



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

ERLON MENDES

**ESTUDO EM ESCALA GENÔMICA DA *Clostridium
acetobutylicum* ATCC 824 PARA A BIOPRODUÇÃO DE
HIDROGÊNIO E CRIAÇÃO DE UM MODELO REGULATÓRIO**

**FLORIANÓPOLIS
2014**

ERLON MENDES

ESTUDO EM ESCALA GENÔMICA DA *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 PARA A BIOPRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E CRIAÇÃO DE UM MODELO REGULATÓRIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior (EQA/UFSC)

FLORIANÓPOLIS
2014

MENDES, Erlon

Estudo em Escala Genômica da *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para a Bioprodução de Hidrogênio e Criação de um Modelo Regulatório.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Engenharia Metabólica – 2. COBRA Toolbox – 3. METoolbox – 4. FBA – 5. regulação – 6. hidrogênio.

ESTUDO EM ESCALA GENÔMICA DA *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 PARA A BIOPRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E CRIAÇÃO DE UM MODELO REGULATÓRIO

por

Erlon Mendes

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de concentração de **Engenharia Genômica e Processos Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior (EQA/UFSC)
orientador

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares (EQA/UFSC)

Prof. Dr. Claus Tröger Pich (UFSC/Araranguá)

Prof. Dr. Eugênio Simão (UFSC/Araranguá)

Prof^a. Dr^a. Gisele Serpa (IFSC/Florianópolis)

Prof. Dr. Elidio Angioletto (UNESC)

Florianópolis, 12 de setembro de 2014

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Ausemir e Acionir, ao meu irmão
Elton e minha esposa Zenair por todo
amor, apoio e incentivo em todos os
momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Agenor Furigo Júnior por viabilizar este trabalho, pela orientação, apoio e amizade.

Um agradecimento especial ao colega e amigo Elidio Angioletto por disponibilizar as instalações do LADEBIMA - Laboratório de Desenvolvimento de Biomateriais e Materiais Antimicrobianos, viabilizar todos os ensaios feitos na UNESC e tantas outras ações que me mantém prosperando nas pesquisas nesta instituição.

Agradeço ao amigo Américo Cruz Júnior por auxílios inestimáveis e grandes idéias durante os meus trabalhos no ENGEPIO - Laboratório de Engenharia Bioquímica.

Agradeço as graduandas do curso de Engenharia Química da UFSC Bárbara Seguin e Eliete Fernanda Testoni por me ajudarem nos primeiros ensaios, e também as graduandas do curso de Engenharia Química da UNESC Danila Niero, Elizandra Alexandre e Naiana Serafim por me ajudarem nos ensaios restantes.

Um agradecimento muito especial aos meus pais Ausemir e Acionir, ao meu irmão Elton e à minha esposa Zenair por toda a compreensão, apoio, amor e carinho dedicados durante toda a minha vida, e que me fizeram chegar até aqui.

RESUMO

A Engenharia Metabólica constitui-se como grande área de conhecimento que utiliza dados genômicos para estudo e mutação sítio-dirigida de organismos, objetivando melhores fatores de conversão de substrato em um produto desejado, geralmente de alto valor agregado. A metodologia empregada neste trabalho iniciou com uma reconstrução *in silico* da *Clostridium acetobutylicum*, bactéria conhecida pela grande produção de acetato, butirato e hidrogênio. Esta reconstrução foi substituída por outra mais recente e pronta para uso, mas ainda foi a melhor opção para a análise de nocaute de genes. Uma Análise de Sensibilidade revelou a possibilidade de substituição de substrato. Esta substituição de substrato foi testada experimentalmente por crescimento em batelada em biorreator anaeróbio. Os trabalhos de reconstrução aqui envolvidos serviram de referência para a correção do METoolbox, que após as correções apresentou os mesmos valores de FBA do COBRA Toolbox, constituindo-se assim como ferramenta bem estabelecida para o estudo de Engenharia Metabólica. Os estudos de Engenharia Metabólica visando maximizar a produção de hidrogênio indicaram a substituição de glicose como substrato por sacarose, maltose ou lactose. Nos ensaios experimentais, taxas de produção de hidrogênio semelhantes às obtidas com glicose foram obtidas com sacarose e maltose, mas claramente inferiores foram obtidas com lactose como substrato. Os estudos *in silico* indicaram também a deleção do gene CAC1742 como alternativa para maximizar a produção de hidrogênio, hipótese ainda não testada experimentalmente. A partir dos modelos não regulados já publicados, um modelo com regulação para a *C. acetobutylicum* foi feito, sendo seus resultados devidamente validados com dados experimentais para diferentes substratos, reproduzidos em Análise de Balanço de Fluxos (FBA), tanto em estado pseudo estacionário quanto dinâmico.

Palavras-chave: Engenharia Metabólica, COBRA Toolbox, METoolbox, FBA, regulação, hidrogênio.

ABSTRACT

Metabolic Engineering established as wide area of knowledge that uses genomic data to study and site-directed mutation of organisms, aiming best yields of substrate to a desired product, usually with high benefit. The methodology in this work began with an *in silico* reconstruction of *Clostridium acetobutylicum*, a bacterium known for high production of acetate, butyrate and hydrogen. We replaced this reconstruction by a newer and ready for use, but it was still the best option for the analysis of gene knockout. A sensitivity analysis revealed the possibility of replacing substrate. We tested this substitution of substrate experimentally by growth in batch anaerobic bioreactor. We use the reconstruction work involved here as reference for the correction of METoolbox, that after presented the same values of FBA COBRA Toolbox, constituting as well established for the study of Metabolic Engineering tool. We made Metabolic Engineering studies to maximize hydrogen production, indicating the replacement of glucose as substrate by sucrose, maltose or lactose. In experimental testing, glucose's similar hydrogen production rates has obtained with sucrose and maltose, but clearly below were obtaine with lactose as substrate. The *in silico* studies also indicated the deletion of CAC1742 gene as an alternative to maximize hydrogen production, experimentally untested hypothesis. From the unregulated models already published, we made a regulated model for *C. acetobutylicum*, with results well validated with experimental data for different substrates, played on Flux Balance Analysis (FBA), in pseudo steady state and dynamic simulation.

Keywords: Metabolic Engineering, COBRA Toolbox, METoolbox, FBA, regulation, hydrogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação estequiométrica da rede metabólica. (a) As primeiras reações da glicólise na forma gráfica. (b) A matriz estequiométrica (S) correspondente à a	33
Figura 2 – Ilustração da programação linear. Os passos (a) à (d) representam a evolução de uma função objetivo na obtenção de uma solução para o sistema.....	36
Figura 3 – Sequência de trabalhos para reconstrução de organismos <i>in silico</i>	39
Figura 4 – Representação estequiométrica da rede metabólica. (a) As primeiras reações da glicólise na forma gráfica. (b) A matriz estequiométrica (S) correspondente à a . (c) Os limites superiores (UB) e inferiores (LB) permitidos para cada reação.	40
Figura 5 – Fluxo de trabalho usado no COBRA Toolbox.....	41
Figura 6 – Meio RCM após a reativação.....	65
Figura 7 – Aparato experimental utilizado.....	66
Figura 8 – Sensibilidade específica para o modelo de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) para a <i>C. acetobutylicum</i> visando à superprodução de hidrogênio.....	73
Figura 9 – Curvas padrões de absorvância vs. concentração para os diferentes substratos testados.	76
Figura 10 – Curva padrão de concentração de células vs. absorvância à 570 nm.....	77
Figura 11 – Dados experimentais da concentração de células (X) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em sacarose e glicose.	78
Figura 12 – Dados experimentais da concentração de substrato (S) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em sacarose e glicose.	78
Figura 13 – Dados experimentais da concentração de hidrogênio (P) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em sacarose e glicose.	79
Figura 14 – Gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo.	79
Figura 15 – Gráfico de X vs. S.....	80
Figura 16 – Gráfico de X vs. P.....	80
Figura 17 – Gráfico da simulação em batelada e dados experimentais de X, S e P em função do tempo, sendo (a) o crescimento em glicose e (b) sacarose.	81

Figura 18 – Dados experimentais da concentração de células (X) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em maltose e glicose.	82
Figura 19 – Dados experimentais da concentração de substrato (S) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em maltose e glicose.	83
Figura 20 – Dados experimentais da concentração de hidrogênio (P) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em maltose e glicose.	83
Figura 21 – Gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo.	84
Figura 22 – Gráfico de X vs. S.	84
Figura 23 – Gráfico de X vs. P.	85
Figura 24 – Gráfico da simulação em batelada e dados experimentais de X, S e P em função do tempo, sendo (a) o crescimento em glicose e (b) maltose.	85
Figura 25 – Dados experimentais da concentração de células (X) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em lactose e glicose.	86
Figura 26 – Dados experimentais da concentração de substrato (S) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em lactose e glicose.	87
Figura 27 – Dados experimentais da concentração de hidrogênio (P) vs. tempo para <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 crescendo em lactose e glicose.	87
Figura 28 – Gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo.	88
Figura 29 – Gráfico de X vs. S.	88
Figura 30 – Gráfico de X vs. P.	89
Figura 31 – Gráfico da simulação em batelada e dados experimentais de X, S e P em função do tempo, sendo (a) o crescimento em glicose e (b) lactose.	89
Figura 32 – Gráfico de validação do modelo com regulação: regulação da glicose sobre o consumo de sacarose. Dados simulados (a) vs. dados experimentais (b), onde ▲ representa a concentração de glicose, ■ sacarose e ● a biomassa.	91
Figura 33 – Gráfico de validação do modelo com regulação: regulação da glicose sobre o consumo de maltose. Dados simulados (a) vs. dados experimentais (b), onde ▲ representa a concentração de glicose, ■ maltose e ● biomassa.	93
Figura 34 – Gráfico de validação do modelo com regulação: regulação da glicose sobre o consumo de lactose. Dados simulados (a) vs. dados	

experimentais (b), onde ▲ representa a concentração de glicose, ■ lactose e ● biomassa.	95
Figura 35 – Velocidades específicas de consumo de substrato e formação de produtos em função da razão de alimentação.	96
Figura 36 – Simulação dinâmica da regulação do glicerol em uma cultura alimentada com glicose e glicerol na proporção de 1:1.....	98
Figura 37 – Variação da função objetivo (taxa de crescimento) (h^{-1}) com o fluxo da reação PGK ($mmol.g\ célula\ seca^{-1}.h^{-1}$).....	113
Figura 38 – Variação da função objetivo (taxa de crescimento) (h^{-1}) com o fluxo da reação TPI ($mmol.g\ célula\ seca^{-1}.h^{-1}$).....	114
Figura 39 – FBA dinâmica da <i>E. coli</i> , indicando a formação de biomassa ($g\ célula\ seca.L^{-1}$), de acetato ($mmol.L^{-1}$) e consumo de glicose ($mmol.L^{-1}$) em função do tempo (h).	116
Figura 40 – Predição da razão entre a taxa de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> mutada e selvagem em relação ao gene deletado.	118
Figura 41 – Distribuição do número de interações sintéticas letais e doentias para cada um dos 147 genes que participam de pelo menos uma destas interações.	119
Figura 42 – Amostragem de fluxos da <i>E. coli</i> . Histogramas de distribuição de fluxos (diagonal) e gráficos de dispersão de pares (fora da diagonal).	123
Figura 43 – A importação dos arquivos .sif e .noa para o Cytoscape..	125
Figura 44 – Principais customizações necessárias para identificar a reversibilidade das reações e os subsistemas reacionais. As setas de origem (a) e destino (b) para as reações irreversíveis, associação gênica e reações reversíveis. Em (c) foram escolhidas as cores para os diferentes subsistemas.	126
Figura 45 – Conjunto de reações correlatas na levedura. Gráfico gerado no programa Cytoscape, importando os arquivos gerados pelo COBRA Toolbox, selecionando Layout > yFiles > Organics e customizando cores para os diferentes subsistemas.	127
Figura 46 – Mapa metabólico da reação isocitrato desidrogenase.	130
Figura 47 – Mapa metabólico completo, gerado a partir do arquivo <i>ecoli_core_map.txt</i> , presente no COBRA Toolbox.	131
Figura 48 – FBA gráfico do modelo simplificado da <i>E. coli</i>	132
Figura 49 – FVA gráfico do modelo simplificado da <i>E. coli</i>	134
Figura 50 – FBA parcimonioso com crescimento em (a) glicose e (b) acetato.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de compartimentos e respectivas siglas.	45
Tabela 2 – Reações excluídas da busca pelo melhor nocaute.	59
Tabela 3 – Reações candidatas ao nocaute.	60
Tabela 4 – Meio clostridial reforçado (RCM) para a pré-cultura.	64
Tabela 5 – Meio de fermentação.	65
Tabela 6 – Comprimentos de onda para o método de Dubois <i>et al.</i> (1956).	67
Tabela 7 – Gaps encontrados no modelo de LEE <i>et al.</i> (2008) utilizando a função <i>gapFind</i> do COBRA Toolbox.	69
Tabela 8 – FBA comparativa entre três versões do modelo <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>in silico</i>	72
Tabela 9 – FBA comparativa entre a <i>C. acetobutylicum</i> mutada e selvagem crescendo em glicose.	74
Tabela 10 – FBA comparativa entre os diferentes toolboxes.	74
Tabela 11 – Síntese dos resultados para o crescimento da <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> em sacarose, maltose e lactose vs. glicose.	90
Tabela 12 – Comparação entre os dados simulados por FBA com regulação e os dados experimentais de Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994).	97
Tabela 13 – Resultados obtidos por OptKnock e GDLS no modelo <i>ecoli_core_model</i> para superprodução de lactato.	139
Tabela 14 – Reações do modelo completo após a remoção de <i>gaps</i>	141
Tabela 15 – Reações do modelo simplificado da <i>C. acetobutylicum</i> (OLIVEIRA, 2008).	173
Tabela 16 – Metabólitos do modelo completo da <i>C. acetobutylicum</i> (LEE <i>et al.</i> , 2008).	175
Tabela 17 – Reações do modelo completo da <i>C. acetobutylicum</i> (LEE <i>et al.</i> , 2008).	192

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μ . Velocidade específica de crescimento celular
- ac(e). Acetato extracelular
- adp. ADP (Difosfato de adenosina)
- atp. ATP (Trifosfato de adenosina)
- BiGG. Base de conhecimentos Bioquímicos, Genéticos e Genômicos de reconstruções metabólicas em larga escala (*Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions*)
- btoh(e). Butanol extracelular
- but(e). Butirato extracelular
- COBRA. Reconstrução e Análise Baseadas em Restrições (*Constraint-based Reconstruction and Analysis*)
- CPLEX (ILOG). Solver de programação linear em larga escala com integradores mistos e programação quadrática
- dhap. Dihidroxiacetona fosfato
- DNA. Ácido desoxirribonucleico
- ENO. Reação enolase
- etoh(e). Etanol extracelular
- EX_glc-D. *Exchange reaction* para glicose, que permite que a glicose entre e saia do sistema
- f6p. D-Frutose 6-fosfato
- FBA. Reação frutose bifosfato aldolase, Análise de Balanço de Fluxos (*Flux Balance Analysis*)
- FBP. Reação frutose bifosfatase
- FBrAtio. Análise de Balanço de Fluxos com Taxas de Reação (*Flux Balance Analysis with Flux Ratios*)
- fdp. D-Frutose 1,6-bifosfato
- FVA. Análise de variabilidade de fluxos (*Flux Variability Analysis*)
- G. Matriz estequiométrica com reações nas linhas e metabólitos nas colunas
- g3p. Gliceraldeído 3-fosfato
- g6p. α D-Glicose 6-fosfato
- G_c. Parte da matriz estequiométrica referente aos fluxos que serão calculados
- GDLS. Genetic design local search
- glc(e). Glicose extracelular
- glc-D. α D-Glicose
- glc-D[e]. α D-Glicose extracelular

GLCt1. Reação de transporte da D-glicose via próton simporte
GLPK. Kit livre de programação linear (GNU *Linear Programming Kit*)
glyc(e). Glicerol extracelular
G_m. Parte da matriz estequiométrica referente aos fluxos
experimentalmente medidos
GNU. Fundação de softwares livres
H. H⁺ (Íon hidrogênio)
h2(e). Hidrogênio extracelular
h2o. Água
HEX1. Reação hexoquinase D-glicose ATP
KEGG. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
lcts(e). Lactose extracelular
IMOMA. Versão linear da minimização de adaptação metabólica
malt(e). Maltose extracelular
MCA. Análise de Controle Metabólico (*Metabolic Control Analysis*)
METtoolbox. Toolbox de Engenharia Metabólica (*Metabolic
Engineering Toolbox*)
MFA. Análise de Fluxo Metabólico (*Metabolic Flux Analysis*)
noGLC. Gene hipotético que representa a ausência de glicose
ORF. Quadro Aberto de Leitura (*Open Reading Frame*)
PFK. Reação fosfofrutoquinase
PGI. Reação glicose 6-fosfato isomerase
PGK. Fosfoglicerato quinase
PGM. Fosfoglicerato mutase
pi. Fosfato
PTS. Sistema fosfotransferase (*Phosphotransferase System*)
RCM. Meio Clostridial Reforçado (*Reinforced Clostridial Medium*)
r_{met}. Rede das taxas de síntese dos intermediários nas reações da via
metabólica
S. Matriz estequiométrica com metabólitos nas linhas e reações nas
colunas
SBML. Linguagem de Marcação de Sistemas Biológicos (*Systems
Biology Markup Language*)
sucr(e). Sacarose extracelular
TPI. Reação triose fosfato isomerase
v. Vetor dos fluxos de cada reação
v^{acid}. Vetor de fluxos na fase acidogênica
v^{acid}_{ac out}. Fluxo de secreção de acetato previamente calculado na fase
acidogênica
v^{acid}_{bu out}. Fluxo de secreção de butirato previamente calculado na fase
acidogênica

v_c . Vetor dos fluxos que serão calculados

v_m . Vetor dos fluxos experimentalmente medidos

v^{sol} . Vetor dos fluxos desejados na fase solvetogênica

$v^{sol}_{ac\ up}$. Fluxo de consumo de acetato desejado na fase solvetogênica

$v^{sol}_{bu\ up}$. Fluxo de consumo de butirato desejado na fase solvetogênica

XLS. Planilhas do Microsoft Excel

X_{met} . Rede de concentrações dos intermediários

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1	A Análise de Fluxo Metabólico (MFA).....	31
3.2	A Análise de Balanço de Fluxos (FBA).....	35
3.3	A Análise de Sensibilidade.....	38
3.4	O COBRA Toolbox.....	38
3.5	O SBML Toolbox e a Estrutura dos Organismos <i>in silico</i> 41	
3.6	A <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 e a Produção de Hidrogênio.....	45
3.7	A Reconstrução em Escala Genômica da <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>in silico</i>	46
3.8	Considerações Finais.....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	A Reconstrução em Escala Genômica da <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>in silico</i>	51
4.2	A Construção do Modelo com Regulação para a <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> ATCC 824.....	51
4.3	Análise de Sensibilidade da <i>C. acetobutylicum</i>	55
4.4	Simulação da <i>C. acetobutylicum</i> Crescendo em Glicose, Glicerol, Sacarose, Lactose e Maltose.....	55
4.5	FBA Dinâmica da <i>C. acetobutylicum</i>	56
4.6	Nocaut de Genes da <i>C. acetobutylicum</i>	58
4.7	Correção da Função mfaop do METoolbox.....	63
4.8	Procedimento Experimental para o Crescimento da <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> Com Diferentes Substratos.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1	A Reconstrução em Escala Genômica da <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>in silico</i>	69
5.2	Análise de Sensibilidade da <i>C. acetobutylicum</i>	72

5.3	Nocaute de Genes da <i>C. acetobutylicum</i>	73
5.4	Correção da Função mfaop do METoolbox	74
5.5	O Crescimento da <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 em Sacarose, Maltose e Lactose vs. Glicose.....	76
5.5.1	<i>Crescimento em Sacarose vs. Glicose</i>	77
5.5.2	<i>Crescimento em Maltose vs. Glicose</i>	82
5.5.3	<i>Crescimento em Lactose vs. Glicose</i>	86
5.5.4	<i>Síntese dos Resultados</i>	90
5.6	Simulações do Modelo com Regulação e Validação com Dados Experimentais.....	90
6	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – GUIA DE INSTALAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO COBRA TOOLBOX.....	105
	Inicialização do Toolbox	105
	Leitura e Exportação de Modelos em Formato SBML e XLS..	106
	Alteração dos Limites das Reações	108
	Adição e/ou Remoção Reações do Modelo.....	109
	Mudança do Objetivo do Modelo.....	110
	Exibição de Fórmulas de Reações	110
	Simulação do Crescimento Máximo Usando Análise de Balanço de Fluxos (FBA)	111
	Análise de Robustez.....	112
	Simulações de Crescimento com FBA Dinâmica (Simulações de Crescimento em Batelada)	114
	Simulações de Fenótipos da Deleção de Genes e Interações Epistáticas	116
	Análise de Variabilidade de Fluxos (FVA)	120
	Amostragem das Distribuições de Fluxo Permitidas.....	121
	Módulos em Redes Metabólicas	123
	COBRA 2.0, Novas Funções	127
	Leitura e exibição de mapas metabólicos	127
	FBA e FVA visualizadas em mapas metabólicos	131
	FBA parcimoniosa	134
	Preenchimento de lacunas (Gap filling)	136
	Engenharia metabólica (nocaute de genes).....	137
	APÊNDICE B – MODELO COMPLETO APÓS A REMOÇÃO DE GAPS	141

APÊNDICE C – FUNÇÕES CORRIGIDAS DO METOOLBOX E NOVA FUNÇÃO PARA ANÁLISE DE SENSIBILIDADE INTEGRADA AO COBRA TOOLBOX	163
Função hydrooptimized_main do METoolbox.....	163
Função vioptimized_main do METoolbox.....	165
Função mfaop do METoolbox	165
Função sensitivity para o COBRA Toolbox	168
APÊNDICE D – MODELO COM REGULAÇÃO	171
ANEXO A – MODELO SIMPLIFICADO DA <i>C. acetobutylicum</i>	173
ANEXO B – MODELO COMPLETO DA <i>C. acetobutylicum</i>	175

1 INTRODUÇÃO

A utilização de células microbianas de plantas ou mamíferas sempre foi a base da indústria de bioprocessamento, objetivando a conversão de um substrato, como glicose, glicerol e até rejeitos urbanos ou industriais, em produtos de alto valor agregado, como antibióticos, aminoácidos, solventes e vacinas. No início da década de noventa, diante do desenvolvimento das técnicas de recombinação do DNA, surgiram os primeiros esforços para a obtenção de organismos geneticamente modificados, dando início ao campo altamente multidisciplinar da engenharia metabólica.

Os estudos de engenharia metabólica culminam na obtenção de células “engenheiradas” com altos rendimentos para o produto desejado, em detrimento dos subprodutos de menor interesse. Para este fim, foram desenvolvidas ferramentas que direcionam os esforços experimentais a partir das quantificações dos fluxos intracelulares, marcando a passagem de modelos *black box* para *grey box*.

A Análise de Controle Metabólico (do inglês, *Metabolic Control Analysis* - MCA), a Análise de Fluxo Metabólico (do inglês, *Metabolic Flux Analysis* - MFA) e a Análise de Marcadores Isotópicos caracterizaram-se como as principais ferramentas para o estudo em escala genômica de microrganismos. No entanto, os dados experimentais necessários a tais análises eram numerosos e de difícil obtenção, o que resultava em modelos metabólicos limitados em reações.

Esforços de Bell e Palsson (2005) levaram à criação de mais uma análise de Engenharia Metabólica, a Análise de Balanço de Fluxos (do inglês, *Flux Balance Analysis* - FBA). A FBA utiliza ferramentas de programação linear para prever fluxos submetidos a restrições e a uma função objetivo, que geralmente é a maximização do crescimento celular.

Da FBA, Becker *et al.* (2007) criaram a Reconstrução e Análise Baseadas em Restrições (do inglês, *Constraint-based Reconstruction and Analysis*), o COBRA Toolbox, que permite uma série de análises quantitativas do metabolismo celular, incluindo simulações dinâmicas, uma grande inovação da FBA não contemplada anteriormente pela MFA.

O COBRA Toolbox utiliza organismos *in silico* na Linguagem de Marcação de Sistemas Biológicos (do inglês, *Systems Biology Markup*

Language - SBML). Schellenberger *et al.* (2010) anunciaram a construção de um banco de dados onde disponibiliza organismos *in silico* em arquivos SBML, o BiGG Database (*Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions*), contando atualmente com apenas dez organismos.

O número de reações para estes organismos é outro fator de contraste em relação à MFA. Organismos como o *Bacillus subtilis* possuem sua reconstrução *in silico* abrangendo cerca de 19% dos quadros abertos de leitura (*Open Reading Frame* - ORF's) do seu genoma, um número impensável na MFA devido às limitações experimentais.

Um organismo recentemente reconstruído em escala genômica foi a *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, cujos estudos de Castro (2010) evidenciam as possibilidades de utilização deste microrganismo na bioprodução de hidrogênio.

A *C. acetobutylicum* ATCC 824 *in silico* publicada por Lee *et al.* (2008) não teve seu arquivo SBML disponibilizado, o que obrigou sua reprodução para as análises de engenharia metabólica posteriores.

O presente trabalho concentra-se na Análise de Sensibilidade, utilizando uma função do METoolbox (do inglês, *Metabolic Engineering Toolbox*) (MENDES, 2006) adaptada ao COBRA Toolbox, na FBA dinâmica e na análise de nocaute de genes da *C. acetobutylicum* ATCC 824 *in silico*, utilizando o COBRA Toolbox, buscando a maximização da produção de hidrogênio. Tais análises levantaram hipóteses, algumas envolvendo a substituição de substrato e outras a mutação da bactéria por nocaute de genes. As hipóteses de substituição de substrato foram testadas experimentalmente.

Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) publicaram um modelo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 mais abrangente, atual e com seus arquivos SBML e MAT disponibilizados no grupo de discussões do COBRA Toolbox. Estes arquivos serviram de base para confirmação das análises de sensibilidade e construção de um modelo com regulação. Um modelo com regulação em escala genômica para a *C. acetobutylicum* é criação inédita e de fundamental importância para os estudos de Engenharia Metabólica futuros, pois as evidências experimentais já publicadas não podem ser reproduzidas por modelos não regulados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Criar um modelo com regulação para a *C. acetobutylicum* ATCC 824 e aplicá-lo em estudo de Engenharia Metabólica *in silico* visando maximizar a produção de hidrogênio.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho abrange os seguintes objetivos específicos:

- Realizar a Análise de Sensibilidade específica dos fluxos extracelulares da *C. acetobutylicum in silico*, com relação ao fluxo de produção de hidrogênio;
- Analisar o nocaute de genes, visando otimizar a bioprodução de hidrogênio;
- Testar experimentalmente se a substituição de substrato aumentará a produção de hidrogênio por *C. acetobutylicum* com base na Análise de Sensibilidade;
- Construir um modelo para a *C. acetobutylicum* com regulação e validar seus resultados com dados experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A quantificação da magnitude dos fluxos metabólicos *in vivo* é um importante objetivo em fisiologia celular e engenharia metabólica, principalmente no que diz respeito à produção de compostos úteis comercialmente e cientificamente. Com este objetivo foram desenvolvidas metodologias como a Análise de Fluxo Metabólico (MFA), a Análise de Controle Metabólico (MCA) e a Análise de Balanço de Fluxos (FBA).

A Análise de Fluxo Metabólico visa a obtenção de fluxos, na sua maioria intracelulares, a partir de balanços de massa e de alguns fluxos experimentalmente medidos de forma a obter um sistema de equações algébricas determinado ou superdeterminado. A Análise de Controle Metabólico estuda cada reação do metabolismo celular de forma ainda mais específica, onde são atribuídas leis de velocidade para cada reação em vias lineares e pontos de bifurcação. A Análise de Balanço de Fluxos baseia-se em modelos em larga escala (modelos em escala genômica), utilizando técnicas de otimização linear para a obtenção de um número representativo de fluxos intra e extracelulares submetidos a restrições e a uma função objetivo.

Apesar da Análise de Fluxo Metabólico e da Análise de Balanço de Fluxos compartilharem originalmente do mesmo objetivo, a situação atual mostra vantagens e desvantagens de ambos os métodos. Entre as desvantagens destacam-se o grande número de dados experimentais exigidos pela Análise de Fluxo Metabólico e a eliminação de todas as vias metabólicas que não estejam diretamente ligadas com a função objetivo na Análise de Balanço de Fluxos.

O estudo da bioprodução de hidrogênio por *C. acetobutylicum* será feito utilizando o COBRA Toolbox, que se baseia, principalmente, na Análise de Balanço de Fluxos. Por esse motivo esta revisão bibliográfica não abordará a Análise de Controle Metabólico, mas iniciará com a Análise de Fluxo Metabólico por apresentar semelhanças importantes com a Análise de Balanço de Fluxos.

3.1 A Análise de Fluxo Metabólico (MFA)

A Análise de Fluxo Metabólico é uma metodologia eficiente para a obtenção dos fluxos metabólicos, onde as reações intracelulares são

quantificadas a partir de fluxos extracelulares utilizando modelos estequiométricos e técnicas de balanço de massa.

A forma geral da equação do balanço de massa para um estado variável é dada pela seguinte equação diferencial (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998):

$$\frac{dX_{\text{met}}}{dt} = \mathbf{r}_{\text{met}} - \mu \cdot X_{\text{met}} \quad (1)$$

O primeiro termo do lado direito representa a rede das taxas de síntese dos intermediários nas reações da via metabólica. O segundo termo descreve a diluição do conjunto de metabólitos devido ao crescimento da biomassa. No entanto, devido ao baixo nível intracelular da maioria dos metabólitos, tais efeitos de diluição são considerados muito pequenos se comparados com os fluxos que afetam os mesmos metabólitos. Isso faz com que o segundo termo do lado direito da Equação (1) seja usualmente considerado zero. Admitindo que exista uma alta regeneração da maioria dos metabólitos, suas concentrações rapidamente se ajustam aos novos níveis, fazendo com que a hipótese de estado pseudo-estacionário seja aplicável. Isso faz com que o primeiro termo da Equação (1) seja igualado a zero. As taxas de síntese de cada reação podem ser decompostas como o produto da transposta da matriz estequiométrica e o vetor de todas as taxas de reação. Logo, chega-se ao seguinte balanço simplificado:

$$\mathbf{0} = \mathbf{r}_{\text{met}} = \mathbf{G}' \cdot \mathbf{v} \quad (2)$$

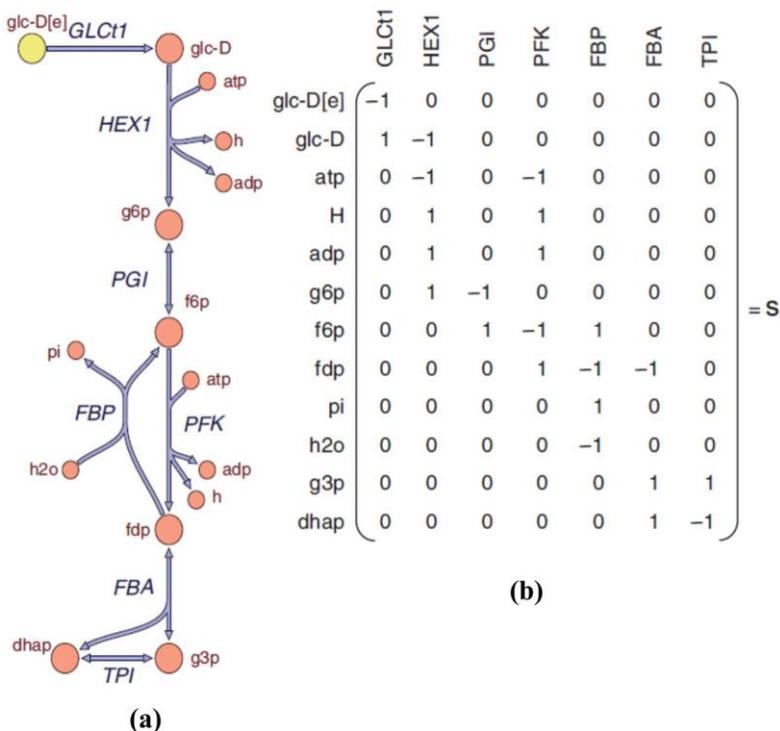
onde \mathbf{G} representa a matriz dos coeficientes estequiométricos, chamada matriz estequiométrica, e \mathbf{v} representa o vetor dos fluxos de cada reação. A linha na Equação (2) representa a transposta da matriz estequiométrica \mathbf{G} . Como apenas a transposta de \mathbf{G} é utilizada nos cálculos subsequentes, a maior parte da literatura atual chama a transposta de \mathbf{G} de matriz estequiométrica \mathbf{S} , resultando na seguinte equação universal:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0} \quad (3)$$

A matriz estequiométrica, \mathbf{S} , é a peça central da representação matemática das conexões metabólicas em escala genômica. Esta matriz representa cada reação como uma coluna e cada metabólito como uma

linha, onde cada elemento numérico é o coeficiente estequiométrico correspondente. A Figura 1a mostra uma forma gráfica das primeiras reações da glicólise e a Figura 1b sua correspondente matriz estequiométrica.

Figura 1 – Representação estequiométrica da rede metabólica. (a) As primeiras reações da glicólise na forma gráfica. (b) A matriz estequiométrica (S) correspondente à a.



Fonte: Becker *et al.* (2007).

As Equações (2) e (3) são a base para Análise de Fluxo Metabólico e representam K balanços algébricos lineares para K metabólitos com J fluxos desconhecidos, tomando-se como base uma matriz G de ordem $J \times K$. Como o número de reações (J) é sempre maior que o número de metabólitos da via (K), existe sempre certo grau de liberdade no conjunto de equações algébricas dado por $F = J - K$.

Portanto, para solução do sistema, alguns elementos de “ \mathbf{v} ” devem ser medidos ou conhecidos para que o sistema seja determinado. Se exatamente F fluxos são medidos, o sistema torna-se *determinado* e a solução é única. Caso o número de fluxos medidos seja superior a F , o sistema é *superdeterminado*, significando que existem equações extras que podem ser usadas para testar a consistência dos balanços globais. No entanto, se o número de fluxos medidos é inferior a F , o sistema é *subdeterminado*, e os fluxos desconhecidos podem ser determinados apenas se restrições adicionais forem induzidas ou se um critério de otimização global for imposto aos balanços metabólicos, caso que será abordado no item 3.2, a Análise de Balanço de Fluxos. Em um sistema determinado, é possível obter os fluxos desconhecidos particionando a Equação (2) da seguinte forma:

$$\mathbf{0} = \mathbf{G}' \cdot \mathbf{v} = \mathbf{G}'_{\mathbf{m}} \cdot \mathbf{v}_{\mathbf{m}} + \mathbf{G}'_{\mathbf{c}} \cdot \mathbf{v}_{\mathbf{c}}, \quad (4)$$

onde os índices \mathbf{m} e \mathbf{c} representam os fluxos medidos e os que se deseja calcular, respectivamente. Uma vez que F é exatamente igual ao número de fluxos medidos (sistema determinado), $\mathbf{G}'_{\mathbf{c}}$ é uma matriz quadrada (dimensões $K \times K$) e, portanto, inversível. Os elementos de $\mathbf{v}_{\mathbf{c}}$ podem, então, ser obtidos pela Equação (5):

$$\mathbf{v}_{\mathbf{c}} = -(\mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{-1} \cdot \mathbf{G}'_{\mathbf{m}} \cdot \mathbf{v}_{\mathbf{m}} \quad (5)$$

Para os sistemas superdeterminados, $\mathbf{G}'_{\mathbf{c}}$ não é inversível e a solução para a Equação (5) pode ser obtida pelo uso da pseudo-inversa de Moore-Penrose.

$$(\mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{\#} = (\mathbf{G}'_{\mathbf{c}} \cdot \mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{-1} \cdot \mathbf{G}'_{\mathbf{c}} \quad (6)$$

Desta forma, a Equação (5) passa a ser:

$$\mathbf{v}_{\mathbf{c}} = -(\mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{\#} \cdot \mathbf{G}'_{\mathbf{m}} \cdot \mathbf{v}_{\mathbf{m}} \quad (7)$$

Observe que, se $\mathbf{G}'_{\mathbf{c}}$ é uma matriz quadrada, sua pseudo-inversa será a própria inversa.

Torna-se evidente, ao observar as Equações (5) e (7), a necessidade do conhecimento de vários fluxos medidos experimentalmente, $\mathbf{v}_{\mathbf{m}}$. Quanto mais reações são descritas na matriz estequiométrica \mathbf{G} , maior a necessidade de dados experimentais para a

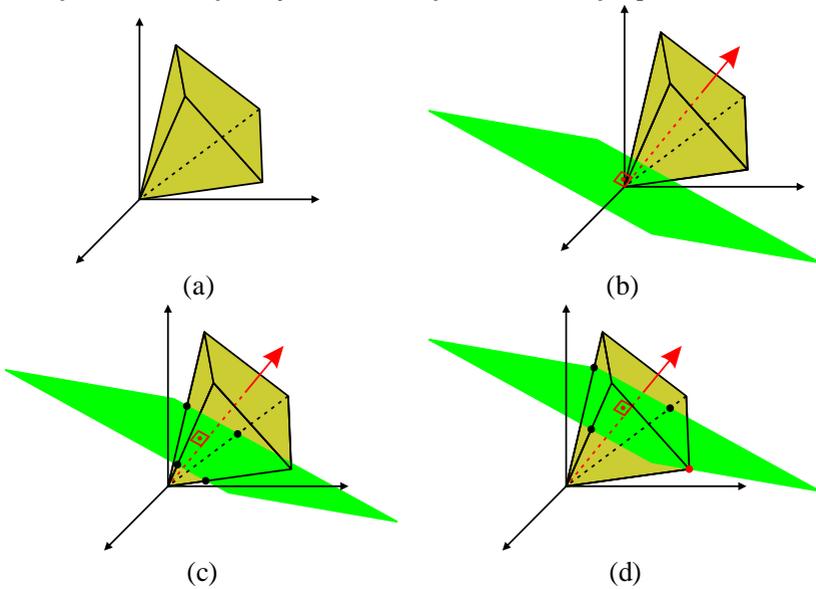
obtenção de um sistema linear determinado, possibilitando a conclusão de uma Análise de Fluxo Metabólico. Tal limitação invariavelmente leva a escolha das vias metabólicas de maior importância, minimizando a expressão do modelo diante de todos os quadros abertos de leitura (ORF's) presentes no genoma do organismo estudado; em outras palavras, os modelos estudados na Análise de Fluxo Metabólico são significativamente menores do que os modelos baseados em restrições, estudados na Análise de Balanço de Fluxos.

3.2 A Análise de Balanço de Fluxos (FBA)

Quando o número de fluxos medidos é inferior ao grau de liberdade do sistema, existe um número infinito de soluções para os fluxos metabólicos (sistema subdeterminado). Nesses casos, a programação linear pode ser usada para determinar a distribuição dos fluxos. Para tanto, torna-se necessário o uso de uma função que força a solução do sistema para satisfazer determinado objetivo, a chamada *função objetivo*.

Para melhor entender o procedimento, considere o espaço metabólico composto por quatro reações restringidas pelo espaço de soluções permitidas indicado em amarelo na Figura 2a. Supondo que se tenha o fluxo indicado pela linha vermelha como função objetivo, a maximização do mesmo será obtida seguindo-se um plano normal a este fluxo (plano verde na Figura 2b e c) até que o mesmo encontre uma das restrições, encontro indicado pelo ponto vermelho da Figura 2d. Os demais fluxos são então determinados conforme mostrados pelos pontos negros da Figura 2d.

Figura 2 – Ilustração da programação linear. Os passos (a) à (d) representam a evolução de uma função objetivo na obtenção de uma solução para o sistema.



Fonte: Do autor.

Em uma situação real de um organismo *in silico*, cada reação corresponde a um fluxo e a função objetivo geralmente é a reação hipotética de formação da biomassa. As restrições correspondem aos valores máximos e mínimos das taxas de cada uma das reações do modelo. Reações com dados experimentais facilmente obtidos, como as de consumo de substrato, possuem suas taxas restritas a um espaço menor de possibilidades. Já reações de taxas desconhecidas, como as dos inúmeros metabólitos intermediários, recebem restrições abrangentes que só distinguem reações reversíveis de irreversíveis. A maximização da função objetivo gera uma solução real, possivelmente não única, de um sistema subdeterminado.

Varma, Boesch e Palsson (1993) usaram MFA por programação linear para interpretar o catabolismo da glicose por *Escherichia coli* sob vários níveis de oxigenação. Neste trabalho foi possível prever as mudanças no metabolismo celular quando o consumo de oxigênio vai ficando debilitado. A sequência de produtos que é obtida na passagem de um sistema aeróbico para anaeróbico (acetato, formato e etanol) foi reproduzida com programação linear usando a maximização da taxa de formação de biomassa como função objetivo.

Ozkan *et al.* (2005) fizeram mutantes de *E. coli* para superprodução da proteína de ligação *glicose isomerase-maltose* (GImalE). O estudo do metabolismo da bactéria mutante foi feito usando MFA por programação linear em um sistema de 411 reações, também usando a taxa de formação de biomassa como função objetivo.

Bell e Palsson (2005) introduziram a teoria da análise do plano fase, cuja principal diferença da Análise de Fluxo Metabólico convencional é a definição de um campo de comportamentos fenotípicos ótimos quando duas condições variam. Suas aplicações incluem a comparação do crescimento de uma linhagem em diferentes substratos, análise das consequências de deleções no gene e de outros tipos de mutação.

Atualmente, a análise do plano fase é chamada de Análise de Balanço de Fluxos (FBA), cuja liberdade de representação das vias metabólicas, permitindo um número de reações jamais visto, e excelentes predições experimentalmente validadas, consagraram esta ferramenta nos estudos de Engenharia Metabólica. Devido ao grande número de reações, tais reconstruções são chamadas de reconstruções *in silico* de larga escala.

