ANDREAS KAROLY GOMBERT

Análise de Redes Metabólicas em
Saccharomyces cerevisiae

Tese apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Engenharia.

São Paulo
2001

ANDREAS KAROLY GOMBERT

Análise de Redes Metabólicas em
Saccharomyces cerevisiae

Tese apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientador:
Beatriz Vahan Kilikian

São Paulo
2001

Gombert, Andreas Karoly
Análise de Redes Metabólicas em
Saccharomyces cerevisiae. São Paulo, 2001.
122 p. + apêndice

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Engenharia Química.

1. Análise de fluxos metabólicos 2.
Repressão por glicose 3. *Saccharomyces cerevisiae*
I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Química II. t

Dedico esta tese aos meus pais, ao meu irmão e a minha avó, que são a razão, o apoio e o amor, sempre.

AGRADECIMENTOS

Uma tese não é fruto do trabalho solitário, pelo contrário, ela é resultado da dedicação de várias pessoas. Por isto, aqui vão alguns agradecimentos àqueles que deram sua contribuição, maior ou menor, para que este objetivo fosse atingido.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Profa. Beatriz Vahan Kilikian pela orientação, pelo apoio, pelo estímulo, pela dedicação, pelo exemplo, que vêm desde o meu trabalho de mestrado e, principalmente, pelo incentivo constante às minhas atividades.

Desde a elaboração do plano de trabalho, até os instantes finais desta tese, o Prof. Jens Nielsen teve participação importantíssima. Por aceitar-me em seu laboratório, por orientar-me num desconhecido campo e por estimular-me sempre, um muito obrigado, ou como eles dizem: “mange tak!”.

Ao Dr. Bjarke Christensen devo um agradecimento especial, pois ele foi efetivamente quem me iniciou em Análise de Redes Metabólicas. Além disto, perto ou distante, ele prestou grande auxílio nos cálculos de fluxos metabólicos, sempre com incomparável sapiência e inteligentíssimo humor.

Agradeço também ao Dr. Peter Kötter, o qual, apesar de não termos nos encontrado pessoalmente, providenciou, de forma eficiente e rápida, os mutantes utilizados neste trabalho

Às técnicas Jette, Tina, Vibeke e Bettina, muito obrigado pelo apoio técnico, sempre preciso e pontual, no laboratório.

Às secretárias Birgitte, Susanne, Kirsten, Bitten e Trine, agradeço pelo apoio administrativo e burocrático, muito necessário quando se trabalha numa sociedade estrangeira. Aprendi com os dinamarqueses como os trâmites podem ser muito menos burocráticos.

A todos os colegas do Center for Process Biotechnology, em especial a Margarida e Jochen, por colaborarem, apoiarem, ajudarem, pedirem, perguntarem, responderem, rirem e sorrirem, sempre que necessário, um agradecimento especial.

À Profa. Maria Cândida e ao Prof. Aldo Tonso, por apoiarem minhas atividades, tanto na esfera ideológica, quando na prática, muito obrigado.

Finalmente (“last but not least”), agradeço à CAPES por conceder-me a bolsa de doutorado sanduíche (BEX 1098/98-5), sem a qual todo este trabalho teria uma cara bem diferente. Este agradecimento inclui aquele cidadão brasileiro que, provavelmente sem sabê-lo, teve parte de seus impostos convertida nesta bolsa e em meu salário como docente.

ERRATA

- **pág. iv:** na lista de símbolos, incluir $OD_{600}=DO_{600}$ =densidade óptica a 600 nm
- **pág. 5:** onde se lê “a diferentes concentrações de glicose”, leia-se “a concentrações de glicose mais elevadas”
- **pág. 6:** complementando a legenda da Figura 2.1. Nas elipses, encontram-se nomes de proteínas de *S. cerevisiae*. Nos retângulos, são indicados nomes de genes de *S. cerevisiae* (para informações sobre as proteínas e genes indicados, favor referir-se a www.proteome.com)
- **pág. 11:** onde se lê “a jusante”, leia-se “cadeia abaixo”
- **pág. 18:** após “... não há acúmulo de metabólitos internos).”, incluir “A hipótese de pseudo estado estacionário é uma boa aproximação para condições de crescimento balanceado, pois normalmente o valor do fluxo molar de formação e consumo de um metabólito é muito superior ao valor da concentração molar deste metabólito. Portanto, grandes variações na concentração de um metabólito não levam a grandes diferenças entre os fluxos molares de formação e de consumo deste metabólito.”
- **pág. 50:** onde se lê “taxa de diluição”, leia-se “vazão específica”
- **pág. 51:** onde se lê “porosidade”, leia-se “diâmetro de poro”
- **pág. 67:** onde se lê “valor constante”, leia-se “valor constante de marcação”
- **págs. 67 e 68 :** onde se lê “cinética de incorporação de primeira ordem”, leia-se “cinética de primeira ordem de lavagem de biomassa não marcada, dada pela equação $\frac{du}{dt} = -k \times u$, onde u = biomassa não marcada e k = constante”
- **pág. 71:** na legenda da Figura 4.5, onde se lê “fossem”, leia-se “seriam”
- **pág. 73:** na Tabela 4.4.1, onde se lê “SFL”, leia-se “MAR”
- **pág. 78:** na 18ª linha do 1º parágrafo, onde se lê “leucina”, leia-se “isoleucina”
- **págs. 84, 100, 101 e 102:** nas legendas das Figuras 4.7, 4.11, 4.12 e 4.13, onde se lê “Fluxos”, leia-se “Fluxos molares relativos”
- **pág. 86:** onde se lê “0,51 mol/g/h”, leia-se “0,51 mmol/g/h”
- **pág. 91:** após “... gene *HXX1* (ROSE *et al*, 1991; KRAAKMAN *et al*, 1999)”, incluir “, e pela enzima glicoquinase.”
- **pág. 105:** onde se lê “Como os dados relativos ao mutante *snf1* não são confiáveis, nota-se ...”, leia-se “Os cálculos relativos ao mutante *snf1* devem ser rejeitados. Nota-se ...”
- **pág. 106:** após “... observada nas atividades respiratórias.”, incluir “Aparentemente, na falha do sensor, a célula não detecta a presença de glicose.”
- **pág. 109:** eliminar o item “- há indícios de que a enzima málica sofre algum tipo de regulação por glicose.”
- **pág. 110:** onde se lê “para ‘cercar’ melhor o problema”, leia-se “para melhor investigar o problema”
- **no texto em geral:** onde se lê “randômico(as)”, leia-se “aleatório(as)”

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Repressão por glicose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.2. Histórico e aplicações da Análise de Fluxos Metabólicos	13
2.3. Fundamentos teóricos da Análise de Fluxos Metabólicos	18
2.3.1. Balanço de metabólitos	18
2.3.2. Balanço de isótopos	26
2.3.3. Modelagem matemática	27
2.3.4. O caminho para a Análise de Redes Metabólicas	33
2.4. Medida da marcação em metabólitos intracelulares por GC-MS	35
2.4.1. Introdução	35
2.4.2. Espectrometria de massa	35
2.4.3. Análise de fragmentos de aminoácidos e carboidratos por GC-MS	39
3. METODOLOGIA	45
3.1. Cepas	45
3.1.1. Preservação	47
3.2. Cultivos	47
3.2.1. Inóculo	47
3.2.2. Cultivos descontínuos	48
3.2.3. Cultivos contínuos	50
3.2.4. Soluções	51
3.2.5. Esterilização	51
3.2.6. Tratamento de amostras	51
3.2.7. Tratamento matemático dos dados	55

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Cultivos realizados	61
4.2. Validação da Metodologia	63
4.3. Repressão por glicose na cepa referência	71
4.3.1. Velocidades específicas e fatores de conversão	71
4.3.2. Identificação de redes metabólicas: inspeção qualitativa dos dados de marcação	72
4.3.3. Análise de fluxos metabólicos	82
4.4. Repressão por glicose em diferentes mutantes	89
4.4.1. Velocidades específicas e fatores de conversão	89
4.4.2. Identificação de redes metabólicas: inspeção qualitativa dos dados de marcação	93
4.4.3. Análise de fluxos metabólicos	98
5. CONCLUSÕES	108
5.1. Repressão por glicose na cepa referência	108
5.2. Repressão por glicose em diferentes mutantes	109
5.3. Considerações finais	109
6. REFERÊNCIAS	112
APÊNDICE	A-1

NOMENCLATURA

Metabólitos

3PG ou G3P	3-fosfoglicerato
ACA	acetaldeído
AcCOA	acetil coenzima A
ACE	acetato
AKG	α -cetoglutarato
AMP	monofosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
cAMP	monofosfato de adenosina cíclica
C1	unidades de 1 carbono
CO ou CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
E4P	eritrose-4-fosfato
F6P	frutose-6-fosfato
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FUM	fumarato
G6P	glicose-6-fosfato
GA3P	gliceraldeído-3-fosfato
GLC	glicose
GLYC	glicerol
ICI	isocitrato
MTHF	tetrahidrofolato de metila
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
OAA	oxaloacetato
PEP	fosfoenolpiruvato
PHB	poli-hidroxibutirato
PKA	proteína quinase A
PYR	piruvato
R5P	ribose-5-fosfato
RNA	ácido ribonucleico
RU5P	ribulose-5-fosfato
S7P	sedoeptulose-7-fosfato
SUC	succinato
SUCCOA	succinil coenzima A
X5P	xilulose-5-fosfato

Subscritos

cyt	citossólico
mit	mitocondrial

Aminoácidos

Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	aspartato
Cys	cisteína
Gln	glutamina
Glu	glutamato
Gly	glicina
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
Phe	fenilalanina
Pro	prolina
Ser	serina
Thr	treonina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
Val	valina

Demais abreviaturas

AFM	análise de fluxos metabólicos
ARM	análise de redes metabólicas
DMFDMA	dimetilacetal-(N,N)-dimetilformamida
ECF	cloroformiato de etila
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas (via metabólica)
GC-MS	Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa
GPA	glicose pentaacetato
IQDM	inspeção qualitativa dos dados de marcação
MAR	marcação
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
PM	peso molecular
PP	Pentoses Fosfato (via metabólica)
TCA	Ácidos Tricarboxílicos (via metabólica, ciclo)
TFAA	anidrido do ácido trifluoroacético

Símbolos

D	vazão específica (h^{-1})
DO_{600}	densidade ótica a 600 nm
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
$Y_{x/s}$	fator de conversão substrato a células (g/g)

RESUMO

Análise de Redes Metabólicas foi aplicada à cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, e a alguns mutantes interrompidos em genes que codificam para proteínas regulatórias envolvidas no fenômeno de repressão por glicose.

Todas as cepas foram cultivadas em aerobiose, em meio mínimo contendo [1-¹³C]glicose como substrato limitante. As células eram recolhidas em situação de crescimento balanceado e submetidas à hidrólise, seguida de derivação e posterior injeção da amostra resultante num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, para análise da marcação em alguns fragmentos de metabólitos intracelulares. Estes dados serviram como base para a identificação da atividade de algumas vias metabólicas no metabolismo central de *S. cerevisiae*. Além disto, utilizando-os juntamente com um modelo estequiométrico, foi possível obter uma estimativa para os fluxos no metabolismo central na cepa referência e nos mutantes estudados.

Num primeiro momento, a metodologia foi validada para cultivos contínuos e descontínuos. Calculou-se um desvio padrão para a medida da marcação em cada fragmento de metabólito detectado pela metodologia empregada. Na cepa referência, observou-se que o ciclo de Krebs opera de forma cíclica em células que respiram e de forma não cíclica em células que apresentam metabolismo respiratório-fermentativo. Verificou-se que uma maior parte da glicose consumida é desviada para a via das pentoses fosfato no primeiro caso, em relação ao segundo. Foram encontradas evidências para a biossíntese de glicina através da enzima treonina aldolase e para a atividade da enzima málica. A ausência das proteínas Mig1 e Mig2 não altera os padrões de crescimento, produção de etanol e de marcação em metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae*. Já a ausência de Hxk2, Reg1 ou Grr1 provoca alívio na repressão por glicose, observado pelo aumento das atividades respiratórias.

ABSTRACT

Metabolic Network Analysis was applied to the reference strain CEN.PK113-7D of *Saccharomyces cerevisiae*, as well as to some mutants disrupted in genes which code for regulatory proteins involved in the glucose repression cascade.

All strains were cultivated under aerobic conditions, using minimal medium with [1-¹³C]glucose as the limiting substrate. Cells were harvested under balanced growth conditions and submitted to hydrolysis, derivatization and injection of the sample into a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer for analysis of the labeling pattern in some fragments of intracellular metabolites. These data were used for identifying the activity of some pathways in the central metabolism of *S. cerevisiae*. Furthermore, using the data together with a stoichiometric model, it was possible to estimate the fluxes in the central metabolism of the reference strain and in the mutant strains.

First, the methodology was validated for batch and continuous cultivations. Standard deviations were calculated for the measurement of the fractional labeling in each of the detected fragments. In the reference strain, it was observed that the Krebs cycle operates in a cyclic manner in respiratory cells, whereas it operates in a non cyclic manner under respiro-fermentative metabolism. It was also seen that a greater part of the glucose consumed by the cells enters the pentose phosphate pathway in the former than in the later case. Evidence for the activity of the threonine aldolase and the malic enzyme catalyzed reactions was also found. The absence of the Mig1 and Mig2 proteins does not alter the growth, ethanol formation and labeling pattern of intracellular metabolites in *S. cerevisiae*. In contrast, the absence of Hxk2, Reg1, or Grr1 provokes a relief in glucose repression, which was observed by an increased respiratory activity.

1. INTRODUÇÃO

O processo de doutoramento que resulta nesta tese foi realizado no modo chamado sanduíche. Numa primeira etapa, no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Escola Politécnica (EP) da Universidade de São Paulo (USP), foram cumpridos créditos em disciplinas e foi definido o tema a ser pesquisado na etapa seguinte, a qual se desenvolveu no Center for Process Biotechnology (CPB), Department of Biotechnology (IBT), Technical University of Denmark (DTU). Finalmente, a terceira e última etapa deste doutoramento consistiu no tratamento final dos dados e redação desta tese, a qual foi realizada no DEQ/EP/USP.

Um momento crucial neste processo foi, sem dúvida, a definição do assunto a ser pesquisado. As muitas buscas e leituras realizadas levaram à geração, em conjunto com a Profa. Beatriz V. Kilikian, do DEQ/EP/USP, e o Prof. Jens Nielsen, do CPB/IBT/DTU, do projeto intitulado “Metabolic Flux Analysis of *Saccharomyces cerevisiae*”, o qual foi aprovado pela CAPES, agência que patrocinou a etapa desenvolvida no exterior.

Os dois aspectos principais que caracterizam este trabalho encontram-se identificados no próprio título do projeto inicial. De um lado, o modelo de estudo: a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De outro, a ferramenta utilizada para estudar este modelo: a Análise de Fluxos Metabólicos.

Em relação à levedura *S. cerevisiae*, o aspecto abordado foi a chamada repressão por glicose. *S. cerevisiae* é utilizada em processos industriais para a obtenção de vários produtos, a saber: levedura de panificação, pão, bebidas alcoólicas, álcool combustível e proteínas heterólogas. Nestes processos, os meios de cultivo utilizados como fonte de nutrientes para *S. cerevisiae* podem ser o melaço de cana-de-açúcar ou de beterraba, hidrolisados de matérias amiláceas ou celulósicas, dentre outros. Todos estes meios contêm, em diferentes

quantidades e proporções, um certo número de fontes de carbono, usualmente uma mistura de açúcares (mono e dissacarídeos) (OLSSON; NIELSEN, 2000). Glicose está sempre presente nestes meios de cultura e, sendo o monossacarídeo mais abundante no planeta, provocou a adaptação do metabolismo dos microrganismos terrestres a sua detecção e consumo (JOHNSTON, 1999). De fato, um dos fenômenos regulatórios mais observados em microrganismos é a chamada repressão catabólica, ou simplesmente repressão por glicose (GANCEDO, 1998). O número de artigos científicos dedicados a este tema ilustra a importância e abrangência do mesmo. Nos últimos cinco anos, somente em termos de repressão por glicose na levedura *S. cerevisiae*, pelo menos seis revisões foram publicadas (RONNE, 1995; ENTIAN; SCHÜLLER, 1997; GANCEDO, 1998; CARLSON, 1999; JOHNSTON, 1999; THEVELEIN; DE WINDE, 1999). Apesar de importante na natureza, como forma de reduzir os gastos de energia através da adaptação do metabolismo ao consumo da fonte de carbono mais importante, a repressão por glicose pode ser bastante indesejada no âmbito industrial. Este fenômeno afeta negativamente parâmetros como produtividade e rendimento, os quais são essenciais para a viabilidade e bom desempenho dos processos.

Em relação a Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), trata-se de uma ferramenta de análise do metabolismo. Sendo o metabolismo o conjunto de todos os processos químicos que ocorrem numa célula (MADIGAN *et al*, 1997), é de extrema importância estudá-lo a fundo para entender como devemos manipular o genoma e as condições de cultivo de um organismo, no sentido de melhorar os processos de obtenção de produtos de interesse para o homem. Uma das estratégias mais utilizadas no melhoramento de organismos tem sido a indução randômica de mutações e subsequente seleção dos mutantes mais promissores, os quais são identificados por processos de "screening". No entanto, o rápido desenvolvimento da genética molecular, principalmente da tecnologia do DNA recombinante, vem possibilitando

um melhoramento genético mais dirigido, atividade denominada engenharia metabólica (STEPHANOPOULOS *et al*, 1998). Atualmente, encontram-se disponíveis protocolos experimentais para praticamente qualquer manipulação genética a ser introduzida em organismos de importância industrial. No entanto, ainda não está tão bem resolvida a questão de qual a melhor forma de se aplicar estes protocolos, ou seja, quais genes devem ser modificados e de que maneira. A dificuldade reside no fato de que as células vivas são extremamente complexas, de modo que uma determinada modificação genética raramente produz única e exclusivamente o efeito desejado. Desta forma, é importante que se compreenda a complexa relação existente entre as várias reações e mecanismos regulatórios que fazem parte do metabolismo celular, quando se objetiva obter um organismo produtor com características melhoradas.

O primeiro passo a ser seguido para um melhor entendimento dos mecanismos celulares é a observação do sistema sob diferentes condições, residindo neste ponto a importância dos chamados estudos fisiológicos. Ao mesmo tempo, uma análise detalhada torna-se complicada à medida em que a maioria das reações metabólicas ocorre dentro do ambiente celular e usualmente as medidas experimentais, como o consumo de substratos e a formação de produtos, são realizadas no meio extracelular. Se por um lado as medidas intracelulares são bem mais complexas do ponto de vista experimental, o grau de entendimento da estrutura da rede metabólica, a qual é formada por inúmeras reações, está diretamente relacionado à disponibilidade e qualidade destas medidas. O desafio de se compreender o metabolismo celular, baseando-se exclusivamente em informações sobre as trocas materiais entre os ambientes intra e extracelular, assemelha-se à tentativa de se compreender o funcionamento de uma fábrica utilizando-se unicamente dados sobre as matérias-primas utilizadas e os produtos que saem da mesma. A falta de medidas que podem ser relacionadas aos fenômenos que ocorrem

nos processos celulares é portanto um dos grandes obstáculos à compreensão dos mesmos. Neste contexto, a utilização de substratos marcados isotopicamente em cultivos de laboratório facilita a tarefa da obtenção de quantidades mensuráveis no material biológico em estudo, o que pode ser utilizado para o entendimento mais detalhado do funcionamento do metabolismo celular. Estas medidas, juntamente com exercícios de modelagem matemática, permitem que fluxos metabólicos sejam quantificados, contribuindo de forma significativa ao estudo, não somente qualitativo, mas também quantitativo, do metabolismo celular.

Dentro deste espírito, a parte experimental deste doutoramento consistiu na realização de cultivos da levedura *S. cerevisiae* em reator de pequeno volume, utilizando-se meio de cultura contendo glicose marcada com carbono 13. Através de medidas da marcação em alguns metabólitos intracelulares e da modelagem matemática do metabolismo, foi possível quantificar fluxos metabólicos. Não somente as condições ambientais foram variadas nos cultivos realizados, mas também as cepas. Diferentes mutantes de *S. cerevisiae*, interrompidos em genes regulatórios envolvidos no fenômeno de repressão por glicose, foram utilizados.

1.1. Objetivos

Verificar a influência de diferentes condições de repressão por glicose no metabolismo central (via de Embden-Meyerhof-Parnas, via das pentoses fosfato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e reações adjacentes) de *Saccharomyces cerevisiae* através da Análise de Fluxos Metabólicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Repressão por glicose em *Saccharomyces cerevisiae*

A repressão por glicose pode ser definida como o controle da expressão gênica, na etapa de transcrição, que ocorre quando as células são submetidas a diferentes concentrações de glicose. Genes envolvidos em diferentes funções celulares são afetados pela repressão por glicose. As principais funções são as seguintes (ENTIAN; SCHÜLLER, 1997; CARLSON, 1999):

- utilização de dissacarídeos;
- metabolismo de galactose;
- respiração (ou cadeia respiratória);
- ciclo dos ácidos tricarboxílicos;
- utilização de diferentes fontes de carbono;
- gliconeogênese;
- ciclo do glioxilato;
- β -oxidação (ou funções do peroxissomo).

Apesar de ter sido amplamente observada por muitas décadas, os mecanismos através dos quais a repressão por glicose ocorre não estão completamente elucidados. O gatilho ou sinal inicial, através do qual a glicose é detectada pelas células, ainda não foi identificado, mas há fortes evidências de que a fosforilação da glicose intracelular a glicose-6-fosfato pela enzima hexoquinase exerce um papel essencial na repressão por glicose (KRAAKMAN *et al*, 1999). Por outro lado, há evidências de que a concentração de glicose é mais importante do que o fluxo de consumo de glicose (o que é de certa forma contraditório ao resultado anterior) no fenômeno de repressão por glicose (MEIJER *et al*, 1998).

FIGURA 2.1 – Elementos que fazem parte da repressão por glicose. Setas normais indicam ativação/indução. Setas com final reto indicam inativação/repressão. À esquerda, está representada a via cAMP-PKA, à direita a via principal.

Há pelo menos duas vias de transdução de sinal na repressão por glicose em *S. cerevisiae*: a chamada via principal (da qual faz parte a proteína Mig1) e a via cAMP-proteína quinase A (cAMP-PKA), anteriormente conhecida como via Ras-cAMP (CARLSON, 1999; JOHNSTON, 1999; THEVELEIN; DE WINDE, 1999) (FIGURA 2.1). No primeiro caso, foi recentemente demonstrado que o papel da enzima hexoquinase 2 na repressão por glicose está relacionado à formação de um intermediário de transição estável na iminência da reação de transferência do radical fosfato (de uma molécula de ATP para uma molécula de glicose), o que gera uma modificação conformacional na enzima (KRAAKMAN *et al*, 1999). Esta modificação seria um sinal, que é então transduzido de alguma forma para uma proteína quinase chamada Snf1, provavelmente por fosforilação (CARLSON, 1999). A proteína Snf1, por sua vez, interage com a proteína Mig1, a qual se liga ao DNA (FIGURA 2.2). Para isto, a proteína Mig1 recruta a atividade de duas outras proteínas, chamadas Tup1 e Cyc8 (ou Ssn6) (WU; TRUMBLY, 1998). Mig1 é responsável pelo reconhecimento de uma seqüência específica na região promotora de genes reprimidos por glicose, enquanto que as proteínas Tup1 e Cyc8 são as que efetivamente reprimem a transcrição, impedindo que a RNA polimerase se ligue ao DNA (KLEIN *et al*, 1998). As seqüências específicas reconhecidas pela proteína Mig1 são ricas em GC (NEHLIN; RONNE, 1990). Além da proteína Mig1, existe outra proteína, chamada Mig2, que se liga a este tipo de seqüências específicas em *S. cerevisiae* e promove repressão parcial do gene *SUC2* (LUTFIYYA; JOHNSTON, 1996; LUTFIYYA *et al*, 1998). O funcionamento da repressão através de Mig1 depende da localização intracelular desta proteína, a qual por sua vez está relacionada a sua fosforilação e ao estado (ativo ou inativo) da proteína Snf1 (ÖSTLING; RONNE, 1998; TREITEL *et al*, 1998) (FIGURA 2.3).

FIGURA 2.2 – Esquema do mecanismo de repressão pela proteína Mig1. A repressão pode ocorrer tanto pela ligação de Mig1 à região promotora do gene (na figura estão representados os genes para utilização da maltose), como pela ligação de Mig1 à região promotora do ativador de transcrição do gene (no caso da figura, Mal63 é um ativador de transcrição dos genes *MAL*).

FIGURA 2.3 – Esquema da localização intracelular da proteína Mig1. Quando Snf1 está inativa (glicose alta), Mig1 não está fosforilada e migra para o núcleo, ligando-se ao DNA de genes reprimidos por glicose, promovendo repressão de sua transcrição. Quando Snf1 está ativa (glicose baixa), Mig1 é fosforilada, migrando para o citoplasma, aliviando a repressão.

A proteína quinase Snf1 tem um papel central na via principal de repressão por glicose. Sabe-se que esta proteína é ativada quando glicose é exaurida do meio e que isto ocorre por fosforilação, mas não se

sabe exatamente o que promove esta ativação. Sabe-se que o estado de ativação da proteína Snf1 depende de uma série de fatores, dentre eles: a interação com a proteína Snf4, a interação das regiões catalíticas e regulatórias da própria proteína Snf1 e a ligação física às proteínas Sip1, Sip2 e Gal83 (GANCEDO, 1998; LUDIN *et al*, 1998; CARLSON, 1999; VINCENT; CARLSON, 1999) (FIGURA 2.4).

FIGURA 2.4 – Esquema de funcionamento da proteína Snf1. Quando glicose é alta, a região regulatória de Snf1 impede que a região catalítica promova a fosforilação de Mig1. Quando glicose é baixa, Snf4 se liga à região regulatória de Snf1, liberando a região catalítica para promover a fosforilação de Mig1. Sugere-se que a proteína fosfatase tipo 1, que possui uma região catalítica codificada pelo gene *GLC7* e uma região codificada por *REG1* que direciona Glc7 para o complexo Snf1, é responsável pela desfosforilação do complexo, levando-o de volta ao estado inativo (num mutante *reg1*, o complexo Snf1 está sempre ativo). Para se tornar ativo, o complexo deve ser fosforilado, mas ainda não se conhece a quinase que fosforila Snf1.

Para ilustrar a complexidade dos sistemas regulatórios celulares, é interessante observar que algumas proteínas da cascata de repressão por glicose estão envolvidas em várias funções celulares. Observa-se na FIGURA 2.4 que a proteína fosfatase Reg1-Glc7 está envolvida na desfosforilação/ inativação da proteína Snf1. Além disto, Reg1-Glc7 também desfosforila Hxk2 (ALMS *et al*, 1999), no fenômeno de repressão por glicose. No entanto, sabe-se que a deleção de *REG1*

também afeta o acúmulo de glicogênio (HUANG *et al*, 1996), que a proteína fosfatase 1 está envolvida no metabolismo do inositol (SHIRRA; ARNDT, 1999) e que a mesma é essencial para manter a repressão do gene *ADH2* (álcool desidrogenase 2) (DOMBEK *et al*, 1999).

Outro elemento que faz parte da repressão por glicose é o ativador de transcrição Hap4. Esta proteína forma um complexo com as proteínas Hap2, Hap3 e Hap5, direcionando-as aos promotores de genes envolvidos no ciclo de Krebs (como *CIT1*, que codifica a enzima citrato sintase) e da cadeia respiratória (como citocromos e enzimas do tipo citocromo oxidase e citocromo redutase), ativando sua transcrição (ROSENKRANTZ *et al*, 1994; BLOM *et al*, 2000).

