CARLOS ANDRÉS FAJARDO GÓMEZ

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE XILOSE EMPREGANDO TÉCNICAS DE
ENGENHARIA EVOLUTIVA E BIOPROCESSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Butantã/IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2015

CARLOS ANDRÉS FAJARDO GÓMEZ

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE XILOSE EMPREGANDO TÉCNICAS DE
ENGENHARIA EVOLUTIVA E BIOPROCESSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Butanta/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fajardo-Gómez, Carlos Andrés.

Desenvolvimento de processo de produção de polihidroxibutirato a partir de xilose empregando técnicas de engenharia evolutiva e bioprocessos / Carlos Andrés Fajardo Gómez. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção de polihidroxialcanoatos.

Versão do título para o inglês: Development of polydioxbutyrate production from xylose employing evolutionary engineering techniques and bioprocesses.

1. Polímeros materiais 2. Metabolismo de carboidrato 3. Microbiologia industrial 4. Polihidroxibutirato 5. Análise de fluxo metabólico 6. Xilose I. Silva, Profa. Dra. Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0199/2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 563/12 referente ao projeto intitulado: *“Desenvolvimento de processo de produção de polihidroxibutirato a partir de açúcares derivados de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar empregando técnicas de engenharia evolutiva e de bioprocessos”* sob a responsabilidade de **Carlos Andrés Fajardo Gómez**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais e irmãs

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela orientação e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional que me brindou ao me receber no seu grupo de pesquisa, agradeço sua paciência no momento de me direcionar e seu exemplo como pesquisadora e gestora de conhecimento. Ao professor Gregório pela disponibilidade para as discussões e revisões que deram uma melhor estrutura ao meu trabalho. À professora Marilda por sua ajuda em diferentes momentos do meu processo.

À minha família especialmente aos meus pais Maria Trinidad Gómez e Miguel Arturo Fajardo. Eles sempre acreditaram e nunca mediram os esforços para me apoiar e incentivar mesmo à distância. Estarei agradecido sempre e espero compartilhar a felicidade desse logro com eles em casa. Às minhas irmãs por sua compreensão. Elas escutaram e me aconselharam quando foi necessário. À Lorena Garcia pelo apoio que me brindou sempre com sinceridade e amor.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade, pelas sugestões, e pela colaboração no desenvolvimento dos ensaios. Aos técnicos do laboratório e a toda a equipe de apoio do Instituto de Ciências Biomédicas.

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (Processos FAPESP: 2011/15405-0.)

RESUMO

FAJARDO, C. A. **Desenvolvimento de processo de produção de polihidroxibutirato a partir de xilose empregando técnicas de engenharia evolutiva e bioprocessos**. 2015. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A produção de plásticos tem aumentado consideravelmente, também a contaminação pelas más práticas na disposição; razão pela qual foram desenvolvidos materiais menos contaminantes. O polihidroxibutirato (PHB) é uma alternativa ambientalmente correta aos plásticos convencionais. É por isso que vem aumentando o interesse no desenvolvimento de pesquisas na produção de PHB. A xilose é o segundo açúcar mais abundante na natureza, porém, existem limitações para seu uso na indústria, afetando principalmente a produtividade. Dentro deste contexto, foi proposto este trabalho visando melhorar o consumo de xilose na bactéria *Burkholderia sacchari* utilizando o acúmulo de PHB como modelo de produção, aplicando técnicas de engenharia evolutiva. Inicialmente foram avaliadas as características fenotípicas das linhagens utilizadas. Os valores da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) das linhagens usadas foram de $0,17 \text{ h}^{-1}$ para *B. sacchari* LFM 101, selvagem, e $0,19 \text{ h}^{-1}$ para *B. sacchari* EA 87 previamente selecionada por engenharia evolutiva. Depois, foi desenvolvido um processo de evolução na linhagem *B. sacchari* LFM 101, por meio da aplicação de cultivos de fartura e fome (*feast and famine*), cultivos sequenciais em fase exponencial e cultivos sequenciais sob saturação de xilose. No total foram aplicados 11 ciclos de cultivos *feast and famine*; cada um teve uma duração de 7 dias; adicionalmente foram implementadas 967 horas de cultivos sequenciais em fase exponencial e 1440 horas de cultivos sequenciais sob saturação em xilose. A cada duas semanas foi comparada a $\mu_{\max}$ da linhagem evoluída com a linhagem parental. Finalizado o processo de evolução foi obtida uma linhagem mutante com uma $\mu_{\max}$ de $0,24 \text{ h}^{-1}$. Foram realizados ensaios em biorreator de bancada sob a condição de batelada alimentada a partir dos quais foi feita uma análise de fluxos metabólicos para determinar a distribuição dos fluxos da linhagem *B. sacchari* LFM 101. Foi analisado um estado pseudo-estacionário, e gerou 19 modos elementares um dos quais capaz de representar rede metabólica desenhada correspondente aos dados experimentais. Foi possível concluir que o metabolismo da xilose acontecia em sua maioria pela via das pentoses fostafo (VP) associada à Entner-Doudorof (ED). O modo elementar indicou que a via ED apresenta a maior atividade acontecendo de maneira cíclica. No ciclo de Krebs (CK) também se observou um fluxo metabólico, porém menor, apenas para fornecer alguns metabolitos necessários na formação de biomassa. Foi feito um ensaio de acúmulo com carbono marcado utilizando uma solução de xilose, com uma composição de 20:80 de xilose marcada ^{13}C em todos os carbonos e xilose não marcada. Amostras periódicas foram analisadas por CG-MS para determinar quais seriam as possíveis vias metabólicas no uso da xilose por parte de *B. sacchari* LFM 101 e da linhagem evoluída BSEV11. Este ensaio permitiu rastrear os carbonos dos acetil-CoA que participam na produção de PHB. Foi determinado que houve embaralhamento de carbonos, fato que só acontece quando o metabolismo da xilose é feito pela VP junto com a via ED, assim foi possível corroborar a indicação da via ED como principal via para o metabolismo da xilose em *B. sacchari* LFM.

Palavras-chave: *Burkholderia sacchari*. Polihidroxialcanoatos (PHA). Metabolismo de Xilose. Análise de Fluxos Metabólicos.

ABSTRACT

FAJARDO, C. A. **Development of polyhydroxybutyrate production from xylose employing evolutionary engineering techniques and bioprocesses.** 2015. 113 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The production of plastics has increased considerably, also increasing environmental contamination; thus, materials with less potential for contamination have been developed. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable and biocompatible polyester, showing a variety of uses and can be an environmentally friendly alternative to conventional plastics. For this reason, there is growing interest in the development of research in the production of PHB. Xylose is the second most abundant sugar in nature, however, there are limitations to its use in the industry, resulting in a reduction in the productivity for the production of PHB. In this context, this work was proposed to improve the consumption of xylose in *Burkholderia sacchari* by the application of evolutionary engineering techniques. Initially the phenotypic characteristics of the strains used were evaluated. The values of the maximum specific growth rate (μ_{max}) of the strains used were 0.17 h^{-1} for *B. sacchari* LFM 101 (wild type), and 0.19 h^{-1} for *B. sacchari* EA 87 previously selected by evolutionary engineering. Then, it was developed a process of evolution on *B. sacchari* LFM 101, through the application of feast and famine cultures; sequential cultures in exponential phase and sequential cultures on xylose saturation. In total were applied 11 cycles of feast and famine crops, in which each cycle lasted seven days; 967 hours were additionally implemented in sequential exponential phase cultures and 1440 hours of cultivation in sequential saturation xylose were applied. Every two weeks the μ_{max} of the evolved lineage was compared to the parental strain. At the end of the process of evolution, it was obtained a mutant strain with a maximum specific growth rate of 0.24 h^{-1} . Besides, bioreactor assays were performed in a under fed batch condition. From the data collected, An analysis was made to determine the metabolic flux distribution of *B. sacchari* LFM 101 a pseudo-steady state were analyzed and generated 19 elementary modes, in which one of them can represent the designed metabolic network corresponding to the experimental data. It was concluded that the xylose metabolism occurred mostly via the pentose fostafo (VP) associated with Entner-Doudorof (ED). The chosen elementary mode indicated that the via ED has the highest activity going on a cyclical way. The Krebs cycle (CK) also has a metabolic flow, but smaller, just to provide some necessary metabolites in the formation of biomass. An accumulation assay using a labeled carbon xylose was made. It was used a solution with a composition of 20:80 of ^{13}C labeled xylose with regular xylose. Periodic samples were analyzed by GC-MS to determine which pathways would be used on the xylose metabolism by *B. sacchari* LFM 101 and the evolved strain BSEV11. This test allowed track the carbons of acetyl-CoA involved in the production of PHB. It was determined that there was scrambling carbons, fact that only happens when the metabolism of xylose happen by VP pathway in association of ED, so it was possible to corroborate the ED pathway as the main pathway for xylose metabolism in *B. sacchari* LFM 101.

Keywords: *Burkholderia sacchari*. Polyhydroxyalkanoates (PHA). Xylose Metabolism. Metabolic Flux Analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Microscopia eletrônica de células de *Ralstonia eutropha*.** Observa-se acúmulo de polímero na forma de grânulos (Foto: RITA DE CÁSSIA PARO ALLI). 17
- Figura 2. Estrutura química geral dos PHA.** O radical R pode ser composto por cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas e também por outros grupos funcionais. 18
- Figura 3. Procedimento para a análise do metabolismo através do uso de impressões isotópicas.** Depois de retiradas e tratadas, as amostras são quantificadas por meio de cromatografia de gases (GC-MS). (TANG et al., 2012). 23
- Figura 4. Curva de crescimento *B. sacchari* EA 87 em frascos agitados.** Densidade celular em função do tempo no comprimento de onda de 610 nm ($D.O_{610}$) (*círculos*). Logaritmo natural da densidade ótica (*quadrados*). A velocidade máxima de crescimento obtida foi de $0,19 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. Experimentos realizados em triplicata. 34
- Figura 5. Curva de crescimento de *B. sacchari* LFM 101 em frascos agitados.** (A) Variação da densidade celular $D.O_{610}$ e (B) Ln de D.O em função do tempo para *B. sacchari* LFM 101 cultivada em meio mineral usando xilose como fonte de carbono. Média de 3 experimentos. A velocidade específica máxima de crescimento obtida para esta linhagem foi de $0,17 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$ 36
- Figura 6. Estado inicial da velocidade máxima específica de crescimento.** Variação da densidade celular $D.O_{610}$ em função do tempo para *B. sacchari* LFM 101 linhagem de referência. Média de 3 experimentos. (B) Logaritmo natural da densidade ótica, fase exponencial da curva de crescimento de *B. sacchari* LFM 101. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) obtida foi de $0,18 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$. Média de 3 experimentos. 38
- Figura 7. Avaliação da velocidade específica de crescimento da linhagem evoluída.** (A) Variação da densidade celular $D.O_{610}$ em função do tempo para *B. sacchari* evoluída com 11 ciclos de alimentação dinâmica. (B) Logaritmo natural da densidade ótica obtida na fase exponencial da curva de crescimento. A velocidade $\mu_{\max}$ obtida foi de $0,23 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$. Média de 3 experimentos. 38
- Figura 8. Avaliação da velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{\max}$ da linhagem evoluída.** Observa-se o aumento periódico da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) com a aplicação dos cultivos de alimentação dinâmica. 39
- Figura 9. Estimativa da concentração de inibição em xilose para linhagem evoluída *BSEVII*.** Cálculo da $\mu_{\max}$ para cada concentração: 20 g/L ($0,18 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 30 g/L ($0,17 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 35 g/L ($0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), 40 g/L ($0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), 45 g/L ($0,18 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 60 g/L ($0,15 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 70 g/L ($0,1 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 80 g/L ($0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 90 g/L ($0,05 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), 100 g/L ($0,03 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$). 41
- Figura 10. Avaliação da velocidade máxima específica de crescimento após 1500 horas de cultivos sobre saturação em xilose.** (A) Variação da densidade celular $D.O_{610}$ em função do tempo para *BSEVII*. (B). Logaritmo natural da densidade ótica obtida na fase exponencial

da curva de crescimento. A velocidade $\mu_{\max}$ obtida foi de $0,24 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$. Média de três experimentos.....	42
Figura 11. Avaliação do aumento da $\mu_{\max}$ na aplicação de cultivos sequenciais em fase exponencial. Foi quantificada a velocidade máxima específica de crescimento a cada semana de cultivos sequenciais, o incremento da velocidade máxima específica usando esta técnica foi de 4%.	42
Figura 12. Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM 101 em biorreator. Variação das concentrações de xilose (g/L), PHB(g/L), Xr (biomassa residual g/L), Xt (biomassa total g/L) e NH_4 (PPM) em função do tempo. Para o ensaio em biorreator usando a linhagem <i>B. sacchari</i> LFM 101 cultivada em MM usando xilose como fonte de carbono.....	45
Figura 13. Crescimento da biomassa no biorreator. Variação da massa seca (Xr e Xt) e o Ln de Xr em função do tempo, para o ensaio em biorreator usando a linhagem <i>B. sacchari</i> LFM 101 cultivada em MM suplementado com xilose.....	46
Figura 14. Representação gráfica do modelo metabólico proposto para <i>Burkholderia sacchari</i>.	48
Figura 15. Estados pseudo-estacionários escolhidos para análise de fluxo. Variação da biomassa total (Xt), biomassa residual (Xr), Xilose e PHB em função do tempo. Apresentam-se dois estados pseudo-estacionários demarcados em laranja e azul.....	49
Figura 16. Análises cinética nos estados pseudo-estacionários. Variação das concentrações de xilose, PHB, e biomassa residual, em g/L, em função do tempo. (A) Estado pseudo estacionário 1: intervalo entre 16 e 21 horas de cultivo. (B) Estado pseudo estacionário 2: intervalo entre 26 e 47 horas de cultivo.....	50
Figura 17. Distribuição dos fluxos metabólicos para <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101. A distribuição foi feita segundo o modo elementar 13 na solução fornecida pelo software METATOOL.	54
Figura 18. Otimização da distribuição dos fluxos metabólicos usando o software Matlab	56
Figura 19. Ensaios em biorreator com as linhagens <i>B. sacchari</i> LFM 101 (Linhagem parental) e BSEV11 (linhagem evoluída). Observa-se o Ln Xttotal , o acúmulo de PHB (g/L) e o uso de NaOH (mL), nos ensaios feitos em biorreator com as duas linhagens parental e evoluída.....	58
Figura 20. Avaliação do consumo de xilose e a adição de NaOH durante os ensaios em biorreator com as linhagens <i>B. sacchari</i> LFM 101 (Linhagem parental) e BSEV11(linhagem evoluída).	59
Figura 21. Estado pseudo estacionário escolhido para a análise de fluxo metabólico da linhagem BSEV11. Observa-se entre as linhas laranjas o intervalo de tempo escolhido (4h-12h).....	61
Figura 22. Distribuição dos fluxos metabólicos da linhagem BSEV11. Esta distribuição foi obtida pela combinação de 8 modos elementares.....	63

Figura 23. Ensaios preliminares para o desenho do experimento usando xilose marcada. Variação da % de acúmulo (preto), D.O610 (verde) e pH (vermelho) no tempo. Avaliação de três condições de acúmulo. (A) 0,5 g/L (NH₄)₂SO₄; (B) 1,0 g/L (NH₄)₂SO₄; (C) 1,5 g/L (NH₄)₂SO₄.....65

Figura 24. Fragmentos m/z: 87, 89 e 131 resultantes da quebra do propil-éster do 3HB......67

Figura 25. Cromatograma de CG-MS da amostra BSEV (linhagem *BSEV11*). Análise dos propil-ésteres produzidos por *B. sacchari*. Setas indicam os fragmentos m/z: 87, 89 (em cinza) e 131. TR: tempo de retenção. 68

Figura 26. Marcação de moléculas de acetil-coA usando a via das pentoses. Padrões de embaralhamento de carbonos da molécula de acetil-CoA. Originada a partir de pentoses contendo carbonos marcados (preto) e não marcados (vermelho) fornecidos pela mistura de xilose marcada e não marcada com ¹³C. Via das pentoses fosfato..... 68

Figura 27. Marcação de moléculas de acetil-coA usando as vias Entner-Doudoroff (ED) e Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Padrões de embaralhamentos de carbonos da molécula de acetil-CoA originada a partir de pentoses contendo carbonos marcados (preto) e não marcados (vermelho) fornecidos pela mistura de xilose marcada e não marcada com ¹³C. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens usadas neste trabalho.....	26
Tabela 2. Formulação de meio de cultura para biorreator para <i>B. Sacchari</i>	27
Tabela 3. Balanço da porcentagem de carbono de entrada (xilose) com a porcentagem de carbono de saída (Xr, CO ₂ , PHB) do ensaio em biorreator, estado pseudo-estacionário 1 e estado pseudo-estacionário 2.....	51
Tabela 4. Equações gerais dos modos elementares obtidos por meio do METATOOL.	52
Tabela 5. Balanço de carbonos do estado pseudo-estacionário linhagem BSEV11. Balanço da porcentagem de carbono de entrada (xilose) com a porcentagem de carbono de saída (Xr, CO ₂ , PHB).....	61
Tabela 6. Comparação de três condições de acúmulo de PHB a partir de xilose. Variação da concentração de nitrogênio no meio.....	66
Tabela 7. Resultados de experimento utilizando xilose marcada com ¹³ C e não marcada (20:80).	66
Tabela 8. Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isótopos de acetil-CoA considerando o metabolismo de xilose marcada (20 %) e não marcada (80 %) pela via das pentoses e ED (ver a situação particular considerada no texto).	70
Tabela 9. Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isotopômeros do fragmento m/z = 131 e m/z = 89 considerando o metabolismo de xilose marcada (20%) e não marcada (80%) pela via das pentoses e ED.	71
Tabela 10. Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isotopômeros do fragmento m/z = 87 considerando o metabolismo de xilose marcada (20%) e não marcada (80%) pela via das pentoses e ED.....	72
Tabela 11. Cálculo da frequência de distribuição dos diferentes isotopômeros dos fragmentos m/z = 87, 89 e 131 experimental comparada à estimada para o fluxo via VP e ED para as linhagens <i>B. sacchari</i> e <i>BSEV11</i>	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Polihidroxicanoatos	17
2.2 Metabolismos de xilose	18
2.3 Bagaço de cana	19
2.4 Análises de fluxos metabólicos (AFM)	20
2.5 Engenharia evolutiva	21
2.6 Uso de Carbono marcado (^{13}C) para elucidar vias metabólicas	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.2 Meios de cultura e microrganismos e meios de cultivo	26
4.3 Determinação do padrão de crescimento em xilose	27
4.4 Engenharia evolutiva para seleção de linhagens mais eficientes	29
4.4.1 Subcultivos sequenciais em fase exponencial	29
4.4.2 Fome e fartura	29
4.4.3 Limitação por altas concentrações de xilose	30
4.4.4 Avaliação das linhagens em frascos sob agitação	30
4.5 Ensaios em Biorreator	30
4.6 Análises de fluxos metabólicos	31
4.7 Ensaios com xilose marcada ^{13}C (UL-xilose ^{13}C)	31
4.7.1 Ensaios preliminares	31
4.8 Metodologias analíticas	32
4.8.1 Determinação do pH	32

4.8.2 Concentração de Biomassa (<i>Massa Seca Celular</i>)	32
4.8.3 Determinação de açúcares	33
4.8.4 Determinação de PHB.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1.1 Avaliação inicial de <i>Burkholderia sacchari</i> EA 87	34
5.1.2. Avaliação inicial de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	35
5.2 Engenharia evolutiva para seleção de linhagens mais eficientes	36
5.2.1 Fome e fartura	37
5.2.2 Cultivos sequenciais em fase exponencial	40
5.3 Ensaios em Biorreator	43
5.4 Análises de fluxos metabólicos	46
5.4.1. Estado pseudo-estacionário	48
5.4.2 Resolução da matriz estequiométrica	52
5.4.3 Distribuição dos fluxos metabólicos.....	53
5.4.4 Ensaio em biorreator com a linhagem <i>Evoluída</i>	57
5.4.5 Análise de fluxo da linhagem <i>evoluída</i>	60
5.5 Ensaios com xilose marcada ^{13}C (UL-xilose ^{13}C)	64
6 CONCLUSÕES	75
REFERENCIAS	76
APÊNDICE A-Informação de saída do programa METATOOL	81
APÊNDICE B - Cálculo da μ_{max} durante a evolução.	88
APÊNDICE C - Resultados da análise CG-MS do ensaio com carbono marcado ^{13}C. ...	94
ANEXO A - METATOOL	108

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O uso do plástico tem aumentado significativamente nos últimos anos e sua aplicação tem permeado a maioria dos aspectos da vida humana. Sendo o petróleo sua matéria-prima dominante (HAWARI; YEZZA, 2010), os plásticos derivados são poluentes altamente recalcitrantes ameaçando os diferentes ecossistemas. Assim, é necessário procurar alternativas mais sustentáveis, tais como polihidroxialcanoatos (PHA), polilactatos (PLA), poliésteres alifáticos, polissacarídeos, misturas de amido e de polipropileno e outros copolímeros (LEE, 1996).

Neste contexto, destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHA) que compõem um grupo bastante diversificado de poliésteres acumulados por um grande número de bactérias (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). A variedade de PHAs, com novas composições e massa molecular, tem aumentado ao longo da última década, um número crescente de patentes foi aprovado para diferentes aplicações, particularmente no campo da medicina, aumentando a relevância destes biopolímeros (MENDONÇA et al., 2014; REHM, 2007). Além de serem biodegradáveis e biocompatíveis apresentam propriedades termoplásticas, tornando-se alvo das atenções da comunidade científica direcionando os esforços para sua produção industrial (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY; 2010).

Um dos principais fatores limitantes para a produção industrial desse poliéster natural é o elevado custo associado à fonte de carbono (KEENAN; NAKAS; TANENBAUM, 2006), que pode atingir até 29% de seu preço de produção global, mesmo quando integrado às usinas de cana de açúcar (NONATO; MANTELATTO; ROSSELL, 2001). Por essa razão, esforços são focados no melhoramento do uso de substratos de baixo custo como materiais lignocelulósicos renováveis (SILVA et al., 2014).

O PHA produzido a partir de açúcares derivados do hidrolisado de bagaço de cana aparece como uma alternativa viável para melhorar a eficiência das usinas de bioetanol (ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2014) e um dos objetivos principais nesta área da pesquisa é aumentar o fator de conversão dos açúcares em PHA, e já que a xilose é o polissacarídeo que está em maior porcentagem no bagaço, procura-se aumentar o rendimento da produção de PHA a partir de xilose, sendo este um pré-requisito para sua produção industrial.