Embora o objetivo inicial da Análise de Balanço de Fluxos tenha sido obter todos os fluxos celulares, os resultados mostraram-se pobres para fluxos intracelulares porque as vias metabólicas não diretamente ligadas à função objetivo são zeradas. No entanto, tendências e variações no metabolismo diante de alterações de substrato ou de acceptor final de elétrons foram modeladas com sucesso. Uma alternativa para resolver este problema é restringir ainda mais os fluxos, diminuindo o número de soluções possíveis. Uma revisão sobre este tema foi feita por Reed (2012).

Juntamente com a reconstrução metabólica, os modelos *in silico* mais atuais contém também uma representação booleana de parte da rede regulatória transcricional. Em resposta a estímulos externos e internos, fatores transcricionais ativam ou reprimem genes associados a reações metabólicas. Esta regulação melhora a fidelidade preditiva do modelo metabólico pela imposição de um contexto adicional à restrições de genes específicos, podendo tanto induzi-los completamente quanto reprimi-los totalmente. Se os genes associados à uma enzima ou complexo proteico de transporte são reprimidos, então o fluxo *in silico* é levado a zero para a reação correspondente (ORTH, FLEMING e PALSSON, 2009).

3.3 A Análise de Sensibilidade

A Análise de Sensibilidade, desenvolvida por Stephanopoulos, Aristidou e Nielsen (1998), gera as sensibilidades acumuladas em toda a rede metabólica, mostrando quais fluxos medidos têm maior importância em toda a rede, e as sensibilidades com relação a um fluxo de interesse. A Equação (8) mostra a sensibilidade dos fluxos calculados a pequenas perturbações nas medidas.

$$\frac{dv_c}{dv_m} = -(\mathbf{G}'_c)^{\#} \mathbf{G}'_m. \quad (8)$$

Apesar do lado esquerdo da equação apresentar fluxos medidos experimentalmente, apenas a derivada $\frac{dv_c}{dv_m}$ fornece a sensibilidade.

Como o lado direito não necessita de nada além da matriz estequiométrica, a Análise de Sensibilidade não é influenciada por fluxos medidos experimentalmente. Dessa forma a Análise de Sensibilidade pode ser adaptada à análise de balanço de fluxo, como feito anteriormente por Mendes (2006) e, conseqüentemente, ao COBRA Toolbox (funções `mfaop` e `sensitivity` do Apêndice C, respectivamente).

Existem duas classes de Análise de Sensibilidade, a sensibilidade acumulada, referente ao somatório da sensibilidade de todos os fluxos extracelulares, e a sensibilidade específica, referente apenas ao metabólito alvo, aquele que se deseja a superprodução.

A principal aplicação desta análise é verificar qual fluxo apresenta maior influência sobre um fluxo de interesse, sendo um bom indicativo para deleção de gene e superprodução do metabólito de interesse.

3.4 O COBRA Toolbox

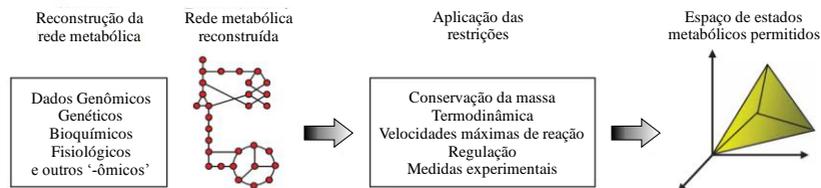
O COBRA Toolbox é um pacote de funções, criado pelo Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos da Universidade da Califórnia – San Diego, aplicado ao ambiente MATLAB que permite fazer predições quantitativas do metabolismo celular utilizando uma abordagem baseada em restrições.

Especificamente, este software permite predições computacionais tanto no estado estacionário (sistemas contínuos) quanto no dinâmico

(batelada) do comportamento ótimo de crescimento, dos efeitos da deleção de genes, análise na abrangência da robustez, amostragem da extensão dos possíveis estados metabólicos e a determinação de módulos de cruzamento (BECKER *et al.*, 2007).

A estratégia para reconstrução e análise baseada em restrições é indicada na Figura 3.

Figura 3 – Sequência de trabalhos para reconstrução de organismos *in silico*.



Fonte: Becker *et al.* (2007).

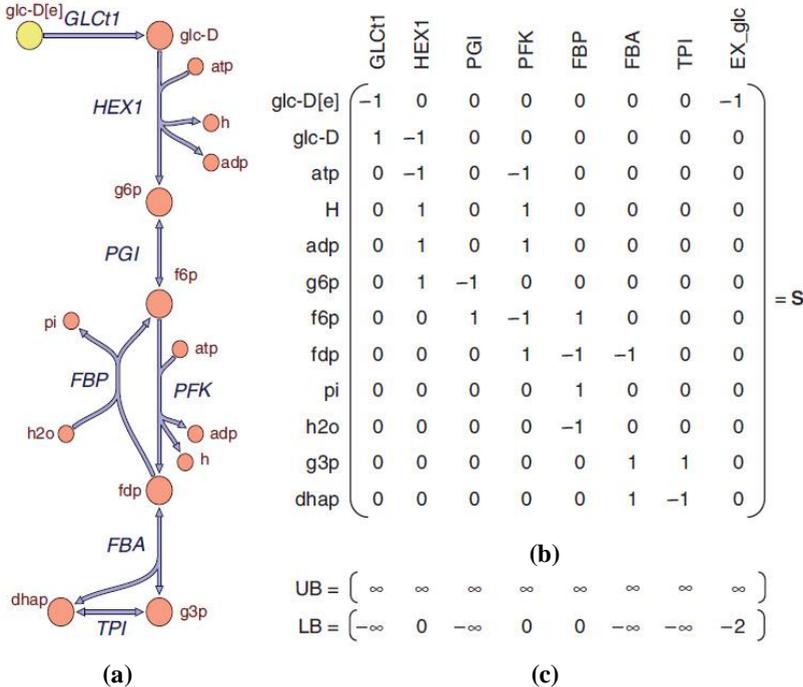
Um número de diferentes tipos de restrições físicas, químicas e biológicas pode ser usado para determinar a extensão dos potenciais estados que uma rede de reações bioquímicas pode alcançar. No caso do metabolismo, estes estados correspondem a diferentes distribuições de fluxo através da rede metabólica.

A principal diferença entre a MFA e a FBA reside na aplicação das restrições. Na MFA as restrições são todas experimentais, residindo exclusivamente no conhecimento dos fluxos necessários para que o sistema apresentado na Equação (3) seja possível, gerando uma única solução e sempre no estado pseudo-estacionário. Já na FBA as restrições geram um espaço de soluções permitidas para a Equação (3) com base em observações experimentais. Estas observações experimentais geralmente estão relacionadas com a reversibilidade das reações, mas também podem ser fluxos máximos e mínimos possíveis para reações conhecidas (Figura 4c). Das reações da Figura 4, excetuando o transporte de glicose para dentro da célula (GLCt1), três são reversíveis (PGI, FBA e TPI). Na Figura 4b, EX_glc é uma *exchange reaction* para glicose, que permite que a glicose entre e saia do sistema. Para esta reação foi atribuído um limite inferior -2, indicando uma potencial taxa de consumo de glicose de $2 \text{ mmol.gDW}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Na FBA a matriz estequiométrica e as restrições aplicadas à mesma geram um espaço de soluções possíveis para a Equação (3), mas que permitem a obtenção de uma única solução ao utilizar programação linear segundo uma função objetivo adequada. Excelentes predições do

comportamento celular têm sido verificadas utilizando a maximização da velocidade de crescimento como função objetivo.

Figura 4 – Representação estequiométrica da rede metabólica. **(a)** As primeiras reações da glicólise na forma gráfica. **(b)** A matriz estequiométrica (**S**) correspondente à **a**. **(c)** Os limites superiores (UB) e inferiores (LB) permitidos para cada reação.

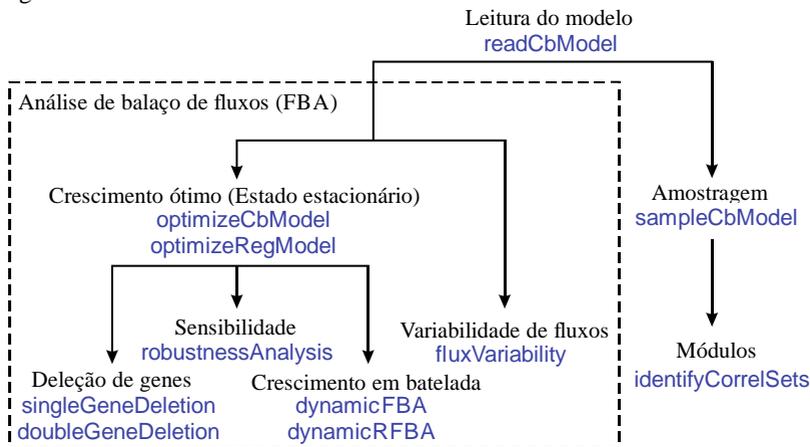


Fonte: Becker *et al.* (2007).

O formato de entrada reconhecido pelo COBRA Toolbox é a Linguagem de Marcação de Sistemas Biológicos (SBML), que será abordada no item 2.5. O Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos da Universidade da Califórnia criou um banco de dados onde disponibiliza alguns organismos *in silico* no formato SBML, o BiGG Database.

A Figura 5 mostra uma visão global do fluxo de trabalho e o nome das principais funções do COBRA Toolbox.

Figura 5 – Fluxo de trabalho usado no COBRA Toolbox.



Fonte: Becker *et al.* (2007).

3.5 O SBML Toolbox e a Estrutura dos Organismos *in silico*

A Linguagem de Marcação de Sistemas Biológicos (SBML), um formato baseado em XML para modelos computacionais de redes bioquímicas, está se tornando aceito como um padrão *de facto* para a representação destes tipos de modelos e, assim, facilitar suas permutas sistemáticas (KEATING *et al.*, 2006).

O SBML Toolbox foi inicialmente desenvolvido especificamente para reunir duas necessidades separadas: (1) aos usuários do MATLAB já existentes que desejam importar modelos SBML e aplicar funcionalidades apropriadas a seus objetivos, qualquer que seja o meio ou o propósito; e (2) aos usuários experientes em SBML que desejam aplicar o poder computacional do MATLAB a seus modelos. O SBML toolbox não deve ser considerado uma ferramenta de simulação, mas preferivelmente um facilitador para o desenvolvimento de outras funções e toolboxes (KEATING *et al.*, 2006).

A estrutura dos modelos SBML começa com a identificação do modelo, aqui exemplificado pela *S.cerevisiae* iND750 *in silico*, usado em muitas das simulações presentes no Apêndice A.

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<sbml xmlns="http://www.sbml.org/sbml/level2"
level="2" version="1"
xmlns:html="http://www.w3.org/1999/xhtml">
<model id="Sc_iND750" name="Sc_iND750">
```

Em seguida vem a definição das unidades usadas no modelo, onde são identificados mol, grama e segundo.

```
<listOfUnitDefinitions>
  <unitDefinition id="mmol_per_gDW_per_hr">
    <listOfUnits>
      <unit kind="mole" scale="-3"/>
      <unit kind="gram" exponent="-1"/>
      <unit kind="second"
multiplier=".00027777" exponent="-1"/>
    </listOfUnits>
  </unitDefinition>
</listOfUnitDefinitions>
```

A próxima parte é a lista de compartimentos do modelo.

```
<listOfCompartments>
  <compartment id="Extra_organism"/>
  <compartment id="Cytosol"
outside="Extra_organism"/>
  <compartment id="Endoplasmic_Reticulum"
outside="Extra_organism"/>
  <compartment id="Golgi_Apparatus"
outside="Extra_organism"/>
  <compartment id="Mitochondria"
outside="Extra_organism"/>
  <compartment id="Nucleus"
outside="Extra_organism"/>
  <compartment id="Peroxisome"
outside="Extra_organism"/>
  <compartment id="Vacuole"
outside="Extra_organism"/>
</listOfCompartments>
```

Depois vem a lista das espécies químicas, sendo representado aqui apenas o primeiro metabólito. É possível identificar a sigla de identidade do metabólito, seu nome completo, o compartimento onde se

encontra, sua carga e se é ou não uma condição de contorno, cujos valores verdadeiros (“true”) são destinados às condições de contorno do modelo.

```
<listOfSpecies>
  <species id="M_10fthf_c"
name="M_10_Formyltetrahydrofolate_C20H21N7O7"
compartment="Cytosol" charge="-2"
boundaryCondition="false"/>
  :
</listOfSpecies>
```

Por fim vem a lista de reações e finalização do modelo. Apenas a estrutura da primeira reação está sendo representada ($13BDglcn[c] + h_2o[c] \rightarrow glc_D[c]$). É possível identificar a sigla de identidade da reação e seu nome completo, se é ou não reversível, notas de informação como gene associado, proteína associada, subsistema e classe da proteína, lista de reagentes com as respectivas siglas e índices estequiométricos, lista de produtos com as respectivas siglas e índices estequiométricos, os valores dos limites inferior e superior, se é ou não a função objetivo, recebendo 1 para sim e zero para não, o valor do fluxo e o custo reduzido.

```
<listOfReactions>
  <reaction id="R_13BGH"
name="R_Endo_1_3_beta_glucan_glucohydase"
reversible="false">
  <notes>
    <html:p>GENE_ASSOCIATION:
YGR282C</html:p>
    <html:p>PROTEIN_ASSOCIATION:
Bg12</html:p>
    <html:p>SUBSYSTEM:
S_Starch_and_Sucrose_Metabolism</html:p>
    <html:p>PROTEIN_CLASS:
3.2.1.58</html:p>
  </notes>
  <listOfReactants>
    <speciesReference
species="M_13BDglcn_c" stoichiometry="1.000000"/>
```

```

        <speciesReference species="M_h2o_c"
stoichiometry="1.000000"/>
    </listOfReactants>
    <listOfProducts>
        <speciesReference species="M_glc_D_c"
stoichiometry="1.000000"/>
    </listOfProducts>
    <kineticLaw>
        <math
xmlns="http://www.w3.org/1998/Math/MathML">
            <apply>
                (CIENTEC) LOWER_BOUND </ci>
                (CIENTEC) UPPER_BOUND </ci>
                (CIENTEC) OBJECTIVE_COEFFICIENT
</ci>
                (CIENTEC) FLUX_VALUE </ci>
                (CIENTEC) REDUCED_COST </ci>
            </apply>
        </math>
        <listOfParameters>
            <parameter id="LOWER_BOUND"
value="0.000000" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
            <parameter id="UPPER_BOUND"
value="999999.000000" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
            <parameter
id="OBJECTIVE_COEFFICIENT" value="0.000000"/>
            <parameter id="FLUX_VALUE"
value="0.000000" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
            <parameter id="REDUCED_COST"
value="-0.011123"/>
        </listOfParameters>
    </kineticLaw>
</reaction>
:
</listOfReactions>
</model>
</sbml>

```

Um detalhe importante que deve ser levado em consideração ao criar um modelo é a representação da identidade dos metabólitos e reações. Todos os metabólitos apresentam o prefixo “M” e todas as reações o prefixo “R”, com exceção das reações pertencentes às condições de contorno que devem ter o prefixo “EX”. Os sufixos são

obrigatórios em metabólitos e não só indicam o compartimento em que estão inseridos (Tabela 1), mas também se constituem como principal indicador das condições de contorno, cuja terminação é “b”. Metabólitos que são condições de contorno devem, portanto, apresentar terminação “b” e `boundaryCondition="true"` para serem reconhecidos. Em `M_10fthf_c`, por exemplo, o prefixo “M” indica que 10fthf é um metabólito e o sufixo “c” indica que ele está presente no citosol. Sem a indicação das condições de contorno, a única solução para otimização é de fluxo zero, já que não é permitido acúmulo em FBA.

Tabela 1 – Lista de compartimentos e respectivas siglas.

Lista de compartimentos	Símbolos dos compartimentos
Citoplasma	c
Mitocôndria	m
Vacúolo	v
Peroxisomo	x
Extracelular	e
Pool	t
Complexo de Golgi	g
Retículo endoplasmático	r
Núcleo	n
Periplasma	p
Lisossomo	l

A partir desta estrutura foram gerados novos organismos *in silico* para estudos no COBRA Toolbox, que foram a base deste trabalho, e direcionarão os planejamentos experimentais futuros.

3.6 A *C. acetobutylicum* ATCC 824 e a Produção de Hidrogênio

A *C. acetobutylicum* é uma bactéria anaeróbica Gram-positiva conhecida pela grande produção de acetona, butanol e etanol (ABE) (LEE *et al.*, 2008). Trata-se de um organismo completamente sequenciado possuindo um cromossomo com 3.940.880 pares de base e um plasmídeo com 192.000 pares de base (SUBHRAVETI *et al.*, 2014).

Um grande desenvolvimento na bioprodução de acetona, butanol e etanol ocorreu com as duas grandes guerras, mas que parou em meados do século XX devido ao rápido crescimento da indústria petroquímica. Espera-se que os problemas ambientais envolvidos com a exploração de combustíveis fósseis, juntamente com o crescente

aumento de preço do petróleo, levem à retomada da bioprodução destes solventes (LEE *et al.*, 2008).

Bactérias da linhagem *Clostridia* são conhecidas pela alta atividade da enzima hidrogenase, produzindo, pelo processo conhecido como fermentação escura, grandes quantidades de hidrogênio (HALLENBECK, 2009).

Pan *et al.* (2008) fizeram uma otimização estatística em *Clostridium sp.* Fanp2 visando produzir mais hidrogênio a partir de glicose. Lehmann e Lütke-Eversloh (2011) fizeram a mutação da *C. acetobutylicum* para produzir mais etanol, com base na deleção de suas vias fermentativas de butirato e butanol.

Heap *et al.* (2007) e Heap *et al.* (2010) apresentam o kit para mutagenese ClosTron, de rápido resultado, menos trabalhoso, mais flexível e de aplicação mais abrangente na mutagênese dirigida à *Clostridium*.

3.7 A Reconstrução em Escala Genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 *in silico*

Em 2008 duas reconstruções em escala genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 foram publicadas, Senger e Papoutsakis (2008a; b) e Lee *et al.* (2008), a última pertencente ao Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos da Universidade da Califórnia, cujas informações, especificidades e material suplementar levaram, em um primeiro momento, a escolha desta como a melhor opção para estudos futuros com esta bactéria.

O principal interesse no estudo da *C. acetobutylicum* por Lee *et al.* (2008) foi o melhoramento na produção de butanol utilizando técnicas de DNA recombinante. A rede metabólica reconstruída consiste de 502 reações e 479 metabólitos. A cobertura da reconstrução é de aproximadamente 11 % do total de ORFs (quadros abertos de leitura) identificados. As reações do modelo estão presentes no Anexo B.

A *C. acetobutylicum* tem tipicamente duas fases distintas para formação de produtos: acidogênese e solvetogênese. A acidogênese ocorre na fase de crescimento exponencial com produção de acetato e butirato, que são tóxicos para célula a altas concentrações. Durante a solvetogênese, o crescimento celular se torna estacionário e a célula consome acetato e butirato para formar acetona, butanol e etanol (LEE *et al.*, 2008).

A fase acidogênica foi modelada por FBA com a maximização da formação de biomassa como função objetivo, mas o objetivo da célula na fase solvetogênica nitidamente não é o mesmo, já que o crescimento é estacionário. Lee *et al.* (2008) desenvolveram um modelo estequiométrico da *C. acetobutylicum* na fase solvetogênica sob a hipótese de minimização da flutuação nas concentrações dos metabólitos entre as fases acidogênica e solvetogênica, exceto para os fluxos relacionados a produção de ácidos e solventes. A Equação (9) representa esta função objetivo,

Minimize :

$$\| \mathbf{v}^{\text{acid}} - \mathbf{v}^{\text{sol}} \|^2 + \left(\mathbf{v}_{\text{bu up}}^{\text{sol}} \mathbf{v}_{\text{ac out}}^{\text{acid}} - 0,315 \mathbf{v}_{\text{ac up}}^{\text{sol}} \mathbf{v}_{\text{bu out}}^{\text{acid}} \right)^2 \quad (9)$$

Sujeito a :

$$\mathbf{S} \times \mathbf{v} = \mathbf{0}, \mathbf{v}_{\text{min}} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{v}_{\text{max}}$$

onde \mathbf{v}^{acid} é o vetor de fluxos na fase acidogênica, que fora calculado previamente utilizando a maximização do crescimento celular como função objetivo; \mathbf{v}^{sol} é o vetor dos fluxos desejados na fase solvetogênica; $\mathbf{v}_{\text{bu up}}^{\text{sol}}$ é o fluxo de consumo de butirato desejado na fase solvetogênica; $\mathbf{v}_{\text{ac out}}^{\text{acid}}$ é o fluxo de secreção de acetato previamente calculado na fase acidogênica; $\mathbf{v}_{\text{ac up}}^{\text{sol}}$ é o fluxo de consumo de acetato desejado na fase solvetogênica; $\mathbf{v}_{\text{bu out}}^{\text{acid}}$ é o fluxo de secreção de butirato previamente calculado na fase acidogênica; \mathbf{S} é a matriz estequiométrica e \mathbf{v}_{min} e \mathbf{v}_{max} são os vetores limites inferior e superior dos fluxos, respectivamente. A maior parte destes representa a reversibilidade de cada reação e alguns são obtidos experimentalmente (Ver seção 3.2).

O modelo da *C. acetobutylicum* em SBML não foi disponibilizado pelo Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos da Universidade da Califórnia, mas os dados suplementares de Lee *et al.* (2008), juntamente com os limites apresentados por Senger e Papoutsakis (2008a; b), permitiram sua reconstrução, o que viabilizou os primeiros estudos de possíveis mutações na *C. acetobutylicum* objetivando um melhoramento da produção de hidrogênio.

Dois anos depois dos modelos não regulados de Senger e Papoutsakis (2008a; b) e Lee *et al.* (2008), Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) publicaram um novo modelo em escala genômica para a *C.*

acetobutylicum ATCC 824, também sem regulação. Diferentemente do modelo de Lee *et al.* (2008), onde as restrições foram estimadas conforme será descrito na seção 3.1, o modelo de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) teve seus arquivos SBML e MAT disponibilizados no grupo de discussões do COBRA Toolbox. Além disso, o modelo de Papoutsakis (2008a; b) cobre 12,6 % das ORFs, o modelo de Lee *et al.* (2008) cobre 11,2 % enquanto o de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) cobre 16,3 %, sendo este último ainda mais compreensivo quanto as restrições.

Uma expansão do modelo de Senger e Papoutsakis (2008a; b) foi feita por McAnulty *et al.* (2012) e uma nova metodologia, chamada Análise de Balanço de Fluxos com Taxas de Reação (do inglês, *Flux Balance Analysis with Flux Ratios - FBrAtio*), foi introduzida e validada com este modelo.

Wallenius *et al.* (2013) utilizaram um modelo *in silico* da *C. acetobutylicum* DSM 792 previamente construído para validar e prever o comportamento desta bactéria na produção de solventes.

Visando maximizar a produção de biocombustíveis, Dusseaux *et al.* (2013) utilizaram uma mutante butirato- patenteada (SOUCAILLE, FIGGE e CROUX, 2006), chamada *C. acetobutylicum* ATCC 824 Δ cac15 Δ upp Δ buk, para obter uma nova mutante por inserção de plasmídeo, que inibiu sua produção de acetona, considerada um produto indesejável, para produzir isopropanol.

Yadav *et al.* (2014) otimizaram experimentalmente a produção de butanol por *C. acetobutylicum* KF158795 a partir do glicerol. Sua abordagem envolveu um aumento na tolerância desta bactéria ao butanol por exposição controlada e otimização experimental uma variável por vez. Esta bactéria ainda não foi sequenciada e nem possui modelo *in silico*, caracterizando-se, portanto, como uma boa fonte para estudos de Engenharia Metabólica futuros.

3.8 Considerações Finais

Apesar da existência de modelos metabólicos da *C. acetobutylicum* ATCC 824 (LEE *et al.*, 2008; SENER e PAPOUTSAKIS, 2008a; b; SALIMI, ZHUANG e MAHADEVAN, 2010; MCANULTY *et al.*, 2012), nenhum deles abordou estudos específicos buscando a maximização da produção de hidrogênio.

A Análise de Sensibilidade verifica o quão sensível é um fluxo extracelular alvo a variações nos demais fluxos extracelulares, não

sendo uma função presente no COBRA Toolbox. Tal análise é um bom indicativo, apesar de puramente estequiométrico, de rotas mais eficientes para afetar um fluxo alvo. A implementação da Análise de Sensibilidade de Stephanopoulos, Aristidou e Nielsen (1998), feita anteriormente no METoolbox, nunca tinha sido feita no COBRA Toolbox, muito menos a sua utilização visando à produção de hidrogênio como fluxo alvo em nenhum modelo da *C. acetobutylicum* ATCC 824.

A FBA dinâmica foi feita em Senger e Papoutsakis (2008b), mas apenas utilizando glicose como substrato. A FBA dinâmica, sem regulação, falha em todos os casos envolvendo substratos múltiplos para todos os modelos da *C. acetobutylicum*, o que motivou a criação de um modelo com regulação a partir do modelo metabólico mais recente.

É inédita também a análise de nocaute de genes de qualquer modelo da *C. acetobutylicum* ATCC 824 visando maximizar a produção de hidrogênio.

As considerações apontadas validam a pesquisa e salientam sua importância para a comunidade científica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 A Reconstrução em Escala Genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 *in silico*

Durante o processo de domínio da técnica, foi necessário alternar entre as linguagens SBML e XLS (ver estrutura SBML na seção 3.5) em um modelo da *C. acetobutylicum* simplificado apresentado por Oliveira (2008), cujas reações estão no Anexo A. Este primeiro modelo serviu apenas para a validação de rotinas computacionais, mas não se caracteriza como um modelo em escala genômica, já que seu número de reações é inexpressivo.

O modelo de Lee *et al.* (2008) foi então reproduzido em SBML, aqui referido como modelo completo. Sua análise permeou inicialmente as principais funções presentes do COBRA Toolbox (reações no Anexo B). Pela ausência dos limites do modelo, foi necessária uma análise detalhada dos limites presentes no modelo de Senger e Papoutsakis (2008b). No entanto, inserir todos os limites de Senger e Papoutsakis (2008b) no modelo de Lee *et al.* (2008) não mostrou resultado, obrigando a escolha de apenas alguns limites baseada na observação de tendências experimentais.

O estudo de todos os modelos visou rotas de mutação sítio-dirigida para a superprodução de hidrogênio.

4.2 A Construção do Modelo com Regulação para a *C. acetobutylicum* ATCC 824

O modelo de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) foi escolhido para a inserção de regras de regulação.

Atualmente, as regras de regulação são booleanas e, portanto, apenas inibições completas da expressão gênica podem ser reproduzidas por este tipo de modelo.

As regras de regulação adicionadas ao modelo tiveram como base as evidências experimentais de Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994), relativo à regulação por glicerol, Tangney e Mitchell (2000), relativo à regulação por sacarose, Tangney, Winters e Mitchell (2001), relativo à regulação por maltose e, finalmente, Yu *et al.* (2007), relativo à regulação por lactose.

As primeiras regras de regulação envolveram o crescimento em glicerol. A simples troca de substrato, de glicose para glicerol, no modelo não regulado de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010), já apresentou uma forte inconsistência, pois o FBA indicou menor produção de biomassa, mas maior produção de hidrogênio com glicerol, fato que desrespeita as evidências experimentais de Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994).

Segundo Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994), o glicerol inibe a enzima NADH-ferredoxina oxireductase.

Em Tangney e Mitchell (2000), a atividade do sistema fosfotransferase (*Phosphotransferase System* - PTS) dependente do fosfoenolpiruvato e específico para a sacarose não foi observada em extratos preparados de culturas de *C. acetobutylicum* crescendo em glicose como única fonte de carbono. A glicose é utilizada preferencialmente em meio contendo glicose e sacarose. A sacarose só é consumida apreciavelmente quando a glicose acaba. Sendo assim, a glicose regula o metabolismo da sacarose. Segundo Tangney e Mitchell (2000), essa regulação age exatamente sobre o sistema PTS da sacarose, impedindo seu consumo enquanto existir glicose no meio. Três ORFs são responsáveis pelo sistema PTS da sacarose: scrA, scrB e scrK, na ordem scrAKB, precedidas por uma ORF scrT que contém um número de regiões discretas que se assemelham às características regulatórias conhecidas.

Estudando a regulação da maltose, Tangney, Winters e Mitchell (2001) apresentam mais detalhes do sistema PTS para a *C. acetobutylicum*. Este sistema é composto de duas proteínas citosólicas gerais chamadas enzima I (EI) e HPr, assim como uma enzima substrato-específica complexa chamada enzima II (EII). O complexo EII consiste de três domínios funcionais distintos, chamados IIA, IIB e IIC. Os domínios IIA e IIB estão envolvidos na transferência sequencial de fosfato, enquanto IIC é responsável pela translocação do substrato através da membrana. Em uma reação PTS, fosfato é transferido do fosfoenolpiruvato (PEP) para o substrato via EI, HPr e EII. O produto do transporte será um substrato fosforilado que deve ser metabolizado em seguida e, conseqüentemente, o sistema de transporte PTS está geralmente associado com uma ou mais enzimas produto-específicas.

Segundo Tangney, Winters e Mitchell (2001), em meio com glicose e maltose, glicose foi consumida especificamente, não sendo observado o consumo perceptível de maltose. Sendo assim, glicose regula o metabolismo da maltose em *C. acetobutylicum*. A atividade do sistema PTS da maltose foi observada apenas em extratos preparados de

culturas crescendo em maltose, mas não glicose ou sacarose. As ORFs malP e malH codificam EII da maltose e 6-fosfo- α -D-glicosidase, respectivamente, sendo os dois genes responsáveis pelo sistema de utilização da maltose em *C. acetobutylicum*.

Yu *et al.* (2007) confirmam que a *C. acetobutylicum* é metabolicamente versátil no que diz respeito a utilização de carboidratos e que este potencial permite explorar substratos mais baratos.

Assim como para sacarose e maltose, Yu *et al.* (2007) observaram a inibição do sistema PTS da lactose quando culturas crescendo em lactose receberam suplemento com glicose. Foi observada uma inibição do consumo de lactose, enquanto glicose foi consumida rapidamente.

Com estas informações regulatórias, foram criadas as regras de regulação que fizeram parte de um novo modelo, Cacetobut_824Reg_xxxx, onde xxxx representa variantes do mesmo modelo, com restrições ajustadas a cada substrato (glyc para glicerol, sucR para sacarose, malt para maltose e lcts para lactose).

Ainda não existe um formato SBML que comporte as regras de regulação, por isso os modelos com regulação foram criados em arquivos MAT. Todas as informações contidas nos arquivos SBML são convertidas em uma estrutura MAT. Dentro desta estrutura, os campos *regulatoryGenes*, *regulatoryRules*, *regulatoryInputs1* e *regulatoryInputs2* foram manualmente adicionados com comandos como

```
>> model.regulatoryGenes =
modelReg.regulatoryGenes;
```

que permite copiar o respectivo campo, neste caso o *regulatoryGenes*, de um modelo regulatório previamente carregado no MATLAB (*modelReg*) e outro modelo não regulado também carregado com um outro nome (*model*). Os novos campos gerados são então modificados para compor as regras do modelo em construção, neste caso, o *model*.

O campo *regulatoryGenes* contém todos os genes originais do modelo, mais os genes responsáveis por uma regulação específica. Em *regulatoryRules* se encontram as regras de regulação, sempre com caráter booleano, recebendo o valor true para a maioria dos genes do modelo. O valor true para todos os genes torna o modelo regulatório um simples modelo não regulado. Em *regulatoryInputs1* encontram-se as

entradas envolvendo metabólitos, que são condições de presença ou ausência de metabólitos específicos. Já *regulatoryInputs2* possui entradas envolvendo reações específicas, como uma reação levando a inibição de um gene. *regulatoryInputs 1 e 2* funcionam como variáveis que são utilizadas nas regras presentes em *regulatoryRules*, que por sua vez estão associadas a um gene registrado em *regulatoryGenes*.

Primeiramente, adicionou-se o gene hipotético noGLC, com regra *~glc_D[e]* (na ausência de glicose), como condição para a expressão dos genes PTS da lactose, com *Locus Number* (o número de registro para genes específicos de um microrganismo) CAC2964 e CAC2965. O til (~) anterior ao substrato extracelular glicose significa “na ausência de”.

O único gene do PTS da maltose com *Locus Number* registrado foi o CAC3425, que também faz parte do PTS da glicose e, por isso, não poderia ser regulado pelo noGLC. Já o PTS da sacarose não possuía nenhum gene com *Locus Number*. Fazendo uma pesquisa no KEGG, encontrou-se MalX e ScrA ainda não mapeados, mas que precisaram ser adicionados ao modelo para que as regras de regulação observadas experimentalmente fossem alcançadas. Sendo assim, as modificações do modelo foram mais profundas do que a simples adição de regras de regulação. Com os genes MalX e ScrA devidamente inseridos no modelo, aplicou-se o gene hipotético noGLC como condição para a expressão dos mesmos.

Ao reproduzir a regulação da glicose ao consumo de maltose, observou-se o consumo de maltose por uma via alternativa. A reação MALTabc acabava permitindo o consumo de maltose na presença de glicose, o que não foi observado experimentalmente em Tangney, Winters e Mitchell (2001). Este fato obrigou a adição do gene noGLC como condição para que o gene CAC3237, responsável pela reação MALTabc, fosse expresso.

Resumindo as regras de regulação anteriormente adicionadas ao modelo, os sistemas PTS's específicos da sacarose, maltose e lactose só serão expressos na ausência de glicose.

Para a regulação envolvendo o glicerol, adicionou-se o gene hipotético noGLYC, com regra *~glyc[e]* (na ausência de glicerol), como condição para a expressão dos genes responsáveis pela enzima NADH-ferredoxina oxireductase. Esta enzima também não possuía genes com *Locus Number* para a *C. acetobutylicum* e, assim como ocorreu com os genes MalX e ScrA, o gene nomeado como NADHfred foi adicionado ao modelo. Durante o processo de adição do gene NADHfred, aproveitou-se a oportunidade para adicionar também o NADPHfred, mas este último recebeu a regra de regulação true, o que não afeta o

modelo, mas permite estudos futuros caso uma regulação envolvendo a NADPH-ferredoxina oxiredutase seja descoberta. Adicionado o gene NADHfred, associou-se o gene hipotético noGLYC como condição para que esta enzima seja expressa. Em outras palavras, NADH-ferredoxina oxiredutase só será expressa na ausência de glicerol.

Só com as regras de regulação adicionadas foi possível fazer o ajuste fino do modelo com base nos resultados experimentais alterando-se as restrições do modelo por tentativas e análises das respostas no metabolismo global. A maior parte das restrições alteradas limitaram as taxas de consumo dos próprios substratos estudados.

Maiores detalhes sobre a validação do modelo com dados experimentais são mostrados nos itens 3.4, 3.5 e 4.6.

4.3 Análise de Sensibilidade da *C. acetobutylicum*

A Análise de Sensibilidade foi feita utilizando a função sensitivity (Apêndice C), executada no modelo com regulação feito nesta tese, que teve como base o modelo de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010), que é o modelo mais completo e atual para a *C. acetobutylicum* ATCC 824, sendo considerado um aprimoramento do modelo de Lee *et al.* (2008). O modelo é lido com clique duplo sobre o arquivo *Cacetobut_824Reg_glc.mat* e a Análise de Sensibilidade visando superprodução de hidrogênio é feita com o comando

```
>> sensitivity(modelReg, 616);
```

uma vez que 616 é a posição da reação de produção de hidrogênio neste modelo.

Para o funcionamento correto da função, a posição escolhida para reação deve obrigatoriamente ser de uma reação de contorno (exchange reaction).

4.4 Simulação da *C. acetobutylicum* Crescendo em Glicose, Glicerol, Sacarose, Lactose e Maltose

Uma comparação dois a dois entre os diferentes substratos (todos vs. glicose) foi feita inicialmente por FBA com regulação. Não há campos apropriados em arquivo SBML para um modelo com regulação, por isso a sua leitura é feita diretamente com clique duplo sobre os arquivos *Cacetobut_824Reg_glc.mat*, *Cacetobut_824Reg_glyc.mat*,

Cacetobut_824Reg_sucr.mat, *Cacetobut_824Reg_lcts.mat* e *Cacetobut_824Reg_malt.mat*, para a simulação em glicose, glicerol, sacarose, lactose e maltose, respectivamente. Os comandos executados foram:

```
>> FBA_sols = optimizeRegModel(modelReg);

>> printFluxVector(modelReg, FBA_sols{1,1}.x, true,
true);
```

Todos os arquivos fazem parte de um mesmo modelo com regulação, apenas trocando a alimentação, e tiveram como base o modelo não regulado de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010).

4.5 FBA Dinâmica da *C. acetobutylicum*

A FBA dinâmica com regulação da *C. acetobutylicum*, que simula o crescimento em batelada, foi realizada no COBRA Toolbox em condições iniciais idênticas as apresentadas em Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994) para regulação com glicerol, Tangney e Mitchell (2000) para regulação com sacarose, Yu *et al.* (2007) para regulação com lactose e Tangney, Winters e Mitchell (2001) para regulação com maltose, para fins de validação com os dados experimentais apresentados nos respectivos artigos. Os comandos foram os seguintes:

```
>> substrateRxns = {'EX_glc(e)'};

>> initConcentrations = 5 ; initBiomass = .035;

>> timeStep = .05; nSteps = 200;

>> plotRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_ac(e)',
'EX_but(e)', 'EX_h2(e)', 'EX_co2(e)'};

>> dynamicRFBA(modelReg, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps,
plotRxns);
```

Dessa forma, a glicose foi selecionada como substrato, com concentração inicial de 5 mmol.L⁻¹ e com concentração inicial de biomassa de 0,035 g célula seca.L⁻¹, escolhidos para fins de validação

com dados experimentais. As concentrações escolhidas para o gráfico foram glicose, acetato, butirato, hidrogênio e CO₂.

A simulação da regulação com glicerol foi realizada através dos comandos:

```
>> substrateRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_glyc(e)'};
>> initConcentrations = [5 5]; initBiomass = .035;
>> timeStep = .055; nSteps = 200;
>> plotRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_glyc(e)',
'EX_ac(e)', 'EX_but(e)', 'EX_etch(e)',
'EX_btoh(e)', 'EX_h2(e)', 'EX_co2(e)'};
>> dynamicRFBA(modelReg, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps,
plotRxns);
```

Para a simulação da regulação com sacarose:

```
>> substrateRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_sucr(e)'};
>> initConcentrations = [5.5 4.5]; initBiomass =
.035;
>> timeStep = .05; nSteps = 200;
>> plotRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_sucr(e)',
'EX_ac(e)', 'EX_but(e)', 'EX_h2(e)', 'EX_co2(e)'};
>> dynamicRFBA(modelReg, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps,
plotRxns);
```

Para a simulação da regulação com lactose:

```
>> substrateRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_lcts(e)'};
>> initConcentrations = [5 5]; initBiomass = .035;
```

```
>> timeStep = .08; nSteps = 200;

>> plotRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_lcts(e)',
'EX_ac(e)', 'EX_but(e)', 'EX_h2(e)', 'EX_co2(e)'};

>> dynamicRFBA(modelReg, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps,
plotRxns);
```

Para a simulação da regulação com maltose:

```
>> substrateRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_malt(e)'};

>> initConcentrations = [4 4]; initBiomass = .035;

>> timeStep = .05; nSteps = 200;

>> plotRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_malt(e)',
'EX_ac(e)', 'EX_but(e)', 'EX_h2(e)', 'EX_co2(e)'};

>> dynamicRFBA(modelReg, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps,
plotRxns);
```

4.6 Nocaute de Genes da *C. acetobutylicum*

O estudo do nocaute de genes para possíveis inativações por mutação sítio dirigida que aumentariam a produção de hidrogênio foi feito com o COBRA Toolbox a partir dos seguintes comandos:

```
>> model = readCbModel('Ca_ATCC824_Glc');
```

o qual faz a leitura do modelo da *C. acetobutylicum* em meio mínimo de glicose,

```
>> selectedRxns = model.rxns';
```

insere todas as reações do modelo como candidatas ao nocaute.

```
>> selExchange = findExcRxns(model,true,false);
```

```
>> p = find(selExchange~=0);
```

```
>> selectedRxns(p) = [];
```

faz a busca pelas reações que constituem as condições de contorno (*exchange reactions*) e as elimina das candidatas ao nocaute, conforme instruções presentes em Schellenberger *et al.* (2011). Outras exclusões são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Reações excluídas da busca pelo melhor nocaute.

Comando	Reações excluídas
>> selectedRxns(411:501) = [];	Reações de manutenção celular
>> selectedRxns(1:72) = [];	Reações de transporte
>> selectedRxns(107:319) = [];	Reações do metabolismo do piruvato, nitrogênio, enxofre e aminoácidos essenciais
>> selectedRxns(45:68) = [];	Vias metabólicas TCA, pentose fosfato e interconversões pentose glucuronato
>> selectedRxns(1:22) = [];	Glicólise e manutenção de ATP

As setenta e nove candidatas restantes são mostradas na Tabela 3.
O comando:

```
>> options.targetRxn = 'EX_H2 (e)';
```

seleciona o hidrogênio como alvo para superprodução.

```
>> options.vMax = 1000;
```

estipula o fluxo máximo permitido.

```
>> options.numDel = 5;
```

```
>> options.numDelSense = 'L';
```

estipula o número máximo de deleções gênicas (não simultâneas).

```
>> constrOpt.rxnList = {'BIOMASS'};
```

```
>> constrOpt.values = [0.05];
```

```
>> constrOpt.sense = 'GE';
```

fixa valores, neste caso mínimos (GE – maiores ou iguais), para os fluxos selecionados (Biomassa).

