, Industry. **Xylitol-A Global Market Overview**. 2017.

GARNIER, Gil. **Grand challenges in chemical engineering**. *Frontiers in Chemistry*, v. 2, 9 Abr 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3988393/>>. Acesso em: 29 nov 2020.

GONÇALVES, Emanuel e ROCHA, Isabel e ROCHA, Miguel. Computational Tools for Strain Optimization by Tuning the Optimal Level of Gene Expression. ROCHA, M. P. e colab. (Org.). **6th International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. v. 154. p. 251–258. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-28839-5_29>. Acesso em: 19 nov 2020.

HALLBORN, Johan *et al.* Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio/technology**, v. 9, n. 11, p. 1090-1095, 1991.

HALLBORN, Johan *et al.* The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the XYL1 gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 42, n. 2-3, p. 326-333, 1994.

HANDUMRONGKUL, C.; MA, D. P.; SILVA, J. L. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xyl1) in *Pichia pastoris*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 399-404, 1998.

ISIDRO, Inês A. *et al.* Design of Pathway-Level Bioprocess Monitoring and Control Strategies Supported by Metabolic Networks. In: **Measurement, Monitoring, Modelling and Control of Bioprocesses**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 193-215.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 29 nov 2020.

KEGG PATHWAY: Pentose and glucuronate interconversions - *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast). Disponível em: <http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=sce00040&keyword=>>. Acesso em: 29 nov 2020.

KOGJE, Anushree; GHOSALKAR, Anand. Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing different xylose reductases using non-detoxified hemicellulosic hydrolysate of corncob. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 127, 2016.

LEE, Woo-Jong; RYU, Yeon-Woo; SEO, Jin-Ho. Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1199-1203, 2000.

LI, Zhe *et al.* Direct and efficient xylitol production from xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through transcriptional level and fermentation processing optimizations. **Bioresource technology**, v. 149, p. 413-419, 2013.

MATHEW, Anil K. *et al.* Lignocellulosic Biorefinery Wastes, or Resources?. In: **Waste Biorefinery**. Elsevier, 2018. p. 267-297.

MENDES, Erlon *et al.* **Estudo em escala genômica da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para a bioprodução de hidrogênio e criação de um modelo regulatório**. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 18, DE 24 DE MARÇO DE 2008**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_18_2008_COMP.pdf/2e33a54e-f7b8-4d1d-b496-21b5a3c67fb7>. Acesso em: 29 nov 2020.

MUSSATTO, Solange I. **Application of Xylitol in Food Formulations and Benefits for Health**. In: d-Xylitol. [S.l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 309–323. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-31887-0_14>. Acesso em: 29 nov 2020.

NAIR, Nikhil U.; ZHAO, Huimin. Selective reduction of xylose to xylitol from a mixture of hemicellulosic sugars. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 5, p. 462-468, 2010.

PARK, Eunjoo *et al.* Xylitol induces cell death in lung cancer A549 cells by autophagy. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 5, p. 983–990, 2015.

RAVELLA, Sreenivas R. *et al.* **Overview on Commercial Production of Xylitol, Economic Analysis and Market Trends**. In: d-Xylitol. [S.l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 291–306. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-31887-0_13>. Acesso em: 29 nov 2020.

REED, Jennifer L. *et al.* **Computational Approaches in Metabolic Engineering**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/207414/>>. Acesso em: 29 nov 2020.

ROCHA, Isabel *et al.* OptFlux: an open-source *software* platform for in silico metabolic engineering. **BMC Systems Biology**, v. 4, p. 45, 2010.

SARKAR, Nibedita. *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: Na overview. **Renewable Energy**, Índia, p.19-27, 2012.

SILVA, Silvio S. *et al.* Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 549-553, 1996.

SKOOG, Kerstin; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 2, p. 66-80, 1988.

TAMANINI, Carolina; DE OLIVEIRA HAULY, Maria C. Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TEIXEIRA, Ana P. *et al.* Cell functional enviromics: Unravelling the function of environmental factors. **BMC Systems Biology**, v. 5, p. 92, 2011.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn *et al.* Partial substitution of glucose with xylitol suppressed the glycolysis and selectively inhibited the proliferation of oral cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 69, n. 6, p. 862–872, 2017.