No caso de genes envolvidos em gliconeogênese, é sabido que, além de serem reprimidos por glicose, a expressão dos genes *ICL1* (isocitrato liase), *MLS1* (malato sintase), *FBP1* (frutose 1,6 bisfosfatase) e *PCK1* (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) é dependente de indução por uma via que envolve a proteína Cat8. Estes genes têm em suas regiões promotoras um sítio de ativação de transcrição chamado CSRE ("carbon source-responsive element"). Para que estes genes sejam expressos, é necessário que Snf1 esteja ativa. Não se sabe se Cat8 é capaz de ligar-se diretamente às regiões CSRE, mas sabe-se que a proteína Sip4 se liga a estas regiões (VINCENT; CARLSON, 1998; RAHNER *et al*, 1999). A ativação de Cat8 requer modificação pós-traducional, dada por fosforilação (RANDEZ-GIL *et al*, 1997). Além disto, sabe-se que Cat8 está envolvida na ativação de outras funções celulares, além da gliconeogênese (BOJUNGA; ENTIAN, 1999).

Além dos elementos descritos acima, há vários outros envolvidos na repressão por glicose. Um deles merece atenção, a proteína Grr1, que tem uma função central na detecção das condições nutricionais e que afeta a expressão dos genes *SUC2* (invertase), *HXT* (envolvidos no transporte de hexoses) e *MAL* (envolvidos no metabolismo de maltose), entre outros (BAILEY, WOODWORD, 1984; FLICK; JOHNSTON, 1991; ÖZCAN *et al*, 1994). Analogamente a outras proteínas, Grr1 está

envolvida em outras funções celulares, como por exemplo na regulação do ciclo celular (LI; JOHNSTON, 1997).

Na segunda via de transdução de sinal na repressão por glicose, a via cAMP-PKA, a enzima hexoquinase 2 também exerce um papel chave, mas neste caso este papel é diferente daquele proposto para a via principal (conforme descrito acima) (FIGURA 2.1). Na via cAMP-PKA, o papel da Hxk2 está diretamente ligado à ação catalítica desta enzima, e não à formação de um intermediário (KRAAKMAN *et al*, 1999). Para o restante da via cAMP-PKA em *S. cerevisiae*, foi recentemente proposto um novo modelo de funcionamento. Segundo este modelo, o sinal não é transmitido da glicose à enzima adenilato ciclase (que catalisa a síntese de cAMP) via as proteínas Ras, mas sim via o chamado sistema GPCR, o qual envolve as proteínas Gpr1 e Gpa2. Esta via afeta algumas das funções celulares também afetadas pela via principal, havendo portanto elementos comuns a ambas as vias. Os elementos a jusante da proteína quinase A (PKA), a qual por sua vez responde a diferentes níveis de cAMP (determinados pela atividade da enzima adenilato ciclase), ainda não foram identificados (THEVELEIN; DE WINDE, 1999).

Observa-se assim que o fenômeno de repressão por glicose envolve várias vias de transdução de sinal, paralelas e complementares, as quais envolvem vários elementos, que muitas vezes estão envolvidos em outras funções celulares. Além disto, não se sabe exatamente o papel de todos estes elementos e provavelmente há elementos que ainda não foram caracterizados. Ainda assim, para facilitar a visualização das muitas informações reunidas nesta revisão, procurou-se identificar os elementos envolvidos na repressão por glicose em *S. cerevisiae* e suas interações na FIGURA 2.1.

Sabe-se que os genes reprimidos por glicose não são sempre controlados por uma única via regulatória. Vias adicionais existem e provavelmente variam de acordo com a função celular na qual o gene está envolvido. No entanto, a maioria dos dados existentes na literatura sobre os efeitos fisiológicos da repressão por glicose são apresentados

em termos da expressão do gene *SUC2*. Este gene, envolvido na utilização de sacarose por *S. cerevisiae*, muito provavelmente não irá responder a diferentes concentrações de glicose de forma análoga a genes envolvidos em outras funções celulares como respiração, gliconeogênese, funções peroxissomais, etc. Poucos dados podem ser encontrados na literatura sobre deleções em genes envolvidos na repressão por glicose e suas consequências no metabolismo central de *S. cerevisiae*, tema do presente trabalho.

2.2. Histórico e aplicações da Análise de Fluxos Metabólicos

A Análise de Fluxos Metabólicos (AFM) pode ser definida como a quantificação dos fluxos no metabolismo de um determinado organismo, sob condições definidas. O resultado desta análise é uma “fotografia” do metabolismo, não sendo possível obter informações ligadas à dinâmica do sistema. Desta forma, a importância da AFM reside na possibilidade de se comparar diferentes “fotografias”, cada uma delas representando uma determinada condição de cultivo. Além disto, a AFM pode ser aplicada como forma de caracterização fenotípica de diferentes mutantes de um organismo, comparando-se para esta finalidade as “fotografias” dos diferentes mutantes, todos na mesma condição de cultivo. Em termos matemáticos, o problema resume-se (nos casos mais simples) a encontrar a solução para um sistema linear de equações algébricas, as quais representam a estequiometria das reações metabólicas consideradas. Por esta razão, alguns autores preferem utilizar o termo Balanço de Fluxos Metabólicos ou ainda Análise do Balanço de Fluxos (VARMA; PALSSON, 1994).

Os primeiros trabalhos que fizeram uso de um modelo estequiométrico para a interpretação de dados experimentais datam de décadas passadas (AIBA; MATSUOKA, 1979; PAPOUTSAKIS; MEYER, 1985). No entanto, somente com o trabalho de HOLMS (1986), a AFM foi introduzida como uma técnica de análise do metabolismo e mais tarde, com o trabalho de VALLINO; STEPHANOPOULOS (1990), esta técnica foi sistematizada através do uso de álgebra linear e cálculo matricial.

No início da década de 90, o rápido avanço das técnicas de biologia molecular e, principalmente, da tecnologia do DNA recombinante, aumentou muito o espectro de aplicações desta tecnologia em vários setores da biotecnologia, como por exemplo no melhoramento de organismos utilizados na obtenção de produtos de interesse para o homem. Nesta época, o termo engenharia metabólica foi introduzido por BAILEY (1991), que o definiu da seguinte forma:

“engenharia metabólica é o melhoramento das atividades celulares através da manipulação de funções enzimáticas, de transporte e regulatórias das células, fazendo uso da tecnologia do DNA recombinante”. Quase na mesma época, CAMERON; TONG (1993) definiram engenharia metabólica como “a modificação racional do metabolismo intermediário utilizando-se técnicas de DNA recombinante”. Mais recentemente, STEPHANOPOULOS *et al* (1998) propuseram a seguinte definição em seu livro texto: “engenharia metabólica é o melhoramento dirigido da formação de produto ou de propriedades celulares através da modificação de reações bioquímicas específicas ou da introdução de novas reações fazendo uso da tecnologia do DNA recombinante”. Observa-se assim que a engenharia metabólica envolve análise e modificação de vias metabólicas, e que o resultado final é sempre o metabolismo modificado com um determinado propósito. Definido o propósito, deve-se estabelecer as modificações genéticas a serem introduzidas no organismo. Nesta etapa, é essencial realizar uma análise detalhada do metabolismo, lançando mão de várias ferramentas analíticas e matemáticas, como por exemplo a análise de expressão gênica em termos de mRNA, a medida das concentrações de metabólitos intracelulares, a caracterização de proteínas e a análise de vias metabólicas (OSTERGAARD *et al*, 2000) (FIGURA 2.5). Neste ponto, observa-se que há uma interface entre engenharia metabólica e bioinformática, à medida em que análises do genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma fornecerão informações importantíssimas para a análise do metabolismo (EDWARDS; PALSSON, 1998; BASSETT JR *et al*, 1999; PANDEY; MANN, 2000).

Para a análise de vias metabólicas, uma das ferramentas mais eficientes é a Análise de Fluxos Metabólicos (NIELSEN, 1998). A AFM traz informações preciosas sobre o funcionamento do metabolismo de um organismo numa determinada condição e pode ser utilizada, em conjunto com outras ferramentas analíticas e matemáticas, para se atingir os objetivos da engenharia metabólica (FIGURA 2.5).

FIGURA 2.5 – Representação dos componentes de análise e síntese em engenharia metabólica. Na parte de análise, ferramentas analíticas e matemáticas são utilizadas para investigar o metabolismo, dando subsídios para as modificações genéticas a serem introduzidas na parte de síntese. Após realizadas as modificações, retorna-se à parte de análise para verificar o efeito das mesmas. Este processo iterativo ocorre até que um determinado propósito seja atingido. (Adaptado de OSTERGAARD *et al*, 2000, com permissão do autor).

É possível extrair uma série de informações sobre o metabolismo através da aplicação da AFM. Estas informações podem ser divididas em alguns casos típicos, os quais encontram-se ilustrados abaixo com alguns exemplos da literatura:

- a identificação de possíveis nós rígidos (“rigid nodes”) na rede metabólica de *Corynebacterium glutamicum*, os quais constituem potenciais sítios de modificações genéticas a serem introduzidas para a otimização da produção de lisina (STEPHANOPOULOS; VALLINO, 1991; VALLINO; STEPHANOPOULOS, 1993). Variando-se as condições de operação do reator, é possível verificar qual o efeito de diferentes vazões específicas na distribuição dos fluxos metabólicos pelos diferentes nós do metabolismo, o que serve para identificar as reações que limitam o fluxo por uma determinada via metabólica;
- a identificação da existência de vias diferentes daquelas normalmente esperadas numa determinada condição de cultivo, como a atividade de algumas enzimas em *Saccharomyces cerevisiae* (NISSEN *et al*, 1997);
- o cálculo de fluxos extracelulares não medidos e a identificação de erros nas determinações analíticas (STEPHANOPOULOS *et al*, 1998);
- o cálculo do rendimento teórico máximo para um determinado par substrato/produto (JØRGENSEN *et al*, 1995);
- a análise da inserção de vias alternativas e/ou da superexpressão ou deleção de algum(s) gene(s) na distribuição dos fluxos metabólicos, o que caracteriza praticamente a simulação de modificações genéticas previamente a sua introdução na célula (JØRGENSEN *et al*, 1995; NISSEN, 1999).

Além dos exemplos acima, são apresentadas na [TABELA 2.1](#) aplicações recentes de AFM. A diversidade dos sistemas biológicos investigados ilustra o amplo espectro e os potenciais de aplicação da AFM.

TABELA 2.1 – Exemplos recentes de aplicações da Análise de Fluxos Metabólicos (GOMBERT; NIELSEN, 2000)

Sistema investigado	Tipo de análise	Aplicação*	Principais resultados da análise	Referência
Produção de proteases alcalinas por <i>B. licheniformis</i>	AFM + programação linear	(a)	Projeto de uma estratégia de transferência de oxigênio em biorreator para a produção de proteases alcalinas (não verificado experimentalmente)	ÇALIK <i>et al</i> (1999)
Mutantes de <i>E. coli</i> que não contêm a via de produção de acetato (genes <i>ackA-pta</i>)	AFM	(b)	Mutações em ambos os genes <i>ackA-pta</i> e <i>nuo</i> (codificam para a NADH:ubiquinona desidrogenase) são requeridas para a redução do fluxo através da reação catalisada pela enzima piruvato-formiato-liase	YANG <i>et al</i> (1999)
<i>E. coli</i> expressando o gene da acetolactato sintase de <i>B. subtilis</i>	AFM	(b)	Redução da formação de acetato e aumento da formação de acetoína, que é menos tóxica ao crescimento e formação de proteínas heterólogas	ARISTIDOU <i>et al</i> (1999)
<i>E. coli</i> expressando o operon <i>phb</i> de <i>R. eutropha</i>	AFM + programação linear	(b)	Para maximizar o rendimento de PHB, as disponibilidades tanto de acetil CoA como de NADPH devem ser aumentadas (resultados experimentais não estão de acordo com as previsões da AFM)	SHI <i>et al</i> (1999)
Produção de piruvato por <i>T. glabrata</i>	AFM	(a)	A produção de piruvato é principalmente afetada pelos fluxos através das reações catalisadas pelas enzimas piruvato desidrogenase e piruvato descarboxilase. Uma estratégia de alimentação de tiamina e a influência do oxigênio dissolvido no acúmulo de piruvato também foram investigados	HUA <i>et al</i> (1999)
Produção de IgG contra fribronectina humana por células de hibridoma murino	AFM	(a)	Interpretação da multiplicidade de estados estacionários (diferentes concentrações celulares na mesma taxa de diluição) como diferentes formas de utilização de piruvato no ciclo de Krebs	FOLLSTAD <i>et al</i> (1999)
Fermentação de <i>Z. mobilis</i> selvagem e recombinante em glicose, frutose e xilose	AFM + experimentos de marcação	(a) (b)	Síntese de ribose-5-fosfato ocorre principalmente via reação catalisada pela enzima transcetolase. Evidências para a operação reversível das enzimas ribose-5-fosfato isomerase, fosfoglicoisomerase e ribulose-5-fosfato epimerase. Identificação de atividade da enzima xiluloquinase como a etapa controladora da velocidade de produção de etanol em <i>Z. mobilis</i> recombinante	DE GRAAF <i>et al</i> (1999)
Produção de PHB em culturas mistas de <i>L. delbrueckii</i> e <i>A. eutrophus</i>	AFM	(a)	NADPH gerado na reação catalisada pela enzima isocitrato desidrogenase em <i>A. eutrophus</i> é usado principalmente na conversão de α -cetoglutarato a glutamato quando NH_3 é abundante, enquanto que em baixas concentrações de NH_3 o NADPH é utilizado na formação de PHB	KATOH <i>et al</i> (1999)
Co-metabolismo de citrato e glicose em <i>B. subtilis</i>	AFM	(a)	Alimentação simultânea de citrato e glicose reduz a formação de ácidos e aumenta a conversão substrato a células devido à atenuação do fluxo pela enzima piruvato quinase	GOEL <i>et al</i> (1999)
Remoção biológica de fósforo (“enhanced biological phosphorous removal, EBPR”)	AFM + programação linear	(a)	Provavelmente a primeira tentativa de aplicação de AFM a uma cultura mista e indefinida. A degradação de polímeros e o consumo ou liberação de fosfato e acetato num sistema EBPR foram simulados pelo modelo, mas os resultados diferiram em até 55% em relação aos dados experimentais	PRAMANIK <i>et al</i> (1999)

*Aplicação:

- (a) mesmas células sob diferentes condições de cultivo
- (b) diferentes mutantes nas mesmas condições de cultivo

2.3. Fundamentos teóricos da Análise de Fluxos Metabólicos

2.3.1. Balanço de metabólitos

A AFM é aplicada através de um modelo estequiométrico que representa o metabolismo do organismo nas condições de estudo. As reações que fazem parte deste modelo matemático podem ser normalmente encontradas na literatura, em livros texto e artigos científicos de bioquímica, havendo às vezes a necessidade de se confirmar alguma reação específica para o organismo/condições estudados através de análises experimentais. O modelo estequiométrico baseia-se na aplicação de balanços de massa aos metabólitos considerados, sendo que para os metabólitos internos assume-se a hipótese de pseudo estado estacionário, o que significa que as reações de formação de cada um destes metabólitos internos balanceiam as reações de consumo do respectivo metabólito (ou que não há acúmulo de metabólitos internos). Alguns metabólitos, como substratos e produtos, quando incluídos no modelo, têm acúmulo não nulo e a eles não se aplica esta hipótese. O problema pode ser representado matematicamente por:

$$S \times v = 0 \quad (2.1)$$

onde S é a chamada matriz estequiométrica e v é o vetor de fluxos (que contém os fluxos a serem determinados). Para ilustrar a aplicação desta equação, será utilizado o exemplo de rede metabólica representado na **FIGURA 2.6**. Aplicando-se balanços de massa aos 5 metabólitos da rede, obtém-se:

$$\begin{aligned} \text{A:} & \quad -v_1 = -b_1 + b_4 \\ \text{B:} & \quad +v_1 - v_2 - v_3 = 0 \\ \text{C:} & \quad +v_2 = b_2 \\ \text{D:} & \quad +v_3 - v_4 = 0 \\ \text{E:} & \quad +v_4 = b_3 \end{aligned} \quad (2.2)$$

FIGURA 2.6 - Esquema de rede metabólica consistindo de 5 metabólitos internos e 8 fluxos. As fronteiras do sistema estão indicadas em tracejado. O “pool” intracelular indicado pode ser por exemplo de proteínas.

Colocando as equações 2.2 no formato matricial da equação 2.1, temos:

$$S = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

$$v = [v_1 \quad v_2 \quad v_3 \quad v_4 \quad b_1 \quad b_2 \quad b_3 \quad b_4]^T \quad (2.4)$$

Este sistema linear contém 5 equações linearmente independentes e 8 incógnitas: os fluxos internos v_1 a v_4 e os fluxos de fronteira b_1 a b_4 . Portanto, é um sistema indeterminado com três graus de liberdade e torna-se necessário impor três restrições a este sistema para que os fluxos possam ser calculados. Isto é normalmente realizado através da medida de alguns dos fluxos do vetor v . No caso da FIGURA 2.6, poder-se-ia medir os fluxos b_1 a b_3 (que corresponderiam, por exemplo, ao consumo de substrato e à formação de produtos de fermentação) e o sistema se tornaria determinado. A medida de outro conjunto de 3 fluxos poderia ser utilizada, porém é experimentalmente

mais difícil medir fluxos internos que fluxos de fronteira. Para obter a solução deste sistema linear, agora determinado, é conveniente utilizar álgebra matricial, separando-se o vetor v em dois vetores: v_m , que contém os fluxos medidos e v_c , que contém os fluxos a serem calculados. Analogamente, os elementos da matriz estequiométrica S que correspondem aos fluxos medidos são realocados numa matriz S_m e o restante numa matriz S_c . Desta forma, a equação 2.1 pode ser reescrita como:

$$S \times v = S_m \times v_m + S_c \times v_c = 0 \quad (2.5)$$

onde:

$$S_m = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}, \quad v_m = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \end{bmatrix}, \quad S_c = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad e \quad v_c = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ b_4 \end{bmatrix}$$

Sempre que o sistema linear de equações em estudo for determinado, a matriz S_c será quadrada e o problema do cálculo de fluxos pode ser resolvido através da seguinte equação:

$$v_c = -(S_c)^{-1} \times S_m \times v_m \quad (2.6)$$

Conforme mencionado acima, no caso da FIGURA 2.6, a escolha do conjunto de fluxos medidos b_1 a b_3 é arbitrária. Como é difícil medir fluxos internos (v_1 a v_4 no exemplo acima), alguma das medidas b_1 a b_3 poderia ser substituída pela medida do fluxo b_4 (através por exemplo da determinação do teor de proteína intracelular). O sistema resultante seria igualmente determinado e a resolução dada de modo análogo ao indicado na equação 2.6, substituído-se adequadamente os elementos das matrizes S_m , v_m , S_c e v_c . No caso de haver mais medidas disponíveis

que o número de graus de liberdade do sistema (por exemplo, se todo o conjunto de fluxos b_1 a b_4 puder ser determinado experimentalmente), o mesmo se tornará sobredeterminado, o que significa que há um maior número de equações do que o estritamente necessário para resolução do sistema. Este grau de redundância pode ser utilizado para verificar a consistência dos balanços de massa, a precisão das determinações experimentais dos fluxos medidos e a validade da hipótese de pseudo estado estacionário. Neste caso, a matriz S_c não será quadrada e portanto não pode ser invertida. No entanto, a solução do problema é dada de forma análoga ao apresentado na equação 2.6, utilizando-se a pseudo inversa da matriz S_c (STEPHANOPOULOS et al, 1998). No caso de haver menos medidas disponíveis que o número de graus de liberdade do sistema, o mesmo permanecerá indeterminado e o problema do cálculo de fluxos metabólicos só poderá ser resolvido se restrições adicionais forem introduzidas ou se um critério de otimização for imposto (por exemplo, a maximização do crescimento). Neste caso, pode-se utilizar algum dos algoritmos de programação linear disponíveis para definir o conjunto de fluxos que satisfaça a uma determinada função objetivo (VARMA; PALSSON, 1994) (FIGURA 2.8).

É interessante observar que, para que este tipo de análise do metabolismo seja coerente, torna-se necessário incluir no modelo estequiométrico os balanços de co-fatores, como as coenzimas NADH e NADPH, além de ATP. No exemplo da FIGURA 2.6 não foram incluídos co-fatores, com o intuito de simplificar a apresentação da metodologia. No caso de NADH e NADPH, sabe-se que as reações que geram estes co-fatores na forma reduzida devem balancear as reações que geram suas respectivas formas oxidadas. As restrições impostas ao sistema por estes balanços de óxido-redução são normalmente sujeitas a incertezas, principalmente sob aerobiose, em função da variação da razão P/O (ou o número de moles de ATP gerado por mol de oxigênio consumido) na cadeia respiratória, o que faz com que estas restrições não sejam sempre realistas. No caso de ATP, deve-se sempre incluir no modelo

uma reação de consumo do excesso de ATP, já que as células sempre produzem mais ATP do que necessitam, perdendo uma parte sob a forma de calor. Além disto, reações que consomem ATP, como as que fazem parte dos chamados ciclos fúteis e o transporte de metabólitos entre os vários compartimentos celulares, não são usualmente levadas em consideração no modelo estequiométrico.

Além das aproximações acima, outra limitação que pode surgir através da aplicação desta análise ocorre quando a rede metabólica em estudo apresenta duas vias paralelas que levam de um determinado metabólito interno a outro. Este problema pode ser ilustrado pelo exemplo da rede metabólica da FIGURA 2.6, se for incluída a reação v_5 (FIGURA 2.7). Observa-se que o metabólito C pode ser formado a partir de B pela via que envolve a reação v_2 ou pela via que envolve as reações v_3 a v_5 .

FIGURA 2.7 - Esquema de rede metabólica consistindo de 5 metabólitos internos e 9 fluxos. As fronteiras do sistema estão indicadas em tracejado. O “pool” intracelular indicado pode ser por exemplo de proteínas. Esta rede é obtida a partir da rede apresentada na FIGURA 2.6, incluindo-se a reação do metabólito E para o metabólito C.

Neste caso, traduzindo a rede da FIGURA 2.7 para a forma da equação 2.1, obtém-se:

$$S = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} e \quad v = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

Neste caso, o sistema linear apresenta 5 equações linearmente independentes e 9 incógnitas, concluindo-se que o grau de liberdade do sistema é igual a 4. No entanto, não é possível determinar os fluxos v_1 a v_5 , medindo-se os 4 fluxos de fronteira b_1 a b_4 . Isto ocorre porque a matriz S_c gerada neste caso (conforme equação 2.5) seria singular e portanto não poderia ser invertida (a equação 2.6 não poderia ser aplicada). Isto é decorrência da estrutura da rede metabólica da FIGURA 2.7, que, conforme mencionado acima, tem duas vias paralelas que levam do metabólito B ao metabólito C. A única forma de se resolver este problema é através da imposição de restrições adicionais (como a hipótese do funcionamento ou não de algumas vias metabólicas) ou através da escolha de um conjunto diferente de fluxos medidos. Se forem escolhidos os fluxos b_1 a b_3 e o fluxo v_5 , o sistema se tornaria determinado e a matriz S_c gerada neste caso não seria singular, podendo-se resolver o problema através da equação 2.6. No entanto, pode ser experimentalmente muito complicado medir v_5 , pois é um fluxo interno.

De uma forma geral, a AFM pode ser aplicada medindo-se o consumo de substratos e a formação de produtos num cultivo, utilizando-se estes valores como restrições ao modelo estequiométrico. Devido à característica das redes metabólicas dos organismos vivos, é possível obter um sistema determinado e portanto calcular os fluxos (desde que não sejam incluídas reversibilidades nas reações do modelo

estequiométrico, o que geraria singularidade na matriz S_0). Existem algumas alternativas adicionais, mais elaboradas, quanto à forma de se analisar uma rede metabólica, partindo-se da matriz estequiométrica S . A realização de experimentos com traçadores isotópicos, que agrega o balanço de isótopos ao balanço de metabólitos, é uma delas (ver item 2.3.2). Outra possibilidade é a aplicação de análise convexa, através da qual é possível calcular os chamados modos de fluxo elementares, os quais trazem importantes informações sobre a estrutura da rede metabólica. Esta análise tem, inclusive, potencial de aplicação dentro do escopo da análise funcional (CORNISH-BOWDEN; CÁRDENAS, 2000; GOMBERT; NIELSEN, 2000; SCHUSTER *et al*, 2000) ([FIGURA 2.8](#)).

FIGURA 2.8 – Princípios de modelagem estequiométrica para AFM. Primeiramente, a matriz estequiométrica é definida em função da rede metabólica em estudo. Em seguida, a matriz estequiométrica é multiplicada pelo vetor de fluxos, definindo a equação de balanços de massa. Finalmente, pode-se manipular a matriz estequiométrica de diferentes formas, dependendo do objetivo da análise. A) É possível impor restrições medindo-se alguns fluxos, de modo que o sistema se torne determinado e resolvido por álgebra linear simples. B) Se restrições adicionais são impostas através da medida da marcação em alguns metabólitos intracelulares, pode-se combinar o balanço de metabólitos com o balanço de isótopos e o sistema será resolvido numericamente. Neste caso, melhores estimativas para os fluxos são normalmente obtidas. C) Se as restrições não são suficientes para tornar o sistema determinado, pode-se aplicar programação linear (otimização) para encontrar o máximo ou mínimo de uma função objetivo. D) Ao invés de calcular soluções particulares, é possível obter informações sobre a estrutura de redes metabólicas através da aplicação de análise convexa, calculando-se os chamados modos elementares de fluxo. E) Outra alternativa é o cálculo de vetores que formam a base do espaço nulo correspondente à matriz estequiométrica, desde que estes vetores tenham um significado bioquímico.

2.3.2. Balanço de isótopos

Os problemas e limitações da AFM, conforme descritos no item anterior, os quais levam geralmente à singularidade da matriz S_c , podem ser contornados aplicando-se restrições ao sistema através da realização de experimentos com traçadores isotópicos (CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999). Experimentos que utilizam substratos marcados, como por exemplo glicose 100% marcada no carbono 1 ($[1-^{13}\text{C}]$ glicose), permitem que balanços de massa sejam aplicados a átomos de carbono individuais, os quais são diferenciados dos outros por serem mais pesados. Desta forma, restrições adicionais são aplicadas ao sistema além daquelas impostas pelos balanços em torno dos metabólitos, e a necessidade de balancear co-fatores e ATP é dispensada. Para esta finalidade, torna-se necessário identificar e quantificar estes átomos marcados no momento em que as células encontram-se num estado fisiológico bem definido, normalmente o estado estacionário de um cultivo contínuo ou a fase exponencial de um cultivo descontínuo. Esta quantificação pode ser obtida através de NMR ou GC-MS (SZYPERSKI, 1998). O princípio da aplicação do balanço de isótopos encontra-se ilustrado na **FIGURA 2.9**.

FIGURA 2.9 - Princípio de aplicação do balanço de metabólitos (à esquerda) e de isótopos (à direita). Duas reações, com fluxos x e y , levam à formação do produto Z , o qual pode ser quantificado (80 unidades arbitrárias). A marcação nos metabólitos está indicada pelos retângulos e os valores são dados em porcentagem. Utilizando-se o balanço de metabólitos somente, não é possível quantificar os fluxos x e y . Agregando-se o balanço de isótopos, calcula-se o valor dos fluxos x e y , ambos iguais a 40 (adaptado de CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999).

2.3.3. Modelagem matemática

Ao contrário dos sistemas lineares obtidos através da aplicação da AFM convencional, os modelos matemáticos que representam a combinação dos balanços de metabólitos com os balanços de isótopos são não-lineares. Ganha-se portanto em precisão na estimativa dos fluxos metabólicos, mas ganha-se também em termos de complexidade do equacionamento matemático, o que significa que métodos numéricos mais sofisticados devem ser utilizados. Através de um exemplo simples, ilustrado na [FIGURA 2.10](#), é possível verificar como a solução é obtida neste casos (CHRISTENSEN; NIELSEN, 2000).