```
>> optKnockSol = OptKnock(model, selectedRxns,
options, constrOpt);
```

Tabela 3 – Reações candidatas ao nocaute.

Nome	Reação
PROPAN1	$2\text{HBUT} + \text{NAD} \leftrightarrow 2\text{OBUT} + \text{NADH}$
PROPAN2	$2\text{OBUT} + \text{COA} \rightarrow \text{PROCOA} + \text{FORM}$
PROPAN3	$\text{PROCOA} + \text{Pi} \rightarrow \text{PROPP} + \text{COA}$
PROPAN4	$\text{PROPP} + \text{ADP} \rightarrow \text{PROP} + \text{ATP}$
BUTAN1	$\text{ACCOA} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{ACAL} + \text{COA} + \text{NAD}$
BUTAN2	$\text{ACAL} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{ETOH} + \text{NAD}$
BUTAN3	$\text{ACCOA} + \text{Pi} \leftrightarrow \text{ACTP} + \text{COA}$
BUTAN4	$\text{ACTP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{AC} + \text{ATP}$
BUTAN5	$2 \text{ACCOA} \rightarrow \text{ACTACCOA} + \text{COA}$
BUTAN6	$\text{ACTACCOA} + \text{NADH} \rightarrow 3\text{HBCOA} + \text{NAD}$
BUTAN7	$3\text{HBCOA} \rightarrow \text{CRTCOA}$
BUTAN8	$\text{CRTCOA} + 2 \text{NADH} + \text{Fd(Ox)} \rightarrow \text{BUCOA} + 2 \text{NAD} + \text{Fd(Red)}$
BUTAN9	$\text{BUCOA} + \text{Pi} \rightarrow \text{BUP} + \text{COA}$
BUTAN10	$\text{BUP} + \text{ADP} \rightarrow \text{BU} + \text{ATP}$
BUTAN11	$\text{BUCOA} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{BUAL} + \text{COA} + \text{NAD}$
BUTAN12	$\text{BUAL} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{BUOH} + \text{NAD}$
BUTAN13	$\text{ACTAC} \rightarrow \text{ACETONE} + \text{CO}_2$
BUTAN14	$\text{THMPP} + \text{PYR} \rightarrow \text{HETHMPP} + \text{CO}_2$
BUTAN15	$\text{HETHMPP} + \text{PYR} \rightarrow \text{ACLAC} + \text{THMPP}$
BUTAN16	$\text{ACLAC} \rightarrow \text{ACETOIN} + \text{CO}_2$
BUTAN17	$\text{AC} + \text{ACTACCOA} \rightarrow \text{ACCOA} + \text{ACTAC}$
BUTAN18	$\text{BU} + \text{ACTACCOA} \rightarrow \text{BUCOA} + \text{ACTAC}$
FM1	$\text{F1P} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{FDP} + \text{ADP}$
FM2	$\text{F1P} \rightarrow \text{DHAP} + \text{GLYALD}$
FM3	$\text{MNL1P} + \text{NAD} \leftrightarrow \text{F6P} + \text{NADH}$

FM4	$\text{MAN6P} \leftrightarrow \text{F6P}$
FM5	$\text{FRU} + \text{ATP} \rightarrow \text{F6P} + \text{ADP}$
GAL1	$\text{LCTS6P} \leftrightarrow \text{GLC} + \text{GAL6P}$
GAL2	$\text{GAL6P} \leftrightarrow \text{TAG6P}$
GAL3	$\text{TAG6P} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{TAGDP} + \text{ADP}$
GAL4	$\text{TAGDP} \leftrightarrow \text{DHAP} + \text{GA3P}$
GAL5	$\text{GAL} + \text{ATP} \rightarrow \text{GAL1P} + \text{ADP}$
GAL6	$\text{UDPGLC} + \text{GAL1P} \leftrightarrow \text{G1P} + \text{UDPGAL}$
GAL7	$\text{UDPGAL} \leftrightarrow \text{UDPGLC}$
GAL8	$\text{G1P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDPGLC} + \text{PPi}$
GAL9	$\text{G1P} \leftrightarrow \text{G6P}$
SUCR1	$\text{SUC6P} \rightarrow \text{FRU} + \text{G6P}$
SUCR2	$\text{MALT6P} \rightarrow \text{GLC} + \text{G6P}$
SUCR3	$\text{MALT} \rightarrow 2 \text{GLC}$
SUCR4	$\text{MALT} + \text{Pi} \rightarrow \text{bDGLC} + \text{bDG1P}$
SUCR5	$\text{bDG1P} \leftrightarrow \text{bDG6P}$
SUCR6	$\text{G1P} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADPGLC} + \text{PPi}$
SUCR7	$\text{ADPGLC} \rightarrow \text{ADP} + \text{Glycogen}$
SUCR8	$\text{Glycogen} + \text{Pi} \rightarrow \text{G1P}$
SUCR9	$\text{CLB(Ext)} \rightarrow 2 \text{bDGLC(Ext)}$
AMSU1	$\text{F6P} + \text{LGLN} \rightarrow \text{GAM6P} + \text{LGLU}$
AMSU2	$\text{F6P} + \text{NH}_3 \leftrightarrow \text{GAM6P}$
AMSU3	$\text{GAM6P} + \text{AC} \leftrightarrow \text{ACGAM6P}$
AMSU4	$\text{GAM6P} \rightarrow \text{GAM1P}$
AMSU5	$\text{GAM1P} + \text{ACCOA} \rightarrow \text{ACGAM1P} + \text{COA}$
AMSU6	$\text{ACGAM1P} + \text{UTP} \leftrightarrow \text{UACGAM} + \text{PPi}$
AMSU7	$\text{UACGAM} + \text{PEP} \leftrightarrow \text{UACCG} + \text{Pi}$
AMSU8	$\text{UACCG} + \text{NADPH} \rightarrow \text{UAMR} + \text{NADP}$
NUSU1	$\text{dTTP} + \text{G1P} \rightarrow \text{TDPGLC} + \text{PPi}$
NUSU2	$\text{TDPGLC} \leftrightarrow \text{TDPGAL}$
NUSU3	$\text{TDPGLC} \rightarrow \text{TDPDHdGLC}$
NUSU4	$\text{TDPDHdGLC} \rightarrow \text{GDPoRHAM}$

NUSU5	$\text{TDPDHdGLC} \rightarrow \text{TDPoRHAM}$
NUSU6	$\text{GDPOrHAM} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GDPRHAM} + \text{NADP}$
NUSU7	$\text{TDPoRHAM} + \text{NADPH} \rightarrow \text{TDPRHAM} + \text{NADP}$
FAS1	$\text{ACCOA} + \text{ACP} \leftrightarrow \text{ACACP} + \text{COA}$
FAS2	$\text{MALCOA} + \text{ACP} \leftrightarrow \text{MALACP} + \text{COA}$
FAS3	$\text{ACACP} + 6 \text{ MALACP} + 12 \text{ NADPH} \rightarrow 12 \text{ NADP} + \text{C140-ACP} + 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ ACP}$
FAS4	$\text{ACACP} + 7 \text{ MALACP} + 14 \text{ NADPH} \rightarrow 14 \text{ NADP} + \text{C160-ACP} + 7 \text{ CO}_2 + 7 \text{ ACP}$
FAS5	$\text{ACACP} + 7 \text{ MALACP} + 13 \text{ NADPH} \rightarrow 13 \text{ NADP} + \text{C161-ACP} + 7 \text{ CO}_2 + 7 \text{ ACP}$
FAS6	$\text{ACACP} + 8 \text{ MALACP} + 16 \text{ NADPH} \rightarrow 16 \text{ NADP} + \text{C180-ACP} + 8 \text{ CO}_2 + 8 \text{ ACP}$
FAS7	$\text{ACACP} + 8 \text{ MALACP} + 15 \text{ NADPH} \rightarrow 15 \text{ NADP} + \text{C181-ACP} + 8 \text{ CO}_2 + 8 \text{ ACP}$
FAS8	$\text{C161-ACP} + \text{AMET} \rightarrow \text{C17CYC-ACP} + \text{AHCYS}$
FAS9	$\text{C181-ACP} + \text{AMET} \rightarrow \text{C19CYC-ACP} + \text{AHCYS}$
STERO1	$\text{DMPP} + \text{IPDP} \rightarrow \text{GRDP} + \text{PPi}$
STERO2	$\text{GRDP} + \text{IPDP} \rightarrow \text{FRDP} + \text{PPi}$
STERO3	$\text{FRDP} + \text{IPDP} \rightarrow \text{GGRDP} + \text{PPi}$
STERO4	$\text{GGRDP} + 7 \text{ IPDP} \rightarrow \text{UDCPDP} + 7 \text{ PPi}$
STERO5	$\text{PYR} + \text{GA3P} \rightarrow \text{dXYLU5P} + \text{CO}_2$
STERO6	$\text{dXYLU5P} + \text{NADPH} \rightarrow \text{MERYTH4P} + \text{NADP}$
STERO7	$\text{MERYTH4P} + \text{CTP} \rightarrow \text{CDPMERYTH} + \text{PPi}$
STERO8	$\text{CDPMERYTH} + \text{ATP} \rightarrow \text{CDPMERY2P} + \text{ADP}$
STERO9	$\text{CDPMERY2P} \rightarrow \text{MERYcDP} + \text{CMP}$
STERO10	$\text{MERYcDP} + \text{ProDTH} \rightarrow \text{HMB4DP} + \text{ProDS}$

Utilizando as mesmas condições, a função *GDLS* é executada com o seguinte comando:

```
>> [gdlsSolution, bilevelMILPproblem,
gdlsSolutionStructs] = GDLS(model, 'EX_H2(e)',
'minGrowth', 0.05, 'selectedRxns', selectedRxns,
'maxKO', 5);
```

O critério de busca pelas melhores opções de nocaute de ambas as funções segue a tentativa e erro, executando novas FBAs a cada tentativa e registrando os melhores resultados que maximizam o fluxo de interesse.

4.7 Correção da Função *mfaop* do METoolbox

Diante de uma função para a FBA comprovadamente correta, a *optimizeCbModel* do COBRA Toolbox, tornou-se necessário fazer uma correção na função *mfaop* (MENDES, 2006), também desenvolvida para este fim. Diferentemente da função *optimizeCbModel* do COBRA Toolbox, a função *mfaop* faz uso do próprio *solver* de otimização do MATLAB.

As funções de entrada *hydrooptimized_main* e *viotimized_main* (MENDES, 2006), respectivamente para os modelos de produção de hidrogênio por *C. acetobutylicum* e de violaceína por *Chromobacterium violaceum*, também foram ajustadas para a nova versão da *mfaop*. A função *hydrooptimized_main* foi alterada para o próprio modelo simplificado de OLIVEIRA (2008), com o objetivo de validação da nova função por comparação com os resultados do COBRA Toolbox nas mesmas condições.

A função *viotimized_main*, desenvolvida para o estudo da superprodução de violaceína por *C. violaceum*, manteve a matriz estequiométrica original (MENDES, 2006) adicionando-se as reações de contorno, mas a função objetivo foi alterada para maximização da biomassa.

O algoritmo para a Análise de Sensibilidade, estudo mostrado na seção 3.3 e presente na *mfaop*, foi também colocado em uma função separada, *sensitivity*, e alterado para receber modelos do COBRA, permitindo esta análise em todos os modelos construídos neste trabalho.

Todas as novas funções do METoolbox estão presentes no Apêndice C.

4.8 Procedimento Experimental para o Crescimento da *C. acetobutylicum* Com Diferentes Substratos

Pan *et al.* (2008) estudaram um meio de cultura ótimo para a produção de hidrogênio por *Clostridium* sp. Fanp2, identificando os fatores determinantes pelo método de triagem de Plackett–Burman. Tais

fatores foram glicose, tampão fosfato e solução vitamínica, todos com influência individual significativa e sinergia entre glicose e os outros dois fatores. Devido ao grande número de reagentes necessários aos meios de Pan *et al.* (2008), optou-se por meios mais simples (Tabela 4 e Tabela 5), indicados pela Fundação André Tosello, a fornecedora da *C. acetobutylicum* ATCC 824.

O crescimento consiste inicialmente de uma reativação em um meio clostridial reforçado (*Reinforced Clostridial Medium* - RCM) previamente autoclavado a 121 °C/15 min. A reativação deve ser feita durante 24 horas em jarro de anaerobiose a 37 °C e pH 6,8, aqui chamada de pré-cultura. A transferência das bactérias para o meio RCM é feita em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70 % e luz UV. O procedimento de inoculação do meio RCM é feito próximo a chama de um bico de Bunsen. A tampa do frasco deve estar praticamente solta e o mesmo deve ser colocado no jarro de anaerobiose juntamente com um sachet do produto Anaerogen da Oxoid, que garantirá a anaerobiose do jarro.

Tabela 4 – Meio clostridial reforçado (RCM) para a pré-cultura.

Composto	Concentração (g/L)
Glicose-D	5,0
Peptona	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de carne	10,0
Cloridrato de cisteína (1-hidr)	0,5
Acetato de sódio	3,0

Fonte: Fundação André Tosello

Após 24 horas de reativação, o resultado é o mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Meio RCM após a reativação.



Fonte: Do autor.

Um novo meio, agora destinado a fermentação propriamente dita, é então inoculado a 10 % v/v utilizando o meio RCM com as bactérias reativadas. A inoculação do meio de fermentação, previamente autoclavado, também é feita em capela de fluxo laminar com os mesmos cuidados de esterilização do meio RCM.

Tabela 5 – Meio de fermentação.

Composto	Concentração (g/L)
Glicose-D	20,0
Peptona	4,0
Cloreto de sódio	3,0
Extrato de levedura	1,0
Extrato de carne	1,0
Cloridrato de cisteína (1-hidr)	0,5
Acetato de sódio	0,1

Fonte: Fundação André Tosello

Após a inoculação, os frascos foram tampados com rolhas de silicone contendo dois tubos de vidro seguidos de mangueiras de silicone para entrada e saída de gases devidamente seladas com pinças de mohr. Foi acoplada a saída do cilindro de nitrogênio a um filtro e este a entrada de gás do frasco. Liberou-se a saída de gás do frasco e borbulhou-se o nitrogênio para remover o oxigênio no espaço de topo e manter o ambiente anaeróbio. Este procedimento leva em torno de 10 minutos. A entrada e a saída de gases do frasco foram novamente

seladas simultaneamente. Para todos os frascos, as saídas de gás foram acopladas a lavadores de gás contendo solução 1 M de NaOH, para a captura do CO₂, e as saídas dos lavadores de gás foram finalmente acopladas a provetas invertidas, de onde foi quantificado o volume de gás restante produzido (primordialmente hidrogênio). As pinças de mohr das saídas de gás foram liberadas e as das entradas foram usadas durante todo o experimento para a retirada de amostras do meio líquido por meio de seringas. Iniciou-se a fermentação a 37 °C em um agitador orbital a 120 rpm conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Aparato experimental utilizado.



(a)



(b)

Fonte: Do autor.

O volume do gás foi determinado pelo método de proveta invertida. Devido aos lavadores de gás, considerou-se este o volume de

hidrogênio, o produto desejado. A concentração de células foi determinada por turbidimetria a 570 nm e também por peso seco, este último centrifugando a amostra a 10000 g por 10 minutos, lavando duas vezes com água destilada e secando a 60 °C até peso constante. A concentração de glicose, e outros açúcares nas variações de substrato, foi determinada pelo método ácido antrona-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O pH do meio também foi monitorado.

O método ácido antrona-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956) consiste primeiramente em preparar as curvas padrões dos substratos testados, com concentrações variando entre 10 e 70 µg/mL (0,01 e 0,07 g/L). Mistura-se 1 mL da solução com 1 mL de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado em béquer. No branco substitui-se o 1 mL da solução por 1 mL de água destilada. Espera-se 10 min e faz-se a leitura da absorbância segundo a Tabela 6.

Tabela 6 – Comprimentos de onda para o método de Dubois *et al.* (1956).

Substrato	Comprimento de onda (nm)
Glicose	485
Sacarose	490
Maltose	490
Lactose	490

Para as medidas de concentração de substrato durante a fermentação, uma amostra de 1 mL é retirada do sobrenadante do procedimento de peso seco e diluída em balão de 250 mL, deixando a concentração dentro da faixa de detecção do método de Dubois *et al.* (1956). Novamente é misturado 1 mL da solução com 1 mL de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado em béquer. O resultado de absorbância obtido é convertido em concentração pelas curvas padrões previamente construídas, finalizando com os cálculos necessários para obter a concentração original do meio à partir da concentração diluída.

O procedimento completo durou em torno de 10 horas com amostragens de hora em hora em duplicata, contados à partir da saída das primeiras bolhas de ar, para evitar o refluxo do meio básico do lavador de gás para o meio de fermentação.

Os ensaios de cada substrato testado foram feitos sempre simultaneamente com glicose (dois reatores com o substrato teste e dois com glicose), evitando assim que influências ambientais ou na preparação do meio interferissem na análise comparativa.

Com este procedimento, investigou-se a resposta na produção de hidrogênio quanto a utilização de outros substratos, sugeridos durante a análise de sensibilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A Reconstrução em Escala Genômica da *C. acetobutylicum* ATCC 824 *in silico*

Com base no modelo de Lee *et al.* (2008), dois modelos foram reproduzidos. O primeiro é mais fiel ao original, onde foram mantidos todos os *gaps*, já no segundo foi feito um trabalho de eliminação de *gaps*.

A eliminação de *gaps* é uma estratégia adotada durante a reconstrução de qualquer organismo *in silico*, já que qualquer via metabólica que não possua um fluxo de entrada e um fluxo de saída simplesmente não poderia ocorrer. A eliminação de *gaps* começa com a busca dos mesmos com comandos específicos do COBRA Toolbox, como o *gapFind*.