TRINH, Cong T.; UNREAN, Pornkamol; SRIENC, Friedrich. Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3634–3643, 2008.

UNREAN, Pornkamol; TRINH, Cong T.; SRIENC, Friedrich. Rational design and construction of an efficient E. coli for production of diapolycopendioic acid. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 2, p. 112–122, 2010.

UR-REHMAN, Salim *et al.* Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1514–1528, 2015.

VILAÇA, Paulo *et al.* Analyzing and Designing Cell Factories with OptFlux. In: **Metabolic Network Reconstruction and Modeling**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 37-76.

ZHANG, Jia *et al.* Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource technology**, v. 152, p. 192-201, 2014.

ANEXO A – Códigos implementados no modelo da levedura

Código da reação de conversão de xilitol a xilose (R_XYLTD_D) com a inserção da condição de reversibilidade.

```

<reaction fast="false" fbc:lowerFluxBound="cobra_default_lb"
fbc:upperFluxBound="cobra_default_ub" id="R_XYLTD_D" metaid="R_XYLTD_D"
name="Xylitol dehydrogenase D xyulose forming "
reversible="true" sboTerm="SBO:0000375">
<annotation>
<rdf:RDF
xmlns:rdf="http://www.w3.org/1999/02/22-rdf-syntax-ns#"
xmlns:bqbiol="http://biomodels.net/biology-qualifiers/"
<rdf:Description rdf:about="#R_XYLTD_D">
<bqbiol:is>
<rdf:Bag>
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/bigg.reaction/XYLTD_D" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/biocyc/META:D-XYLULOSE-REDUCTASE-
RXN" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/biocyc/META:RXN-11825" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/ec-code/1.1.1.14" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/ec-code/1.1.1.15" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/ec-code/1.1.1.9" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/kegg.reaction/R01896" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/kegg.reaction/R05831" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/metanetx.reaction/MNXR105262" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/rhea/20433" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/rhea/20434" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/rhea/20435" />
<rdf:li rdf:resource="http://identifiers.org/rhea/20436" />
</rdf:Bag>
</bqbiol:is>
</rdf:Description>
</rdf:RDF>
</annotation>
<fbc:geneProductAssociationxmlns:fbc="http://www.sbml.org/sbml/level3/version1/fbc/
version2">
<fbc:geneProductRef fbc:geneProduct="G_YLR070C" />
</fbc:geneProductAssociation>
<listOfReactants>
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000010" species="M_nad_c"
stoichiometry="1" />
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000010" species="M_xyult_c"
stoichiometry="1" />
</listOfReactants>
<listOfProducts>
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000011" species="M_h_c"
stoichiometry="1" />
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000011" species="M_nadh_c"
stoichiometry="1" />
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000011" species="M_xyulu__D_c"
stoichiometry="1" />
</listOfProducts>
</reaction>