Na rede metabólica indicada na [FIGURA 2.10](#), não é possível obter uma quantificação completa dos fluxos através de um simples balanço de massa em torno dos metabólitos intracelulares, mesmo que as velocidades de formação dos produtos B_p e C_p e a velocidade de consumo do substrato S sejam conhecidas. Isto pode ser observado através da aplicação de balanços de massa aos metabólitos intracelulares (equação 2.8), o que gera um sistema indeterminado, se valores numéricos forem introduzidos no lugar das variáveis r_4 e r_5 . Por outro lado, se o substrato S for especificamente marcado em um dos dois átomos de carbono, o conjunto completo de fluxos r_1 a r_5 pode ser determinado, se as marcações dos dois átomos do produto C_p forem medidos. A rotina para estimativa dos fluxos funciona da seguinte maneira. Primeiramente, são estabelecidos os balanços de massa em torno dos metabólitos A, B e C:

$$\begin{aligned} 100 - r_1 - r_2 &= 0 \\ r_2 - r_3 - r_4 &= 0 \\ r_1 + r_3 - r_5 &= 0 \end{aligned} \tag{2.8}$$

FIGURA 2.10 - O substrato S, composto de 2 carbonos (S₁ e S₂), é convertido nos produtos B_p e C_p através dos intermediários A, B e C. O consumo de S é arbitrariamente fixado em 100. As transições dos átomos de carbono estão indicadas à direita. O ponto-chave desta rede metabólica é que a origem dos átomos de carbono no composto C depende da utilização relativa das vias de consumo do substrato S, já que a reação de A para B inverte a ordem destes átomos. (Adaptado de CHRISTENSEN; NIELSEN, 2000).

Fazendo-se as devidas substituições, pode-se representar o conjunto total de fluxos, r_{tot} , em função de dois fluxos apenas, os quais passam a ser denominados fluxos independentes:

$$r_{tot} = \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ r_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_1 \\ 100 - r_1 \\ r_3 \\ 100 - r_1 - r_3 \\ r_1 + r_3 \end{bmatrix} \quad (2.9)$$

Analogamente aos balanços de massa em torno dos metabólitos, pode-se aplicar balanços de massa em torno dos átomos de carbono individuais, sendo S₁, S₂, A₁, A₂, ... a marcação nos átomos de carbono S₁, S₂, A₁, A₂, ..., respectivamente:

$$\begin{aligned}
-(r_1 + r_2)A_1 &= -100S_1 \\
-(r_1 + r_2)A_2 &= -100S_2 \\
r_2A_2 - (r_3 + r_4)B_1 &= 0 \\
r_2A_1 - (r_3 + r_4)B_2 &= 0 \\
r_1A_1 + r_3B_1 - r_5C_1 &= 0 \\
r_1A_2 + r_3B_2 - r_5C_2 &= 0
\end{aligned} \tag{2.10}$$

Agrupando-se as equações acima sob a forma de um produto de matrizes, obtém-se:

$$\begin{bmatrix}
-(r_1 + r_2) & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & -(r_1 + r_2) & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & r_2 & -(r_3 + r_4) & 0 & 0 & 0 \\
r_2 & 0 & 0 & -(r_3 + r_4) & 0 & 0 \\
r_1 & 0 & r_3 & 0 & -r_5 & 0 \\
0 & r_1 & 0 & r_3 & 0 & -r_5
\end{bmatrix}
\begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ B_1 \\ B_2 \\ C_1 \\ C_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -100S_1 \\ -100S_2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \tag{2.11}$$

Utilizando-se notação matricial, a equação 2.11 pode ser transformada na equação 2.12, na qual todas as marcações encontram-se no vetor X :

$$M \times X = v \tag{2.12}$$

Desta forma, dado um conjunto de fluxos (matriz M), a equação 2.12 pode ser resolvida para as marcações, por simples inversão da matriz M :

$$X = M^{-1} \times v \tag{2.13}$$

É importante neste ponto diferenciar o termo marcação, quando aplicado a um átomo de carbono individual (por exemplo na posição 3 do piruvato), do mesmo termo quando aplicado a uma molécula inteira, por exemplo o piruvato com todos os seus carbonos. No primeiro caso, a marcação indica *a proporção de átomos de carbono na posição 3 do*

piruvato que são marcados, ou seja, que possuem massa 13. No segundo caso, a marcação indica *o número médio de átomos de carbono marcados por molécula de piruvato*. Deve-se observar que a marcação em uma molécula é igual à soma das marcações nos seus átomos de carbono individuais. Uma ilustração simples é apresentada na [FIGURA 2.11](#).

FIGURA 2.11 – Ilustração do conceito de marcação. Os átomos em negro têm massa 13 e os átomos em branco têm massa 12. Considerando a distribuição isotopomérica hipotética de uma molécula de 3 átomos de carbono, se há um total de 10 moléculas numa amostra, observa-se que a marcação no C1 (carbono 1) é igual a 0,8, pois em 8 das 10 moléculas existentes, o carbono que ocupa a posição 1 tem massa 13. Analogamente, a marcação em C2 é igual a 0,3 e em C3 é igual a 0,0. Conclui-se que a marcação na molécula toda é igual a $0,8 + 0,3 + 0,0 = 1,1$.

O algoritmo numérico utilizado para o cálculo dos fluxos metabólicos funciona da seguinte forma. Faz-se uma primeira estimativa dos fluxos independentes (no caso do exemplo acima, os fluxos r_1 e r_3), calcula-se o conjunto inteiro de fluxos (equação 2.9), substitui-se estes fluxos na matriz M e, conhecendo-se o consumo de substrato (vetor v), calcula-se o vetor X através da equação 2.13. A marcação em cada composto medido (por GC-MS, por exemplo) é calculada somando-se as marcações nos átomos de carbono individuais presentes neste composto. (Para um composto A qualquer de 2 carbonos, se as marcações são $A_1 = 0,15$ e $A_2 = 0,42$, a marcação na molécula será 0,57.) Em seguida, um erro é calculado comparando-se os valores calculados com os valores medidos. Ao mesmo tempo, um erro é calculado comparando-se os fluxos calculados r_4 e r_5 com os valores medidos. O erro total é então minimizado por um algoritmo evolucionário (SCHMIDT; ISAACS, 1995), o qual gera novas estimativas

para os fluxos independentes a cada iteração, até que um conjunto de fluxos que atenda a um determinado critério seja obtido. Este critério pode ser, por exemplo, um erro máximo. Um esquema do processo de minimização do erro entre as medidas experimentais e os resultados dos cálculos a cada iteração é apresentado na [FIGURA 2.12](#).

Os algoritmos evolucionários são técnicas de otimização diretas, isto é, não fazem uso do cálculo de derivadas. Elementos básicos de evolução biológica são aplicados, assumindo-se portanto que mudanças randômicas nas propriedades de um sistema irão ocasionalmente gerar uma melhoria. Desta forma, pequenas mudanças são provocadas randomicamente no sistema e o desempenho do sistema alterado é comparado ao sistema original para selecionamento do melhor entre ambos. O melhor sistema passa então a ser o sistema original e novas mudanças são provocadas randomicamente. Estes algoritmos são chamados evolucionários devido a sua analogia com a teoria da seleção natural proposta por Charles Darwin, segundo a qual mutações ocorrem aleatoriamente em sistemas biológicos, após o que sobrevivem os “mais fortes”. As principais vantagens da utilização deste tipo de algoritmo na estimativa de parâmetros em modelos bioquímicos complexos são sua fácil implementação e a capacidade de resolver problemas sofisticados num tempo razoável sem encontrar complicações numéricas (SCHMIDT; ISAACS, 1995). Um esquema do funcionamento deste tipo de algoritmo é apresentado na [FIGURA 2.13](#).

Apesar de mais complexa, a modelagem matemática de experimentos que fazem uso de traçadores isotópicos possibilita a solução de problemas que não podem ser resolvidos pela modelagem de experimentos que não fazem uso de traçadores (como o exemplo da [FIGURA 2.10](#)). Uma comparação entre as duas abordagens é feita por SCHMIDT *et al* (1998). Além disto, é possível incluir fluxos reversíveis, compartimentação e “channeling” (MARX *et al*, 1996), o que torna a análise do metabolismo bem mais completa. Normalmente, a modelagem é feita em estado estacionário, pois esta condição simplifica

tanto a formulação quanto a resolução do problema matemático (SAUER *et al*, 1997; MARX *et al*, 1996) e portanto a metodologia pode ser aplicada a cultivos contínuos em estado estacionário (CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999).

FIGURA 2.12 – Esquema do processo iterativo utilizado neste trabalho para a estimativa de fluxos metabólicos em experimentos com substrato marcado. O processo é terminado quando um erro aceitável é atingido.

FIGURA 2.13 – Esquema de um algoritmo evolucionário para a estimativa de parâmetros. O desempenho pode ser medido pela soma dos quadrados dos erros entre os valores medidos e os dados simulados. (Adaptado de SCHMIDT; ISAACS, 1995).

2.3.4. O caminho para a Análise de Redes Metabólicas

A capacidade de investigação de redes metabólicas tem aumentado nos últimos anos, principalmente em função do desenvolvimento de métodos analíticos e de métodos matemáticos cada vez mais poderosos. Portanto, as possibilidades de se extrair informações de redes metabólicas cada vez mais complexas, utilizando-se uma combinação do balanço de metabólitos (como na Análise de Fluxos Metabólicos tradicional, [item 2.3.1](#)) com experimentos que fazem uso de substratos marcados, são cada vez maiores. Informações como a

identificação de vias metabólicas, a compartimentação de metabólitos e enzimas, a análise de ciclos fúteis, o “channeling” metabólico e a reversibilidade de reações são alguns exemplos dos resultados que podem ser obtidos através da combinação destas técnicas, o que vai muito além de uma simples quantificação dos fluxos metabólicos de um organismo numa determinada condição. Sugere-se ainda que este tipo de análise pode ter um papel importante em análise funcional, aspecto de extrema relevância dada a alta velocidade com que genomas completos de organismos vêm sendo publicados (CORNISH-BROWN; CÁRDENAS, 2000). Por esta razão, o termo Análise de Fluxos Metabólicos talvez não represente exatamente a amplitude desejada e sugere-se que o termo Análise de Redes Metabólicas seja mais apropriado para caracterizar este tipo de análise (CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999).

2.4. Medida da marcação em metabólitos intracelulares por GC-MS

2.4.1. Introdução

Uma das principais técnicas analíticas utilizadas neste trabalho é a combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (GC-MS). Seu papel é central na medida da marcação em alguns aminoácidos e carboidratos de *S. cerevisiae*. Esta informação pode ser utilizada para deduzir a marcação nos átomos de carbono dos precursores destes aminoácidos e carboidratos (precursores são metabólitos desviados das vias metabólicas centrais para as rotas de biossíntese). Os valores de marcação obtidos através desta determinação analítica são utilizados no cálculo de fluxos metabólicos.

A cromatografia gasosa é uma técnica bastante conhecida e difundida, tanto nos meios de pesquisa, quanto no meio industrial para o controle de qualidade em processos. Suas principais vantagens são a alta sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez. É considerada a técnica mais importante para a separação de compostos de baixa polaridade (WILSON, 1994). Não será dada aqui uma descrição detalhada desta técnica analítica, pois a mesma já é bem conhecida e descrita na literatura. Além disto, a etapa cromatográfica apenas separa os compostos da mistura, enquanto que a espectrometria de massa é responsável pelas medidas de marcação.

2.4.2. Espectrometria de massa (SILVERSTEIN *et al*, 1991; GORDON, 1994)

Espectros de massa, de infravermelho, de ressonância magnética nuclear e de ultravioleta são freqüentemente utilizados (de forma complementar ou independente) na identificação de compostos orgânicos. Essencialmente, a molécula a ser analisada é submetida a campos de energia e a resposta da molécula a estes campos é gravada na forma de espectros.

Princípio de detecção

A forma de espectrometria de massa (MS) mais utilizada é a de impacto de elétrons (EI), na qual as moléculas a serem analisadas, encontrando-se na fase gasosa, são bombardeadas por um feixe de elétrons e o resultado do impacto dos elétrons é gravado como um espectro de íons positivos separados com base nas suas diferentes relações massa/carga (m/z). A maioria destes íons apresenta apenas uma carga positiva. A espectrometria de massa, quando de alta resolução, fornece como resultado uma fórmula molecular única, podendo-se utilizá-la, portanto, para identificar os componentes de uma mistura. Isto é possível devido ao fato de as massas atômicas dos elementos que compõem uma molécula não serem números inteiros.

O espectro de massa

Espectros de massa são normalmente obtidos utilizando-se um feixe de elétrons de energia 70 eV. O evento mais simples que ocorre é a remoção de um elétron da molécula na fase gasosa, por um elétron do feixe, formando-se um íon molecular, o qual é um cátion radical ($M^{\cdot+}$). No caso do metanol, a formação do íon molecular pode ser representada por:

O ponto representa o elétron desemparelhado. Muitos destes íons moleculares são desintegrados em 10^{-10} — 10^{-3} s, resultando, no caso mais simples, num fragmento carregado positivamente e num radical (equação 2.15). Desta forma, diferentes íons fragmentados são formados e cada um deles pode ser clivado gerando fragmentos menores.

Utilizando-se ainda o metanol como exemplo, pode-se representar alguns fragmentos:

Se alguns dos íons moleculares (parentais) permanecerem intactos o suficiente para que sejam detectados, observa-se no espectro um pico correspondente ao íon molecular. É importante que este pico seja reconhecido, pois o mesmo fornece a massa molecular do composto analisado.

Um espectro de massa (FIGURA 2.14) é portanto a representação das massas dos fragmentos carregados (incluindo o íon molecular) em função de suas concentrações relativas. Ao pico mais intenso no espectro (denominado pico base) é atribuído o valor 100%, enquanto os outros picos apresentam intensidades relativas a este pico base. Além disto, o pico correspondente ao íon molecular é normalmente o pico de maior massa, com exceção dos picos relativos aos isótopos.

Cromatografia gasosa - Espectrometria de massa (GC-MS)

Em muitos casos, torna-se interessante a utilização de um cromatógrafo gasoso (GC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS), pois a concentração da amostra no gás de arraste é aumentada. Os tempos de análise são suficientemente rápidos, permitindo que vários espectros de massa sejam obtidos a partir da eluição de um simples pico do cromatógrafo gasoso.

FIGURA 2.14 - Espectro de massa do *n*-butano, obtido por ionização de impacto de elétrons (EI). A abundância relativa é uma escala normalizada de 0 a 100%. O pico base (43) tem a intensidade 100% e os outros são calculados relativamente a este. O pico de maior massa (58) corresponde ao íon molecular, enquanto os outros correspondem a fragmentos (reproduzido de GORDON, 1994)

Derivados

Se um determinado composto tem baixa volatilidade ou se sua massa molecular não pode ser determinada, é possível preparar um derivado adequado, o qual deve ter as seguintes características: volatilidade aumentada, um modo de clivagem previsível, um padrão de fragmentação simplificado e um aumento de estabilidade do íon molecular. Compostos que contêm muitos grupos polares podem apresentar baixa volatilidade (p.e. açúcares, peptídeos e alguns ácidos carboxílicos). A acetilação de grupos hidroxila e amina, assim como a metilação de ácidos livres são algumas das possibilidades de se aumentar a volatilidade de compostos, tornando-se possível a identificação de picos correspondentes aos mesmos.

2.4.3. Análise de fragmentos de aminoácidos e carboidratos por GC-MS (CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999b; SZYPERSKI, 1998)

Os esqueletos de carbono dos aminoácidos têm sua origem em metabólitos que fazem parte das vias metabólicas centrais (EMP, TCA e PP), sendo bem conhecidas as vias biossintéticas que levam à formação dos aminoácidos a partir de seus respectivos precursores. Sabe-se também que a fração de carboidratos na biomassa de *S. cerevisiae* tem origem nas moléculas de glicose-6-fosfato da via de EMP. Sendo assim, conhecendo-se o padrão de marcação nos átomos de carbono dos aminoácidos e carboidratos (através de medidas por GC-MS), os quais são resultantes da hidrólise de proteínas e polissacarídeos, respectivamente, é possível deduzir o padrão de marcação nos respectivos metabólitos precursores. A vantagem de se medir a marcação nos aminoácidos é que os mesmos se encontram em grande proporção na biomassa, enquanto que os metabólitos precursores encontram-se em quantidades muito pequenas. Além disto, o “turnover” destes precursores é muito rápido, impossibilitando medidas diretas na maioria dos casos, diferentemente dos aminoácidos, que representam um “pool” mais estável frente a variações ambientais.

Biossíntese de Aminoácidos

Cerca da metade dos 20 aminoácidos que fazem parte da estrutura das proteínas (também chamados proteinogênicos) é sintetizada através de reações simples, a partir de intermediários das vias metabólicas centrais, quais sejam:

1. o ciclo de Krebs, ou ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA);
2. a via glicolítica, ou via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP);
3. a via das Hexoses Monofosfato, ou via das Pentoses Fosfato (PP).

A maioria dos aminoácidos chamados essenciais (pois não são sintetizados pelos seres humanos, devendo ser obtidos a partir da dieta) apresenta vias biossintéticas mais complexas. Microrganismos como

Escherichia coli e *Saccharomyces cerevisiae* possuem as enzimas necessárias à síntese de todos os 20 aminoácidos.

Em todos os casos, os precursores das vias biossintéticas de formação de aminoácidos são os seguintes:

1. α -cetoglutarato (AKG) e oxaloacetato (OAA), da via TCA;
2. 3-fosfoglicerato (3PG), fosfoenolpiruvato (PEP) e piruvato (PYR), da via EMP;
3. eritrose-4-fosfato (E4P) e ribose-5-fosfato (R5P), da via PP.
4. acetil coenzima A (AcCoA).

Na **TABELA 2.2** encontra-se descrita a correspondência entre os átomos de carbono das moléculas precursoras e dos respectivos aminoácidos oriundos destas moléculas.

TABELA 2.2 - Correspondência entre os aminoácidos de *S. cerevisiae* e seus precursores (ZUBAY, 1988)*

amino-ácido	nº de átomos de C	precursores	nº de átomos de C	correspondência dos átomos de C		
Ala	3	PYR	3	PYR1,2,3	→	Ala1,2,3
Asp	4	OAA	4	OAA1,2,3,4	→	Asp1,2,3,4
Glu	5	AKG	5	AKG1,2,3,4,5	→	Glu1,2,3,4,5
Gly	2	3PG	3	3PG1,2	→	Gly1,2
Ile	6	OAA	4	OAA1,2,3,4	→	Ile1,2,6,4
		PYR	3	PYR2,3	→	Ile3,5
Leu	6	PYR	3	PYR2,2,3,3	→	Leu3,4,5,6
		AcCoA	2	AcCoA1,2	→	Leu1,2
Lys	6	AKG	5	AKG2,3,4,5	→	Lys3,4,5,6
		AcCoA	2	AcCoA1,2	→	Lys1,2
Phe	9	E4P	4	E4P1,2,3,4	→	Phe6,7,8,9
		PEP	3	PEP1,2,3,2,3	→	Phe1,2,3,4,5
Pro	5	AKG	5	AKG1,2,3,4,5	→	Pro1,2,3,4,5
Ser	3	3PG	3	3PG1,2,3	→	Ser1,2,3
Thr	4	OAA	4	OAA1,2,3,4	→	Thr1,2,3,4
Val	5	PYR	3	PYR1,2,2,3,3	→	Val1,2,3,4,5

*somente estão indicados os aminoácidos que apresentam pelo menos um fragmento que segue os critérios de aceitação do método de detecção apresentados por CHRISTENSEN; NIELSEN (1999b)

Em alguns casos, como na biossíntese de serina, glicina e treonina, não existe somente uma única via biossintética, o que significa que os átomos de carbono destes aminoácidos podem ser oriundos de outras moléculas, além das indicadas na Tabela 2.2. Este

fato ocorre, pois descobriu-se recentemente que a enzima treonina aldolase, ativa no crescimento em glicose, catalisa a reação reversível de conversão de treonina em glicina (LIU *et al*, 1997; MONSCHAU *et al*, 1997). Desta forma, os átomos de glicina e serina podem ser oriundos do oxaloacetato (além do 3-fosfoglicerato) e os átomos de treonina podem ser oriundos do 3-fosfoglicerato (além do oxaloacetato). Em outros casos, como na biossíntese de alanina, sabe-se que a mesma ocorre a partir do piruvato, mas não se sabe se a síntese ocorre exclusivamente no citoplasma ou se parte da biossíntese ocorre na mitocôndria. Isto se deve ao fato de haver duas enzimas putativas do tipo alanina aminotransferase que catalisam a reação de conversão de piruvato a alanina, sendo uma citossólica e outra mitocondrial. Estes dados são obtidos por similaridades de seqüências, resultantes da disponibilidade dos dados gerados pelo seqüenciamento do genoma de *S. cerevisiae*. Para estudar esta e outras questões fisiológicas, experimentos específicos devem ser realizados.

Em complementação aos dados da [TABELA 2.2](#), encontra-se na [FIGURA 2.15](#) um esquema simplificado do metabolismo central de *S. cerevisiae*, indicando quais precursores levam à formação de quais aminoácidos.

Fragmentação

Uma característica da metodologia de determinação da marcação em aminoácidos por GC-MS é o fato de que não apenas os derivados de aminoácidos são detectados, mas também alguns fragmentos dos mesmos, devido à fragmentação que ocorre no espectrômetro de massa ([FIGURA 2.16](#)). Isto representa um aumento na quantidade de informação obtida, pois torna-se possível comparar dados de diferentes fragmentos de um mesmo aminoácido, deduzindo-se a partir daí a marcação em átomos de carbono individuais dos precursores ([FIGURA 2.17](#)). Além disto, utilizando-se diferentes derivações, é possível

comparar o padrão de marcação nos mesmos fragmentos de aminoácidos obtidos pelas diferentes derivações, o que serve para confirmar as medidas.

FIGURA 2.15 - Aminoácidos proteinogênicos de *S. cerevisiae* e seus precursores do metabolismo central. Os aminoácidos detectados pela metodologia empregada neste trabalho (indicados na TABELA 2.2) estão sombreados.

A metodologia empregada neste trabalho é a mesma descrita por CHRISTENSEN; NIELSEN (1999b). Os dois tipos de derivações utilizados para aminoácidos usam os agentes ECF (cloroformiato de etila) e DMFDMA (dimetilacetal- (N,N)-dimetilformamida). Nas FIGURAS 2.18 e 2.19 é possível observar cromatogramas com os picos correspondentes aos aminoácidos detectáveis pela metodologia empregada, juntamente com os principais padrões de fragmentação.

FIGURA 2.16 – Fragmentação de uma molécula de alanina. Alanina (esquerda) é derivatizada a éster metil alanina N-(N',N')-dimetilmetileno, que gera o íon molecular do aminoácido derivatizado (centro) e um fragmento consistindo dos átomos de C2 e C3 da molécula original de alanina (direita). (Reproduzido de CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999b com permissão dos autores).

FIGURA 2.17 – Espectros de massa correspondentes ao íon molecular e a um fragmento de íon da alanina derivatizada conforme a FIGURA 2.16. O fragmento à esquerda contém os átomos de C2 e C3 da alanina e o fragmento à direita contém os 3 átomos de alanina. As marcações em ambos os fragmentos podem ser medidas por GC-MS. Subtraindo-se a marcação no fragmento à esquerda da marcação no fragmento à direita, obtém-se a marcação no átomo C1 da alanina. (Reproduzido de CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999b com permissão dos autores).

Outras formas de derivação podem ser utilizadas para aminoácidos, como por exemplo derivação por MTBSTFA ((N)-t-butildimetilsilil-(N)-metil-trifluoroacetamida), conforme proposto por DAUNER; SAUER (2000). No entanto, em todos os casos, não são todos os aminoácidos que podem fornecer informações à análise, pois durante a hidrólise da biomassa previamente à derivação, aminoácidos como cisteína e triptofano são destruídos oxidativamente e outros, como

asparagina e glutamina, perdem radicais amina e são convertidos a aspartato e glutamato, respectivamente.

Figura 2.18 - Cromatograma dos aminoácidos derivados por *ECF* obtidos do hidrolizado de biomassa de *P. chrysogenum*. Os tempos de retenção correspondem a Ala (4,05), Gly (4,25), Val (4,74), Ser (4,88), Leu (5,14), Ile (5,19), Pro (5,47), Thr (5,62), Asp (6,07), Glu (6,48), Phe (6,88), Lys (8,36). Os padrões de fragmentação mais comuns encontram-se indicados à direita: A, sem fragmentação, B, perda do grupo éster e C, perda da cadeia lateral. O fragmento B é o mais freqüente (reproduzido de CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999b).

Figura 2.19 - Cromatograma dos aminoácidos derivados por *DMFDMA* obtidos do hidrolizado de biomassa de *P. chrysogenum*. Os tempos de retenção correspondem a Ala (6,09), Gly (6,30), Val (7,25), Asp (10,96), Glu (11,70), Phe (12,13), Lys (13,24). Os padrões de fragmentação mais comuns encontram-se indicados à direita: D, sem fragmentação, E, perda do grupo éster e F, perda da cadeia lateral. O fragmento E é o mais freqüente (reproduzido de CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999b).

3. METODOLOGIA

3.1. Cepas

Todas as cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da cepa referência CEN.PK113-7D. Somente cepas haplóides foram utilizadas. Suas principais características encontram-se descritas na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Cepas utilizadas

Cepa	mu- tante	detalhes	deleções	referência
CEN.PK113-7D	-	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	-	VAN DIJKEN <i>et al</i> (2000)
T468	<i>mig1</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>mig1::MEL1</i>	KLEIN <i>et al</i> (1999)
T475	<i>mig1</i> <i>mig2</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>mig1::MEL1 mig2::URA3</i>	KLEIN <i>et al</i> (1999)
CEN.PK506-1C	<i>snf1</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>cat1(4,1899)::loxP-Kan-loxP</i>	este trabalho
CEN.PK507-5B	<i>snf4</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>cat3(4,966)::loxP-Kan-loxP</i>	este trabalho
CEN.PK513-3A	<i>grr1</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>cat80(4,2883)::loxP-Kan-loxP</i>	este trabalho
CEN.PK514-2B	<i>reg1</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>hex2(131,4092)::loxP-Kan-loxP</i>	este trabalho
CEN.PK517-1A	<i>hap4</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>hap4(41,1617)::loxP-Kan-loxP</i>	este trabalho
CEN.PK520-6B	<i>hvk2</i>	<i>MAL2-8^c SUC2</i>	<i>hvk2(4,1458)::loxP-Kan-loxP</i>	este trabalho

A cepa CEN.PK113-7D é a cepa atualmente mais utilizada em pesquisas biotecnológicas na Europa. Foi escolhida como referência, dentre várias possibilidades, a partir de estudos realizados por grupos europeus. O motivo desta escolha é permitir a comparação entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios (VAN DIJKEN *et al*, 2000).

Como o objetivo dos trabalhos de pesquisa em biotecnologia é otimizar as características celulares para aplicações industriais, esforços multidisciplinares são requeridos, o que exige o trabalho de diferentes profissionais, como geneticistas, biólogos moleculares, fisiologistas e engenheiros bioquímicos. Cada um destes profissionais tem seus requerimentos específicos de trabalho. Se por um lado os engenheiros bioquímicos e os fisiologistas procuram trabalhar com cepas que apresentam um bom desempenho em termos de velocidades

de crescimento, de formação de produto e alta conversão, os geneticistas e os biólogos moleculares preferem cepas que apresentam alto grau de esporulação e alta eficiência de transformação. Desta forma, o que tem ocorrido historicamente é que diferentes cepas de levedura têm sido utilizadas por estes diferentes grupos de profissionais, o que dificulta a comparação e interpretação de resultados. Cabe aqui ressaltar que características genéticas e fisiológicas de *S. cerevisiae* variam muito entre diferentes cepas.