```
>> [allGaps, rootGaps, downstreamGaps] =  
gapFind(model)
```

Posteriormente é feita uma minuciosa pesquisa nos bancos de dados genômicos, principalmente o KEGG, na busca por reações que permitam o ciclo completo da via metabólica interrompida, permitindo consequentemente o seu fluxo.

Ao todo foram encontrados 69 *gaps* no modelo original (Tabela 7).

Tabela 7 – Gaps encontrados no modelo de LEE *et al.* (2008) utilizando a função *gapFind* do COBRA Toolbox.

Sigla	Nome
2DDGLCN	2-Desidro-3-D-gluconato
MALT	Maltose
MECORR	Metilcorrinoíde
CORR	Corrinoíde
4ABUT	4-Aminobutirato
SUCCSA	Succinato semialdeído
O2	Oxigênio
GLYCAC	D-Glicerato

HPYR	Hidroxipiruvato
PTRC	Putrecina
METADN	5'-Metiltioadenosina
SPERMD	Espermidina
5METRIB	5-Metiltio-D-ribose
MTYRAM	N-Metiltiramina
HOR	Hordeína
4H2KPM	4-Hidroxi-2-cetopimelato
GTH_Red	Glutaciona
GTH_Ox	Glutaciona disulfato
DMPP	Dimetilalil difosfato
IPDP	Isopentenil difosfato
GRDP	Geranil difosfato
FRDP	trans,trans-Farnesil difosfato
GGRDP	Geranilgeranil difosfato
UDCPDP	Undecaprenil difosfato
ProDTH	Proteína ditiol
HMB4DP	1-Hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfato
ProDS	Proteína disulfato
NMN	Nicotinamida D-ribonucleotídeo
4PCYS	N-((R)-Pantotenoil)-L-cisteína
PAN	Panteteína
CPPPG3	Coproporfirinogênio III
PPPG9	Protoporfirinogênio IX
Fe2	Íon ferroso
SHEME	Sirohemo
COBALT	Íon cobalto
CPRCR2	Cobalto-precorrina 2
CPRCR3	Cobalto-precorrina 3
CPRCR4	Cobalto-precorrina 4
CPRCR5A	Cobalto-precorrina 5A
CPRCR5B	Cobalto-precorrina 5B
CPRCR6	Cobalto-precorrina 6

CDHPRCR6	Cobalto-precorrina 6B
CPRCR7	Cobalto-precorrina 7
CPRCR8	Cobalto-precorrina 8
CBRN	Cobirinato
CBRNDA	Cob(II)irinato a,c diamida
PRCR3B	Pecorrina 3B
PRCR4	Pecorrina 4
PRCR5	Pecorrina 5
PRCR6A	Pecorrina 6A
PRCR6B	Pecorrina 6B
PRCR8	Pecorrina 8
HGBRN	Hidrogenobirinato
ACBRNDA	Adenosil cobirinato a,c diamida
ACBRNHA	Adenosil cobirinato hexamida
1APROH	(R)-1-Aminopropan-2-ol
ACBA	Adenosil cobinamida
ACBAP	Adenosil cominamida fosfato
APROHP	D-1-Aminopropan-2-ol O-fosfato
AGDPCBA	Adenosina-GDP-cominamida
ARBZL	N1-(alfa-D-Ribosil)-5,6-dimetilbenzimidazol
CACO	Cobamida coenzima
ARBZL5P	N1-(5-Fosfo-alfa-D-ribosil)-5,6-dimetilbenzimidazol
HIPCOA	2-Hidroxi-4-isopropenilciclohexano-1-carboxil-CoA
IPCHCOA	4-Isopropenil-2-oxi-ciclohexanocarboxil-CoA
MTNOL	Mirtenol
MTNAL	Mirtenal
HDMHCOA	3-Hidroxi-2,6-dimetil-5-metileno-heptanoil-CoA
DMMOHCOA	2,6-Dimetil-5-metileno-3-oxo-heptanoil-CoA

A Tabela 8 mostra a FBA de alguns fluxos extracelulares para os três modelos, o original, a reprodução sem eliminação de *gaps* e com a eliminação de *gaps*. A eliminação de *gaps* foi feita utilizando as funções

detectDeadEnds, gapFind e pesquisa ao banco de dados da *C. acetobutylicum* ATCC 824 no KEGG.

Tabela 8 – FBA comparativa entre três versões do modelo *C. acetobutylicum* ATCC 824 *in silico*.

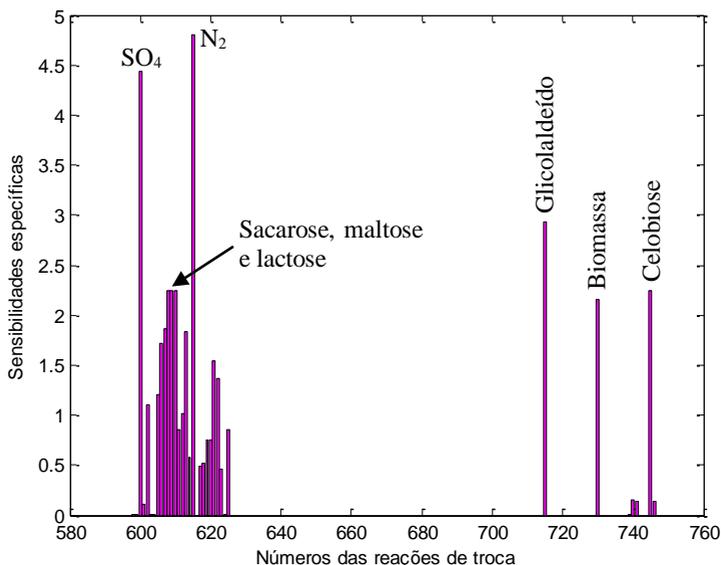
		Modelo		
		Lee <i>et al.</i> (2008)	Reprodução sem <i>gap</i> filling	Reprodução com <i>gap</i> filling
Velocidades (mmol.g célula seca ⁻¹ h ⁻¹)	Glicose	6,74	6,74	6,74
	Acetato	5,14	5,14	0
	Butirato	0	3,09	0
	Hidrogênio	10,22	12,4	1,84
	Acetona	0,18	0,13	3,26
	Butanol	2,63	0	0
	Etanol	0	0	0

A reprodução sem a eliminação de *gaps* teve boa concordância com os dados de Lee *et al.* (2008), mostrando que o bloqueio de algumas reações foi necessário. Esta reprodução foi bem sucedida, mas Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) apresentaram um modelo melhorado com todos os arquivos disponíveis. Após a modificação e inserção das regras de regulação, este último se tornou o modelo padrão para todas as análises deste trabalho, com exceção da análise de nocaute de genes, que foi inconclusiva no modelo regulado e decidiu-se manter a análise feita com a reprodução de Lee *et al.* (2008).

5.2 Análise de Sensibilidade da *C. acetobutylicum*

A Análise de Sensibilidade, feita agora com a função *sensitivity* (Apêndice C), mostra grande influência do fluxo 615, relativo ao fluxo de nitrogênio para dentro da célula. A segunda sensibilidade específica mais alta é o fluxo 600, relativo ao consumo de SO₄. Depois destes, os fluxos 608, 609 e 610, relativos ao consumo de sacarose, maltose e lactose, respectivamente, apresentaram alta sensibilidade, sendo provavelmente opções melhores do que a glicose como substrato para a produção de hidrogênio, o que foi experimentalmente investigado (Figura 8).

Figura 8 – Sensibilidade específica para o modelo de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010) para a *C. acetobutylicum* visando à superprodução de hidrogênio.



Fonte: Do autor.

5.3 Nocaute de Genes da *C. acetobutylicum*

A função *OptKnock* (seção 4.6) apresenta como cinco melhores opções de nocaute os genes responsáveis pelas reações BUTAN2, BUTAN3, BUTAN6, BUTAN16 e FM1 (ver Tabela 3).

A função *GDLS* apresentou apenas uma solução possível, o nocaute do gene responsável pela reação BUTAN3, de *Locus Number* CAC1742.

A comparação da FBA para as situações mutada (BUTAN3-) e selvagem (BUTAN3+) é mostrada na Tabela 9.

Tabela 9 – FBA comparativa entre a *C. acetobutylicum* mutada e selvagem crescendo em glicose.

	Taxas de consumo de substrato e formação de produtos (mmol.g célula seca ⁻¹ .h ⁻¹).	
	BUTAN3+	BUTAN3-
Glicose	-6,74	-6,74
n-Acetyl-D-glucosamine	-0,03	-0,03
N ₂	-0,565951	-0,501709
CO ₂	11,9454	17,8944
H ₂	12,3976	19,536
Acetona	0,128964	5,88743
SO ₄	-0,0993544	-0,0883676
Fosfato inorgânico	-0,133771	-0,118979
Acetato	5,14	0,03
Butirato	3,09373	0
Gliceraldeído	0,00234286	0,00208378
4-Aminobenzoato	-0,00234286	-0,00208378
Biomassa	0,147745	0,131407

Os resultados mostram uma redução de 99,64% na produção de acetato e butirato, uma redução de 11% na produção de biomassa e um aumento de 53,76% na produção de hidrogênio e CO₂.

5.4 Correção da Função mfaop do METoolbox

Para validar a correção feita no METoolbox (MENDES, 2006), uma FBA comparativa foi feita entre GEnSys (OLIVEIRA, 2008), COBRA Toolbox e METoolbox, a partir do mesmo modelo simplificado da *C. acetobutylicum* (Tabela 10).

Tabela 10 – FBA comparativa entre os diferentes toolboxes.

	Taxas de consumo de substrato e formação de produtos (mmol.g célula seca ⁻¹ .h ⁻¹).		
	GEnSys	COBRA	METoolbox
Ex_glc	-	-11,069	-11,0689
Ex_glyc	-	0	0
Ex_atp	-	-34,88	-34,88
Ex_nad	-	-2,0551	-2,0551
Ex_hyd	-	32,8249	32,8249
Ex_lac	-	0	0

Ex_ac	-	17,44	17,44
Ex_etoH	-	0	0
Ex_bu	-	0	0
Ex_acetone	-	0	0
Ex_buoh	-	0	0
vglc	8,72	8,72	8,72
vglyc	0	0	0
vpYr	17,44	17,44	17,44
vpdh	17,44	17,44	17,44
vnadh	15,3849	15,3849	15,3849
vhyd	32,8249	32,8249	32,8249
vlac	0	0	0
vthi	0	0	0
vac	17,44	17,44	17,44
vetoh	0	0	0
vacetone1	0	0	0
vacetone2	0	0	0
vhcoa	0	0	0
vbu	0	0	0
vbuh	0	0	0
vatpase	0	0	0
vbiomass	3,5232	3,52323	3,5232

A FBA do modelo original, feita utilizando toolbox GEnSys (OLIVEIRA, 2008), foi idêntica aos das reproduções feitas no COBRA Toolbox e METoolbox. Diferentemente do COBRA Toolbox e do METoolbox, o GEnSys não opera com *exchange reactions* e por esse motivo estes fluxos não são mostrados na Tabela 10.

É importante salientar que, diferentemente do GEnSys e do COBRA, o METoolbox não utiliza o glpk como *solver* de programação linear, mas sim o próprio *solver* do MATLAB.

Apenas o COBRA e o METoolbox trabalham com reações de contorno (*exchange reactions*), mas o METoolbox ainda precisa ter o

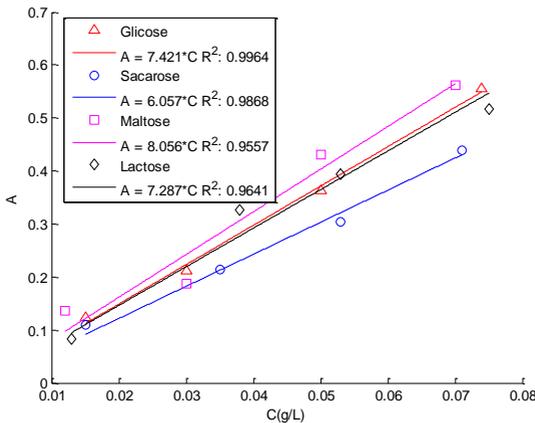
modelo convertido para sua matriz estequiométrica, enquanto o COBRA possui funções de importação que suportam arquivos SBML e XLS.

5.5 O Crescimento da *C. acetobutylicum* ATCC 824 em Sacarose, Maltose e Lactose vs. Glicose

A análise de sensibilidade, mostrada na seção 3.2, indicou a possibilidade de aumentar a produção de hidrogênio simplesmente substituindo o substrato padrão, glicose, por outros como sacarose, maltose e lactose.

Para a determinação das concentrações de substrato, quatro curvas padrões foram feitas, uma para cada substrato, conforme procedimento descrito na seção 3.7 (Figura 9).

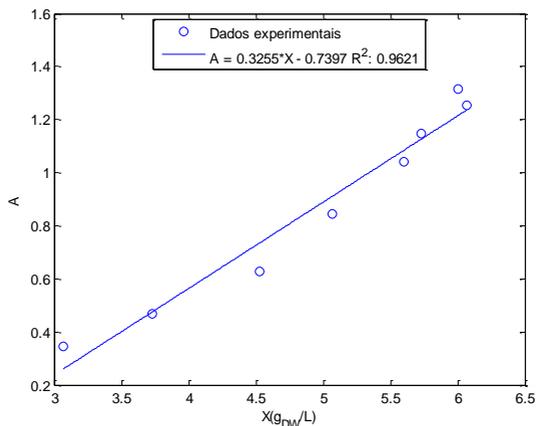
Figura 9 – Curvas padrões de absorbância vs. concentração para os diferentes substratos testados.



Fonte: Do autor.

A melhor relação linear obtida entre concentração de células e absorbância foi usada em todas as medidas de concentração celular, já que as medidas de absorbância são mais fáceis de se obter e menos suscetíveis a erros que a determinação da massa de célula seca (Figura 10).

Figura 10 – Curva padrão de concentração de células vs. absorvância à 570 nm.

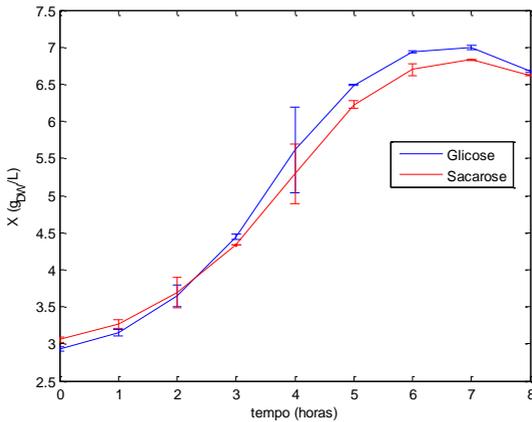


Fonte: Do autor.

5.5.1 Crescimento em Sacarose vs. Glicose

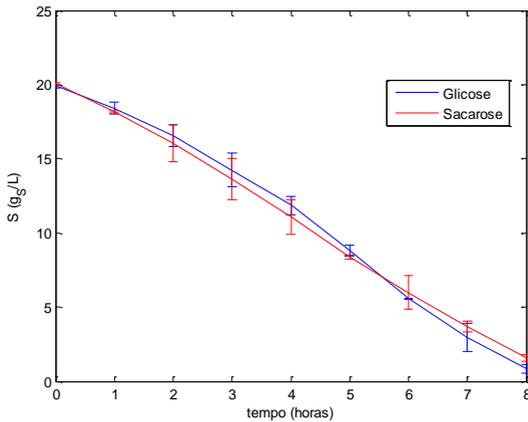
As taxas de crescimento e produção de hidrogênio com a *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em glicose ou sacarose foram muito semelhantes, sendo as de sacarose levemente inferiores (Figura 11, Figura 12 e Figura 13). Considera-se X a concentração de células, S a concentração de substrato (glicose ou sacarose) e P a concentração do produto desejado (hidrogênio).

Figura 11 – Dados experimentais da concentração de células (X) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em sacarose e glicose.



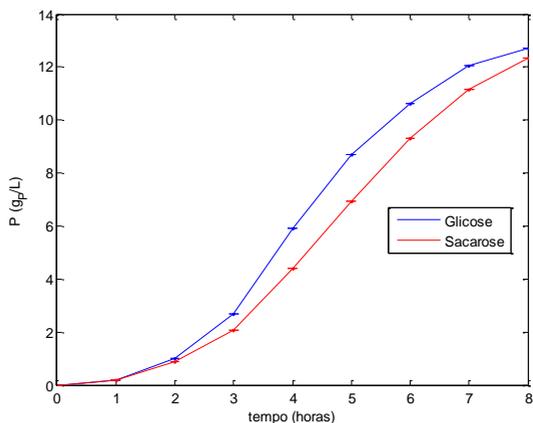
Fonte: Do autor.

Figura 12 – Dados experimentais da concentração de substrato (S) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em sacarose e glicose.



Fonte: Do autor.

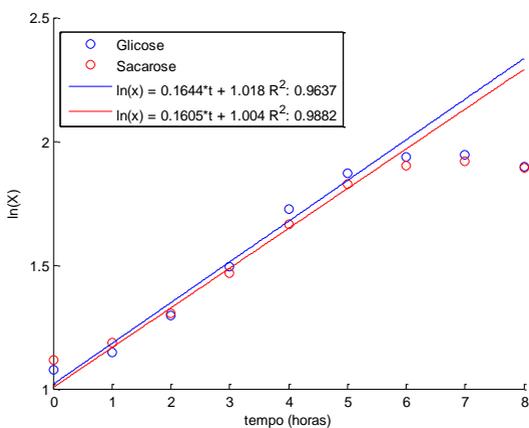
Figura 13 – Dados experimentais da concentração de hidrogênio (P) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em sacarose e glicose.



Fonte: Do autor.

Conforme Schmidell *et al.* (2001), a velocidade específica de crescimento máxima foi obtida pelo gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo, identificando a fase exponencial de crescimento (Figura 14), obtendo $\mu_m = 0,1644 \text{ h}^{-1}$ para glicose e $0,1605 \text{ h}^{-1}$ para sacarose.

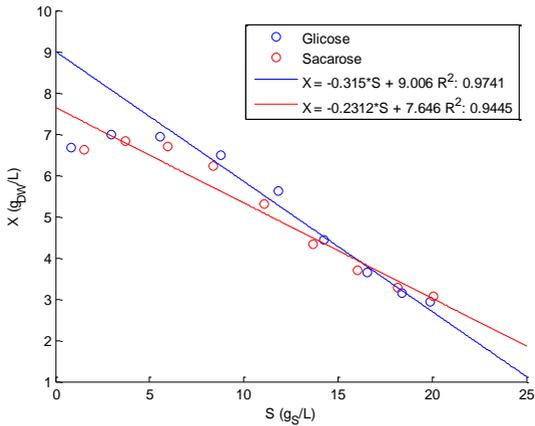
Figura 14 – Gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo.



Fonte: Do autor.

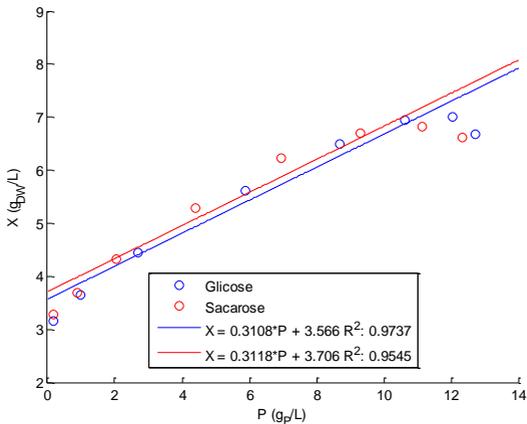
As estimativas iniciais para $Y_{X/S}$ e $Y_{X/P}$ foram obtidas pelos gráficos de X (concentração de células) vs. S (concentração de substrato) e X (concentração de células) vs. P (concentração de hidrogênio) (Figura 15 e Figura 16), mas as simulações dos balanços em batelada exigiram um ajuste desses parâmetros, por tentativa e erro, para que os dados experimentais fossem melhor contemplados.

Figura 15 – Gráfico de X vs. S.



Fonte: Do autor.

Figura 16 – Gráfico de X vs. P.



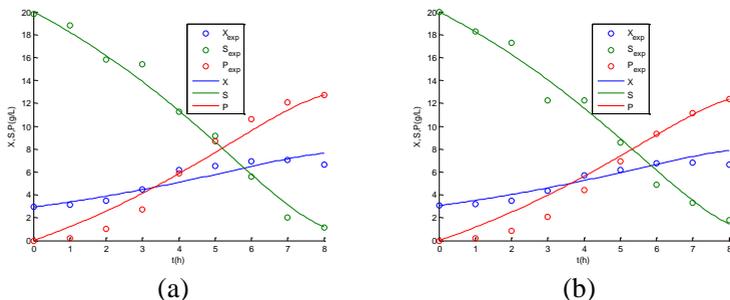
Fonte: Do autor.

O modelo cinético escolhido foi o de Monod, Equação (10), mas a linearização de Lineweaver-Burk apresentou coeficiente linear negativo e a constante de saturação K_S foi obtida por ajuste manual da simulação em batelada com os dados experimentais. Outras linearizações alternativas, como Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee, também foram testadas e falharam.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad (10)$$

Os dados simulados para crescimento em batelada, juntamente com os dados experimentais, são mostrados na Figura 17.

Figura 17 – Gráfico da simulação em batelada e dados experimentais de X , S e P em função do tempo, sendo (a) o crescimento em glicose e (b) sacarose.



Fonte: Do autor.

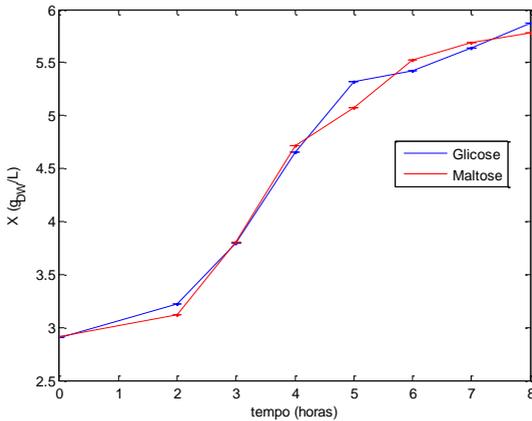
Como resultado de todos os ajustes, os dados cinéticos e estequiométricos restantes foram $K_S = 3 \text{ g}_S/\text{L}$, $Y_{X/S} = 0,25 \text{ g}_X/\text{g}_S$ e $Y_{X/P} = 0,37 \text{ g}_X/\text{g}_P$ para crescimento em glicose, e $K_S = 3 \text{ g}_S/\text{L}$, $Y_{X/S} = 0,26 \text{ g}_X/\text{g}_S$ e $Y_{X/P} = 0,39 \text{ g}_X/\text{g}_P$ para crescimento em sacarose. Constantes de morte celular e manutenção celular foram desprezadas.

Os resultados indicam um crescimento muito semelhante da *C. acetobutylicum* nos dois substratos.

5.5.2 Crescimento em Maltose vs. Glicose

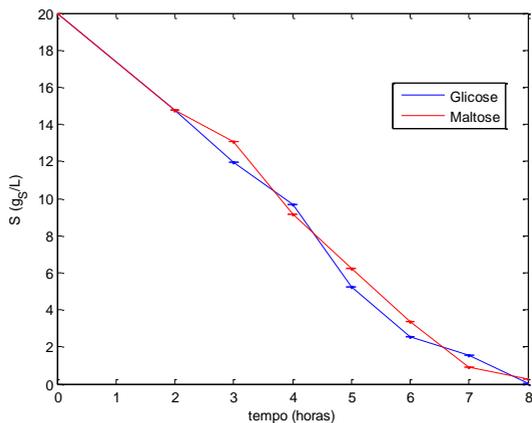
As taxas de crescimento e produção de hidrogênio *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em glicose ou maltose foram ainda mais semelhantes e promissoras que as obtidas com sacarose (Figura 18, Figura 19 e Figura 20).

Figura 18 – Dados experimentais da concentração de células (X) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em maltose e glicose.



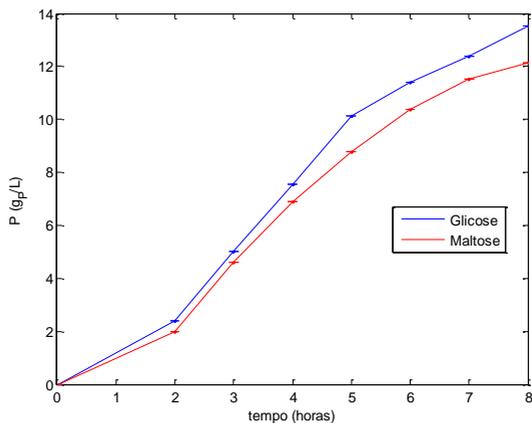
Fonte: Do autor.

Figura 19 – Dados experimentais da concentração de substrato (S) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em maltose e glicose.



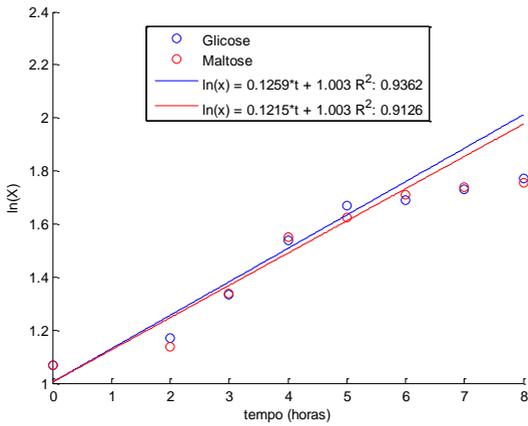
Fonte: Do autor.

Figura 20 – Dados experimentais da concentração de hidrogênio (P) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em maltose e glicose.



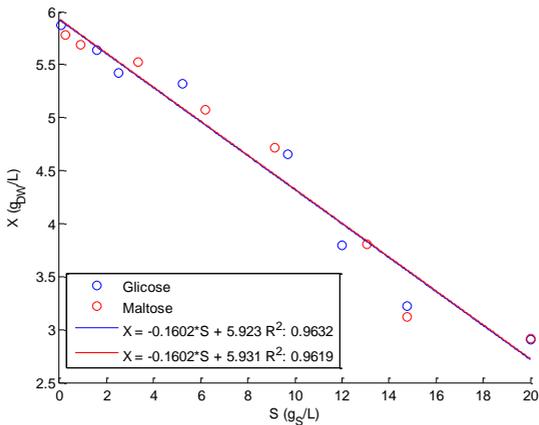
Fonte: Do autor.

Obteve-se $\mu_m = 0,1259 \text{ h}^{-1}$ para glicose e $0,1215 \text{ h}^{-1}$ para maltose (Figura 21).

Figura 21 – Gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo.

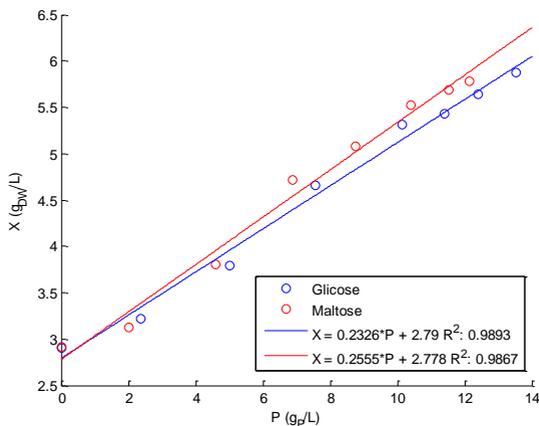
Fonte: Do autor.

As estimativas para $Y_{X/S}$ e $Y_{X/P}$ foram então obtidas (Figura 22 e Figura 23).

Figura 22 – Gráfico de X vs. S .

Fonte: Do autor.

Figura 23 – Gráfico de X vs. P.

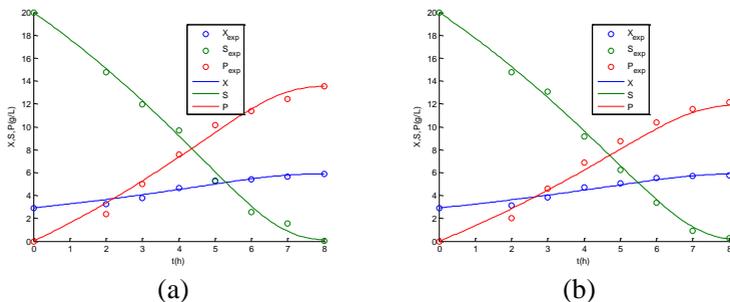


Fonte: Do autor.

A constante de saturação K_S foi novamente obtida por tentativa e erro na simulação em batelada.

Os dados simulados para crescimento em batelada, juntamente com os dados experimentais, são mostrados na Figura 24.

Figura 24 – Gráfico da simulação em batelada e dados experimentais de X, S e P em função do tempo, sendo (a) o crescimento em glicose e (b) maltose.



Fonte: Do autor.

Os dados cinéticos e estequiométricos restantes foram $K_S = 2$ g_S/L , $Y_{X/S} = 0,15$ g_X/g_S e $Y_{X/P} = 0,22$ g_X/g_P para crescimento em glicose, e $K_S = 2$ g_S/L , $Y_{X/S} = 0,15$ g_X/g_S e $Y_{X/P} = 0,25$ g_X/g_P para crescimento em maltose.

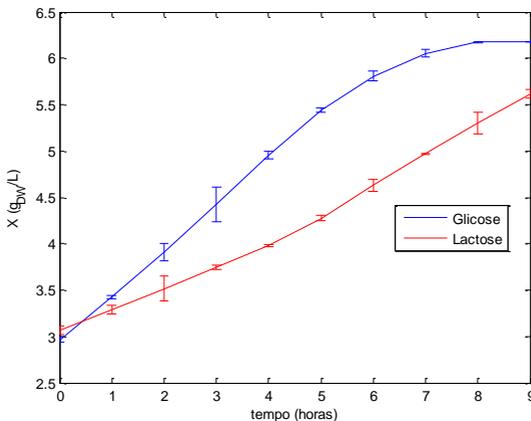
Os resultados indicam um crescimento idêntico da *C. acetobutylicum* nos dois substratos.

O motivo pelo qual todos os experimentos foram realizados contra a glicose fica claro ao analisar os novos dados cinéticos obtidos, que para glicose são diferentes dos anteriores (seção 5.5.1). O principal motivo está no tempo de armazenamento da própria bactéria, já que os experimentos foram feitos em dias diferentes, mas outras perturbações estatísticas imprevisíveis também podem ter influenciado neste crescimento menos acelerado.

5.5.3 Crescimento em Lactose vs. Glicose

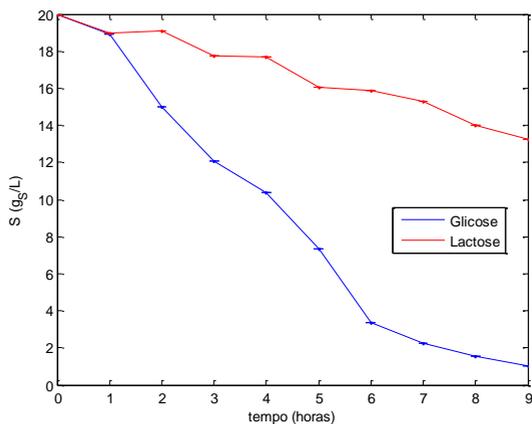
As taxas de crescimento e produção de hidrogênio *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em lactose foram bem inferiores às obtidas com glicose (Figura 25, Figura 26 e Figura 27).

Figura 25 – Dados experimentais da concentração de células (X) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em lactose e glicose.



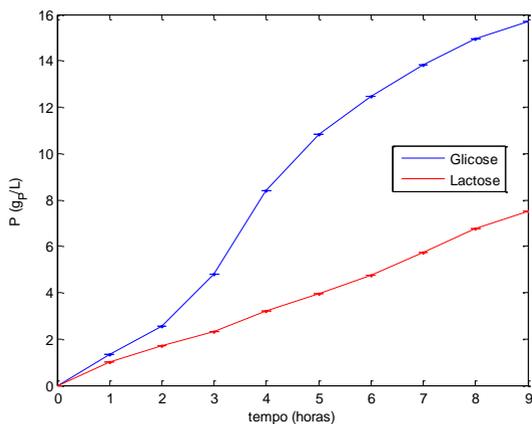
Fonte: Do autor.

Figura 26 – Dados experimentais da concentração de substrato (S) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em lactose e glicose.



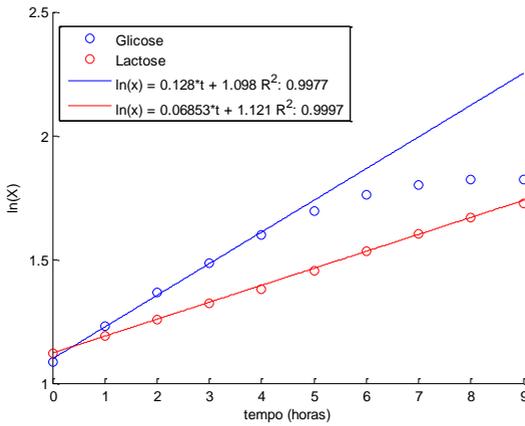
Fonte: Do autor.

Figura 27 – Dados experimentais da concentração de hidrogênio (P) vs. tempo para *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescendo em lactose e glicose.



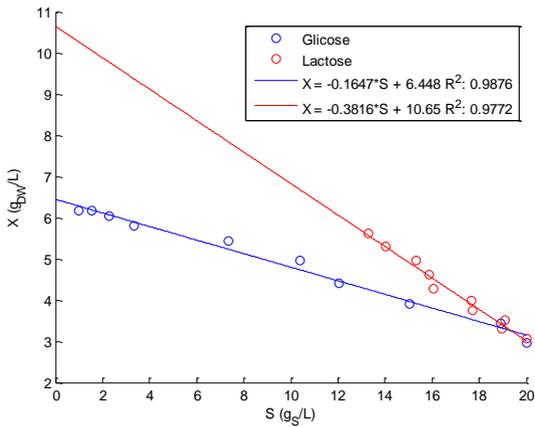
Fonte: Do autor.

Obteve-se $\mu_m = 0,128 \text{ h}^{-1}$ para glicose e $0,06853 \text{ h}^{-1}$ para lactose (Figura 28).

Figura 28 – Gráfico de $\ln(X)$ vs. tempo.

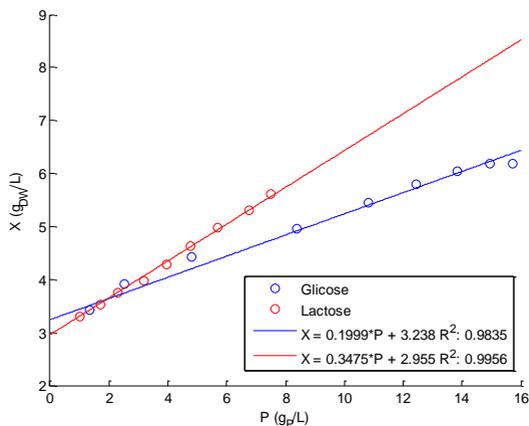
Fonte: Do autor.

As estimativas para $Y_{X/S}$ e $Y_{X/P}$ foram então obtidas (Figura 29 e Figura 30).

Figura 29 – Gráfico de X vs. S .

Fonte: Do autor.

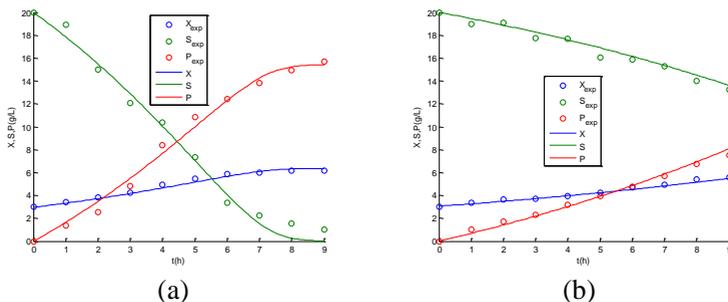
Figura 30 – Gráfico de X vs. P.



Fonte: Do autor.

Os dados simulados para crescimento em batelada, juntamente com os dados experimentais, são mostrados na Figura 31.

Figura 31 – Gráfico da simulação em batelada e dados experimentais de X, S e P em função do tempo, sendo (a) o crescimento em glicose e (b) lactose.



Fonte: Do autor.

Os dados cinéticos e estequiométricos restantes foram $K_S = 2$ g_S/L , $Y_{X/S} = 0,17$ g_X/g_S e $Y_{X/P} = 0,22$ g_X/g_P para crescimento em glicose, e $K_S = 1$ g_S/L , $Y_{X/S} = 0,38$ g_X/g_S e $Y_{X/P} = 0,30$ g_X/g_P para crescimento em lactose.

Os resultados indicam que a *C. acetobutylicum* cresce menos em lactose do que nos outros substratos estudados.

Os dados cinéticos obtidos para a glicose agora foram semelhantes aos da seção 5.5.2, confirmando a hipótese de que o tempo de armazenamento da bactéria foi o fator de maior influência, já que o período de espera entre o primeiro experimento e o segundo foi muito maior que entre o segundo e o terceiro. O extrato de carne utilizado no primeiro experimento foi de um fornecedor diferente dos outros dois, o que pode ter também influenciado.

5.5.4 Síntese dos Resultados

Diferentemente do que era previsto pela análise de sensibilidade, nenhuma das substituições de substrato resultou em uma produção maior de hidrogênio. Sacarose e maltose mostraram velocidades específicas e fatores de conversão muito semelhantes aos da própria glicose, tornando-os alternativas interessantes de substituição. Já a lactose apresentou velocidades específicas inferiores, indicando limitações maiores que simplesmente a estequiometria para este substrato Tabela 11.

Tabela 11 – Síntese dos resultados para o crescimento da *C. acetobutylicum* em sacarose, maltose e lactose vs. glicose.

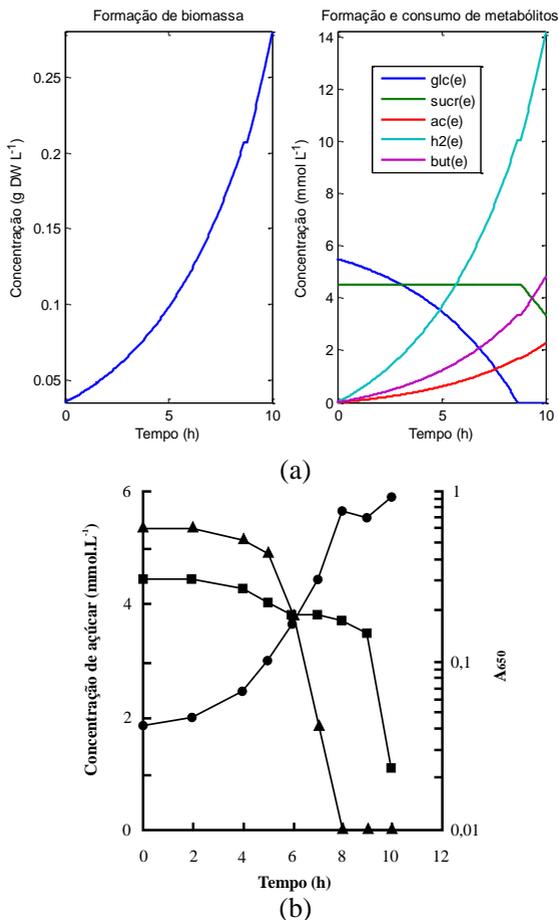
	Glicose	Sacarose	Glicose	Maltose	Glicose	Lactose
μ_m (h ⁻¹)	0,1644	0,1605	0,1259	0,1215	0,128	0,06853
K_S (gS/L)	3	3	2	2	2	1
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0,25	0,26	0,15	0,15	0,17	0,22
$Y_{X/P}$ (gX/gP)	0,37	0,39	0,22	0,22	0,22	0,30

5.6 Simulações do Modelo com Regulação e Validação com Dados Experimentais

Executando os comandos do COBRA Toolbox descritos na seção 3.2, o modelo com regulação e suas variantes restrições ajustadas para os diferentes substratos estudados foi devidamente validado.

Na primeira validação feita, dados da simulação dinâmica com regulação foram comparados com os dados experimentais de Tangney e Mitchell (2000) (Figura 32).

Figura 32 – Gráfico de validação do modelo com regulação: regulação da glicose sobre o consumo de sacarose. Dados simulados (a) vs. dados experimentais (b), onde \blacktriangle representa a concentração de glicose, \blacksquare sacarose e \bullet a biomassa.



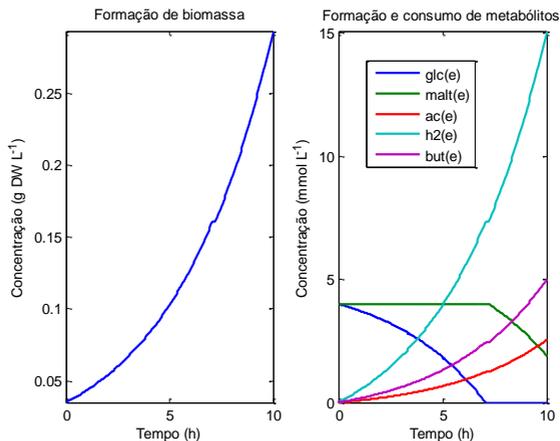
Fonte: (a) Simulação do autor e (b) Tangney e Mitchell (2000).

Apesar dos dados experimentais de Tangney e Mitchell (2000) indicarem claramente uma redução no fator de conversão de substrato em células quando sacarose passa a ser o único substrato, tal redução não foi observada nos dados experimentais da seção 5.5 e decidiu-se

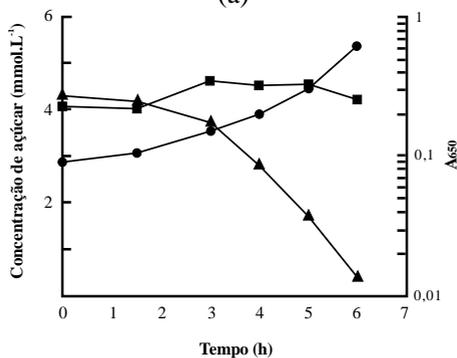
ajustar as restrições para que as taxas de crescimento não fossem alteradas quando sacarose passa a ser o único substrato. A regras de regulação têm caráter booleano e, portanto, o pequeno consumo de sacarose observado enquanto glicose estava presente no meio de fermentação não poderia ser reproduzido por este modelo. Diante das evidências mostradas pelo próprio artigo, o consumo de sacarose nesta região pode perfeitamente ser um erro experimental. Além disso, um consumo acelerado de sacarose após o fim da glicose gerou um crescimento celular inferior, o que obrigaria alterar restrições no metabolismo interno do modelo. Ajustar este comportamento sem uma evidência experimental é inviável diante das centenas de possibilidades. Ainda assim o comportamento regulatório descrito por Tangney e Mitchell (2000) foi bem reproduzido pelo modelo. Aproveitou-se a simulação para representar gráficos de outros metabólitos não quantificados experimentalmente, como acetato, butirato e hidrogênio.

A segunda validação realizada envolveu a regulação da glicose sobre o consumo de maltose, descrita por Tangney, Winters e Mitchell (2001) (Figura 33).

Figura 33 – Gráfico de validação do modelo com regulação: regulação da glicose sobre o consumo de maltose. Dados simulados (a) vs. dados experimentais (b), onde \blacktriangle representa a concentração de glicose, \blacksquare maltose e \bullet biomassa.



(a)



(b)

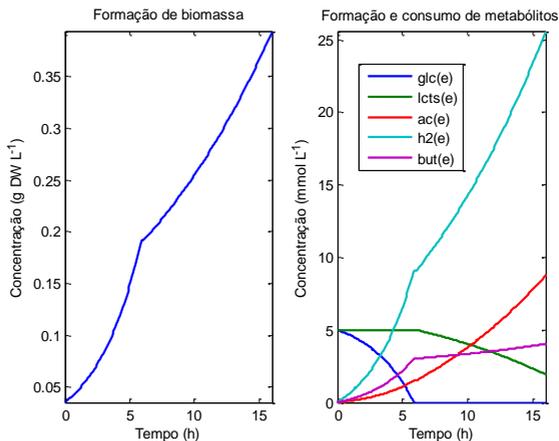
Fonte: (a) Simulação do autor e (b) Tangney, Winters e Mitchell (2001).

Tangney, Winters e Mitchell (2001) pararam o crescimento exatamente quando a concentração de glicose estava se esgotando. A simulação teve o esgotamento da glicose no tempo muito próximo do observado experimentalmente. O ajuste das restrições para maltose também levou em consideração os dados experimentais da seção 5.5, onde os parâmetros cinéticos observados para glicose e maltose foram

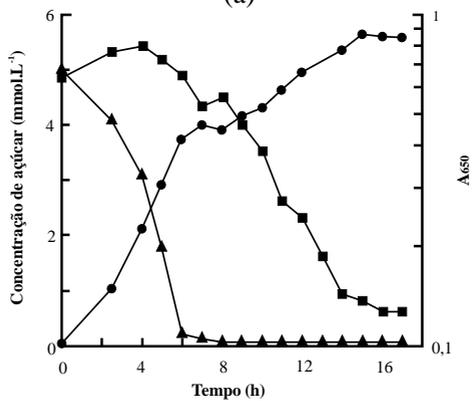
praticamente idênticos. Com a simulação foi possível expandir o tempo para dez horas e verificar a maltose sendo consumida quando a glicose se esgota.

Prosseguindo com as validações, comparou-se a simulação dinâmica do modelo regulado com os dados experimentais de Yu *et al.* (2007), envolvendo a regulação da glicose sobre o consumo de lactose (Figura 34).

Figura 34 – Gráfico de validação do modelo com regulação: regulação da glicose sobre o consumo de lactose. Dados simulados (a) vs. dados experimentais (b), onde \blacktriangle representa a concentração de glicose, \blacksquare lactose e \bullet biomassa.



(a)



(b)

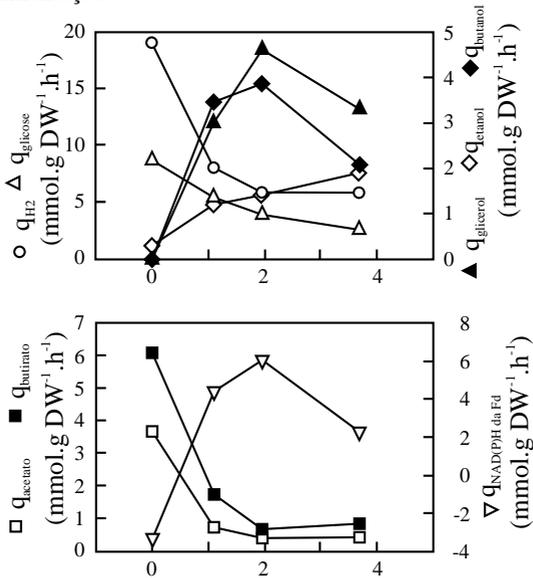
Fonte: (a) Simulação do autor e (b) Yu *et al.* (2007).

As menores taxas de crescimento observadas quando o microrganismo passa a consumir lactose também foram observadas na seção 4.8.4. Sendo assim, a restrição para a lactose foi ajustada para que o seu consumo fosse mais lento, o que resultou em crescimento a taxas menores. Todas as evidências experimentais foram reproduzidas pelo modelo com regulação.

A Figura 34 evidencia uma relação direta entre a formação de biomassa e a produção de hidrogênio pelo modelo com regulação. Esta relação de fato existe, já que a produção de hidrogênio atinge seu auge na fase exponencial de crescimento e todos os experimentos e análises do metabolismo da célula confirmam tal comportamento.

Diferentemente das últimas três situações de regulação validadas, para a regulação por glicerol, Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994) fizeram seus experimentos em um sistema contínuo (Figura 35).

Figura 35 – Velocidades específicas de consumo de substrato e formação de produtos em função da razão de alimentação.



Razão molar Glicerol/Glicose na alimentação

Fonte: Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994).

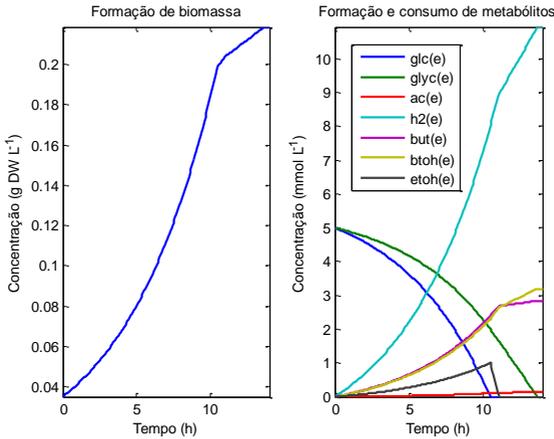
A razão de alimentação de 1:1 da Figura 35 serviu de base para a validação do modelo com as regras de regulação descritas na seção 3.2. Uma comparação entre a simulação e os dados experimentais é mostrada na Tabela 12.

Tabela 12 – Comparação entre os dados simulados por FBA com regulação e os dados experimentais de Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994).

	Taxas de consumo de substrato e formação de produtos (mmol.g célula seca ⁻¹ .h ⁻¹).	
	Simulação	Experimental
Glicose	-5	-5
Glicerol	-3	-3
H ⁺	3,4643	
SO ₄ ²⁻	-0,176987	
HPO ₄ ²⁻	-0,168143	
NH ₄ ⁺	-1,48836	
H ₂ O	5,75872	
4-aminobenzoato	-0,00263254	
Acetato	0,5	0,6
H ₂	8	8
Formato	0,107237	
CO ₂	11,1215	
Butirato	2,00814	2
Butanol	2,49524	3,5
Etanol	1	1,2
Glicolaldeído	0,00263254	
Biomassa	0,166014	

Apesar de uma diferença maior na velocidade específica de produção de butanol, o modelo como um todo apresentou boa concordância com os dados experimentais também para regulação por glicerol. Com o objetivo de verificar o comportamento dinâmico desta regulação, executou-se a FBA dinâmica com regulação para o modelo alimentado nessas condições, sem dados experimentais para comparação (Figura 36) .

Figura 36 – Simulação dinâmica da regulação do glicerol em uma cultura alimentada com glicose e glicerol na proporção de 1:1.



Fonte: Do autor.

Observa-se que ocorre uma forte alteração no metabolismo quando glicerol passa a ser o único substrato presente. O etanol passa a ser consumido juntamente com o glicerol e as velocidades específicas de crescimento e de produção de todos os metabólitos diminuem. Este consumo de etanol na ausência de glicose em meio contendo glicerol ainda não possui evidência experimental.

Dos resultados de Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994), o modelo consegue prever a maior produção de álcoois, em detrimento da produção de acetato e butirato, na presença de um meio contendo glicose e glicerol simultaneamente como fontes de carbono. No entanto, a redução na produção de butirato foi menor que o esperado.

Diante de todas as comparações com os dados experimentais, considera-se este modelo validado e útil para estudos de engenharia metabólica futuros. Cabe ressaltar que todo o modelo *in-silico* é um trabalho passível de melhoramentos, especialmente envolvendo regulação.

O fato de as regras de regulação serem necessariamente booleanas se caracteriza como uma limitação importante dos modelos com regulação, impedindo que interações alostéricas de inibição parcial sejam reproduzidas.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo faz uma comparação entre a Análise de Fluxo Metabólico (MFA) e a Análise de Balanço de Fluxos (FBA). Dentro da FBA, área da engenharia metabólica onde recentemente foram verificados grandes avanços, destaca-se o grupo de funções sintetizado em um Toolbox para o MATLAB desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos, o COBRA Toolbox.

O modelo simplificado da *C. acetobutylicum* (OLIVEIRA, 2008) foi utilizado para domínio da arte e validação da correção feita no METoolbox (MENDES, 2006), se tornando uma ferramenta bem estabelecida para estudos de engenharia metabólica.

A bactéria *C. acetobutylicum* ATCC 824 é uma grande produtora de hidrogênio utilizando glicose como substrato. Seu modelo *in silico*, cujas reações estão disponíveis em Lee *et al.* (2008), foi estruturado em SBML com sucesso e com resultados de FBA muito próximos dos indicados pelo autor.

Uma tentativa de melhorar o modelo de Lee *et al.* (2008) foi feita utilizando a remoção de gaps, mas os resultados ficaram mais distantes dos dados experimentais.

Com base no modelo de Salimi, Zhuang e Mahadevan (2010), um novo modelo com regulação foi feito e teve seus resultados dinâmicos e contínuos validados com dados experimentais de regulação apresentados em Vasconcelos, Girbal e Soucaille (1994), Tangney e Mitchell (2000), Tangney, Winters e Mitchell (2001) e Yu *et al.* (2007).

A Análise de Sensibilidade do modelo regulado indicou que a utilização de outros substratos como lactose, sacarose e maltose poderia aumentar a produção de hidrogênio.

Ensaio experimentais mostraram que os crescimentos com sacarose e maltose apresentaram velocidades específicas e fatores de conversão muito próximos aos obtidos com glicose, podendo substituir este substrato. Já os parâmetros cinéticos obtidos com lactose foram desvantajosos, o que indica limitações além da própria estequiometria para este substrato.

A análise do nocaute de genes, utilizando o COBRA Toolbox no modelo reproduzido de Lee *et al.* (2008), indicou o nocaute do gene responsável pela reação BUTAN3 como melhor opção para maximizar a produção de hidrogênio. A FBA da *C. acetobutylicum* mutante apresentou uma grande redução na produção de acetato e butirato, uma

leve redução na produção de biomassa e um grande aumento na produção de hidrogênio e CO₂.

Fica como sugestão para trabalhos futuros o teste da hipótese de deleção do gene responsável pela reação BUTAN₃, única hipótese gerada nesta tese que não foi testada experimentalmente.

Modelos *in silico*, principalmente os que possuem regras de regulação, não são modelos definitivos. Todos são passíveis de melhoramentos, podendo abranger uma porcentagem maior das ORFs, ter mais restrições compatíveis com observações experimentais, apresentar funções objetivo mais complexas e ainda receber novas regras de regulação.

O fato de as regras de regulação terem um comportamento booleano se tornou uma limitação clara durante a elaboração do modelo regulado. Trabalhos futuros podem estudar formas de inibição que não eliminem por completo a expressão de um gene.

REFERÊNCIAS

BECKER, S. A. et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. **Nat Protoc**, v. 2, n. 3, p. 727-38, 2007.

BELL, S. L.; PALSSON, B. O. Phenotype phase plane analysis using interior point methods. **Computers & Chemical Engineering**, v. 29, n. 3, p. 481-486, Feb 15 2005.

CASTRO, J. D. V. **Produção Biológica de Hidrogênio a partir de Glicerol por Clostridium acetobutylicum ATCC 824**. 2010. 100 Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, SC.

CIENTEC. **Fossil coal ash in Brazil**. Porto Alegre: CIENTEC - Science and Technology Foundation, 2006. 202.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956/03/01 1956.

DUSSEAUX, S. et al. Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. **Metabolic Engineering**, v. 18, p. 1-8, Jul 2013.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7379-7389, Sep 2009.

HEAP, J. T. et al. The ClosTron: Mutagenesis in Clostridium refined and streamlined. **J Microbiol Methods**, v. 80, n. 1, p. 49-55, Jan 2010.

HEAP, J. T. et al. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus Clostridium. **J Microbiol Methods**, v. 70, n. 3, p. 452-64, Sep 2007.

KEATING, S. M. et al. SBMLToolbox: an SBML toolbox for MATLAB users. **Bioinformatics**, v. 22, n. 10, p. 1275-7, May 15 2006.

LEE, J. et al. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 80, n. 5, p. 849-62, Oct 2008.

LEHMANN, D.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 5, p. 464-473, 2011.

MCANULTY, M. et al. Genome-scale modeling using flux ratio constraints to enable metabolic engineering of clostridial metabolism in silico. **BMC Systems Biology**, v. 6, n. 1, p. 42, 2012.

MENDES, E. **Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica: Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína**. 2006. 119 Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, SC.

OLIVEIRA, I. L. **Análise computacional de redes metabólicas com regulação**. 2008. 126 Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, SC.

ORTH, J. D.; FLEMING, R. M. T.; PALSSON, B. O. **Reconstruction and Use of Microbial Metabolic Networks: the Core *Escherichia coli* Metabolic Model as an Educational Guide**: University of California, San Diego: 60 p. 2009.

OZKAN, P. et al. Metabolic flux analysis of recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 2, p. 167-195, Jan 2005.

PAN, C. M. et al. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fap2. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 8, p. 3146-54, May 2008.

REED, J. L. Shrinking the Metabolic Solution Space Using Experimental Datasets. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 8, p. e1002662, 2012.

SALIMI, F.; ZHUANG, K.; MAHADEVAN, R. Genome-scale metabolic modeling of a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 7, p. 726-738, 2010.

SHELLENBERGER, J. et al. BiGG: a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 213, 2010.

SHELLENBERGER, J. et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. **Nat. Protocols**, v. 6, n. 9, p. 1290-1307, 2011.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. ISBN 85-212-0279-2.

SENGER, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. **Biotechnol Bioeng**, v. 101, n. 5, p. 1036-52, Dec 1 2008a.

_____. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Development of specific proton flux states and numerically determined subsystems. **Biotechnol Bioeng**, v. 101, n. 5, p. 1053-71, Dec 1 2008b.

SMOOT, M. E. et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 431-2, Feb 1 2011.

SOUCAILLE, P.; FIGGE, R.; CROUX, C. **Process for Chromosomal Integration and DNA Sequence Replacement in Clostridia**. WO2006EP66997 20061003, 2006

STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering : principles and methodologies**. San Diego ; London: Academic Press, 1998. xxi,725p. ISBN 0126662606.

SUBHRAVETI, P. et al. Summary of *Clostridium acetobutylicum*, Strain ATCC 824, version 18.1. 2014. Disponível em: < <http://www.biocyc.org> >. Acesso em: 22 out. 2014.

TANGNEY, M.; MITCHELL, W. J. Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 2, n. 1, p. 71-80, Jan 2000.

TANGNEY, M.; WINTERS, G. T.; MITCHELL, W. J. Characterization of a maltose transport system in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 5, p. 298-306, Nov 2001.

VARMA, A.; BOESCH, B. W.; PALSSON, B. O. Stoichiometric Interpretation of Escherichia-Coli Glucose Catabolism under Various Oxygenation Rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2465-2473, Aug 1993.

VASCONCELOS, I.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. Regulation of carbon and electron flow in Clostridium acetobutylicum grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1443-50, Mar 1994.

WALLENIUS, J. et al. Constraint-based genome-scale metabolic modeling of Clostridium acetobutylicum behavior in an immobilized column. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 603-610, Aug 2013.

YADAV, S. et al. A novel approach for biobutanol production by Clostridium acetobutylicum using glycerol: A low cost substrate. **Renewable Energy**, v. 71, p. 37-42, Nov 2014.

YU, Y. et al. Analysis of the mechanism and regulation of lactose transport and metabolism in Clostridium acetobutylicum ATCC 824. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 6, p. 1842-50, Mar 2007.

APÊNDICE A – GUIA DE INSTALAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO COBRA TOOLBOX

Inicialização do Toolbox

Primeiramente é necessário que o Matlab esteja instalado. Em seguida são instalados os toolboxes necessários e faz-se a integração dos mesmos ao Matlab. O SBML Toolbox está disponível em <http://sourceforge.net/projects/sbml/files/libsbml/> e o COBRA Toolbox está disponível em <http://opencobra.sourceforge.net/openCOBRA/>. Pacotes de programação linear e não linear também são necessários. O GNU Linear Programming Kit, glpk, é o único pacote de programação linear gratuito e já vem integrado às versões mais recentes do COBRA Toolbox.

A instalação dos toolboxes exige a adição automática de alguns diretórios de trabalho no Matlab, o que atualmente só funcionará se o Controle de Conta do Usuário do Windows for desativado durante o procedimento de instalação.

Com o bloqueio à pasta Arquivos de Programas desativado, após executar a instalação do SBML Toolbox, a integração do mesmo ao Matlab atualmente é feita com a execução do arquivo *C:\Program Files\SBML\libSBML-5.1.0b0-libxml2-x86\bindings\matlab\matlab\installSBML.m* dentro da janela de comando do Matlab. O caminho possui a versão do SBML Toolbox, portanto, está sujeito a alterações quando o COBRA Toolbox utilizar versões mais novas do mesmo. Por fim, integração do COBRA Toolbox é feita ao rodar o script

```
>> initCobraToolbox
```

na janela de comando do Matlab. O comando é responsável pela integração dos diretórios do COBRA Toolbox ao Matlab, bem como a seleção dos melhores *solvers* previamente instalados no computador. Sua execução deve ser feita antes de qualquer utilização do COBRA Toolbox, pois as seleções prévias dos *solvers* são perdidas toda vez que o Matlab é fechado. Os *solvers* compatíveis são:

- Gurobi (Gurobi Optimization, <http://www.gurobi.com>) através do
Gurobi Mex

(http://www.convexoptimization.com/wikimization/index.php/Gurobi_mex);

- CPLEX (ILOG) através do Tomlab (Tomlab Optimization, <http://tomopt.com>);
- GLPK (<http://www.gnu.org/software/glpk>) através do glpkmex (<http://glpkmex.sourceforge.net>) (SCHELLENBERGER *et al.*, 2011).

Durante a utilização do COBRA Toolbox, os *solvers* para cada tipo de problema (LP, MILP, QP, MIQP, NLP) podem ser trocados utilizando o comando

```
>> changeCobraSolver('glpk', 'LP');
```

onde o glpk está sendo escolhido para uso. Trocando glpk por outro LP *solver* previamente instalado, o mesmo será utilizado nas análises subsequentes.

É importante salientar que o GLPK, único *solver* gratuito compatível, não fornece soluções acuradas para os comandos OptKnock e GDLS implementados no Toolbox.

O comando

```
>> testAll
```

executa um conjunto de testes relacionados a todas as funções do COBRA Toolbox, informando quais as funções estão ou não funcionando corretamente com os *solvers* instalados.

Após a instalação, o Controle de Conta do Usuário pode ser reativado.

Leitura e Exportação de Modelos em Formato SBML e XLS

Esta seção inicia uma série de simulações envolvendo todas as análises disponíveis no COBRA Toolbox. As simulações foram aplicadas aos modelos da *Escherichia coli* (Ec_iJR904_GlcMM) ou da *Saccharomyces cerevisiae* (Sc_iND750_GlcMM) em meio mínimo de glicose, cujos arquivos SBML estão disponíveis em http://gcrp.ucsd.edu/Downloads/Cobra_Toolbox?action=AttachFile&do=get&target=Ec_iJR904_GlcMM.xml e http://gcrp.ucsd.edu/Downloads/Cobra_Toolbox?action=AttachFile&do=get&target=Sc_iND750_GlcMM.xml, respectivamente. Ambos os

modelos estão pré-configurados com maximização da taxa de crescimento como função objetivo.

Toda a vez que o Matlab for aberto, a inicialização dos *solvers* deve ser feita com o comando

```
>> initCobraToolbox
```

Assumindo que o organismo *in silico* no formato SBML está no diretório de trabalho atual do Matlab, a leitura do modelo é feita através do comando

```
>> model = readCbModel(fileName);
```

Por exemplo, para fazer a leitura da *E. coli* iJR904, disponível nos organismos *in silico* do Grupo de Pesquisa de Sistemas Biológicos, o comando seria:

```
>> model = readCbModel('Ec_iJR904_GlcMM');
```

Este é um passo crítico para que as próximas funções funcionem e indica se os procedimentos de instalação e integração foram feitos corretamente.

Organismos *in silico* podem ser construídos também em arquivos XLS (Planilhas do Microsoft Excel). Este processo é muito mais simples do que a construção direta em SBML, mas é limitado quanto ao número de caracteres presentes em cada célula.

A leitura de arquivos XLS é feita com o comando

```
>> model = xls2model(fileName);
```

que, aplicado ao modelo da *E. coli*, fica

```
>> model = xls2model('Ec_iJR904_GlcMM');
```

A exportação de modelos entre os diferentes formatos pode ser feita com o comando

```
>> writeCbModel(model, format, [fileName],
[compSymbolList], [compNameList], [SBMLLevel],
[SBMLVersion]);
```

Por exemplo, para exportar o modelo da *E. coli* para o formato SBML usa-se

```
>> writeCbModel(model, 'sbml', 'Ec_iJR904_GlcMM');
```

e para o format XLS usa-se

```
>> writeCbModel(model, 'xls', 'Ec_iJR904_GlcMM');
```

Na exportação para o formato XLS, no entanto, existe a possibilidade de uma célula ter seu conteúdo cortado devido a limitações do Excel quanto ao número de caracteres por célula.

Alteração dos Limites das Reações

Mudar os limites de reações específicas é uma estratégia interessante para simular diferentes condições do meio, como limitações no transporte de substrato para o interior da célula. A função relacionada é:

```
>> model = changeRxnBounds(model, rxnNameList,
boundValue, boundType);
```

onde `rxnNameList` é a lista de reações cujos limites deseja-se mudar. Para reações de transporte, limites inferiores negativos permitem entrada no sistema, enquanto limites superiores positivos permitem saída do sistema. O parâmetro `boundType` define qual limite a ser mudado, com três possíveis valores: “l”, limite inferior, “u”, limite superior; e “b” para ambos. As reações cujas observações experimentais indicam sempre procederem no sentido direto podem ter seus limites inferiores fixados em zero.

Por exemplo, para substituir o substrato glicose por succinato, é impedido o consumo de glicose tornando zero o seu limite inferior. Ao colocar o limite inferior do fluxo de consumo de succinato para -9, permitimos o consumo (sinal negativo) de até 9 mmol.g célula seca⁻¹.hr⁻¹ pela célula.