Num estudo realizado por (SILVA et al., 2004), no Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), foram isoladas diversas linhagens produtoras de PHA a partir de xilose e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Linhagens de *Burkholderia*

foram isoladas de amostras de solo de cultivo de cana e foram testadas no uso de xilose e glicose, principais açúcares presentes no hidrolisado, os testes resultaram em altas concentrações de biomassa (60 g / L) e teor de polímero (60%) com valores de produtividade de 0,46 - 0,47 g / L.h. Porém, usando hidrolisado, a produtividade observada foi menor (0,11 g / L.h), e foi necessário eliminar ou diminuir a concentração de componentes tóxicos para a bactéria, oriundos do processo de hidrólise.

Lopes e colaboradores (2009) trabalharam numa pesquisa que consistiu na clonagem e superexpressão, de genes envolvidos no catabolismo de xilose em *B. sacchari*. Mesmo que os genes tenham sido superexpressos, nenhum ganho no crescimento e produção de P3HB a partir de xilose foi obtido (LOPES et al., 2009). Posteriormente num trabalho feito pelos mesmos autores, foram isoladas novas linhagens capazes de acumular P3HB utilizando xilose como fonte de carbono. Entre mais de 3000 isolados analisados, um isolado de *Bacillus* sp acumulou P3HB numa relação de aproximadamente 65% da massa celular usando xilose ou glicose como fontes de carbono, foram obtidos fatores de conversão em torno de 0,25 g/g porém com baixos valores de produtividades (0,10 g / L.h a partir de glicose e 0.06 g / L.h a partir de xilose) (LOPES et al., 2009).

O panorama atual frente ao uso da xilose em processos biotecnológicos, serviram de base para propor este trabalho, que tem como alvo o melhoramento do metabolismo da xilose a partir da aplicação de técnicas de engenharia evolutiva aplicadas a *B. sacchari*, usando a produção de PHB como plataforma de análise.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são termoplásticos naturais que são produzidos por uma grande variedade de bactérias, que sintetizam estes poliésteres para o armazenamento de carbono e energia (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). Estes polímeros são acumulados em forma de grânulos intracelulares (figura 1), fenômeno que acontece de forma mais expressiva sob condições desbalanceadas de crescimento, ou seja, quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial para a multiplicação celular (LOPES et al., 2009; PAN et al., 2012). Tem-se reportado acúmulo destes grânulos em valores que atingem cerca de 80% da massa celular seca (DE ANDRADE et al., 2000; JEYASEELAN; PANDIYAN; RAVI, 2012), e uma vez esgotada a fonte de carbono, o micro-organismo tem a facilidade de usar esses grânulos como alimento para continuar com seu crescimento, desde que haja disponibilidade dos demais nutrientes necessários ao crescimento (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003). Os PHA são poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos com uma estrutura geral mostrada na figura 2.

Figura 1. Microscopia eletrônica de células de *Ralstonia eutropha*. Observa-se acúmulo de polímero na forma de grânulos (Foto: RITA DE CÁSSIA PARO ALLI).

Na figura 2 observa-se a fórmula química geral dos PHA na qual n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H , CH_3 , CH_2CH_3 , para $n=1$, os PHA são classificados como PHAscl (“short chain length”) e possui monômeros com 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando R for igual a $(CH_2)_2CH_3$ a $(CH_2)_8CH_3$, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os

PHAmcl (“medium chain length”) que tem monômeros do poliéster compostos na cadeia principal com 6 a 14 átomos de carbono.

Figura 2. Estrutura química geral dos PHA. . O radical R pode ser composto por cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas e também por outros grupos funcionais.

2.2 Metabolismos de xilose

D-xilose é um açúcar com estrutura composta de cinco carbonos. Os microrganismos que degradam xilose apresentam dois mecanismos para transportá-la. A xilose livre pode ser transportada por um sistema quimiosmótico de simporte de prótons, de baixa afinidade (XylE ou XylT) e por outro sistema de transporte de alta afinidade, o XylFGH (SONG; PARK, 1998), no qual temos que XylF representa uma proteína periplasmática que se liga à xilose com alta afinidade, XylH é uma permease e XylG uma ATPase que fornece energia para o processo de translocação da xilose.

Depois que a xilose é transportada para dentro da célula, ocorre sua conversão em xilulose, pela ação da xilose isômerase (codificado pelo gene *xyIA*), que é então fosforilada pela ação da xiluloquinase (codificada pelo gene *xyIB*) formando uma xilulose-5-fosfato (ZHOU et al., 2012). A partir da xilulose-5-fosfato e da ribose-5-fosfato resultante de uma isomerização, começam as reações da fase não oxidativa da via das pentoses. Assim são geradas, por meio do embaralhamento dos carbonos, moléculas de 3, 4, 5, 6 e 7 carbonos, que acontece pela ação de enzimas transcetolases e transaldolases. Estas reações criam uma ponte entre duas vias metabólicas necessárias para o microrganismo como são a via das pentoses fosfato (VP) e a via glicolítica (EMP) e/ou a via Entner Doudoroff (ED). Na VP são gerados alguns intermediários na formação de biomassa, purinas e pirimidinas. Tanto na via glicolítica como na via ED é gerada a energia necessária para os diferentes processos celulares (LIU et al., 2013; MATSUSHIKA et al., 2012; SMITH, VAN RENSBURG E GÖRGENS, 2014).

2.3 Bagaço de cana

A ênfase atual sobre a sustentabilidade e os produtos verdes levou a intensa busca por recursos renováveis e ambientalmente amigáveis. Assim, o desenvolvimento sustentável é reconhecido como necessário para o crescimento da economia e produtividade industrial. Como as reservas de petróleo mundiais são finitas, existe uma necessidade adicional de novas fontes de energia (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010)

Com a necessidade de introduzir novas alternativas para a produção de combustíveis junto à crise da produção do petróleo, no Brasil na década de 1970, começou-se o investimento em pesquisa e produção de bioetanol. O Brasil para essa época já estava bem posicionado na produção de açúcar refinado, fato que possibilitou o começo da indústria do bioetanol no país (GOLDEMBERG, 2008).

Considerando apenas a produção de açúcar e de etanol no Brasil, a quantidade estimada de cana-de-açúcar moída para a temporada 2013/14 foi de 658,8 milhões de toneladas. Levantamento publicado em abril de 2014 no qual foram avaliadas as 319 usinas em operação (AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, 2014). A produção média de etanol de primeira geração no Brasil é de 25.000.000.000 L por safra entre 2008 e 2013. A quantidade de bagaço de cana que sobra é aproximadamente de 30% do peso da cana de açúcar. No Brasil, com cada safra de cultivo de cana, 150 milhões de toneladas são usadas na produção de energia elétrica, esta produção atingiu o 5% do total da energia elétrica do país em 2010 (SILVA et al., 2014). No entanto, existe uma porcentagem excedente de bagaço e pode ser utilizado para outros fins, especialmente na produção de produtos com alto valor agregado. (ALBUQUERQUE; TORRES; REIS, 2010)

A produção de etanol de segunda geração já está sendo aplicada em vários países, mas só é considerada a fração celulósica para a fermentação. Pois leveduras fermentadoras eficientes dno consumo de xilose ainda se encontram em desenvolvimento (SILVA et al., 2014). A fração celulósica representa 35% da composição química do bagaço, mas também está composto de hemicelulose num teor de 24-29%, assim como celulose, lignina, minerais, ceras e outros compostos (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; CANILHA et al., 2012; REZENDE et al., 2011). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo com xilana como o hidrato de carbono principal e compreende principalmente polímeros de xilose, arabinose, galactose, manose e glicose (CANILHA et al., 2012).

A biomassa obtida após o pré-tratamento do hidrolisado e a hidrólise contém várias hexoses e pentoses. Apesar de haver alguma variação na composição dos hidrolisados os

polissacarídeos, glicose e xilose são os principais açúcares presentes na maioria dos hidrolisados de biomassa vegetal terrestre (SINDHU et al., 2013).

Em resumo, a literatura aponta que no Brasil, se for utilizada principalmente a glicose pra produzir etanol, no momento, haverá um excesso de xilose que pode ser aproveitada para gerar outros produtos biotecnológicos.

2.4 Análises de fluxos metabólicos (AFM)

Para caracterizar o metabolismo de um microrganismo é necessário determinar quais são os fatores que definem a fisiologia celular. Uma das ferramentas que pode ser usada com essa finalidade é a Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), na qual são avaliadas as velocidades de reação das vias metabólicas para entender de forma detalhada e quantitativa a natureza dos fluxos das reações bioquímicas que acontecem no metabolismo. Para isso é indispensável o conhecimento, não somente de cada componente individualmente de uma rede metabólica, mas também é necessário estudar a rede metabólica em conjunto (PRADELHA et al., 2012).

O interesse pela análise da distribuição de fluxos metabólicos vem aumentando, devido à possibilidade da interpretação quantitativa da fisiologia metabólica, por meio da análise de dados experimentais. A AFM requer apenas informações sobre as reações estequiométricas necessárias ao crescimento, e a quantificação de alguns parâmetros específicos de uma linhagem.

A construção de modelos para a AFM envolve quatro etapas essenciais: definir o sistema, obter reações estequiométricas; definir funções “objetivo” biologicamente relevantes e adicionar restrições bioquímicas adequadas, e resolver a matriz de variáveis (HÖFFNER; HARWOOD; BARTON, 2013).

Um programa utilizado para resolver matematicamente as múltiplas variáveis numa AFM é o Metatool. A metodologia adotada para o desenvolvimento deste programa é baseada no conceito de modos elementares de fluxos, a partir dos quais se podem testar conjuntos de enzimas que formam uma via metabólica consistente, considerando o direcionamento (irreversibilidade) das reações. A partir da análise de um modelo de rede metabólica, e utilizando os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente, o programa define as possíveis vias que o microrganismo utiliza na situação em estudo para fechar o balanço estequiométrico, gerando uma ou mais equações que representam este caminho (modos elementares) (TACIRO, 2008).

2.5 Engenharia evolutiva

A evolução natural é um dos fatores responsáveis pela grande diversidade de organismos, que ao interagir com os diferentes ecossistemas sofrem mudanças ou adaptações que permitem sua viabilidade. Esse fato tem sido aplicado pelo homem desde os começos da biotecnologia, os registros mais antigos do uso de microrganismos vêm do ano 6000 a.c, e eram aproveitados principalmente na preservação de alimentos, nos quais acontecia a fermentação dos carboidratos em ácidos e álcoois. Com os benefícios também vieram as tentativas de seu melhoramento (BACHMANN et al., 2015).

O genoma de cada organismo contém não apenas informação para o seu funcionamento no meio ambiente, mas também o potencial para se adaptar em novas condições ambientais por meio do processo de evolução. Os microrganismos, com suas gerações de curto tempo de duplicação, são sujeitos perfeitos para uma pesquisa envolvendo engenharia evolutiva, porque pode se estudar e encaminhar o comportamento de milhares de gerações, usando ambientes simples e controlados no laboratório, nos quais as "regras" da evolução se aplicam e são notavelmente simples (SAUER, 2001).

Ao se discutirem aproximações acerca da engenharia evolutiva, é prático usar o termo "*fitness landscape*" ou paisagem adaptativa, termo introduzido pela primeira vez por (WRIGHT, 1982). É a representação topológica de uma aptidão biológica num determinado ambiente. Cada genótipo (ou sequência de proteínas) é associado com um valor adaptativo (fenótipo) e a distribuição destes valores funcionais sobre o espaço da sequência de todos os genótipos constitui uma paisagem adaptativa.

A evolução acontece por meio da incorporação de mutações simples, selecionando aquelas que resultam em fenótipos mais aptos, para depois expandir a população e introduzir as próximas alterações (ARBER, 2014). Estas alterações espontâneas que acontecem nas sequências gênicas herdáveis, podem resultar a partir de várias causas e mecanismos agrupados em três categorias i) pequenas mudanças locais, como são a substituição, inserção, deleção e duplicação de uma ou mais pares de bases. ii) rearranjos no DNA, y iii) transferência horizontal de DNA originada por processos como transformação, conjugação ou infecções virais (SAUER, 2001).

Ao assumir que existe um caminho que o microrganismo tem que percorrer para evoluir e se adaptar em novos ambientes, é possível estimular cada passo nessa evolução exercendo uma pressão seletiva, visando uma paisagem adaptativa determinada. Assim, a engenharia evolutiva implica a obtenção de um fenótipo desejado pela aplicação de um

processo de seleção mediante o uso de uma pressão seletiva no cultivo do microrganismo (SAUER, 2001) e seu principal desafio é projetar, testar e desenvolver estratégias de cultivo que efetivamente selecionem células com fenótipos desejáveis. A seleção de fenótipos microbianos desejáveis pode ser 'artificial', feita pelo homem com dispositivos como catadores ou classificadores de colônias celulares, ou "natural", permitindo que misturas de células, compitam por recursos comuns durante o cultivo (WRIGHT et al., 2011).

A engenharia evolutiva tem como resultado modificações genéticas que codificam determinadas funções biológicas permitindo a adaptação do microrganismo às condições ambientais impostas. E ao analisar as modificações gênicas, pode se obter informação para definir pontos chave nos diferentes processos biológicos avaliados (CAKAR et al., 2012).

Alguns exemplos desta pressão podem ser concentrações elevadas de algum composto para gerar resistência, baixas temperaturas, condições limitantes em substratos ou também a aplicação de ciclos de alimentação dinâmica (*feast and famine*). Esta última condição é aplicada em cultivos líquidos, nos quais a primeira fase do cultivo o microrganismo dispõe de todos os substratos necessários para seu crescimento, mas, quando esgotado o fator limitante, que exerce a pressão seletiva, o microrganismo passa por um período de limitação. A aplicação contínua destes ciclos de alimentação dinâmica, pode levar à diferenciação de microrganismos (SAUER, 2001).

2.6 Uso de Carbono marcado (^{13}C) para elucidar vias metabólicas

A marcação ^{13}C é uma ferramenta poderosa para a elucidação *in vivo* de atividades enzimáticas em microrganismos. Quando um substrato marcado é suplementado num determinado meio de cultivo, a marcação é transferida para alguns produtos metabólicos (composto analisados) através das vias metabólicas. Os produtos contêm misturas de isotopômeros com padrões específicos de rotulagem, que são denominados impressões digitais isotópicas (TANG et al., 2012).

As técnicas de marcação com isótopos estáveis têm sido utilizadas amplamente em microrganismos pobremente estudados, esclarecendo dúvidas que frequentemente existem entre o sequenciamento do genoma e sua caracterização funcional (STEPHANOPOULOS; STAFFORD, 2002; TANG et al., 2012)

Na figura 3 pode se observar um esquema que descreve o uso da técnica de marcação com ^{13}C para analisar metabolismo microbiano. Essa metodologia inclui dois procedimentos

chave: i) a medição de padrões isotópicos nos metabólitos e ii) a análise das redes metabólicas.

Devido ao fato que os isótopos ^{13}C são estáveis em termos de radioatividade, são mais fáceis e seguras as análises utilizando ressonância magnética nuclear, que resulta uma técnica de alta eficiência.

Ao analisar os padrões de marcação dos metabólitos produzidos pelo microrganismo de interesse e comparando-os com a previsão de marcação na rede metabólica pode se conferir o uso de determinadas reações enzimáticas, tendo como suporte informações do sequenciamento do genoma (TANG et al., 2009).

O ensaio com carbono marcado ^{13}C é atualmente o método mais sofisticado e confiável para determinar taxas em reações enzimáticas intracelulares e tem se tornado numa ferramenta indispensável na biotecnologia para resolver redes metabólicas e regulatórias com o objetivo de melhorar processos biotecnológicos.

Figura 3. Procedimento para a análise do metabolismo através do uso de impressões isotópicas. Depois de retiradas e tratadas, as amostras são quantificadas por meio de cromatografia de gases (GC-MS). (TANG et al., 2012).

Devido ao progresso recente em medições analíticas, assim como ao desenvolvimento nos algoritmos para a análise, a análise de fluxo metabólico utilizando ^{13}C é aplicável aos mais complexos sistemas incluindo plantas e mamíferos (BLANK; EBERT, 2013).

Assim, neste trabalho foi proposto o uso de técnicas de engenharia evolutiva para melhorar o consumo de xilose na bactéria *B. sacchari*, bem como o uso de AFM e

experimentos com xilose marcada a fim de elucidar os fluxos e as vias metabólicas predominantes no catabolismo deste açúcar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Aumentar a velocidade específica máxima de crescimento de *Burkholderia sacchari* em cultivos de xilose como fonte de carbono.

3.2 Objetivos específicos

Obter linhagens evoluídas a partir de *Burkholderia sacchari* LFM 101, com a capacidade de consumir xilose com maior velocidade.

Determinar a distribuição dos fluxos metabólicos das linhagens evoluídas, por meio de análise de carbono marcado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens utilizadas neste trabalho

Na tabela 1 apresenta-se a informação das linhagens utilizadas neste trabalho.

Tabela 1. Linhagens usadas neste trabalho.

<i>Bactéria</i>	<i>Características</i>	<i>Origem/Referência</i>
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101	Linhagem selvagem: sac^+ xyI^+ , PHA ⁺ , Kan, Amp, Tc	BRÄMER <i>et al.</i> , 2001
<i>Burkholderia sacchari</i> EA 87	Linhagem evoluída para melhoramento de μ_{max} : Sac^+ , PHA ⁺ , Kan, Amp, Tc.	LOPES, 2011 (comunicação pessoal) ¹

LFM - Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB-USP; PHA⁺ - acúmulo de PHA; Kan – sensibilidade à canamicina; Amp – sensibilidade à ampicilina; Tc – sensibilidade à tetraciclina.

Para o desenvolvimento desta pesquisa foi proposto o uso de linhagens previamente selecionadas em outros trabalhos por sua capacidade de crescer e acumular PHB a partir de xilose. Assim foram escolhidas *Burkholderia sacchari* LFM101 (BRÄMER *et al.*, 2001) e *Burkholderia sacchari* EA 87 (LOPES, 2011 comunicação pessoal¹). A primeira é a linhagem selvagem de referência, a partir da qual foi obtida a linhagem EA 87, por um processo de evolução. Este processo, na literatura, é chamado de cultivo de alimentação dinâmica ou *feast and famine*. A finalidade de avaliar as condições iniciais é a de ter um parâmetro de comparação com as bactérias que vão ser obtidas ao finalizar o processo de evolução.

4.2 Meios de cultura e microrganismos e meios de cultivo

4.2.1 Meios de cultura

Os cultivos foram realizados em caldo nutriente (CN), Luria Bertani (LB) ou Meio Mineral (MM), cujas composições estão descritas a seguir:

- CN - extrato de carne 3 g/L, peptona 5 g/L.
- LB – triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L.

1. Primeiro relatório de Pos-doutorado do Dr. Mateus Schreiner Garcez Lopes, referente ao projeto intitulado **Análise sistêmica e engenharia do metabolismo da xilose em bactérias utilizadas em bioprocessos**. Processo FAPESP 2010/50454-0.

• MM (ROCHA et al., 2008) - Na_2HPO_4 3,5 g/L; KH_2PO_4 1,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sol. 20% 1,0 mL/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sol. 1 % 1,0 mL/L; Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% 1,0 mL/L; Solução de elementos traços 1,0 mL/L. A solução de elementos traços continha: H_3BO_3 0,30 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,10 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L. Esta composição foi utilizada nos ensaios que foram propostos para reproduzir os resultados de Lopes 2011 com a linhagem evoluída EA 87.

Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição de ágar (15-20 g/L) à composição dos meios líquidos acima citados. Soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C, 1 atm.

Experimentos em biorreator foram feitos com um meio de cultura otimizado, em parceria com T.T. Mendonça, e que resultou no meio modificado apresentado a seguir:

Tabela 2. Formulação de meio de cultura para biorreator para *B. Sacchari*.

Reagentes	Quantidade (2 L)	Concentração final (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,814 g	2,9070
KH_2PO_4	0,775 g	0,3875
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,621 g	0,3105
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sol. 10 g/L)	4 mL	0,0100
Citr. Fe NH_4 (sol. 60 g/L)	2 mL	0,0600
Elementos traços	4 mL	-
NaCl	2 g	1
Xilose	30 g	15

4.3 Determinação do padrão de crescimento em xilose

As duas linhagens *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* EA 87 foram pré cultivadas em LB, lavadas com solução NaCl (0,85% m/v) e cultivadas em MM (ROCHA et al., 2008). A esses meios de cultura foi adicionada xilose (3 g/L). O volume de inóculo foi calculado de forma que todos os cultivos iniciassem o crescimento com DO_{610} (densidade óptica com $\lambda = 610$ nm) igual a 0,1.

Dessa forma, foi construída uma curva de crescimento para cada uma das linhagens retirando 2 mL de cada amostra a cada hora nas primeiras 6 horas e a cada duas horas após esse período até completar 20 horas de amostragem. Para cada amostra foi medida a

densidade celular por espectrofotometria (Varian Cary 50 UV-visible spectrophotometer, Agilent Technology). Após centrifugação (4 °C, 11.000 rpm, 8 min) e obtenção do sobrenadante, este foi congelado para a dosagem de açúcares. Todos esses experimentos foram feitos em triplicata e os açúcares foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram calculados a partir dos valores de Ln da absorbância medidos ao longo do cultivo (DO 610), de acordo com a literatura (PIRT, 1975).

4.4 Engenharia evolutiva para seleção de linhagens mais eficientes

4.4.1 Subcultivos sequenciais em fase exponencial

Nesta metodologia o processo de evolução foi desenvolvido em frascos de 125 ml contendo um volume de 25 ml de MM com xilose numa concentração de 2 g/L. Foram realizados cultivos sequenciais sob agitação de 150 rpm numa temperatura de 30 °C nos quais o tempo de cultivo não excedia 16 horas de incubação para assegurar que o microrganismo estivesse em fase exponencial ao longo do processo. Transcorridas 16 horas ou menos, foram inoculados novos frascos contendo MM estéril. O inóculo foi feito a partir do cultivo anteriormente descrito. Assim foram aplicados cultivos sequencias durante 2 meses. A cada duas semanas foi construída uma curva de crescimento para avaliar e comparar a velocidade específica de crescimento com a linhagem parental. Esta metodologia foi baseada na revisão da literatura (COOPER; LENSKI, 2010; ELENA ;LENSKI, 2003; SAUER, 2001).