```

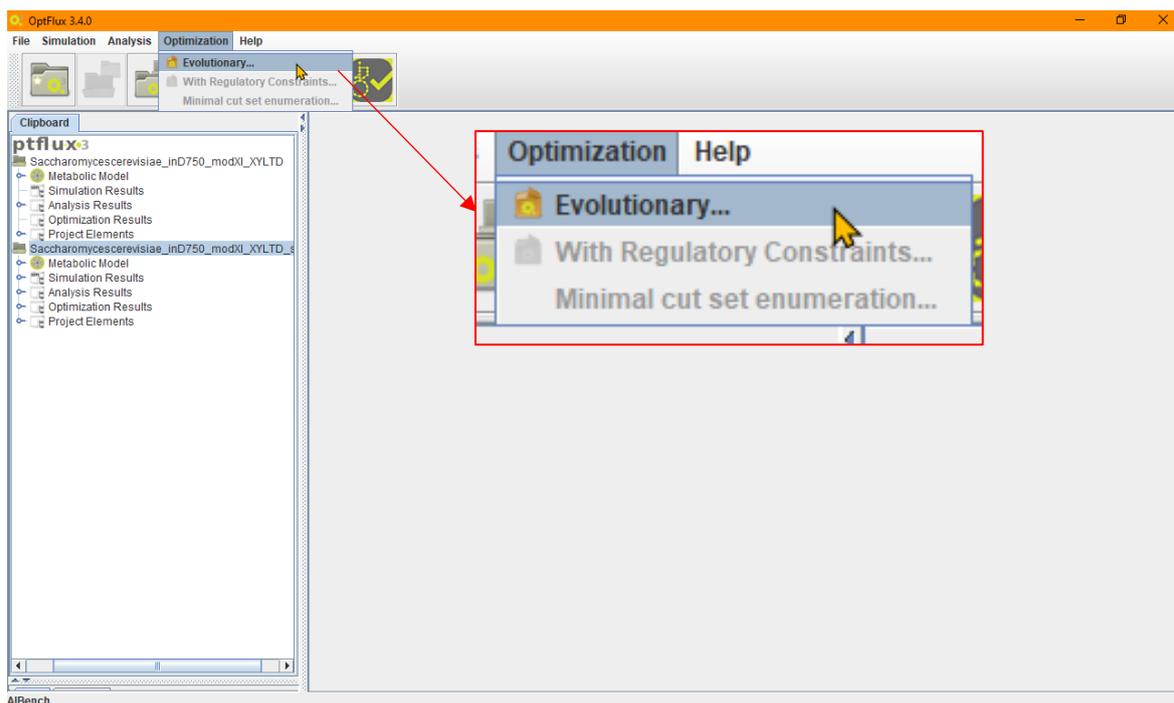
Código da reação de conversão de xilose em xilulose (R_XI_aa).

```
-----  
<reaction fast="false" fbc:lowerFluxBound="cobra_default_lb"  
fbc:upperFluxBound="cobra_default_ub" id="R_XI_aa" metaid="R_XI_aa" name="D-  
Xylose isomerase" reversible="true"  
sboTerm="SBO:0000375">  
<annotation></annotation>  
<fbc:geneProductAssociation  
xmlns:fbc="http://www.sbml.org/sbml/level3/version1/fbc/version2">  
</fbc:geneProductAssociation>  
<listOfReactants>  
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000010" species="M_xyl__D_c"  
stoichiometry="1" />  
</listOfReactants>  
<listOfProducts>  
<speciesReference constant="true" sboTerm="SBO:0000011" species="M_xylu__D_c"  
stoichiometry="1" />  
</listOfProducts>  
</reaction>  
-----
```

ANEXO B – Guia para otimização no *software* OptFlux

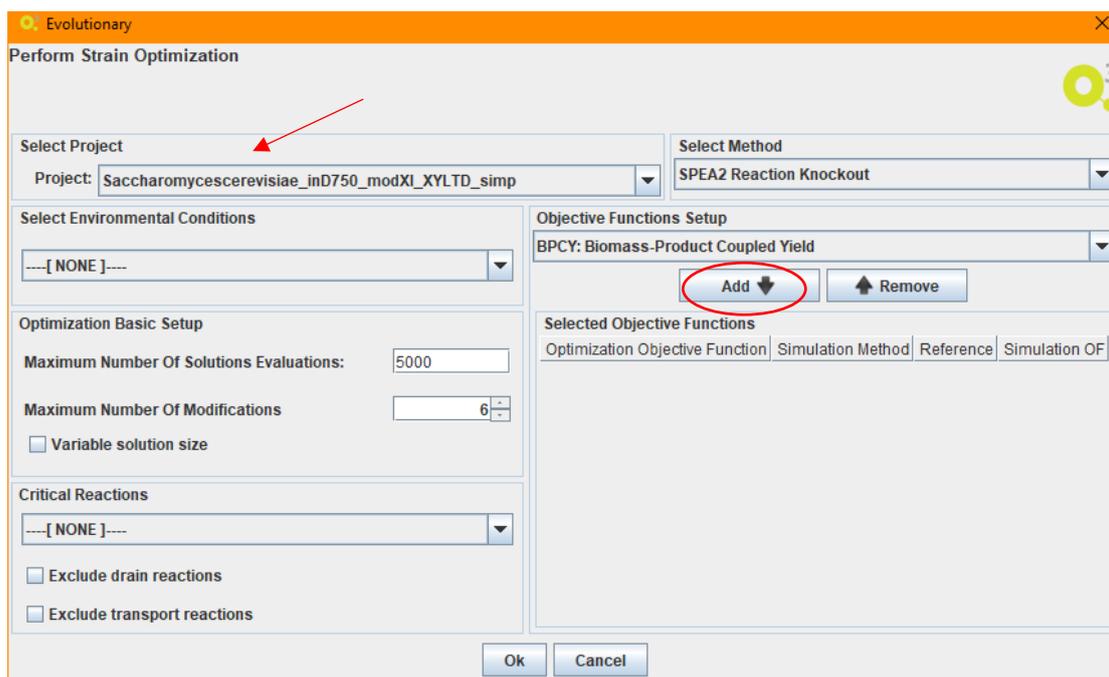
Guia com o passo-a-passo para realizar uma otimização no *software* OptFlux. O exemplo a seguir é da otimização OPT SA ROU MOMA YIELD X20G4O20.