Aparentemente, não existe uma cepa ideal para estudos biotecnológicos. Cepas como a CBS8066, que tem um ótimo desempenho fisiológico, tem características genéticas desfavoráveis, como baixa eficiência de transformação e o fato de ser heterozigota para alguns marcadores auxotróficos. Cepas como a X2180 tem ótimo desempenho genético, mas características fisiológicas desfavoráveis, como baixa velocidade de crescimento em glicose. Tomando como base as características indicadas na TABELA 3.2, um estudo conjunto realizado entre vários laboratórios da Europa elegeu a cepa CEN.PK113-7D como referência a ser utilizada para pesquisa em biotecnologia.

A cepa CEN.PK113-7D é uma cepa haplóide (*MATa*), prototrófica, obtida a partir da cepa diplóide CEN.PK122, sendo que ambas apresentam características muito similares. A família CEN.PK foi construída dentro de um projeto de pesquisa interdisciplinar alemão, patrocinado pela fundação Volkswagen, o qual teve como objetivo atender às necessidades de fisiologistas, geneticistas e engenheiros. As cepas CEN.PK foram obtidas a partir de duas cepas de laboratório, através de uma série de cruzamentos e retrocruzamentos. Por todos estes motivos, ao longo deste trabalho, emprega-se o termo *cepa referência* e não *cepa selvagem* para a cepa CEN.PK113-7D. No entanto, é importante ressaltar que todos os mutantes utilizados são prototróficos e isogênicos em relação à cepa referência. A cepa referência encontra-se disponível na maioria dos laboratórios de biotecnologia da Europa. A maioria dos mutantes utilizados neste

trabalho foi obtida do laboratório do Dr. Peter Kötter, do Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt. Alguns mutantes (*mig1* e *mig1mig2*, vide TABELA 3.1) já se encontravam disponíveis nos laboratórios do CPB/IBT/DTU.

TABELA 3.2 - Características desejadas para uma cepa referência em biotecnologia

♦ Crescimento rápido em meio mineral suplementado somente com vitaminas
♦ Ampla gama de fontes de nitrogênio e carbono para crescimento
♦ Alta conversão da fonte de carbono a biomassa
♦ Crescimento rápido, respiratório em aerobiose em quimiostatos limitados por glicose
♦ Crescimento em meio definido sob condições estritamente anaeróbias
♦ Alta eficiência de esporulação, viabilidade de esporos e eficiência de "mating"
♦ Alta eficiência de transformação
♦ Estabilidade genética
♦ Boa produção de proteínas heterólogas, tanto intra- como extracelularmente

3.1.1. Preservação

As cepas eram conservadas em placas contendo meio YPD ("Yeast Extract, Peptone, Dextrose"), contendo (em g/L): extrato de levedura, 10; peptona, 20; glicose, 20; agar, 20. Repiques eram feitos a cada 30 dias, aproximadamente. As primeiras placas foram obtidas a partir das cepas congeladas a -80°C em tubos contendo meio YPD com glicerol (em g/L): extrato de levedura, 8; peptona, 16; glicose, 16 e glicerol, 200 mL/L.

3.2. Cultivos

3.2.1. Inóculo

A partir das placas (descritas no item 3.1.1), células eram transferidas com uma alça de platina para frascos de 500 mL do tipo Erlenmeyer, com chicanas. Estes frascos continham 100 mL do seguinte meio (em g/L): glicose, 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,5; KH_2PO_4 , 14,4;

MgSO₄.7H₂O, 0,48; solução de elementos traço, 2,0 mL/L; solução de vitaminas, 1,0 mL/L; pH ajustado para 6,5. Após cerca de 24 h num incubador rotativo a 30°C, 150 min⁻¹, as células desta cultura eram utilizadas para inocular o reator numa proporção tal que a DO₆₀₀ inicial fosse de 0,15. Nestas condições, o reator era sempre inoculado com um volume de inóculo em torno de 1 a 2% do volume total de meio, com células em fase exponencial de crescimento.

3.2.2. Cultivos descontínuos

Os cultivos descontínuos foram realizados em reatores de 300 mL de volume total, sendo que 200 mL era o volume ocupado pelo meio durante os ensaios (FIGURA 3.1). O meio de cultura (VERDUYN *et al*, 1992) era composto de (em g/L): (NH₄)₂SO₄, 5,0; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; solução de elementos traço, 1,0 mL/L; solução de vitaminas, 1,0 mL/L. Nos cultivos realizados com substrato marcado, foi utilizada [1-¹³C]glicose como fonte de carbono e energia, numa concentração inicial de 5,0 g/L. Nos cultivos sem substrato marcado, glicose naturalmente marcada (1,1% em cada átomo de carbono) foi utilizada. As principais características de cada cultivo estão indicadas na TABELA 4.1. Em todos os casos, o pH era controlado em 5,0 ± 0,05 através de adição controlada de NaOH 0,05N. A temperatura era controlada em 30°C através da circulação de água da camisa do reator por um banho termostatzado. Para garantir condições de aerobiose, ar comprimido e filtrado era introduzido por uma agulha mergulhada no líquido, após borbulhamento em solução de NaOH 2N, para garantir eliminação de eventuais traços de CO₂ no gás de entrada, o que poderia prejudicar a análise de fluxos metabólicos. O conteúdo do reator era continuamente agitado magneticamente à rotação de 900 min⁻¹, o que garantia condições de mistura perfeita e uma concentração de oxigênio dissolvido sempre acima de 70% da saturação com ar.

FIGURA 3.1 – Fotografia do reator utilizado para cultivos com substrato marcado. O reator é denominado HPBRG4.1 (High-Performance Bioreactor Generation 4.1).

Devido ao pequeno volume dos reatores utilizados para experimentos com substrato marcado, o que poderia gerar dúvidas quanto às medidas de concentração celular em termos de biomassa seca de células (item 3.2.6.2), foram realizados alguns cultivos descontínuos em reatores de 4 L de volume útil, com o objetivo de se

confirmar parâmetros do tipo $\mu_{\max}$ e $Y_{x/s}$ obtidos nos reatores pequenos. Estes reatores (de fabricação própria do CPB/IBT/DTU) eram equipados com duas turbinas tipo Rushton, e as condições de pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido eram iguais às utilizadas nos reatores pequenos. A única diferença é que o pH era controlado através da adição de uma solução de NaOH 2N. O meio de cultura também era o mesmo, com exceção da concentração inicial de glicose, que nos casos dos reatores de 4 L foi de 10 g/L (nestes casos sempre foi utilizada glicose naturalmente marcada).

3.2.3. Cultivos contínuos

Os cultivos contínuos sempre foram realizados nos reatores de 300 mL descritos acima ([FIGURA 3.1](#)) e tinham início com um cultivo descontínuo. No entanto, o volume de trabalho nestes casos era de 150 ou 200 mL. As condições de pH, temperatura, aeração e agitação empregadas, foram iguais às descritas no item acima (para detalhes sobre os ensaios, ver [TABELA 4.1](#)). A taxa de diluição sempre foi de 0,1 h⁻¹, sendo tanto a alimentação e a retirada de meio (por um tubo ajustado ao nível desejado) feitos por operação ininterrupta de bombas Watson-Marlow, modelo 101 U/R. O meio de cultura de alimentação era análogo ao descrito acima, mas com concentração de glicose (naturalmente marcada) de 2 g/L. Quando o estado estacionário fisiológico era atingido (normalmente, 4 ou 5 tempos de residência após o início do processo contínuo, o que era determinado por medidas de DO₆₀₀ e posteriormente confirmado por medidas de concentração de metabólitos extracelulares), o meio de alimentação era substituído por outro meio análogo, mas com 2 g/L de [1-¹³C]glicose no lugar da glicose naturalmente marcada. Esperava-se então mais 4 ou 5 tempos de residência até que o estado estacionário isotópico fosse atingido (o que era determinado por medidas de DO₆₀₀ e posteriormente confirmado por

medidas de concentração de metabólitos extracelulares e de marcação nos metabólitos intracelulares).

3.2.4. Soluções

Os meios de cultura utilizados incluem uma solução de elementos traço e uma solução de vitaminas (VERDUYN *et al*, 1992). A composição da solução de elementos traço é (em g/L): EDTA, 15,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,84; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,30; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,30; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,40; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0; H_3BO_3 , 1,0; KI, 0,10. A composição da solução de vitaminas é (em g/L): D-biotina, 0,05; pantotenato de cálcio, 1,0; ácido nicotínico, 1,0; mio-inositol, 25,0; cloreto de tiamina, 1,0; cloreto de piridoxol, 1,0; ácido *para*-aminobenzóico, 0,20.

3.2.5. Esterilização

Todos os componentes do meio de cultura e os reatores eram esterilizados em autoclave a 121°C por 25 min, com exceção da solução de vitaminas, a qual era esterilizada por filtração através de membrana 0,22 μm de porosidade.

3.2.6. Tratamento de amostras

Ao longo dos cultivos descontínuos, eram retiradas amostras de hora em hora, o que gerava um total de cerca de 10 amostras. Nos cultivos contínuos, amostras eram retiradas cerca de duas vezes por tempo de residência. As amostras eram retiradas por um fino tubo de aço, com volume morto de cerca de 0,3 mL. Em cada amostragem, desprezava-se cerca de 0,5 mL e retirava-se 1 mL em cubeta espectrofotométrica, para medida de DO_{600} em Espectrofotômetro Shimadzu (Japão), modelo CL-720. Após esta medida, a amostra era

filtrada através de membrana de acetato 0,45 μm Osmonics (Minnetonka, MN) e congelada a -20°C para futura determinação da concentração de metabólitos extracelulares (item 3.2.6.1).

Os cultivos descontínuos eram interrompidos ao final da fase exponencial de crescimento, após pelo menos 4 tempos de geração. Os cultivos contínuos eram interrompidos quando o estado estacionário isotópico era atingido. Em ambos os casos, o conteúdo do reator (150 ou 200 mL, dependendo do caso) era transferido rapidamente para um frasco em banho de gelo. Cerca de 40 mL eram utilizados para determinação da concentração celular por biomassa seca de células (item 3.2.6.2). Nos casos em que foi utilizado substrato marcado, o restante do conteúdo do reator era filtrado sob vácuo, através de membrana de nitrocelulose 0,45 μm Gelman Sciences (Ann Harbour, MI), lavado duas vezes com água destilada e a massa úmida de células era congelada imediatamente a -80°C e posteriormente utilizada para a determinação da marcação em metabólitos intracelulares (item 3.2.6.3).

Além das análises descritas acima, em alguns cultivos contínuos foram retiradas amostras na saída do reator ao longo dos experimentos. Isto era realizado em tubos de centrífuga de 50 mL, em banho de gelo. Após cerca de uma hora (tempo suficiente para recolher em torno de 15 mL de amostra), os tubos eram levados à centrifugação a 4°C , 3000g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante era desprezado, o “pellet” ressuspenso em água destilada, centrifugado novamente e o “pellet” resultante transferido para todos tipo Eppendorf utilizando-se 1,5 mL de água destilada. Estes tubos eram subsequenteiramente centrifugados a 4°C , 5000g por 5 min e o “pellet” resultante era congelado a -80°C para futura determinação da marcação em metabólitos intracelulares (item 3.2.6.3).

Conforme mencionado no item 3.2.2, nos cultivos descontínuos realizados em reatores de 4 L, não foi utilizado substrato marcado. No entanto, amostras de maior volume eram retiradas periodicamente do reator para determinação da concentração celular por biomassa seca de

células (item 3.2.6.2) e da concentração de metabólitos extracelulares (item 3.2.6.1).

3.2.6.1. Determinação da concentração de metabólitos extracelulares

Glicose, etanol, glicerol, acetato, succinato e piruvato eram separados numa coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercules, CA) a 65°C, utilizando-se H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Glicose, etanol, glicerol e succinato eram detectados num refratômetro diferencial Waters 410 (Millipore, Milford, MA). Acetato e piruvato eram detectados por absorbância a 210 nm num detector Waters 486. Os dois detectores estavam conectados em série.

3.2.6.2. Determinação da concentração celular por biomassa seca de células

Um volume entre 20 mL e 50 mL de amostra era filtrado sob vácuo através de membrana de nitrocelulose 0,45 µm Gelman Sciences (Ann Harbour, MI) (previamente seca em forno de microondas a 180W por 10 min), lavado duas vezes com água destilada e levado ao forno de microondas numa potência de 180W por 15 min. A diferença entre a massa da membrana contendo a biomassa seca de células e a massa da membrana sem células, era então dividida pelo volume utilizado na filtração, obtendo-se a concentração celular em *gramas de biomassa seca por litro*. Para que esta determinação seja precisa, deve-se utilizar um volume de amostra tal que a biomassa seca de células retidas na membrana esteja em torno de 50 mg (OLSSON; NIELSEN, 1997). A análise era feita em duplicata no caso de cultivos contínuos e única no caso dos cultivos descontínuos.

3.2.6.3. Determinação da marcação em metabólitos intracelulares

Para a análise da marcação nos fragmentos de metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae*, cerca de 20 mg de massa úmida de células congeladas a -80°C eram transferidos para 800 μL de HCl 6M. A mistura era então separada em duas frações. Uma delas, de cerca de 700 μL , era usada para a determinação da marcação em fragmentos de aminoácidos. A outra fração, de cerca de 100 μL , era utilizada para a determinação da marcação na glicose intracelular. A primeira fração era submetida a hidrólise a 105°C por um período entre 12 e 24 h. Em seguida, cerca de 800 μL de água destilada eram adicionados à amostra, a qual era centrifugada a 3000g por 5 min para separação dos fragmentos de células. O sobrenadante era então separado em frações de 200 μL , as quais eram levadas à secagem a 105°C . Após isto, as amostras secas eram derivatizadas separadamente por dois agentes, quais sejam o cloroformiato de etila (ECF) e o dimetilacetal-(N,N)-dimetilformamida (DMFDMA). Em ambos os casos, o protocolo descrito por CHRISTENSEN; NIELSEN (1999b) foi utilizado. A única diferença é que não foi utilizada adição de anidrido trifluoroacético (TFAA) no presente trabalho. A segunda fração de amostra (de cerca de 100 μL , conforme descrito acima), era hidrolisada durante apenas 20 a 30 min a 105°C . Em seguida, 100 μL de água destilada eram adicionados à amostra e a derivatização da glicose presente na amostra a glicose pentaacetato (GPA) era realizada de acordo com o protocolo descrito por CHRISTENSEN; NIELSEN (2000).

Em todos os casos, as amostras derivatizadas eram injetadas num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS) (Hewlett-Packard, modelo HP-G1723A). O espectrômetro de massa era do tipo detector seletivo de massa (EI). Pelo menos duas injeções eram realizadas para cada derivatização e as condições empregadas encontram-se descritas por CHRISTENSEN; NIELSEN (1999b). O resultado da análise é constituído por uma série de “clusters”, cada um

deles correspondente às intensidades dos isotopômeros de massa de um único fragmento de aminoácido (ou do fragmento de glicose, no caso da derivatização da glicose) (ver item 2.4.2 da revisão bibliográfica para uma descrição dos princípios da metodologia). Estas intensidades eram corrigidas em função da marcação natural dos átomos agregados aos fragmentos devido ao processo de derivatização (LEE *et al*, 1991; LEE *et al*, 1992). Finalmente, a marcação de cada fragmento era calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$MAR(Ala^{1-3}) = \frac{0.m_0^{1-3} + 1.m_1^{1-3} + 2.m_2^{1-3} + 3.m_3^{1-3}}{m_0^{1-3} + m_1^{1-3} + m_2^{1-3} + m_3^{1-3}} \quad [3.1]$$

Na equação acima, está indicada a fórmula de cálculo da marcação no fragmento de alanina que contém os 3 átomos de carbono do aminoácido. Os índices superiores indicam os átomos de carbono presentes no fragmento e m_n representa a intensidade corrigida do isotopômero de massa que contém n átomos de carbono marcados. É importante notar que a marcação em um fragmento, calculado conforme a equação 3.1 a partir das medidas por GC-MS, é igual à soma das marcações nos átomos de carbono presentes no fragmento. Portanto, se $MAR(Ala^{1-3})$ e $MAR(Ala^{1-2})$ podem ser medidos, torna-se possível calcular a marcação no átomo C3 da alanina subtraindo-se o segundo valor do primeiro.

3.2.7. Tratamento matemático dos dados

Os dados de marcação, obtidos conforme o descrito no item 3.2.6.3, são usados como dados de entrada para uma rotina matemática numérica, a qual é utilizada para calcular os fluxos no metabolismo central de *S. cerevisiae*. Conforme descrito por CHRISTENSEN; NIELSEN (2000) e apresentado com detalhes no item 2.3.3 da revisão bibliográfica, a cada iteração da rotina numérica, uma

estimativa é feita para o conjunto de fluxos. Esta estimativa é utilizada para calcular as marcações nos metabólitos intracelulares através de um modelo matemático que representa as vias metabólicas centrais de *S. cerevisiae*. Em seguida, dois erros são gerados: o primeiro comparando-se os valores das marcações calculadas com as marcações medidas e o segundo comparando-se os valores dos fluxos calculados com os fluxos medidos (alternativamente, pode-se utilizar dados de composição da biomassa de *S. cerevisiae*, disponíveis na literatura, como fluxos medidos). Se a soma destes dois erros for menor que o erro armazenado, a estimativa para o conjunto de fluxos utilizada nesta iteração é considerada a melhor até o momento. Caso contrário, esta estimativa é descartada. Em seguida, uma nova iteração é iniciada a partir de uma nova estimativa para o conjunto de fluxos. O processo segue até que um erro aceitável seja atingido.

O modelo matemático é um elemento central neste processo iterativo. Este modelo é do tipo estequiométrico (GOMBERT; NIELSEN, 2000) e inclui as principais reações do metabolismo central de *S. cerevisiae*. As equações que fazem parte deste modelo, assim como as correspondentes transições de átomos de carbono nas reações individuais do metabolismo, encontram-se indicadas no [Apêndice](#). As vias metabólicas consideradas são as centrais: a via EMP, a via PP e o ciclo TCA. Além destas, são incluídas algumas reações adicionais, baseando-se em conhecimentos bioquímicos específicos de *S. cerevisiae* e nos resultados de marcação obtidos nos experimentos realizados neste trabalho (ver seção Resultados e Discussão para detalhes). Dividir alguns metabólitos em diferentes compartimentos celulares é importante para ajustar os valores de marcação calculados aos valores medidos (CHRISTENSEN; NIELSEN, 2000). Desta forma, oxaloacetato, acetil coenzima A e piruvato foram separados em dois “pools” cada, um citossólico e outro mitocondrial. A reação anaplerótica catalisada pela enzima piruvato carboxilase foi incluída no modelo como citossólica (HAARASILTA; TASKINEN, 1977; WALKER *et al*, 1991), a reação

catalisada pela enzima treonina aldolase foi incluída como uma rota alternativa de biossíntese de glicina (LIU *et al*, 1997; MONSCHAU *et al*, 1997) e a reação catalisada pela enzima málica foi incluída como mitocondrial, pois há evidências de que esta reação ocorre quando *S. cerevisiae* cresce em glicose (BOLES *et al*, 1998).

Em termos da excreção de metabólitos, dos principais produtos formados em cultivos de *S. cerevisiae* (etanol, acetato, glicerol, succinato e piruvato), as excreções de succinato e piruvato não foram consideradas no modelo, pois representam uma fração muito pequena ($< 0,1\%$) do carbono consumido pelas células sob forma de glicose.

Em termos da drenagem de precursores para biossíntese (o que corresponde aos chamados fluxos medidos), diferentes composições, em termos de macromoléculas, foram consideradas para a biomassa da cepa referência de *S. cerevisiae*, dependendo da condição de cultivo. Os valores foram obtidos da literatura e encontram-se indicados na [TABELA 3.3](#). Nota-se que uma composição diferente foi considerada para células cultivadas em quimiostato a $0,1 \text{ h}^{-1}$ em relação a células cultivadas a $\mu_{\max}$ em processo descontínuo (em ambos os casos, glicose é o substrato limitante). Isto se deve basicamente ao fato de que o teor de proteína aumenta e o teor de carboidratos diminui com o aumento da velocidade específica de crescimento de *S. cerevisiae*. No entanto, em ambos os casos, assumiu-se que a composição de cada tipo de macromolécula é independente da condição de cultivo. Assim, a composição da proteína de *S. cerevisiae* em termos de aminoácidos foi considerada independente da condição de cultivo e foi obtida de OURA (1983). Analogamente, assumiu-se que a composição lipídica é independente da condição de cultivo e foi obtida de BRUINENBERG *et al* (1983) e OURA (1983). A fração de carboidratos foi assumida como sendo um polímero de glicose e que o único precursor drenado para sua biossíntese é a glicose-6-fosfato. Os ácidos nucleicos foram assumidos como sendo exclusivamente RNA, já que a fração de DNA corresponde a apenas 0,3% da biomassa seca (OURA, 1983). Levando-se tudo isto em

consideração, a drenagem de precursores para biossíntese na cepa referência de *S. cerevisiae* foi calculada e encontra-se apresentada na [TABELA 3.4](#).

Finalmente, para o cálculo da composição da biomassa dos mutantes utilizados neste trabalho, foi assumido que a composição é função exclusiva da velocidade específica de crescimento. Desta forma, para obter os valores apresentados na [TABELA 3.5](#), utilizou-se simples interpolação dos valores da [TABELA 3.3](#), considerando-se as velocidades específicas de crescimento de cada mutante. Apesar de estas hipóteses serem fortes, considerou-se fazê-las, pois foi demonstrado que perturbações na composição da biomassa não alteram significativamente o conjunto final de fluxos calculados (DAAE; ISON, 1999). Com os valores da [TABELA 3.5](#), calculou-se a drenagem de precursores para biossíntese nos diferentes mutantes estudados ([TABELA 3.6](#)). Os valores apresentados nas [TABELAS 3.4 e 3.6](#) foram utilizados na rotina numérica de estimativa de fluxos metabólicos, conforme descrito no item [2.3.3 da revisão bibliográfica](#).

TABELA 3.3 – Composição celular nas diferentes condições de cultivo estudadas

macro-molécula	$D=\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ (quimioestado)	$\mu_{\max}=0,37 \text{ h}^{-1}$ (descontínuo)	referências
proteína	42%	51%	ERTUGAY; HAMAMCI (1997) VERDUYN (1991)
lipídeos	7%	7%	NISSEN <i>et al</i> (1997) OURA (1972) VAN GULIK; HEIJNEN (1995)
carboidratos	40%	27%	KÜENZI; FIECHTER (1972)
RNA	7%	11%	OURA (1983) VERDUYN (1991)
cinzas	4%	4%	NISSEN <i>et al</i> (1997) OURA (1983)

TABELA 3.4 – Precusores drenados para biossíntese na cepa referência*

	D=μ=0,1 h⁻¹ (quimiostato)	μ_{max}=0,37 h⁻¹ (descontínuo)
ACCOAcyt	2,44	2,50
ACCOAmit	0,311	0,378
AKG	1,07	1,30
C ₁	0,327	0,397
E4P	0,277	0,337
GLY	0,407	0,494
SER	0,202	0,245
G3P(lipídeos)	0,091	0,091
G6P	2,47	1,67
THR	0,403	0,490
OAA(outros)	0,589	0,715
P5P	0,318	0,464
PEP	0,555	0,674
PYR	1,83	2,22

*valores em mmol de precursor por g de biomassa seca

As equações que fazem parte do modelo podem variar de um caso para outro, dependendo da condição de cultivo e do mutante analisado. O modelo apresentado no [Apêndice](#) foi gerado para a cepa referência CEN.PK113-7D e foi também o que levou a melhores resultados com os mutantes. É importante notar que o modelo utilizado em cada caso é a versão final de frutos de tentativas e erros, ou seja, tenta-se fazer os cálculos com diferentes modelos, e aquele que apresentar o menor erro, é aceito como o melhor, desde que a bioquímica e a fisiologia de *S. cerevisiae* não sejam desrespeitadas. Este procedimento característico da Análise de Redes Metabólicas é conhecido como identificação de redes metabólicas (CHRISTENSEN; NIELSEN, 1999) ou, conforme denominado no item 4.3.2, inspeção qualitativa dos dados de marcação.

TABELA 3.5 – Composição celular dos diferentes mutantes estudados*

macro-molécula	<i>snf1</i>	<i>snf4</i>	<i>hxx2</i>	<i>hap4</i>	<i>grr1</i>	<i>reg1</i>
μ (h ⁻¹)	0,34	0,34	0,32	0,30	0,27	0,18
proteína	50,0%	50,0%	49,3%	48,7%	47,7%	44,7%
lipídeos	7,0%	7,0%	7,0%	7,0%	7,0%	7,0%
carboidratos	28,4%	28,4%	29,4%	30,4%	31,8%	36,1%
RNA	10,6%	10,6%	10,3%	10,0%	9,5%	8,2%
cinzas	4,0%	4,0%	4,0%	4,0%	4,0%	4,0%

*considerou-se que a composição celular dos mutantes *mig1* e *mig1mig2* é igual à da cepa referência

TABELA 3.6 – Precursores drenados para biossíntese nos mutantes*

mutante	<i>snf1</i>	<i>snf4</i>	<i>hxx2</i>	<i>hap4</i>	<i>grr1</i>	<i>reg1</i>
μ (h ⁻¹)	0,34	0,34	0,32	0,30	0,27	0,18
ACCOAcyt	2,50	2,50	2,49	2,49	2,48	2,46
ACCOAmit	0,370	0,370	0,365	0,361	0,353	0,331
AKG	1,27	1,27	1,26	1,24	1,21	1,14
C ₁	0,389	0,389	0,384	0,379	0,371	0,348
E4P	0,330	0,330	0,325	0,322	0,315	0,295
GLY	0,484	0,484	0,477	0,472	0,462	0,433
SER	0,240	0,240	0,237	0,234	0,229	0,214
G3P(lipídeos)	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091
G6P	1,75	1,75	1,81	1,88	1,96	2,23
THR	0,48	0,48	0,473	0,468	0,458	0,429
OAA(outros)	0,701	0,701	0,691	0,683	0,668	0,626
P5P	0,449	0,449	0,438	0,427	0,409	0,362
PEP	0,660	0,660	0,651	0,643	0,630	0,590
PYR	2,18	2,18	2,15	2,12	2,08	1,95

*valores em mmol de precursor por g de biomassa seca

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivos realizados

As principais características dos ensaios (cultivos em biorreator) realizados são apresentadas na [Tabela 4.1](#). A ordem de apresentação segue a numeração dos ensaios e é cronológica. Os ensaios cujos resultados não puderam ser aproveitados não aparecem na [Tabela 4.1](#).