4.4.2 Fome e fartura

A linhagem *Burkholderia sacchari* IPT101 foi submetida a cultivos sequenciais em frascos agitados em meio mineral anteriormente referenciado (ROCHA et al., 2008), segundo a metodologia aplicada por Lopes (2011, comunicação pessoal¹). Para isso, 5 ml de cultura previamente crescida em MM (20 horas de incubação) foram inoculados em 50 ml de MM contendo xilose numa concentração de 15 g/L. O meio foi incubado numa temperatura de 30 °C sob agitação de 150 rpm. Uma vez esgotada a fonte de nitrogênio, aproximadamente 48 horas de cultivo, foi tomada uma alíquota desse cultivo e foi inoculado em meio mineral novo sem fonte de carbono. Após essa operação, o cultivo foi mantido sob as mesmas condições até completar 48 horas. Finalizado o ciclo, um novo subcultivo teve início pela inoculação de um volume de 5 mL desta cultura em um novo meio mineral (50 mL) com fonte de carbono, reiniciando-se o seguinte subcultivo e assim sucessivamente. A cada subcultivo, uma amostra da cultura foi preservada em glicerol no freezer -80 °C (500 µL de cultura com 500 µL de glicerol 20%) e uma amostra foi avaliada para verificar se a cultura estava livre de contaminantes (semeadura em meio LB sólido). O experimento foi realizado em triplicata para garantir a continuidade dos subcultivos em caso de contaminação. A partir das amostras

1. Primeiro relatório de Pos-doutorado do Dr. Mateus Schreiner Garcez Lopes, referente ao projeto intitulado **Análise sistêmica e engenharia do metabolismo da xilose em bactérias utilizadas em bioprocessos**. Processo FAPESP 2010/50454-0.

foram obtidas colônias isoladas. Estas colônias isoladas foram preservadas e comparadas com a linhagem parental. Os parâmetros analisados para selecionar as linhagens foram suas velocidades máximas específicas de crescimento.

4.4.3 Limitação por altas concentrações de xilose

Para determinar a concentração inibitória de xilose na linhagem evoluída, esta foi submetida a cultivos em meio mineral nos quais foi avaliado o crescimento a partir de diferentes concentrações de xilose num intervalo de 20 g/L até 100 g/L de xilose. Uma concentração de 70 g/L de xilose foi escolhida para desenvolver cultivos sequenciais em frascos de 125 mL contendo um volume de 25 mL de MM. Foi monitorada a D.O numa longitude de onda de 610 nm. Uma alíquota do meio era inoculada em meio novo quando o cultivo entrava em fase estacionária. O procedimento foi feito durante 1300 horas aproximadamente.

4.4.4 Avaliação das linhagens em frascos sob agitação

Esta avaliação foi feita com as linhagens obtidas nos processos de evolução descritos (*feast and famine* e cultivos sequenciais em fase exponencial). Foram avaliadas as velocidades específicas máximas de crescimento por meio da construção de uma curva de crescimento como descrito no item 4.3.

4.5 Ensaio em Biorreator

Para testar as condições iniciais da linhagem *B. sacchari* LFM 101, foi realizado um ensaio em biorreator de bancada sob a condição de batelada alimentada. O ensaio realizou-se num biorreator *Biostat®* (*BBraun – Biotech International*) com capacidade para 4 L. Para tanto, fez-se um pré-inóculo de *B. sacchari* LFM 101 em meio LB por 24 h. O inóculo foi feito em meio mineral (MM), contendo xilose 4 g/L, incubando-se por 24 h, sob agitação. Um volume correspondente a 10% do volume final foi utilizado para inocular 2 L de MM (ROCHA et al., 2008) no biorreator.

O cultivo foi dividido em duas fases, uma para avaliar o crescimento e outra para avaliar o acúmulo, nessa última etapa, a alimentação de xilose fez-se por bateladas, procurando manter a concentração de xilose em excesso para promover o acúmulo de PHB.

Foram quantificados periodicamente os parâmetros: biomassa, PHB, nitrogênio, carboidratos e ácidos orgânicos, bem como a determinação de O₂ consumido e CO₂ formado.

4.6 Análises de fluxos metabólicos

A análise de fluxos metabólicos foi baseada no procedimento proposto por Stephanopoulos e colaboradores (1988). Dos ensaios realizados no biorreator se obtiveram dados de concentrações de biomassa total, produção de PHB, fonte de carbono consumida, e do teor de O₂ e CO₂ consumido ou produzido respectivamente. Paralelamente, Importaram-se reconstruções do metabolismo de *Burkholderia sacchari* do banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que foram conferidas por meio da análise do genoma sequenciado de *Burkholderia sacchari* LFM 101 (SILVA, 2013 comunicação pessoal²). Com essa informação foi desenhada uma rede metabólica considerando a xilose como substrato e o PHB e a biomassa como produtos.

Os *softwares* Metatool (PFEIFFER et al., 1999) e o Matlab (versão 7.6.0) foram usados para resolver a matriz das equações que compõem a rede metabólica determinado os possíveis modos elementares e combinações de modos elementares representativos do metabolismo bacteriano, naquelas condições experimentais.

Foram calculados os fluxos metabólicos a partir de balanços de massa analisados num estado pseudo-estacionário, durante o qual não existe acúmulo de metabólitos intermediários. A metodologia adotada para o desenvolvimento do software metatool é baseada no conceito de modos elementares de fluxos (TACIRO, 2008).

4.7 Ensaios com xilose marcada ¹³C (UL-xilose ¹³C)

4.7.1 Ensaios preliminares

Inicialmente fez-se um pré-inóculo em meio LB tanto de *B. sacchari* LFM 101 quanto da *B. sacchari* evoluída. O período de incubação foi de 24 horas sob agitação de 150 rpm, numa temperatura de 30 °C. Depois se inocularam 12 frascos erlenmeyer de 125 mL de capacidade, com 25 mL de MM (ROCHA et al., 2008) suplementado com xilose 10 g/L para cada linhagem. As amostragens foram feitas em triplicata nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. Para cada evento de amostragem foram usados 3 frascos erlenmeyer. O volume retirado em cada amostra foi de 10 mL, os quais foram centrifugados, o sobrenadante foi usado para a

2. Sequenciamento do genoma de *Burkholderia sacchari* LFM 101, Luiziana Ferreira da Silva, São Paulo, 2013.

dosagem de xilose por HPLC e o *pellet* para determinação da concentração de biomassa. Também foram medidos o pH e a porcentagem de polímero acumulado.

4.7.2 Ensaio usando proporção xilose: ^{13}C xilose de 80:20

Foi feita uma solução composta de xilose marcada ^{13}C (^{13}C -UL-xylose, Cambridge Isotope Laboratories) e xilose não marcada de grau analítico, numa proporção de 20:80 respectivamente contendo uma concentração de 100 g/L. Essa solução foi utilizada como fonte de carbono em um ensaio com *B. sacchari* LFM 101 e a linhagem evoluída no processo de *feast and famine*. As condições deste ensaio foram as mesmas descritas no item 5.5.1. A análise das amostras obtidas foi feita por meio de CG-MS.

4.8 Metodologias analíticas

4.8.1 Determinação do pH

Do sobrenadante foi obtida uma medição do pH em um potenciômetro (Tecnal – TEC-2), previamente calibrado utilizando soluções padrões de pH 4,01 e 7,00.

4.8.2 Concentração de Biomassa (Massa Seca Celular)

A biomassa foi determinada por gravimetria, 10 mL do cultivo foram centrifugados (10600 x g, 10min, 4°C), o pellet foi resuspenso em água e filtrado em membranas de poro 0,22 µm (Millipore). A membrana e as células foram secas a 105 °C e pesadas. Para determinar a massa seca usou-se a seguinte equação:

$$\text{MSC} = (\text{MMC} - \text{MM} + \text{UM}) \times 1000 / \text{VOL}$$

Em que:

MMC = massa da membrana e células após a secagem (g)

MM = massa da membrana (g)

UM = umidade média do lote de membrana (g)

VOL = volume de suspensão centrifugada (mL)

4.8.3 Determinação de açúcares

A concentração de xilose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Previamente, cada amostra foi diluída para uma concentração entre 0,5 e 2 g/L, filtrada através de membrana de poro 0,45 μm (Millipore) e injetada em cromatógrafo líquido Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H_2SO_4 (5 mM) com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 μL .

4.8.4 Determinação de PHB

A quantidade de poli-3-hidroxibutirato (PHB) foi determinada por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS; MAI, 1988). Foram utilizados de 10 a 15 mg de células liofilizadas e transferidas para tubos de ensaio com tampa, aos quais se adicionaram 2 mL de ácido clorídrico em solução com propanol numa relação de 1:4 v/v, 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 μL de uma solução de ácido benzoico e propanol (40 mg/ mL), a qual foi utilizada como padrão interno. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho com água a 100° C por 3 horas. Finalizado esse tempo, as fases aquosa e orgânica foram separadas adicionando água destilada (4 mL). Posteriormente foi retirada a maior parte da água por meio de uma bomba de vácuo e foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção da água residual. A fase orgânica foi transferida para vials adequados para cromatógrafo e o volume de 1 μL foi analisado após fracionamento da amostra (split 1:20) em cromatógrafo gasoso Agilent 7890A equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95% dimetil-polisiloxane, comprimento 30 cm, diâmetro 32 mm, espessura do filme 0,25 μm). Os propil-ésteres foram detectados por meio de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. Empregou-se um programa de temperatura da coluna para separar os propil-ésteres, que consistiu em 100 °C por 1 minuto, aumentando até 180 °C a uma razão de 8 °C/min e 180 °C por 15 minutos. O gás de arraste empregado foi hélio a uma vazão de 0,8 mL/min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de crescimento em xilose

5.1.1 Avaliação inicial de *Burkholderia sacchari* EA 87

Nos trabalhos desenvolvidos por Lopes (2011, comunicação pessoal¹), *B. sacchari* EA87 atingiu uma velocidade específica máxima de consumo de xilose de $0,32 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. No presente trabalho, foi construída uma curva de crescimento a partir de dados obtidos em cultivos em meio mineral utilizando xilose como fonte de carbono, os cultivos foram feitos em frascos agitados. O objetivo desses ensaios foi reproduzir os resultados obtidos anteriormente com essa linhagem. A figura 4 apresenta os resultados do crescimento de *B. sacchari* EA87 em meio mineral, e a variação do logaritmo natural da D.O₆₁₀ em função do tempo.

Figura 4. Curva de crescimento *B. sacchari* EA 87 em frascos agitados. Densidade celular em função do tempo no comprimento de onda de 610 nm (D.O₆₁₀) (*círculos*). Logaritmo natural da densidade ótica (*quadrados*). A velocidade máxima de crescimento obtida foi de $0,19 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. Experimentos realizados em triplicata.

A velocidade específica máxima de crescimento para a linhagem EA 87 foi menor ($0,19 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) do que a velocidade obtida no trabalho anterior ($0,32 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$). Assim,

embora tenham sido empregadas as mesmas condições usadas por Lopes (comunicação pessoa ¹, 2011) neste experimento não foi possível reproduzir os resultados reportados para esta linhagem.

Em um trabalho publicado por Wright e colaboradores em 2011, os autores desenvolveram um processo de evolução em *Saccharomyces cerevisiae* que visava o aumento da tolerância da linhagem para o ácido acético em cultivos em batelada sequenciais, usando xilose como fonte de carbono. Eles aumentaram a concentração de ácido acético sistematicamente durante 7 meses, e lograram tolerância numa concentração de 5 g/L. Porém, após a preservação em -80 °C da linhagem evoluída e sua posterior reativação em meios de cultivo sem pressão seletiva, foram inoculados meios com concentrações de ácido acético de 5 g/L usando xilose como fonte de carbono e não se detectou consumo de xilose nem crescimento. É pouco provável que a perda da tolerância adquirida fosse devido a uma reversão da mutação, já que foram poucos os cultivos aplicados em meio não seletivo (WRIGHT et al., 2011). Eles atribuíram a perda da resistência à ocorrência de bi ou multiestabilidade genética num determinado fenótipo, na qual uma população pode ter dois fenótipos distinguíveis. (VEENING; SMITS; KUIPERS, 2008). Porém a seleção aplicada nesse experimento resultou em linhagens fortemente induzíveis à resistência ao ácido acético, já que depois de alguns cultivos aumentando a concentração de ácido acético no meio, a resistência foi adquirida novamente.

No caso da linhagem *B. sacchari* EA 87 pode ter acontecido o fenômeno de multiestabilidade genica, tendo como resultado que após a reativação no meio não seletivo o microrganismo não apresentou a capacidade de crescer na velocidade reportada a partir do consumo de xilose. Também foi feita a reativação usando o mesmo meio que foi usado na aplicação da evolução, mas a velocidade máxima específica de crescimento não atingiu o valor previamente reportado.

5.1.2. Avaliação inicial de *Burkholderia sacchari* LFM 101

No intuito de gerar informações de referência, foi feito um cultivo da cepa parental *Burkholderia sacchari* LFM 101 para avaliar a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}). Os resultados da curva de crescimento apresentam-se nas Figuras 5A e B.

1. Primeiro relatório de Pos-doutorado do Dr. Mateus Schreiner Garcez Lopes, referente ao projeto intitulado **Análise sistêmica e engenharia do metabolismo da xilose em bactérias utilizadas em bioprocessos**. Processo FAPESP 2010/50454-0.

Ao analisar a curva de crescimento de *B. sacchari* LFM 101, foi determinado um $\mu_{\max}$ de $0,17 \text{ h}^{-1}$. Comparado com trabalhos anteriores, nos quais também se avaliou o crescimento de *B. sacchari* LFM 101 usando MM (ROCHA et al., 2008) e a mesma fonte de carbono, esta linhagem teve um $\mu_{\max}$ similar com os dados reportados em outros trabalhos (FREIRE, 2012). Este valor de $\mu_{\max}$ ($0,17 \text{ h}^{-1}$) serve como referência, já que um dos objetivos deste trabalho é evoluir linhagens da *B. sacchari* LFM 101 para obter clones com $\mu_{\max}$ maiores, utilizando xilose como fonte de carbono.

Figura 5. Curva de crescimento de *B. sacchari* LFM 101 em frascos agitados. (A) Variação da densidade celular D.O₆₁₀ e (B) Ln de D.O em função do tempo para *B. sacchari* LFM 101 cultivada em meio mineral usando xilose como fonte de carbono. Média de 3 experimentos. A velocidade específica máxima de crescimento obtida para esta linhagem foi de $0,17 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$.

Numa análise econômica da produção de biopolímeros feita por Raicher (2011), foi determinado que o custo do PHB é altamente dependente do investimento, e mais precisamente, do valor investido no processo de produção. Um aumento na produtividade, hoje em $0,28 \text{ g/L.h}$ para $1,11 \text{ g/L.h}$, significa uma redução no custo de produção de aproximadamente 60%. Por isto é importante o aumento da velocidade específica de crescimento, já que pode resultar na diminuição do tempo de duração do processo, e assim, aumentar a produtividade do mesmo (RAICHER, 2011).

5.2 Engenharia evolutiva para seleção de linhagens mais eficientes

A linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 101 foi submetida a cultivos sequenciais nos quais não foi excedido um período 16 horas de incubação com o objetivo de manter essa linhagem em fase exponencial de crescimento ao longo do processo de evolução. Durante 6

semanas foi monitorada a velocidade máxima de crescimento, mas nenhum aumento neste parâmetro foi evidenciado. (dados não mostrados).

Ao desenvolver evoluções em cultivos líquidos em batelada agitado, procura-se a substituição da população parental, como consequência de uma adaptação por seleção. Uma característica importante na seleção em cultivos *Batch* são as condições de estresse que podem estimular a ocorrência de mutações no genoma. Porém nos cultivos mantidos em fase exponencial no presente trabalho, não foram obtidas linhagens com melhores velocidades máximas específicas de crescimento no período avaliado. A aplicação de cultivos sequenciais em fase exponencial não representa nenhuma limitação para o microrganismo, já que durante este período de crescimento todos os nutrientes estão disponíveis e o metabolismo acontece sem alguma restrição que facilite as condições para gerar mutações no genoma.

5.2.1 Fome e fartura

A linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 101 foi submetida a cultivos em batelada sequenciais como descrito no item 5.2.2 em meio mineral anteriormente referenciado (ROCHA et al., 2008). Em cada ciclo de cultivo houve duas etapas de seleção de linhagens: (i) um primeiro momento com excesso de carbono e nitrogênio (período de fartura) no qual durante 48 horas, as bactérias competiram por fonte de carbono para crescer e para acumular PHB. (ii) Após a exaustão do nitrogênio e da fonte de carbono uma alíquota desse cultivo foi inoculada em meio mineral novo, sem nenhuma adição de fonte carbono, mas sim com nitrogênio presente no meio, permitindo a mobilização de PHB para funções celulares e obtenção de energia. Neste período, denominado período de fome, foram selecionados clones que teriam crescido mais rápido por terem acumulado maior quantidade de PHB no primeiro período. Quando a concentração celular começou a cair, as linhagens foram reinoculadas em um novo meio de cultura para começar um novo ciclo de cultivo. Por meio da aplicação do cultivo de alimentação dinâmica (*Fome e fartura*), foi exercida uma pressão seletiva através da variação de condições de excesso de substrato (fartura) e de limitação (fome) que permitiu a seleção de linhagens com maiores velocidades para o metabolismo da xilose fornecida. Na série de cultivos realizados no presente trabalho, foram feitos 11 ciclos. Para verificar se houve aumento na velocidade de crescimento a partir de xilose, foram feitas curvas de crescimento a cada duas semanas. Nestas curvas foram medidas as velocidades específicas máximas de crescimento na fase exponencial. Na Figura 6 e na Figura 7 apresentam-se as

curvas de crescimento para *Burkholderia sacchari* LFM 101 (linhagem parental) e para a linhagem evoluída, construída depois do último ciclo de evolução aplicado.

Figura 6. Estado inicial da velocidade máxima específica de crescimento. Variação da densidade celular D.O₆₁₀ em função do tempo para *B. sacchari* LFM 101 linhagem de referencia. Média de 3 experimentos. (B) Logaritmo natural da densidade ótica, fase exponencial da curva de crescimento de *B. sacchari* LFM 101. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) obtida foi de $0,18 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$. Média de 3 experimentos.

Figura 7. Avaliação da velocidade específica de crescimento da linhagem evoluída. (A) Variação da densidade celular D.O₆₁₀ em função do tempo para *B. sacchari* evoluída com 11 ciclos de alimentação dinâmica. (B) Logaritmo natural da densidade ótica obtida na fase exponencial da curva de crescimento. A velocidade $\mu_{\max}$ obtida foi de $0,23 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$. Média de 3 experimentos.

Em comparação com o estado inicial da linhagem *B. sacchari*, obteve-se um aumento na velocidade específica máxima de crescimento de $0,18 \text{ h}^{-1}$ para $0,23 \text{ h}^{-1}$ depois de 11 ciclos de evolução. Na figura 8 pode se observar o aumento consecutivo na medida em que foram aplicados os ciclos de alimentação dinâmica.

Figura 8. Avaliação da velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{\max}$ da linhagem evoluída. Observa-se o aumento periódico da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) com a aplicação dos cultivos de alimentação dinâmica.

Finalizadas 11 ciclos de fome e fartura obteve-se um aumento de 21 % da velocidade específica máxima de crescimento, ao comparar a linhagem selvagem com a linhagem evoluída, linhagem que foi nomeada como *BSEVII*. No apêndice B podem ser observadas as curvas de crescimentos construídas depois de finalizar os cultivos ciclicos de fome e fartura. Observou-se que a partir da semana 7, a linhagem não apresentou mudança no valor de $\mu_{\max}$ e se manteve estável até finalizado o processo. Assim, a aplicação desta metodologia para a obtenção de linhagens evoluídas foi concluída.

Neste tipo de procedimento, as linhagens foram sometidas a períodos de tempo em fase de cultivo estacionária, na qual vários complexos enzimáticos são ativados. As células entram numa competição para se adaptar e ter uma vantagem de crescimento sobre as células selvagens. (KUYPER et al., 2005). Na fase estacionária ocorrem mutações que permitem a adaptação as condições impostas.

A adaptação às condições de seleção determinadas num processo de engenharia evolutiva, normalmente envolve primeiro um número pequeno de mutações que exercem grandes efeitos positivos, seguido de muitas mutações com efeitos moderados. A razão global da mutagênese numa população se incrementa durante condições ambientais adversas como o estresse metabólico ou a entrada numa fase estacionária. Estes ambientes estimulam a produção de sistemas enzimáticos, estão desenhados para gerar mutações, como são os sistemas enzimáticos SOS de reparação de DNA.(SOYER; O'MALLEY, 2013).

5.2.2 Cultivos sequenciais em fase exponencial

Como anteriormente foi descrito, foram aplicados cultivos sequenciais em fase exponencial durante um período de 967 horas, porém não foi evidenciado nenhum incremento na $\mu_{\max}$ durante a aplicação desta metodologia.

Na literatura tem se reportado evoluções de até 10000 gerações (SAUER, 2001), mas também são reportadas evoluções com menor número de gerações. Um trabalho feito por Wright e colaboradores (2011) cita um processo de evolução que levou 400 gerações para aumentar a tolerância de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* ao ácido acético em um cultivo usando xilose como substrato.

5.2.3 Limitação por altas concentrações de xilose

Para determinar a concentração de inibição em xilose para a linhagem *BSEVII* resultado do processo de *feast and famine*, foi avaliado seu crescimento em meio mineral com diferentes concentrações de xilose figura 9. Foi avaliado o crescimento em meio mineral, usando concentrações de xilose cada vez maiores no intuito de determinar a concentração que inibe, por excesso, o crescimento da linhagem evoluída.

Figura 9. Estimativa da concentração de inibição em xilose para linhagem evoluída *BSEV11*. Cálculo da $\mu_{\max}$ para cada concentração: 20 g/L ($0,18 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 30 g/L ($0,17 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 35 g/L ($0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), 40 g/L ($0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), 45 g/L ($0,18 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 60 g/L ($0,15 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 70 g/L ($0,1 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 80 g/L ($0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), 90 g/L ($0,05 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), 100 g/L ($0,03 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$).

Foi escolhida a concentração 70 g/L de xilose, para exercer uma condição de seleção em cultivos sequenciais em meio mineral. Como se observa na figura 9, o crescimento do microrganismo foi limitado nessa concentração de xilose e sua velocidade específica de crescimento foi de $0,1 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$.

Usando esta concentração foram feitos cultivos sequenciais usando a linhagem evoluída obtida no processo de fome e fartura. O crescimento foi monitorado por meio da densidade ótica. Os cultivos foram mantidos até o crescimento estabilizar. Foi cultivada durante 1400 horas num total de 48 repiques, trabalho que foi realizado durante dois meses.

Na Figura 10 apresentam-se os resultados da última curva de crescimento construída a partir da linhagem evoluída obtida após a aplicação desta metodologia.

Figura 10. Avaliação da velocidade máxima específica de crescimento após 1500 horas de cultivos sobre saturação de xilose(A) Variação da densidade celular $D.O_{610}$ em função do tempo para *BSEVII* evoluída com 1500 horas de cultivo em fase exponencial. (B). Logaritmo natural da densidade ótica obtida na fase exponencial da curva de crescimento. A velocidade μ_{max} obtida foi de $0,24 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$. Média de três experimentos.

Na Figura 11 apresentam-se os resultados das curvas de crescimento feitas a cada duas semanas de cultivos sequenciais. Com a aplicação desta metodologia obteve-se um aumento no valor de μ_{max} de 4%, ou seja, praticamente não foi alterada.