1) Com o *software* OptFlux já aberto no diretório que contém o modelo do microrganismo a ser otimizado, clica-se na aba *Optimization* e em seguida, em *Evolutionary...*



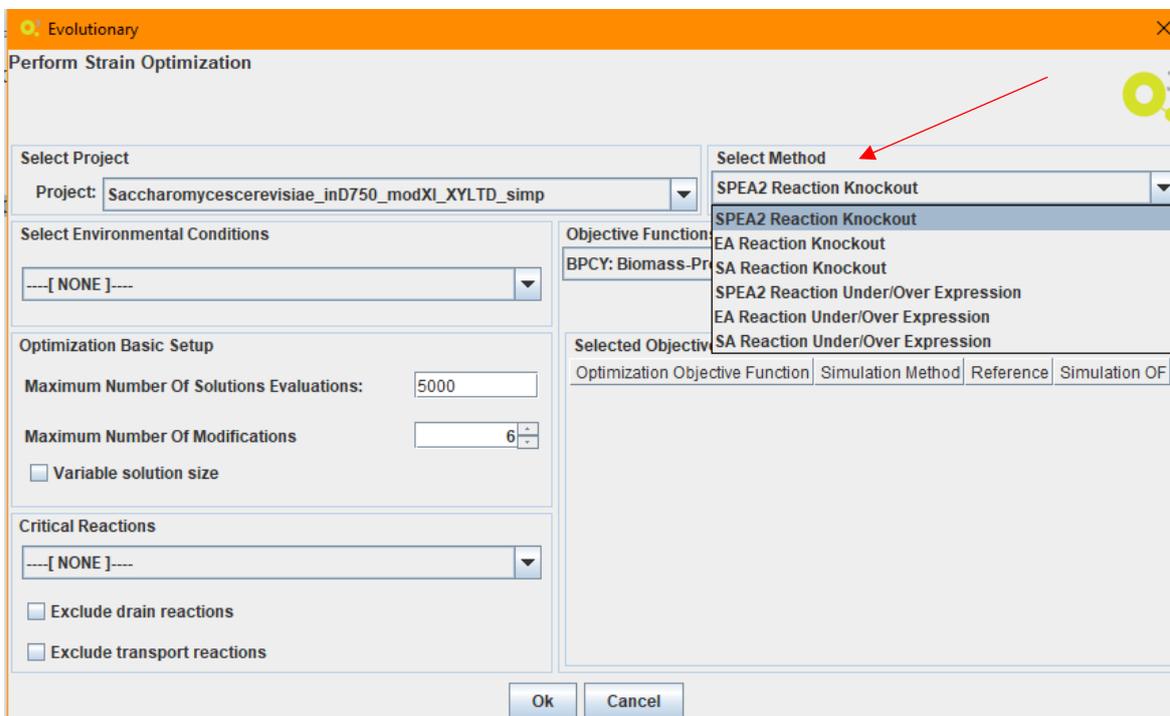
Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

2) Em seguida, seleciona-se o projeto que contém o modelo a ser otimizado.