```
>> model = changeRxnBounds(model, {'EX_glc(e)',
'EX_succ(e)'}, [0 -9], 'l');
```

Adição e/ou Remoção Reações do Modelo

O comando para adicionar reações no modelo é:

```
>> model = addReaction(model, rxnName,
metaboliteList, stoichCoeffList, [revFlag],
[lowerBound], [upperBound],
[objCoeff], [subsystem], [grRule], [geneNameList],
[systNameList], [checkDuplicate]);
```

onde `rxnName` é o nome da reação, `metaboliteList` e `stoichCoeffList` contém os nomes dos metabólitos participantes da reação e seus correspondentes coeficientes estequiométricos em um vetor, `[revFlag]` indica se a reação é reversível ou não (`true` para sim e `false` para não), `[lowerBound]` e `[upperBound]` são os limites inferiores e superiores da reação, `[objCoeff]` é a indicação se esta reação é ou não a função objetivo, `[grRule]` contém as siglas dos genes associados à reação e suas relações em formato booleano (`and/or`), `[geneNameList]` contém os nomes dos genes indicados em `[grRule]`, usado apenas para a tradução dos nomes comuns para os nomes sistemáticos, `[systNameList]`, e finalmente `[checkDuplicate]` solicita ou não a verificação de reações em duplicata (`true` para sim e `false` para não).

Como exemplo, a adição de uma reação hipotética $A \rightarrow B + 2 C$ pode ser feita com o comando

```
>> model = addReaction(model, 'newRxn1', 'A -> B + 2
C');
```

ou com o comando

```
>> model =
addReaction(model, 'newRxn1', {'A', 'B', 'C'}, [-1 1
2], false);
```

A função que remove uma ou mais reações é:

```
>> model = removeRxnns(model, rxnRemoveList);
```

onde `rxnRemoveList` contem os nomes das reações a serem removidas do modelo. Qualquer metabólito que não for mais usado em reação alguma também será removido.

Como exemplo, a remoção da reação PGK do modelo *E. coli* é feita com

```
>> model = removeRxnns(model, {'PGK'});
```

Mudança do Objetivo do Modelo

Nas abordagens baseadas em restrições que utilizam otimização, é necessária uma função objetivo para a obtenção da distribuição de fluxos que otimiza este objetivo. O comando que muda a função objetivo é:

```
>> model =
changeObjective(model, rxnNameList, objectiveCoeff);
```

onde `rxnNameList` são as reações cujo coeficiente do objetivo será mudado, enquanto o `objectiveCoeff` é um vetor que contém os coeficientes de cada reação em `rxnNameList`.

Por exemplo, a troca da função objetivo padrão, formação de biomassa, para produção de etanol em *E. coli* seria feita com o comando

```
>> model = changeObjective(model, {'EX_etoH(e)',
'BiomassEcoli'}, [1 0]);
```

Boas predições do comportamento da célula foram obtidas utilizando a maximização da velocidade de crescimento como função objetivo, mas um mesmo micro-organismo pode ter comportamentos metabólicos distintos em fases de crescimento diferentes, por exemplo, a acidogênese e a solvetogênese da *C. acetobutylicum* (LEE *et al.*, 2008), sendo necessárias funções objetivo distintas para prever o comportamento de cada fase.

Exibição de Fórmulas de Reações

A seguinte função permite a exibição de fórmulas estequiométricas de qualquer reação do modelo:

```
>> printRxnFormula(model, rxnNameList);
```

onde rxnNameList contém os nomes de uma ou mais reações incluídas no modelo. Como exemplo, o comando

```
>> printRxnFormula(model, {'HYD1', 'HYD2', 'HYD3'});
```

exibe as reações nomeadas como HYD1, HYD2 e HYD3, presentes no modelo Ec_iJR904_GlcMM, bem como os genes associados às mesmas.

```
HYD1      h2[c] + 2.000000 h[c] + q8[c]      ->
2.000000 h[e] + q8h2[c]      ( ( b0972 and b0973
and b0974 ) or ( b2994 and b2997 ) or (
b2719 and b2720 and b2721 and b2722 and
b2723 and b2724 ) )
HYD2      h2[c] + 2.000000 h[c] + mqn8[c]      ->
2.000000 h[e] + mql8[c]      ( ( b2994 and b2997 )
or ( b0972 and b0973 and b0974 ) )
HYD3      2dmmq8[c] + h2[c] + 2.000000 h[c]      ->
2dmmq18[c] + 2.000000 h[e]      ( ( b0972 and b0973
and b0974 ) or ( b2994 and b2997 ) )
```

Simulação do Crescimento Máximo Usando Análise de Balanço de Fluxos (FBA)

A FBA, baseada na otimização linear, faz uso de restrições (limites superiores e inferiores para os fluxos) e de uma função objetivo, que geralmente é a formação de biomassa, para prever o comportamento metabólico de uma célula. No COBRA Toolbox a FBA é executada com a função

```
>> solution = optimizeCbModel(model);
```

Esta função faz a FBA no modelo com o intuito de maximizar a função objetivo atual. O campo “x”, resultante da função, descreve uma particular, possivelmente não única, distribuição de fluxos ótima através da rede. A função

```
>>
printFluxVector(model, solution.x, nonZeroFlag, excFlag);
```

exibe o resultado da FBA na janela de comandos. A saída irá conter uma lista de todas as reações do modelo ao lado dos correspondentes valores de fluxo. Colocando `nonZeroFlag` como “true”, apenas fluxos diferentes de zero serão reportados, e colocando o `excFlag` como “true”, apenas os fluxos de transporte (ex. transporte de glicose extracelular para dentro da célula) serão reportados. Por exemplo, a FBA do modelo `Ec_iJR904_GlcMM`, previamente configurado para maximizar biomassa, é feita com o comando

```
>> solution = optimizeCbModel(model);
```

para executar a FBA, e o comando

```
>> printFluxVector(model, solution1.x, true, true);
```

para exibir todos os fluxos extracelulares não nulos (“true” em `nonZeroFlag` e `excFlag`). Os seguintes resultados, mmol.g célula seca⁻¹.h⁻¹, são exibidos:

```
BiomassEcoli      0.539113
EX_co2(e)         13.649
EX_glc(e)         -6
EX_h2o(e)         25.0619
EX_h(e)           4.92804
EX_nh4(e)         -5.76013
EX_o2(e)          -12.568
EX_pi(e)          -0.491475
EX_so4(e)         -0.1256
```

Análise de Robustez

A função `robustnessAnalysis` faz análises de balanço de fluxo sequenciais, registrando o fluxo de biomassa encontrado (se este for o objetivo escolhido) em resposta a cada fluxo fixado para a reação investigada. Dessa forma é possível prever, por exemplo, se a deleção de um gene é letal ou não para a célula. A função usada para a análise de robustez é:

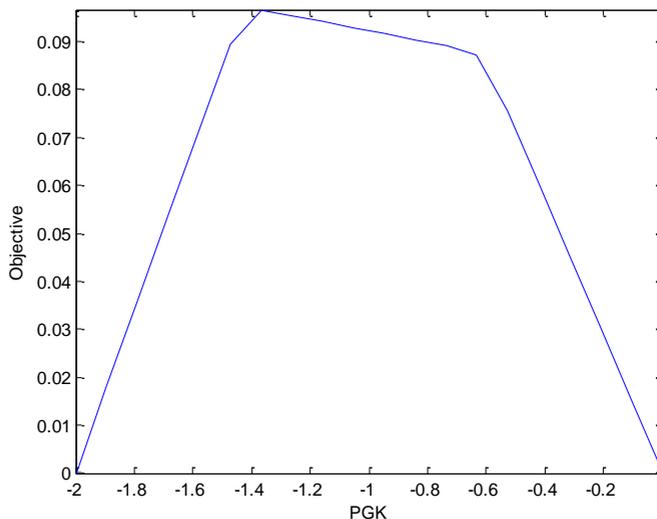
```
>> robustnessAnalysis(model, controlRxn, nPoints);
```

Esta função computa e constrói o gráfico dos valores da função objetivo como uma função dos valores de fluxo para a reação de interesse (controlRxn). O fluxo da reação de interesse é variado entre os limites inferior e superior pré-configurados no modelo para esta reação. O valor nPoints é o número de pontos que o intervalo entre o limite inferior e superior será dividido.

Como exemplo, a análise de robustez para a reação PGK (fosfoglicerato quinase) no modelo Sc_iND750_GlcMM, após a leitura do mesmo (readCbModel ou xls2model), é feita com o comando

```
>> robustnessAnalysis(model, 'PGK', 20);
```

Figura 37 – Variação da função objetivo (taxa de crescimento) (h^{-1}) com o fluxo da reação PGK ($mmol.g \text{ célula seca}^{-1}.h^{-1}$).



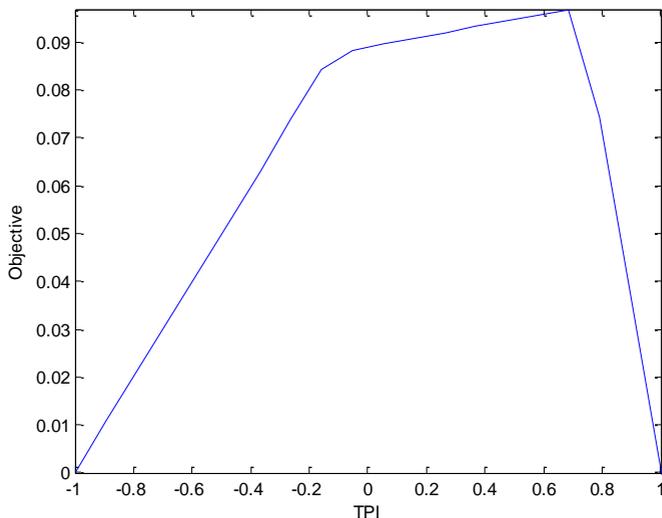
Fonte: Do autor.

A resposta da análise de robustez (Figura 37) indica a variação da função objetivo (biomassa) com o fluxo da reação fosfoglicerato quinase. O gráfico mostra que o nocaute deste gene (fluxo PGK zero) é letal para a célula.

Uma resposta diferente é obtida quando a análise de robustez é feita com a reação TPI (triose fosfato isomerase).

```
>> robustnessAnalysis(model, 'TPI', 20);
```

Figura 38 – Variação da função objetivo (taxa de crescimento) (h^{-1}) com o fluxo da reação TPI ($\text{mmol.g célula seca}^{-1}.\text{h}^{-1}$).



Fonte: Do autor.

A resposta, mostrada na Figura 38, agora indica que o nocaute do gene responsável pela reação TPI causa apenas um modesto retardo no crescimento.

Simulações de Crescimento com FBA Dinâmica (Simulações de Crescimento em Batelada)

Apesar da FBA, assim como a MFA, analisar a rede metabólica assumindo estado estacionário, FBA pode ser combinada com uma abordagem iterativa baseada em um estado semi-estacionário (FBA dinâmica baseado em otimização estática). Em cada passo no tempo, FBA é usado para prever taxas de crescimento, consumo de nutrientes e secreção de produtos. Estas taxas são então usadas para calcular biomassa e concentração de nutrientes em uma cultura no fim do passo no tempo. Usando este procedimento, a FBA dinâmica permite a

simulação de ambos os experimentos, batelada e batelada alimentada. A função responsável pela FBA dinâmica é:

```
>> dynamicFBA(model, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, tStep,
nSteps, plotRxns)
```

onde `substrateRxns` é a lista de reações de transporte relacionadas aos substratos (ex. glicose, amônia, fosfato). A variável `initConcentrations` é um vetor contendo as concentrações iniciais dos substratos presentes no vetor `substrateRxns`. A variável `initBiomass` especifica a quantidade inicial de biomassa na simulação. A variável `tStep` especifica o intervalo de tempo em horas e `nSteps` designa o número máximo de passos no tempo para a análise. A variável `plotRxns` é opcional e contém os nomes das reações de transporte para os metabólitos cuja dependência da concentração com o tempo deseja-se plotar.

Como exemplo, para fazer o FBA dinâmica do modelo `Ec_iJR904_GlcMM`, convém tornar mais limitados os consumos de glicose e oxigênio.

```
>> model = changeRxnBounds(model,
{'EX_glc(e)', 'EX_o2(e)'}, [-10 -18], 'l');
```

Alterados os limites de consumo de glicose e oxigênio, deve-se selecionar o substrato

```
>> substrateRxns = {'EX_glc(e)'};
```

estipular as concentrações iniciais de glicose e biomassa (10 mmol.L⁻¹ de glicose e 0,035 g célula seca.L⁻¹)

```
>> initConcentrations = 10; initBiomass = .035;
```

estipular o intervalo de tempo (em horas) e o número de intervalos

```
>> timeStep = .25; nSteps = 20;
```

selecionar as curvas que serão exibidas no gráfico

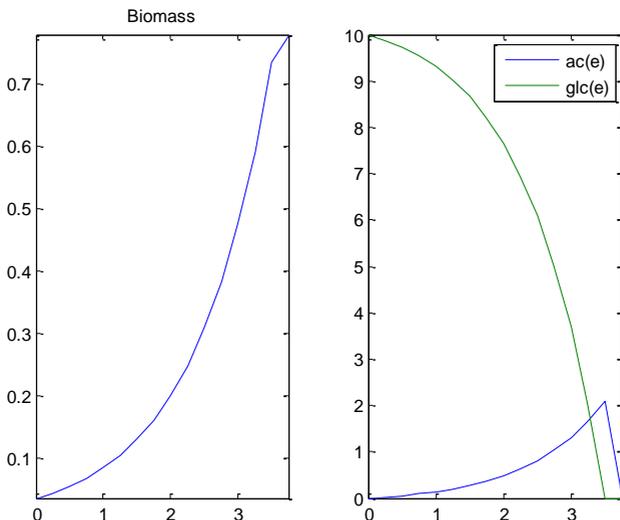
```
>> plotRxns = {'EX_glc(e)', 'EX_ac(e)'};
```

e finalmente fazer a simulação de crescimento dinâmico da *E. coli*.

```
>> dynamicFBA(model, substrateRxns,
initConcentrations, initBiomass, timeStep, nSteps,
plotRxns);
```

Como resultado, a função *dynamicFBA* mostra as curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de acetato, pois estes foram os fluxos selecionados pela função *plotRxns* (Figura 39).

Figura 39 – FBA dinâmica da *E. coli*, indicando a formação de biomassa (g célula seca.L⁻¹), de acetato (mmol.L⁻¹) e consumo de glicose (mmol.L⁻¹) em função do tempo (h).



Fonte: Do autor.

É interessante observar que a célula produz acetato até que a glicose seja completamente consumida. A partir desse ponto, o próprio acetato passa a ser substrato e um crescimento menos pronunciado da biomassa é observado.

Simulações de Fenótipos da Deleção de Genes e Interações Epistáticas

A simulação da deleção de um gene é obtida levando os limites inferior e superior de cada reação a zero e verificando as respectivas respostas na função objetivo. A deleção de um único gene pode ser estudada com a seguinte função:

```
>> [grRatio, grRateKO, grRateWT] =
singleGeneDeletion(model, method);
```

que calcula as taxas de crescimento para cada cepa deletada (grRateKO), bem como as razões entre suas taxas de crescimento (grRatio) e entre as taxas de crescimento das cepas mutadas e selvagens (grRateWT). O argumento `method` permite selecionar o método utilizado para obter a resposta, com opções FBA e linear MOMA (lMOMA), a versão linear da minimização de adaptação metabólica. Como exemplo, a simulação da deleção simples na *S. cerevisiae* (modelo Sc_iND750_GlcMM) comparando FBA com lMOMA é feita com o comando

```
>> grRatioFBA = singleGeneDeletion(model, 'FBA');
```

para FBA e o comando

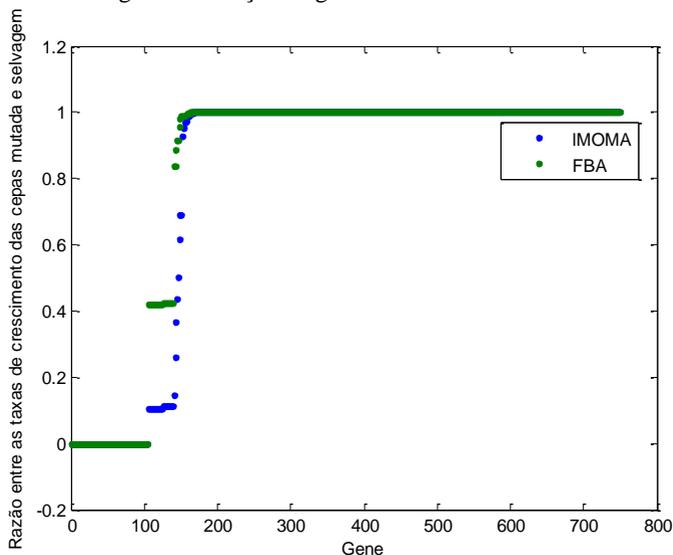
```
>> grRatioMOMA = singleGeneDeletion(model, 'lMOMA');
```

para lMOMA. A visualização gráfica dos dados pode ser feita com

```
>> plot(1:length(grRatioFBA), [sort(grRatioMOMA)
sort(grRatioFBA)], '.'); xlabel('Gene');
ylabel('Razão entre as taxas de crescimento das
cepas mutada e selvagem'); legend('lMOMA', 'FBA');
```

resultando na Figura 40.

Figura 40 – Predição da razão entre a taxa de crescimento da *S. cerevisiae* mutada e selvagem em relação ao gene deletado.



Fonte: Do autor.

A Figura 40 indica que a deleção de qualquer dos primeiros 105 genes é letal. A deleção de um dos próximos 57 genes resulta em redução da taxa de crescimento. Por fim, a deleção de um dos últimos 593 genes não altera a taxa de crescimento.

A deleção de dois genes pode ser investigada com a seguinte função:

```
>> [grRatio, grRateKO, grRateWT] =
doubleGeneDeletion(model,method);
```

que simula inicialmente a deleção simples para eliminar as deleções que já são letais. Das reações restantes, o `doubleGeneDeletion` faz combinações dois a dois para verificar a resposta na taxa de crescimento quando dois genes são deletados simultaneamente.

Usando os dados relativos à taxa de crescimento, a seguinte função pode ser utilizada para encontrar interações epistáticas (inibição) entre os genes do modelo:

```
>> interactions =
findEpistaticInteractions(model,grRatio);
```

Segue um exemplo de deleção dupla e busca por interações epistáticas aplicado ao modelo `Sc_iND750_GlcMM` com o método FBA.

```
>> grRatioDouble = doubleGeneDeletion(model, 'FBA');

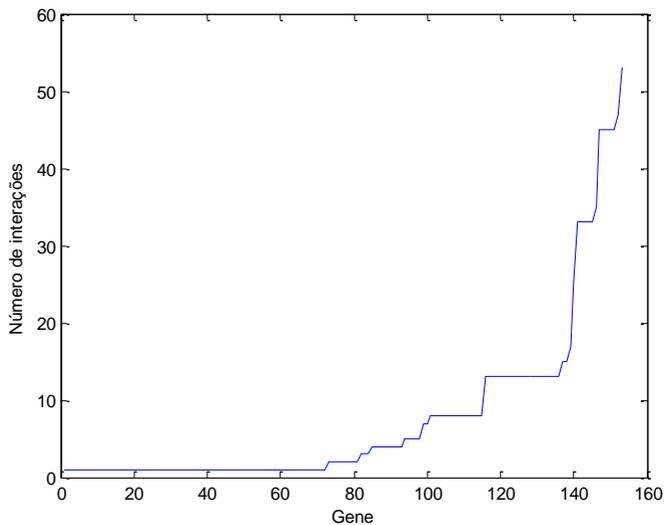
>> interactions = findEpistaticInteractions(model, grRatioDouble);

>> nInteractions = sum(interactions);

>> plot(sort(nInteractions(nInteractions > 0)), '-');
xlabel('Gene'); ylabel('Número de interações');
```

A sequência permite a visualização gráfica do número de interações epistáticas de cada um dos genes não letais (Figura 41).

Figura 41 – Distribuição do número de interações sintéticas letais e doentias para cada um dos 147 genes que participam de pelo menos uma destas interações.



Fonte: Do autor.

Análise de Variabilidade de Fluxos (FVA)

A análise de variabilidade de fluxos é particularmente útil para determinar as variações de fluxo que correspondem a uma solução ótima determinada através do FBA. É possível determinar os valores de fluxo mínimo e máximo que cada reação no modelo pode possuir enquanto satisfaz a hipótese de estado estacionário do FBA e os limites do sistema usando a função:

```
>> [minFlux,maxFlux] =
fluxVariability(model,optPercentage);
```

A variável `optPercentage`, com valores permitidos entre zero e 100, fixa a porcentagem mínima da solução ótima que será considerada. O valor padrão para a variável `optPercentage` é 100 (i.e., apenas solução(ões) ótimas). A aplicação do FVA, após a leitura do modelo `Ec_iJR904_GlcMM`, com taxa de crescimento contida em 90% do valor máximo é feita com o comando

```
>> [minFlux,maxFlux] = fluxVariability(model,90);
```

A exibição organizada dos resultados pode ser feita com a sequência de comandos que começa com a seleção das reações que se deseja exibir o FBA (glicólise e a via metabólica pentose fosfato)

```
>> rxnNames = {'PGI', 'PFK', 'FBP', 'FBA', 'TPI',
'GAPD', 'PGK', 'PGM', 'ENO', 'PYK', 'PPS',
'G6PDH2r', 'PGL', 'GND', 'RPI', 'RPE', 'TKT1',
'TKT2', 'TALA'};
```

seguida da busca pelos índices das reações selecionadas

```
>> rxnID = findRxnIDs(model,rxnNames);
```

e finalmente a exibição dos resultados com o comando

```
>> printLabeledData(model.rxns(rxnID),
[minFlux(rxnID) maxFlux(rxnID) maxFlux(rxnID) -
minFlux(rxnID)], true, 3);
```

Os seguintes resultados são exibidos:

RPI	-7.27712	-0.369992	6.90713	
TKT1	-1.94641	5.08359	7.03	
TALA	-1.95864	5.07137	7.03	
TKT2	-2.15805	4.87195	7.03	
GAPD	2.27346	10.6122	8.33878	
PGK	-10.6122	-2.27346	8.33878	
TPI	-2.94209	5.3967	8.33878	
PPS	0	11.66	11.66	
FBP	0	11.66	11.66	
FBA	-6.83141	6.89631	13.7277	
RPE	-4.10446	9.95554	14.06	
PGM	-14.2893	0.439926	14.7293	
ENO	-0.439926	14.2893	14.7293	
PFK	0	16.4134	16.4134	
GND	0	16.6488	16.6488	
PGI	-11.5701	5.91567	17.4857	
G6PDH2r	-7.42517e-026		17.4857	17.4857
PGL	0	17.4857	17.4857	
PYK	0	18.1839	18.1839	

A primeira coluna é a abreviação da reação, a segunda o valor mínimo, a terceira o máximo e a quarta a variação do fluxo das reações escolhidas em $\text{mmol.g célula seca}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Amostragem das Distribuições de Fluxo Permitidas

A amostragem aleatória uniforme da solução espacial em qualquer condição do meio é uma forma rápida e escalável para caracterizar a estrutura do espaço permitido de fluxos metabólicos. É possível fazer uma amostragem aleatória uniforme do espaço de fluxos definido pelas restrições no modelo com a seguinte função:

```
>> [models, samples] =
sampleCbModel(model, sampleFile)
```

A variável `sampleFile` contém o nome do arquivo usado para armazenar os resultados da amostragem.

É possível plotar histogramas das distribuições de fluxo para reações individuais, bem como gráficos de dispersão de pares para as reações de interesse com a seguinte função:

```
>> sampleScatterMatrix(rxnNames,modelS,samples)
```

onde rxnNames define o conjunto de reações que serão amostradas.

Um exemplo aplicado, após a leitura do modelo Ec_iJR904_GlcMM, inicialmente é feito o FBA.

```
>> sol = optimizeCbModel(model);
```

Se a taxa de crescimento for a função objetivo, esta pode ser selecionada pelo comando

```
>> growthRate = sol.f;
```

Para permitir soluções diversas, alterou-se o limite inferior da formação de biomassa para 90% da taxa de crescimento máximo com o comando

```
>> model = changeRxnBounds(model,'BiomassEcoli',
0.9*growthRate,'l');
```

A amostragem da distribuição de fluxos permitidos, seleção das reações de interesse (as mesmas da seção anterior), o histograma da distribuição de fluxos e gráficos de dispersão de pares correlacionando as reações são feitos com a seguinte sequência de comandos:

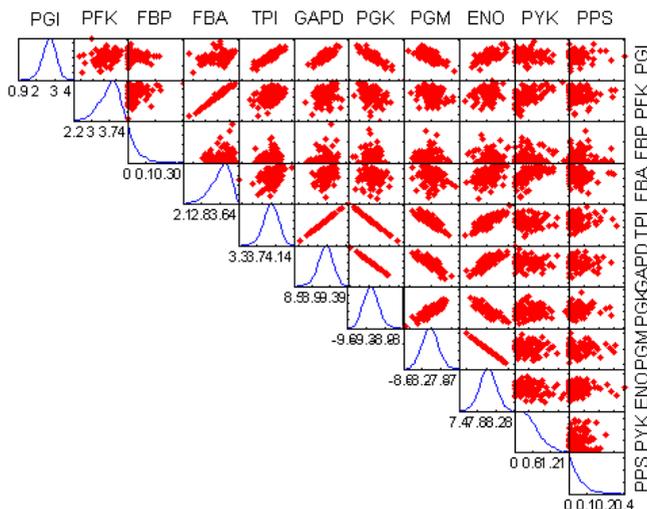
```
>> [modelSampling,samples] = sampleCbModel(model,
'Ec_iJR904_GlcMM_flux');
```

```
>> rxnNames = {'PGI', 'PFK', 'FBP', 'FBA', 'TPI',
'GAPD', 'PGK', 'PGM', 'ENO', 'PYK', 'PPS'};
```

```
>> sampleScatterMatrix(rxnNames,modelSampling,
samples);
```

O histograma da distribuição de fluxos e gráficos de dispersão de pares, resultantes da sequência de comandos, são mostrados na Figura 42.

Figura 42 – Amostragem de fluxos da *E. coli*. Histogramas de distribuição de fluxos (diagonal) e gráficos de dispersão de pares (fora da diagonal).



Fonte: Do autor.

Os eixos x dos histogramas, que formam a diagonal da figura, mostram a magnitude dos fluxos de crescimento celular através dos fluxos reação indicada. Os gráficos de dispersão de pares, elementos fora da diagonal, mostram as relações entre os fluxos de duas reações. Por exemplo, os fluxos das reações ENO e PGM são totalmente correlacionados no modelo (pontos estão bem alinhados), enquanto existe uma correlação muito pequena entre os fluxos ENO e PFK (pontos estão espalhados).

Módulos em Redes Metabólicas

A amostragem pode ser usada para determinar dependências entre reações que podem futuramente ser usadas para definir módulos de reações em redes que devem ser co-utilizadas em razões estequiométricas precisas (conjunto de reações correlacionadas).

Começando com um conjunto de amostras (a saída da função *sampleCbModel*), identifica-se o conjunto de reações correlacionadas com:

```
>> [sets, setNumber, setSize] =
identifyCorrelSets(modelSampling, samples, corrThr)
```

onde *modelSampling* e *samples* são saídas da função *sampleCbModel*. *corrThr* é um argumento opcional que define o limite mínimo de correspondência. A função retorna uma lista de conjuntos de reações correlacionadas (*sets*), bem como o número do conjunto que cada reação pertence (vetor *setNumber*) e o tamanho do conjunto (vetor *setSize*).

Um exemplo aplicado ao modelo *Sc_iND750_GlcMM*, após a leitura do mesmo (*readCbModel* ou *xls2model*), segue os seguintes comandos:

```
>> [modelSampling, samples] =
sampleCbModel(model, 'Sc_iND750_GlcMM_flux');
```

faz a amostragem das distribuições fluxos permitidas,

```
>> [sets, setNumber] =
identifyCorrelSets(modelSampling, samples);
```

identifica o conjunto de reações correlacionadas,

```
>> selectRxns = setNumber > 0 & setNumber <= 5;
```

seleciona as cinco primeiras correlações,

```
>> outputRxnList = modelSampling.rxns(selectRxns);
```

```
>> outputSetNumber = setNumber(selectRxns);
```

buscam as reações selecionadas e os respectivos índices,

```
>> outputNetworkCytoscape(model,
'iND750_correlSets', outputRxnList,
outputSetNumber, [], [], 40);
```

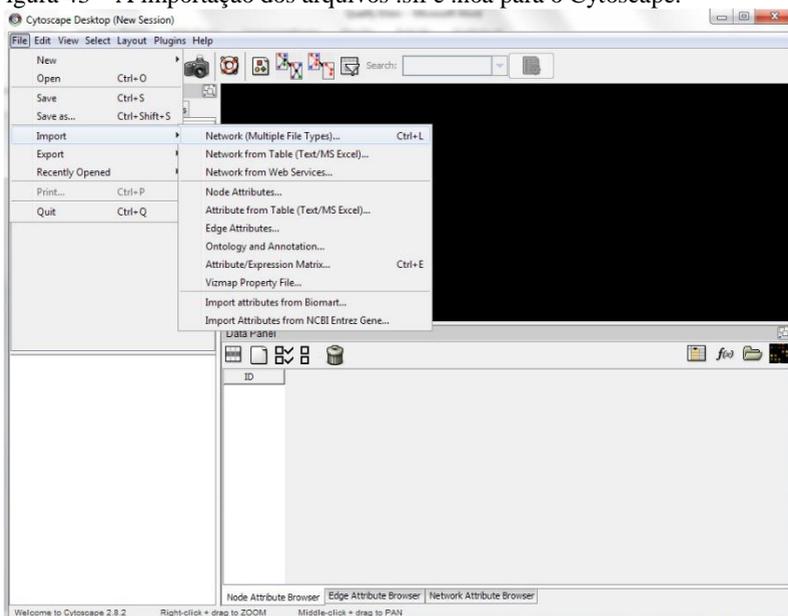
gera os arquivos *iND750_correlSets.sif*,
iND750_correlSets_edgeType.noa, *iND750_correlSets_nodeComp.noa*,
iND750_correlSets_nodeType.noa,

iND750_correlSets_rxnMetData.noa e iND750_correlSets_subSys.noa, necessários para criar gráficos de correlação usando o Cytoscape.

O Cytoscape é um programa de bioinformática destinado à visualização de redes metabólicas e integração de dados. Trata-se de um aplicativo em Java, sob a biblioteca de licenças públicas GNU, disponível em <http://cytoscape.org> (SMOOT *et al.*, 2011).

No programa Cytoscape, o primeiro procedimento a ser feito é importar os arquivos gerados pela função *outputNetworkCytoscape* (Figura 43).

Figura 43 – A importação dos arquivos .sif e .noa para o Cytoscape.



Fonte: Do autor.

Em File > Import > Network (Multiple File Types), importa-se o arquivo iND750_correlSets.sif. Em File > Import > Node Attributes são importados os arquivos iND750_correlSets_nodeComp.noa, iND750_correlSets_nodeType.noa, iND750_correlSets_rxnMetData.noa e iND750_correlSets_subSys.noa. Por fim, em File > Import > Edge Attributes importa-se iND750_correlSets_edgeType.noa.

Concluídos os procedimentos de importação, seleciona-se Layout > yFiles > Organics para melhor visualização. O sistema é composto por nós (Nodes) e conexões (Edges). Por padrão o Cytoscape não diferencia os nós que são metabólitos, reações ou genes, sendo necessária uma customização manual da visualização. A diferenciação das conexões (reações) em reversíveis e irreversíveis, bem como atribuir cores aos subsistemas metabólicos também é feito de forma manual. As customizações mais importantes são indicadas na Figura 44, feitas na guia VizMapper do painel de controle.

Figura 44 – Principais customizações necessárias para identificar a reversibilidade das reações e os subsistemas reacionais. As setas de origem (a) e destino (b) para as reações irreversíveis, associação gênica e reações reversíveis. Em (c) foram escolhidas as cores para os diferentes subsistemas.

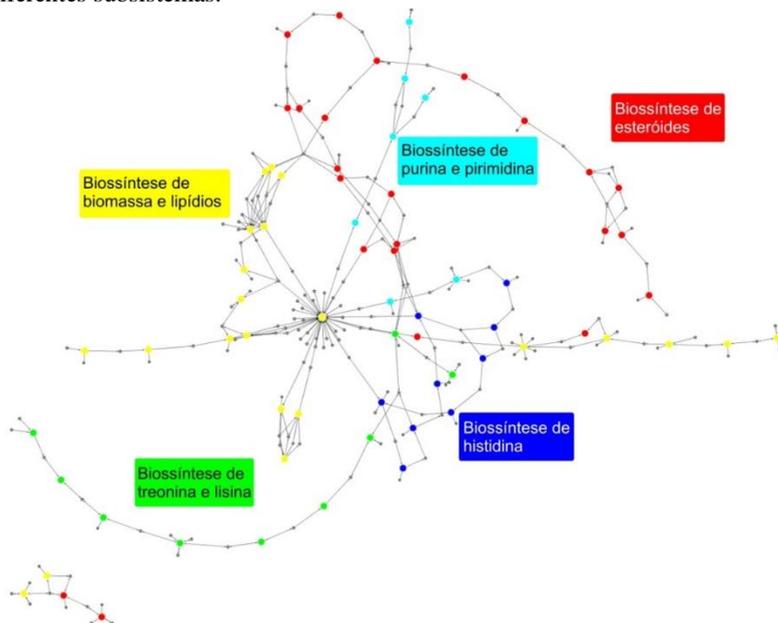
(a)		(c)	
Edge Visual Mapping		Node Color	
Edge Source Arrow Shape	EdgeType	Mapping Type	SubSystems
Mapping Type	Discrete Mapping	Exchange	Discrete Mapping
dir	 NONE	Fatty Acid Biosynthesis	
gra	 NONE	Fructose and Mannose ...	
rev	 DELTA	Glycerolipid Metabolism	
		Glycoprotein Metabolism	
		Histidine Metabolism	
		Phospholipid Biosynthesis	
		Purine and Pyrimidine Bi...	
		Pyruvate Metabolism	
		Sterol Biosynthesis	
		Threonine and Lysine M...	
		Transport Endoplasmic R...	
		Transport Mitochondrial	
		Transport Nuclear	

(b)	
Edge Target Arrow Shape	EdgeType
Mapping Type	Discrete Mapping
dir	 DELTA
gra	 NONE
rev	 DELTA

Fonte: Do autor.

Outras customizações de menor importância não serão mostradas. O resultado obtido é mostrado na Figura 45.

Figura 45 – Conjunto de reações correlatas na levedura. Gráfico gerado no programa Cytoscape, importando os arquivos gerados pelo COBRA Toolbox, selecionando Layout > yFiles > Organics e customizando cores para os diferentes subsistemas.



Fonte: Do autor.

COBRA 2.0, Novas Funções

Em SCHELLENBERGER *et al.* (2011) é apresentada oficialmente uma nova versão para o COBRA Toolbox contendo funções para criação de modelos teciduais, visualizações de FBA e de FVA na forma de mapas, FBA parcimonioso, fluxômica (experimentos de marcação com carbono-13), preenchimento de lacunas e engenharia metabólica (nocaute de genes para superprodução de um produto específico).

Leitura e exibição de mapas metabólicos

A exibição de vias metabólicas na forma de mapas é uma forma intuitiva de representação e muito utilizada nos bancos de dados genômicos, como o KEGG.

Para tal finalidade, o COBRA Toolbox exige que um arquivo de texto que representa o mapa seja previamente construído. Respostas a questionamentos presentes no grupo de discussões do COBRA indicaram o uso do software SimPheny para a criação dos mapas. Tais mapas são basicamente arquivos de texto contendo identificações de metabólitos, de reações e códigos gráficos de posicionamento. Sem o SimPheny, torna-se inevitável a adaptação de um mapa previamente construído para que seja compatível com o modelo (arquivo SBML) em estudo.

A estrutura de um mapa de uma única reação é mostrada abaixo:

```

Molecules
icit 1 Y 3383 3946 3413 3976
1576505 Isocitrate
nadp 1 N 3495 4098 3495 4065
1576506 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nadph 1 N 3635 3657 3659 3660
1576507 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- reduced
co2 1 N 3593 3710 3620 3710
1576508 CO2
akg 1 Y 3710 3620 3746 3627
1576509 2-Oxoglutarate
Reactions Nodes
          3413 3976 1576505
          3495 4065 1576506
          3659 3660 1576507
          3620 3710 1576508
          3746 3627 1576509
          3616 3866 3606 3846 1576846
          3512 3923 1576847
          3663 3781 1576848

Reactions
ICDHyr Reversible 1576847 1576846
isocitrate dehydrogenase (NADP)
ICDHyr Reversible 1576846 1576848
isocitrate dehydrogenase (NADP)
ICDHyr Reversible 1576505 1576847
isocitrate dehydrogenase (NADP)

```

```

ICDHyr      Reversible  1576506 1576847
isocitrate dehydrogenase (NADP)
ICDHyr      Reversible  1576848 1576507
isocitrate dehydrogenase (NADP)
ICDHyr      Reversible  1576848 1576508
isocitrate dehydrogenase (NADP)
ICDHyr      Reversible  1576848 1576509
isocitrate dehydrogenase (NADP)
Texts

```

Um arquivo de mapa é dividido em quatro grandes seções: Molecules, Reactions Nodes, Reactions e Texts. A seção Molecules contém os metabólitos que participam de cada reação, mas diferentemente dos arquivos SBML, nos arquivos de mapas os metabólitos são inseridos para cada reação, sendo repetidos com diferentes identidades a cada reação que aparecem. O campo Reactions Nodes é reservado para o posicionamento dos nós das reações. Em Reactions ficam todas as reações, onde cada reagente se liga a um nó intermediário e este por sua vez aos produtos. A seção Texts está em branco neste exemplo, mas é reservada às formatações de texto e inserção de linhas ou caixas adicionais.

A funções do COBRA que fazem a leitura dos mapas em txt e representação em arquivos gráficos (svg ou matlab fig) são respectivamente:

```
>> map = readCbMap([filename])
```

faz a leitura do mapa

```
>> changeCbMapOutput('svg');
```

seleciona o extensão de destino, e

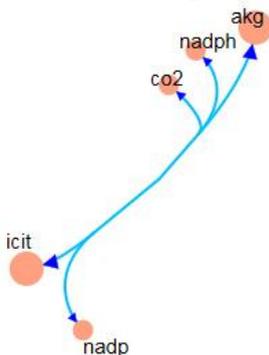
```
>> drawCbMap(map, [options], [varargin])
```

gera a representação gráfica do mapa.

Sem a escolha do nome do arquivo no comando drawCbMap, um arquivo com o nome target.svg contendo o mapa será gerado automaticamente no diretório atual, sendo um formato reconhecido, por

exemplo, por browsers de internet. A resposta ao mapa acima é mostrada na Figura 46.

Figura 46 – Mapa metabólico da reação isocitrato desidrogenase.

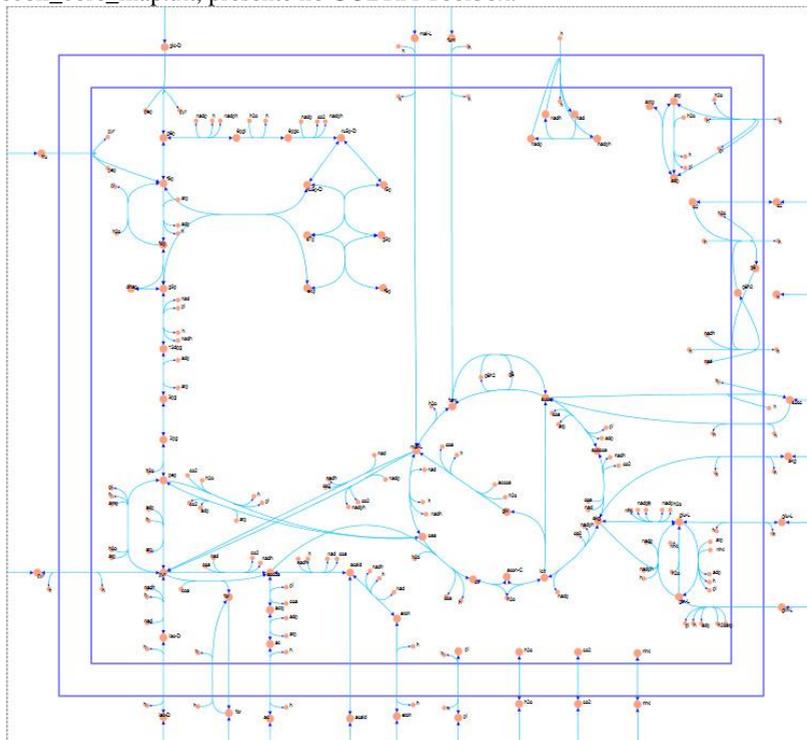


Fonte: Do autor.

Esta reação foi retirada de um mapa mais completo da *E. coli*, que é parte integrante do COBRA 2.0, cujos comandos abaixo geram a Figura 47.

```
>> map = readCbMap('ecoli_core_map.txt');  
>> changeCbMapOutput('svg');  
>> drawCbMap(map);
```

Figura 47 – Mapa metabólico completo, gerado a partir do arquivo `ecoli_core_map.txt`, presente no COBRA Toolbox.



Fonte: Do autor.

FBA e FVA visualizadas em mapas metabólicos

Com a estrutura dos mapas pronta, os resultados obtidos no FBA e no FVA podem ser representados graficamente através dos mapas e diagramas de cores. Segue um exemplo de FBA gráfico aplicado a *E. coli*.