Figura 11. Avaliação do aumento da μ_{max} na aplicação de cultivos sequenciais em fase exponencial. Foi quantificada a velocidade máxima específica de crescimento a cada semana de cultivos sequenciais, o incremento da velocidade máxima específica usando esta técnica foi de 4%.

Como foi comentado anteriormente antes de atingir o pico de uma paisagem adaptativa o microrganismo precisa passar por uma serie de modificações genéticas e assim lograr a adaptação às restrições impostas nos ambientes artificiais. Estas modificações também dependem da capacidade que tem os microrganismos de evolucionar, o que na literatura se define como evo-viabilidade (DRAGHI et al., 2010) (EARL; DEEM, 2004).

5.3 Ensaios em Biorreator

Nos primeiros ensaios com *B.sacchari* LFM 101 em biorreator usando MM (ROCHA et al., 2008) foram obtidas curvas de crescimento com a fase exponencial muito curta, e depois da fase exponencial o microrganismo entrava numa fase de crescimento linear, que se prolongava até o começo da fase estacionária, indicando uma possível limitação de algum nutriente no meio de cultivo utilizado.

Por tal motivo, foram feitos ensaios modificando as concentrações de ferro, magnésio e cálcio no meio, para assim determinar qual desses substratos poderia estar ocasionando uma limitação na fase exponencial de crescimento nos ensaios em biorreator (MENDONÇA et al., 2014).

Foi feito um ensaio em biorreator, usando a nova formulação do meio de cultivo, para avaliar a condição de referência para *Burkholderia sacchari* LFM 101, sendo esse microrganismo a cepa parental.

O ensaio foi feito sobre a condição de batelada alimentada, e sua execução tardo 48 horas. A Figura 12 apresenta os resultados dos parâmetros avaliados no ensaio.

Durante o ensaio foram feitas duas alimentações de xilose, isto com a finalidade de manter a concentração do açúcar em excesso, já que essa é uma condição primordial para o acúmulo de PHB.

Sendo o PHB uma molécula de reserva para o microrganismo, este é produzido quando o mesmo enfrenta uma condição de estresse, o meio de cultivo deve apresentar um fator limitante que pode ser o nitrogênio ou o fósforo. Neste caso foi usada uma limitação em nitrogênio. Na Figura 12, pode se observar que, uma vez esgotada a fonte de nitrogênio no meio (~20 horas), a concentração de PHB começa aumentar. A porcentagem máxima de acúmulo atingida neste ensaio foi de 56% da massa celular na hora 47.

Da Figura 12 pode se concluir que o cultivo teve uma fase Lag (de adaptação) de 6 horas e, logo depois desse período de tempo, o microrganismo começou crescer exponencialmente. A fase exponencial demorou até 16 horas. Em 24 horas de cultivo, o

crescimento da biomassa residual X_r (sem PHB) manteve-se constante até finalizado o ensaio, enquanto massa total (X_t) continuou aumentando, isto pelo fato de que a quantidade de células presente no meio, embora talvez não estivesse em condições de continuar seu crescimento, estavam sob estímulo de continuar acumulando por causa da limitação em nitrogênio e do excesso na fonte de carbono.

Figura 12. Cultivo de *B. sacchari* LFM 101 em biorreator. Variação das concentrações de xilose (g/L), PHB(g/L), Xr (biomassa residual g/L), Xt (biomassa total g/L) e NH₄ (PPM) em função do tempo. Para o ensaio em biorreator usando a linhagem *B. sacchari* LFM 101 cultivada em MM usando xilose como fonte de carbono.

Na Figura 13 observa-se melhor definida a fase exponencial de crescimento. Neste ensaio foi usada a nova formulação do MM como informado no item 5.1.1. Avaliou-se o comportamento da fase exponencial a qual foi mantida durante 20 horas aproximadamente, a fase linear que se apresentava passadas entre 8 a 10 horas de cultivo não foi observada neste ensaio, conferindo assim que a modificação feita teve um efeito direto no crescimento da *Burkholderia sacchari* LFM 101. A velocidade máxima específica de crescimento atingida nesse experimento foi de $0,15 \text{ h}^{-1}$, e foi menor do que o valor que se esperava, porém, as curvas anteriores foram quantificadas usando densidade ótica, enquanto no ensaio em biorreator foi usada a determinação da massa seca por gravimetria.

Figura 13. Crescimento da biomassa no biorreator. Variação da massa seca ($X_r \triangle$ e $X_t \blacktriangle$) e o $\ln X_r$ ($\circ$) em função do tempo, para o ensaio em biorreator usando a linhagem *B. sacchari* LFM 101 cultivada em MM suplementado com xilose.

5.4 Análises de fluxos metabólicos

A análise de fluxos metabólicos foi feita a partir dos resultados obtidos no ensaio em biorreator descrito no item 5.3. O objetivo deste ensaio é obter informações de como estão distribuídos os fluxos, na condição testada, da linhagem *B. sacchari* LFM 101, linhagem parental a partir da qual está sendo desenvolvido o processo de evolução.

Para fazer a análise de fluxos metabólicos é necessário conhecer profundamente as redes metabólicas do microrganismo que vai ser analisado. Neste caso, fez-se uma revisão bibliográfica para determinar as vias metabólicas que usa *B. sacchari* no metabolismo da xilose. O levantamento da informação foi feito a partir de trabalhos realizados no laboratório de bioprodutos do ICB na Universidade de São Paulo (BRÄMER et al., 2001; LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009; LOPES et al., 2009). A Figura 14 ilustra a rede considerada para o metabolismo de xilose. A xilose é metabolizada por um conjunto de vias metabólicas, das quais participam a via das pentoses fosfato, a via Entner Doudoroff (ED), e o ciclo de Krebs (CK). No caso da via glicolítica ou Embden Meyerhof Parnas (EMP), nem todas as reações foram consideradas, já que *B. sacchari*, não possui a enzima fosfofrutoquinase que catalisa a reação que produz frutose-1,6-bifosfato a partir de frutose-1-fosfato, porém as outras reações da EMP também foram avaliadas na análise de fluxos metabólicos, assim como também as reações de gluconeogênese, para assim determinar as vias que foram utilizadas.

Foram definidas todas as reações possíveis e sua respectiva direção. Também, como se pode observar na Figura 14, foram consideradas as reações de oxido-redução NADH/NAD, NADPH/NADP, FAD/FADH; assim como as descarboxilações e a produção ou gasto de ATP/ADP.

Abreviações:

G6P: glicose-6-fosfato
 F6P: frutose-fosfato
 F16P: frutose-1,6-difosfato
 GL6P: glicono-g-lactona-3-fosfato
 PG6: 6-fosfogliconato
 KDPG2: 2-ceto-desoxi-6-fosfogliconato
 G3P: gliceraldeído-3-fosfato
 E4P: eitrese-4-fosfato
 S7P: sedo-7-heptulose
 Rbl5P: ribulose-6-fosfato
 Rb5P: ribose-5-fosfato
 X5P: xilulose-5-fosfato
 DHP: dihidroxiacetona
 BPG13: 1,3-bifosfoglicerato
 PG3: 3-fosfoglicerato
 PG2: 2-fosfoglicerato
 PEP: fosfoenolpiruvato
 PIR: piruvato
 AcCoA: acetil-CoA
 Cit: citrato
 IsoCit: isocitrato
 KG2: α-cetoglutarato
 SucCoA: succinil-CoA
 Suc: succinato
 Fum: fumarato
 OAA: oxalacetato
 NAD: nicotina amida dinucleotido
 ATP: adenosina trifosfato
 3HB: 3-hidroxi-butirato
 XR: biomassa residual
 XT: biomassa total

Figura 14. Representação gráfica do modelo metabólico proposto para *Burkholderia sacchari*.

5.4.1. Estado pseudo-estacionário

A análise de fluxos metabólicos é realizada a partir de dados de estado estacionário, ou seja, numa situação na qual não existe acúmulo de intermediários e é mantida uma proporção entre as velocidades em que acontecem as reações (SCHUSTER; FELL; DANDEKAR, 2000).

Estes estados estacionários podem ser obtidos mediante o uso do quimiostato em

cultivos contínuos. Porém, na ausência desta tecnologia, pode-se buscar estados pseudo-estacionários, nos quais embora existam variações nas concentrações de substratos e produtos, o metabolismo acontece de forma constante, sem acúmulo de intermediários metabólicos. Classicamente, a fase exponencial de crescimento é reconhecida como um período pseudo-estacionário (TRINH; WLASCHIN; SRIENC, 2009; MENDONÇA et al., 2014).

A análise deste estado pseudo-estacionário permite fazer um balanço de massa, com a finalidade de observar se a quantidade de carbono fornecida corresponde à quantidade de carbono medida experimentalmente nos parâmetros de saída do sistema biológico (produção de CO₂, PHB, biomassa).

No ensaio feito no biorreator, foi possível determinar dois estados pseudo-estacionários. O primeiro no intervalo entre 16 e 22 horas de cultivo, e o segundo de 26 a 47 horas (Figura 15).

Figura 15. Estados pseudo-estacionários escolhidos para análise de fluxo. Variação da biomassa total (Xt), biomassa residual (Xr), Xilose e PHB em função do tempo. Apresentam-se dois estados pseudo-estacionários demarcados em laranja e azul.

A Figura 16 apresenta as velocidades específicas de consumo de xilose, produção de PHB e crescimento bacteriano. Como se observa na figura, as velocidades destes parâmetros não mudam no período de tempo analisado, fato que confere o estado pseudo-estacionário.

Figura 16. Análises cinética nos estados pseudo-estacionários.Variação das concentrações de xilose, PHB, e biomassa residual, em g/L, em função do tempo. (A) Estado pseudo estacionário 1: intervalo entre 16 e 21 horas de cultivo. (B) Estado pseudo estacionário 2: intervalo entre 26 e 47 horas de cultivo.

Na Figura 16A, correspondente ao estado pseudo-estacionário 1, pode-se observar um comportamento de crescimento e acúmulo por parte do microrganismo estudado, os dois fenômenos estão acontecendo no mesmo tempo. Na Figura 16B pode-se observar que a velocidade de acúmulo de PHB neste período de tempo foi o dobro, aproximadamente, da velocidade atingida no estado pseudo-estacionário 1.

Depois de definidos os estados pseudo-estacionários, foi feito um balanço de carbono, para conferir que as medições experimentais foram suficientes para determinar o destino do carbono fornecido em forma de xilose (Tabela 3). Levando-se em conta o número de carbonos de cada componente na tabela 3, estimaram-se as velocidades específicas de consumo de substratos e formação de produtos em Cmmol/g.h, permitindo-se estabelecer um balanço de carbonos, ou seja, a parcela dos carbonos consumidos nos substratos, presentes nos produtos detectados.

A concentração de carbono na biomassa residual foi calculada baseando-se em Neidhart e Umbarger (1996) onde a determinação da composição celular foi feita para *Escherichia coli* (50% da biomassa composta por carbono).

Tabela 3. Balanço da porcentagem de carbono de entrada (xilose) com a porcentagem de carbono de saída (Xr, CO₂, PHB) do ensaio em biorreator, estado pseudo-estacionário 1 e estado pseudo-estacionário 2.

	Xilose	Xr	PHB	CO ₂	% Carbono	%PHB
Estado pseudo-estacionário 1 (16 – 22 h)						
MM	150,00	0,50	86,00			
g/L.h	0,96	0,55	0,10			16,22
mmol/L.h	6,41		1,24			
Cmmol/l.H	32,05	23,01	4,97	6,08	106,27	
Estado pseudo-estacionário 2 (26 - 47 h)						
MM	150,0	0,5	86,0			
g/L.h	0,60	0,0005	0,20			99,75
mmol/L.h	4,02		2,34			
Cmmol/l.H	20,12	0,02	9,36	6,07	76,83	

MM. massa molar.

A porcentagem de PHB acumulado para os dois estados pseudo-estacionários foi definida por meio da equação $\% \text{ PHB} = \text{PHB}_{(g/L.h)} / (\text{PHB}_{(g/L.h)} + X_{(g/L.h)})$. Para resolver a matriz de equações estequiométricas (enzimáticas) que permite a determinação dos fluxos da rede metabólica proposta.

Na Tabela 3 observa-se que o balanço atingiu 100%, o que indica que todo o carbono fornecido em forma de xilose, foi quantificado nas medições de biomassa, PHB e CO₂. Isto permite fazer uma análise da distribuição dos fluxos metabólicos no estado pseudo-estacionário 1.

Neste ensaio, o balanço de carbono para o estado pseudo-estacionário 2, definido desde a hora 26 até a hora 47, não atingiu o 100 %. Mas não foi possível identificar nenhum outro composto que estiver sendo produzido. Valores superiores a 100% podem indicar erros de subestimativa nas velocidades de consumo dos substratos e/ou superestimativa nas velocidades de formação dos produtos. Valores inferiores a 100% podem indicar erros de superestimativa das velocidades de consumo dos substratos e/ou subestimativas das velocidades de formação dos produtos. No estado pseudo-estacionário 2 só foi possível quantificar 76% do carbono fornecido inicialmente, provavelmente por desvios nas medições dos parâmetros analisados. Portanto não foi possível fazer a análise de fluxos metabólicos a partir do estado pseudo-estacionário 2.

5.4.2 Resolução da matriz estequiométrica

Para resolver a magnitude do vetor de cada um dos fluxos representados como equações enzimáticas, é necessário o uso de modelos matemáticos que tenham capacidade de relacionar múltiplas equações com múltiplas variáveis. Neste ensaio usou-se o programa METATOOL (PFEIFFER et. al., 1999), as bases teóricas para o uso do programa estão definidas no Anexo A.

O programa resolve a matriz como um problema de otimização, no qual a função objetivo serve como restrição para gerar combinações de vetores que satisfazem a restrição definida, usando as enzimas propostas na rede metabólica. O número mínimo de enzimas que suportam um estado estacionário de uma rede metabólica com suas reações irreversíveis definidas na direção correta, foi definido como modo elementar (TRINH; WLASCHIN; SRIENC, 2009).

Tabela 4. Equações gerais dos modos elementares obtidos por meio do METATOOL.

M.E	Xilose externa		ADP		Oxigênio		ATP		CO ₂		biomassa total
1	3058,55	+	53944,8	+	19818,4	=	53944,8	+	10137,2	+	1
2	1718,09	+	16572,1	+	6413,76	=	16572,1	+	3434,93	+	1
3	1840,91	+	20256,9	+	7642,04	=	20256,9	+	4049,07	+	1
4	1320,91	+	4656,83	+	2442,01	=	4656,83	+	1449,06	+	1
5	1480,13	+	9433,5	+	4034,23	=	9433,5	+	2245,17	+	1
6	1181,9	+	2452,7	+	1051,9	=	2452,7	+	754	+	1
7	1398,98	+	4710,94	+	3222,7	=	4710,94	+	1839,4	+	1
8	1323,2	+	2210,2	+	2464,9	=	2210,2	+	1460,5	+	1
9	1313	+	2529,1	+	2362,9	=	2529,1	+	1409,5	+	1
10	1398,98	+	4780,84	+	3222,7	=	4780,84	+	1839,4	+	1
11	1297,43	+	1937,44	+	2207,2	=	1937,44	+	1331,65	+	1
12	1398,98	+	4936,54	+	3222,7	=	4936,54	+	1839,4	+	1
13	1252,55	+	232	+	1758,4	=	232	+	1107,25	+	1
14	1225,6	+	81,9	+	1488,9	=	81,9	+	972,5	+	1
15	1205,45	+	1086,8	+	1287,4	=	1086,8	+	871,75	+	1
16	1220,41	+	219,12	+	1437	=	219,12	+	946,55	+	1
17	1368,9	+	4094,3	+	2921,9	=	4094,3	+	1689	+	1
18	1389,66	+	4519,88	+	3129,5	=	4519,88	+	1792,8	+	1
19	1412,96	+	5125,68	+	3362,5	=	5125,68	+	1909,3	+	1

M.E: Modo elementar

As equações de entrada para o programa estão definidas no Apêndice A. Neste ensaio foram obtidos 19 modos elementares no estado pseudo-estacionário 1. As fórmulas gerais de

cada modo elementar estão apresentadas na Tabela 4, na qual pode ser observar as reações estequiométricas gerais que o programa Metatool fornece como resposta da matriz de equações. O programa também fornece a magnitude e direção dos vetores ou enzimas propostas na rede metabólica, eles são apresentados no Apêndice A.

As unidades dos valores que estão apresentados na Tabela 4 são milimol/L.h. Cada fórmula está baseada na produção de um milimol/L.h. de biomassa.

A partir destes resultados foram achados os diferentes fatores de conversão nos modos elementares para depois compará-los com os fatores de conversão experimentais e, dessa forma, saber qual dos modos elementares suporta ou representa o estado pseudo-estacionário analisado. Na tabela 4 está em destaque o modo elementar número 13, que foi o que mais se assemelhava ao comparar seus fatores de conversão com os que foram obtidos no experimento.

5.4.3 Distribuição dos fluxos metabólicos

Na Figura 17 apresenta-se a distribuição dos fluxos metabólicos de *B. sacchari* LFM 101 para o estado pseudo-estacionário 1, a magnitude dos vetores de cada uma das reações da matriz, fornecidos pelo programa Metatool foram ajustados dividindo cada valor pela magnitude do vetor na reação XIL1 ($\text{XILext} + \text{ATP} = \text{XIL} + \text{ADP}$), a qual representa a entrada de xilose na rede. Assim, todos os valores para cada reação estão apresentados em função da xilose que entra. Os números representam fluxos expressos em milimol/L.h. Na Figura 17 observa-se a distribuição dos fluxos para o metabolismo proposto. O modo elementar que mais se assemelha aos dados experimentais (modo elementar 13, ver Tabela 4) do estado pseudo estacionário 1, possui um fluxo cíclico entre as vias Entner Doudoroff (ED) e Embden Meyerhof Parnas (EMP). As setas azuis circulares indicam esse fluxo cíclico, no qual também participa a enzima da gliconeogênese, *frutose-1,6-bisfosfatase* que catalisa a reação de frutose-1,6-bisfosfato (F16P) para frutose-6-fosfato (F6P). Também não há reingresso da glicose-6-fosfato na VP e apenas há um fluxo cíclico mais intenso na ED.

O fluxo no ciclo de Krebs, que na figura aparece realçado em um círculo laranja, é baixo perto de 0,1 mmol/L.h. Assim, provavelmente, essa via metabólica só funciona para fornecer a demanda de alguns precursores no metabolismo, como o NADPH e o Oxalacetato.

Figura 17. Distribuição dos fluxos metabólicos para *Burkholderia sacchari* LFM 101. A distribuição foi feita segundo o modo elementar 13 na solução fornecida pelo software METATOOL.

O fator de conversão de xilose em PHB, $Y_{\text{PHB/xilose}}$ em milimol por milimol, no estado pseudo-estacionário analisado, foi de 0,18; o máximo valor teórico do fator de conversão de xilose em PHB foi de 0,19, e foi calculado a partir dos modos elementares. Este desempenho corresponde a quase 95% do maior valor observado para o teor de P3HB acumulado durante este pseudo-estacionário.

A partir dos modos elementares obtidos, gerou-se uma matriz com as equações gerais de cada modo elementar, e utilizando a função `fmincon` presente no programa Matlab (versão 7.6.0), foi feita uma otimização para estimar o vetor que, multiplicado por um modo elementar ou um conjunto de modos elementares, leva à obtenção de uma equação estequiométrica com resultados mais próximos dos dados experimentais. A matriz inicialmente gerada foi reduzida, e uma combinação de 11 modos elementares foi escolhida por apresentar uma diferença mínima frente aos dados experimentais. Foi determinado o aporte de cada modo elementar na distribuição dos fluxos composta pelos 11 modos elementares.

A distribuição dos fluxos resultado da otimização está representada na figura 18, e nela se observa o metabolismo *B. sacchari* LFM 101 ao combinar 11 modos elementares, tendo como referencia o estado pseudo estacionário 1.

Nesta combinação de 11 modos elementares também apresenta um metabolismo cíclico na via ED, mas a magnitude do fluxo que volta pela *frutose-1,6-bisfosfatase* é menor comparado com o fluxo na mesma enzima do modo elementar 13 apresentado anteriormente. No modo elementar número 13 analisado anteriormente, não se apresentava nenhum fluxo de *Glicose-6-fosfato* entrando na via das pentosas. Porém ao ser levados em conta mais de um modo elementar, a predição do metabolismo teve um fluxo entrando na via das pentoses através da *Glicose-6-fosfato-desidrogenase*, e a *frutose-6-fosfato* e o *gliceraldeído-6-fosfato* que são produzidos nessa via, entram na via EMP, que nesta análise apresenta um fluxo baixo nas enzimas subsequentes à *gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase*, fluxo que não foi evidente na análise de um único modo elementar.

Como ocorre no modo elementar 13, na combinação dos modos elementares, o fluxo que passa no ciclo de Krebs é mínimo, permitindo fornecer alguns precursores de biomassa.

Figura 18. Otimização da distribuição dos fluxos metabolicos usando o software Matlab.

5.4.4 Ensaio em biorreator com a linhagem Evoluída

No intuito de obter informações mais precisas da linhagem resultado da aplicação do processo de engenharia evolutiva, foi desenvolvido um ensaio em biorreator uma vez terminado o processo de evolução.

A aplicação destes ensaios em biorreator permite ter mais controle sobre os parâmetros analisados. Tanto no ensaio em biorreator com a linhagem parental (*Burkholderia sacchari* LFM 101) quanto o ensaio usando a linhagem evoluída (BSEV 11), os parâmetros de acompanhamento foram os mesmos e foi possível fazer uma comparação das duas linhagens. Na figura 19 apresentam-se plotados os dados dos parâmetros analisados nos dois ensaios. Como se observa na figura 19, as duas linhagens tem comportamentos de crescimento semelhantes, mas tiveram algumas diferenças que sugerem mudanças no metabolismo.

Uma das diferenças encontradas foi na velocidade máxima específica de crescimento. A $\mu_{\max}$ da linhagem parental no ensaio em biorreator foi de $0,15 \text{ h}^{-1}$, este crescimento exponencial foi evidenciado num período de tempo de 10 horas, começando desde a hora 6 até a hora 16 do cultivo no biorreator. Na linhagem BSEV11 a $\mu_{\max}$ atingiu um valor de $0,22 \text{ h}^{-1}$, com um período de crescimento em fase exponencial de 12 horas. Ao comparar as velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios desenvolvidos em frascos agitados com as obtidas nos ensaios em biorreator observou-se que para *B. sacchari* LFM 101 o valor obtido neste parâmetro foi de $0,17 \text{ h}^{-1} \pm 0,018$ enquanto que para a linhagem BSEV11 a $\mu_{\max}$ obtida foi de $0,24 \pm 0,02$. O crescimento dos ensaios em frascos agitados foi quantificado por meio de espectrofotometria numa longitude de onda de 610 nm, já nos ensaios em biorreator o crescimento foi medido por gravimetria e massa seca, porém, mesmo usadas diferentes técnicas para a medição do crescimento é evidente o aumento da $\mu_{\max}$ na linhagem evoluída.