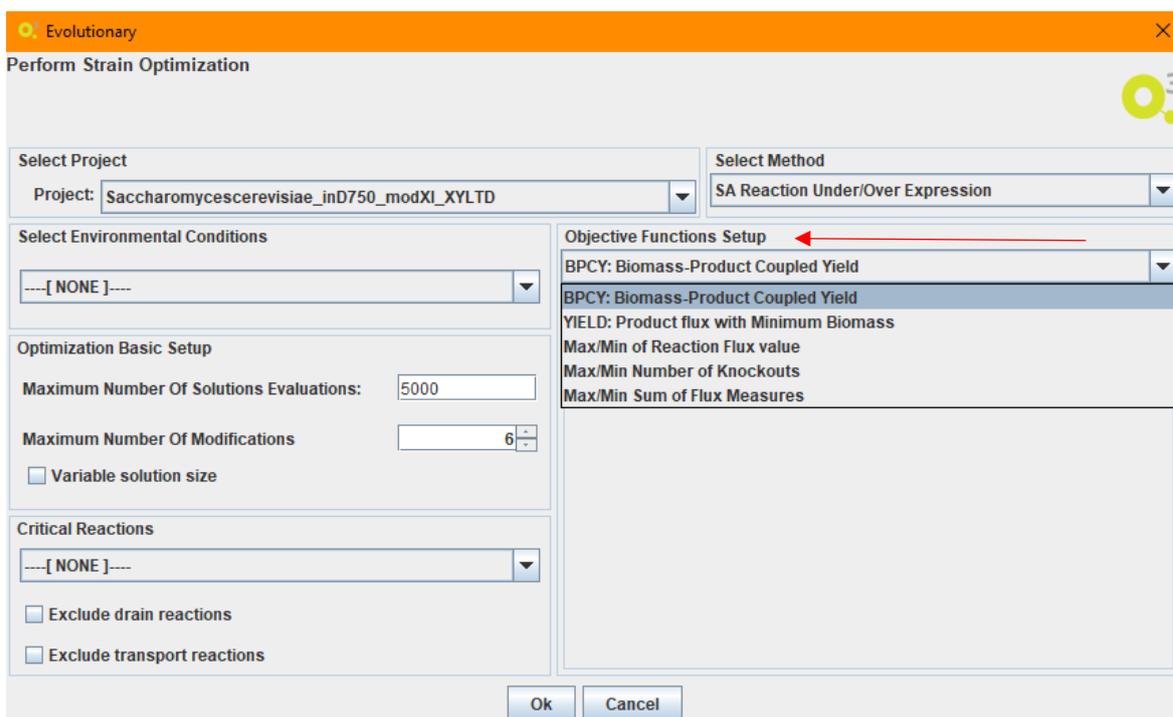
Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

3) Seleciona-se então o método de deleção e de otimização dentre as opções disponíveis.



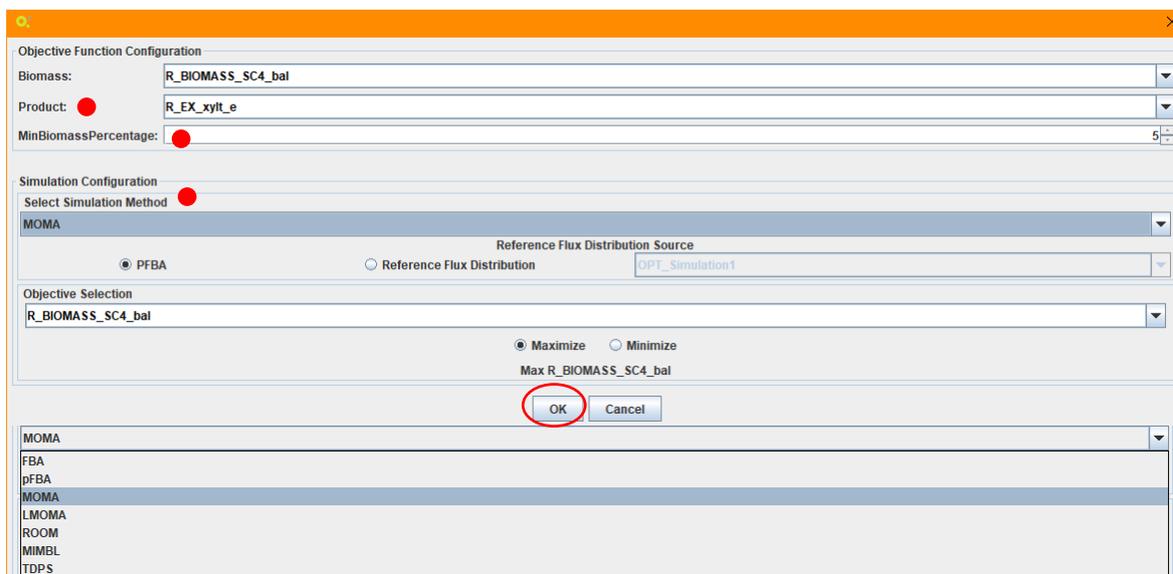
Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