Tabela 4.1 - Principais características dos ensaios realizados*

Ensaio	Objetivo	Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	S ₀ ^(a) (g/L)	Substrato marcado
ANG08a ANG08b Descontínuo	Verificar a reprodutibilidade de cultivos realizados no reator HPBRG4.1 ^(b) .	CEN.PK 113-7D (referência)	5,0	-
ANG09 Descontínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares na cepa referência em crescimento exponencial, em situação de repressão por glicose.	CEN.PK 113-7D (referência)	5,0	[1- ¹³ C]glicose
ANG010 Descontínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares no mutante <i>mig1</i> em crescimento exponencial, em situação de repressão por glicose.	T468 (<i>mig1</i>)	5,0	[1- ¹³ C]glicose
ANG011 Contínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares na cepa referência, na ausência de repressão por glicose. Verificar o número de tempos de residência necessários para se atingir o estado estacionário isotópico. Verificar a reprodutibilidade da metodologia de determinação da marcação em metabólitos intracelulares de <i>S. cerevisiae</i> por GC-MS.	CEN.PK 113-7D (referência)	2,0 ^(c)	[1- ¹³ C]glicose
MDSANGO Incubador rotativo	Verificar a reprodutibilidade e precisão da metodologia de determinação da marcação em metabólitos intracelulares de <i>S. cerevisiae</i> por GC-MS.	CEN.PK 113-7D (referência)	10,0	-
ANG012 Descontínuo	Verificar a conversão substrato a biomassa seca.	CEN.PK113-7D (referência)	5,0	-
ANG013 Descontínuo + Contínuo	Verificar a conversão substrato a biomassa seca e determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares do mutante <i>mig1</i> , na ausência de repressão por glicose.	T468 (<i>mig1</i>)	5,0	-
			2,0 ^(c)	[1- ¹³ C]glicose
ANG015 Descontínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares do mutante <i>mig1mig2</i> em crescimento exponencial, em situação de repressão por glicose.	T475 (<i>mig1mig2</i>)	5,0	[1- ¹³ C]glicose

Tabela 4.1 (continuação)

Ensaio	Objetivo	Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	S ₀ ^(a) (g/L)	Substrato marcado
ANGO16a^(d) ANGO16b^(d) Descontínuo	Confirmar os valores dos parâmetros $\mu_{\max}$ e $Y_{x/s}$ em cultivos descontínuos.	CEN.PK113-7D (referência) ANGO16a	10,0	-
		T468 (<i>mig1</i>) ANGO16b	10,0	-
ANGO17a ANGO17b Descontínuo	Confirmar a validade da utilização de cultivos descontínuos para experimentos com substrato marcado (verificação da hipótese de estado pseudo estacionário).	CEN.PK506-1C (<i>snf1</i>)	5,0	[1- ¹³ C]glicose
ANGO18a^(d) ANGO18b^(d) ANGO18c^(d) Descontínuo	Confirmar os valores dos parâmetros $\mu_{\max}$ e $Y_{x/s}$ em cultivos descontínuos.	CEN.PK506-1C (<i>snf1</i>) ANGO18a	10,0	-
		T475 (<i>mig1 mig2</i>) ANGO18b	10,0	-
		CEN.PK113-7D (referência) ANGO18c	10,0	-
ANGO19a ANGO19b Descontínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares dos mutantes <i>snf4</i> e <i>grr1</i> em crescimento exponencial, em situação de repressão por glicose.	CEN.PK507-5B (<i>snf4</i>) ANGO19a	5,0	[1- ¹³ C]glicose
		CEN.PK513-3A (<i>grr1</i>) ANGO19b	5,0	[1- ¹³ C]glicose
ANGO20 Descontínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares do mutante <i>reg1</i> em crescimento exponencial, em situação de repressão por glicose.	CEN.PK514-2B (<i>reg1</i>)	5,0	[1- ¹³ C]glicose
ANGO21a ANGO21b Descontínuo	Determinar o padrão de marcação nos metabólitos intracelulares dos mutantes <i>hap4</i> e <i>hvk2</i> em crescimento exponencial, em situação de repressão por glicose.	CEN.PK517-1A (<i>hap4</i>) ANGO21a	5,0	[1- ¹³ C]glicose
		CEN.PK520-6B (<i>hvk2</i>) ANGO21b	5,0	[1- ¹³ C]glicose

^(a) O substrato limitante foi sempre glicose

^(b) HPBRG4.1 é o nome dado ao reator: "High-Performance Bioreactor Generation 4.1"

^(c) Em cultivos contínuos, este valor indica a concentração de substrato na alimentação

^(d) Estes cultivos foram realizados em reatores de 4L de volume útil

*todos os ensaios foram realizados em aerobiose

4.2. Validação da Metodologia

Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade de cultivos realizados no reator HPBRG4.1 (“High-Performance Bioreactor Generation 4.1”), foram realizados alguns ensaios, tratando-se simplesmente de cultivos da levedura *S. cerevisiae* sem substrato marcado. Estes cultivos foram realizados em aerobiose, conduzidos de forma descontínua e em meio contendo inicialmente 5 g/L de glicose (os detalhes das condições de cultivo encontram-se na seção Metodologia). Os resultados do ensaio ANGO8, com dois cultivos realizados em paralelo, são apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2.

Figura 4.1 –Concentração celular, de glicose e etanol. Os dados apresentados são de dois cultivos realizados em paralelo (ensaio ANGO8, Tabela 4.1)

Como é possível observar nas Figuras 4.1 e 4.2, os dois cultivos realizados em paralelo no ensaio ANGO8, apresentam resultados bastante similares entre si, tanto em termos de crescimento celular, como de consumo do substrato limitante e formação de produtos extracelulares.

Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade da metodologia de determinação da marcação em fragmentos de aminoácidos e na glicose

intracelular, desenvolvida e validada por CHRISTENSEN; NIELSEN (1999b) e CHRISTENSEN; NIELSEN (2000), respectivamente, para um fungo filamentoso, alguns experimentos específicos foram realizados, quais sejam MDSANGO e ANGO11 (Tabela 4.1).

Figura 4.2 – Concentração de succinato, glicerol, acetato e piruvato. Os dados apresentados são de dois cultivos realizados em paralelo (ensaio ANGO8, Tabela 4.1)

No experimento MDSANGO, células de *S. cerevisiae* foram cultivadas em incubador rotativo, em frascos tipo erlenmeyer com chicanas, com glicose naturalmente marcada como substrato limitante (o que significa que a marcação é de 1,1% em cada átomo de C, pois o carbono existente na natureza tem uma abundância de 98,9% em ^{12}C e 1,1% em ^{13}C). O meio de cultura utilizado foi o descrito no item 3.2.1. Três frascos foram utilizados, sendo que ao final dos cultivos, a biomassa de cada frasco foi filtrada separadamente e hidrolisada. A amostra do frasco Nº 1 foi hidrolisada durante 13 horas, a do frasco Nº 2 durante 16 horas e a do frasco Nº 3 durante 19 horas. Procedeu-se com a derivatização dos aminoácidos e, para cada derivatização, as análises por GC-MS foram realizadas em dois instantes diferentes: imediatamente após a derivatização (amostras 1a, 2a e 3a) e no mínimo 24 horas após a derivatização (amostras 1b, 2b e 3b). Todos estes

procedimentos tiveram como objetivo introduzir várias fontes de erro na metodologia, para verificar se alguma das etapas teria influência significativa nos resultados finais. Os principais resultados do experimento MDSANGO são apresentados na [Tabela 4.2](#), na qual os valores médios correspondem à média das medidas nas amostras 1a, 2a, 3a, 1b, 2b, e 3b, conforme descrito acima. Nota-se que, de uma maneira geral, as médias calculadas apresentam um valor inferior às médias esperadas correspondentes, as quais são obtidas considerando-se a marcação natural de 1,1% em cada átomo de carbono. No entanto, os desvios relativos calculados são baixos, quase sempre menores que 10%, o que significa que as medidas, com exceção de 3 ou 4 fragmentos, são reprodutíveis. Para determinar se realmente existe uma tendência de as medidas serem mais baixas do que na realidade deveriam ser, ou se este problema ocorre apenas para esta faixa de valores de marcação baixos, tentou-se realizar um experimento no qual as células eram continuamente alimentadas com meio contendo 10% de glicose totalmente marcada [U- $^{13}\text{C}_6$]glicose e 90% de glicose naturalmente marcada. Neste experimento, esperar-se-ia que todos os metabólitos intracelulares apresentassem marcação de 11,1% em cada átomo de carbono, após atingido o estado estacionário isotópico, em vez de 1,1%, conforme realizado no experimento MDSANGO. Este experimento não foi bem sucedido e terminou-se por tomar como base os dados de um experimento análogo realizado por CHRISTENSEN; NIELSEN (1999b), os quais comprovam que não há uma tendência de os valores medidos serem mais baixos do que deveriam ser. Deve-se ainda levar em conta que muitas variáveis foram introduzidas em todo o processo de amostragem, hidrólise e derivatização neste experimento MDSANGO, o que não ocorre normalmente nos cultivos e nas amostragens realizados em biorreator.

Tabela 4.2 – Médias, desvios padrão e desvios relativos, calculados a partir dos dados de marcação do ensaio MDSANGO

Fragmento ^(a)	média esperada ^(b)	média de 6 medidas	desvio padrão de 6 medidas	desvio relativo (%) ^(c)
Ser175	2,2	1,5	0,4	29%
Ser132	2,2	1,6	0,1	5%
Gly175	2,2	1,7	0,2	12%
Gly144	2,2	1,7	0,1	8%
Gly85	1,1	1,0	0,1	6%
Ala116	2,2	1,9	0,1	3%
Ala99	2,2	2,2	0,1	4%
Ala158	3,3	3,1	0,2	6%
Leu158	5,5	5,2	0,1	2%
Val144	4,4	4,2	0,1	2%
Val143	2,2	2,1	0,1	5%
Val127	4,4	4,4	0,2	4%
Val186	5,5	5,1	0,3	6%
Asp188	3,3	2,8	0,1	5%
Asp115	1,1	0,7	0,1	20%
Asp216	4,4	4,0	0,1	3%
Ile158	5,5	5,0	0,1	2%
Thr175	2,2	1,4	0,1	7%
Thr146	3,3	3,6	0,3	9%
Pro142	4,4	4,0	0,1	2%
Lys156	5,5	5,4	0,1	1%
Glu143	2,2	3,0	0,3	11%
Glu230	5,5	5,4	0,4	7%
His327	6,6	4,5	0,7	15%
Phe192	8,8	18,5	4,9	27%
Phe143	2,2	2,3	0,1	3%
Glc331	6,6	5,5	0,5	8%

(a) para detalhes sobre os fragmentos, vide rodapé da [Tabela 4.5](#)

(b) considerando marcação natural de 1,1% em cada átomo de carbono

(c) $\text{desvio relativo} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}}$

O experimento ANGO11 teve como objetivos, dentre outros, verificar o número de tempos de residência necessários para se atingir o estado estacionário isotópico num cultivo contínuo e verificar a reprodutibilidade da metodologia de determinação da marcação em metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae* por GC-MS. Estes objetivos foram atingidos através do acompanhamento da incorporação da marca nos metabólitos intracelulares, conforme descrito no [item 3.2.6](#). Os principais resultados encontram-se na [Figura 4.3](#). Nota-se que há um período variável de incorporação da marca nos diferentes fragmentos analisados. Apesar disto, pode-se dizer que 4 ou 5 tempos de residência são suficientes para que o estado estacionário isotópico seja atingido, pois a partir deste instante, todos os fragmentos parecem apresentar

um valor constante, até a amostra final, com quase 10 tempos de residência. Sendo assim, definiu-se como 5 o número de tempos de residência a ser utilizado neste tipo de ensaio. Além disto, demonstra-se que a amostragem na saída do reator é uma boa alternativa à amostragem de todo o volume do reator, o que tornaria possível, com um cultivo apenas, atingir diferentes estados estacionários isotópicos, aumentando a capacidade de geração de resultados. Neste caso, porém, a medida da concentração celular em termos de massa seca de células ficaria comprometida, pois não seria possível retirar um volume de meio do reator suficiente para esta análise. Nota-se ainda, na [Figura 4.3](#), que uma cinética de incorporação de primeira ordem pode ser utilizada para aproximar o fenômeno de incorporação da marca, conforme indicado para o fragmento Asp216. Utilizando-se cinética de primeira ordem, calcula-se que a marcação em cada fragmento terá o valor de 99,4% do valor em estado estacionário isotópico, após 5 tempos de residência. Finalmente, aproveitou-se a grande quantidade de dados de marcação disponíveis para cada fragmento, para calcular o erro da medida da marcação. Os resultados são apresentados na [Tabela 4.3](#) e refletem a alta reprodutibilidade das medidas, pois os desvios relativos calculados (a partir de no mínimo 6 medidas de marcação em estado estacionário isotópico para cada fragmento) são muito baixos, quase em todos os casos menores que 5%.

A avaliação da reprodutibilidade das medidas de marcação, conforme realizada utilizando-se os dados do experimento ANGO11, apresentada na [Tabela 4.3](#), é mais apropriada do que a avaliação realizada com os dados do experimentos MDSANGO, apresentada na [Tabela 4.2](#). Isto ocorre porque a metodologia sempre é aplicada a experimentos com substrato marcado, e portanto, os valores de marcação serão quase sempre significativamente maiores que os valores de marcação natural (1,1% em cada átomo de carbono), conforme utilizado no experimento MDSANGO. O que ocorre é que, de forma análoga a qualquer determinação analítica, a imprecisão da medida

Figura 4.3 – Marcação nos fragmentos de metabólitos intracelulares em função do número de tempos de residência (ensaio ANGO11). Os dados são apresentados em três gráficos apenas para facilitar a visualização. No gráfico do meio, uma curva correspondente à cinética de incorporação de primeira ordem é apresentada para o fragmento Asp216

Tabela 4.3 – Médias, desvios padrão e desvios relativos, calculados a partir dos dados de marcação do ensaio ANGO11

Fragmento ^(a)	valor médio	desvio padrão	desvio relativo (%) ^(b)
Ser175	3,1	0,6	17,9%
Ser132	33,8	0,5	1,5%
Gly175	5,9	0,3	5,5%
Gly144	6,2	0,3	4,9%
Gly85	3,7	0,1	3,9%
Ala116	36,0	0,3	0,7%
Ala99	36,0	0,2	0,6%
Ala158	38,5	0,5	1,3%
Leu158	106,1	0,7	0,6%
Val144	73,3	0,3	0,4%
Val143	6,9	0,3	4,0%
Val127	73,1	0,4	0,5%
Val186	74,9	0,8	1,1%
Asp188	57,1	0,3	0,5%
Asp115	12,0	0,3	2,9%
Asp216	64,4	0,4	0,6%
Ile158	93,7	0,4	0,4%
Thr175	17,8	0,8	4,3%
Thr146	54,5	1,0	1,9%
Pro142	85,5	0,4	0,5%
Lys156	117,2	0,3	0,2%
Glu143	39,9	0,6	1,6%
Glu230	100,1	0,8	0,8%
His327	57,1	1,7	3,0%
Phe192	90,6	2,9	3,2%
Phe143	3,0	0,1	1,9%
Glc331	91,0	1,7	1,8%

(a) para detalhes sobre os fragmentos, vide rodapé da [Tabela 4.5](#)

(c)
$$\text{desvio relativo} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}}$$

aumenta para valores muito baixos a serem analisados. Em suma, para cultivos contínuos, o erro da medida da marcação em cada fragmento analisado será aquele indicado na [Tabela 4.3](#).

No caso de cultivos descontínuos, nos quais as células são retiradas do reator em fase exponencial de crescimento, e não em estado estacionário, a situação é diferente. Apesar de o crescimento exponencial ser uma situação de crescimento balanceado, ela é diferente de um estado estacionário. Para avaliar a validade de se utilizar células em crescimento exponencial de um cultivo descontínuo para aplicação da metodologia de determinação da marcação em metabólitos intracelulares, realizou-se o ensaio ANGO17 ([Tabela 4.1](#)).

Neste ensaio, dois cultivos nas mesmas condições foram realizados em paralelo. Em um deles, as células foram retiradas num instante da fase exponencial e no outro, duas horas mais tarde ([Figura 4.4](#)).

Figura 4.4 – Concentração celular em função do tempo (ensaio ANGO17). O instante de retirada de células em cada cultivo, para análise da marcação nos metabólitos intracelulares, está indicado pela seta correspondente.

Os resultados de marcação dos cultivos realizados no ensaio ANGO17 encontram-se indicados na [Figura 4.5](#). Os dados do cultivo ANGO17b, no qual as células foram colhidas com 11 h de cultivo (5,4 gerações após a inoculação), são apresentados em função dos dados do cultivo ANGO17a, no qual as células foram colhidas com 9 h de cultivo (4,6 gerações após a inoculação). Nota-se que os dados são muito próximos entre si e que portanto pode-se aplicar a metodologia a células retiradas em fase exponencial de cultivos descontínuos. SAUER *et al* (1999) obtiveram resultado análogo para *Escherichia coli*. Estes autores verificaram que, durante a fase exponencial de um cultivo descontínuo, as marcações em metabólitos intracelulares permaneciam constantes, mesmo após o início da fase estacionária. Ao longo deste trabalho, adotamos um mínimo de 4 gerações após a inoculação para a retirada de células.

Uma última e importante forma de se avaliar a reprodutibilidade da metodologia de determinação da marcação nos metabólitos

intracelulares de *S. cerevisiae* é através da análise de alguns dos dados apresentados na [Tabela 4.5](#), conforme discutido no [item 4.3.2](#).

Figura 4.5 – Dados de marcação em fragmentos de metabólitos intracelulares. Os dados do cultivo ANGO17b, no qual as células foram colhidas com 11 h de cultivo, são apresentados em função dos dados do cultivo ANGO17a, no qual as células foram colhidas com 9 h de cultivo. Os pontos indicam as medidas experimentais, enquanto a reta representa a situação em que os resultados de ambos os cultivos fossem idênticos.

4.3. Repressão por glicose na cepa referência (GOMBERT *et al*, 2001)

Os resultados dos ensaios ANGO9 e ANGO11 permitem fazer uma comparação entre células de *S. cerevisiae* crescendo exponencialmente com velocidade específica máxima (metabolismo respiratório-fermentativo) e células crescendo numa velocidade específica bem abaixo da máxima num quimiostato (metabolismo respiratório).

4.3.1. Velocidades específicas e fatores de conversão

Os principais resultados dos ensaios ANGO9 e ANGO11, em termos de medidas realizadas fora do ambiente celular, são apresentados na [Tabela 4.4](#).

Tabela 4.4 – Velocidades específicas de crescimento e fatores de conversão para a cepa referência CEN.PK113-7D*

Ensaio	ANG09	ANG011
Forma de operação do reator	descontínua	contínua
Metabolismo	respiratório-fermentativo	respiratório
$\mu_{\max}$ / D (h ⁻¹)	0,37	0,11
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,105	0,52
$Y_{\text{acetato}/s}$ (mol/mol)	0,065	~0
$Y_{\text{glicerol}/s}$ (mol/mol)	0,055	~0
$Y_{\text{etanol}/s}$ (mol/mol)	1,56	~0

*os fatores de conversão de glicose a piruvato e de glicose a succinato foram sempre menores que 0,01 mol/mol. Os parâmetros $\mu_{\max}$ e $Y_{x/s}$ foram determinados nos reatores de 4 L. Os valores da velocidade específica máxima de crescimento calculados a partir dos dados de densidade óptica (absorbância) foram iguais nos ensaios realizados nos reatores de 4 L e nos reatores de 200 mL. Os fatores de conversão de glicose aos metabólitos medidos também foram similares nos dois tipos de reator utilizados.

Observa-se que no cultivo contínuo, toda a glicose é utilizada para formação de biomassa e CO₂, enquanto que no cultivo descontínuo a conversão a biomassa é cerca de cinco vezes menor e a maior parte da glicose consumida pelas células é convertida a etanol. Os valores obtidos estão de acordo com dados de literatura (VERDUYN, 1991).

4.3.2. Identificação de redes metabólicas: inspeção qualitativa dos dados de marcação

Previamente à utilização dos dados de marcação nos metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae* para o cálculo de fluxos metabólicos, é interessante inspecionar estes dados de forma qualitativa. Esta tarefa é denominada **Inspeção Qualitativa dos Dados de Marcação (IQDM)** e consiste basicamente em utilizar os dados de marcação medidos, para verificar a atividade de algumas vias que fazem parte do metabolismo central de *S. cerevisiae*. Para isto, deve-se comparar o que se conhece sobre o funcionamento destas vias, que consiste basicamente do que está disponível na literatura, com os dados de marcação obtidos, observando se há coerência entre ambos. Levando-se em conta os fragmentos de aminoácidos e glicose intracelular analisados neste

TABELA 4.4.1 – Pequeno guia para IQDM*

Função metabólica	Fragmentos analisados	Át. de C precursores	Como olhar para os fragmentos?
Via PP	Glc331 Ser132 Ala116(99)	Glc1-6 Ser2-3 Ala2-3	↓SFL Glc1-6 ⇒ ↑fluxo via PP ↓SFL Ser2-3 ⇒ ↑fluxo via PP ↓SFL Ala2-3 ⇒ ↑fluxo via PP
Treonina Aldolase (TA)	Ser175 Gly175(144) Thr175	Ser1-2 Gly1-2 Thr1-2	Se MAR ^(b) Gly1-2 tem valor intermediário entre Ser1-2 e Thr1-2 ⇒ atividade TA
Via TCA	Asp115	Oaa2	↑MAR ^(b) Oaa2 ⇒ ↑ciclo TCA
Enzima Málica (MAE) 1^(a)	Val144(127)+2 Ala116(99)	Pyr2-3(mit) Pyr2-3	Se MAR ^(b) Pyr2-3(mit) via Val é maior que MAR ^(b) Pyr2-3 via Ala ⇒ fluxo MAE
Enzima Málica (MAE) 2^(a)	Val143 Phe143	Pyr1-2(mit) Pep1-2	Se MAR ^(b) Pyr1-2(mit) é maior que MAR ^(b) Pep1-2 ⇒ fluxo MAE

TABELA 4.4.1 (continuação)

Função Metabólica	Observações	A IQDM é conclusiva?	Melhores exemplos (ver item 4.4.2)
Via PP	As 3 observações devem ocorrer simultaneamente, pois são interdependentes.	Sim.	<i>snf1</i>
Treonina Aldolase (TA)	A marca em Thr1-2 pode ser passada até Ser1-2, devido à reversibilidade de SHM ^(c) .	Sim, se as marcações não estiverem próximas à marcação natural.	<i>reg1</i> <i>grr1</i>
Via TCA	Thr175 deve seguir a tendência de Asp115.	Sim.	
Enzima Málica (MAE) 1^(a)	Leu158 deve seguir a tendência de Val144(127).	Provavelmente. Não se sabe com certeza se a síntese de Ala é citossólica.	<i>reg1</i>
Enzima Málica (MAE) 2^(a)	Pep é considerado um metabólito citossólico.	Provavelmente. Se as marcações são iguais, não há fluxo pela MAE.	<i>snf4</i> (não há fluxo pela MAE)

* Inspeção Qualitativa dos Dados de Marcação

- (a) A princípio, existe a possibilidade de as enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e enzima málica estarem ambas ativas ao mesmo tempo, de modo que não seja possível observar esta ocorrência através dos dados de marcação. Mede-se a marcação em OAAcyt (via Asp e Thr), PEP (via Phe), PYRcyt (via Ala?) e PYRmit (via Val). Se ambas as enzimas estiverem ativas, as seguintes transições de átomos de C ocorrerão:

PEP1,2,3 → PYRcyt1,2,3 (via piruvato quinase)
 PYRcyt1,2,3 → PYRmit1,2,3 (via transportador)
 OAAcyt1,2,3 → PEP1,2,3 (via PEP carboxiquinase)
 OAAmit1,2,3 → OAAcyt1,2,3 (via transporte)
 OAAcyt1,2,3 → OAAmit1,2,3 (via transporte)
 OAAmit1,2,3 → MAL1,2,3 (via reversibilidade da enzima malato desidrogenase)
 MAL1,2,3 → PYRmit1,2,3 (via enzima málica)

Estas transições indicam que é possível que PEP carboxiquinase e enzima málica estejam ativas ao mesmo tempo e que as marcações nos átomos C1 e C2 dos fragmentos indicados sejam todas iguais.

- (b) Marcação (ver [item 3.2.6.3](#) para detalhes)
 (c) Serina Hidroximetil Transferase

trabalho, há basicamente quatro funções metabólicas centrais, sobre as quais é possível obter informações: o ciclo TCA, a via PP, a enzima treonina aldolase e a enzima málica. Os detalhes da IQDM são apresentados na [Tabela 4.4.1](#).

O exercício da IQDM é importante para a definição exata das reações que fazem parte da rede metabólica, o que auxiliará na formulação do modelo estequiométrico que será subsequentemente utilizado para o cálculo de fluxos.

Os resultados de marcação nos metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae* para os ensaios ANGO9 e ANGO11 são apresentados na [Tabela 4.5](#). É possível observar, através dos dados apresentados na [Tabela 4.5](#), que um número considerável de fragmentos de aminoácidos, além da glicose intracelular, pode ser analisado pela técnica empregada. Estes dados de marcação nos aminoácidos refletem as marcações nos precursores das vias metabólicas centrais, pois são bem conhecidas as vias de biossíntese dos aminoácidos a partir de seus respectivos precursores (ZUBAY, 1988). É sabido, por exemplo, que alanina é sintetizada a partir de piruvato por uma única reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase. Nesta reação, os átomos de carbono 1, 2 e 3 do piruvato são convertidos nos átomos 1, 2 e 3 da alanina, respectivamente. De maneira análoga, é possível saber como os átomos de outros precursores das vias metabólicas centrais são incorporados nos aminoácidos detectados pela análise empregada, conforme indicado na [Tabela 4.5](#), mesmo que haja mais que uma reação catalisando a síntese do aminoácido.

Conforme mencionado no item 4.2, alguns dos dados da [Tabela 4.5](#) podem ser utilizados para verificar a acurácia das medidas experimentais. É sabido que os aminoácidos alanina e valina são ambos derivados do piruvato. De acordo com os valores de marcação medidos e a correspondência de átomos de carbono, verifica-se que todos os dados de marcação para os fragmentos destes dois aminoácidos estão de acordo entre si. Por exemplo, a marcação no fragmento Ala116 (ou

Tabela 4.5 – Dados de marcação nos metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae* (ensaios ANGO9 e ANGO11)

metabólito	peso molecular do isotopômero não marcado ^(a)	átomos de C no fragmento medido	precursor reportado ^(b)	Correspondência de átomos de C reportada ^(b)	marcação no fragmento (%)	
					ANGO 9 descon-tínuo	ANGO 11 con-tínuo
Glc	331 [§]	1,2,3,4,5,6	G6P	1,2,3,4,5,6	98,2	91,0
Ser	175 [#] 132 [#]	1,2 2,3	3-PG	1,2 2,3	2,3 44,3	3,1 33,8
Gly	175 [#] 144* 85*	1,2 1,2 2		1,2 1,2 2	2,2 2,4 1,3	5,9 6,2 3,7
Ala	116 [#] 99* 158*	2,3 2,3 1,2,3	PYR	2,3 2,3 1,2,3	45,2 45,1 46,8	36,0 36,0 38,5
Val	144 [#] 143* 127* 186*	2,3,4,5 1,2 2,3,4,5 1,2,3,4,5		2,2,3,3 1,2 2,2,3,3 1,2,2,3,3	90,6 6,9 90,2 93,0	73,3 6,9 73,1 74,9
Leu	158 [#]	2,3,4,5,6	PYR + AcCoA	2,2,3,3 + 2	130,1	106,1
Asp	188 [#] 115* 216*	2,3,4 2 1,2,3,4	OAA	2,3,4 2 1,2,3,4	49,9 2,0 51,7	57,1 12,0 64,4
Thr	175 [#] 146 [#]	1,2 2,3,4		1,2 2,3,4	2,9 47,6	17,8 54,5
Ile	158 [#]	2,3,4,5,6	OAA + PYR	2,3,4 + 2,3	95,1	93,7
Glu	143* 230*	1,2 1,2,3,4,5	AKG	1,2 1,2,3,4,5	43,9 95,2	39,9 100,1
Pro	142 [#]	2,3,4,5		2,3,4,5	87,1	85,5
Lys	156 [#]	2,3,4,5,6	AKG + AcCoA	2,3,4,5 + 2	125,7	117,2
Phe	143* 192 [#]	1,2 2,3,4,5,6,7,8,9	PEP E4P + PEP	1,2 1,2,3,4 + 2,2,3,3	2,5 111,9	3,0 90,6

(a) os índices superiores indicam o tipo de agente utilizado na derivatização: § GPA, # ECF, * DMFDMA. Os detalhes estão descritos na seção Métodos.

(b) precursores são sempre moléculas que fazem parte das chamadas vias metabólicas centrais: a via EMP, a via PP, o ciclo TCA e reações anapleróticas (ZUBAY, 1988).