Também se observa na figura 20 que no ensaio feito com a linhagem evoluída a quantidade de NaOH usada foi maior. No ensaio usando a linhagem parental a quantidade NaOH utilizada foi para manter o pH do meio de cultivo, foi de 59 mL. No ensaio com BSEV11 esta quantidade aumentou para 69 mL. Foi analisado o sobrenadante das amostras para conferir se tinha algum outro composto que contribuísse na acidificação do meio, mas não foi observado nenhum pico nos cromatogramas das amostras analisados.

Figura 19. Ensaios em biorreator com as linhagens *B. sacchari* LFM 101 (Linhagem parental) e BSEV11 (linhagem máxima). Observa-se o $\ln X_{total}$, o acúmulo de PHB (g/L) e o uso de NaOH (mL), nos ensaios feitos em biorreator com as duas linhagens parental e evoluída.

Figura 20. Avaliação do consumo de xilose e a adição de NaOH durante os ensaios em biorreator com as linhagens *B. sacchari* LFM 101 (Linhagem parental) e BSEV11(linhagem evoluída).

Observou-se também nos ensaios em biorreator que a porcentagem de acúmulo da linhagem evoluída BSEV11 foi ligeiramente superior a da linhagem parental. A linhagem evoluída atingiu uma porcentagem de 62 % de acúmulo de PHB em massa seca enquanto que a linhagem parental a maior porcentagem de acúmulo de PHB obtida foi de 52%. Este aumento na capacidade de acúmulo da linhagem evoluída pode ser por causa da seleção no processo de *feast and famine*, no qual foram desenvolvidos cultivos sequenciais com fases que estimulavam o acúmulo, e fases nas quais a fonte de carbono não estava presente, forçando ao microrganismo usar o polímero como sustento, permitindo a seleção de células com maior capacidade de acúmulo.

Com relação ao consumo de xilose, também pode se observar uma alteração na velocidade específica de consumo ($\mu S_{\max}$) da linhagem evoluída BSEV11 com respeito à linhagem parental. A cepa BSEV11 apresentou uma $\mu S_{\max}$ de 0,4 g/g.h valor que representa este parâmetro foi calculado na fase exponencial de crescimento no ensaio feito em biorreator figura 19. A linhagem parental apresentou uma $\mu S_{\max}$ de 0,34 g/g.h. A aplicação de técnicas de engenharia evolutiva teve um efeito no consumo de xilose, a velocidade máxima específica de consumo de xilose aumento num 15 % com a aplicação das diferentes metodologias de engenharia evolutiva.

5.4.5 Análise de fluxo da linhagem evoluída

No intuito de analisar se teve ou não mudanças no metabolismo da xilose na linhagem evoluída, foi desenvolvida uma análise de fluxo metabólico a partir dos dados obtidos do ensaio em biorreator. Assim como na análise feita com a linhagem parental, foi escolhido um estado pseudo-estacionário do ensaio desenvolvido com a linhagem BSEV11, estado no qual não há acúmulo de intermediários e as velocidades mantiveram-se estáveis. Na figura 21 pode se observar o intervalo de tempo que foi escolhido como estado pseudo-estacionário. Desde a hora 12 até a hora de 21 do cultivo as velocidades de consumo de xilose, de formação de biomassa e de PHB ao igual que a velocidade de formação de CO_2 permaneceram constantes.

Figura 21. Estado pseudo estacionário escolhido para a análise de fluxo metabólico da linhagem BSEV11. Observa-se entre as linhas laranjas o intervalo de tempo escolhido (4h-12h).

Considerando o valor médio da quantidade de biomassa residual nesse período, é possível calcular as velocidades específicas (g/g.h), que podem ser convertidas a velocidades específicas molares (mmol/g.h), utilizando a massa molar de cada um dos componentes consumidos ou produzidos assim, estimaram-se as velocidades específicas de consumo de substratos e formação de produtos em Cmmol/g.h, permitindo-se estabelecer um balanço de carbonos, ou seja, a parcela dos carbonos consumidos nos substratos, presentes nos produtos detectados.

Tabela 5. Balanço de carbonos do estado pseudo-estacionário linhagem BSEV11. Balanço da porcentagem de carbono de entrada (xilose) com a porcentagem de carbono de saída (Xr, CO₂, PHB)

	Xilose	Xr	PHB	CO ₂	% Carbono	%PHB
Estado pseudo estacionário (16 – 22 h)						
MM	150,00	0,50	86,00			
g/L.h	0,64	0,32	0,1			23,8
mmol/L.h	4,26		1,16			
Cmmol/l.H	21,33	13,33	4,65	4,49	105,35	

Utilizando o arquivo de entrada mostrado no apêndice A, simularam-se no Metatool os possíveis caminhos metabólicos. O programa gerou 20 modos elementares a partir dos quais foi gerada uma matriz e, utilizando a função `fmincon` presente no programa Matlab (versão 7.6.0), estimou-se o vetor que multiplicado por esta levaria à obtenção de resultados mais próximos dos dados experimentais. A matriz inicialmente gerada foi reduzida a 8 modos elementares, uma vez que verificou-se ser possível atingir resultados com o mesmo resíduo. Estes modos elementares foram utilizados para representar a distribuição de fluxos nos experimentos com a linhagem evoluída. A figura 22 apresenta a distribuição dos fluxos que melhor representa aos dados, já que ao combinar 8 modos elementares obteve-se uma solução mais parecida com os dados experimentais, fato que não é possível atingir ao confrontar os modos elementares por separado.

Ao comparar as distribuições dos fluxos resultado das análises feitas com as linhagens parental e evoluída, observa-se que o metabolismo nas duas linhagens é similar. As duas simulações apresentam um fluxo cíclico na ED. Esse fluxo cíclico da linhagem evoluída é ligeiramente maior (1,30) que na linhagem parental (1,26) provavelmente devido à necessidade, no primeiro caso, de suprir uma demanda de NADPH por conta do maior fluxo metabólico na produção de PHB da linhagem evoluída.

Observa-se também que as duas simulações exibem um fluxo entrando na VP, via metabólica que também tem um aporte importante nas duas linhagens, já que nesta via são produzidos o *gliceraldeído-3-fosfato* e a *frutose-6-fosfato* que também contribuem no fluxo metabólico da ED.

O Ciclo de Krebs é usado nas duas linhagens, porém, como já foi discutido, o fluxo só fornece alguns precursores da biomassa.

Figura 22. Distribuição dos fluxos metabólicos da linhagem BSEV11. Esta distribuição foi obtida pela combinação de 8 modos elementares.

5.5 Ensaios com xilose marcada ^{13}C (UL-xilose ^{13}C)

O uso de carbono marcado é uma ferramenta importante para caracterizar o metabolismo celular. Neste caso será de grande ajuda para determinar a distribuição dos fluxos metabólicos na linhagem selvagem, para depois definir se haverá modificação destes fluxos nas linhagens evoluídas.

Foram feitos cultivos preliminares de *B. sacchari* LFM 101 para dimensionar o ensaio com carbono marcado avaliando três condições de acúmulo, sob limitação de nitrogênio: **A.** 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **B.** 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **C.** 1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na Figura 23 apresenta-se o comportamento da linhagem *B. sacchari* LFM 101 nestes ensaios.

A condição que melhor crescimento e acúmulo apresentou foi a B, na qual foi obtido um acúmulo máximo de 62 % de PHB em massa seca, quando o cultivo completou 48 horas. Não foi observada uma grande diferença no acúmulo de PHB nas condições nas 3 condições, porém a densidade ótica nas condições A e C foi menor. Provavelmente na condição A não teve nitrogênio suficiente para o crescimento celular, e na condição C o crescimento foi afetado pelo baixo pH que o cultivo atingiu nas últimas horas. Tabela 6 são apresentados estes resultados.

Figura 23. Ensaios preliminares para o desenho do experimento usando xilose marcada. Variação da % de acúmulo (preto), D.O.610 (verde) e pH (vermelho) no tempo. Avaliação de três condições de acúmulo. (A) 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (B) 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (C) 1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tabela 6. Comparação de três condições de acúmulo de PHB a partir de xilose. Variação da concentração de nitrogênio no meio.

Tempo	0,5 g/L (NH ₄)			1 g/L (NH ₄)			1,5 g/L (NH ₄)		
	D.O	% de PHB	pH	D.O	% de PHB	pH	D.O	% de PHB	pH
0	0,08 ± 0,03	0	7 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0	7 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0 ± 0	7 ± 0,03
24	11,08 ± 0,06	7,14 ± 3,0	6,93 ± 0,01	9,89 ± 0,03	36,41 ± 3,02	6,3 ± 0,01	10 ± 0,04	30,3 ± 1,4	5,6 ± 0,01
48	11,62 ± 0,39	61,74 ± 1,5	6,82 ± 0,03	11,92 ± 0,07	62,88 ± 1,5	5,7 ± 0,03	12,6 ± 0,04	59,3 ± 1,1	5,2 ± 0,03
72	14,8 ± 0,01	57,75 ± 1,3	6,75 ± 0,01	16,87 ± 0,03	58,84 ± 1,8	5,8 ± 0,04	13,3 ± 0,14	55,8 ± 2,6	5 ± 0,05

Segundo os autores Ryu e colaboradores (1997), Taciro (2008) e Wendlandt e colaboradores (2001), usando como fator limitante o fósforo é gerada uma condição mais adequada para o acúmulo do polímero, porém experimentos realizados por Parrine em 2013 mostraram que para *B. sacchari*, a restrição em nitrogênio favorece ainda mais a produção de PHB (PARRINE, 2013).

No experimento com carbono marcado, uma mistura de 20:80 de xilose marcada com ¹³C em todos os carbonos e não-marcada foi utilizada como fonte de carbono. Tanto para a linhagem parental *B. sacchari* LFM 101 quanto para a linhagem evoluída foi feito um cultivo de 48 horas em MM utilizando a mistura de xilose, anteriormente descrita, como fonte de carbono. O ensaio foi desenhado em triplicatas biológicas, das quais para cada réplica foi feita uma análise em duplicata por Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa (CG-MS)

Tabela 7. Resultados de experimento utilizando xilose marcada com ¹³C e não marcada (20:80).

	<i>B. sacchari</i> LFM 101	Linhagem Evoluída
pH	6,41±0,02	6,07±0,01
D.O	15,95±0,09	16,12±0,26
PHB (%)	61,96±2,23	65,75±1,80

Notas: D.O densidade celular medida em 610 nm, % PHB em massa seca.

A linhagem evoluída atingiu um acúmulo 6% maior que *B. sacchari* LFM 101, provavelmente devido ao fato de que o processo de evolução também selecionou linhagens com maior capacidade de acúmulo, dado que na segunda fase da metodologia de *feast and famine* podem ser selecionadas as células que acumularam mais polímero a partir da xilose fornecida. As densidades óticas observadas não foram diferentes, mas o pH foi ligeiramente mais ácido no cultivo usando a linhagem evoluída.

A mistura de carbonos marcados e não marcados em substratos utilizados para o rastreamento de carbonos, possibilita a identificação das vias metabólicas utilizadas para a síntese do PHB em algumas condições, também define como as parcelas de carbono são desviadas para vias metabólicas através da análise de isotopômeros e suas distribuições. A quebra do propil-éster (3HB) pela análise de CG-MS forma fragmentos característicos 87, 89 e 131 m/z (massa/intensidade relativa) (figura 21).

Fonte: Kawai, 2013 – modificada.

Figura 24. Fragmentos m/z: 87, 89 e 131 resultantes da quebra do propil-éster do monômero 3HB.

Estes fragmentos apresentam isotopômeros de massa e posição, sendo os primeiros chamados de M+1, M+2 e M+3 e M+4 (o último, somente no caso do fragmento 87). Os fragmentos 87 e 89 apresentam em seus espectros, picos que sofrem interferência, já que os isotopômeros M+2 e M+3 do fragmento 87 aparecem no mesmo tempo de retenção que os isotopômeros M, M+1 do fragmento 89 (figura 25). Isto dificulta a análise da distribuição destes fragmentos, já que eles não podem ser definidos. Para solucionar este problema, considerou-se a contribuição de cada isotopômero para o pico formado (a partir de uma análise de CG-MS feita anteriormente de cada pico separadamente) e estabeleceu-se uma relação. Desta forma, foi possível separar a distribuição dos isotopômeros dos dois fragmentos, 87 e 89.

Figura 25. Cromatograma de CG-MS da amostra BSEV (linhagem *BSEVII*). Análise dos propil-ésteres produzidos por *B. sacchari*. Setas indicam os fragmentos m/z: 87, 89 (em cinza) e 131. TR: tempo de retenção.

A primeira informação importante para esta análise é saber como é metabolizada a xilose. Uma vez dentro da célula ocorre sua conversão em xilulose, pela ação da xilose isomerase, que é então fosforilada pela ação da xiluloquinase formando uma xilulose-5-fosfato (SONG E PARK, 1998). A partir deste último precursor o metabolismo é feito na via das pentoses fosfato na qual são produzidos a frutose-6-fosfato e o gliceraldeído -3-fosfato, que poderiam continuar sendo metabolizados através das vias Entner-Doudoroff (ED) e Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

Figura 26. Marcação de moléculas de acetil-coA usando a via das pentoses. Padrões de embaralhamento de carbonos da molécula de acetil-CoA. Originada a partir de pentoses contendo

carbonos marcados (preto) e não marcados (vermelho) fornecidos pela mistura de xilose marcada e não marcada com ^{13}C . Via das pentoses fosfato.

Figura 27. Marcação de moléculas de acetil-coA usando a vias Entner-Doudoroff (ED) e Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Padrões de embaralhamentos de carbonos da molécula de acetil-CoA originada a partir de pentoses contendo carbonos marcados (preto) e não marcados (vermelho) fornecidos pela mistura de xilose marcada e não marcada com ^{13}C .

Considerando o metabolismo da xilose (marcada e não marcada) na via das pentoses, seriam gerados 2 mols de frutose-6-fosfato e 1 mol de gliceraldeído -3-fosfato para cada 3 mols de xilose metabolizada. O metabolismo do gliceraldeído -3-fosfato levaria à formação de acetil-CoA com carbonos embaralhados provenientes de diferentes moléculas de xilose (Figura 27). A via ED ou EMP não promovem o embaralhamento de carbonos do acetil-CoA.

Tampouco a via das pentoses isoladamente. Entretanto, caso a frutose-6-fosfato resultante do metabolismo de xilose pela via das pentoses seja metabolizada na via ED, o acetil-CoA formado poderá conter carbonos originados de diferentes moléculas de xilose.

A questão, portanto, é estimar quais são as frequências com que devem ocorrer as diferentes moléculas de acetil-CoA considerando este metabolismo, e posteriormente avaliar as frequências com que ocorreriam os diferentes isotopômeros gerados na análise das amostras. A Tabela 8 apresenta a distribuição teórica de carbonos marcados e não marcados das diferentes moléculas de acetil-CoA tomando como o metabolismo descrito e considerando a mistura de xilose marcada e não marcada na proporção 20:80.

Tabela 8. Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isótopos de acetil-CoA considerando o metabolismo de xilose marcada (20 %) e não marcada (80 %) pela via das pentoses e ED (ver a situação particular considerada no texto).

Frequência de diferentes moléculas de acetil-CoA			
OO	OX	XO	XX
$((0,8 \times 3/5) + (0,8 \times 0,8 \times 2/5))$	$(0,8 \times 0,2 \times 2/5)$	$(0,2 \times 0,8 \times 2/5)$	$((0,2 \times 3/5) + (0,2 \times 0,2 \times 2/5))$
O – carbono não marcado X – carbono marcado			

Considerando as frequências de ocorrências dos diferentes isótopos de acetil-CoA (Tabela 8) é possível calcular as frequências com que ocorreriam os diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 131$, $m/z = 89$ ou $m/z = 87$. As Tabelas 9 e 10 apresentam os cálculos dessas frequências.

Tabela 9. Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 131$ e $m/z = 89$ considerando o metabolismo de xilose marcada (20%) e não marcada (80%) pela via das pentoses e ED.

Fragmento	Acetil-CoA 1					Acetil-CoA 2					Frequência Isotopômero		
$m/z = 131$ e 89	OO	OX	XO	XX	Frequência (A)	OO	OX	XO	XX	Frequência (B)	(A x B)	M + (1, 2 ou 3)	
OOO	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,588	0,588	M
XOO	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,051		
OXO	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,051	0,249	M+1
OOX	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,147		
XXO	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,108		
OXX	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,012	0,134	M+2
XOX	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,012		
XXX	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,027	0,027	M+3

1 – Acetil-CoA que contribui com dois carbonos para os fragmentos de propil-éster $m/z = 131$ e 89 .

2 – Acetil-CoA que contribui com apenas um carbono para os fragmentos de propil-éster $m/z = 131$ e 89 .

O – carbono não marcado X – carbono marcado.

Tabela 10. Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 87$ considerando o metabolismo de xilose marcada (20%) e não marcada (80%) pela via das pentoses e ED.

Fragmento $m/z = 87$	Acetil-CoA 1				Frequência (A)	Acetil-CoA 2				Frequência (B)	Frequência Isotopômero		
	OO	OX	XO	XX		OO	OX	XO	XX		(A x B)	M + (1, 2, 3 ou 4)	
OOOO	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,542	0,542	M
XOOO	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,047		
OXOO	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,047		
OOXO	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,047	0,188	M+1
OOOX	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,047		
XOOX	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,004		
OXOX	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,004	0,2082	M+2
OOXX	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,1001		
XXOO	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,1001		
OXXO	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,004		
XOXO	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,004		
XXOX	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,009	0,04	M+3
OXXX	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,009		
XOXX	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,009		
XXXO	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,009		
XXXX	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,018	0,018	M+4

Acetil-CoA 1 contribui com dois carbonos para os fragmentos de propil-éster $m/z = 87$.

Acetil-CoA 2 contribui com apenas dois carbonos para os fragmentos de propil-éster $m/z = 87$.

O – carbono não marcado X – carbono marcado.

Tabela 11. Cálculo da frequência de distribuição dos diferentes isotopômeros dos fragmentos $m/z = 87, 89$ e 131 experimental comparada à estimada para o fluxo via VP e ED para as linhagens *B. sacchari* e *BSEVII*.

<i>B. sacchari</i>					
Fragmentos	M	M+1	M+2	M+3	M+4
87	0,42±0,01	0,18±0,00	0,27±0,00	0,087±0,00	0,04±0,00
87 estimado	0,39	0,13	0,32	0,1	0,05
89	0,67±0,01	0,20±0,01	0,10±0,01	0,02±0,01	-
89 estimado	0,67	0,2	0,11	0,02	-
131	0,6±0,02	0,25±0,02	0,11±0,01	0,025±0,01	-
131 estimado	0,59	0,25	0,13	0,027	-
<i>BSEVII</i>					
Fragmentos	M	M+1	M+2	M+3	M+4
87	0,44±0,01	0,17±0,01	0,27±0,01	0,08±0,01	0,04±0,01
87 estimado	0,39	0,13	0,32	0,1	0,05
89	0,68±0,01	0,21±0,01	0,09±0,01	0,01±0,01	-
89 estimado	0,67	0,2	0,11	0,02	-
131	0,61±0,02	0,25±0,03	0,11±0,02	0,021±0,01	-
131 estimado	0,59	0,25	0,13	0,027	-

A partir da comparação dos valores estimados da distribuição dos isotopômeros, numa situação de embaralhamento de carbonos, com os valores de distribuição obtidos experimentalmente para *B. sacchari* e *BSEVII*, pode-se concluir que o metabolismo utilizado pelas duas linhagens é composto pelas vias VP e ED, já que os valores de distribuição estimados e experimentais são muito similares (Tabela 10).

A frequência com que devemos encontrar lado a lado nas moléculas de 3HB quatro carbonos não marcados é de $0,8 \times 0,8 = 0,64$ e de encontrar lado a lado nas moléculas de 3HB quatro carbonos marcados é de $0,2 \times 0,2 = 0,04$. Assim, também pode ser calculada a frequência com que deverão ser encontrados lado a lado nas moléculas de 3HB quatro carbonos, sendo dois marcados e dois não marcados, ou vice-versa, $0,2 \times 0,8 = 0,16$. Assim, caso as vias metabólicas que não promovem o embaralhamento de carbonos estejam sendo utilizadas, os isotopômeros M, M+1, M+2 e M+3 correspondentes ao fragmento $m/z = 131$ (ou $m/z = 89$) deverão ser observados com frequências de 0,64; 0,16; 0,16 e 0,04; respectivamente. As frequências que foram obtidas experimentalmente são muito diferentes das frequências que suportam um metabolismo sem embaralhamento dos carbonos, portanto,

pode-se concluir que a via EMP não foi utilizada nesta rede metabólica, já que houve embaralhamento de carbonos e no caso da combinação das vias VP e EMP, o acetil-CoA formado não deve apresentar embaralhamento.

Este ensaio permitiu rastrear os carbonos dos acetil-CoA que participam na produção dos monômeros de PHB e foi determinado que houve embaralhamento de carbonos, assim como também permitiu conferir os resultados obtidos na análise de fluxo metabólico, nos quais foi determinado que a via principal que participa no metabolismo da xilose em *B. sacchari* LFM 101 é a via Entner–Doudoroff.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de técnicas de engenharia evolutiva em *B. sacchari* LFM 101 teve como resultado a obtenção de uma linhagem evoluída com valores de $\mu_{\max}$ maiores, este aumento pode não ser suficiente para permitir a produção competitiva do PHB, porém é uma aproximação, já que o aumento da $\mu_{\max}$ pode resultar na diminuição do tempo de duração do processo, e assim, aumentar a produtividade do mesmo.

A aplicação de técnicas como a análise de fluxo metabólico permite o estudo do metabolismo de um microrganismo, para determinar quais são os pontos chave a serem abordados para tentar melhorar os resultados de produção, esse tipo de análise somado ao rastreamento de carbonos fornecem informações mais completas acerca de como esta acontecendo o metabolismo na célula.

Na análise de fluxo metabólico feita em *B. sacchari* LFM 101 foi determinado que o metabolismo da xilose acontece em sua maioria pela via ED, a qual funciona de forma cíclica. Também foi possível definir a distribuição dos fluxos metabólicos calculando o valor do fluxo para cada reação.

Ao comparar os fatores de conversão experimentais com os fatores de conversão máximos teóricos, fornecidos pela análise de modos elementares, foi observado que a conversão de xilose em PHB ocorreu na maior taxa possível, Ou seja, nessa faixa de tempo, a produção de PHB a partir de xilose atingiu uma proporção máxima teórica possível.