```
>> map = readCbMap('ecoli_core_map.txt');
>> changeCbMapOutput('svg');
>> model = readCbModel('ecoli_core_model.xml');
```

faz a leitura de um modelo *E. coli* simplificado, com apenas 95 reações e 72 metabólitos, fornecido como parte integrante do COBRA a partir da versão 2.0.

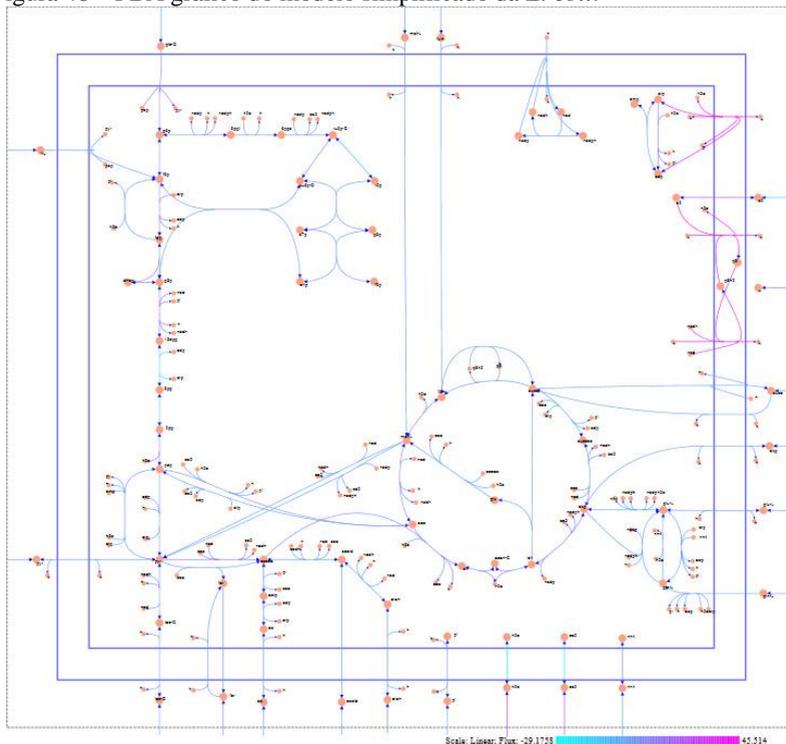
```
>> solution = optimizeCbModel(model);
```

executa o FBA e

```
>> drawFlux(map, model, solution.x, [], 'FileName',  
'EcoreOptFlux.svg');
```

gera a representação gráfica do mapa, agora acoplada a solução do FBA e com o nome do arquivo EcoreOptFlux.svg, mostrada na Figura 48. Os fluxos do FBA podem ser estimados pela barra de cores.

Figura 48 – FBA gráfico do modelo simplificado da *E. coli*.



Fonte: Do autor.

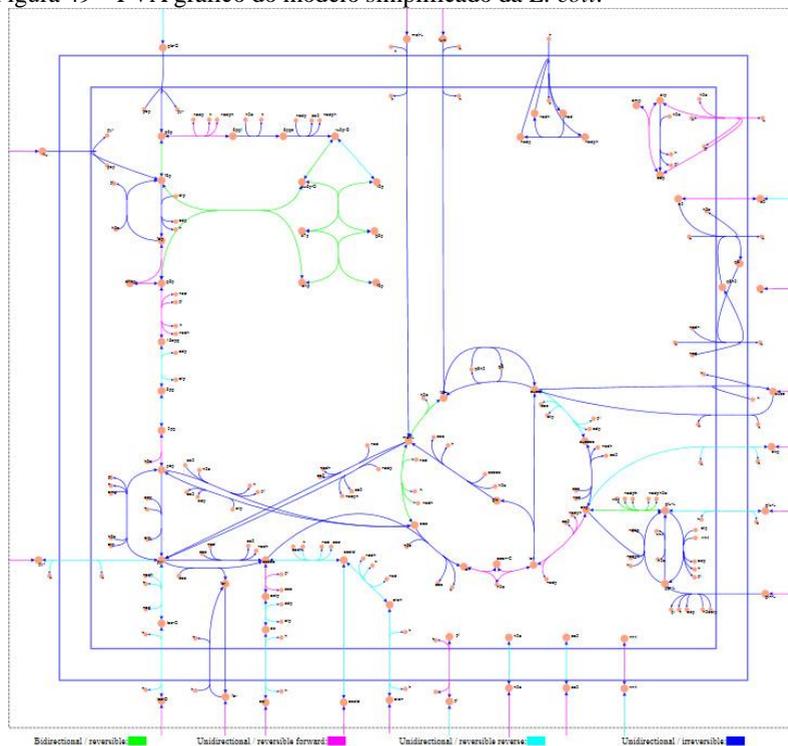
O FVA também pode ser representado na forma de mapa metabólico. Após a leitura do mapa e do modelo metabólicos, seguem os comandos.

```
[minFlux, maxFlux] = fluxVariability(model, 90);
```

executa o FVA e

```
>> drawFluxVariability(map, model, minFlux,  
maxFlux, [], 'FileName',  
'EcoreFluxVariability.svg');
```

gera a representação gráfica do mapa, agora acoplada a solução do FVA e com o nome do arquivo EcoreOptFlux.svg, mostrada na Figura 49. As cores indicam as reações que se comportaram como reversíveis (verde), as reações reversíveis que só apresentaram fluxos diretos (magenta), as reações reversíveis que só apresentaram fluxos reversos (ciano) e as reações irreversíveis (azul).

Figura 49 – FVA gráfico do modelo simplificado da *E. coli*.

Fonte: Do autor.

FBA parcimoniosa

Para classificar genes do modelo com base em uma solução ideal, FBA parcimoniosa (pFBA) é uma abordagem que incorpora a parcimônia de fluxos como uma restrição para categorizar o espaço de solução. O conceito de parcimônia de fluxos, no contexto de uma rede metabólica, refere-se a minimizar o fluxo de material total necessário para atingir um objetivo.

Neste método, os genes são classificados em seis categorias: (i) genes essenciais (ou seja, genes metabólicos necessários para o crescimento *in silico* no meio dado), (ii) genes ótimos (ou seja, genes não essenciais que contribuem para a taxa de crescimento máxima e fluxo mínimo associado a genes); (iii) genes enzimaticamente menos eficientes, que requerem mais fluxo através de etapas enzimáticas do que através de vias alternativas que atendam a mesma taxa de

crescimento previsto; (iv) genes metabolicamente menos eficientes, que exigem uma redução na taxa de crescimento se utilizados; (v) genes sem fluxo, que são incapazes de realizar de fluxo nas condições experimentais, e (vi) genes bloqueados, que só são associados com reações que não podem transportar fluxo sob qualquer condição (reações bloqueadas) (SCHELLENBERGER *et al.*, 2011).

Como exemplo aplicado, um comparativo entre dois substratos, glicose e acetato, pode ser feito.

```
>> map = readCbMap('ecoli_core_map.txt');
```

faz a leitura do mapa.

```
>> model = readCbModel('ecoli_core_model.xml');
```

faz a leitura do modelo.

```
>> [pFBAGeneClasses, pFBARxn] = pFBA(model, 'map',
map, 'mapOutName', 'Ecore_pFBA_glu.svg');
```

faz FBA parcimonioso. Glicose é o substrato padrão.

```
>> model =
changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', 0, 'l');
```

elimina a glicose do meio alterando a respectiva restrição inferior.

```
>> model = changeRxnBounds(model, 'EX_ac(e)', -
10, 'l');
```

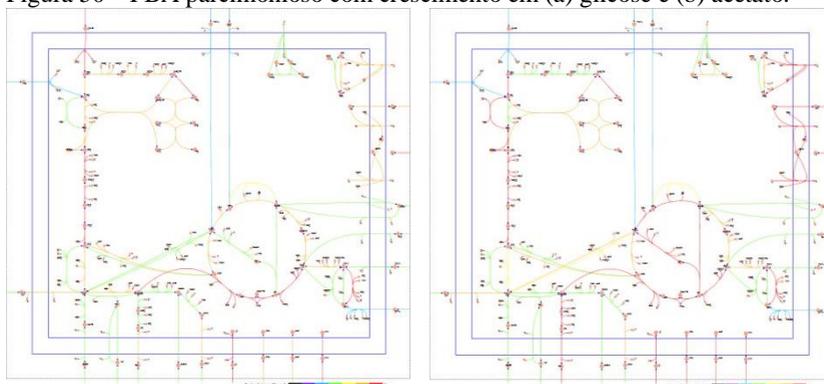
permite o consumo de acetato alterando a respectiva restrição inferior.

```
>> [pFBAGeneClasses, pFBARxn] = pFBA(model, 'map',
map, 'mapOutName', 'Ecore_pFBA_ac.svg');
```

faz novamente o FBA parcimonioso, agora em acetato.

Um comparativo entre os resultados é mostrado na Figura 50. As cores representam cada uma das seis classes anteriormente mencionadas.

Figura 50 – FBA parcimonioso com crescimento em (a) glicose e (b) acetato.



Fonte: Do autor.

A Figura 50 evidencia por meio de cores a alteração do metabolismo com diferentes substratos, já que várias reações tiveram alteradas suas classificações.

Preenchimento de lacunas (Gap filling)

Gap é definido como uma informação bioquímica faltante que pode explicar discrepâncias entre predições do modelo e dados experimentais. *Gaps* são tipicamente as reações que facilitam a conversão de um metabólito disponível no modelo em um que é necessário para alcançar um objetivo. A identificação de *gaps* em modelos metabólicos pode ser tentada usando `detectDeadEnds` ou `gapFind` (SCHELLENBERGER *et al.*, 2011).

Após a leitura do modelo (`readCbModel` ou `xls2model`), qualquer metabólito necessário a uma reação que não seja produto de outra ou fornecido por uma condição de contorno, e qualquer metabólito que seja produto de uma reação sem ser consumido por outra ou consumido por uma condição de contorno será identificado pela sequência de comandos.

```
>> outputMets = detectDeadEnds(model);
```

```
>> DeadEnds = model.mets(outputMets)
```

A função *gapFind*, diferentemente da função *detectDeadEnds*, funciona com uma alteração dos limites das reações, tornando-a independente dos mesmos.

```
>> model = changeRxnBounds(model,
model.rxns(logical(model.rev)), -1e6, 'l');

>> model = changeRxnBounds(model, model.rxns, 1e6,
'u');

>> exchangeRxns = model.rxns(findExcRxns(model));

>> model = changeRxnBounds(model, exchangeRxns, -1,
'l');

>> [allGaps, rootGaps, downstreamGaps] =
gapFind(model)
```

Além da vantagem de ser independente de limites, a função *gapFind* categoriza seus resultados em *allGaps* (todos), *rootGaps* (reagentes indisponíveis) e *downstreamGaps* (produtos sem consumo).

Vale lembrar que os modelos metabólicos foram criados operar em estado pseudo-estacionário, portanto, qualquer acúmulo existente em uma reação a impossibilitará de ocorrer.

Engenharia metabólica (nockaute de genes)

O COBRA 2.0 possui, além das funções *singleGeneDeletion* e *doubleGeneDeletion* já mencionadas, três novas funções para análise de deleção de genes: *OptKnock*, *optGene* e *GDLS*.

O algoritmo *OptKnock* determina o conjunto de reações a ser nocauteado para superprodução de um produto específico, quando o modelo é otimizado para objetivos celulares internos (SCHELLENBERGER *et al.*, 2011).

Um exemplo aplicado ao modelo *ecoli_core_model* para superprodução de lactato segue abaixo.

```
>> model = readCbModel('ecoli_core_model.xml');
```

faz a leitura do modelo.

```
>> model = changeRxnBounds(model, {'EX_o2(e)',
'EX_glc(e)'}, [0, -20], 'l');
```

altera os limites do modelo tornando-o anaeróbio.

```
>> selectedRxns = {model.rxns{ [1, 3:5, 7:8, 10,
12, 15:16, 18, 40:41, 44, 46, 48:49, 51, 53:55, 57,
59:62, 64:68, 71:77, 79:83, 85:86, 89:95]}};
```

seleciona as reações candidatas ao nocaute.

```
>> options.targetRxn = 'EX_lac-D(e)';
```

seleciona a reação de produção do lactato para a sua superprodução.

```
>> options.vMax = 1000;
```

seleciona o fluxo máximo permitido.

```
>> options.numDel = 5;
```

seleciona o número máximo de deleções.

```
>> options.numDelSense = 'L';
```

indica se o número de deleções deve ser maior, igual ou menor que número anterior (G, E ou L).

```
>> constrOpt.rxnList =
{'Biomass_Ecoli_core_N(w/GAM)-Nmet2', 'ATPM'};
```

```
>> constrOpt.values = [0.05, 8.39];
```

```
>> constrOpt.sense = 'GE';
```

estipula valores maiores ou iguais aos escolhidos em constrOpt.values para a reação de produção de biomassa e manutenção de ATP.

```
>> optKnockSol = OptKnock(model, selectedRxns,
options, constrOpt);
```

executa o OptKnock segundo as opções pré-estabelecidas.

O algoritmo GDLS possui o mesmo objetivo, mas com alguns requisitos distintos. Exemplo aplicado abaixo.

```
>> model = readCbModel('ecoli_core_model.xml');
```

faz a leitura do modelo.

```
>> model = changeRxnBounds(model, {'EX_o2(e)',
'EX_glc(e)'}, [0, -20], 'l');
```

altera os limites do modelo tornando-o anaeróbico.

```
>> selectedRxns = {model.rxns{ [1, 3:5, 7:8, 10,
12, 15:16, 18, 40:41, 44, 46, 48:49, 51, 53:55, 57,
59:62, 64:68, 71:77, 79:83, 85:86, 89:95]}};
```

seleciona as reações candidatas ao nocaute.