Ala99) corresponde à metade da marcação no fragmento Val144 (ou Val127) em ambos os cultivos. Analogamente, a marcação no fragmento Asp188 pode ser comparada àquela no fragmento Thr146, pois ambos fragmentos derivam dos mesmos átomos de carbono do oxaloacetato. Neste caso, há uma pequena diferença entre os valores, se forem considerados os desvios padrão indicados na Tabela 4.3. Esta diferença, como será discutido mais adiante no texto, pode ocorrer devido à compartimentação do oxaloacetato (existência deste metabólito em mais de um compartimento celular).

A seguir, uma análise de diferentes aspectos do metabolismo de *S. cerevisiae* será apresentada, baseando-se nos resultados de marcação apresentados na [Tabela 4.5](#).

4.3.2.1. Biossíntese de glicina

No caso de glicina, imagina-se que o precursor de sua biossíntese é a serina, que por sua vez é sintetizada a partir do 3-fosfoglicerato (ZUBAY, 1988), sendo este portanto o precursor drenado a partir das vias metabólicas centrais ([Figura 4.6](#)). No entanto, os resultados do quimiostato indicam que a marcação no fragmento Gly175 (ou Gly144) é maior que o valor obtido para o fragmento Ser175 ([Tabela 4.5](#)). Isto é um forte indício de que há outra rota de biossíntese de glicina, além daquela a partir de 3-fosfoglicerato, rota esta que contribui para o aumento na marcação deste aminoácido. Em *S. cerevisiae*, a inativação de três genes é necessária para que haja auxotrofia em relação a glicina (McNEIL *et al*, 1994). Dois destes genes, denominados *SHM1* e *SHM2*, codificam para a enzima serina hidroximetiltransferase mitocondrial e citossólica, respectivamente. O terceiro gene, denominado *GLY1*, não tinha sua função elucidada, até que recentemente dois estudos paralelos demonstraram que o gene *GLY1* codifica para a enzima treonina aldolase, que catalisa a quebra de treonina em glicina e acetaldeído (LIU *et al*, 1997; MONSCHAU *et al*, 1997). Portanto, existem duas vias de síntese de glicina em células de *S. cerevisiae* crescendo em glicose: uma, a partir do 3-fosfoglicerato, e outra, a partir do oxaloacetato via treonina. Quando *S. cerevisiae* cresce em substratos não fermentáveis, como etanol e acetato, uma terceira via é a principal responsável pela síntese de glicina. Neste caso, glioxilato é convertido em glicina através de uma reação catalisada pela enzima alanina-glioxilato-aminotransferase (MONSCHAU *et al*, 1997), cujo gene ainda não foi clonado. Como esta via não opera sob crescimento em glicose, a análise feita aqui indica atividade da enzima treonina aldolase e

portanto esta reação foi incluída no modelo matemático utilizado para o cálculo de fluxos (ver [Apêndice](#)).

O metabolismo das coenzimas de folato é outro ponto de interesse a ser discutido. Quando os cálculos de fluxos foram realizados pela primeira vez para o quimiostato, a reação correspondente à descarboxilação da glicina foi incluída no modelo. Os cálculos levaram ao valor zero para o fluxo por esta reação. Este resultado está de acordo com dados de literatura, os quais indicam que a geração de unidades de

Figura 4.6 – As três possíveis vias de biossíntese de glicina em *S. cerevisiae*.

um carbono ocorre principalmente na reação catalisada pela enzima serina hidroximetiltransferase, e que a quebra da glicina pelo sistema GCV (“Glycine Cleavage System”) somente ocorre quando o primeiro está inativo (McNEIL *et al*, 1996). Desta forma, a reação foi excluída do modelo (conforme apresentado no [Apêndice](#)), principalmente por causa dos baixos valores de marcação obtidos para os fragmentos de glicina no cultivo descontínuo ([Tabela 4.5](#)), valores estes que correspondem à marcação natural do carbono (1,1% em ^{13}C) e que poderiam gerar complicações numéricas na rotina de estimativa de fluxos em torno deste ponto do metabolismo.

4.3.2.2. Compartimentação do piruvato

Os aminoácidos que possuem átomos de carbono oriundos do piruvato são valina, alanina, isoleucina e leucina (estes dois últimos também possuem átomos de carbono oriundos de outros precursores). Sabe-se que valina é sintetizada a partir de piruvato mitocondrial, já que a primeira reação da via biossintética de valina, catalisada pela enzima acetolactato sintase (Ilv2), ocorre na mitocôndria (FALCO *et al*, 1985). No caso da alanina, sintetizada a partir de piruvato por uma única reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase, não se pode afirmar em que compartimento ocorre a reação. Segundo as bases de dados (por exemplo: YPD database, www.proteome.com), existem duas alanina aminotransferases putativas, uma citossólica (YDR111C) e outra mitocondrial (YLR089C). Neste trabalho, assumiu-se que a biossíntese de alanina a partir de piruvato é citossólica, pois este é o caso da maioria dos aminoácidos sintetizados a partir de uma simples reação de transaminação. No caso da isoleucina, a primeira reação de sua via biossintética é catalisada pela enzima Ilv2, a mesma enzima da primeira reação da via biossintética da valina. Portanto, o piruvato desviado para biossíntese de leucina é mitocondrial. A biossíntese de leucina ocorre a partir do α -cetisovalerato, um intermediário da via biossintética da valina. Portanto, o piruvato drenado para a síntese de leucina também é mitocondrial.

Devido aos diferentes compartimentos nos quais os aminoácidos da família do piruvato são sintetizados (conforme discutido no parágrafo acima), decidiu-se dividir o “pool” de piruvato celular em um “pool” citossólico e outro mitocondrial no modelo estequiométrico utilizado para o cálculo de fluxos metabólicos. Também foi incluída uma reação de transporte de piruvato do citossol para a mitocôndria ([Apêndice](#)).

4.3.2.3. Compartimentação da acetil coenzima A

As marcações nos aminoácidos derivados de mais de um precursor, como por exemplo leucina, isoleucina, lisina e fenilalanina, também podem ser utilizadas para obter informações interessantes sobre o metabolismo. Subtraindo-se a marcação no fragmento Val127 (ou Val144) da marcação no fragmento Leu158, obtém-se a marcação no átomo C2 da acetil coenzima A (39,9% no cultivo descontínuo e 33,0% no cultivo contínuo). Estes valores representam a marcação no átomo C2 da acetil coenzima A na mitocôndria, pois a reação de incorporação da acetil coenzima A na via biossintética da leucina, catalisada pela enzima α -isopropilmalato sintase (Leu4), ocorre na mitocôndria (HAMPSEY *et al*, 1983; RYAN *et al*, 1973). Subtraindo-se a marcação no fragmento Pro142 da marcação no fragmento Lys156, também é possível calcular a marcação no átomo C2 da acetil coenzima A (38,6% no cultivo descontínuo e 31,7% no cultivo contínuo). Neste caso, os valores representam provavelmente a marcação no átomo C2 da acetil coenzima A no núcleo celular, pois a reação de incorporação da acetil coenzima A na via biossintética da lisina, catalisada pelas duas formas da enzima homocitrato sintase (Lys20 e Lys21), ocorre no núcleo (CHEN *et al*, 1997). Apesar disto, para não incluir um terceiro compartimento no modelo estequiométrico utilizado para cálculo de fluxos metabólicos ([Apêndice](#)), esta acetil coenzima A foi incluída como citossólica, para diferenciá-la da acetil coenzima A mitocondrial. No caso dos dados calculados acima, não há diferença significativa entre as marcações na forma mitocondrial e na forma não mitocondrial da acetil coenzima A. No entanto, a inclusão desta compartimentação no modelo estequiométrico é importante, pois pode levar a resultados interessantes, como no caso da identificação de uma via de degradação de ácido fenoxiacético em *Penicillium chrysogenum* (CHRISTENSEN; NIELSEN, 2000).

4.3.2.4. Enzima málica

Com relação à marcação na fenilalanina, a qual é sintetizada a partir de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato, observa-se que o fragmento Phe143, que é derivado dos átomos C1 e C2 do fosfoenolpiruvato, tem uma marcação menor que aquela no fragmento Val143, o qual é derivado dos átomos C1 e C2 do piruvato ([Tabela 4.5](#)), tanto no cultivo contínuo como no descontínuo. Esta observação dá indícios para a atividade de uma segunda via de formação de piruvato, além daquela catalisada pela enzima piruvato quinase. BOLES *et al* (1998) demonstraram que, apesar de não se conhecer exatamente sua função, a enzima málica (Mae1) é ativa em células de *S. cerevisiae* crescendo em glicose. Esta enzima catalisa a conversão de malato em piruvato na mitocôndria, e poderia portanto explicar as diferenças observadas nas marcações no piruvato e no fosfoenolpiruvato, como indicado acima. Sendo assim, a reação catalisada pela enzima málica foi incluída no modelo para cálculo de fluxos metabólicos ([Apêndice](#)).

4.3.2.5. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA)

Comparando-se os dados de marcação do cultivo descontínuo com os correspondentes dados do cultivo contínuo, observam-se várias diferenças. No primeiro caso, fica evidente que o metabolismo opera na forma respiratória-fermentativa e que o ciclo TCA não opera como um ciclo propriamente dito, mas sob a forma de dois ramos. Isto pode ser deduzido a partir da marcação no átomo C2 do aspartato, que é igual a 2,0% ([Tabela 4.5](#)), indicando que este átomo de C não pode ter origem no α -cetoglutarato. Os dados indicam que este átomo deve ser gerado a partir do piruvato através da reação anaplerótica catalisada pela enzima piruvato carboxilase, a qual é citossólica (HAARASILTA; TASKINEN, 1977; WALKER *et al*, 1991). Considerando-se esta reação anaplerótica e o ciclo TCA, há no metabolismo de *S. cerevisiae* somente duas

possibilidades para a origem do átomo C2 do aspartato (que reflete o átomo C2 do oxaloacetato): no átomo C2 do piruvato ou nos átomos C3 e C4 do α -cetoglutarato (neste caso há duas opções devido à simetria de alguns intermediários do ciclo TCA, como o succinato). Como as marcações nos fragmentos de prolina e glutamato (derivados do α -cetoglutarato) são muito mais altas que a marcação no aspartato, conclui-se que o C2 do oxaloacetato somente pode vir do piruvato, que tem sua marcação refletida nos fragmentos de valina, que por sua vez apresenta marcações baixas em seus átomos C1 e C2. Ao contrário do cultivo descontínuo, as células no quimiostato crescem com metabolismo puramente respiratório. Neste caso, o átomo C2 do aspartato apresenta uma marcação de 12,0%, indicando que o mesmo é, ao menos em parte, gerado a partir do α -cetoglutarato (devido aos altos valores de marcação nos fragmentos de prolina e glutamato e aos baixos valores de marcação nos fragmentos de valina).

4.3.2.6. *Via das pentoses fosfato (via PP)*

Outra observação interessante é que os aminoácidos que têm sua origem em precursores como o 3-fosfoglicerato e o piruvato, da via EMP, apresentam marcações mais baixas no quimiostato que no cultivo descontínuo (Tabela 4.5). Isto é devido ao fato de o fluxo pela via PP ser mais alto no primeiro caso. Um alto fluxo por esta via é requerido quando o fator de conversão de glicose a biomassa é alto, em função da maior necessidade de NADPH para reações de biossíntese. Um alto fluxo pela via PP provoca uma diminuição nos valores de marcação nos intermediários da via EMP, pois a descarboxilação do 6-fosfogluconato que ocorre na reação catalisada pela enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (uma das primeiras reações da via PP) remove justamente o átomo de C que carrega a marca introduzida no meio de cultura sob a forma de [1- 13 C]glicose. Além disto, a marcação no fragmento de glicose-6-fosfato é mais alta no cultivo descontínuo do que

no quimiostato, devido ao fato de o fluxo pela via PP ser menor no primeiro caso, o que faz que menos frutose-6-fosfato seja convertida a glicose-6-fosfato pela reversibilidade da reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato isomerase, o que finalmente ocasiona uma menor “diluição” da marca na glicose-6-fosfato.

4.3.3. Análise de fluxos metabólicos

A análise acima, denominada identificação de redes metabólicas, foi realizada através da inspeção das marcações medidas nos fragmentos de metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae*. Esta análise tem um caráter qualitativo ou, na melhor das hipóteses, semi-quantitativo. No entanto, se estes dados de marcação forem combinados com um modelo matemático adequado, torna-se possível quantificar os fluxos pelo metabolismo central de *S. cerevisiae*. Desta forma, pode-se comparar de maneira quantitativa células crescendo num quimiostato a $0,1 \text{ h}^{-1}$ com células crescendo exponencialmente num cultivo descontínuo com $\mu_{\max} = 0,37 \text{ h}^{-1}$. O processo de estimar fluxos caracteriza-se pela busca do modelo estequiométrico que descreve de forma mais adequada o metabolismo em estudo, num processo de tentativa e erro com base em conhecimento bioquímico e hipóteses adequadas (estas são necessárias para definir detalhes bioquímicos não conhecidos e para evitar complicações numéricas nos cálculos). O modelo que se mostrou mais adequado é o apresentado no [Apêndice](#), o qual pode ser utilizado para ambas as condições de cultivo estudadas, conforme indicado no [item 4.3.1](#).

Os fluxos estimados para as duas condições de cultivo são apresentados na [Figura 4.7](#). Na [Tabela 4.6](#), os valores das marcações medidas são apresentados juntamente com os valores calculados pela rotina numérica utilizada para a estimativa de fluxos. A comparação entre estes dois conjuntos de valores dá uma indicação da precisão dos cálculos realizados. É possível observar que quase todas as marcações

calculadas, utilizando-se o modelo matemático apresentado no [Apêndice](#), são iguais às marcações medidas, se for considerado um erro absoluto de uma unidade na medida da marcação. As reversibilidades são indicadas na [Figura 4.7](#) em termos dos fluxos de intercâmbio normalizados:

$$v_{interc}^{[0,1]} = \frac{v_{interc}}{v_{interc} + v_{líquido}} \quad [4.1]$$

onde V_{interc} é o fluxo de intercâmbio (fluxo 2 na [Figura 4.8](#)) e $V_{líquido}$ é o fluxo líquido (fluxo 1 na [Figura 4.8](#)).

As reversibilidades das reações catalisadas pelas transaldolases e transcetolases da via PP não estão indicadas na [Figura 4.7](#), pois o número de medidas de marcação em fragmentos de aminoácidos derivados de metabólitos desta via não permite uma estimativa precisa destes valores. No entanto, os valores dos fluxos líquidos por estas reações podem ser estimados com relativa confiança (os valores obtidos não sofreram alteração quando diferentes cálculos foram realizados).

Uma primeira observação que pode ser feita a partir dos dados da [Figura 4.7](#) é com relação ao fluxo pela via PP. Nota-se que o valor de 44,2 para o quimiostato é bem maior que o valor de 16,2 obtido no cultivo descontínuo (ambos valores são relativos a um consumo de 100 unidades arbitrárias de glicose). Conforme mencionado acima, isto está de acordo com a maior necessidade de NADPH para reações anabólicas no caso do cultivo contínuo, no qual o fator de conversão de glicose a células é maior ($Y_{x/s} = 0,5$ g/g). No cultivo descontínuo, apesar de o conteúdo protéico das células ser maior ([Tabela 3.3](#)), o que exige maior quantidade de NADPH para a síntese de aminoácidos, o catabolismo de glicose gera principalmente etanol e o fator de conversão de glicose a células ficou em torno de 0,1 g/g. No entanto, se a velocidade específica de consumo de glicose (15,9 mmol/g/h no cultivo descontínuo e 1,17 mmol/g/h no quimiostato) for multiplicada pelo correspondente fluxo pela via PP (que é um dado relativo), conforme indicado acima, é

Figura 4.7 – Fluxos no metabolismo central de *S. cerevisiae*. Os valores em negrito correspondem ao cultivo descontínuo e os valores em itálico correspondem ao cultivo contínuo. Reversibilidades são indicadas pelos dados em parênteses, sob a forma de fluxos de intercâmbio normalizados (equação 4.1).

Figura 4.8 – Definição de fluxo de intercâmbio e fluxo líquido numa reação reversível.

Tabela 4.6 – Marcações medidas e marcações calculadas nos cultivos contínuo e descontínuo com a cepa referência CEN.PK113-7D

fragmento ^(a)	contínuo		descontínuo	
	calculado	medido	calculado	medido
Glc331	91,1	91,0	98,5	98,2
Gly175	6,2	5,9	2,9	2,2
Gly144	6,2	6,2	2,9	2,4
Gly85	3,2	3,7	1,4	1,3
Ser175	3,5	3,1	2,9	2,3
Ser132	34,4	33,8	44,3	44,3
Ala116	34,4	36,0	43,9	45,2
Ala99	34,4	36,0	43,9	45,1
Ala158	36,6	38,5	46,2	46,8
Leu158	105,1	106,1	128,4	130,1
Val144	72,7	73,3	87,9	90,6
Val143	7,7	6,9	5,6	6,9
Val127	72,7	73,1	87,9	90,2
Val186	76,2	74,9	90,2	93,0
Asp188	58,9	57,1	53,2	49,9
Asp115	10,3	12,0	3,3	2,0
Asp216	65,4	64,4	55,4	51,7
Ile158	95,2	93,7	97,1	95,1
Glu143	40,2	39,9	42,7	43,9
Glu230	99,6	100,1	96,0	95,2
Pro142	85,2	85,5	87,9	87,1
Lys156	118,1	117,2	128,4	125,7
Phe192	91,8	90,6	110,3	111,9
Phe143	3,5	3,0	3,0	2,5

^(a)para detalhes sobre os fragmentos, vide rodapé da Tabela 4.5. Os fragmentos de treonina não foram incluídos nos cálculos.

possível observar que o fluxo pela via PP, em termos absolutos, é na realidade maior no cultivo descontínuo (2,57 mmol/g/h) do que no quimiostato (0,51 mol/g/h). Isto significa que as células consomem glicose com maior velocidade no cultivo descontínuo em relação ao contínuo. Isto ocorre devido a um maior fluxo global pelas vias glicolíticas em células com metabolismo respiratório-fermentativo em relação a células com metabolismo respiratório.

Poucos valores podem ser encontrados na literatura para o fluxo pela via PP em *S. cerevisiae*. GANCEDO; LAGUNAS (1973) reportam que a via PP responde por apenas 2,5% do catabolismo de glicose em células crescendo em glicose e amônia. Este valor foi obtido a partir de medidas de radioatividade no CO₂ produzido por células crescendo em frascos agitados, em meio contendo glicose marcada com ¹⁴C. Devido à reversibilidade da reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato isomerase, este método tende a subestimar o valor do fluxo pela via PP.

A quantidade de NADPH requerida para formação de biomassa foi estimada em 831 mmol (BRUINENBERG *et al*, 1983) ou 931 mmol (OURA, 1983) para 100 g de massa seca de células. Utilizando-se estes valores, é possível fazer uma estimativa do fluxo pela via PP, imaginando-se que esta é a única via de geração de NADPH. Para um fator de conversão de glicose a células de 0,5 g/g, para cada 100 mmol de glicose consumidos, 9 g de massa seca de células são formados e 74,8 mmol ou 83,8 mmol de NADPH são requeridos. Como cada molécula de glicose-6-fosfato que entra na via PP gera duas moléculas de NADPH, um fluxo de 37,4 ou 41,9 mmol por 100 mmol de glicose pode ser calculado para a via PP, valores que estão muito próximos aos 44,2 estimados neste trabalho. Aplicando-se o mesmo raciocínio ao cultivo descontínuo, com um fator de conversão de glicose a células de 0,1 g/g, o fluxo calculado para a via PP fica entre 7,5 e 8,4. Neste caso, o valor estimado pela metodologia empregada neste trabalho é maior (16,2).

É importante notar que a análise feita neste trabalho é baseada em dois pontos principais. Primeiro, no fato de que é possível medir a marcação na glicose-6-fosfato com alto grau de confiabilidade. Segundo, no fato de que a reversibilidade da reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato isomerase foi incluída nos cálculos.

Com relação ao ciclo TCA, observa-se que o mesmo opera de forma cíclica em células retiradas do quimiostato, e na forma de dois ramos em células retiradas do cultivo descontínuo, um ramo que leva a α -cetoglutarato e outro que leva a fumarato. Não foi encontrada nenhuma referência anterior na literatura a esta observação *in vivo*. O ponto exato de interrupção do ciclo, localizado entre α -cetoglutarato e fumarato, não pode ser determinado pela metodologia empregada neste trabalho, pois não há nenhuma medida da marcação em fragmentos de succinato e/ou succinil coenzima A e portanto estes metabólitos não foram incluídos no modelo. Os dados da [Figura 4.7](#) mostram que o fluxo que leva do α -cetoglutarato ao fumarato é zero em células com metabolismo respiratório-fermentativo e que o fluxo líquido que leva de fumarato a oxaloacetato também é zero, apesar de haver um fluxo de intercâmbio neste caso. A compartimentação do oxaloacetato, conforme consta do modelo apresentado no [Apêndice](#), foi importante para que as marcações calculadas pudessem ser ajustadas às marcações medidas ([Tabela 4.6](#)), assim como a inclusão das reações catalisadas pela enzima piruvato carboxilase e pela enzima málica em diferentes compartimentos.

Conforme mencionado no item anterior, a inclusão da enzima málica no modelo estequiométrico foi a única forma de compensar a diferença entre a marcação no fosfoenolpiruvato e no piruvato. Apesar de medidas de atividade enzimática e “Northern blot” indicarem que o fluxo pela enzima málica é provavelmente maior num cultivo descontínuo à velocidade específica de crescimento máxima em relação a um quimiostato a $0,1 \text{ h}^{-1}$ (BOLES *et al*, 1998), os resultados apresentados na [Figura 4.7](#) indicam o inverso, ou seja, um fluxo maior

na condição de quimiostato. É importante ter em mente que análises do tipo “Northern blot” refletem apenas a concentração dos mRNAs, e não a atividade da enzima. Por outro lado, medidas de atividade enzimática no extrato celular (*in vitro*) não refletem necessariamente o que ocorre *in vivo*. No entanto, as reais causas das diferenças observadas entre os resultados apresentados por BOLES *et al* (1998) e aqueles obtidos neste trabalho, assim como o próprio papel da enzima málica no crescimento de *S. cerevisiae* em glicose, ainda não foram esclarecidos.

A formação de glicina por duas diferentes vias, pela enzima hidroximetiltransferase (Shm1/2) e pela enzima treonina aldolase (Gly1), foi incluída no modelo. Os resultados apresentados na [Figura 4.7](#) indicam que há uma maior contribuição da enzima Shm1/2 para a síntese de glicina em relação à contribuição da enzima Gly1. No entanto, resultados de literatura indicam que o crescimento de *S. cerevisiae* é reduzido de forma mais dramática quando a expressão do gene *GLY1* é anulada, do que quando a expressão de ambos os genes *SHM1* e *SHM2* é anulada (McNEIL *et al*, 1994).

4.4. Repressão por glicose em diferentes mutantes

Após a análise realizada na cepa referência CEN.PK113-7D, passou-se à investigação do metabolismo central em diferentes mutantes desta cepa. Cada mutante continha uma interrupção num gene codificador de uma proteína envolvida na cascata de repressão por glicose, conforme apresentado na Tabela 3.1 (somente o mutante *mig1mig2* continha interrupções em dois genes). Desta forma, torna-se possível verificar o efeito da ausência de cada uma destas proteínas na atividade de algumas vias metabólicas e na distribuição de fluxos pelo metabolismo central de *S. cerevisiae*.

4.4.1. Velocidades específicas e fatores de conversão

As velocidades específicas máximas ($\mu_{\max}$) dos mutantes, obtidas durante a fase exponencial de cultivos descontínuos, são apresentadas na Figura 4.9.

Figura 4.9 – Velocidades específicas máximas de crescimento de diferentes mutantes de *S. cerevisiae*. A primeira coluna corresponde à cepa referência.

Os dados apresentados nas Figuras 4.9 e 4.10, além dos dados da Tabela 4.7, correspondem aos seguintes ensaios (conforme Tabela 4.1): ANGO9 (RS), ANGO13 (*mig1*), ANGO15 (*mig1mig2*), ANGO17 (*snf1*), ANGO19a (*snf4*), ANGO19b (*grr1*), ANGO20 (*reg1*), ANGO21a (*hap4*) e ANGO21b (*hvk2*).

Os dados da Figura 4.9 mostram que a interrupção simples de *MIG1*, *SNF1* ou *SNF4*, ou a interrupção conjunta de *MIG1* e *MIG2* não têm um grande efeito no valor da velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae*, a qual nestes casos permanece acima de 90% do valor para a cepa referência. De acordo com os dados da Figura 4.10, os fatores de conversão glicose a etanol e glicose a células também não sofreram grandes alterações nestes mutantes em relação à cepa referência, ficando dentro de uma faixa de variação de 20%. No caso das proteínas Snf1 e Snf4, que devem estar presentes e ativas para que haja desrepressão em células de *S. cerevisiae* (TREITEL *et al*, 1998; CARLSON, 1999), é de se esperar que a interrupção de seus respectivos genes não cause grandes mudanças no crescimento em situação de repressão por glicose, pois, neste caso, estas proteínas estariam inativas. No caso da ausência de Mig1, que tem um papel importante e comprovado na repressão da transcrição do gene *SUC2* (KLEIN *et al*, 1998; WU; TRUMBLY, 1998), é de certa forma surpreendente que o mutante apresente velocidade de crescimento e fatores de conversão similares à cepa referência, pois seria esperado que na ausência de Mig1, não haveria mais ligação desta proteína aos sítios promotores de genes reprimidos por glicose, liberando sua transcrição. Sendo assim, ou há outra proteína que se liga aos sítios de ligação de Mig1, como por exemplo a proteína Mig2, ou há outros mecanismos / vias regulatórias que controlam o funcionamento do metabolismo central de *S. cerevisiae*, além da via que envolve Mig1. Esta última hipótese é mais plausível, pois no duplo mutante *mig1mig2* não se observaram mudanças significativas no crescimento e produção de etanol (Figuras 4.9 e 4.10). Observações similares já haviam sido feitas por KLEIN *et al*

(1999) com relação ao metabolismo de dissacarídeos e galactose, mas não com relação ao metabolismo central.

Figura 4.10 – Fatores de conversão substrato a etanol em função dos respectivos fatores de conversão substrato a células em diferentes mutantes de *S. cerevisiae*.

A interrupção simples de *HXK2*, *HAP4* ou *GRR1* têm um ligeiro efeito negativo no valor da velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae*, a qual nestes casos permanece entre 70% e 85% do valor para a cepa referência (Figura 4.9). No caso do mutante *hxk2*, observa-se pelos dados da Figura 4.10 que há uma aparente desrepressão das células devido ao maior acúmulo de biomassa e ao menor acúmulo de etanol em relação à cepa referência. Estes mutantes são viáveis, pois a reação de conversão de glicose a glicose-6-fosfato ocorre pela reação catalisada pela enzima hexoquinase I, codificada pelo gene *HXK1* (ROSE *et al*, 1991; KRAAKMAN *et al*, 1999). No caso do mutante *hap4*, não seria de se esperar que o valor de μ_{max} diminuísse, pois Hap4 é um ativador de transcrição de genes respiratórios e do ciclo TCA, cuja transcrição é reprimida por glicose via proteína Mig1 (ROSENKRANTZ *et al*, 1994). Nota-se, na Figura 4.10, que os fatores de conversão glicose a células e glicose a etanol neste mutante são muito

próximos aos valores da cepa referência. No caso do mutante *grr1*, observou-se ao microscópio que as células encontravam-se mais alongadas que o normal em *S. cerevisiae* (resultados não apresentados), o que está de acordo com os dados apresentados por FLICK; JOHNSTON (1991). Estes autores também observaram redução na velocidade de crescimento de *S. cerevisiae* quando o gene *GRR1* é interrompido, mas não quantificaram esta redução. Observa-se pela [Figura 4.10](#) que ocorre significativa desrepressão na ausência da proteína Grr1, pois a produção de etanol é 46% menor e a formação de biomassa 146% maior que na cepa referência. Além de estar envolvida na via de repressão por glicose, atuando como uma espécie de sensor (JOHNSTON, 1999), a proteína Grr1 participa do maquinário de proteólise e também do ciclo celular (LI; JOHNSTON, 1997).