Neste trabalho a aplicação de cultivos com xilose marcada ^{13}C teve uma repercussão importante já que por meio da análise dos isotopómeros dos fragmentos do PHB foi possível concluir que efetivamente o metabolismo da xilose acontece pela via ED e não pela via EMP. Assim por meio do rastreamento dos carbonos marcados, confirmaram-se os resultados obtidos na análise de fluxo metabólico.

REFERENCIAS *

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 732-743, 2010. ISSN 1097-4660.

ALBUQUERQUE, M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 411-421, 2007. ISSN 0168-1656.

ALBUQUERQUE, M.; TORRES, C.; REIS, M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production by a Mixed Microbial Culture Using Sugar Molasses: Effect Of The Influent Substrate Concentration on Culture Selection. **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3419-3433, 2010. ISSN 0043-1354.

ARBER, W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and its Role in Biological Evolution. **Life**, v. 4, n. 2, p. 217-224, 2014.

BACHMANN, H. et al. Evolutionary engineering to enhance starter culture performance in food fermentations. **Current opinion in biotechnology**, v. 32, p. 1-7, 2015. ISSN 0958-1669.

BLANK, L. M.; EBERT, B. E. From measurement to implementation of metabolic fluxes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 13-21, 2013. ISSN 0958-1669.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Primeiro levantamento Safra 2013/2014**. Brasília, 2014.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.; MILAGRES, A. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199-204, 2009. ISSN 1369-703X.

BRÄMER, C. O. et al. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1709-1713, 2001. ISSN 1466-5026.

CAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 171-182, 2012. ISSN 1567-1364.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v.11, p.1-15, 2012. ISSN 1110-7243.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COOPER, T. F.; LENSKE, R. E. Experimental evolution with *E. coli* in diverse resource environments. I. Fluctuating environments promote divergence of replicate populations. **BMC evolutionary biology**, v. 10, n. 1, p. 11, 2010. ISSN 1471-2148.

DE ANDRADE RODRIGUES, M. et al. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 453-460, 2000. ISSN 0175-7598.

DRAGHI, J. A. et al. Mutational robustness can facilitate adaptation. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 353-355, 2010. ISSN 0028-0836.

EARL, D. J.; DEEM, M. W. Evolvability is a selectable trait. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 32, p. 11531-11536, 2004. ISSN 0027-8424.

ELENA, S. F.; LENSKE, R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 6, p. 457-469, 2003. ISSN 1471-0056.

FREIRE, R. **Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 6, p. 1-7, 2008.

HAWARI, J.; YEZZA, A. **Process for Producing Poly- β -hydroxybutyrate**: Google Patents 2010.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 1-12, 2007. ISSN 0175-7598.

HÖFFNER, K.; HARWOOD, S.; BARTON, P. A reliable simulator for dynamic flux balance analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 792-802, 2013. ISSN 1097-0290.

JEYASEELAN, A.; PANDIYAN, S.; RAVI, P. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) using hydrolyzed grass and syzygium cumini seed as low cost substrates. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 3, p. 970-982, 2012. ISSN 1338-5178.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244-3250, 2003. ISSN 0099-2240.

KEENAN, T. M.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 616-626, 2006. ISSN 1367-5435.

KUYPER, M. et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 10, p. 925-934, 2005. ISSN 1567-1364.

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996. ISSN 0167-7799.

LIU, W. et al. Engineering of the xylose metabolic pathway for microbial production of bio-based chemicals. **Sheng wu gong cheng xue bao Chinese journal of biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1161-1172, 2013. ISSN 1000-3061.

LOPES, M. S. G.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1012-1015, 2009. ISSN 0008-4166.

LOPES, M. S. G. et al. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1751-1756, 2009. ISSN 0959-3993.

MATSUSHIKA, A. et al. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 1, p. 16-25, 2012. ISSN 0141-0229.

MENDONÇA, T. et al. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 4, p. 815-829, 2014. ISSN 1365-2672.

NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 1-5, Oct 2001. ISSN 0175-7598.

PAN, W. et al. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 459-469, 2012. ISSN 1367-5435.

PARRINE, D. Análise de fluxos metabólicos aplicada à biossíntese do polímero biodegradável poli-3-hidroxi-butirato P(3HB) por *Burkholderia sacchari*. 2013. 113 (Mestrado em Ciências). **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIRT, S. J. Principles of microbe and cell cultivation. **Blackwell Scientific Publications.**, 1975. ISBN 0632081503.

PRADELHA, F. et al. Flux balance analysis of mixed microbial cultures: application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 336-345, 2012. ISSN 0168-1656.

RAICHER; GIL. Análise Econômica da Produção de Polímeros Biodegradáveis no contexto de uma Biorefinaria a partir de cana-de-açúcar 2011. 178 (Doutor em Biotecnologia). **Instituto Butantã/ IPT**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

REHM, B. H. A. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, p. 41-62, 2007 2007. ISSN 1467-3037.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2011. ISSN 1754-6834.

ROCHA, R. C. et al. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P (3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 427-431, 2008. ISSN 0959-3993.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. In: (Ed.). **Metabolic Engineering**: Springer, 2001. p.129-169. ISBN 3540418482.

SCHUSTER, S.; FELL, D. A.; DANDEKAR, T. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 326-332, 2000. ISSN 1087-0156.

SILVA, L. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 245-254, 2004. ISSN 1367-5435.

SILVA, L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International journal of biological macromolecules**, v. 71, p. 2-7, 2014. ISSN 0141-8130

SMITH, J.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 41, 2014. ISSN 1472-6750.

SINDHU, R. et al. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 67-72, 2013. ISSN 1369-703X.

SONG, S.; PARK, C. Utilization of d-ribose through d-xylose transporter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 255-261, 1998. ISSN 1574-6968.

SOYER, O. S.; O'MALLEY, M. A. Evolutionary systems biology: What it is and why it matters. **BioEssays**, v. 35, n. 8, p. 696-705, 2013. ISSN 1521-1878.

STEPHANOPOULOS, G.; STAFFORD, D. E. Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 14, p. 2595-2602, 2002. ISSN 0009-2509.

TACIRO KEICO, M. processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (phamcl) sob limitação múltipla de nutrientes 2008. 98 (Doutorado em Biotecnologia). **Instituto Butantã / IPT**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TANG, J. K.-H. et al. Recent advances in mapping environmental microbial metabolisms through ¹³C isotopic fingerprints. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 76, p. 2767-2780, 2012. ISSN 1742-5689.

TRINH, C. T.; WLASCHIN, A.; SRIENC, F. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 813-826, 2009. ISSN 0175-7598.

VEENING, J.-W.; SMITS, W. K.; KUIPERS, O. P. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 193-210, 2008. ISSN 0066-4227.

WRIGHT, J. et al. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 3, p. 299-306, 2011. ISSN 1567-1364.

WRIGHT, S. Character change, speciation, and the higher taxa. **Evolution**, p. 427-443, 1982. ISSN 0014-3820.

ZHOU, H. et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 6, p. 611-622, 2012. ISSN 1096-7176.

APÊNDICE A-Informação de saída do programa METATOOL

ENTRADAS DO PROGRAMA *METATOOL*

Abreviações:

G6P: glicose-6-fosfato
 F6P: frutose-fosfato
 F16P: frutose-1,6-difosfato
 GL6P: glicono-g-lactona-3-fosfato
 PG6: 6-fosfogliconato
 KDPG2: 2-ceto-desoxi-6-fosfogliconato
 G3P: gliceraldeído-3-fosfato
 E4P: eitrse-4-fosfato
 S7P: sedo-7-heptulose
 Rbl5P: ribulose-6-fosfato
 Rb5P: ribose-5-fosfato
 X5P: xilulose-5-fosfato
 DHP: dihidroxiacetona
 BPG13: 1,3-bifosfoglicerato
 PG3: 3-fosfoglicerato
 PG2: 2-fosfoglicerato
 PEP: fosfoenolpiruvato
 PIR: piruvato
 AcCoA: acetil-CoA
 Cit: citrato
 IsoCit: isocitrato
 KG2: α -cetoglutarato
 SucCoA: succinil-CoA
 Suc: succinato
 Fum: fumarato
 OAA: oxalacetato

Biossíntese de PHB a partir de xilose considerando também a biossíntese de biomassa. Considera acúmulo variável de PHB e as vias EMP, ED, VP, CK, Glioxilato, anapleróticas e respiração aeróbia de coenzimas

-ENZREV (enzimas reversíveis)

EMP2 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10 EMP4

-ENZIRREV (enzimas irreversíveis)

XIL1 XIL2 XIL3 ED1 ED2 EMP3 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7
 CK8 CGLX1 CGLX2 GLN3 AD1 AD2 P3HB BIOTOT BIOMASSA OXFAD OXNAD

-METINT (metabólitos internos)

XIL XLL G6P KDPG2 NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA Rb15P Rb5P
X5P S7P E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX FAD FADH2
NAD NADH CoASH XR HB

-METEXT (metabólitos externos)

XILext ADP ATP CO2 XT O

-CAT

XIL1 : $XIL_{ext} + ATP = XIL + ADP$.

XIL2 : $XIL = XLL$.

XIL3 : $XLL + ATP = X5P + ADP$.

EMP2 : $G6P = F6P$.

ED1 : $PG6 = KDPG2$.

ED2 : $KDPG2 = PIR + G3P$.

EMP7 : $BPG13 + ADP = PG3 + ATP$.

EMP8 : $PG3 = PG2$.

EMP9 : $PG2 = PEP$.

EMP10 : $PEP + ADP = PIR + ATP$.

CPD : $PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO_2$.

VP1 : $G6P + NADP = PG6 + NADPH$.

VP5 : $PG6 + NADP = NADPH + Rb15P + CO_2$.

VP6 : $Rb15P = Rb5P$.

VP7 : $Rb15P = X5P$.

VP8 : $Rb5P + X5P = S7P + G3P$.

VP9 : $G3P + S7P = E4P + F6P$.

VP10 : $X5P + E4P = F6P + G3P$.

CK1 : $OAA + AcCoA = Cit + CoASH$.

CK2 : $Cit = IsoCit$.

CK3 : $IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO_2$.

CK4 : $KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO_2$.

CK5 : $SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH$.

CK6 : $Suc + FAD = Fum + FADH_2$.

CK7 : $Fum = Mal$.

CK8 : $Mal + NAD = OAA + NADH$.

CGLX1 : $IsoCit = GLX + Suc$.

CGLX2 : $GLX + AcCoA = Mal + CoASH$.

GLN3 : $F16P = F6P$.

AD1 : $PIR + CO_2 + ATP = OAA + ADP$.

AD2 : $OAA + ATP = PEP + ADP + CO_2$.

P3HB : $2 AcCoA + 1 NADPH = HB + 2 CoASH + 1 NADP$

BIOMASSA : $205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP +$
 $2833 PIR + 3748 AcCoA + 1079 KG2 + 1787 OAA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP$
 $= 1 XR + 18485 ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH$.

BIOTOT : $36821 HB + 1 XR = 1 XT$.

OXFAD : $FADH_2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP$.

OXNAD : $\text{NADH} + 3 \text{ ADP} + \text{O} = \text{NAD} + 3 \text{ ATP}$.

SAÍDAS DO PROGRAMA *METATOOL*

Estado pseudo-estacionário 1.

enzymes

in () indicates # of enzymes used by the elementary mode

1: (32) (0.183252 XIL1) (0.183252 XIL2) (0.183252 XIL3) (0.116211 ED1) (0.116211 ED2) (0.331438 EMP10) (0.430676 CPD) (0.116211 VP1) (0.193857 CK1) (0.193857 CK2) (0.00646448 CK3) (0.187392 CK6) (0.187392 CK7) (0.374784 CK8) (0.187392 CGLX1) (0.187392 CGLX2) (0.170221 AD2) (5.99118e-006 BIOMASSA) (5.99118e-006 BIOTOT) (0.0134861 P3HB) (0.187392 OXFAD) OXNAD (-0.117439 EMP2) (0.173289 EMP6) (0.173289 EMP7) (0.164326 EMP8) (0.164326 EMP9) (0.0653877 VP6) (-0.0653877 VP7) (0.0600137 VP8) (0.0600137 VP9) (0.0578508 VP10) irreversible

2: (32) (0.311243 XIL1) (0.311243 XIL2) (0.311243 XIL3) (0.189484 ED1) (0.189484 ED2) (0.244619 EMP10) (0.330869 CPD) (0.189484 VP1) (0.181426 CK1) (0.181426 CK2) (0.181426 CK3) (0.16188 CK4) (0.16188 CK5) (0.16188 CK6) (0.16188 CK7) (0.16188 CK8) (0.0519157 AD1) (1.81143e-005 BIOMASSA) (1.81143e-005 BIOTOT) (0.0407754 P3HB) (0.16188 OXFAD) OXNAD (-0.193197 EMP2) (0.281119 EMP6) (0.281119 EMP7) (0.25402 EMP8) (0.25402 EMP9) (0.11676 VP6) (-0.11676 VP7) (0.100511 VP8) (0.100511 VP9) (0.0939721 VP10) irreversible

3: (33) (0.28133 XIL1) (0.28133 XIL2) (0.28133 XIL3) (0.172359 ED1) (0.172359 ED2) (0.225127 EMP10) (0.354195 CPD) (0.172359 VP1) (0.184331 CK1) (0.184331 CK2) (0.140535 CK3) (0.124047 CK4) (0.124047 CK5) (0.167843 CK6) (0.167843 CK7) (0.211638 CK8) (0.0437955 CGLX1) (0.0437955 CGLX2) (1.5281e-005 BIOMASSA) (1.5281e-005 BIOTOT) (0.0343976 P3HB) (0.167843 OXFAD) OXNAD (-0.175492 EMP2) (0.255918 EMP6) (0.255918 EMP7) (0.233058 EMP8) (0.233058 EMP9) (0.104754 VP6) (-0.104754 VP7) (0.0910466 VP8) (0.0910466 VP9) (0.0855302 VP10) irreversible

4: (27) (0.54089 XIL1) (0.54089 XIL2) (0.54089 XIL3) (0.225017 ED1) (0.225017 ED2) (0.390296 EMP10) (0.381971 CPD) (0.509608 VP1) (0.284591 VP5) (0.0441791 CK1) (0.0441791 CK2) (0.0441791 CK3) (0.117347 AD1) (4.09445e-005 BIOMASSA) (4.09445e-005 BIOTOT) (0.092166 P3HB) OXNAD (-0.518002 EMP2) (0.472799 EMP6) (0.472799 EMP7) (0.411546 EMP8) (0.411546 EMP9) (0.304572 VP6) (-0.0199809 VP7) (0.267845 VP8) (0.267845 VP9) (0.253064 VP10) irreversible

5: (32) (0.39495 XIL1) (0.39495 XIL2) (0.39495 XIL3) (0.180617 ED1) (0.180617 ED2) (0.296817 EMP10) (0.401846 CPD) (0.349076 VP1) (0.168459 VP5) (0.105257 CK1) (0.105257 CK2) (0.028789 CK3) (0.0764684 CK6) (0.0764684 CK7) (0.152937 CK8) (0.0764684 CGLX1) (0.0764684 CGLX2) (2.66812e-005 BIOMASSA) (2.66812e-005 BIOTOT) (0.0600594 P3HB) (0.0764684 OXFAD) OXNAD (-0.354546 EMP2) (0.350579

EMP6) (0.350579 EMP7) (0.310664 EMP8) (0.310664 EMP9) (0.206969 VP6) (-0.0385099 VP7) (0.183036 VP8) (0.183036 VP9) (0.173404 VP10) irreversible

6: (29) (1.12338 XIL1) (1.12338 XIL2) (1.12338 XIL3) (1.84347 ED1) (1.84347 ED2) (1.18905 EMP4) (0.886619 CPD) (1.84347 VP1) (0.102547 CK1) (0.102547 CK2) (0.102547 CK3) (1.18905 GLN3) (0.687607 AD1) (0.415225 AD2) (9.5039e-005 BIOMASSA) (9.5039e-005 BIOTOT) (0.213933 P3HB) OXNAD (-1.86295 EMP2) (-1.18905 EMP5) (-0.223722 EMP6) (-0.223722 EMP7) (-0.3659 EMP8) (-0.3659 EMP9) (0.44273 VP6) (-0.44273 VP7) (0.35748 VP8) (0.35748 VP9) (0.32317 VP10) irreversible

7: (34) (0.489023 XIL1) (0.489023 XIL2) (0.489023 XIL3) (0.677992 ED1) (0.677992 ED2) (0.386732 EMP4) (0.578969 CPD) (0.677992 VP1) (0.164159 CK1) (0.164159 CK2) (0.0377147 CK3) (0.126444 CK6) (0.126444 CK7) (0.252888 CK8) (0.126444 CGLX1) (0.126444 CGLX2) (0.386732 GLN3) (0.0262675 AD2) (3.49534e-005 BIOMASSA) (3.49534e-005 BIOTOT) (0.0786802 P3HB) (0.126444 OXFAD) OXNAD (-0.685157 EMP2) (-0.386732 EMP5) (0.0441637 EMP6) (0.0441637 EMP7) (-0.00812667 EMP8) (-0.00812667 EMP9) (0.188116 VP6) (-0.188116 VP7) (0.156763 VP8) (0.156763 VP9) (0.144144 VP10) irreversible

8: (33) (16.0943 XIL1) (16.0943 XIL2) (16.0943 XIL3) (23.5918 ED1) (23.5918 ED2) (14.0717 EMP4) (17.0727 CPD) (23.5918 VP1) (4.17542 CK1) (4.17542 CK2) (1.31235 CK3) (2.86308 CK6) (2.86308 CK7) (5.72616 CK8) (2.86308 CGLX1) (2.86308 CGLX2) (14.0717 GLN3) (3.07349 AD1) (2.45077 AD2) (0.00121626 BIOMASSA) (0.00121626 BIOTOT) (2.7378 P3HB) (2.86308 OXFAD) (27.1129 OXNAD) (-23.8412 EMP2) (-14.0717 EMP5) (-1.81953 EMP8) (-1.81953 EMP9) (6.23845 VP6) (-6.23845 VP7) (5.14746 VP8) (5.14746 VP9) (4.70839 VP10) irreversible

9: (34) (0.61232 XIL1) (0.61232 XIL2) (0.61232 XIL3) (0.802653 ED1) (0.802653 ED2) (0.440808 EMP4) (0.536898 CPD) (0.802653 VP1) (0.152184 CK1) (0.152184 CK2) (0.152184 CK3) (0.101868 CK4) (0.101868 CK5) (0.101868 CK6) (0.101868 CK7) (0.101868 CK8) (0.440808 GLN3) (0.133647 AD1) (4.6632e-005 BIOMASSA) (4.6632e-005 BIOTOT) (0.104969 P3HB) (0.101868 OXFAD) OXNAD (-0.812213 EMP2) (-0.440808 EMP5) (0.0939635 EMP6) (0.0939635 EMP7) (0.024202 EMP8) (0.024202 EMP9) (0.237604 VP6) (-0.237604 VP7) (0.195775 VP8) (0.195775 VP9) (0.178941 VP10) irreversible

10: (33) (11.5379 XIL1) (11.5379 XIL2) (11.5379 XIL3) (16.7822 ED1) (16.7822 ED2) (10.0061 EMP4) (9.67694 CPD) (16.7822 VP1) (2.07797 CK1) (2.07797 CK2) (2.07797 CK3) (1.08412 CK4) (1.08412 CK5) (1.08412 CK6) (1.08412 CK7) (1.08412 CK8) (10.0061 GLN3) (4.49582 AD1) (1.85599 AD2) (0.000921087 BIOMASSA) (0.000921087 BIOTOT) (2.07337 P3HB) (1.08412 OXFAD) (15.1123 OXNAD) (-16.971 EMP2) (-10.0061 EMP5) (-1.37795 EMP8) (-1.37795 EMP9) (4.50761 VP6) (-4.50761 VP7) (3.6814 VP8) (3.6814 VP9) (3.34889 VP10) irreversible

11: (33) (28.3706 XIL1) (28.3706 XIL2) (28.3706 XIL3) (38.2029 ED1) (38.2029 ED2) (21.4633 EMP4) (24.6071 CPD) (38.2029 VP1) (6.56831 CK1) (6.56831 CK2) (6.56831 CK3) (4.20906 CK4) (4.20906 CK5) (4.20906 CK6) (4.20906 CK7) (4.20906 CK8) (21.4633 GLN3) (7.40138 AD1) (1.13481 AD2) (0.00218652 BIOMASSA) (0.00218652

BIOTOT) (4.92186 P3HB) (4.20906 OXFAD) (44.0519 OXNAD) (-38.6512 EMP2) (-21.4633 EMP5) (3.27104 EMP6) (3.27104 EMP7) (11.0275 VP6) (-11.0275 VP7) (9.0662 VP8) (9.0662 VP9) (8.27686 VP10) irreversible

12: (35) (0.489023 XIL1) (0.489023 XIL2) (0.489023 XIL3) (0.651724 ED1) (0.651724 ED2) (0.360464 EMP4) (0.552701 CPD) (0.651724 VP1) (0.164159 CK1) (0.164159 CK2) (0.0639822 CK3) (0.0262675 CK4) (0.0262675 CK5) (0.126444 CK6) (0.126444 CK7) (0.226621 CK8) (0.100177 CGLX1) (0.100177 CGLX2) (0.360464 GLN3) (3.49534e-005 BIOMASSA) (3.49534e-005 BIOTOT) (0.0786802 P3HB) (0.126444 OXFAD) OXNAD (-0.65889 EMP2) (-0.360464 EMP5) (0.0704312 EMP6) (0.0704312 EMP7) (0.0181408 EMP8) (0.0181408 EMP9) (0.188116 VP6) (-0.188116 VP7) (0.156763 VP8) (0.156763 VP9) (0.144144 VP10) irreversible

13: (34) (87.1321 XIL1) (87.1321 XIL2) (87.1321 XIL3) (119.354 ED1) (119.354 ED2) (67.4583 EMP4) (101.71 CPD) (119.354 VP1) (29.2491 CK1) (29.2491 CK2) (8.16784 CK3) (1.44798 CK4) (1.44798 CK5) (22.5293 CK6) (22.5293 CK7) (43.6106 CK8) (21.0813 CGLX1) (21.0813 CGLX2) (67.4583 GLN3) (3.23226 AD2) (0.00622786 BIOMASSA) (0.00622786 BIOTOT) (14.0189 P3HB) (22.5293 OXFAD) (178.176 OXNAD) (-120.63 EMP2) (-67.4583 EMP5) (9.31687 EMP6) (9.31687 EMP7) (33.5177 VP6) (-33.5177 VP7) (27.9313 VP8) (27.9313 VP9) (25.6831 VP10) irreversible