```
[gdlsSolution, bilevelMILPproblem,
gdlsSolutionStructs] = GDLS(model, 'EX_lac-D(e)',
'minGrowth', 0.05, 'selectedRxns', selectedRxns,
'maxKO', 5, 'nbhdsz', 3);
```

executa o GDLS. A opção `nbhdsz` indica o tamanho da vizinhança (do inglês, *neighborhood size*), tornando a busca mais ou menos abrangente conforme o número de reações a partir do alvo, que neste exemplo aplicado é a produção de lactato. Os resultados obtidos pelo OptKnock e pelo GDLS são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos por OptKnock e GDLS no modelo `ecoli_core_model` para superprodução de lactato.

	OptKnock	GDLS
Lista de nocautes	'ACALD' – acetaldáido desidrogenase	'ACALD' – acetaldéido desidrogenase
	'GLUDy' – glutamato desidrogenase	'FUM' – Fumarase
	'ME2' – enzima málica	'GLUDy' – glutamato desidrogenase
	'NADH16' – NADH desidrogenase	'PTAr' – Fosfoacetilase
	'PYK' – piruvato kinase	'PYK' – piruvato kinase

O algoritmo optGene permite funções objetivo não lineares, o que obriga a utilização do pacote de otimização Tomlab e não será discutido.

APÊNDICE B – MODELO COMPLETO APÓS A REMOÇÃO DE GAPS

Tabela 14 – Reações do modelo completo após a remoção de *gaps*.

Reação	Fórmula
EX_GLC	GLC[e] \Leftrightarrow
GLCpts	GLC[e] + PEP[c] \rightarrow G6P[c] + PYR[c]
EX_FRU	FRU[e] \Leftrightarrow
FRUpts	FRU[e] + PEP[c] \rightarrow F1P[c] + PYR[c]
EX_MNL	MNL[e] \Leftrightarrow
MNLpts	MNL[e] + PEP[c] \rightarrow MNL1P[c] + PYR[c]
EX_MAN	MAN[e] \Leftrightarrow
MANpts	MAN[e] + PEP[c] \rightarrow MAN6P[c] + PYR[c]
EX_LACT	LCTS[e] \Leftrightarrow
LACTpts	LCTS[e] + PEP[c] \rightarrow LCTS6P[c] + PYR[c]
EX_SUCR	SUCR[e] \Leftrightarrow
SUCRpts	PEP[c] + SUCR[e] \rightarrow PYR[c] + SUC6P[c]
EX_MALT	MALT[e] \Leftrightarrow
MALTpts	MALT[e] + PEP[c] \rightarrow MALT6P[c] + PYR[c]
EX_ACGAM	ACGAM[e] \Leftrightarrow
ACGAMpts	ACGAM[e] + PEP[c] \rightarrow ACGAM6P[c] + PYR[c]
GLCt	GLC[e] \Leftrightarrow GLC[c]
EX_DXYL	DXYL[e] \Leftrightarrow
XYLt	DXYL[e] \Leftrightarrow DXYL[c]
EX_LARAB	LARAB[e] \Leftrightarrow
ARABt	LARAB[e] \Leftrightarrow LARAB[c]
EX_GAL	GAL[e] \Leftrightarrow
GALt	GAL[e] \Leftrightarrow GAL[c]
EX_NO2	NO2[e] \Leftrightarrow
NO2t	NO2[e] \rightarrow NO2[c]
EX_O2	O2[c] \Leftrightarrow
EX_N2	N2[e] \Leftrightarrow

N2t	N2[e] -> N2[c]
EX_CO2	CO2[e] <=>
CO2t	CO2[c] <=> CO2[e]
EX_H2	H2[e] <=>
H2t	H2[c] -> H2[e]
EX_NH3	NH3[e] <=>
NH3t	NH3[e] -> NH3[c]
EX_ETOH	ETOH[e] <=>
ETOHt	ETOH[c] -> ETOH[e]
EX_BUOH	BUOH[e] <=>
BUOHt	BUOH[c] -> BUOH[e]
EX_ACETONE	ACETONE[e] <=>
ACETONEt	ACETONE[c] -> ACETONE[e]
EX_ACETOIN	ACETOIN[e] <=>
ACETOINt	ACETOIN[c] -> ACETOIN[e]
EX_SO4	SO4[e] <=>
SULFATEt	ATP[c] + SO4[e] -> ADP[c] + Pi[c] + SO4[c]
EX_Pi	Pi[e] <=>
Pit	Pi[e] -> Pi[c]
Piabc	ATP[c] + Pi[e] -> ADP[c] + 2 Pi[c]
EX_GLY	GLY[e] <=>
GLYt	GLY[e] <=> GLY[c]
EX_LALA	LALA[e] <=>
LALAt	LALA[e] <=> LALA[c]
EX_LVAL	LVAL[e] <=>
LVALt	LVAL[e] <=> LVAL[c]
EX_LLEU	LLEU[e] <=>
LLEUt	LLEU[e] <=> LLEU[c]
EX_LILE	LILE[e] <=>
LILEt	LILE[e] <=> LILE[c]
EX_LGLU	LGLU[e] <=>
LGLUt	LGLU[e] <=> LGLU[c]
EX_LGLN	LGLN[e] <=>

LGLNt	LGLN[e] <=> LGLN[c]
EX_LMET	LMET[e] <=>
LMETt	LMET[e] <=> LMET[c]
EX_LCYS	LCYS[e] <=>
LCYSt	LCYS[e] <=> LCYS[c]
EX_LASP	LASP[e] <=>
LASPt	LASP[e] <=> LASP[c]
EX_LASN	LASN[e] <=>
LASNt	LASN[e] <=> LASN[c]
EX_LPRO	LPRO[e] <=>
LPROt	LPRO[e] <=> LPRO[c]
EX_LTRP	LTRP[e] <=>
LTRPt	LTRP[e] <=> LTRP[c]
EX_LTYR	LTyr[e] <=>
LTYRt	LTyr[e] <=> LTyr[c]
EX_LHIS	LHIS[e] <=>
LHISt	LHIS[e] <=> LHIS[c]
EX_LPHE	LPHE[e] <=>
LPHEt	LPHE[e] <=> LPHE[c]
EX_LSER	LSER[e] <=>
LSERt	LSER[e] <=> LSER[c]
EX_LTHR	LTHR[e] <=>
LTHRt	LTHR[e] <=> LTHR[c]
EX_LLYS	LLYS[e] <=>
LLYSt	LLYS[e] <=> LLYS[c]
EX_LARG	LARG[e] <=>
LARGt	LARG[e] <=> LARG[c]
LALAabc	ATP[c] + LALA[e] -> ADP[c] + LALA[c] + Pi[c]
LVALabc	ATP[c] + LVAL[e] -> ADP[c] + LVAL[c] + Pi[c]
LTHRabc	ATP[c] + LTHR[e] -> ADP[c] + LTHR[c] + Pi[c]
LCYSabc	ATP[c] + LCYS[e] -> ADP[c] + LCYS[c] + Pi[c]
LILEabc	ATP[c] + LILE[e] -> ADP[c] + LILE[c] + Pi[c]

LASNabc	ATP[c] + LASN[e] -> ADP[c] + LASN[c] + Pi[c]
LASPabc	ATP[c] + LASP[e] -> ADP[c] + LASP[c] + Pi[c]
LGLNabc	ATP[c] + LGLN[e] -> ADP[c] + LGLN[c] + Pi[c]
LGLUabc	ATP[c] + LGLU[e] -> ADP[c] + LGLU[c] + Pi[c]
LARGabc	ATP[c] + LARG[e] -> ADP[c] + LARG[c] + Pi[c]
LHISabc	ATP[c] + LHIS[e] -> ADP[c] + LHIS[c] + Pi[c]
LLYSabc	ATP[c] + LLYS[e] -> ADP[c] + LLYS[c] + Pi[c]
LPROabc	ATP[c] + LPRO[e] -> ADP[c] + LPRO[c] + Pi[c]
LMETabc	ATP[c] + LMET[e] -> ADP[c] + LMET[c] + Pi[c]
EX_AC	AC[e] <=>
ACt	AC[c] <=> AC[e]
EX_BU	BU[e] <=>
BUt	BU[c] <=> BU[e]
EX_PROP	PROP[e] <=>
PROPt	PROP[c] <=> PROP[e]
EX_MAL	MAL[e] <=>
MALt	MAL[c] <=> MAL[e]
EX_UREA	UREA[e] <=>
UREAt	UREA[c] -> UREA[e]
EX_Na	NA[e] <=>
NAt	NA[c] <=> NA[e]
EX_LAC	LAC[e] <=>
LACt	LAC[c] <=> LAC[e]
EX_PYR	PYR[e] <=>
PYRt	PYR[c] <=> PYR[e]
EX_GLYCALD	GLYCALD[e] <=>
GLYCALDt	GLYCALD[c] -> GLYCALD[e]
EX_PABA	PABA[e] <=>
PABAt	PABA[e] -> PABA[c]
EX_GLYC	GLYC[e] <=>
GLYct	GLYC[e] <=> GLYC[c]
EX_FORM	FORM[e] <=>
FORMt	FORM[c] <=> FORM[e]

EX_bdGLC	bDGLC[e] <=>
bDGLC	bDGLC[e] <=> GLC[e]
HCO3	CO2[c] <=> HCO3[c]
EX_H2O2	H2O2[e] <=>
H2O2t	H2O2[c] <=> H2O2[e]
PPi	PPi[c] -> 2 Pi[c]
ATP	ATP[c] -> ADP[c] + Pi[c]
EMP1	ADP[c] + bDG6P[c] <=> ATP[c] + bDGLC[c]
EMP2	bDGLC[c] <=> GLC[c]
EMP3	ATP[c] + GLC[c] <=> ADP[c] + G6P[c]
EMP4	G6P[c] <=> F6P[c]
EMP5	bDG6P[c] <=> F6P[c]
EMP6	ATP[c] + F6P[c] -> ADP[c] + FDP[c]
EMP7	FDP[c] -> F6P[c] + Pi[c]
EMP8	FDP[c] -> DHAP[c] + GA3P[c]
EMP9	DHAP[c] <=> GA3P[c]
EMP10	GA3P[c] + NAD[c] + Pi[c] <=> 13DPG[c] + NADH[c]
EMP11	13DPG[c] + ADP[c] <=> 3PG[c] + ATP[c]
EMP12	13DPG[c] -> 3PG[c] + Pi[c]
EMP13	3PG[c] <=> 2PG[c]
EMP14	2PG[c] <=> PEP[c]
EMP15	ADP[c] + PEP[c] -> ATP[c] + PYR[c]
EMP16	NADH[c] + PYR[c] <=> LAC[c] + NAD[c]
EMP17	COA[c] + Fd_Ox[c] + PYR[c] -> ACCOA[c] + CO2[c] + Fd_Red[c]
EMP18	Fd_Red[c] + NAD[c] <=> Fd_Ox[c] + NADH[c]
EMP19	Fd_Red[c] + NADP[c] -> Fd_Ox[c] + NADPH[c]
EMP20	Fd_Red[c] -> H2[c] + Fd_Ox[c]
PROPAN1	2HBUT[c] + NAD[c] <=> 2OBUT[c] + NADH[c]
PROPAN2	2OBUT[c] + COA[c] -> FORM[c] + PROCOA[c]
PROPAN3	Pi[c] + PROCOA[c] -> COA[c] + PROPP[c]
PROPAN4	ADP[c] + PROPP[c] -> ATP[c] + PROP[c]

EX_2HBUT	2HBUT[c] <=>
BUTAN1	ACCOA[c] + NADH[c] <=> ACAL[c] + COA[c] + NAD[c]
BUTAN2	ACAL[c] + NADH[c] <=> ETOH[c] + NAD[c]
BUTAN3	ACCOA[c] + Pi[c] <=> ACTP[c] + COA[c]
BUTAN4	ACTP[c] + ADP[c] <=> AC[c] + ATP[c]
BUTAN5	2 ACCOA[c] -> ACTACCOA[c] + COA[c]
BUTAN6	ACTACCOA[c] + NADH[c] -> 3HBCOA[c] + NAD[c]
BUTAN7	3HBCOA[c] -> CRTCOA[c]
BUTAN8	CRTCOA[c] + Fd_Ox[c] + 2 NADH[c] -> BUCOA[c] + Fd_Red[c] + 2 NAD[c]
BUTAN9	BUCOA[c] + Pi[c] -> BUP[c] + COA[c]
BUTAN10	ADP[c] + BUP[c] -> ATP[c] + BU[c]
BUTAN11	BUCOA[c] + NADH[c] <=> BUAL[c] + COA[c] + NAD[c]
BUTAN12	BUAL[c] + NADH[c] <=> BUOH[c] + NAD[c]
BUTAN13	ACTAC[c] -> ACETONE[c] + CO2[c]
BUTAN14	PYR[c] + THMPP[c] -> CO2[c] + HETHMPP[c]
BUTAN15	HETHMPP[c] + PYR[c] -> ACLAC[c] + THMPP[c]
BUTAN16	ACLAC[c] -> ACETOIN[c] + CO2[c]
BUTAN17	AC[c] + ACTACCOA[c] -> ACCOA[c] + ACTAC[c]
BUTAN18	ACTACCOA[c] + BU[c] -> ACTAC[c] + BUCOA[c]
TCA1	ATP[c] + HCO3[c] + PYR[c] -> ADP[c] + OAA[c] + Pi[c]
TCA2	NADH[c] + OAA[c] <=> MAL[c] + NAD[c]
TCA3	MAL[c] <=> FUM[c]
TCA4	Fd_Red[c] + FUM[c] <=> Fd_Ox[c] + SUCC[c]
TCA5	ACTACCOA[c] + SUCC[c] -> ACTAC[c] + SUCCOA[c]
TCA6	CO2[c] + Fd_Red[c] + SUCCOA[c] <=> AKG[c] + COA[c] + Fd_Ox[c]
TCA7	AKG[c] + CO2[c] + NADH[c] <=> ICIT[c] + NAD[c]
TCA8	ICIT[c] <=> CIT[c]
TCA9	CIT[c] + COA[c] <=> ACCOA[c] + OAA[c]
TCA10	CIT[c] <=> AC[c] + OAA[c]
PPP1	F6P[c] + GA3P[c] <=> DXU5P[c] + E4P[c]

PPP2	$\text{DXU5P[c]} \rightleftharpoons \text{DRU5P[c]}$
PPP3	$\text{R5P[c]} \rightleftharpoons \text{DRU5P[c]}$
PPP4	$\text{DXU5P[c]} + \text{R5P[c]} \rightleftharpoons \text{GA3P[c]} + \text{S7P[c]}$
PPP5	$\text{GA3P[c]} + \text{S7P[c]} \rightleftharpoons \text{E4P[c]} + \text{F6P[c]}$
PPP6	$\text{ATP[c]} + \text{R5P[c]} \rightarrow \text{AMP[c]} + \text{PRPP[c]}$
PPP7	$2\text{DDGLCN[c]} + \text{ATP[c]} \rightarrow 2\text{DDG6P[c]} + \text{ADP[c]}$
PPP8	$2\text{DDG6P[c]} \rightleftharpoons \text{GA3P[c]} + \text{PYR[c]}$
PPP9	$\text{ATP[c]} + \text{DRIB[c]} \rightarrow \text{ADP[c]} + \text{R5P[c]}$
PPP10	$\text{R5P[c]} \rightleftharpoons \text{R1P[c]}$
EX_2DDGLCN	$2\text{DDGLCN[c]} \rightleftharpoons$
PI1	$\text{DXYL[c]} + \text{NADPH[c]} \rightleftharpoons \text{NADP[c]} + \text{XOL[c]}$
PI1_2	$\text{NAD[c]} + \text{XOL[c]} \rightleftharpoons \text{DXYLU[c]} + \text{NADH[c]}$
PI2	$\text{ATP[c]} + \text{DXYLU[c]} \rightleftharpoons \text{ADP[c]} + \text{DXU5P[c]}$
PI3	$\text{LARAB[c]} \rightleftharpoons \text{LRBL[c]}$
PI4	$\text{ATP[c]} + \text{LRBL[c]} \rightleftharpoons \text{ADP[c]} + \text{LRU5P[c]}$
PI5	$\text{LRU5P[c]} \rightleftharpoons \text{DXU5P[c]}$
FM1	$\text{ATP[c]} + \text{F1P[c]} \rightleftharpoons \text{ADP[c]} + \text{FDP[c]}$
FM2	$\text{F1P[c]} \rightarrow \text{DHAP[c]} + \text{GLYALD[c]}$
FM3	$\text{MNL1P[c]} + \text{NAD[c]} \rightleftharpoons \text{F6P[c]} + \text{NADH[c]}$
FM4	$\text{MAN6P[c]} \rightleftharpoons \text{F6P[c]}$
FM5	$\text{ATP[c]} + \text{FRU[c]} \rightarrow \text{ADP[c]} + \text{F6P[c]}$
EX_GLYALD	$\text{GLYALD[c]} \rightleftharpoons$
GAL1	$\text{LCTS6P[c]} \rightleftharpoons \text{GAL6P[c]} + \text{GLC[c]}$
GAL2	$\text{GAL6P[c]} \rightleftharpoons \text{TAG6P[c]}$
GAL3	$\text{ATP[c]} + \text{TAG6P[c]} \rightleftharpoons \text{ADP[c]} + \text{TAGDP[c]}$
GAL4	$\text{TAGDP[c]} \rightleftharpoons \text{DHAP[c]} + \text{GA3P[c]}$
GAL5	$\text{ATP[c]} + \text{GAL[c]} \rightarrow \text{ADP[c]} + \text{GAL1P[c]}$
GAL6	$\text{GAL1P[c]} + \text{UDPGLC[c]} \rightleftharpoons \text{G1P[c]} + \text{UDPGAL[c]}$
GAL7	$\text{UDPGAL[c]} \rightleftharpoons \text{UDPGLC[c]}$
GAL8	$\text{G1P[c]} + \text{UTP[c]} \rightarrow \text{PPi[c]} + \text{UDPGLC[c]}$
GAL9	$\text{G1P[c]} \rightleftharpoons \text{G6P[c]}$
SUCR1	$\text{SUC6P[c]} \rightarrow \text{FRU[c]} + \text{G6P[c]}$

SUCR2	MALT6P[c] -> G6P[c] + GLC[c]
SUCR3	MALT[c] -> 2 GLC[c]
SUCR4	MALT[c] + Pi[c] -> bDG1P[c] + bDGLC[c]
SUCR5	bDG1P[c] <=> bDG6P[c]
SUCR6	ATP[c] + G1P[c] -> ADPGLC[c] + PPi[c]
SUCR7	ADPGLC[c] -> ADP[c] + Glycogen[c]
SUCR8	Glycogen[c] + Pi[c] -> G1P[c]
SUCR9	CLB[e] -> 2 bDGLC[e]
SUCR10	MALT[e] -> MALT[c]
EX_CLB	CLB[e] <=>
AMSU1	F6P[c] + LGLN[c] -> GAM6P[c] + LGLU[c]
AMSU2	F6P[c] + NH3[c] <=> GAM6P[c]
AMSU3	AC[c] + GAM6P[c] <=> ACGAM6P[c]
AMSU4	GAM6P[c] -> GAM1P[c]
AMSU5	ACCOA[c] + GAM1P[c] -> ACGAM1P[c] + COA[c]
AMSU6	ACGAM1P[c] + UTP[c] <=> PPi[c] + UACGAM[c]
AMSU7	PEP[c] + UACGAM[c] <=> Pi[c] + UACCG[c]
AMSU8	NADPH[c] + UACCG[c] -> NADP[c] + UAMR[c]
NUSU1	dTTP[c] + G1P[c] -> PPi[c] + TDPGLC[c]
NUSU2	TDPGLC[c] <=> TDPGAL[c]
NUSU3	TDPGLC[c] -> TDPDHdGLC[c]
NUSU4	TDPDHdGLC[c] -> GDPoRHAM[c]
NUSU5	TDPDHdGLC[c] -> TDPoRHAM[c]
NUSU6	NADPH[c] + GDPoRHAM[c] -> NADP[c] + GDPRHAM[c]
NUSU7	NADPH[c] + TDPoRHAM[c] -> NADP[c] + TDPRHAM[c]
EX_TDPGAL	TDPGAL[c] <=>
EX_GDPRHAM	GDPRHAM[c] <=>
EX_TDPRHAM	TDPRHAM[c] <=>
PYR1	ATP[c] + PYR[c] -> AMP[c] + PEP[c] + Pi[c]
PYR2	MAL[c] + NAD[c] -> CO2[c] + NADH[c] + PYR[c]
PYR3	MAL[c] + NADP[c] -> CO2[c] + NADPH[c] + PYR[c]
PYR4	ACCOA[c] + ATP[c] + HCO3[c] <=> ADP[c] +

	MALCOA[c] + Pi[c]
PYR5	3MOB[c] + ACCOA[c] -> 2IPPMAL[c] + COA[c]
PYR6	COA[c] + PYR[c] -> ACCOA[c] + FORM[c]
METHANE1	CO2[c] + MECORR[c] -> ACCOA[c] + CORR[c]
EX_MECORR	MECORR[c] <=>
EX_CORR	CORR[c] <=>
NITROGEN1	6 Fd_Red[c] + NO2[c] -> 6 Fd_Ox[c] + NH3[c]
NITROGEN2	16 ATP[c] + 8 Fd_Red[c] + N2[c] -> 16 ADP[c] + 8 Fd_Ox[c] + H2[c] + 2 NH3[c] + 16 Pi[c]
NITROGEN3	ATP[c] + LGLU[c] + NH3[c] -> ADP[c] + LGLN[c] + Pi[c]
NITROGEN4	AKG[c] + LGLN[c] + NADPH[c] -> 2 LGLU[c] + NADP[c]
NITROGEN5	ATP[c] + LASP[c] + LGLN[c] -> AMP[c] + LASN[c] + LGLU[c] + PPi[c]
NITROGEN6	AKG[c] + NADPH[c] + NH3[c] <=> LGLU[c] + NADP[c]
NITROGEN7	LASP[c] -> FUM[c] + NH3[c]
NITROGEN8	LASN[c] -> LASP[c] + NH3[c]
NITROGEN9	CYST[c] -> LHCYS[c] + NH3[c] + PYR[c]
SULFUR1	ATP[c] + SO4[c] -> APS[c] + PPi[c]
SULFUR2	APS[c] + ATP[c] -> ADP[c] + PAPS[c]
SULFUR3	PAPS[c] + TRD_Red[c] -> PAP[c] + SO3[c] + TRD_Ox[c]
SULFUR4	PAP[c] -> AMP[c] + Pi[c]
SULFUR5	3 NADPH[c] + SO3[c] -> 3 NADP[c] + S[c]
SULFUR6	ACCOA[c] + LSER[c] -> ACSER[c] + COA[c]
SULFUR7	ACSER[c] + S[c] -> AC[c] + LCYS[c]
SULFUR8	LHMS[c] + SUCCOA[c] -> COA[c] + SUCHMS[c]
SULFUR9	LCYS[c] + SUCHMS[c] -> CYST[c] + SUCC[c]
GLU1	AKG[c] + LASP[c] <=> LGLU[c] + OAA[c]
GLU2	LGLU[c] <=> DGLU[c]
GLU3	ATP[c] + DNAD[c] + LGLN[c] -> AMP[c] + LGLU[c] + NAD[c] + PPi[c]
GLU4	4ABUT[c] + AKG[c] <=> LGLU[c] + SUCCSA[c]

EX_4ABUT	4ABUT[c] <=>
EX_SUCCSA	SUCCSA[c] <=>
ASPALA1	ATP[c] + LASP[c] + LCITR[c] -> AMP[c] + ARGUSUC[c] + PPI[c]
ASPALA2	ARGUSUC[c] -> FUM[c] + LARG[c]
ASPALA3	LASP[c] -> bALA[c] + CO2[c]
ASPALA4	LGLU[c] + PYR[c] <=> AKG[c] + LALA[c]
ASPALA5	LALA[c] <=> DALA[c]
ASPALA6	LASP[c] + O2[c] -> H2O2[c] + NH3[c] + OAA[c]
ASPALA7	ATP[c] + 2 DALA[c] -> ADP[c] + DALADALA[c] + Pi[c]
ASPALA8	DGLU[c] + PYR[c] <=> AKG[c] + DALA[c]
GST1	ATP[c] + LASP[c] -> 4PASP[c] + ADP[c]
GST2	4PASP[c] + NADPH[c] -> ASPSA[c] + NADP[c] + Pi[c]
GST3	ASPSA[c] + NADPH[c] <=> LHMS[c] + NADP[c]
GST4	ATP[c] + LHMS[c] -> ADP[c] + PHOM[c]
GST5	PHOM[c] -> LTHR[c] + Pi[c]
GST6	LTHR[c] <=> ACAL[c] + GLY[c]
GST7	GLY[c] + MLTHF[c] <=> LSER[c] + THF[c]
GST8	LSER[c] -> NH3[c] + PYR[c]
GST9	3PG[c] + NAD[c] -> 3PHP[c] + NADH[c]
GST10	3PHP[c] + LGLU[c] -> AKG[c] + LPSER[c]
GST11	LPSER[c] -> LSER[c] + Pi[c]
GST12	GLYCAC[c] + NAD[c] <=> HPYR[c] + NADH[c]
EX_HPYR	HPYR[c] <=>
MET1	SUCHMS[c] <=> 2OBUT[c] + NH3[c] + SUCC[c]
MET2	AC[c] + CYST[c] <=> ACHMS[c] + LCYS[c]
MET3	ACHMS[c] + S[c] -> AC[c] + LHCYS[c]
MET4	S[c] + SUCHMS[c] -> LHCYS[c] + SUCC[c]
MET5	AMET[c] + LHMS[c] -> AHCYS[c] + LMET[c]
MET6	5MTHF[c] + LHCYS[c] -> LMET[c] + THF[c]
MET7	AHCYS[c] -> ADE[c] + RHCYS[c]
MET8	RHCYS[c] -> DRIB[c] + LHCYS[c]

MET9	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{LMET}[\text{c}] \rightarrow \text{AMET}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}] + \text{PPi}[\text{c}]$
MET10	$\text{AMET}[\text{c}] \rightarrow \text{AMETA}[\text{c}] + \text{CO}_2[\text{c}]$
MET11	$\text{AMETA}[\text{c}] + \text{PTRC}[\text{c}] \rightarrow \text{METADN}[\text{c}] + \text{SPERMD}[\text{c}]$
MET12	$\text{METADN}[\text{c}] \rightarrow 5\text{METRIB}[\text{c}] + \text{ADE}[\text{c}]$
EX_PTRC	$\text{PTRC}[\text{c}] \rightleftharpoons$
EX_SPERMD	$\text{SPERMD}[\text{c}] \rightleftharpoons$
EX_5METRIB	$5\text{METRIB}[\text{c}] \rightleftharpoons$
CYS1	$\text{NH}_3[\text{c}] + \text{PYR}[\text{c}] + \text{S}[\text{c}] \rightarrow \text{LCYS}[\text{c}]$
VLI0	$\text{LTHR}[\text{c}] \rightarrow 2\text{OBUT}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}]$
VLI1	$2\text{OBUT}[\text{c}] + \text{HETHMPP}[\text{c}] \rightarrow 2\text{AHBUT}[\text{c}] + \text{THMPP}[\text{c}]$
VLI2	$2\text{AHBUT}[\text{c}] \rightleftharpoons 3\text{H3MOP}[\text{c}]$
VLI3	$3\text{H3MOP}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] \rightleftharpoons 23\text{DHMP}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}]$
VLI4	$23\text{DHMP}[\text{c}] \rightarrow 3\text{MOP}[\text{c}]$
VLI5	$3\text{MOP}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{AKG}[\text{c}] + \text{LILE}[\text{c}]$
VLI6	$\text{ACLAC}[\text{c}] \rightleftharpoons 3\text{H3MOB}[\text{c}]$
VLI7	$3\text{H3MOB}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] \rightleftharpoons 23\text{DHMB}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}]$
VLI8	$23\text{DHMB}[\text{c}] \rightarrow 3\text{MOB}[\text{c}]$
VLI9	$3\text{MOB}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{AKG}[\text{c}] + \text{LVAL}[\text{c}]$
VLI10	$2\text{IPPMAL}[\text{c}] \rightleftharpoons 2\text{IPPM}[\text{c}]$
VLI11	$2\text{IPPM}[\text{c}] \rightleftharpoons 3\text{IPPMAL}[\text{c}]$
VLI12	$3\text{IPPMAL}[\text{c}] + \text{NAD}[\text{c}] \rightleftharpoons 2\text{IPSUCC}[\text{c}] + \text{NADH}[\text{c}]$
VLI13	$2\text{IPSUCC}[\text{c}] \rightarrow 4\text{MOP}[\text{c}] + \text{CO}_2[\text{c}]$
VLI14	$4\text{MOP}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{AKG}[\text{c}] + \text{LLEU}[\text{c}]$
LYS1	$\text{ASPSA}[\text{c}] + \text{PYR}[\text{c}] \rightarrow 23\text{DHDP}[\text{c}]$
LYS2	$23\text{DHDP}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{NADP}[\text{c}] + \text{THDP}[\text{c}]$
LYS3	$\text{SUCCOA}[\text{c}] + \text{THDP}[\text{c}] \rightarrow \text{COA}[\text{c}] + \text{SL2A6O}[\text{c}]$
LYS4	$\text{LGLU}[\text{c}] + \text{SL2A6O}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{AKG}[\text{c}] + \text{SL26DA}[\text{c}]$
LYS5	$\text{SL26DA}[\text{c}] \rightarrow 26\text{DAP_LL}[\text{c}] + \text{SUCC}[\text{c}]$
LYS6	$26\text{DAP_LL}[\text{c}] \rightleftharpoons 26\text{DAP_M}[\text{c}]$
LYS7	$26\text{DAP_M}[\text{c}] \rightarrow \text{CO}_2[\text{c}] + \text{LLYS}[\text{c}]$

LYS8	LLYS[c] -> CDV[c] + CO2[c]
EX_CDV	CDV[c] <=>
PRO1	ATP[c] + LGLU[c] -> ADP[c] + GLU5P[c]
PRO2	GLU5P[c] + NADPH[c] <=> GLU5SA[c] + NADP[c] + Pi[c]
PRO3	GLU5SA[c] <=> 1PYR5C[c]
PRO4	1PYR5C[c] + NADPH[c] <=> LPRO[c] + NADP[c]
PRO5	AKG[c] + LORN[c] <=> GLU5SA[c] + LGLU[c]
ARG1	LARG[c] -> LORN[c] + UREA[c]
ARG2	CBP[c] + LORN[c] <=> LCITR[c] + Pi[c]
HIS1	ATP[c] + PRPP[c] -> PPI[c] + PRBATP[c]
HIS2	PRBATP[c] -> PPI[c] + PRBAMP[c]
HIS3	PRBAMP[c] -> PRFP[c]
HIS4	PRFP[c] -> PRLP[c]
HIS5	LGLN[c] + PRLP[c] -> AICAR[c] + EIG3P[c] + LGLU[c]
HIS6	EIG3P[c] -> IMACP[c]
HIS7	IMACP[c] + LGLU[c] <=> AKG[c] + HISP[c]
HIS8	HISP[c] -> HISTD[c] + Pi[c]
HIS9	HISTD[c] + NAD[c] -> HISTDAL[c] + NADH[c]
HIS10	HISTDAL[c] + NAD[c] -> LHIS[c] + NADH[c]
HIS11	AMET[c] + LHIS[c] -> AHCYS[c] + MLHIS[c]
EX_MLHIS	MLHIS[c] <=>
PTT1	E4P[c] + PEP[c] -> 2DDA7P[c] + Pi[c]
PTT2	2DDA7P[c] -> 3DHQ[c] + Pi[c]
PTT3	3DHQ[c] <=> 3DHSK[c]
PTT4	3DHSK[c] + NADPH[c] <=> NADP[c] + SKM[c]
PTT5	ATP[c] + SKM[c] -> ADP[c] + SKM3P[c]
PTT6	PEP[c] + SKM3P[c] <=> 3PSME[c] + Pi[c]
PTT7	3PSME[c] -> CHOR[c] + Pi[c]
PTT8	CHOR[c] + LGLN[c] -> ANTH[c] + LGLU[c] + PYR[c]
PTT9	ANTH[c] + PRPP[c] -> PPI[c] + PRAN[c]
PTT10	PRAN[c] <=> 2CPR5P[c]

PTT11	2CPR5P[c] -> 3IG3P[c] + CO2[c]
PTT12	3IG3P[c] -> GA3P[c] + INDOLE[c]
PTT13	INDOLE[c] + LSER[c] -> LTRP[c]
PTT14	CHOR[c] <=> PPHN[c]
PTT15	PPHN[c] -> CO2[c] + PHPYR[c]
PTT16	LGLU[c] + PHPYR[c] <=> AKG[c] + LPHE[c]
PTT17	DGLU[c] + PHPYR[c] <=> AKG[c] + DPHE[c]
PTT18	NAD[c] + PPHN[c] -> 34HPP[c] + CO2[c] + NADH[c]
PTT19	34HPP[c] + LGLU[c] <=> AKG[c] + LTYR[c]
EX_DPHE	DPHE[c] <=>
TYR1	MTYRAM[c] + AMET[c] -> HOR[c] + AHCYS[c]
TYR2	AKG[c] + LTYR[c] <=> 34HPP[c] + LGLU[c]
TYR3	4H2KPM[c] -> PYR[c] + SUCCSA[c]
EX_MTYRAM	MTYRAM[c] <=>
EX_HOR	HOR[c] <=>
EX_4H2KPM	4H2KPM[c] <=>
UREA1	ACCOA[c] + LGLU[c] -> ACGLU[c] + COA[c]
UREA2	ACGLU[c] + ATP[c] -> ACGLU5P[c] + ADP[c]
UREA3	ACGLU5P[c] + NADPH[c] -> ACGLU5SA[c] + NADP[c] + Pi[c]
UREA4	ACGLU5SA[c] + LGLU[c] <=> ACORN[c] + AKG[c]
UREA5	ACORN[c] + LGLU[c] <=> ACGLU[c] + LORN[c]
GTH1	2 GTH_Red[c] + H2O2[c] -> GTH_Ox[c]
EX_GTH_Red	GTH_Red[c] <=>
EX_GTH_Ox	GTH_Ox[c] <=>
PUR1	LGLN[c] + PRPP[c] -> LGLU[c] + PPi[c] + PRAM[c]
PUR2	ATP[c] + GLY[c] + PRAM[c] -> ADP[c] + GAR[c] + Pi[c]
PUR3	10FTHF[c] + GAR[c] -> FGAR[c] + THF[c]
PUR4	ATP[c] + FGAR[c] + LGLN[c] -> ADP[c] + FGAM[c] + LGLU[c] + Pi[c]
PUR5	ATP[c] + FGAM[c] -> ADP[c] + AIR[c] + Pi[c]
PUR6	AIR[c] + HCO3[c] <=> PRAIC[c]

PUR7	$\text{ATP}[c] + \text{LASP}[c] + \text{PRAIC}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{Pi}[c] + \text{SAICAR}[c]$
PUR8	$\text{SAICAR}[c] \Leftrightarrow \text{AICAR}[c] + \text{FUM}[c]$
PUR9	$10\text{FTHF}[c] + \text{AICAR}[c] \rightarrow \text{FPRICA}[c] + \text{THF}[c]$
PUR10	$\text{FPRICA}[c] \Leftrightarrow \text{IMP}[c]$
PUR11	$\text{GTP}[c] + \text{IMP}[c] + \text{LASP}[c] \rightarrow \text{DCAMP}[c] + \text{GDP}[c] + \text{Pi}[c]$
PUR12	$\text{DCAMP}[c] \rightarrow \text{AMP}[c] + \text{FUM}[c]$
PUR13	$\text{AMP}[c] + \text{ATP}[c] \Leftrightarrow 2 \text{ADP}[c]$
PUR14	$\text{ATP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dATP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PUR15	$\text{dATP}[c] + \text{PYR}[c] \rightarrow \text{dADP}[c] + \text{PEP}[c]$
PUR16	$\text{ADP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dADP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PUR17	$\text{ADP}[c] + \text{dADP}[c] \Leftrightarrow \text{ATP}[c] + \text{dAMP}[c]$
PUR18	$\text{AMP}[c] + \text{PPi}[c] \Leftrightarrow \text{ADE}[c] + \text{PRPP}[c]$
PUR19	$2\text{DR1P}[c] + \text{ADE}[c] \Leftrightarrow \text{dADN}[c] + \text{Pi}[c]$
PUR20	$\text{dADN}[c] \rightarrow \text{dINS}[c] + \text{NH}_3[c]$
PUR21	$\text{dINS}[c] + \text{Pi}[c] \Leftrightarrow 2\text{DR1P}[c] + \text{HXAN}[c]$
PUR22	$\text{HXAN}[c] + \text{R1P}[c] \Leftrightarrow \text{INS}[c] + \text{Pi}[c]$
PUR23	$\text{ADN}[c] \rightarrow \text{INS}[c] + \text{NH}_3[c]$
PUR24	$\text{ADN}[c] + \text{Pi}[c] \Leftrightarrow \text{ADE}[c] + \text{R1P}[c]$
PUR25	$\text{ADE}[c] \rightarrow \text{HXAN}[c] + \text{NH}_3[c]$
PUR26	$\text{HXAN}[c] + \text{PRPP}[c] \Leftrightarrow \text{IMP}[c] + \text{PPi}[c]$
PUR27	$\text{IMP}[c] + \text{NAD}[c] \rightarrow \text{NADH}[c] + \text{XMP}[c]$
PUR28	$\text{ATP}[c] + \text{NH}_3[c] + \text{XMP}[c] \rightarrow \text{AMP}[c] + \text{GMP}[c] + \text{PPi}[c]$
PUR29	$\text{ATP}[c] + \text{LGLN}[c] + \text{XMP}[c] \rightarrow \text{AMP}[c] + \text{GMP}[c] + \text{LGLU}[c] + \text{PPi}[c]$
PUR30	$\text{GMP}[c] + \text{NADPH}[c] \rightarrow \text{IMP}[c] + \text{NADP}[c] + \text{NH}_3[c]$
PUR31	$\text{GMP}[c] + \text{PPi}[c] \Leftrightarrow \text{GUA}[c] + \text{PRPP}[c]$
PUR32	$\text{GUA}[c] \rightarrow \text{NH}_3[c] + \text{XAN}[c]$
PUR33	$\text{PRPP}[c] + \text{XAN}[c] \Leftrightarrow \text{PPi}[c] + \text{XMP}[c]$
PUR34	$\text{Pi}[c] + \text{XANT}[c] \Leftrightarrow \text{R1P}[c] + \text{XAN}[c]$
PUR35	$\text{ATP}[c] + \text{GMP}[c] \Leftrightarrow \text{ADP}[c] + \text{GDP}[c]$
PUR36	$\text{GDP}[c] + \text{PEP}[c] \Leftrightarrow \text{GTP}[c] + \text{PYR}[c]$
PUR37	$\text{GTP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dGTP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$

PUR38	$dGTP[c] + PYR[c] \rightleftharpoons dGDP[c] + PEP[c]$
PUR39	$GDP[c] + TRD_Red[c] \rightarrow dGDP[c] + TRD_Ox[c]$
EX_dAMP	$dAMP[c] \rightleftharpoons$
EX_XANT	$XANT[c] \rightleftharpoons$
PYRM1	$2 ATP[c] + HCO3[c] + LGLN[c] \rightarrow 2 ADP[c] + CBP[c] + LGLU[c] + Pi[c]$
PYRM2	$CBP[c] + LASP[c] \rightarrow CBASP[c] + Pi[c]$
PYRM3	$CBASP[c] \rightleftharpoons DHOR_S[c]$
PYRM4	$DHOR_S[c] + NAD[c] \rightleftharpoons NADH[c] + OROT[c]$
PYRM5	$OROT[c] + PRPP[c] \rightarrow OROT5P[c] + PPI[c]$
PYRM6	$OROT5P[c] \rightarrow CO2[c] + UMP[c]$
PYRM7	$ATP[c] + UMP[c] \rightleftharpoons ADP[c] + UDP[c]$
PYRM8	$ATP[c] + UDP[c] \rightleftharpoons ADP[c] + UTP[c]$
PYRM9	$ATP[c] + NH3[c] + UTP[c] \rightarrow ADP[c] + CTP[c] + Pi[c]$
PYRM10	$ATP[c] + LGLN[c] + UTP[c] \rightarrow ADP[c] + CTP[c] + LGLU[c] + Pi[c]$
PYRM11	$CTP[c] \rightarrow NH3[c] + UTP[c]$
PYRM12	$ADP[c] + CTP[c] \rightleftharpoons ATP[c] + CDP[c]$
PYRM13	$ADP[c] + CDP[c] \rightleftharpoons ATP[c] + CMP[c]$
PYRM14	$CTP[c] + TRD_Red[c] \rightarrow dCTP[c] + TRD_Ox[c]$
PYRM15	$CDP[c] + TRD_Red[c] \rightarrow dCDP[c] + TRD_Ox[c]$
PYRM16	$NADPH[c] + TRD_Ox[c] \rightarrow NADP[c] + TRD_Red[c]$
PYRM17	$ADP[c] + dCTP[c] \rightleftharpoons ATP[c] + dCDP[c]$
PYRM18	$ADP[c] + dCDP[c] \rightleftharpoons ATP[c] + dCMP[c]$
PYRM19	$dCMP[c] \rightarrow dUMP[c] + NH3[c]$
PYRM20	$TRD_Red[c] + UTP[c] \rightarrow dUTP[c] + TRD_Ox[c]$
PYRM21	$dCTP[c] \rightarrow dUTP[c] + NH3[c]$
PYRM22	$dUTP[c] \rightarrow dUMP[c] + PPI[c]$
PYRM23	$ADP[c] + dUTP[c] \rightleftharpoons ATP[c] + dUDP[c]$
PYRM24	$ADP[c] + dUDP[c] \rightleftharpoons ATP[c] + dUMP[c]$
PYRM25	$TRD_Red[c] + UDP[c] \rightarrow dUDP[c] + TRD_Ox[c]$
PYRM26	$dUMP[c] + MLTHF[c] \rightarrow DHF[c] + dTMP[c]$

PYRM27	$\text{ATP}[c] + \text{dTMP}[c] \rightleftharpoons \text{ADP}[c] + \text{dTDP}[c]$
PYRM28	$\text{ATP}[c] + \text{dTDP}[c] \rightleftharpoons \text{ADP}[c] + \text{dTTP}[c]$
PL1	$\text{ATP}[c] + \text{GLYCAC}[c] \rightarrow 3\text{PG}[c] + \text{ADP}[c]$
PL2	$\text{ATP}[c] + \text{GLYC}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{GLYC3P}[c]$ $0.073 \text{ C140_ACP}[c] + 0.521 \text{ C160_ACP}[c] + 0.065$ $\text{ C161_ACP}[c] + 0.022 \text{ C17CYC_ACP}[c] + 0.036$
PL3	$\text{ C180_ACP}[c] + 0.102 \text{ C181_ACP}[c] + 0.181$ $\text{ C19CYC_ACP}[c] + \text{GLYC3P}[c] \rightarrow \text{IMAG3P}[c] +$ $\text{ACP}[c]$ $1\text{MAG3P}[c] + 0.073 \text{ C140_ACP}[c] + 0.521$ $\text{ C160_ACP}[c] + 0.065 \text{ C161_ACP}[c] + 0.022$
PL4	$\text{ C17CYC_ACP}[c] + 0.036 \text{ C180_ACP}[c] + 0.102$ $\text{ C181_ACP}[c] + 0.181 \text{ C19CYC_ACP}[c] \rightarrow \text{ACP}[c] +$ $\text{PA}[c]$
PL5	$12\text{DAG}[c] + \text{ATP}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{PA}[c]$
PL6	$\text{GLYC3P}[c] + \text{NAD}[c] \rightleftharpoons \text{DHAP}[c] + \text{NADH}[c]$
PL7	$\text{GLYC3P}[c] + \text{NADP}[c] \rightleftharpoons \text{DHAP}[c] + \text{NADPH}[c]$
PL8	$\text{CTP}[c] + \text{PA}[c] \rightarrow \text{CDP_DAG}[c] + \text{PPi}[c]$
PL9	$\text{CDP_DAG}[c] + \text{GLYC3P}[c] \rightarrow \text{CMP}[c] + \text{PGP}[c]$
PL10	$\text{PGP}[c] \rightarrow \text{PG}[c] + \text{Pi}[c]$
PL11	$2 \text{ PG}[c] \rightarrow \text{CDL}[c] + \text{GLYC}[c]$
PL12	$\text{CDP_DAG}[c] + \text{PG}[c] \rightarrow \text{CDL}[c] + \text{CMP}[c]$
PL13	$\text{CDP_DAG}[c] + \text{LSER}[c] \rightarrow \text{CMP}[c] + \text{PS}[c]$
PL14	$\text{PS}[c] \rightarrow \text{CO}_2[c] + \text{PE}[c]$
PL15	$12 \text{ PG}[c] \rightarrow 12 \text{ 12DAG}[c] + \text{POLYGP}[c]$
FAS1	$\text{ACCOA}[c] + \text{ACP}[c] \rightleftharpoons \text{ACACP}[c] + \text{COA}[c]$
FAS2	$\text{ACP}[c] + \text{MALCOA}[c] \rightleftharpoons \text{COA}[c] + \text{MALACP}[c]$
FAS3	$\text{ACACP}[c] + 6 \text{ MALACP}[c] + 12 \text{ NADPH}[c] \rightarrow 6$ $\text{ ACP}[c] + \text{ C140_ACP}[c] + 6 \text{ CO}_2[c] + 12 \text{ NADP}[c]$
FAS4	$\text{ACACP}[c] + 7 \text{ MALACP}[c] + 14 \text{ NADPH}[c] \rightarrow 7$ $\text{ ACP}[c] + \text{ C160_ACP}[c] + 7 \text{ CO}_2[c] + 14 \text{ NADP}[c]$
FAS5	$\text{ACACP}[c] + 7 \text{ MALACP}[c] + 13 \text{ NADPH}[c] \rightarrow 7$ $\text{ ACP}[c] + \text{ C161_ACP}[c] + 7 \text{ CO}_2[c] + 13 \text{ NADP}[c]$
FAS6	$\text{ACACP}[c] + 8 \text{ MALACP}[c] + 16 \text{ NADPH}[c] \rightarrow 8$ $\text{ ACP}[c] + \text{ C180_ACP}[c] + 8 \text{ CO}_2[c] + 16 \text{ NADP}[c]$
FAS7	$\text{ACACP}[c] + 8 \text{ MALACP}[c] + 15 \text{ NADPH}[c] \rightarrow 8$ $\text{ ACP}[c] + \text{ C181_ACP}[c] + 8 \text{ CO}_2[c] + 15 \text{ NADP}[c]$
FAS8	$\text{AMET}[c] + \text{ C161_ACP}[c] \rightarrow \text{AHCYS}[c] +$ $\text{ C17CYC_ACP}[c]$

FAS9	AMET[c] + C181_ACP[c] -> AHCYS[c] + C19CYC_ACP[c]
STERO1	DMPP[c] + IPDP[c] -> GRDP[c] + PPI[c]
STERO2	GRDP[c] + IPDP[c] -> FRDP[c] + PPI[c]
STERO3	FRDP[c] + IPDP[c] -> GGRDP[c] + PPI[c]
STERO4	GGRDP[c] + 7 IPDP[c] -> 7 PPI[c] + UDCPDP[c]
STERO5	GA3P[c] + PYR[c] -> CO2[c] + dXYLU5P[c]
STERO6	dXYLU5P[c] + NADPH[c] -> MERYTH4P[c] + NADP[c]
STERO7	CTP[c] + MERYTH4P[c] -> CDPMERYTH[c] + PPI[c]
STERO8	ATP[c] + CDPMERYTH[c] -> ADP[c] + CDPMERY2P[c]
STERO9	CDPMERY2P[c] -> CMP[c] + MERYcDP[c]
STERO10	MERYcDP[c] + ProDTH[c] -> HMB4DP[c] + ProDS[c]
EX_IPDP	IPDP[c] <=>
EX_DMPP	DMPP[c] <=>
EX_UDCPDP	UDCPDP[c] <=>
EX_ProDTH	ProDTH[c] <=>
EX_HMB4DP	HMB4DP[c] <=>
EX_ProDS	ProDS[c] <=>
NAD1	ACCOA[c] + FORM[c] + LASP[c] -> QULN[c]
NAD2	PRPP[c] + QULN[c] -> CO2[c] + NAMN[c] + PPI[c]
NAD3	ATP[c] + NAMN[c] -> DNAD[c] + PPI[c]
NAD4	ATP[c] + NAD[c] <=> ADP[c] + NADP[c]
NAD5	NA[c] + PRPP[c] -> NAMN[c] + PPI[c]
NAD6	ATP[c] + NMN[c] -> NAD[c] + PPI[c]
NAD7	NAMNs[c] + Pi[c] <=> NA[c] + R1P[c]
EX_NMN	NMN[c] <=>
EX_NAMNs	NAMNs[c] <=>
PANCOA1	3MOB[c] + MLTHF[c] -> 2DHP[c] + THF[c]
PANCOA2	2DHP[c] + NADPH[c] -> NADP[c] + PANT[c]
PANCOA3	ATP[c] + bALA[c] + PANT[c] -> AMP[c] + PNT0[c] + PPI[c]

PANCOA4	ATP[c] + PNT0[c] -> 4PPAN[c] + ADP[c]
PANCOA5	4PPAN[c] + ATP[c] + LCYS[c] -> 4PPCYS[c] + ADP[c] + Pi[c]
PANCOA6	4PPAN[c] + CTP[c] + LCYS[c] -> 4PPCYS[c] + CDP[c] + Pi[c]
PANCOA7	4PPCYS[c] -> CO2[c] + PAN4P[c]
PANCOA8	ATP[c] + PAN4P[c] -> DPCOA[c] + PPI[c]
PANCOA9	ATP[c] + DPCOA[c] -> ADP[c] + COA[c]
PANCOA10	4PCYS[c] + ATP[c] -> 4PPCYS[c] + ADP[c]
PANCOA11	4PCYS[c] <=> PAN[c] + CO2[c]
PANCOA12	ATP[c] + PAN[c] -> ADP[c] + PAN4P[c]
EX_4PCYS	4PCYS[c] <=>
RIBFLA1	DRU5P[c] -> DB4P[c] + FORM[c]
RIBFLA2	4R5AU[c] + DB4P[c] -> DMLZ[c] + Pi[c]
RIBFLA3	GTP[c] -> 25DRAPP[c] + FORM[c] + PPI[c]
RIBFLA4	25DRAPP[c] -> 5APRBU[c] + NH3[c]
RIBFLA6	5APRBU[c] + NADP[c] -> 5APRU[c] + NADPH[c]
RIBFLA7	5APRU[c] -> 4R5AU[c] + Pi[c]
RIBFLA8	2 DMLZ[c] -> 4R5AU[c] + RIBFLA[c]
RIBFLA9	ATP[c] + RIBFLA[c] -> ADP[c] + FMN[c]
RIBFLA10	ATP[c] + FMN[c] -> FAD[c] + PPI[c]
RIBFLA11	RIBFLA[c] -> DMBZID[c]
RIBFLA12	DMBZID[c] + NAMN[c] -> 5PRDMBZ[c] + NA[c]
EX_5PRDMBZ	5PRDMBZ[c] <=>
FOLATE1	GTP[c] -> FAPTP[c]
FOLATE2	FAPTP[c] -> DAPTP[c] + FORM[c]
FOLATE3	DAPTP[c] -> DATHAO[c]
FOLATE4	DATHAO[c] -> AHTHDH[c]
FOLATE5	AHTHDH[c] -> DHNPP[c] + PPI[c]
FOLATE6	DHNPP[c] -> DHNP[c] + Pi[c]
FOLATE7	DHNP[c] -> AHHMDHP[c] + GLYCALD[c]
FOLATE8	AHHMDHP[c] + ATP[c] -> ADHHP[c] + AMP[c]
FOLATE9	ADHHP[c] + PABA[c] -> DHPT[c] + PPI[c]
FOLATE10	AHHMDHP[c] + PABA[c] -> DHPT[c]

FOLATE11	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{DHPT}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] \rightarrow \text{ADP}[\text{c}] + \text{DHF}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}]$
FOLATE12	$\text{DHF}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{FOL}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}]$
FOLATE13	$\text{NADP}[\text{c}] + \text{THF}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{DHF}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}]$
FOLATE14	$5\text{FTHF}[\text{c}] + \text{ATP}[\text{c}] \rightarrow \text{ADP}[\text{c}] + \text{METHF}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}]$
FOLATE15	$\text{METHF}[\text{c}] \rightarrow 5\text{FTHF}[\text{c}]$
FOLATE16	$\text{MLTHF}[\text{c}] + \text{NADH}[\text{c}] \rightarrow 5\text{MTHF}[\text{c}] + \text{NAD}[\text{c}]$
FOLATE17	$10\text{FTHF}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{METHF}[\text{c}]$
FOLATE18	$\text{MLTHF}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{METHF}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}]$
FOLATE19	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{FORM}[\text{c}] + \text{THF}[\text{c}] \rightarrow 10\text{FTHF}[\text{c}] + \text{ADP}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}]$
EX_FOL	$\text{FOL}[\text{c}] \rightleftharpoons$
PORCHL1	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] \rightarrow \text{AMP}[\text{c}] + \text{GLU1SA}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}] + \text{PPi}[\text{c}]$
PORCHL2	$\text{GLU1SA}[\text{c}] \rightarrow 5\text{AOP}[\text{c}]$
PORCHL3	$2\text{AOP}[\text{c}] \rightarrow \text{PPBNG}[\text{c}]$
PORCHL4	$4\text{PPBNG}[\text{c}] \rightarrow \text{HMBIL}[\text{c}] + 4\text{NH}_3[\text{c}]$
PORCHL5	$\text{HMBIL}[\text{c}] \rightarrow \text{UPPG3}[\text{c}]$
PORCHL6	$\text{UPPG3}[\text{c}] \rightarrow \text{CPPPG3}[\text{c}] + 4\text{CO}_2[\text{c}]$
PORCHL7	$2\text{AMET}[\text{c}] + \text{CPPPG3}[\text{c}] \rightarrow 2\text{CO}_2[\text{c}] + 2\text{dADN}[\text{c}] + 2\text{LMET}[\text{c}] + \text{PPPG9}[\text{c}]$
PORCHL8	$2\text{AMET}[\text{c}] + \text{UPPG3}[\text{c}] \rightarrow 2\text{AHCYS}[\text{c}] + \text{PRCR2}[\text{c}]$
PORCHL9	$\text{NAD}[\text{c}] + \text{PRCR2}[\text{c}] \rightarrow \text{NADH}[\text{c}] + \text{SHCL}[\text{c}]$
PORCHL10	$\text{Fe}_2[\text{c}] + \text{SHCL}[\text{c}] \rightarrow \text{SHEME}[\text{c}]$
PORCHL11	$\text{COBALT}[\text{c}] + \text{SHCL}[\text{c}] \rightarrow \text{CPRCR2}[\text{c}]$
PORCHL12	$\text{AMET}[\text{c}] + \text{CPRCR2}[\text{c}] \rightarrow \text{AHCYS}[\text{c}] + \text{CPRCR3}[\text{c}]$
PORCHL13	$\text{AMET}[\text{c}] + \text{CPRCR3}[\text{c}] \rightarrow \text{AHCYS}[\text{c}] + \text{CPRCR4}[\text{c}]$
PORCHL14	$\text{AMET}[\text{c}] + \text{CPRCR4}[\text{c}] \rightarrow \text{AHCYS}[\text{c}] + \text{CPRCR5A}[\text{c}]$
PORCHL15	$\text{CPRCR5A}[\text{c}] \rightarrow \text{ACAL}[\text{c}] + \text{CPRCR5B}[\text{c}]$
PORCHL16	$\text{AMET}[\text{c}] + \text{CPRCR5B}[\text{c}] \rightarrow \text{AHCYS}[\text{c}] + \text{CPRCR6}[\text{c}]$
PORCHL17	$\text{CPRCR6}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] \rightarrow \text{CDHPRCR6}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}]$
PORCHL18	$\text{AMET}[\text{c}] + \text{CDHPRCR6}[\text{c}] \rightarrow \text{AHCYS}[\text{c}] + \text{CPRCR7}[\text{c}]$
PORCHL19	$\text{AMET}[\text{c}] + \text{CPRCR7}[\text{c}] \rightarrow \text{AHCYS}[\text{c}] + \text{CO}_2[\text{c}] +$

	CPRCR8[c]
PORCHL20	CPRCR8[c] -> CBRN[c]
PORCHL21	2 ATP[c] + CBRN[c] + 2 LGLN[c] -> 2 ADP[c] + CBRNDA[c] + 2 LGLU[c] + 2 Pi[c]
PORCHL22	AMET[c] + PRCR3B[c] -> AHCYS[c] + PRCR4[c]
PORCHL23	AMET[c] + PRCR4[c] -> AHCYS[c] + PRCR5[c]
PORCHL24	AMET[c] + PRCR5[c] -> AHCYS[c] + PRCR6A[c]
PORCHL25	NADPH[c] + PRCR6A[c] -> NADP[c] + PRCR6B[c]
PORCHL26	2 AMET[c] + PRCR6B[c] <=> 2 AHCYS[c] + PRCR8[c] + CO2[c]
PORCHL27	PRCR8[c] -> HGBRN[c]
PORCHL28	ACBRNDA[c] + 4 ATP[c] + 4 LGLN[c] -> ACBRNHA[c] + 4 ADP[c] + 4 LGLU[c] + 4 Pi[c]
PORCHL29	1APROH[c] + ACBRNHA[c] + ATP[c] -> ACBA[c] + ADP[c] + Pi[c]
PORCHL30	ACBA[c] + ATP[c] -> ACBAP[c] + ADP[c]
PORCHL31	ACBA[c] + GTP[c] -> ACBAP[c] + GDP[c]
PORCHL32	ACBRNHA[c] + APROHP[c] + ATP[c] -> ACBAP[c] + ADP[c] + Pi[c]
PORCHL33	ACBAP[c] + GTP[c] -> AGDPCBA[c] + PPi[c]
PORCHL34	AGDPCBA[c] + ARBZL[c] -> CACO[c] + GMP[c]
PORCHL35	ARBZL5P[c] -> ARBZL[c] + Pi[c]
EX_Fe2	Fe2[c] <=>
EX_SHEME	SHEME[c] <=>
EX_COBALT	COBALT[c] <=>
EX_CBRNDA	CBRNDA[c] <=>
EX_PRCR3B	PRCR3B[c] <=>
EX_HGBRN	HGBRN[c] <=>
EX_ACBRNDA	ACBRNDA[c] <=>
EX_1APROH	1APROH[c] <=>
EX_CACO	CACO[c] <=>
EX_ARBZL5P	ARBZL5P[c] <=>
EX_PPPG9	PPPG9[c] <=>
EX_APROHP	APROHP[c] <=>
LIMPIN1	HIPCOA[c] + NAD[c] -> IPCHCCOA[c] + NADH[c]

LIMPIN2	MTNOL[c] + NAD[c] + O2[c] -> MTNAL[c] + NADH[c]
LIMPIN3	HDMHCOA[c] + NAD[c] -> DMMOHCOA[c] + NADH[c]
EX_HIPCOA	HIPCOA[c] <=>
EX_IPCHCCOA	IPCHCCOA[c] <=>
EX_MTNOL	MTNOL[c] <=>
EX_MTNAL	MTNAL[c] <=>
EX_HDMHCOA	HDMHCOA[c] <=>
EX_DMMOHCOA	DMMOHCOA[c] <=>
DNA	4.403 ATP[c] + 1.118 dATP[c] + 0.501 dCTP[c] + 0.501 dGTP[c] + 1.118 dTTP[c] -> 4.403 ADP[c] + DNA[c] + 4.403 Pi[c] + 3.236 PPI[c]
RNA	1.05 ATP[c] + 1.124 CTP[c] + 0.832 GTP[c] + 0.873 UTP[c] -> 1.554 ADP[c] + 1.554 Pi[c] + 3.879 PPI[c] + RNA[c]
PROTEIN	37.195 ATP[c] + 1.078 GLY[c] + 0.775 LALA[c] + 0.133 LARG[c] + 0.156 LASN[c] + 0.156 LASP[c] + 1.216 LCYS[c] + 0.127 LGLN[c] + 0.127 LGLU[c] + 0.146 LHis[c] + 0.436 LILE[c] + 0.429 LLEU[c] + 0.336 LLYS[c] + 0.783 LMET[c] + 0.185 LPHE[c] + 0.457 LPRO[c] + 0.427 LSER[c] + 0.41 LTHR[c] + 0.043 LTRP[c] + 0.801 LTYR[c] + 1.172 LVAL[c] -> 37.195 ADP[c] + 37.195 Pi[c] + PROTEIN[c]
PLIPID	0.109 CDL[c] + 0.8 PE[c] + 0.397 PG[c] -> PLIPID[c]
TEICHOIC	0.129 ATP[c] + 0.129 LLYS[c] + 0.518 POLYGP[c] + 0.129 UACGAM[c] -> 0.129 ADP[c] + 0.129 Pi[c] + TEICH[c] + 0.129 UDP[c]
TRACE	0.199 COA[c] + 0.182 FAD[c] + 0.313 FMN[c] + 0.215 NAD[c] + 0.192 NADP[c] + 0.321 THF[c] -> TRACE[c]
PEPTIDO	1.106 26DAP_M[c] + 4.425 ATP[c] + 1.106 DALADALA[c] + 1.106 LALA[c] + 1.106 LGLU[c] + 1.064 UACGAM[c] + 1.064 UAMR[c] -> 4.425 ADP[c] + 1.106 DALA[c] + PEPTIDO[c] + 4.425 Pi[c] + 1.106 UDP[c] + 1.106 UMP[c]
CARBO	4.115 UDPGAL[c] + 2.058 UDPGLC[c] -> CARBO[c] + 6.173 UDP[c]
BIOMASS	40 ATP[c] + 0.0432 CARBO[c] + 0.026 DNA[c] + 0.1009 PEPTIDO[c] + 0.076 PLIPID[c] + 0.5284 PROTEIN[c] + 0.0655 RNA[c] + 0.08 TEICH[c] +

0.0494 TRACE[c] -> 40 ADP[c] + 40 Pi[c]

APÊNDICE C – FUNÇÕES CORRIGIDAS DO METOOLBOX E NOVA FUÇÃO PARA ANÁLISE DE SENSIBILIDADE INTEGRADA AO COBRA TOOLBOX

Função hydroptimized_main do METoolbox

```
% Optimized Metabolic Flux Analysis
```

```
% Stoichiometric matrix of the proposed metabolic network with dimensions
```

```
% (i x j), where "i" is number of reactions (fluxes) and "j" is the number
```

```
% of metabolities:
```

```
% Ex_glc          glc[c]  <=>
% Ex_glyc         glyc[c] <=>
% Ex_atp          adp[c]  <=>
% Ex_nad          nad[c]  <=>
% Ex_hyd          h2[c]   <=>
% Ex_lac          lac[c]  <=>
% Ex_ac           ac[c]   <=>
% Ex_etoh         etoh[c] <=>
% Ex_bu           bu[c]   <=>
% Ex_acetone      acetone[c] <=>
% Ex_buoh         buoh[c] <=>
% vglc            glc[c] + 2 atp[c]  -> 2 adp[c] + 2
ga3p[c]
% vglyc           glyc[c] + nad[c] + atp[c]  ->
nadh[c] + adp[c] + ga3p[c]
% vpyr            ga3p[c] + 2 adp[c] + nad[c]  ->
pyr[c] + 2 atp[c] + nadh[c]
% vpdh            pyr[c] + fdox[c] + coa[c]  ->
accoa[c] + fdred[c]
% vnadh           fdox[c] + nadh[c]  <=> fdred[c] +
nad[c]
% vhyd            fdred[c]  -> fdox[c] + h2[c]
% vlac            pyr[c] + nadh[c]  -> nad[c] +
lac[c]
% vthi            2 accoa[c]  -> coa[c] + actaccoa[c]
% vac             accoa[c] + adp[c]  <=> atp[c] +
coa[c] + ac[c]
% vetoh           accoa[c] + 2 nadh[c]  -> coa[c] + 2
nad[c] + etoh[c]
```



```

-0.6667,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,-9.9,0,-
0.5833,0,0,0,0,0,0,0,0];

% Objective function
sG = size(G);
f = zeros(sG(1),1);
f(28) = 1;

% Lower and upper bounds:
lb = zeros(sG(1),1);
ub = 1000*ones(sG(1),1);
ub(12) = 8.72;
ub(13) = 0;
lb(1:11) = -1000;
lb(16) = -1000;
lb(20) = -1000;
lb(25) = -1000;

% Position vector of exchange reactions:
p = [1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11;28];

% Relative position of the unmeasured flux of
interest for specific
% sensitivity analysis:
pcs = 5;

% Metabolic flux analysis:
[x,fval] = mfaop(f,G,lb,ub,p,pcs)

```

Função vioptimized_main do METoolbox

Função vioptimized_main, obtida por contato com o autor pelo e-mail erlon@unesc.net, sob o compromisso de dar os devidos créditos.

Função mfaop do METoolbox

```

% MFAOP.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the metabolic flux analysis.
% [x,fval,exitflag,output,lambda,C] =
MFAOP(f,SP,EF,G,pcs) Makes the

```

```
% metabolic flux analysis of subdetermined
systems.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
%   input:
%     f = objective function.
%     G = stoichiometric matrix.
%     lb = lower bounds vector.
%     ub = upper bounds vector.
%     p = position vector of exchange reactions.
%     pcs = relative position of the interest
flux for specific
%     sensitivity analysis.
%
%   output:
%     x = metabolic flux vector.
%     fval = objective function value in "x".
%     exitflag = describes the exit condition. >
0 when LINPROG
%     converged with a solution X. 0 when LINPROG
reached the maximum
%     number of iterations without converging. <
0 when the problem was
%     infeasible or LINPROG failed.
%     output = interactions number.
%     lambda = set of Lagrangian multipliers.
%     C = conditional number.
%
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and
Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies.
Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General
Public Licence
% (Free Software Foundation 1991;
http://www.gnu.org)
```

```

function [x,fval] = mfaop(f,G,lb,ub,p,pcs)

% _____Linear programming_____
Gt = G';
sG = size(Gt);

% Equalities of the system
beq = zeros(sG(1),1);

% Optimization solve
f = -1*f;
[x,fval] = linprog(f,[],[],Gt,beq,lb,ub);

% Flux display
figure
hold on
bar(x,'b')
ylabel('Rates of fluxes (mmol/h/g [dry wt])')
xlabel('Fluxes')
hold off

% _____Sensitivity analysis_____
pa = find(p==pcs);
p(pa) = [];

% External rates
Gtm = Gt(:,p);

% Internal rates
sgt = size(Gt);
j = 1;
i = 1;
for k=1:sgt(2)
    if j == length(p)+1
        for l=k:sgt(2)
            q(i) = 1;
        end
        break;
    end
    if k == p(j)
        j = j+1;
    else

```

```

        q(i) = k;
        i = i+1;
    end
end

Gtc = Gt(:,q);

C = norm(Gt)*norm(pinv(Gt));
sens = -pinv(Gtc)*Gtm;

% Accumulated sensitivities
accum = sum(abs(sens));

figure
bar(p,accum,'g');title('Accumulated
sensitivities');

% Specific sensitivities
pcs = find(q==pcs);
spec = abs(sens(pcs,:));

figure
bar(p,spec,'m');title('Specific sensitivities');
```

Função sensitivity para o COBRA Toolbox

```

function sensitivity(model,pcs)
% _____Sensitivity analysis_____
Gt = full(model.S);
selExchange = findExcRxns(model,true,false);
p = find(selExchange~=0);
pa = find(p==pcs);
p(pa) = [];

% External rates
Gtm = Gt(:,p);

% Internal rates
sgt = size(Gt);
j = 1;
i = 1;
for k=1:sgt(2)
    if j == length(p)+1
```

```

        for l=k:sgt(2)
            q(i) = l;
        end
        break;
    end
    if k == p(j)
        j = j+1;
    else
        q(i) = k;
        i = i+1;
    end
end
end

Gtc = Gt(:,q);

C = norm(Gt)*norm(pinv(Gt));
sens = -pinv(Gtc)*Gtm;

% Accumulated sensitivities
accum = sum(abs(sens));

figure
bar(p,accum,'g');title('Accumulated
sensitivities');