4) O próximo passo é selecionar a função objetivo para a otimização.



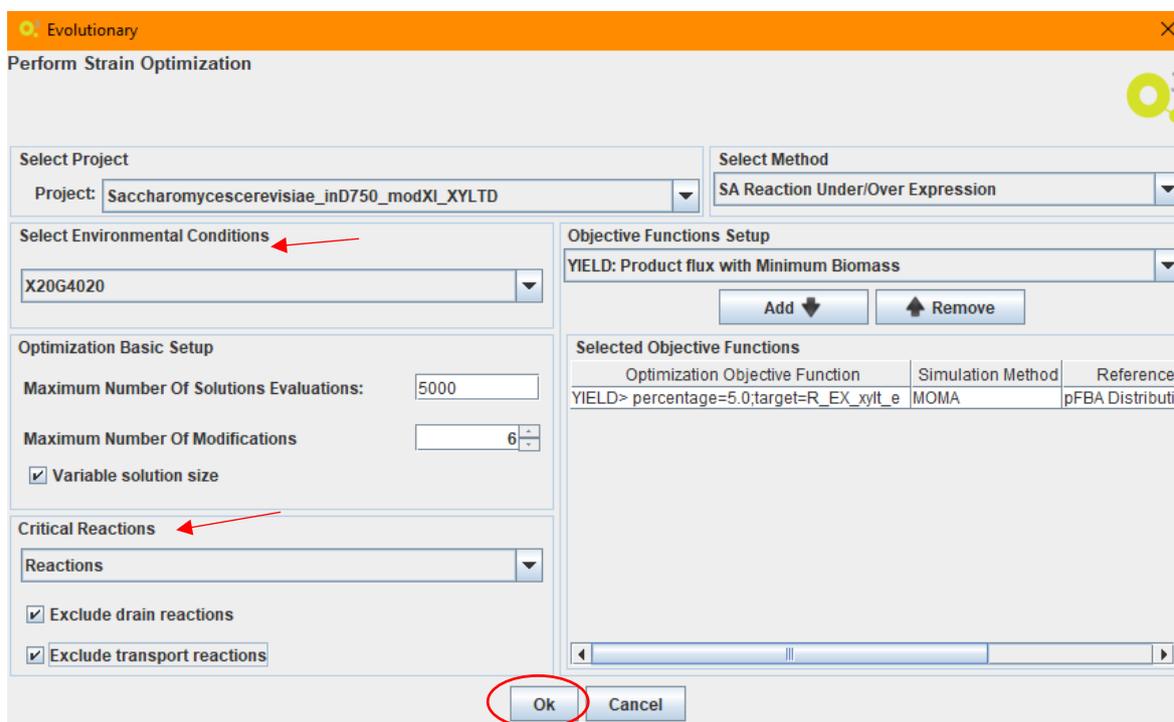
Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

5) Após selecionar a função objetivo, clica-se em *Add* e define-se os objetivos da função (produto alvo, porcentagem mínima de biomassa e método de simulação), como mostrado na imagem abaixo.