14: (29) (0.823121 XIL1) (0.823121 XIL2) (0.823121 XIL3) (1.0092 ED1) (1.0092 ED2) (0.576127 EMP4) (0.626486 CPD) (1.1559 VP1) (0.146699 VP5) (0.0724599 CK1) (0.0724599 CK2) (0.0724599 CK3) (0.576127 GLN3) (0.192465 AD1) (6.71547e-005 BIOMASSA) (6.71547e-005 BIOTOT) (0.151165 P3HB) OXNAD (-1.16967 EMP2) (-0.576127 EMP5) (0.135317 EMP6) (0.135317 EMP7) (0.0348533 EMP8) (0.0348533 EMP9) (0.371513 VP6) (-0.224814 VP7) (0.311275 VP8) (0.311275 VP9) (0.287032 VP10) irreversible

15: (28) (11.1043 XIL1) (11.1043 XIL2) (11.1043 XIL3) (15.6981 ED1) (15.6981 ED2) (9.57249 EMP4) (8.59282 CPD) (16.7822 VP1) (1.08412 VP5) (0.993853 CK1) (0.993853 CK2) (0.993853 CK3) (9.57249 GLN3) (4.49582 AD1) (1.85599 AD2) (0.000921087 BIOMASSA) (0.000921087 BIOTOT) (2.07337 P3HB) (11.8599 OXNAD) (-16.971 EMP2) (-9.57249 EMP5) (-1.37795 EMP8) (-1.37795 EMP9) (4.72444 VP6) (-3.64032 VP7) (3.89822 VP8) (3.89822 VP9) (3.56571 VP10) irreversible

16: (28) (26.6869 XIL1) (26.6869 XIL2) (26.6869 XIL3) (33.9939 ED1) (33.9939 ED2) (19.7797 EMP4) (20.3981 CPD) (38.2029 VP1) (4.20906 VP5) (2.35926 CK1) (2.35926 CK2) (2.35926 CK3) (19.7797 GLN3) (7.40138 AD1) (1.13481 AD2) (0.00218652 BIOMASSA) (0.00218652 BIOTOT) (4.92186 P3HB) (31.4247 OXNAD) (-38.6512 EMP2) (-19.7797 EMP5) (3.27104 EMP6) (3.27104 EMP7) (11.8693 VP6) (-7.66026 VP7) (9.90801 VP8) (9.90801 VP9) (9.11867 VP10) irreversible

17: (34) (0.51945 XIL1) (0.51945 XIL2) (0.51945 XIL3) (0.67896 ED1) (0.67896 ED2) (0.379894 EMP4) (0.571467 CPD) (0.707475 VP1) (0.0285145 VP5) (0.149687 CK1) (0.149687 CK2) (0.040941 CK3) (0.108746 CK6) (0.108746 CK7) (0.217492 CK8) (0.108746 CGLX1) (0.108746 CGLX2) (0.379894 GLN3) (3.79435e-005 BIOMASSA)

(3.79435e-005 BIOTOT) (0.0854107 P3HB) (0.108746 OXFAD) OXNAD (-0.715253 EMP2) (-0.379894 EMP5) (0.0764561 EMP6) (0.0764561 EMP7) (0.0196927 EMP8) (0.0196927 EMP9) (0.209911 VP6) (-0.181396 VP7) (0.175876 VP8) (0.175876 VP9) (0.162178 VP10) irreversible

18: (33) (86.5529 XIL1) (86.5529 XIL2) (86.5529 XIL3) (117.906 ED1) (117.906 ED2) (66.8791 EMP4) (100.262 CPD) (119.354 VP1) (1.44798 VP5) (27.8012 CK1) (27.8012 CK2) (6.71986 CK3) (21.0813 CK6) (21.0813 CK7) (42.1626 CK8) (21.0813 CGLX1) (21.0813 CGLX2) (66.8791 GLN3) (3.23226 AD2) (0.00622786 BIOMASSA) (0.00622786 BIOTOT) (14.0189 P3HB) (21.0813 OXFAD) (173.832 OXNAD) (-120.63 EMP2) (-66.8791 EMP5) (9.31687 EMP6) (9.31687 EMP7) (33.8073 VP6) (-32.3593 VP7) (28.2209 VP8) (28.2209 VP9) (25.9727 VP10) irreversible

19: (33) (61.2902 XIL1) (61.2902 XIL2) (61.2902 XIL3) (84.1352 ED1) (84.1352 ED2) (47.588 EMP4) (2.01695 EMP10) (73.8639 CPD) (84.1352 VP1) (21.3797 CK1) (21.3797 CK2) (4.6802 CK3) (16.6995 CK6) (16.6995 CK7) (33.399 CK8) (16.6995 CGLX1) (16.6995 CGLX2) (47.588 GLN3) (4.26813 AD2) (0.00433753 BIOMASSA) (0.00433753 BIOTOT) (9.76379 P3HB) (16.6995 OXFAD) (129.137 OXNAD) (-85.0243 EMP2) (-47.588 EMP5) (6.48895 EMP6) (6.48895 EMP7) (23.5459 VP6) (-23.5459 VP7) (19.6551 VP8) (19.6551 VP9) (18.0893 VP10) irreversible

overall reaction

- 1: 30587 XILext + 539466 ADP + 198190 O = 539466 ATP + 101376 CO₂ + XT
- 2: 17182.1 XILext + 165732 ADP + 64141.4 O = 165732 ATP + 34351.7 CO₂ + XT
- 3: 18410.4 XILext + 202581 ADP + 76424.3 O = 202581 ATP + 40493.1 CO₂ + XT
- 4: 13210.3 XILext + 46578 ADP + 24423.3 O = 46578 ATP + 14492.7 CO₂ + XT
- 5: 14802.6 XILext + 94344.7 ADP + 40345.6 O = 94344.7 ATP + 22453.8 CO₂ + XT
- 6: 11820.2 XILext + 24517.4 ATP + 10522 O = 24517.4 ADP + 7542 CO₂ + XT
- 7: 13990.7 XILext + 47109.1 ADP + 32227 O = 47109.1 ATP + 18394.5 CO₂ + XT
- 8: 13232.6 XILext + 22091.8 ADP + 24646 O = 22091.8 ATP + 14604 CO₂ + XT
- 9: 13130.9 XILext + 25289.2 ADP + 23629 O = 25289.2 ATP + 14095.5 CO₂ + XT
- 10: 12526.4 XILext + 2318.2 ADP + 17584 O = 2318.2 ATP + 11073 CO₂ + XT
- 11: 12975.2 XILext + 19372.6 ADP + 22072 O = 19372.6 ATP + 13317 CO₂ + XT
- 12: 13990.7 XILext + 49363.6 ADP + 32227 O = 49363.6 ATP + 18394.5 CO₂ + XT
- 13: 13990.7 XILext + 47806.6 ADP + 32227 O = 47806.6 ATP + 18394.5 CO₂ + XT
- 14: 12257.1 XILext + 822.8 ADP + 14891 O = 822.8 ATP + 9726.5 CO₂ + XT
- 15: 12055.6 XILext + 10864.2 ATP + 12876 O = 10864.2 ADP + 8719 CO₂ + XT
- 16: 12205.2 XILext + 2187.4 ATP + 14372 O = 2187.4 ADP + 9467 CO₂ + XT
- 17: 13690.1 XILext + 40946.8 ADP + 29221 O = 40946.8 ATP + 16891.5 CO₂ + XT
- 18: 13897.7 XILext + 45202.6 ADP + 31297 O = 45202.6 ATP + 17929.5 CO₂ + XT
- 19: 14130.2 XILext + 51247.6 ADP + 33622 O = 51247.6 ATP + 19092 CO₂ + XT

APÊNDICE B - Cálculo da $\mu_{\max}$ durante a evolução.

Nas gráficas seguintes apresenta-se o cálculo da $\mu_{\max}$ a partir da regressão lineal feita nas retas construídas com dados do Logaritmo natural da densidade ótica.

Feast and famine.

2 ciclos de evolução :

3 ciclos de evolução:

4 ciclos de evolução:

5 ciclos de evolução:

8 ciclos de evolução:

A partir de oitavo ciclo, a velocidade máxima específica de crescimento manteve-se constante até o final do processo. A curva de crescimento final se encontra na discussão dos resultados no texto.

Cultivos sequenciais em saturação de xilose.

Calculo com 300 horas aproximadamente:

Calculo com 620 horas aproximadamente, em fase exponencial:

Calculo com 1500 horas aproximadamente, em fase exponencial:

Não se registrou um aumento na $\mu_{\max}$ depois das 1500 horas de cultivos sequenciais, a curva de crescimento final se encontra na discussão dos resultados no texto.

APÊNDICE C - Resultados da análise CG-MS do ensaio com carbono marcado ^{13}C .

As seguintes figuras representam os cromatogramas obtidos da análise das amostras de PHB marcado com carbono ^{13}C . As amostras com as siglas BS correspondem a *B. sacchari* LFM 101(linhagem parental). As amostras com As siglas EV correspondem à linhagem BSEV11 evoluída.

Amostra BS A1

34.95	0.20	62.05	6.28	92.05	0.23	120.10	0.01
35.95	0.92	63.05	2.15	93.10	0.02	121.10	0.01
37.00	0.57	64.25	0.04	94.10	0.01	122.10	0.00
38.00	1.78	65.25	0.01	95.10	0.01	123.10	0.00
39.00	12.84	66.25	0.02	96.10	0.00	124.10	0.00
40.05	4.78	67.15	0.04	97.10	0.01	125.10	0.00
41.05	29.84	68.10	0.31	98.10	0.01	126.10	0.01
42.05	29.79	69.05	1.34	99.00	0.03	127.00	0.01
43.05	100.00	70.90	6.20	100.10	0.07	128.00	0.06
44.05	25.52	72.05	2.35	102.00	0.75	129.00	0.05
45.05	56.87	73.05	1.10	103.10	0.89	131.00	1.53
46.05	11.03	74.10	0.28	104.10	0.63	132.05	0.70
47.05	7.06	75.05	0.42	105.10	0.75	133.05	0.32
48.10	0.16	76.05	0.10	106.05	0.25	134.15	0.05
49.15	0.04	77.05	0.06	107.10	0.15	135.15	0.01
50.05	0.03	78.05	0.02	108.25	0.03	136.15	0.00
51.10	0.07	79.05	0.01	109.25	0.01	137.15	0.00
52.10	0.04	80.05	0.01	110.25	0.01	138.15	0.00
53.05	0.23	81.05	0.02	111.25	0.00	139.15	0.00
54.05	0.13	82.05	0.03	112.15	0.00	140.15	0.00
55.05	0.63	83.05	0.05	113.00	0.02	141.15	0.00
56.05	0.76	85.00	1.93	113.90	0.01	142.15	0.00
57.05	1.82	86.90	16.99	114.90	0.02	143.15	0.00
58.10	3.65	88.05	6.92	115.90	0.01	144.15	0.00
59.10	7.32	89.05	10.16	117.10	0.03	145.15	0.03
60.05	23.53	90.05	3.58	118.10	0.03	146.15	0.01

Amostra BS A2

35.05	0.02	61.05	18.52	91.05	1.59	117.15	0.04
35.95	0.09	62.05	5.69	92.05	0.23	118.15	0.02
37.05	0.54	63.05	1.90	93.15	0.02	119.15	0.02
38.05	1.55	64.10	0.06	94.15	0.01	120.15	0.01
39.05	12.98	65.10	0.02	95.15	0.01	121.15	0.01
40.05	5.25	66.10	0.01	96.15	0.01	122.15	0.01
41.05	29.57	67.95	0.36	97.15	0.01	123.15	0.01
42.10	29.50	69.10	1.45	98.15	0.03	124.15	0.01
43.05	100.00	70.95	6.06	99.15	0.02	125.15	0.01
44.05	24.70	72.05	2.25	100.15	0.04	126.15	0.01
45.05	56.49	73.10	1.05	101.10	0.05	127.15	0.01
46.10	10.20	74.10	0.32	102.10	0.53	128.15	0.05
47.05	6.59	75.10	0.46	103.10	0.65	129.15	0.05
48.10	0.16	76.05	0.10	104.10	0.56	131.05	1.77
49.05	0.03	77.15	0.07	105.05	0.54	132.10	0.73
50.05	0.04	78.10	0.02	106.10	0.26	133.05	0.39
51.10	0.08	79.10	0.01	107.10	0.15	134.00	0.06
52.05	0.03	80.10	0.01	108.15	0.04	135.10	0.01
53.00	0.22	81.10	0.01	109.15	0.01	136.10	0.01
54.05	0.12	82.10	0.02	110.15	0.01	137.10	0.02
55.05	0.68	83.95	0.28	111.15	0.01	138.10	0.01
56.05	0.68	85.10	1.96	112.15	0.01	139.10	0.00
57.05	1.78	86.95	19.50	113.15	0.03	140.10	0.01
58.10	3.49	88.10	7.32	114.15	0.03	141.10	0.01
59.10	6.62	89.10	11.64	115.15	0.01	142.10	0.01
60.05	21.54	90.10	3.66	116.15	0.02	143.10	0.01

Amostra BS B1

35.05	0.02	60.05	21.54	89.10	11.64	114.15	0.03
35.95	0.09	61.05	18.52	90.10	3.66	115.15	0.01
37.05	0.54	62.05	5.69	91.05	1.59	116.15	0.02
38.05	1.55	63.05	1.90	92.05	0.23	117.15	0.04
39.05	12.98	64.10	0.06	93.15	0.02	118.15	0.02
40.05	5.25	65.10	0.02	94.15	0.01	119.15	0.02
41.05	29.57	66.10	0.01	95.15	0.01	120.15	0.01
42.10	29.50	67.95	0.36	96.15	0.01	121.15	0.01
43.05	100.00	69.10	1.45	97.15	0.01	122.15	0.01
44.05	24.70	70.95	6.06	98.15	0.03	123.15	0.01
45.05	56.49	72.05	2.25	99.15	0.02	124.15	0.01
46.10	10.20	73.10	1.05	100.15	0.04	125.15	0.01
47.05	6.59	74.10	0.32	101.10	0.05	126.15	0.01
48.10	0.16	75.10	0.46	102.10	0.53	127.15	0.01
49.05	0.03	76.05	0.10	103.10	0.65	128.15	0.05
50.05	0.04	77.15	0.07	104.10	0.56	129.15	0.05
51.10	0.08	78.10	0.02	105.05	0.54	131.05	1.77
52.05	0.03	79.10	0.01	106.10	0.26	132.10	0.73
53.00	0.22	80.10	0.01	107.10	0.15	133.05	0.39
54.05	0.12	81.10	0.01	108.15	0.04	134.00	0.06
55.05	0.68	82.10	0.02	109.15	0.01	135.10	0.01
56.05	0.68	83.95	0.28	110.15	0.01	136.10	0.01
57.05	1.78	85.10	1.96	111.15	0.01	137.10	0.02
58.10	3.49	86.95	19.50	112.15	0.01	138.10	0.01
59.10	6.62	88.10	7.32	113.15	0.03	139.10	0.00

Amostra BSB2

34.85	0.01	62.10	4.66	90.10	3.03	117.15	0.04
35.95	0.11	63.05	1.47	91.10	1.17	118.15	0.02
37.00	0.58	64.20	0.03	92.10	0.14	119.15	0.02
38.05	1.59	65.20	0.02	93.15	0.01	120.15	0.01
39.05	12.51	66.20	0.01	94.15	0.01	121.15	0.01
40.05	4.67	67.00	0.03	95.15	0.01	122.15	0.01
41.05	28.26	68.15	0.35	96.15	0.01	123.15	0.01
42.05	28.89	69.10	1.27	97.15	0.00	124.15	0.00
43.05	100.00	70.90	5.70	98.15	0.02	125.15	0.00
44.10	22.63	72.10	1.79	99.15	0.02	126.15	0.01
45.05	54.70	73.10	0.79	100.15	0.02	127.15	0.01
46.10	9.74	74.10	0.27	101.35	0.04	128.15	0.05
47.10	5.73	75.05	0.37	102.10	0.52	129.10	0.03
48.10	0.14	76.00	0.08	103.10	0.59	131.00	1.87
49.10	0.05	77.10	0.05	104.10	0.44	132.05	0.60
50.10	0.05	78.15	0.01	105.10	0.50	133.05	0.21
51.15	0.05	79.15	0.01	106.10	0.15	134.05	0.08
52.05	0.03	80.15	0.01	107.10	0.12	135.10	0.01
53.00	0.20	81.15	0.02	108.15	0.01	136.10	0.01
54.10	0.13	82.15	0.03	109.15	0.01	137.10	0.01
55.05	0.62	83.30	0.08	110.15	0.01	138.10	0.01
56.05	0.58	84.15	0.17	111.15	0.01	139.10	0.01
57.05	1.61	85.10	1.83	112.15	0.01	140.10	0.00
58.10	3.23	86.05	2.21	113.15	0.02	141.10	0.00
59.10	5.86	87.10	17.63	114.15	0.01	142.10	0.01
60.05	20.53	88.10	6.91	115.15	0.01	143.10	0.01
61.05	17.14	89.10	10.47	116.15	0.01	144.10	0.01

Amostra BSB3

35.10	0.04	62.05	5.35	91.05	1.27	118.10	0.02
36.10	0.11	63.05	1.62	92.05	0.14	119.10	0.02
37.05	0.50	64.10	0.03	93.05	0.01	120.10	0.01
38.05	1.61	65.10	0.02	94.05	0.01	121.10	0.01
39.00	12.56	66.10	0.03	95.05	0.01	122.10	0.01
40.05	4.79	67.20	0.08	96.05	0.01	123.10	0.01
41.05	28.77	68.20	0.34	97.05	0.01	124.10	0.01
42.05	28.66	69.10	1.14	98.05	0.01	125.10	0.00
43.05	100.00	70.90	5.49	99.05	0.02	126.10	0.01
44.05	24.15	72.05	1.78	100.05	0.02	127.10	0.00
45.05	55.61	73.05	0.83	101.15	0.05	128.10	0.03
46.05	10.28	74.10	0.26	102.10	0.56	129.10	0.03
47.05	6.31	75.10	0.34	103.10	0.71	131.00	1.46
48.05	0.14	76.10	0.07	104.05	0.50	132.05	0.57
49.05	0.02	77.05	0.06	105.05	0.54	133.05	0.23
50.05	0.03	78.05	0.02	106.10	0.21	134.05	0.05
51.05	0.03	79.05	0.01	107.05	0.10	135.00	0.01
52.00	0.04	80.05	0.01	108.10	0.02	136.00	0.01
52.95	0.17	81.05	0.02	109.10	0.01	137.00	0.01
54.00	0.13	82.05	0.03	110.10	0.01	138.00	0.01
55.05	0.57	82.85	0.04	111.10	0.01	139.00	0.01
56.10	0.61	83.50	0.05	112.10	0.02	140.00	0.01
57.05	1.69	85.05	1.91	113.10	0.03	141.00	0.00
58.05	3.36	86.95	16.47	114.10	0.01	142.00	0.00
59.10	6.68	88.05	6.49	115.10	0.01	143.00	0.00
60.05	20.73	89.05	9.67	116.10	0.01	144.00	0.00
61.05	17.92	90.05	3.29	117.10	0.04	145.00	0.03

Amostra BSC1

34.85	0.01	62.05	5.14	91.10	1.40	117.95	0.03
36.00	0.06	63.10	1.78	92.10	0.18	118.95	0.02
37.05	0.57	64.30	0.04	93.30	0.02	119.95	0.01
38.05	1.51	65.30	0.01	94.30	0.00	120.95	0.01
39.05	12.74	66.30	0.02	95.30	0.01	121.95	0.01
40.05	4.79	68.05	0.41	96.30	0.01	122.95	0.01
41.05	28.71	69.10	1.35	97.30	0.01	123.95	0.01
42.10	29.08	70.90	5.94	98.30	0.02	124.95	0.01
43.05	100.00	72.10	1.91	99.30	0.02	125.95	0.01
44.05	24.10	73.10	0.86	100.25	0.05	126.95	0.01
45.05	56.34	74.15	0.24	100.85	0.03	128.05	0.05
46.10	10.05	75.10	0.37	102.05	0.55	128.70	0.01
47.05	6.17	76.15	0.06	103.15	0.68	129.30	0.04
48.05	0.10	77.05	0.09	104.15	0.52	131.05	1.85
48.90	0.03	78.30	0.01	105.10	0.62	132.05	0.75
49.90	0.03	79.30	0.01	106.10	0.19	133.05	0.41
50.90	0.05	80.30	0.01	107.10	0.11	134.10	0.05
51.90	0.05	81.30	0.01	107.95	0.03	135.20	0.01
53.00	0.21	82.30	0.02	108.95	0.02	136.20	0.00
54.00	0.13	83.20	0.04	109.95	0.01	137.20	0.00
55.05	0.62	84.15	0.17	110.95	0.01	138.20	0.01
56.10	0.63	85.10	2.02	111.95	0.01	139.20	0.01
57.05	1.59	86.10	2.13	112.95	0.03	140.20	0.01
58.10	3.30	87.10	18.67	113.95	0.02	141.20	0.00
59.15	6.17	88.10	8.01	114.95	0.01	142.20	0.01
60.05	20.66	89.10	12.26	115.95	0.01	143.20	0.01
61.05	10.00	90.10	0.00	116.95	0.00	144.20	0.00

Amostra EVA1

35.05	0.01	63.10	1.65	92.10	0.16	120.25	0.01
35.95	0.07	64.25	0.04	93.15	0.01	121.25	0.01
37.05	0.57	65.25	0.02	94.15	0.01	122.25	0.01
38.05	1.48	66.25	0.02	95.15	0.01	123.25	0.01
39.05	12.12	67.05	0.03	96.15	0.01	124.25	0.01
40.05	4.78	68.15	0.34	97.15	0.01	125.20	0.00
41.05	28.45	69.10	1.33	98.15	0.01	126.20	0.01
42.05	28.28	70.95	5.68	99.15	0.03	127.20	0.01
43.05	100.00	72.10	1.87	100.15	0.03	128.20	0.05
44.05	24.03	73.05	0.89	101.10	0.08	129.20	0.06
45.05	55.17	74.10	0.26	102.10	0.56	131.05	1.96
46.10	9.73	75.10	0.39	103.05	0.65	132.05	0.84
47.10	6.30	76.10	0.10	104.10	0.52	133.10	0.36
48.10	0.11	77.20	0.07	105.10	0.57	134.05	0.07
49.15	0.03	78.15	0.01	106.10	0.24	135.15	0.01
50.15	0.04	79.15	0.01	107.10	0.12	136.15	0.00
51.15	0.04	80.15	0.01	108.25	0.02	137.15	0.00
52.05	0.04	81.15	0.01	109.25	0.01	138.15	0.01
53.05	0.15	82.15	0.04	110.25	0.01	139.15	0.01
54.00	0.13	83.05	0.03	111.25	0.02	140.15	0.01
55.05	0.61	84.10	0.14	112.25	0.02	141.15	0.00
56.05	0.50	85.05	1.92	113.25	0.02	142.15	0.00
57.05	1.56	86.10	2.10	114.25	0.01	143.15	0.00
58.10	3.16	87.10	19.80	115.25	0.01	144.15	0.01
59.10	5.84	88.10	7.74	116.25	0.02	145.15	0.04
60.05	19.11	89.10	11.82	117.25	0.03	146.15	0.02
61.05	17.18	90.10	3.95	118.25	0.03	147.10	0.03