A interrupção do gene *REG1* provoca uma drástica diminuição no valor da velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae* (cerca de 50%), o que também foi observado por HUANG *et al* (1996). Além disto, também provoca desrepressão das funções respiratórias, já que a formação de biomassa é 100% maior e a produção de etanol 54% menor que na cepa referência. A proteína Reg1 direciona a proteína fosfatase Glc7 para o complexo Snf1, desfosforilando-o ([Figura 2.4](#)). O complexo Snf1, quando desfosforilado, encontra-se na forma inativa. Desta forma, se a expressão de *REG1* é abolida, não ocorre desfosforilação do complexo Snf1 e o mesmo se mantém na forma ativa, bloqueando a atividade de Mig1, o que pode ser a explicação para o alívio da repressão no mutante *reg1*.

Os dados da [Figura 4.10](#) mostram que as cepas que apresentam os maiores fatores de conversão substrato a biomassa são as que apresentam os menores fatores de conversão substrato a etanol, havendo praticamente uma tendência linear decrescente entre os dois parâmetros. Os mutantes *hxx2*, *reg1* e *grr1* poderiam, a princípio, ser considerados menos reprimidos por glicose que as outras cepas

estudadas (inclusive a referência), já que suas capacidades fermentativas são menores e suas capacidades respiratórias maiores.

De uma forma geral, observa-se que a eliminação da expressão de genes que codificam proteínas da parte inferior da cascata de repressão por glicose ([Figura 2.1](#)), como Mig1, Mig2 e Hap4, não provoca grande alívio na repressão. Nestes casos, o papel das proteínas está razoavelmente bem definido na literatura e provavelmente existem cascatas em paralelo que garantem a repressão das funções metabólicas centrais, mesmo quando estas proteínas estão ausentes das células. Por outro lado, a interrupção de genes que codificam proteínas da parte superior da cascata de repressão por glicose, como Hxk2 e Grr1, provoca um maior alívio na repressão. Nestes casos, o papel das proteínas ainda não está muito bem estabelecido e as mesmas estão envolvidas em vários pontos da cascata de repressão por glicose, além de fazerem parte de outras funções celulares.

Para estudar de forma mais aprofundada a atividade do ciclo TCA e de outras vias no metabolismo central de *S. cerevisiae*, as marcações em metabólitos intracelulares foram medidas em todos os mutantes analisados. Os resultados são apresentados e discutidos no [item 4.4.2](#).

4.4.2. Identificação de redes metabólicas: inspeção qualitativa dos dados de marcação

Os dados de marcação em metabólitos intracelulares de *S. cerevisiae*, medidos nos mutantes analisados, são apresentados na [Tabela 4.7](#).

4.4.2.1. Atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA)

A marcação no fragmento Asp115 está diretamente relacionada à atividade do ciclo TCA, pois esta marcação reflete o átomo C2 do oxaloacetato ([Tabela 4.4.1](#)). Este átomo pode ser originário do átomo C2 do piruvato (via piruvato carboxilase) ou dos átomos C3 e C4 do

Tabela 4.7 – Marcação em metabólitos intracelulares de mutantes de *S. cerevisiae*

Fragmento	PM do isotópomo não marcado ^(a)	átomos de C no fragmento medido	Precursor reportado ^(b)	Correspondência reportada de átomos de C ^(b)	Marcação no fragmento (%)								
					RS	<i>mig1</i>	<i>mig1 mig2</i>	<i>snf1</i>	<i>snf4</i>	<i>grr1</i>	<i>reg1</i>	<i>hxx2</i>	<i>hap4</i>
Glc	331 [§]	1,2,3,4,5,6	G6P	1,2,3,4,5,6	98.2	99.9	99.1	83.8	98.1	100.1	101.0	96.5	97.9
Ser	175 [#] 132 [#]	1,2 2,3	3-PG	1,2 2,3	2.3 44.3	3.6 43.7	2.0 42.9	1.8 37.3	1.8 44.9	2.5 42.8	6.1 40.2	0.9 41.6	2.1 44.0
Gly	175 [#] 144 [*] 85 [*]	1,2 1,2 2		1,2 1,2 2	2.2 2.4 1.3	3.6 4.1 1.9	1.6 2.6 1.3	2.2 2.5 1.4	2.6 3.0 1.6	4.2 4.5 2.6	8.5 8.7 5.6	2.6 2.9 1.6	2.4 2.9 1.6
Ala	116 [#] 99 [*] 158 [*]	2,3 2,3 1,2,3		2,3 2,3 1,2,3	45.2 45.1 46.8	44.4 44.1 45.8	44.6 44.3 46.5	39.1 39.4 41.2	46.0 46.6 48.5	46.5 47.2 49.8	46.5 46.2 52.0	43.7 43.9 45.6	45.6 45.7 47.7
Val	144 [#] 143 [*] 127 [*] 186 [*]	2,3,4,5 1,2 2,3,4,5 1,2,3,4,5	PYR	2,2,3,3 1,2 2,2,3,3 1,2,2,3,3	90.6 6.9 90.2 93.0	nd ^(c) 6.2 89.2 91.8	89.3 7.8 87.7 90.9	78.0 6.5 77.2 79.2	92.3 8.0 91.2 93.9	94.7 11.4 95.5 97.8	98.1 24.4 98.9 104.7	87.9 6.9 87.0 90.6	90.7 9.2 91.7 91.8
Leu	158 [#]	2,3,4,5,6	PYR + AcCoA	2,2,3,3 + 2	130.1	126.9	127.9	112.4	127.1	135.6	135.1	126.0	130.1
Asp	188 [#] 115 [*] 216 [*]	2,3,4 2 1,2,3,4	OAA	2,3,4 2 1,2,3,4	49.9 2.0 51.7	50.3 2.0 52.3	49.9 2.8 52.5	43.5 1.9 46.0	50.5 2.2 53.4	56.9 6.1 61.4	59.0 14.6 67.4	51.2 3.1 55.0	49.1 3.0 51.8
Thr	175 [#] 146 [#]	1,2 2,3,4		1,2 2,3,4	2.9 47.6	4.6 52.3	3.6 45.5	3.2 43.7	3.0 48.7	8.5 54.9	21.4 58.8	4.8 50.6	3.9 47.0
Ile	158 [#]	2,3,4,5,6	OAA + PYR	2,3,4 + 2,3	95.1	94.9	96.0	82.4	96.3	103.8	109.2	96.1	95.1
Glu	143 [†] 230 [*]	1,2 1,2,3,4,5	AKG	1,2 1,2,3,4,5	43.9 95.2	43.0 95.4	38.3 96.6	37.4 83.8	44.8 91.6	46.9 120.8	42.8 110.0	43.3 106.8	45.1 92.7
Pro	142 [#]	2,3,4,5		2,3,4,5	87.1	86.3	86.5	75.4	81.3	102.7	95.0	91.7	84.1
Lys	156 [#]	2,3,4,5,6	AKG + AcCoA	2,3,4,5 + 2	125.7	122.6	124.3	109.0	114.3	142.8	129.3	126.3	121.8
Phe	143 [†] 192 [#]	1,2 2,3,4,5,6,7,8,9	PEP E4P + PEP	1,2 1,2,3,4 + 2,2,3,3	2.5 111.9	2.2 110.9	2.5 110.4	4.4 97.3	7.8 115.3	7.7 109.8	5.8 105.9	3.3 104.4	5.0 115.7

(a) Índices superiores indicam o tipo de derivatização utilizada: § GPA, # ECF, * DMFDMA. Referir-se à seção Metodologia para detalhes.

(b) Precursores são moléculas do metabolismo central, que envolve: a via EMP, a via PP, o ciclo TCA e reações adjacentes. As informações foram obtidas de um livro texto de bioquímica (ZUBAY, 1988).

(c) Não determinado.

α -cetoglutarato (via ciclo TCA). Neste segundo caso, há duas possibilidades, devido à simetria de alguns intermediários do ciclo TCA, como o succinato e o fumarato. Na cepa referência, a marcação no fragmento Asp115 é de 2,0%. Como a marcação no fragmento Glu143 (que reflete o correspondente fragmento do α -cetoglutarato) é bem maior que este valor (43,9%), e como a marcação em Val143 (que reflete o correspondente fragmento do piruvato) é 6,9%, é possível concluir que o ciclo TCA não opera na forma de um ciclo, mas sob a forma de dois ramos (GOMBERT *et al*, 2001). Observações similares podem ser feitas para todas as outras cepas analisadas, com exceção dos mutantes *grr1* e *reg1*, as quais apresentam marcações de 6,1% e 14,6% no fragmento

Asp115, respectivamente. Isto é uma indicação de que há desrepressão nestes dois mutantes. No entanto, o fragmento Val143 apresenta marcações de 11,4% e 22,4% nos mutantes *grr1* e *reg1*, respectivamente, o que significa que existe a possibilidade de a reação catalisada pela enzima piruvato carboxilase estar contribuindo para a formação de oxaloacetato. Considerando-se os maiores valores para o fator de conversão substrato a biomassa e os menores valores para o fator de conversão substrato a etanol nos mutantes *grr1* e *reg1*, juntamente com os dados de marcação obtidos, pode-se concluir que há desrepressão na atividade do ciclo TCA. Um resultado surpreendente é a marcação de 3,1% no fragmento Asp115, no caso do mutante *hvk2*. Este dado indica que provavelmente não há desrepressão da atividade do ciclo TCA neste mutante, apesar de o fator de conversão substrato a biomassa ser mais alto e o fator de conversão substrato a etanol ser mais baixo que na cepa referência ([Figuras 4.9 e 4.10](#)). Sabe-se que a proteína Hvk2 tem um papel central na parte superior da cascata de repressão por glicose (KRAAKMAN *et al*, 1999), o que significa que a interrupção do gene *HVK2* tem efeitos pleiotrópicos no metabolismo de *S. cerevisiae*, os quais não são totalmente conhecidos.

4.4.2.2. Atividade da via das Pentoses Fosfato (PP)

As marcações nos fragmentos Glc331, Ser132 e Ala 116 (ou Ala99) estão diretamente relacionadas à atividade da via PP ([Tabela 4.4.1](#)). Valores baixos de marcação nestes três fragmentos indicam alto fluxo pela via PP, devido à eliminação do átomo de C marcado na reação catalisada pela enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, nas primeiras etapas da via PP (desde que o substrato utilizado nos cultivos seja [1-¹³C]glicose). No caso do fragmento Glc331, a diminuição da marcação se dá também devido à reversibilidade da reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato isomerase, que converte frutose-6-fosfato não marcada (gerada pela via PP, juntamente com gliceraldeído-3-fosfato) em glicose-

6-fosfato. A partir dos dados da Tabela 4.7, é possível observar que o mutante *snf1* apresenta maior fluxo pela via PP em relação à cepa referência, pois os fragmentos Glc331, Ser132 e Ala116 (ou Ala 99) apresentam valores de marcação mais baixos. Sabe-se que Snf1 é uma proteína quinase que fosforila Mig1 quando o nível de glicose é baixo na célula, aliviando a repressão causada pela ligação desta proteína aos sítios promotores de genes reprimidos por glicose. No entanto, parece difícil especular sobre como a função de Snf1 poderia ser relacionada à atividade da via PP. Análises complementares, como a medida da expressão de genes em todo o genoma de *S. cerevisiae* (por “chips” de DNA, por exemplo), poderiam auxiliar no esclarecimento desta observação experimental.

4.4.2.3. Treonina aldolase

As marcações nos fragmentos Ser175, Gly175 (ou Gly 144) e Thr175 são diretamente relacionadas à atividade da enzima treonina aldolase, que representa uma segunda rota biossintética de glicina (LIU *et al*, 1997; MONSCHAU *et al*, 1997) (Tabela 4.4.1). Se a marcação em Gly175 (ou Gly144) assumir um valor intermediário entre as marcações em Ser175 e Thr175, glicina está sendo formada por ambas as vias biossintéticas, a partir de serina e a partir de treonina. Neste caso, os mutantes *grr1* e *reg1* são aqueles para os quais a situação é mais clara, ou seja, a marcação nos átomos C1 e C2 da glicina deriva parcialmente de serina e parcialmente de treonina. Na cepa referência e nos demais mutantes, é difícil obter informação a respeito desta função metabólica, pois as medidas experimentais assumem valores muito próximos à marcação natural (1,1% de ^{13}C em cada posição).

4.4.2.4. Enzima málica

As marcações nos fragmentos Val144 (ou Val127), Ala116 (ou Ala99), Val143 e Phe143 estão relacionadas à atividade da enzima málica (Tabela 4.4.1). Se a metade do valor da marcação no fragmento Val144 (ou Val127) for maior que a marcação no fragmento Ala116 (ou Ala99), há uma indicação de que a enzima málica encontra-se ativa, já que o piruvato drenado para biossíntese de valina é mitocondrial (FALCO *et al*, 1985), enquanto que não é sabido em que compartimento ocorre a biossíntese de alanina (há duas enzimas alanina aminotransferase putativas, uma no citossol e outra na mitocôndria). Se alanina é ao menos parcialmente formada no citossol, a enzima málica poderia contribuir para as diferentes marcações nos fragmentos de valina e alanina. Além disto, se a marcação em Val143 (que reflete os átomos C1 e C2 do piruvato) for maior que a marcação em Phe143 (que reflete os átomos C1 e C2 do fosfoenolpiruvato), existe também indicação de atividade da enzima málica, pois esta é a única reação que pode levar à formação de piruvato em células sob crescimento em glicose, além da reação catalisada pela enzima piruvato quinase. No mutante *reg1*, a marcação em Val144 (ou Val127) corresponde a mais que o dobro da marcação em Ala116 (ou Ala99), indicando atividade da enzima málica. Nos demais mutantes, é difícil afirmar que a enzima málica não está ativa, pois não se sabe exatamente em que compartimento alanina é sintetizada. A marcação no fragmento Val143 é maior que a marcação em Phe143 em todas as cepas analisadas, com exceção do mutante *snf4*, indicando que neste último provavelmente a enzima málica está inativa. Considerando-se o papel da proteína Snf4 na cascata de repressão por glicose, como moduladora da atividade de Snf1, através da ligação com o sítio regulador desta, é difícil especular sobre a ligação entre Snf4 e a enzima málica.

4.4.3. Análise de fluxos metabólicos

Após feita a identificação de redes metabólicas, ou inspeção qualitativa dos dados de marcação (IQDM), procurou-se definir a rede metabólica adequada para o cálculo de fluxos metabólicos em cada um dos mutantes. Os cálculos de fluxos, que no fundo consistem da minimização da função objetivo representada pela somatória dos erros entre medidas experimentais e dados calculados pelo modelo (conforme descrito no [item 3.2.7](#)), foram realizados várias vezes para cada mutante, utilizando-se diferentes redes metabólicas. Partindo-se da rede metabólica indicada no [Apêndice](#), verificou-se o efeito das seguintes variações:

- inclusão da reação gliconeogênica catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase;
- exclusão da reação catalisada pela enzima málica.

Em todos os casos, os melhores resultados foram obtidos com a rede metabólica indicada no [Apêndice](#), ou seja, sem a reação catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase e incluindo a reação catalisada pela enzima málica.

Além disto, procurou-se excluir as medidas de alguns fragmentos de aminoácidos, com o objetivo de obter erros menores ao final do processo de minimização. Verificou-se que a não inclusão das medidas nos fragmentos Ile158, Pro142, Lys156 e Phe143 contribuiu para a diminuição do erro em alguns casos. A exclusão do fragmento Ile158, que reflete os átomos C2, C3 e C4 do oxaloacetato citossólico e C2 e C3 do piruvato mitocondrial, não representa perda de informação, pois a marcação nestes mesmos átomos já é inferida via fragmentos de valina e treonina ([Tabela 4.7](#)). A exclusão do fragmento Pro142, que reflete os átomos C2 a C5 do α -cetoglutarato, não representa perda de informação, pois a medida realizada no glutamato também reflete os átomos de C do α -cetoglutarato. No caso de Lys156, que reflete os átomos C2 a C5 do α -cetoglutarato e o átomo C2 da acetil coenzima A,

perde-se somente a informação sobre a marcação neste último átomo, pois a marcação nos átomos do α -cetoglutarato já é feita via fragmentos de glutamato. No entanto, a exclusão do fragmento Phe143 leva à perda de importante informação sobre a medida da marcação nos átomos C1 e C2 do fosfoenolpiruvato, ponto-chave das vias glicolítica e gliconeogênica. Desta forma, os fluxos metabólicos calculados não servirão para uma análise precisa sobre esta parte do metabolismo. Para realizar tal análise, deve-se ter medidas mais precisas em fragmentos de aminoácidos que refletem os átomos de C do fosfoenolpiruvato. Os resultados apresentados a seguir foram obtidos com ou sem a inclusão das medidas nos fragmentos acima (vide [Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10](#) para verificar quais medidas foram excluídas no cálculo de fluxos em cada mutante).

Para os cálculos de fluxos metabólicos nos mutantes, fez-se a hipótese de que não há reações gliconeogênicas ocorrendo (as medidas realizadas não podem comprovar este fato, conforme descrito no rodapé da [Tabela 4.4.1](#)). Para que genes gliconeogênicos sejam expressos, é necessário que a proteína Snf1 esteja ativa (VINCENT; CARLSON, 1998; RAHNER *et al*, 1999). Sendo assim, é provável que isto não ocorra em nenhum dos mutantes analisados, pois Snf1 é inativa quando os níveis de glicose são não-limitantes ([Figura 2.4](#)). Outra hipótese foi feita com relação à produção de glicerol. Assumiu-se que a produção de glicerol nos mutantes foi a mesma que se observou na cepa referência ([Tabela 4.4](#)). Em função de problemas analíticos, não se conseguiu medir glicerol a partir de uma determinada etapa do trabalho, justamente quando foi iniciada a análise dos mutantes. A produção de glicerol é uma restrição importante a ser imposta ao sistema, pois ela reflete o balanço de óxido-redução de *S. cerevisiae*, já que a reação catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase é muito utilizada pelas células para reoxidação da coenzima NADH.

Levando-se em conta todas as considerações acima, os fluxos metabólicos foram calculados para os mutantes *snf1*, *snf4*, *grr1*, *reg1*,

hxx2 e *hap4*. Os dados são apresentados nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13. Para os mutantes *mig1* e *mig1mig2* não foram realizados cálculos, pois os dados de marcação e a produção de metabólitos extracelulares foram muito parecidos aos da cepa referência, o que significa que os fluxos metabólicos são iguais.

Figura 4.11 – Fluxos no metabolismo central de *S. cerevisiae*. Os valores em negrito correspondem ao mutante *snf4* e os valores em itálico correspondem ao mutante *snf1*. Reversibilidades são indicadas pelos dados em parênteses, sob a forma de fluxos de intercâmbio normalizados (equação 4.1).

Figura 4.12 – Fluxos no metabolismo central de *S. cerevisiae*. Os valores em negrito correspondem ao mutante *grr1* e os valores em *itálico* correspondem ao mutante *reg1*. Reversibilidades são indicadas pelos dados em parênteses, sob a forma de fluxos de intercâmbio normalizados (equação 4.1).

Figura 4.13 – Fluxos no metabolismo central de *S. cerevisiae*. Os valores em negrito correspondem ao mutante *hxx2* e os valores em itálico correspondem ao mutante *hap4*. Reversibilidades são indicadas pelos dados em parênteses, sob a forma de fluxos de intercâmbio normalizados (equação 4.1).

Os dados das Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 devem ser analisados em comparação aos dados em negrito da Figura 4.7, os quais representam os fluxos metabólicos na cepa referência, nas mesmas condições de cultivo. Para verificar a acurácia dos cálculos, são apresentados nas

Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10 os dados de marcação medidos e os calculados, para cada mutante. Pode-se também verificar quais medidas de marcação foram utilizadas como dados de entrada para a rotina de cálculo de fluxos metabólicos, em cada caso.

Tabela 4.8 – Marcações medidas e marcações calculadas nos cultivos descontínuos com as cepas *snf1* e *snf4*

fragmento ^(a)	<i>snf1</i>		<i>snf4</i>	
	calculado	medido	calculado	medido
Glc331	88,4	83,8	100,8	98,1
Gly175	3,5	2,2	4,0	2,6
Gly144	3,5	2,5	4,0	3
Gly85	1,9	1,4	1,4	1,6
Ser175	2,6	1,8	3,9	1,8
Ser132	38,1	37,3	45,1	44,9
Ala116	37,8	39,1	45,1	46,0
Ala99	37,8	39,4	45,1	46,6
Ala158	38,9	41,2	47,7	48,5
Leu158	112,3	112,4	128,9	127,1
Val144	75,6	78,0	90,2	92,3
Val143	7,0	6,5	9,7	8,0
Val127	75,6	77,2	90,2	91,2
Val186	78,3	79,2	93,5	93,9
Asp188	53,6	43,5	53,5	50,5
Asp115	6,1	1,9	2,1	2,2
Asp216	57,1	46,0	56,2	53,4
Glu143	36,3	37,4	44,1	44,8
Glu230	87,8	83,8	97,7	91,6
Pro142	75,7	75,4	-	m.n.u. ^(b)

^(a) para detalhes sobre os fragmentos, vide rodapé da Tabela 4.5.

^(b) medida não utilizada.

Os dados das Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10 indicam que as marcações calculadas apresentaram valores muito próximos aos valores medidos em todos os mutantes analisados, com exceção do mutante *snf1*. Neste caso, foi muito difícil conseguir um bom ajuste e terminou-se por aceitar os fluxos indicados na Figura 4.11. Nota-se que a produção de etanol indicada na figura para o mutante *snf1*, 130 moles para 100 moles de glicose (= 0,33 g/g glicose), não corresponde ao dado de entrada, de 0,38 g/g glicose (Figura 4.10), o que reflete a dificuldade em se encontrar um mínimo na rotina de cálculo de fluxos. Por isto, os dados relativos ao mutante *snf1* devem ser analisados com muito

Tabela 4.9 – Marcações medidas e marcações calculadas nos cultivos descontínuos com as cepas *grr1* e *reg1*

fragmento ^(a)	<i>grr1</i>		<i>reg1</i>	
	calculado	medido	calculado	medido
Glc331	100,7	100,1	102,2	101,0
Gly175	4,6	4,2	8,9	8,5
Gly144	4,6	4,5	8,9	8,7
Gly85	1,9	2,6	4,7	5,6
Ser175	3,7	2,5	4,2	6,1
Ser132	45,1	42,8	45,0	40,2
Ala116	45,1	46,5	45,0	46,5
Ala99	45,1	47,2	45,0	46,2
Ala158	47,6	49,8	47,9	52,0
Leu158	136,3	135,6	135,5	135,1
Val144	94,7	94,7	97,4	98,1
Val143	10,1	11,4	24,3	24,4
Val127	94,7	95,5	97,4	98,9
Val186	99,1	97,8	106,1	104,7
Asp188	58,3	56,9	59,9	59,0
Asp115	4,3	6,1	14,1	14,6
Asp216	62,2	61,4	68,0	67,4
Ile158	-	m.n.u. ^(b)	108,5	109,2
Glu143	46,7	46,9	42,3	42,8
Glu230	118,7	120,8	108,8	110,0
Pro142	104,2	102,7	96,6	95,0

^(a) para detalhes sobre os fragmentos, vide rodapé da [Tabela 4.5](#).

^(b) medida não utilizada.

Tabela 4.10 – Marcações medidas e marcações calculadas nos cultivos descontínuos com as cepas *hvk2* e *hap4*

fragmento ^(a)	<i>hvk2</i>		<i>hap4</i>	
	calculado	medido	calculado	medido
Glc331	98,1	96,5	98,9	97,9
Gly175	2,5	2,6	2,8	2,4
Gly144	2,5	2,9	2,8	2,9
Gly85	0,9	1,6	1,6	1,6
Ser175	2,9	0,9	2,2	2,1
Ser132	41,7	41,6	44,5	44,0
Ala116	42,0	43,7	44,5	45,6
Ala99	42,0	43,9	44,5	45,7
Ala158	44,2	45,6	45,6	47,7
Leu158	125,6	126,0	130,1	130,1
Val144	86,8	87,9	88,9	90,7
Val143	8,5	6,9	9,3	9,2
Val127	86,8	87,0	88,9	91,7
Val186	90,7	90,6	91,2	91,8
Asp188	55,6	51,2	53,7	49,1
Asp115	1,3	3,1	3,8	3,0
Asp216	57,8	55,0	55,3	51,8
Ile158	99,0	96,1	-	m.n.u. ^(b)
Glu143	44,4	43,3	44,3	45,1
Glu230	107,0	106,8	97,2	92,7
Pro142	92,9	91,7	88,9	84,1

^(a) para detalhes sobre os fragmentos, vide rodapé da [Tabela 4.5](#).

^(b) medida não utilizada.

cuidado. Os principais resultados obtidos, agrupados por função metabólica, são apresentados na [Tabela 4.11](#).

TABELA 4.11 – Fluxos por algumas funções metabólicas nos mutantes analisados*

função metabólica	RS^(a)	<i>snf1</i>	<i>snf4</i>	<i>grr1</i>	<i>reg1</i>	<i>hxx2</i>	<i>hap4</i>
via PP	16,2	↑41,8	↓11,6	↓10,9	↓10,3	↑22,2	18,1
treonina aldolase	0(1)	0,3(0)	0,3(0)	0,6(0)	0,5(0,38)	0,4(1)	0,2(0)
ciclo TCA	0	0	0	↑21,6	↑15,1	↑9,1	0
enzima málica	1,7	1,4	↑8,0	↑8,0	↑15,5	↑4,4	↑4,0

* os dados são em mmoles por 100 mmoles de glicose. As setas para cima indicam aumento do fluxo relativamente à cepa referência. As setas para baixo indicam diminuição do fluxo. Os valores entre parênteses são os fluxos de intercâmbio normalizados ([equação 4.1](#)).

^(a) cepa referência (dados em negrito da [Figura 4.7](#)).

Como os dados relativos ao mutante *snf1* não são confiáveis, nota-se que, de uma forma geral, há uma diminuição no valor do fluxo pela via PP ([Tabela 4.11](#)). Isto ocorre provavelmente devido à composição da biomassa dos mutantes, a qual assume uma fração protéica sempre menor que a da cepa referência ([Tabela 3.5](#)), havendo assim uma menor necessidade de geração da coenzima NADPH para biossíntese de aminoácidos. O mutante *hap4* apresenta um valor muito próximo ao da cepa referência para o fluxo pela via PP. Já no mutante *hxx2*, este fluxo é ligeiramente maior que na cepa referência. Isto poderia ser devido ao maior fator de conversão substrato a células neste mutante em relação à cepa referência. No entanto, no caso dos mutantes *grr1* e *reg1*, este valor também é maior e o fluxo pela via PP menor. Desta forma, é difícil encontrar uma relação entre desrepressão e o fluxo de glicose desviado pela via PP.

Com relação à rota biossintética de glicina, via treonina aldolase, os cálculos indicam que há uma pequena tendência de aumento no fluxo líquido por esta reação nos mutantes, em relação à cepa referência ([Tabela 4.11](#)). No entanto, é difícil afirmar que este fato realmente ocorre

in vivo, pois os valores de marcação nos fragmentos Gly175(ou 144), Ser175 e Thr175 (ou Asp115) são todos muito baixos, próximos à marcação natural (1,1% de ^{13}C em cada posição).