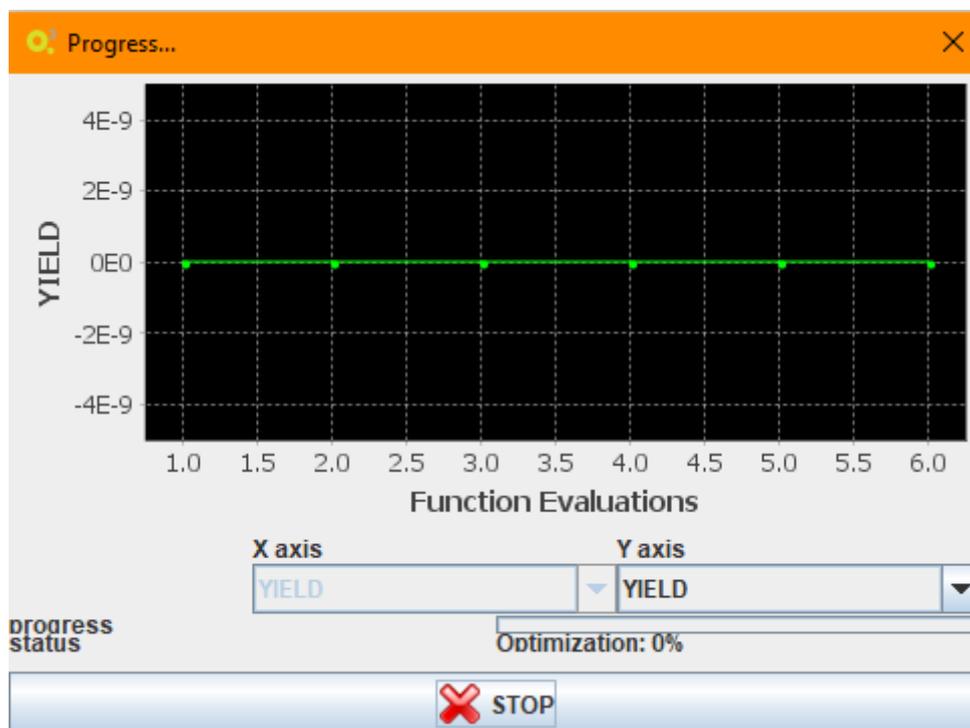
Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

6) Com a função objetivo definida, seleciona-se (se houver) a condição ambiental, as reações/genes críticos e os demais parâmetros que podem ser modificados de acordo com a análise que se deseja obter.



Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

7) Ao clicar em Ok, a janela abaixo irá aparecer e ficará aberta até a conclusão da otimização.



Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

8) No final, a otimização estará no tópico *Optimization Results* -> *Evolutionary*. Ao selecionar o resultado da otimização, visualiza-se o resumo da otimização.

The screenshot shows the OptFlux 3.4.0 interface. The left sidebar displays a tree view of the project structure, with 'Optimization Results' expanded to 'Evolutionary', and 'OPT SA ROU YIELD_MOMA X20G4O20' selected. The main panel shows the following details:

- Optimization Algorithm:** Simulated Annealing
- Optimization Strategy:** ROU
- Max Evaluation Functions:** 5000
- Variable size:** true
- Max Modifications:** 6
- Critical Information:** Not available
- Has drains in criticals:** true
- Has transport in criticals:** true
- Environmental Conditions:** Not available
- Statistics:** Optimization created in: 2019/06/05 13:38:57; Optimization took: 0d:1h:44m:56s:776ms; Simplification took: 0d:0h:16m:14s:849ms
- Objective Functions:** A table with columns: OF ID, OF Name, Simulation Method, Reference, Simulation OF. The first row is YIELD.

Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.

9) E na outra aba, visualiza-se os resultados com as soluções e os valores para a função objetivo. Para realizar as simulações das soluções basta clicar no botão “Add to simulation results”.

The screenshot shows the OptFlux 3.4.0 interface displaying the optimization results. The main panel shows a table of solutions and a scatter plot.

Solutions	YIELD> percentage=10.0;target=R_EX_xyIt_e (MOMA_1)
Solution_1	7.20796
Solution_2	7.30816
Solution_3	7.37981
Solution_4	7.42593
Solution_5	7.24778
Solution_6	7.20616
Solution_7	9.99
Solution_8	7.33523
Solution_9	7.39421
Solution_10	8.19289
Solution_11	7.33545
Solution_12	7.20817

Below the table, a red circle highlights the button "<< Add to simulation results". The 'Decoded Solution' section shows a scatter plot of YIELD_MOMA_1 vs Solution, with a red arrow pointing to the plot area.

Fonte: Arquivo pessoal obtido por meio do *software* OptFlux.