Amostra EVA2

35.05	0.02	62.05	4.83	89.05	12.64	116.05	0.01
36.05	0.09	63.05	1.80	90.05	4.07	116.95	0.05
37.05	0.54	64.40	0.02	91.05	1.55	117.85	0.03
38.05	1.53	65.40	0.02	92.10	0.23	118.85	0.02
39.05	11.75	66.40	0.02	93.05	0.02	119.85	0.01
40.05	4.83	67.25	0.03	94.05	0.01	120.85	0.01
41.05	27.96	68.15	0.27	95.05	0.01	121.85	0.01
42.05	27.48	69.10	1.30	96.05	0.01	122.85	0.01
43.05	100.00	70.15	0.91	97.05	0.01	123.85	0.01
44.05	23.99	71.05	4.78	98.05	0.02	124.80	0.01
45.05	54.66	72.05	1.91	99.05	0.02	125.80	0.01
46.05	10.42	73.05	0.98	100.05	0.04	126.80	0.01
47.10	6.32	74.10	0.25	100.85	0.02	127.80	0.04
48.35	0.13	75.05	0.37	102.00	0.56	128.80	0.06
49.35	0.03	76.10	0.08	103.10	0.73	129.70	0.04
50.35	0.06	77.05	0.06	104.10	0.49	131.05	1.93
51.35	0.05	78.05	0.01	105.10	0.58	132.05	0.76
52.20	0.04	79.05	0.01	106.10	0.25	133.05	0.39
53.00	0.19	80.05	0.01	107.05	0.17	134.30	0.08
54.00	0.14	81.05	0.01	108.05	0.03	135.30	0.01
55.05	0.55	82.05	0.03	109.05	0.01	136.30	0.01
56.10	0.62	83.00	0.05	110.05	0.01	137.30	0.01
57.10	1.59	84.05	0.13	111.05	0.01	138.30	0.00
58.10	2.94	85.10	1.85	112.05	0.01	139.30	0.01
59.10	5.83	86.10	2.18	113.05	0.03	140.30	0.01
60.05	19.28	87.05	18.55	114.05	0.01	141.30	0.00
61.05	17.00	88.10	8.39	115.05	0.02	142.30	0.01

Amostra EVB1

35.05	0.02	62.05	4.63	91.05	1.83	118.05	0.03
36.10	0.11	63.10	1.66	92.05	0.23	119.05	0.02
37.05	0.51	64.10	0.02	93.05	0.02	120.05	0.02
38.05	1.54	65.10	0.02	94.05	0.01	121.05	0.01
39.05	11.35	66.10	0.02	95.05	0.01	122.05	0.01
40.05	4.84	67.10	0.05	96.05	0.02	123.05	0.01
41.05	27.26	68.20	0.37	97.05	0.01	124.05	0.01
42.05	26.21	69.10	1.25	98.05	0.02	125.00	0.01
43.05	100.00	70.10	0.86	99.05	0.02	126.00	0.01
44.05	24.27	71.05	4.70	100.05	0.03	127.00	0.01
45.05	54.77	72.05	1.89	100.95	0.03	128.00	0.04
46.05	10.34	73.05	1.07	102.10	0.47	129.00	0.04
47.05	6.14	74.10	0.27	103.05	0.69	129.90	0.04
48.05	0.13	75.05	0.40	104.05	0.47	131.00	1.87
48.95	0.04	76.10	0.07	105.05	0.53	132.05	0.91
49.95	0.04	76.95	0.07	106.10	0.24	133.05	0.39
50.95	0.06	77.95	0.02	107.05	0.13	134.05	0.11
51.95	0.03	78.95	0.01	108.05	0.04	135.10	0.01
53.05	0.15	79.95	0.02	109.05	0.02	136.10	0.01
54.25	0.09	80.95	0.01	110.05	0.02	137.10	0.01
55.05	0.57	81.95	0.02	111.05	0.01	138.10	0.01
56.05	0.59	83.25	0.07	112.05	0.01	139.10	0.01
57.05	1.55	85.00	2.10	113.05	0.03	140.10	0.01
58.05	2.94	87.00	22.41	114.05	0.01	141.10	0.01
59.10	5.51	88.10	8.51	115.05	0.02	142.10	0.00
60.05	18.60	89.05	13.38	116.05	0.01	143.10	0.01
61.05	16.89	90.05	4.12	117.05	0.06	144.10	0.01

Amostra EVB2

35.05	0.01	62.05	5.17	89.10	13.34	116.05	0.01
36.05	0.10	63.10	1.68	90.10	4.20	117.05	0.04
37.05	0.58	64.20	0.03	91.05	1.55	118.05	0.02
38.05	1.30	65.20	0.02	92.10	0.26	119.05	0.02
39.05	12.21	66.20	0.02	92.95	0.02	120.05	0.01
40.05	4.93	67.35	0.05	93.95	0.01	121.05	0.02
41.05	27.34	68.15	0.25	94.95	0.01	122.05	0.01
42.05	27.59	69.10	1.39	95.95	0.01	123.05	0.01
43.05	100.00	70.15	0.97	96.95	0.01	124.05	0.01
44.05	24.44	71.10	4.79	97.95	0.03	125.00	0.00
45.05	53.97	72.05	2.02	98.95	0.02	126.00	0.01
46.05	10.18	73.10	0.95	100.10	0.06	127.00	0.01
47.05	6.62	74.10	0.23	100.85	0.04	128.00	0.03
48.10	0.11	75.10	0.45	102.05	0.56	129.00	0.03
48.95	0.03	76.05	0.11	103.10	0.65	129.90	0.07
49.95	0.03	77.15	0.08	104.05	0.46	131.05	1.91
50.95	0.04	77.95	0.01	105.05	0.62	132.05	0.80
52.00	0.04	78.95	0.01	106.05	0.24	133.05	0.40
53.05	0.16	79.95	0.01	107.05	0.14	134.20	0.08
54.10	0.17	80.95	0.01	108.05	0.05	135.20	0.01
55.05	0.50	81.95	0.03	109.05	0.01	136.20	0.01
56.10	0.66	82.95	0.05	110.05	0.01	137.20	0.00
57.05	1.46	84.05	0.17	111.05	0.01	138.20	0.00
58.10	3.00	85.10	1.99	112.05	0.01	139.20	0.01
59.10	5.08	86.10	2.26	113.05	0.03	140.20	0.01
60.05	18.95	87.10	20.46	114.05	0.01	141.20	0.00
61.05	16.94	88.10	9.12	115.05	0.02	142.20	0.01

Amostra EVC1

34.90	0.02	62.05	5.26	90.05	4.36	117.10	0.05
36.05	0.08	63.05	1.73	91.05	1.62	117.95	0.04
37.05	0.61	64.40	0.05	92.05	0.27	118.95	0.02
38.05	1.45	65.40	0.02	92.95	0.01	119.95	0.01
39.05	11.54	66.40	0.02	93.95	0.02	120.95	0.00
40.05	4.37	68.00	0.39	94.95	0.01	121.95	0.01
41.05	27.96	69.10	1.36	95.95	0.01	122.95	0.01
42.05	27.01	70.15	0.93	96.95	0.01	123.95	0.01
43.05	100.00	71.05	5.17	97.95	0.02	124.95	0.00
44.05	23.32	72.05	2.10	98.95	0.02	125.95	0.01
45.05	54.64	73.05	0.98	99.95	0.04	126.95	0.01
46.10	9.93	74.10	0.32	101.20	0.04	128.05	0.04
47.05	6.36	75.10	0.39	102.10	0.66	129.05	0.05
48.05	0.13	76.10	0.10	103.05	0.73	130.00	0.06
48.95	0.05	77.10	0.09	104.05	0.69	131.05	2.02
50.05	0.04	77.95	0.01	105.05	0.62	132.05	0.77
51.00	0.05	78.95	0.01	106.05	0.29	133.10	0.39
51.95	0.03	79.95	0.01	107.00	0.14	134.15	0.07
53.05	0.17	80.95	0.01	107.95	0.04	135.00	0.01
54.15	0.11	82.05	0.03	108.95	0.01	136.00	0.01
55.05	0.57	82.85	0.02	109.95	0.01	137.00	0.00
56.10	0.62	84.10	0.20	110.95	0.01	138.00	0.01
57.05	1.54	85.10	2.06	111.95	0.00	139.00	0.01
58.05	2.90	86.05	1.97	112.95	0.03	140.00	0.00
59.10	5.65	87.05	21.06	113.95	0.01	141.00	0.00
60.05	19.50	88.10	9.04	114.95	0.01	142.00	0.01
61.05	17.94	89.05	13.84	115.95	0.01	143.00	0.00

Amostra EVC2

35.15	0.03	62.05	4.83	89.05	13.79	116.15	0.01
35.95	0.09	63.05	1.68	90.05	4.41	117.00	0.05
37.00	0.57	64.10	0.05	91.05	1.74	118.05	0.02
38.05	1.46	65.10	0.02	92.05	0.22	119.05	0.02
39.05	11.97	66.10	0.03	93.25	0.01	120.05	0.01
40.05	4.67	67.05	0.04	94.25	0.01	121.05	0.01
41.05	27.83	68.10	0.30	95.25	0.01	122.05	0.01
42.05	27.31	69.05	1.31	96.25	0.01	123.05	0.01
43.05	100.00	70.15	0.94	97.25	0.01	124.05	0.01
44.05	23.78	71.05	5.08	98.25	0.01	125.00	0.01
45.05	54.12	72.05	1.91	99.15	0.02	126.00	0.01
46.05	10.37	73.05	0.88	99.95	0.03	127.00	0.01
47.05	6.38	74.10	0.25	100.75	0.02	128.00	0.05
48.05	0.13	75.05	0.33	102.05	0.64	129.00	0.03
49.25	0.03	76.10	0.08	103.05	0.64	129.80	0.02
50.25	0.05	77.05	0.06	104.05	0.58	131.00	1.93
51.10	0.06	78.15	0.01	105.05	0.61	132.00	0.80
51.90	0.03	79.15	0.01	106.05	0.26	133.05	0.36
53.00	0.15	80.15	0.01	107.10	0.14	134.10	0.09
54.00	0.13	81.15	0.01	108.25	0.03	135.15	0.01
55.00	0.52	82.15	0.03	109.25	0.02	136.15	0.01
56.05	0.56	83.05	0.03	110.25	0.01	137.15	0.01
57.05	1.48	84.10	0.15	111.25	0.01	138.15	0.00
58.10	2.88	85.05	1.94	112.25	0.01	139.15	0.01
59.10	5.47	86.10	2.36	113.25	0.03	140.15	0.01
60.05	18.92	87.05	20.72	114.25	0.02	141.15	0.00
61.05	16.94	88.10	9.03	115.25	0.01	142.15	0.00

Tabela 1. Intensidad da frequência nos isotopómeros M, M+1, M+2, M+3, M+4 das amostras de PHB do ensaio com carbono marcado ^{13}C usando *B. sacchari* LFM 101.

	BSA1 3HB			BSA2 3HB			BSB1 3HB			BSB2 3HB			BSC1 3HB			BSC2 3HB		
	131	87	89	131	87	89	131	87	89	131	87	89	131	87	89	131	87	89
M	1.96	19.8	11.82	1.93	18.55	12.6	1.87	22.4	13.4	1.91		13.3	2.02	21.06	13.8	1.93	20.7	13.79
M+1	0.84	7.74	3.95	0.76	8.39	4.07	0.91	8.51	4.12	0.8		4.2	0.77	9.04	4.36	0.8	9.03	4.41
M+2	0.36	11.8	1.49	0.39	12.64	1.55	0.39	13.4	1.83	0.4		1.55	0.39	13.84	1.62	0.36	13.8	1.74
M+3	0.07	3.95	0.16	0.07	4.07	0.23	0.11	4.12	0.23	0.08		0.26	0.07	4.36	0.27	0.09	4.41	0.22
M+4		1.49			1.55			1.83						1.62			1.74	
soma	3.23	44.80	17.42	3.15	45.20	18.49	3.28	50.25	19.56	3.19		19.35	3.25	49.92	20.09	3.18	49.69	20.16

Tabela 2. Intensidad da frequência nos isotopómeros M, M+1, M+2, M+3, M+4 das amostras de PHB do ensaio com carbono marcado ^{13}C usando BSEV11.

	EA1 3HB			EA2 3HB			EB1 3HB			EB2 3HB			EC1 3HB			EC2 3HB		
	131	87	89	131	87	89	131	87	89	131	87	89	131	87	89	131	87	89
M	1.53	17	10.16	1.77	19.5	11.6	1.77	19.5	11.6	1.87	17.6	10.5	1.46	16.47	9.67	1.85	18.7	12.26
M+1	0.7	6.92	3.58	0.73	7.32	3.66	0.73	7.32	3.66	0.6	6.91	3.03	0.57	6.49	3.29	0.75	8.01	3.86
M+2	0.32	10.2	1.46	0.39	11.64	1.59	0.39	11.6	1.59	0.21	10.5	1.17	0.23	9.67	1.27	0.41	12.3	1.4
M+3	0.05	3.58	0.23	0.06	3.66	0.23	0.06	3.66	0.23	0.08	3.03	0.14	0.05	3.29	0.14	0.05	3.86	0.18
M+4		1.46			1.59			1.59			1.17			1.27			1.4	
soma	2.60	39.11	15.43	2.95	43.71	17.12	2.95	43.71	17.12	2.76	39.21	14.81	2.31	37.19	14.37	3.06	44.20	17.70

ANEXO A - METATOOL

Avaliação de fluxos metabólicos na produção de PHA

A análise de fluxos metabólicos (AFM) será baseada no procedimento proposto por Stephanopoulos et al. (1998). Ao longo do ensaio operado de modo contínuo, nas amostras periódicas retiradas serão analisadas as concentrações de biomassa total, PHA, fontes de carbonos fornecidos e ácidos orgânicos excretados (ácidos acético, pirúvico, fórmico e propiônico), bem como o teor de O₂ e CO₂ nos gases de saída. A partir desses dados, serão calculadas as velocidades específicas de cada um dos substratos consumidos e produtos formados bem como os fatores de conversão dos substratos aos monômeros. Para a efetivação da AFM, modelos de metabolismo serão propostos, avaliando-se os fluxos dos metabólitos intracelulares através da realização do balanço de massa em estado estacionário, utilizando-se das medidas de velocidades específicas e da estequiometria dos modelos de metabolismo propostos.

O programa Metatool (FEIFFER et al., 2000 de acesso livre na internet: <http://pinguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/metatool/> [metatool.html](http://pinguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/metatool/)) será utilizado para simulação do modelo. O programa analisa e constrói vias metabólicas a partir de dados bioquímicos e/ou sequências genômicas. A metodologia adotada para o desenvolvimento desse programa é baseada no conceito de modos elementares de fluxos. A obtenção desses modos elementares de fluxos permite testar se conjuntos de enzimas formam uma via metabólica consistente, compreendendo, principalmente, o direcionamento das reações, a irreversibilidade. A partir da análise de um conjunto de vias metabólicas, o programa gera regiões admissíveis de distribuição de fluxo em estado estacionário, fornecendo as possíveis vias metabólicas juntamente com os respectivos fluxos das enzimas responsáveis pelas reações.

METATOOL – Entradas e saídas

O programa Metatool foi desenvolvido na linguagem C, analisa e constrói vias metabólicas a partir de dados bioquímicos e/ou sequências genômicas.

A metodologia adotada para o desenvolvimento desse programa é baseada no conceito de modos elementares de fluxos. A obtenção desses modos elementares de fluxos permite testar se conjuntos de enzimas formam uma via metabólica consistente, principalmente compreendendo o direcionamento das reações, a irreversibilidade.

A partir da análise de um conjunto de vias metabólicas, o programa gera regiões admissíveis de distribuição de fluxo em estado estacionário, fornecendo as possíveis vias metabólicas juntamente com os respectivos fluxos das enzimas responsáveis pelas reações.

O programa Metatool

Um conjunto de transformações pode ser descrito matematicamente como um sistema de equações diferenciais ordinárias:

$$\frac{dX}{dt} = N \cdot v(X) \quad (1)$$

Onde N é a matriz estequiométrica, v é o vetor das velocidades das reações e X é o vetor das concentrações dos metabólitos internos.

Considerando um exemplo simples como o da Figura C.1, podemos construir as relações (Figura C.2a) que originará a matriz estequiométrica (Figura C.2b).

Figura C. 1: Sistema de reações simples mostrando 4 reações R1, R2, R3 e R4 com um metabólito interno X e 4 metabólitos externos A, B, C e D.

	R1	R2	R3	R4	
X	1	1	-1	-1	(2a)

$$N = \begin{pmatrix} 1 & 1 & -1 & -1 \end{pmatrix} \quad (2b)$$

Figura C.2: Matriz das relações entre reações (colunas da matriz) e metabólito interno (linhas da matriz) (2a) e a matriz estequiométrica N (2b).

No estado estacionário, $dX/dt = 0$ e a equação 1 resulta na equação 2:

$$N \cdot v(X) = 0 \quad (2)$$

O vetor v pode ser decomposto em dois sub-vetores v_{rev} e v_{irr} , que inclui os fluxos das relações reversíveis e irreversíveis, respectivamente.

O conjunto completo de vetores que satisfaz a equação 2 para esse exemplo, ou outro qualquer mais complexo, define uma região chamada de espaço nulo de N . Sua dimensão é dada pela diferença entre o número de reações e o rank de N . Rank é definido como a dimensão da menor matriz de determinante não nulo.

No exemplo apresentado, podemos calcular o espaço nulo de N que satisfaz a Equação 2 e obter os três vetores a seguir.

$$K_1 = (1 \ -1 \ 0 \ 0)^T; \quad K_2 = (1 \ 0 \ 1 \ 0)^T; \quad K_3 = (1 \ 0 \ 0 \ 1)^T$$

Para analisar as reações reversíveis e irreversíveis, podemos decompor o vetor fluxo em dois sub-vetores v_{rev} e v_{irr} , o que inclui os fluxos das reações reversíveis e irreversíveis, respectivamente. Isso implica que os fluxos das reações irreversíveis deverão ser positivos ou nulos, ou seja:

$$v_{\text{irr}} \geq 0 \quad (3)$$

Assim, temos um sistema para resolver composto por um conjunto de equações $N \cdot v(X) = 0$ e uma restrição $v_{\text{irr}} \geq 0$.

Devido a essa restrição, o problema de álgebra linear torna-se um problema com solução na análise convexa, que mostra que a região de todos os vetores v que satisfazem as equações 2 e 3 é representada por um cone convexo poliédrico F .

Os vetores que formam esse cone podem ser de dois tipos: vetores f_k , para as reações irreversíveis onde $-f_k$ não está contido no espaço F e vetores b_i , para as reações reversíveis, cujos negativos $-b_i$ estão contidos em F . Podemos escrever:

$$F = \left\{ v \in \mathbb{R}^r : v = \sum_k \lambda_k f_k + \sum_i \beta_i b_i, \lambda_k, \beta_i \in \mathbb{R}, \lambda_k \geq 0 \right\} \quad r = \text{número de reações no sistema} \quad (3)$$

Para o exemplo dado, podemos obter os vetores que satisfazem as reações reversíveis $\pm b_i = (0 \ 1 \ 0 \ 1)^T$ e as irreversíveis $f_1 = (1 \ -1 \ 0 \ 0)^T$ e $f_2 = (0 \ 1 \ 1 \ 0)^T$.

A Figura C.3 mostra o espaço formado pelos vetores e o cone F , com a forma de uma cunha.

Figura C.3: Cone convexo de fluxo F mostrando o espaço nulo, formado pelos vetores k_1 , k_2 e k_3 e os vetores gerados $\pm b_1$ (reações reversíveis) e f_1 e f_2 (reações irreversíveis).

Como os coeficientes λ_k da equação 3 deve ser positivo ou nulo sempre (restrição) o cone F pode ser considerado como uma combinação convexa dos vetores f_k , b_i e $-b_i$. Esse conjunto dos vetores é definido como a base convexa de F . No exemplo dado, f_1 , f_2 , $-b_1$, b_1 .

Um algoritmo para a construção da base convexa foi apresentado por Nozicka *et al.*(1974) e é baseado no Método de Gauss-Jordan.

Modos elementares de fluxos

Um vetor de fluxo $v = (v_1, v_2, \dots, v_r)$ com alguns de seus componentes iguais a zero pode ser interpretado como um conjunto de enzimas cada qual com um determinado peso. Vetores gerados são transformações estequiométricas plausíveis de um substrato a produto que não podem ser decompostos em um outro vetor.

Para adaptar os sistemas que envolvem tanto reações reversíveis como reações irreversíveis é que foi definido o conceito de modo elementar de fluxo.

Um modo de fluxo é definido como um padrão de fluxo em estado estacionário no qual são fixadas as proporções dos fluxos enquanto os seus valores absolutos são indeterminados.

Por definição, os vetores f_k do cone formado não podem ser decompostos em dois outros vetores que pertençam ao cone:

$$f_K \neq \lambda_1 \cdot v^{(1)} + \lambda_2 \cdot v^{(2)}, \lambda_1, \lambda_2 \geq 0 \quad (4)$$

Um modo de fluxo elementar pode ser definido como uma classe de vetores de fluxo com v^* :

$$M = \{v : v = \mu \cdot v^*, \mu \in \mathbb{R}, \mu \geq 0\} \quad (5)$$

Onde v^* satisfaz as equações 2 e 3 e não pode ser decomposto nos vetores $v^{(1)}$ e $v^{(2)}$, ou seja, os modos elementares contêm a base convexa e formam um conjunto superior ou igual a essa base convexa pois os modos elementares obtidos de uma rede de reações bioquímicas são unicamente determinadas.

No exemplo, os vetores dos modos elementares obtidos pelo programa Metatool foram: (0 1 0 1), (1 -1 0 0), (0 1 1 0), (1 0 1 0) e (1 0 0 1). No entanto, apenas três deles foram necessários para formar a base convexa: $(0 \ 1 \ 0 \ 1)_{\text{rev}}$, $(1 \ -1 \ 0 \ 0)_{\text{irr}}$ e $(0 \ 1 \ 1 \ 0)_{\text{irr}}$.

Referências consultadas

PFEIFFER, T.; SANCHEZ-VALDENEBRO, I.; NUNO, J.C., MONTERO, F.; SCHUSTER, S. Metatool: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v. 15, n. 3, p.251-257, 1999.

NOZICKA, F.; GUDDAT, J.; HOLLATZ, H.; BANK, B. **Theorie der linearen parametrischen Optimierung**. Berlin: Akademie-Verlag, 1974.