Com relação à atividade do ciclo TCA, resultados bastante interessantes e confiáveis puderam ser obtidos. Os dados mostram que nos mutantes *hvk2*, *grr1* e *reg1* (principalmente nestes dois últimos), houve desrepressão em relação à cepa referência. Isto significa que a atividade respiratória é maior nestes mutantes que na cepa referência, dado que pode ser de grande interesse industrial nas aplicações em que se deseja minimizar a formação de etanol (produção de biomassa ou de proteínas heterólogas). Desrepressão da atividade respiratória também foi observada quando o gene do ativador de transcrição Hap4 foi superexpresso em *S. cerevisiae* (BLOM *et al*, 2000). Desta forma, nota-se que a deleção e/ou superexpressão de genes regulatórios é ferramenta importantíssima dentro da Engenharia Metabólica (STEPHANOPOULOS *et al*, 1998; OSTERGAARD *et al*, 2000). A ausência da proteína Reg1, a qual inativa o complexo Snf1 por desfosforilação quando glicose é não-limitante, deixa este complexo permanentemente ativo (Figura 2.4), inibindo a atuação da proteína Mig1 (Figura 2.3), a qual reprime a transcrição de genes do ciclo TCA e respiratórios. Portanto, no mutante *reg1*, esta pode ser a causa da desrepressão observada. No caso do mutante *grr1*, como o papel da proteína Grr1 ainda não é bem conhecido (sabe-se que a mesma atua como uma espécie de sensor e que está envolvida na repressão do gene *SUC2*; FLICK; JOHNSTON, 1991), torna-se difícil conhecer a causa da desrepressão observada nas atividades respiratórias. No entanto, é interessante observar que a interrupção de *GRR1* pode ser usada como forma de desreprimir a atividade respiratória de *S. cerevisiae*. A ausência da proteína Hvk2, que tem um papel central no fenômeno de repressão por glicose, estando envolvida tanto na via principal (CARLSON, 1999; JOHNSTON, 1999), como na via cAMP-PKA (THEVELEIN; DE WINDE, 1999), também causa desrepressão das

atividades respiratórias, ainda que em menor grau que a ausência de Reg1 ou Grr1 (Figuras 4.12 e 4.13). A interrupção conjunta de genes regulatórios pode ser testada como forma de se desreprimir ainda mais as atividades respiratórias de *S. cerevisiae*.

A enzima málica não é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* (BOLES *et al*, 1998) e sua ausência não afeta o crescimento sob condições de laboratório (WYSOCKI *et al*, 1999). No entanto, observou-se que a mesma está ativa quando as células crescem aerobicamente em glicose (BOLES *et al*, 1998) e que há fluxo por esta reação (GOMBERT *et al*, 2001; Figura 4.7). Devido às variações observadas no fluxo por esta reação nos mutantes analisados (Tabela 4.11), pode-se deduzir que esta enzima sofre algum tipo de regulação por glicose. Observa-se que na ausência das proteínas Reg1 e Grr1, as quais aparentemente mais afetam os fluxos metabólicos em repressão por glicose, dentre os mutantes analisados, a atividade calculada para a enzima málica foi 4 e 7 vezes mais altas que na cepa referência, respectivamente. Além disto, pode-se observar também que há uma aparente relação entre a diminuição do fluxo pela via PP e o aumento do fluxo pela enzima málica, o que vai ao encontro de seu possível papel na geração de NADPH intramitocondrial (BOLES *et al*, 1998).

5. CONCLUSÕES

5.1. Repressão por glicose na cepa referência

- Análise de redes metabólicas (ARM) foi aplicada a células de *S. cerevisiae* crescendo em aerobiose, com glicose como substrato limitante. Através desta análise, foi possível comparar o metabolismo de células crescendo em cultivo descontínuo (condição de metabolismo respiratório-fermentativo) com o metabolismo de células crescendo em quimiostato (condição de metabolismo respiratório).
- Num primeiro momento, a metodologia, que inclui cultivos em reator especialmente projetado, medida de marcação em metabólitos intracelulares por GC-MS e modelagem matemática, foi validada para cultivos contínuos e descontínuos, tendo sido possível calcular um desvio padrão para as medidas.
- A primeira etapa da ARM, a identificação de redes metabólicas, levou a observações qualitativas sobre a biossíntese de glicina, que inclui a reação catalisada pela enzima treonina aldolase.
- Além disto, os dados de marcação levaram à inclusão da reação catalisada pela enzima málica e da compartimentação dos metabólitos piruvato, acetil coenzima A e oxaloacetato no modelo estequiométrico.
- O ciclo TCA opera de forma cíclica em células que respiram e de forma não cíclica em células que apresentam metabolismo respiratório-fermentativo.
- Uma maior parte da glicose consumida é desviada para a via PP em células que respiram do que em células que apresentam metabolismo respiratório-fermentativo, o que está de acordo com as necessidades de NADPH nas vias anabólicas.

5.2. Repressão por glicose em diferentes mutantes

- a interrupção de *MIG1* ou a interrupção conjunta de *MIG1* e *MIG2* não alteram os padrões de crescimento, produção de etanol e o metabolismo central de *S. cerevisiae*;
- os mutantes *hvk2*, *reg1* e *grr1*, que apresentaram menor produção de etanol e maior formação de biomassa, em relação à cepa referência, foram os que apresentaram maior desrepressão das atividades do ciclo TCA / respiratórias. Esta desrepressão coincide com a diminuição da velocidade específica de crescimento e com a localização destas proteínas na parte superior da cascata de repressão por glicose;
- há indícios de que a enzima málica sofre algum tipo de regulação por glicose.

5.3. Considerações finais

Considerando-se que:

- fluxos intracelulares são grandezas não mensuráveis (o que se faz neste tipo de análise é estimar fluxos, utilizando-se um modelo estequiométrico e impondo-se restrições ao sistema, que são as medidas de fluxos extracelulares e de marcações em alguns fragmentos de metabólitos intracelulares);
- é necessário fazer hipóteses fortes em alguns casos, como sobre a composição da biomassa dos mutantes de *S. cerevisiae* (vide [item 3.2.7](#)) e sobre a formação de glicerol nestes mutantes;
- nem sempre todas as medidas de marcação utilizadas como dados de entrada na rotina de cálculo de fluxos são incluídas (a razão pela qual deixar estas medidas de lado leva à melhoria do processo de minimização não é bem conhecida).

Chega-se à seguinte conclusão: a Análise de Redes Metabólicas, principalmente na forma em que foi aplicada em relação aos mutantes neste trabalho, não é comprobatória, mas indicativa. Deve ser utilizada em conjunto com outros tipos de análise para “cercar” melhor o problema. Outras análises que poderiam ser utilizadas de forma complementar à Análise de Redes Metabólicas incluem:

- Análise por “Northern Blot” / tecnologia de chip de DNA (identificam a presença de transcritos, mRNAs, mas não identificam tradução, modificações pós-traducionais e modulação da atividade de proteínas);
- Medida da atividade de β -galactosidase em proteínas de fusão (identificam transcrição e tradução, mas a atividade enzimática medida não reflete necessariamente a da proteína original, portanto não são identificadas modificações pós-traducionais e modulação da atividade protéica);
- Medida de fluorescência em fusões de proteínas com GFP, “green fluorescent protein” (considerações análogas ao item anterior);
- Medida da atividade enzimática em extratos celulares (identificam transcrição e tradução, identificam a presença da enzima, mas as medidas não refletem necessariamente o que ocorre *in vivo*, devido aos diferentes ambiente *in vitro* e *in vivo*, como disponibilidade de substratos, coenzimas, etc. Este tipo de medida não serve para proteínas sem função enzimática);
- Análise do proteoma por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa (identificam transcrição e tradução, além de eventos pós-traducionais, identificam a concentração da enzima no extrato celular, não sua atividade. Várias proteínas celulares não são identificadas por este método, devido à baixa sensibilidade).

A utilização conjunta do maior número possível das ferramentas analíticas indicadas acima em mutantes de *S. cerevisiae* é o caminho

mais apropriado para se obter informações sobre o papel de uma determinada proteína, dentro do escopo da genômica funcional. A Análise de Redes Metabólicas tem papel importante, pois é a única, dentre as possibilidades relacionadas acima, que tem a capacidade de refletir o funcionamento do metabolismo *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

1. AIBA, S.; MATSUOKA, M. Identification of metabolic model: citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 1373-1386, 1979.
2. ALMS, G.R.; SANZ, P.; CARLSON, M.; HAYSTEAD, T.A.J. Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. **EMBO Journal**, v. 18, p. 4157-4168, 1999.
3. ARISTIDOU, A.A.; SAN, K.Y.; BENNETT, G.N. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* expressing the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase in batch and continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 737-749, 1999.
4. BAILEY, J.E. Toward a science of metabolic engineering. **Science**, v. 252, p. 1668-1675, 1991.
5. BAILEY, R.B.; WOODWORD, A. Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, v. 193, p. 507-512, 1984.
6. BASSETT JR, D.E.; EISEN, M.B.; BOGUSKI, M.S. Gene expression informatics – it's all in your mine. **Nature Genetics Suppl.**, v. 21, p. 51-55, 1999.
7. BLOM, J.; TEIXEIRA DE MATTOS, M.J.; GRIVELL, L.A. Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1970-1973, 2000.
8. BOJUNGA, N.; ENTIAN, K.-D. Cat8p, the activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, regulates carbon source-dependent expression of NADP-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase (Idp2p) and lactate permease (Jen1p). **Molecular and General Genetics**, v. 262, p. 869-875, 1999.
9. BOLES, E.; DE JONG-GUBBELS, P.; PRONK, J.T. Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2875-2882, 1998.
10. BRUINENBERG, P.M.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, A. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 953-964, 1983.

11. CAMERON, D.C.; TONG, I.-T. Cellular and metabolic engineering. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 105-140, 1993.
12. CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 202-207, 1999.
13. CHEN, S.; BROCKENBROUGH, J.S.; DOVE, J.E.; ARIS, J.P. Homocitrate synthase is located in the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 16, p. 10839-10846, 1997.
14. CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Metabolic network analysis: a powerful tool in metabolic engineering. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 66, p. 209-231, 1999.
15. CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Isotopomer analysis using GC-MS. **Metabolic Engineering**, v. 1, p. 282-290, 1999b.
16. CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Metabolic network analysis on *Penicillium chrysogenum* using ^{13}C -labeled glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 652-659, 2000.
17. CORNISH-BOWDEN, A.; CÁRDENAS, M.L. From genome to cellular phenotype – a role for metabolic flux analysis? **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 267-268, 2000.
18. ÇALIK, P.; ÇALIK, G.; TAKAÇ, S.; ÖZDAMAR, T.H. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: effects of the oxygen transfer rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 151-167, 1999.
19. DAAE, E. B.; ISON, A.P. Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *Streptomyces lividans*. **Metabolic Engineering**, v. 1, p. 153-165, 1999.
20. DAUNER, M.; SAUER, U. GC-MS analysis of aminoacids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 642-649, 2000.
21. DE GRAAF, A.A.; STRIEGEL, K.; WITTIG, R.M.; LAUFER, B.; SCHMITZ, G.; WIECHERT, W.; SPRENGER, G.A.; SAHM, H. Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose-fed continuous cultures as analysed by ^{13}C - and ^{31}P -NMR spectroscopy. **Archives of Microbiology**, v. 171, p. 371-385, 1999.

22. DOMBEK, K.M.; VORONKOVA, V.; RANEY, A.; YOUNG, E.T. Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type I-binding motif as essential for repression of *ADH2* expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 6029-6040, 1999.
23. EDWARDS, J.S.; PALSSON, B.O. How will bioinformatics influence metabolic engineering? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 162-169, 1998.
24. ENTIAN, K. -D.; SCHÜLLER, H.-J. Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In: Zimmermann, F.K.; Entian, K.-D., eds. **Yeast Sugar Metabolism**. Lancaster, Technomic, 1997. p. 409-434.
25. ERTUGAY, N.; HAMAMCI, H. Continuous cultivation of baker's yeast: change in cell composition at different dilution rates and effect of heat stress on trehalose level. **Folia Microbiologica**, v. 42, p. 463-467, 1997.
26. FALCO, S. C.; DUMAS, K.S.; LIVAK, K.J. Nucleotide sequence of the yeast *ILV2* gene which encodes acetolactate synthase. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 4011-4027, 1985.
27. FLICK, J.S., JOHNSTON, M. *GRR1* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, p. 5101-5112, 1991.
28. FOLLSTAD, B.D.; BALCARCEL, R.R.; STEPHANOPOULOS, G.; WANG, D.I.C. Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 675-683, 1999.
29. GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361, 1998.
30. GANCEDO, J. M.; LAGUNAS, R. Contribution of the pentose-phosphate pathway to glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a critical analysis of the use of labelled glucose. **Plant Science Letters**, v. 1, p. 193-200, 1973.
31. GOEL, A.; LEE, J.; DOMACH, M.M.; ATAAL, M.M. Metabolic fluxes, pools, and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 129-134, 1999.

32. GOMBERT, A.; NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 180-186, 2000.
33. GOMBERT, A.K.; DOS SANTOS, M.M.; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1441-1451, 2001.
34. GORDON, D.B. Mass spectrometric techniques. In: WILSON, K., WALKER, J.M. eds. **Principles and techniques of practical biochemistry**. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1994. p. 381-424.
35. HAARASILTA, S.; TASKINEN, L. Location of three key enzymes of gluconeogenesis in baker's yeast. **Archives of Microbiology**, v. 113, p. 159-161, 1977.
36. HAMPSEY, D.M.; LEWIN, A.S.; KOHLHAW, G.B. Submitochondrial localization, cell-free synthesis, and mitochondrial import of 2-isopropylmalate synthase of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 80, p. 1270-1274, 1983.
37. HOLMS, W.H. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 28, p. 69-105, 1986.
38. HUA, Q.; YANG, C.; SHIMIZU, K. Metabolic flux analysis for efficient pyruvate fermentation using vitamin auxotrophic yeast of *Torulopsis glabrata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 206-213, 1999.
39. HUANG, D.; CHUN, K.T.; GOEBL, M.G.; ROACH, P.J. Genetic interactions between *REG1/HEX2* and *GLC7*, the gene encoding the protein phosphatase type I catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 143, p. 119-127, 1996.
40. JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. **Trends in Genetics**, v. 15, p. 29-33, 1999.
41. JØRGENSEN, H.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; MØLGAARD, H. Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 117-131, 1995.

42. KATOH, T.; YUGUCHI, D.; YOSHII, H.; SHI, H.; SHIMIZU, K.
Dynamics and modeling on fermentative production of poly (β -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Biotechnology**, v. 67, p. 113-134, 1999.
43. KLEIN, C. J. L.; RASMUSSEN, J.J.; RØNNOW, B.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Investigation of the impact of *MIG1* and *MIG2* on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 68, p. 197-212, 1999.
44. KLEIN, C. J. L.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of *MIG1* in metabolic functions. **Microbiology**, v. 144, p. 13-24, 1998.
45. KRAAKMAN, L.S.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M.; DE WINDE, J.H. Structure-function analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering signalling and catabolite repression. **Biochemical Journal**, v. 343, p. 159-168, 1999.
46. KÜENZI, M.T.; FIECHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. **Archives of Mikrobiology**, v. 84, p. 254-265, 1972.
47. LEE, W. -N. P.; BERGNER, E.A.; GUO, Z.K. Mass isotopomer pattern and precursor-product relationship. **Biological Mass Spectrometry**, v. 21, p. 114-122, 1992.
48. LEE, W. -N. P.; BYERLEY, L.O.; BERGNER, E.A.; EDMOND, J. Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. **Biological Mass Spectrometry**, v. 20, p. 451-458, 1991.
49. LI, F.N.; JOHNSTON, M. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. **EMBO Journal**, v. 16, p. 5629-5638, 1997.
50. LIU, J.-Q.; NAGATA, S.; DAIRI, T.; MISONO, H.; SHIMIZU, S.; YAMADA, H. The *GLY1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-*allo*-threonine and L-threonine to glycine. Expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 289-293, 1997.
51. LUDIN, K.; JIANG, R.; CARLSON, M. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 95, p. 6245-6250, 1998.

52. LUTFIYYA, L.L.; IYER, V.R.; DERISI, J.; DEVIT, M.J.; BROWN, P.O.; JOHNSTON, M. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 150, p. 1377-1391, 1998.
53. LUTFIYYA, L.L.; JOHNSTON, M. Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, p. 4790-4797, 1996.
54. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 8. ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall, 1997.
55. MARX, A.; DE GRAAF, A.A.; WIECHERT, W.; EGGELING, L.; SAHM, H. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolic balancing. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 111-129, 1996.
56. MCNEIL, J. B.; MCINTOSH, E.M.; TAYLOR, B.V.; ZHANG, F.; TANGT, S.; BOGNAR, A.L. Cloning and molecular characterization of three genes, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for glycine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9155-9165, 1994.
57. MCNEIL, J.B.; BOGNAR, A.L.; PEARLMAN, R.E. *In vivo* analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 142, p. 371-381, 1996.
58. MEIJER, M. M. C.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A.J.; VERRIPS, C.T. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24102-24107, 1998.
59. MONSCHAU, N.; STAHMANN, K.-P.; SAHM, H.; MCNEIL, J.B.; BOGNAR, A.L. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 55-60, 1997.
60. NEHLIN, J. O.; RONNE, H. Yeast Mig1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. **EMBO Journal**, v. 9, p. 2891-2898, 1990.

61. NIELSEN, J. Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 125-132, 1998.
62. NISSEN, T. **Optimisation of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering.** Denmark, 1999. 239 p. Thesis (Ph.D.) - Technical University of Denmark.
63. NISSEN, T.; SCHULZE, U.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 143, p. 203-218, 1997.
64. OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 517-522, 1997.
65. OLSSON, L.; NIELSEN, J. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 785-792, 2000.
66. OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34-50, 2000.
67. ÖSTLING, J.; RONNE, H. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1-dependent phosphorylation in the absence of glucose. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, p. 162-168, 1998.
68. OURA, E. **The effect of aeration on the growth energetics and biochemical composition of baker's yeast, with an appendix: Reactions leading to the formation of yeast cell material from glucose and ethanol.** Helsinki, 1972. 124 p. Thesis (Ph.D.) - Helsinki University.
69. OURA, E. Biomass from carbohydrates. In: Rehm, H.-J.; Reed, G. eds. **Biotechnology**. Weinheim, Verlag Chemie, 1983.
70. ÖZCAN, S.; SCHULTE, F.; FREIDEL, K.; WEBER, A.; CIRIACY, M. Glucose uptake and metabolism in *grr1/cat80* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 224, p. 605-611, 1994.
71. PANDEY, A., MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-46, 2000.

72. PAPOUTSAKIS, E.T.; MEYER, C.L. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 50-66, 1985.
73. PRAMANIK, J.; TRELSTAD, P.L.; SCHULER, A.J.; JENKINS, D.; KEASLING, J.D. Development and validation of a flux-based stoichiometric model for enhanced biological phosphorous removal metabolism. **Water Research**, v. 33, p. 462-476, 1999.
74. RAHNER, A.; HIESINGER, M.; SCHÜLLER, H.-J. Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 146-156, 1999.
75. RANDEZ-GIL, F., BOJUNGA, N., PROFT, M., ENTIAN, K.-D. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene Cat8p. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 2502-2510, 1997.
76. RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends in Genetics**, v. 11, p. 12-17, 1995.
77. ROSE, M; ALBIG, W; ENTIAN, K.D. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase PI and hexokinase PII. **European Journal of Biochemistry**, v. 199, p. 511-518, 1991.
78. ROSENKRANTZ, M.; KELL, C.S.; PENNELL, E.A.; DEVENISH, L.J. The HAP2,3,4 transcriptional activator is required for derepression of the yeast citrate synthase gene, *CIT1*. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 119-131, 1994.
79. RYAN, E. D.; TRACY, J.W.; KOHLHAW, G.B. Subcellular localization of the leucine biosynthetic enzymes in yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 116, p. 222-225, 1973.
80. SAUER, U.; LASKO, D.R.; FIAUX, J.; HOCHULI, M.; GLASER, R.; SZYPERSKI, T.; WÜTTRICH, K.; BAILEY, J.E. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6679-6688, 1999.
81. SAUER, U.; HATZIMANIKATIS, V.; BAILEY, J.E.; HOCHULI, M.; SZYPERSKI, T.; WÜTTRICH, K. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 448-452, 1997.

82. SCHMIDT, K.; ISAACS, S.H. An evolutionary algorithm for initial state and parameter estimation in complex biochemical models. In: COMPUTER APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY, 6., Garmisch-Partenkirchen, 1995. **CAB6: proceedings.** Garmisch-Partenkirchen, Germany, Pergamon, 1995. p. 239-242.
83. SCHMIDT, K.; MARX, A.; DE GRAAF, A.A.; WIECHERT, W.; SAHM, H.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. ^{13}C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 254-257, 1998.
84. SCHUSTER, S.; FELL, D.A.; DANDEKAR, T. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic network. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 326-332, 2000.
85. SHI, H.; NIKAWA, J.; SHIMIZU, K. Effect of modifying metabolic network on poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 666-677, 1999.
86. SHIRRA, M.K.; ARNDT, K.M. Evidence for the involvement of the Glc7-Reg1 phosphatase and the Snf1-Snf4 kinase in the regulation of *INO1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 152, p. 73-87, 1999.
87. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 5. ed. New York, John Wiley, 1991.
88. STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A.A.; NIELSEN, J. **Metabolic Engineering**. San Diego, Academic Press, 1998.
89. STEPHANOPOULOS, G.; VALLINO, J.J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolic overproduction. **Science**, v. 252, p. 1675-1681, 1991.
90. SZYPERSKI, T. ^{13}C -NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. **Quarterly Reviews in Biophysics**, v. 31, p. 41-106, 1998.
91. THEVELEIN, J.M.; DE WINDE, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 904-918, 1999.
92. TREITEL, M. A.; KUCHIN, S.; CARLSON, M. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in

- Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, p. 6273-6280, 1998.
93. VALLINO, J.J.; STEPHANOPOULOS, G. Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations. In: Sikdar, S .K.; Bier, M.; Todd, P, eds. **Frontiers in Bioprocessing**. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 205-219.
 94. VALLINO, J.J.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 633-646, 1993.
 95. VAN DIJKEN, J.P. *et al.* An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 706-714, 2000.
 96. VAN GULIK, W.M.; HEIJNEN, J.J. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p. 681-698, 1995.
 97. VARMA, A.; PALSSON, B.O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. **Bio/Technology**, v. 12, p. 994-998, 1994.
 98. VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, p. 325-353, 1991.
 99. VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501-517, 1992.
 100. VINCENT, O.; CARLSON, M. Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. **EMBO Journal**, v. 17, p. 7002-7008, 1998.
 101. VINCENT, O.; CARLSON, M. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. **EMBO Journal**, v. 18, p. 6672-6681, 1999.
 102. WALKER, M. E.; VAL, D.L.; ROHDE, M.; DEVENISH, R.J.; WALLACE, J.C. Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, p. 1210-1217, 1991.

103. WILSON, K. Chromatographic techniques. In: WILSON, K.; WALKER, J.M. eds. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1994. p. 462-529.
104. WU, J.; TRUMBLY, R.J. Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site. **Yeast**, v. 14, p. 985-1000, 1998.
105. WYSOCKI, R.; VAN DYCK, E.; FAIRHEAD, C.; FOURY, F. Mass-murdering: deletion of twenty-three ORFs from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XI reveals five genes essential for growth and three genes conferring detectable mutant phenotype. **Gene**, v. 229, p. 37-45, 1999.
106. YANG, Y.T.; BENNETT, G.N.; SAN, K.Y. Effect of inactivation of *nuo* and *ackA-pta* on redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, p. 291-297, 1999.
107. ZUBAY, G. **Biochemistry**. 2. ed. New York, Macmillan, 1988.

APÊNDICE

Modelo matemático (estequiométrico) utilizado para cálculo de fluxos metabólicos em todas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas neste trabalho. O formato de apresentação é o do arquivo utilizado para cálculos em MATLAB® (The Mathworks, Inc.). As letras minúsculas indicam as transições dos átomos de C em cada reação.

% Consumo de glicose

GLC	->	G6P
abcdef		abcdef

% Via EMP

G6P	->	F6P
abcdef		abcdef
F6P + G6P	->	G6P + F6P
abcdef ghijkl		abcdef ghijkl
F6P	->	G3P + G3P
abcdef		cba def
G3P	->	PEP
abc		abc
PEP	->	PYRCYT
abc		abc

% Via PP

G6P	->	CO + P5P
abcdef		a bcdef
P5P + P5P	->	S7P + G3P
abcde fghij		fgabcde hij
S7P + G3P + P5P + P5P	->	P5P + P5P + S7P + G3P
fgabcde hij klmno pqrst		abcde fghij klpqrst mno
S7P + G3P	->	F6P + E4P
abcdefg hij		abchij defg
F6P + E4P + S7P + G3P	->	S7P + G3P + F6P + E4P
abchij defg klmnopq rst		abcdefg hij klmrst nopq
P5P + E4P	->	F6P + G3P
abcde fghi		abfghi cde
F6P + G3P + P5P + E4P	->	P5P + E4P + F6P + G3P
abfghi cde jklmn opqr		abcde fghi jkopqr lmn

% Formação de etanol, acetato e glicerol

PYRCYT	->	ACA + CO
abc		bc a
ACA	->	ETH
ab		ab

ACA	->	ACE
ab		ab
G3P	->	GLYC
abc		abc
% Formação de AcCoA no citossol		
ACE	->	ACCOACYT
ab		ab
% Reação anaplerótica (citossólica)		
PYRCYT + CO	->	OAACYT
abc d		abcd
% ciclo TCA (considerando embaralhamento dos átomos de C devido à simetria do succinato)		
PYRMIT	->	ACCOAMIT + CO
abc		bc a
OAAMIT + ACCOAMIT	->	ICIT
abcd ef		dcbafe
ICIT	->	AKG + CO
abcdef		abcef d
AKG	->	FUM + CO
abcde		bcde a
FUM + FUM	->	OAAMIT + OAAMIT
abcd efgh		abcd hgfe
OAAMIT	->	FUM
abcd		abcd
% Transportes		
OAAMIT	->	OAACYT
abcd		abcd
OAACYT	->	OAAMIT
abcd		abcd
ACCOACYT	->	ACCOAMIT
ab		ab
PYRCYT	->	PYRMIT
abc		abc
% Metabolismo de Thr, Ser e Gly		
G3P	->	SER
abc		abc
SER	->	GLY + C1
abc		ab c
SER + GLY + C1	->	SER + GLY + C1
abc de f		def ab c

OAACYT			->	THR		
abcd				abcd		
THR			->	GLY +	ACA	
abcd				ab	cd	
GLY +	ACA +	THR	->	THR +	GLY +	ACA
ab	cd	efgh		abcd	ef	gh

% Enzima málica (descarboxilação mitocondrial de MAL)

OAAMIT	->	PYRMIT +	CO
abcd		abc	d

% Drenagem de intermediários para biossíntese de macromoléculas

G6P	->	G6POUT
abcdef		abcdef
P5P	->	P5POUT
abcde		abcde
E4P	->	E4POUT
abcd		abcd
G3P	->	G3POUT
abc		abc
PEP	->	PEPOUT
abc		abc
PYRCYT	->	PYRCYTOUT
abc		abc
PYRMIT	->	PYRMITOUT
abc		abc
OAACYT	->	OAACYTOUT
abcd		abcd
AKG	->	AKGOUT
abcde		abcde
ACCOACYT	->	ACCOACYTOUT
ab		ab
ACCOAMIT	->	ACCOAMITOUT
ab		ab
SER	->	SEROUT
abc		abc
GLY	->	GLYOUT
ab		ab
C1	->	C1OUT
a		a
GLYC	->	GLYCOUT
abc		abc
THR	->	THROUT
abcd		abcd

% Produtos excretados

ETH

-> ETHOUT

ab

ab

ACE

-> ACEOUT

ab

ab

% formação de CO₂

CO

-> COOUT

a

a