% Specific sensitivities
pcs = find(q==pcs);
spec = abs(sens(pcs,:));

figure
bar(p,spec,'m');title('Specific sensitivities');

```


APÊNDICE D – MODELO COM REGULAÇÃO

Arquivos Cacetobut_824Reg_glc, Cacetobut_824Reg_sucr,
Cacetobut_824Reg_malt, Cacetobut_824Reg_lcts e
Cacetobut_824Reg_glyc, obtidos por contato com o autor pelo e-mail
erlon@unesb.net, sob o compromisso de dar os devidos créditos.

ANEXO A – MODELO SIMPLIFICADO DA *C. acetobutylicum*

Tabela 15 – Reações do modelo simplificado da *C. acetobutylicum* (OLIVEIRA, 2008).

Reação	Fórmula
Ex_glc	glc[c] <=>
Ex_glyc	glyc[c] <=>
Ex_atp	adp[c] <=>
Ex_nad	nad[c] <=>
Ex_hyd	h2[c] <=>
Ex_lac	lac[c] <=>
Ex_ac	ac[c] <=>
Ex_etoh	etoh[c] <=>
Ex_bu	bu[c] <=>
Ex_acetone	acetone[c] <=>
Ex_buoh	buoh[c] <=>
vglc	glc[c] + 2 atp[c] -> 2 adp[c] + 2 ga3p[c]
vglyc	glyc[c] + nad[c] + atp[c] -> nadh[c] + adp[c] + ga3p[c]
vpyr	ga3p[c] + 2 adp[c] + nad[c] -> pyr[c] + 2 atp[c] + nadh[c]
vpdh	pyr[c] + fdox[c] + coa[c] -> accoa[c] + fdred[c]
vnadh	fdox[c] + nadh[c] <=> fdred[c] + nad[c]
vhyd	fdred[c] -> fdox[c] + h2[c]
vlac	pyr[c] + nadh[c] -> nad[c] + lac[c]
vthi	2 accoa[c] -> coa[c] + actaccoa[c]
vac	accoa[c] + adp[c] <=> atp[c] + coa[c] + ac[c]
vetoh	accoa[c] + 2 nadh[c] -> coa[c] + 2 nad[c] + etoh[c]
vacetone1	ac[c] + actaccoa[c] -> accoa[c] + acetone[c]
vacetone2	bu[c] + actaccoa[c] -> bucoa[c] + acetone[c]
vhcoa	actaccoa[c] + 2 nadh[c] -> bucoa[c] + 2 nad[c]
vbu	bucoa[c] + adp[c] <=> coa[c] + atp[c] + bu[c]
vbuoh	bucoa[c] + 2 nadh -> coa[c] + 2 nad[c] + buoh[c]
vatpase	atp[c] -> adp[c]

vbiomass 0.6667 glc[c] + 0.5833 nadh[c] + 9.9 atp[c] ->

ANEXO B – MODELO COMPLETO DA *C. acetobutylicum*

Tabela 16 – Metabólitos do modelo completo da *C. acetobutylicum* (LEE *et al.*, 2008).

Nome	Descrição
10FTHF[c]	10_Formyltetrahydrofolate
12DAG[c]	1,2_diacylglycerol
13DPG[c]	1,3_Bisphospho_D_glycerate
1APROH[c]	(R)_1_Aminopropan_2_ol
1MAG3P[c]	1_acylglycerol_3_phosphate
1PYR5C[c]	1_Pyrroline_5_carboxylate
23DHDP[c]	L_2,3_Dihydrodipicolinate
23DHMB[c]	(R)_2,3_Dihydroxy_3_methylbutanoate
23DHMP[c]	(R)_2,3_Dihydroxy_3_methylpentanoate
25DRAPP[c]	2,5_Diamino_6_(5'_phosphoribosylamino)_4_pyrimidineone
26DAP_LL[c]	LL_2,6_Diaminoheptanedioate
26DAP_M[c]	meso_2,6_Diaminoheptanedioate
2AHBUT[c]	(S) 2 Aceto 2 hydroxybutanoate
2CPR5P[c]	1_(2_Carboxyphenylamino)_1'_deoxy_D_ribose 5'_phosphate
2DDA7P[c]	2_Dehydro_3_deoxy_D_arabino_heptonate 7_phosphate
2DDG6P[c]	2_Dehydro_3_deoxy_6_phospho_D_gluconate
2DDGLC N[c]	2_Dehydro_3_deoxy_D_gluconate
2DHP[c]	2_Dehydropantoate
2DR1P[c]	2_Deoxy_D_ribose 1_phosphate
2HBUT[c]	2_Hydroxybutyrate
2IPPM[c]	2_Isopropylmaleate

2IPPMAL [c]	(2S)_2_Isopropylmalate
2IPSUCC[c]	(2S)_2_Isopropyl_3_oxosuccinate
2OBUT[c]	2_Oxobutanoate
2PG[c]	2_Phospho_D_glycerate
34HPP[c]	3_(4_Hydroxyphenyl)pyruvate
3DHQ[c]	3_Dehydroquinate
3DHSK[c]	3_Dehydroshikimate
3H3MOB[c]	3_Hydroxy_3_methyl_2_oxobutanoate
3H3MOP[c]	(R)_3_Hydroxy_3_methyl_2_oxopentanoate
3HBCOA[c]	3_Hydroxybutanoyl_CoA
3IG3P[c]	Indoleglycerol phosphate
3IPPMAL [c]	(2R,3S)_3_Isopropylmalate
3MOB[c]	3_Methyl_2_oxobutanoate
3MOP[c]	3_Methyl_2_oxopentanoate
3PG[c]	3_Phospho_D_glycerate
3PHP[c]	3_Phosphonooxypyruvate
3PSME[c]	5_O_(1_Carboxyvinyl)_3_phosphoshikimate
4ABUT[c]	4_Aminobutyrate
4H2KPM[c]	4_Hydroxy_2_ketopimelate
4MOP[c]	4_Methyl_2_oxopentanoate
4PASP[c]	4_Phospho_L_aspartate
4PCYS[c]	N_((R)_Pantothenoyl)_L_cysteine
4PPAN[c]	D_4'_Phosphopantothenate
4PPCYS[c]	(R)_4'_Phosphopantothenoyl_L_cysteine
4R5AU[c]	4_(1_D_Ribitylamino)_5_aminouracil
5AOP[c]	5_Aminolevulinate
5APRBU[c]	5_Amino_6_(5'_phosphoribosylamino)uracil
5APRU[c]	5_Amino_6_(5'_5_Amino_6_(5'_phosphoribitylamino)uracil

5FTHF[c]	5_Formyltetrahydrofolate
5METRIB [c]	5_Methylthio_D_ribose
5MTHF[c]	5_methyltetrahydrofolate
5PRDMB Z[c]	N1_(5_Phospho_alpha_D_ribosyl)_5,6_dimethylbenzimidazole
AC[c]	Acetate
AC[e]	Acetate(Extracellular)
ACACP[c]	Acetyl_[acyl_carrier protein]
ACAL[c]	Acetaldehyde
ACBA[c]	Adenosyl cobinamide
ACBAP[c]	Adenosyl cobinamide phosphate
ACBRND A[c]	Adenosyl cobyrinate a,c diamide
ACBRNH A[c]	Adenosyl cobyrinate hexaamide
ACCOA[c]	Acetyl_CoA
ACETOIN [c]	Acetoin
ACETOIN [e]	Acetoin(Extracellular)
ACETON E[c]	Acetone
ACETON E[e]	Acetone(Extracellular)
ACGAM[e]	N_Acetyl_D_glucosamine(Extracellular)
ACGAM1 P[c]	N_Acetyl_D_glucosamine 1_phosphate
ACGAM6 P[c]	N_Acetyl_D_glucosamine 6_phosphate
ACGLU[c]	N_Acetyl_L_glutamate
ACGLU5 P[c]	N_Acetyl_L_glutamate 5_phosphate
ACGLU5 SA[c]	N_Acetyl_L_glutamate 5_semialdehyde
ACHMS[c]	O_Acetyl_L_homoserine

ACLAC[c]	2_Acetolactate
ACORN[c]	N_Acetylornithine
ACP[c]	Acyl_carrier protein
ACSER[c]	O_Acetyl_L_serine
ACTAC[c]	Acetoacetate
ACTACC OA[c]	Acetoacetyl_CoA
ACTP[c]	Acetyl phosphate
ADE[c]	Adenine
ADHHP[c]	Amino_7,8_dihydro_4_hydroxy_6_(diphosphooxymethyl)pteridin e
ADN[c]	Adenosine
ADP[c]	Adenosine 5'_diphosphate
ADPGLC[c]	ADP_glucose
AGDPCB A[c]	Adenosine_GDP_cobinamide
AHCYS[c]	S_Adenosyl_L_homocysteine
AHHMD HP[c]	2_Amino_4_hydroxy_6_hydroxymethyl_7,8_dihydropteridine
AHTHDH [c]	2_Amino_4_hydroxy_6_(erythro_1,2,3_trihydroxypropyl)dihydro pteridinetriphosphate
AICAR[c]	1_(5'_Phosphoribosyl)_5_amino_4_imidazolecarboxamide
AIR[c]	Aminoimidazole ribotide
AKG[c]	2_Oxoglutarate
AMET[c]	S_adenosyl_L_methionine
AMETA[c]	S_Adenosylmethioninamine
AMP[c]	Adenosine 5'_monophosphate
ANTH[c]	Anthranilate
APROHP[c]	D_1_Aminopropan_2_ol O_phosphate
APS[c]	Adenylyl sulfate
ARBZL[c]	N1_(alpha_D_ribose)_5,6_dimethylbenzimidazole
ARBZL5P [c]	N1_(5_Phospho_alpha_D_ribose)_5,6_dimethylbenzimidazole

ARGSUC[c]	N_(L_Arginino)succinate
ASPSA[c]	L_Aspartate 4_semialdehyde
ATP[c]	Adenosine 5'_triphosphate
bALA[c]	beta_Alanine
bDG1P[c]	beta_D_Glucose 1_phosphate
bDG6P[c]	beta_D_Glucose 6_phosphate
bDGLC[c]	beta_D_Glucose
bDGLC[e]	beta_D_Glucose(Extracellular)
BU[c]	Butyrate
BU[e]	Butyrate(Extracellular)
BUAL[c]	Butyraldehyde
BUCOA[c]	Butyryl_CoA
BUOH[c]	1_Butanol
BUOH[e]	1_Butanol(Extracellular)
BUP[c]	Butyryl phosphate
C140_AC P[c]	C14:0_[acyl_carrier protein]
C160_AC P[c]	C16:0_[acyl_carrier protein]
C161_AC P[c]	C16:1_[acyl_carrier protein]
C17CYC_ ACP[c]	C17:cyclic_[acyl_carrier protein]
C180_AC P[c]	C18:0_[acyl_carrier protein]
C181_AC P[c]	C18:1_[acyl_carrier protein]
C19CYC_ ACP[c]	C19:cyclic_[acyl_carrier protein]
CACO[c]	Cobamide coenzyme
CARBO[c]	Carbohydrate
CBASP[c]	N_Carbamoyl_L_aspartate
CBP[c]	Carbamoyl phosphate
CBRN[c]	Cobyrinate

CBRNDA [c]	Cob(II)yrinate a,c diamide
CDHPRC R6[c]	Cobalt_precorrin 6B
CDL[c]	Cardiolipin
CDP[c]	Cytidine 5'_diphosphate
CDP_DA G[c]	CDP_Diacylglycerol
CDPMER Y2P[c]	2_Phospho_4_(cytidine 5'_diphospho)_2_C_methyl_D_erythritol
CDPMER YTH[c]	4_(Cytidine 5'_diphospho)_2_C_methyl_D_erythritol
CDV[c]	Cadverine
CHOR[c]	Chorismate
CIT[c]	Citrate
CLB[e]	Cellobiose(Extracellular)
CMP[c]	Cytidine_5'_monophosphate
CO2[c]	Carbon dioxide
CO2[e]	Carbon dioxide(Extracellular)
COA[c]	Coenzyme A
COBALT[c]	Cobalt ion
CORR[c]	Corrinoid
CPPPG3[c]	Coproporphyrinogen III
CPRCR2[c]	Cobalt_precorrin 2
CPRCR3[c]	Cobalt_precorrin 3
CPRCR4[c]	Cobalt_precorrin 4
CPRCR5A [c]	Cobalt_precorrin 5A
CPRCR5B [c]	Cobalt_precorrin 5B
CPRCR6[c]	Cobalt_precorrin 6
CPRCR7[c]	Cobalt_precorrin 7
CPRCR8[c]	Cobalt_precorrin 8

CRTCOA[c]	Crotonoyl_CoA
CTP[c]	Cytidine 5'_triphosphate
CYST[c]	Cystathionine
dADN[c]	Deoxyadenosine
dADP[c]	2'_Deoxyadenosine 5'_diphosphate
DALA[c]	D_Alanine
DALADA LA[c]	D_Alanyl_D_Alanine
dAMP[c]	2'_Deoxyadenosine 5'_phosphate
DAPTP[c]	2,5_Diaminopyrimidine nucleosidetriphosphate
DATHAO [c]	2,5_Diamino_6_(5'_triphosphoryl_3',4'_trihydroxy_2'_oxopentyl) _amino_4_oxopyrimidine
dATP[c]	2'_Deoxyadenosine 5'_triphosphate
DB4P[c]	3,4_Dihydroxy_2_butanone 4_phosphate
DCAMP[c]	N6_(1,2_Dicarboxyethyl)_AMP
dCDP[c]	2'_Deoxycytidine 5'_diphosphate
dCMP[c]	2'_Deoxycytidine 5'_monophosphate
dCTP[c]	2'_Deoxycytidine 5'_triphosphate
dGDP[c]	2'_Deoxyguanosine 5'_diphosphate
DGLU[c]	D_Glutamate
dGTP[c]	2'_Deoxyguanosine 5'_triphosphate
DHAP[c]	Dihydroxyacetone phosphate
DHF[c]	Dihydrofolate
DHNP[c]	2_Amino_4_hydroxy_6_(D_erythro_1,2,3_trihydroxypropyl)_7,8 _dihydropteridine
DHNPP[c]	Dihydroneopterin phosphate
DHOR_S[c]	(S)_Dihydroorotate
DHPT[c]	Dihydropteroate
dINS[c]	Deoxyinosine
DMBZID[c]	Dimethylbenzimidazole
DMLZ[c]	6,7_Dimethyl_8_(1_D_ribityl)lumazine

DMMOH COA[c]	2,6_Dimethyl_5_methylene_3_oxo_heptanoyl_CoA
DMPP[c]	Dimethylallyl diphosphate
DNA[c]	DNA
DNAD[c]	Deamino_NAD+
DPCOA[c]	Dephospho_CoA
DPHE[c]	D_Phenylalanine
DRIB[c]	D_Ribose
DRU5P[c]	D_Ribulose 5_phosphate
dTDP[c]	Deoxythymidine 5'_diphosphate
dTMP[c]	Deoxythymidine 5'_phosphate
dTTP[c]	Deoxythymidine 5'_triphosphate
dUDP[c]	2'_Deoxyuridine 5'_diphosphate
dUMP[c]	2'_Deoxyuridine 5'_phosphate
dUTP[c]	2'_Deoxycytidine 5'_triphosphate
DXU5P[c]	D_Xylulose 5_phosphate
DXYL[c]	D_Xylose
DXYL[e]	D_Xylose(Extracellular)
DXYLU[c]	D_Xylulose
dXYLU5P [c]	1_Deoxy_D_xylulose 5_phosphate
E4P[c]	D_Erythrose 4_phosphate
EIG3P[c]	D_erythro_1_(Imidazol_4_yl)glycerol3_phosphate
ETOH[c]	Ethanol
ETOH[e]	Ethanol(Extracellular)
F1P[c]	D_Fructose 1_phosphate
F6P[c]	beta_D_Fructose 6_phosphate
FAD[c]	Flavin adenine dinucleotide
FATP[c]	Formamidopyrimidine nucleoside triphosphate
Fd_Ox[c]	Oxidized ferredoxin
Fd_Red[c]	Reduced ferredoxin
FDP[c]	beta_D_Fructose 1,6_bisphosphate
Fe2[c]	Ferrous ion

FGAM[c]	2_(Formamido)_N1_(5'_phosphoribosyl)acetamidine
FGAR[c]	5'_Phosphoribosyl_N_formylglycinamide
FMN[c]	Flavin mononucleotide
FOL[c]	Folate
FORM[c]	Formate
FORM[e]	Formate(Extracellular)
FPRICA[c]	1_(5'_Phosphoribosyl)_5_formamido_4_imidazolecarboxamide
FRDP[c]	trans,trans_Farnesyl diphosphate
FRU[c]	D_Fructose
FRU[e]	D_Fructose(Extracellular)
FUM[c]	Fumarate
G1P[c]	alpha_D_Glucose 1_phosphate
G6P[c]	alpha_D_Glucose 6_phosphate
GA3P[c]	D_Glyceraldehyde 3_phosphate
GAL[c]	D_Galactose
GAL[e]	D_Galactose(Extracellular)
GAL1P[c]	alpha_D_Galactose 1_phosphate
GAL6P[c]	D_Galactose 6_phosphate
GAM1P[c]	D_Glucosamine 1_phosphate
GAM6P[c]	D_Glucosamine 6_phosphate
GAR[c]	5'_Phosphoribosylglycinamide
GDP[c]	Guanosine 5'_diphosphate
GDPoRH AM[c]	GDP_4_dehydro_6_deoxy_L_mannose
GDPoRHA M[c]	GDP_6_deoxy_L_mannose
GGRDP[c]	Geranylgeranyl diphosphate
GLC[c]	Alpha_D_glucose
GLC[e]	Alpha_D_glucose(Extracellular)
GLU1SA[c]	L_Glutamate 1_semialdehyde

GLU5P[c]	L_Glutamyl 5_phosphate
GLU5SA[c]	L_Glutamate 5_semialdehyde
GLY[c]	Glycine
GLY[e]	Glycine(Extracellular)
GLYALD[c]	D_Glyceraldehyde
GLYC[c]	Glycerol
GLYC[e]	Glycerol(Extracellular)
GLYC3P[c]	sn_Glycerol 3_phosphate
GLYCAC[c]	D_Glycerate
GLYCAL D[c]	Glycolaldehyde
GLYCAL D[e]	Glycolaldehyde(Extracellular)
Glycogen[c]	Glycogen
GMP[c]	Guanosine 5'_phosphate
GRDP[c]	Geranyl diphosphate
GTH_Ox[c]	Glutathione disulfide
GTH_Red[c]	Glutathione
GTP[c]	Guanosine 5'_triphosphate
GUA[c]	Guanine
H2[c]	Hydrogen
H2[e]	Hydrogen(Extracellular)
H2O2[c]	Hydrogen Peroxide
H2O2[e]	Hydrogen Peroxide(Extracellular)
HCO3[c]	Bicarbonate
HDMHCOA[c]	3_Hydroxy_2,6_dimethyl_5_methylene_heptanoyl_CoA
HETHMP P[c]	2_(alpha_Hydroxyethyl)thiamine diphosphate
HGBRN[c]	Hydrogenobyriate
HIPCOA[c]	2_Hydroxy_4_isopropenylcyclohexane_1_carboxyl_CoA

HISP[c]	L_Histidinol phosphate
HISTD[c]	L_Histidinol
HISTDAL [c]	L_Histidinal
HMB4DP[c]	1_Hydroxy_2_methyl_2_butenyl 4_diphosphate
HMBIL[c]	Hydroxymethylbilane
HOR[c]	Hordenine
HPYR[c]	Hydroxypyruvate
HXAN[c]	Hypoxanthine
ICIT[c]	Isocitrate
IMACP[c]	3_(Imidazol_4_yl)_2_oxopropyl phosphate
IMP[c]	Inosine 5'_monophosphate
INDOLE[c]	Indole
INS[c]	Inosine
IPCHCCO A[c]	4_Isopropenyl_2_oxy_cyclohexanecarboxyl_CoA
IPDP[c]	Isopentenyl diphosphate
LAC[c]	(S)_Lactate
LAC[e]	(S)_Lactate(Extracellular)
LALA[c]	L_Alanine
LALA[e]	L_Alanine(Extracellular)
LARAB[c]	L_Arabinose
LARAB[e]	L_Arabinose(Extracellular)
LARG[c]	L_Arginine
LARG[e]	L_Arginine(Extracellular)
LASN[c]	L_Aspargine
LASN[e]	L_Aspargine(Extracellular)
LASP[c]	L_Aspartate
LASP[e]	L_Aspartate(Extracellular)
LCITR[c]	L_Citrulline
LCTS[e]	Lactose(Extracellular)

LCTS6P[c]	Lactose 6_phosphate
LCYS[c]	L_Cysteine
LCYS[e]	L_Cysteine(Extracellular)
LGLN[c]	L_Glutamine
LGLN[e]	L_Glutamine(Extracellular)
LGLU[c]	L_Glutamate
LGLU[e]	L_Glutamate(Extracellular)
LHCYS[c]	L_Homocysteine
LHIS[c]	L_Histidine
LHIS[e]	L_Histidine(Extracellular)
LHMS[c]	L_Homoserine
LILE[c]	L_Isoleucine
LILE[e]	L_Isoleucine(Extracellular)
LLEU[c]	L_Leucine
LLEU[e]	L_Leucine(Extracellular)
LLYS[c]	L_Lysine
LLYS[e]	L_Lysine(Extracellular)
LMET[c]	L_Methionine
LMET[e]	L_Methionine(Extracellular)
LORN[c]	L_Ornithine
LPHE[c]	L_Phenylalanine
LPHE[e]	L_Phenylalanine(Extracellular)
LPRO[c]	L_Proline
LPRO[e]	L_Proline(Extracellular)
LPSER[c]	O_Phospho_L_serine
LRBL[c]	L_Ribulose
LRU5P[c]	L_Ribulose 5_phosphate
LSER[c]	L_Serine
LSER[e]	L_Serine(Extracellular)
LTHR[c]	L_Threonine
LTHR[e]	L_Threonin(Extracellular)
LTRP[c]	L_Tryptophan

LTRP[e]	L_Tryptophan(Extracellular)
LTYR[c]	L_Tyrosine
LTYR[e]	L_Tyrosine(Extracellular)
LVAL[c]	L_Valine
LVAL[e]	L_Valine(Extracellular)
MAL[c]	(S)_Malate
MAL[e]	(S)_Malate(Extracellular)
MALACP [c]	Malonyl_[acyl_carrier protein]
MALCOA [c]	Malonyl_CoA
MALT[c]	Maltose
MALT[e]	Maltose(Extracellular)
MALT6P[c]	Maltose 6'_phosphate
MAN[e]	D_Mannose(Extracellular)
MAN6P[c]	D_Mannose 6_phosphate
MECORR [c]	Methylcorrinoid
MERYcD P[c]	2_C_Methyl_D_erythritol 2,4_cyclodiphosphate
MERYTH 4P[c]	2_C_Methyl_D_erythritol 4_phosphate
METADN [c]	5'_Methylthioadenosine
METHF[c]	5,10_Methenyltetrahydrofolate
MLHIS[c]	N(pi)_Methyl_L_histidine
MLTHF[c]	5,10_Methylenetetrahydrofolate
MNL[e]	Mannitol(Extracellular)
MNL1P[c]	D_Mannitol 1_phosphate
MTNAL[c]	Myrtenal
MTNOL[c]	Myrtenol
MTYRA M[c]	N_Methyltyramine

N2[c]	Nitrogen
N2[e]	Nitrogen(Extracellular)
NA[c]	Nicotinic acid
NA[e]	Nicotinic acid(Extracellular)
NAD[c]	NAD+
NADH[c]	NADH
NADP[c]	NADP+
NADPH[c]]	NADPH
NAMN[c]	Nicotinate D_ribonucleotide
NAMNs[c]]	Nicotinate D_ribonucleoside
NH3[c]	Ammonium ion
NH3[e]	Ammonium ion(Extracellular)
NMN[c]	Nicotinamide D_ribonucleotide
NO2[c]	Nitrite
NO2[e]	Nitrite(Extracellular)
O2[c]	Oxygen
OAA[c]	Oxaloacetate
OROT[c]	Orotate
OROT5P[c]	Orotidine 5'_phosphate
PA[c]	Phosphatidate
PABA[c]	4_Aminobenzoate
PABA[e]	4_Aminobenzoate(Extracellular)
PAN[c]	Pantetheine
PAN4P[c]	Pantetheine 4'_phosphate
PANT[c]	(R)_Pantoate
PAP[c]	Adenosine 3',5'_bisphosphate
PAPS[c]	3'_Phosphoadenylyl sulfate
PE[c]	Phosphatidylethanolamine
PEP[c]	Phosphoenolpyruvate
PEPTIDO[c]	Peptidoglycan
PG[c]	Phosphatidylglycerol

PGP[c]	Phosphatidylglycerophosphate
PHOM[c]	O_Phospho_L_homoserine
PHPYR[c]	Phenylpyruvate
Pi[c]	Inorganic phosphate
Pi[e]	Inorganic phosphate(Extracellular)
PLIPID[c]	Phospholipid
PNTO[c]	Pantothenate
POLYGP[c]	Polyglycerol phosphate
PPBNG[c]	Porphobilinogen
PPHN[c]	Prephenate
PPi[c]	Pyrophosphate
PPPG9[c]	Protoporphyrinogen IX
PRAIC[c]	1_(5_Phospho_D_ribosyl)_5_amino_4_imidazolecarboxylate
PRAM[c]	5_Phosphoribosylamine
PRAN[c]	N_(5_Phospho_D_ribosyl)anthranilate
PRBAMP[c]	Phosphoribosyl_AMP
PRBATP[c]	Phosphoribosyl_ATP
PRCR2[c]	Precorrin 2
PRCR3B[c]	Precorrin 3B
PRCR4[c]	Precorrin 4
PRCR5[c]	Precorrin 5
PRCR6A[c]	Precorrin 6A
PRCR6B[c]	Precorrin 6B
PRCR8[c]	Precorrin 8
PRFP[c]	5_(5_Phospho_D_ribosylaminofromimino)_1_(5_phosphoribosyl)_imidazole_4_carboxamide
PRLP[c]	N_(5'_5_Phospho_D_1'_ribulosylformimino)_5_amino_1_(5''_phospho_D_ribosyl)_4_imidazolecarboxamide
PROCOA[c]	Propionyl_CoA
ProDS[c]	Protein disulfide

ProDTH[c]	Protein dithiol
PROP[c]	Propionate
PROP[e]	Propionate(Extracellular)
PROPP[c]	Propionyl phosphate
PROTEIN [c]	Protein
PRPP[c]	5_Phospho_alpha_D_ribose 1_diphosphate
PS[c]	Phosphatidylserine
PTRC[c]	Putrecine
PYR[c]	Pyruvate
PYR[e]	Pyruvate(Extracellular)
QULN[c]	Pyridine_2,3_dicarboxylate
R1P[c]	D_Ribose 1_phosphate
R5P[c]	D_Ribose 5_phosphate
RHCYS[c]	S_(5_deoxy_D_ribos_5_yl)_L_homocysteine
RIBFLA[c]	Riboflavin
RNA[c]	RNA
S[c]	Sulfide
S7P[c]	D_Sedoheptulose 7_phosphate
SAICAR[c]	1_(5'_Phosphoribosyl)_5_amino_4_(N_succinocarboxamide)_imi dazole
SHCL[c]	Sirohydrochlorin
SHEME[c]	Siroheme
SKM[c]	Shikimate
SKM3P[c]	Shikimate 3_phosphate
SL26DA[c]	N_Succinyl_LL_2,6_diaminoheptanedioate
SL2A6O[c]	N_Succinyl_2_L_amino_6_oxoheptanedioate
SO3[c]	Sulfite
SO4[c]	Sulfate
SO4[e]	Sulfate(Extracellular)
SPERMD[c]	Spermidine

SUC6P[c]	Sucrose 6_phosphate
SUCC[c]	Succinate
SUCCOA[c]	Succinyl_CoA
SUCCSA[c]	Succinate semialdehyde
SUCHMS[c]	O_Succinyl_L_homoserine
SUCR[e]	Sucrose(Extracellular)
TAG6P[c]	D_Tagatose 6_phosphate
TAGDP[c]	D_Tagatose 1,6_bisphosphate
TDPDHd GLC[c]	dTDP_4_dehydro_6_deoxy_alpha_D_glucose
TDPGAL[c]	dTDP_galactose
TDPGLC[c]	dTDP_glucose
TDPoRH AM[c]	dTDP_4_dehydro_6_deoxy_L_mannose
TDPRHA M[c]	dTDP_6_deoxy_L_mannose
TEICH[c]	Teichoic acid
THDP[c]	2,3,4,5_Tetrahydrodipicolinate
THF[c]	Tetrahydrofolate
THMPP[c]	Thiamin pyrophosphate
TRACE[c]	Trace components
TRD_Ox[c]	Oxidized thioredoxin
TRD_Red[c]	Reduced thioredoxin
UACCG[c]	UDP_N_acetyl_3_(1_carboxyvinyl)_D_glucosamine
UACGAM [c]	UDP_N_acetyl_D_glucosamine
UAMR[c]	UDP_N_acetylmuramate
UDCPDP[c]	Undecaprenyl diphosphate
UDP[c]	Uridine 5'_diphosphate
UDPGAL[UDP_D_galactose

c]	
UDPGLC[c]	UDP_D_glucose
UMP[c]	Uridine 5'_monophosphate
UPPG3[c]	Uroporphyrinogen III
UREA[c]	Urea
UREA[e]	Urea(e)
UTP[c]	Uridine 5'_triphosphate
XAN[c]	Xanthine
XANT[c]	Xanthosine
XMP[c]	Xanthosine 5'_phosphate
XOL[c]	Xylitol

Tabela 17 – Reações do modelo completo da *C. acetobutylicum* (LEE *et al.*, 2008).

Reação	Fórmula
EX GLC	GLC[e] <=>
GLCpts	GLC[e] + PEP[c] -> G6P[c] + PYR[c]
EX FRU	FRU[e] <=>
FRUpts	FRU[e] + PEP[c] -> F1P[c] + PYR[c]
EX MNL	MNL[e] <=>
MNLpts	MNL[e] + PEP[c] -> MNL1P[c] + PYR[c]
EX MAN	MAN[e] <=>
MANpts	MAN[e] + PEP[c] -> MAN6P[c] + PYR[c]
EX LACT	LCTS[e] <=>
LACTpts	LCTS[e] + PEP[c] -> LCTS6P[c] + PYR[c]
EX SUCR	SUCR[e] <=>
SUCRpts	PEP[c] + SUCR[e] -> PYR[c] + SUC6P[c]
EX MALT	MALT[e] <=>
MALTpts	MALT[e] + PEP[c] -> MALT6P[c] + PYR[c]
EX ACGAM	ACGAM[e] <=>
ACGAMpts	ACGAM[e] + PEP[c] -> ACGAM6P[c] + PYR[c]
EX XYL	DXYL[e] <=>
XYLt	DXYL[e] <=> DXYL[c]

EX ARAB	LARAB[e] <=>
ARABt	LARAB[e] <=> LARAB[c]
EX GAL	GAL[e] <=>
GALt	GAL[e] <=> GAL[c]
EX NO2	NO2[e] <=>
NO2t	NO2[e] -> NO2[c]
EX N2	N2[e] <=>
N2t	N2[e] -> N2[c]
EX CO2	CO2[e] <=>
CO2t	CO2[e] <=> CO2[c]
EX H2	H2[e] <=>
H2t	H2[c] -> H2[e]
EX NH3	NH3[e] <=>
NH3t	NH3[e] -> NH3[c]
EX ETOH	ETOH[e] <=>
ETOHt	ETOH[c] -> ETOH[e]
EX BUOH	BUOH[e] <=>
BUOHt	BUOH[c] -> BUOH[e]
EX ACETONE	ACETONE[e] <=>
ACETONEt	ACETONE[c] -> ACETONE[e]
EX ACETOIN	ACETOIN[e] <=>
ACETOINt	ACETOIN[c] -> ACETOIN[e]
EX SULFATE	SO4[e] <=>
SULFATEt	ATP[c] + SO4[e] -> ADP[c] + Pi[c] + SO4[c]
EX Pi	Pi[e] <=>
Pit	Pi[e] -> Pi[c]
Piabc	ATP[c] + Pi[e] -> ADP[c] + 2 Pi[c]
EX GLY	GLY[e] <=>
GLYt	GLY[e] <=> GLY[c]
EX LALA	LALA[e] <=>
LALAt	LALA[e] <=> LALA[c]

EX LVAL	LVAL[e] <=>
LVALt	LVAL[e] <=> LVAL[c]
EX LLEU	LLEU[e] <=>
LLEUt	LLEU[e] <=> LLEU[c]
EX LILE	LILE[e] <=>
LILEt	LILE[e] <=> LILE[c]
EX LGLU	LGLU[e] <=>
LGLUt	LGLU[e] <=> LGLU[c]
EX LGLN	LGLN[e] <=>
LGLNt	LGLN[e] <=> LGLN[c]
EX LMET	LMET[e] <=>
LMETt	LMET[e] <=> LMET[c]
EX LCYS	LCYS[e] <=>
LCYSt	LCYS[e] <=> LCYS[c]
EX LASP	LASP[e] <=>
LASPt	LASP[e] <=> LASP[c]
EX LASN	LASN[e] <=>
LASNt	LASN[e] <=> LASN[c]
EX LPRO	LPRO[e] <=>
LPROt	LPRO[e] <=> LPRO[c]
EX LTRP	LTRP[e] <=>
LTRPt	LTRP[e] <=> LTRP[c]
EX LTYR	LTyr[e] <=>
LTyr t	LTyr[e] <=> LTyr[c]
EX LHis	LHis[e] <=>
LHis t	LHis[e] <=> LHis[c]
EX LPHE	LPHE[e] <=>
LPHEt	LPHE[e] <=> LPHE[c]
EX Lser	Lser[e] <=>
Lser t	Lser[e] <=> Lser[c]
EX LThr	LThr[e] <=>
LThr t	LThr[e] <=> LThr[c]
EX Llys	Llys[e] <=>

LLYSt	LLYS[e] \Leftrightarrow LLYS[c]
EX LARG	LARG[e] \Leftrightarrow
LARGt	LARG[e] \Leftrightarrow LARG[c]
LALAabc	ATP[c] + LALA[e] \rightarrow ADP[c] + LALA[c] + Pi[c]
LVALabc	ATP[c] + LVAL[e] \rightarrow ADP[c] + LVAL[c] + Pi[c]
LTHRabc	ATP[c] + LTHR[e] \rightarrow ADP[c] + LTHR[c] + Pi[c]
LCYSabc	ATP[c] + LCYS[e] \rightarrow ADP[c] + LCYS[c] + Pi[c]
LILEabc	ATP[c] + LILE[e] \rightarrow ADP[c] + LILE[c] + Pi[c]
LASNabc	ATP[c] + LASN[e] \rightarrow ADP[c] + LASN[c] + Pi[c]
LASPabc	ATP[c] + LASP[e] \rightarrow ADP[c] + LASP[c] + Pi[c]
LGLNabc	ATP[c] + LGLN[e] \rightarrow ADP[c] + LGLN[c] + Pi[c]
LGLUabc	ATP[c] + LGLU[e] \rightarrow ADP[c] + LGLU[c] + Pi[c]
LARGabc	ATP[c] + LARG[e] \rightarrow ADP[c] + LARG[c] + Pi[c]
LHISabc	ATP[c] + LHIS[e] \rightarrow ADP[c] + LHIS[c] + Pi[c]
LLYSabc	ATP[c] + LLYS[e] \rightarrow ADP[c] + LLYS[c] + Pi[c]
LPROabc	ATP[c] + LPRO[e] \rightarrow ADP[c] + LPRO[c] + Pi[c]
LMETabc	ATP[c] + LMET[e] \rightarrow ADP[c] + LMET[c] + Pi[c]
EX AC	AC[e] \Leftrightarrow
ACt	AC[c] \Leftrightarrow AC[e]
EX BU	BU[e] \Leftrightarrow
BUt	BU[c] \Leftrightarrow BU[e]
EX PROP	PROP[e] \Leftrightarrow
PROPt	PROP[c] \Leftrightarrow PROP[e]
EX MAL	MAL[e] \Leftrightarrow
MALt	MAL[c] \Leftrightarrow MAL[e]
EX UREA	UREA[e] \Leftrightarrow
UREAt	UREA[c] \rightarrow UREA[e]
EX NA	NA[e] \Leftrightarrow
NAt	NA[c] \Leftrightarrow NA[e]
EX LAC	LAC[e] \Leftrightarrow
LACt	LAC[c] \Leftrightarrow LAC[e]
EX PYR	PYR[e] \Leftrightarrow

PYRt	PYR[c] \Leftrightarrow PYR[e]
EX	
GLYCALD	GLYCALD[e] \Leftrightarrow
GLYCALDt	GLYCALD[c] \rightarrow GLYCALD[e]
EX PABA	PABA[e] \Leftrightarrow
PABA t	PABA[e] \rightarrow PABA[c]
EX GLYC	GLYC[e] \Leftrightarrow
GLYCt	GLYC[c] \Leftrightarrow GLYC[e]
EX FORM	FORM[e] \Leftrightarrow
FORMt	FORM[c] \Leftrightarrow FORM[e]
bDGLC	bDGLC[e] \Leftrightarrow GLC[e]
HCO3	CO2[c] \Leftrightarrow HCO3[c]
EX H2O2	H2O2[e] \Leftrightarrow
H2O2t	H2O2[c] \Leftrightarrow H2O2[e]
PPi	PPi[c] \rightarrow 2 Pi[c]
ATP	ATP[c] \rightarrow ADP[c] + Pi[c]
EMP1	ADP[c] + bDG6P[c] \Leftrightarrow ATP[c] + bDGLC[c]
EMP2	bDGLC[c] \Leftrightarrow GLC[c]
EMP3	ATP[c] + GLC[c] \Leftrightarrow ADP[c] + G6P[c]
EMP4	G6P[c] \Leftrightarrow F6P[c]
EMP5	bDG6P[c] \Leftrightarrow F6P[c]
EMP6	ATP[c] + F6P[c] \rightarrow ADP[c] + FDP[c]
EMP7	FDP[c] \rightarrow F6P[c] + Pi[c]
EMP8	FDP[c] \rightarrow DHAP[c] + GA3P[c]
EMP9	DHAP[c] \Leftrightarrow GA3P[c]
EMP10	GA3P[c] + NAD[c] + Pi[c] \Leftrightarrow 13DPG[c] + NADH[c]
EMP11	13DPG[c] + ADP[c] \Leftrightarrow 3PG[c] + ATP[c]
EMP12	13DPG[c] \rightarrow 3PG[c] + Pi[c]
EMP13	3PG[c] \Leftrightarrow 2PG[c]
EMP14	2PG[c] \Leftrightarrow PEP[c]
EMP15	ADP[c] + PEP[c] \rightarrow ATP[c] + PYR[c]
EMP16	NADH[c] + PYR[c] \Leftrightarrow LAC[c] + NAD[c]
EMP17	COA[c] + Fd_Ox[c] + PYR[c] \rightarrow ACCOA[c] + CO2[c] + Fd_Red[c]

EMP18	$\text{Fd_Red}[c] + \text{NAD}[c] \rightleftharpoons \text{Fd_Ox}[c] + \text{NADH}[c]$
EMP19	$\text{Fd_Red}[c] + \text{NADP}[c] \rightarrow \text{Fd_Ox}[c] + \text{NADPH}[c]$
EMP20	$\text{Fd_Red}[c] \rightarrow \text{Fd_Ox}[c] + \text{H}_2[c]$
PROPAN1	$2\text{HBUT}[c] + \text{NAD}[c] \rightleftharpoons 2\text{OBUT}[c] + \text{NADH}[c]$
PROPAN2	$2\text{OBUT}[c] + \text{COA}[c] \rightarrow \text{FORM}[c] + \text{PROCOA}[c]$
PROPAN3	$\text{Pi}[c] + \text{PROCOA}[c] \rightarrow \text{COA}[c] + \text{PROPP}[c]$
PROPAN4	$\text{ADP}[c] + \text{PROPP}[c] \rightarrow \text{ATP}[c] + \text{PROP}[c]$
BUTAN1	$\text{ACCOA}[c] + \text{NADH}[c] \rightleftharpoons \text{ACAL}[c] + \text{COA}[c] + \text{NAD}[c]$
BUTAN2	$\text{ACAL}[c] + \text{NADH}[c] \rightleftharpoons \text{ETOH}[c] + \text{NAD}[c]$
BUTAN3	$\text{ACCOA}[c] + \text{Pi}[c] \rightleftharpoons \text{ACTP}[c] + \text{COA}[c]$
BUTAN4	$\text{ACTP}[c] + \text{ADP}[c] \rightleftharpoons \text{AC}[c] + \text{ATP}[c]$
BUTAN5	$2 \text{ACCOA}[c] \rightarrow \text{ACTACCOA}[c] + \text{COA}[c]$
BUTAN6	$\text{ACTACCOA}[c] + \text{NADH}[c] \rightarrow 3\text{HBCOA}[c] + \text{NAD}[c]$
BUTAN7	$3\text{HBCOA}[c] \rightarrow \text{CRTCOA}[c]$
BUTAN8	$\text{CRTCOA}[c] + \text{Fd_Ox}[c] + 2 \text{NADH}[c] \rightarrow \text{BUCOA}[c] + \text{Fd_Red}[c] + 2 \text{NAD}[c]$
BUTAN9	$\text{BUCOA}[c] + \text{Pi}[c] \rightarrow \text{BUP}[c] + \text{COA}[c]$
BUTAN10	$\text{ADP}[c] + \text{BUP}[c] \rightarrow \text{ATP}[c] + \text{BU}[c]$
BUTAN11	$\text{BUCOA}[c] + \text{NADH}[c] \rightleftharpoons \text{BUAL}[c] + \text{COA}[c] + \text{NAD}[c]$
BUTAN12	$\text{BUAL}[c] + \text{NADH}[c] \rightleftharpoons \text{BUOH}[c] + \text{NAD}[c]$
BUTAN13	$\text{ACTAC}[c] \rightarrow \text{ACETONE}[c] + \text{CO}_2[c]$
BUTAN14	$\text{PYR}[c] + \text{THMPP}[c] \rightarrow \text{CO}_2[c] + \text{HETHMPP}[c]$
BUTAN15	$\text{HETHMPP}[c] + \text{PYR}[c] \rightarrow \text{ACLAC}[c] + \text{THMPP}[c]$
BUTAN16	$\text{ACLAC}[c] \rightarrow \text{ACETOIN}[c] + \text{CO}_2[c]$
BUTAN17	$\text{AC}[c] + \text{ACTACCOA}[c] \rightarrow \text{ACCOA}[c] + \text{ACTAC}[c]$
BUTAN18	$\text{ACTACCOA}[c] + \text{BU}[c] \rightarrow \text{ACTAC}[c] + \text{BUCOA}[c]$
TCA1	$\text{ATP}[c] + \text{HCO}_3[c] + \text{PYR}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{OAA}[c] + \text{Pi}[c]$
TCA2	$\text{NADH}[c] + \text{OAA}[c] \rightleftharpoons \text{MAL}[c] + \text{NAD}[c]$
TCA3	$\text{MAL}[c] \rightleftharpoons \text{FUM}[c]$
TCA4	$\text{Fd_Red}[c] + \text{FUM}[c] \rightleftharpoons \text{Fd_Ox}[c] + \text{SUCC}[c]$
TCA5	$\text{ACTACCOA}[c] + \text{SUCC}[c] \rightarrow \text{ACTAC}[c] + \text{SUCCOA}[c]$
TCA6	$\text{CIT}[c] \rightleftharpoons \text{ICIT}[c]$

TCA7	$\text{ICIT}[c] + \text{NAD}[c] \Leftrightarrow \text{AKG}[c] + \text{CO}_2[c] + \text{NADH}[c]$
TCA8	$\text{AKG}[c] + \text{COA}[c] + \text{Fd_Ox}[c] \Leftrightarrow \text{CO}_2[c] + \text{Fd_Red}[c] + \text{SUCCOA}[c]$
PPP1	$\text{F6P}[c] + \text{GA3P}[c] \Leftrightarrow \text{DXU5P}[c] + \text{E4P}[c]$
PPP2	$\text{DXU5P}[c] \Leftrightarrow \text{DRU5P}[c]$
PPP3	$\text{R5P}[c] \Leftrightarrow \text{DRU5P}[c]$
PPP4	$\text{DXU5P}[c] + \text{R5P}[c] \Leftrightarrow \text{GA3P}[c] + \text{S7P}[c]$
PPP5	$\text{GA3P}[c] + \text{S7P}[c] \Leftrightarrow \text{E4P}[c] + \text{F6P}[c]$
PPP6	$\text{ATP}[c] + \text{R5P}[c] \rightarrow \text{AMP}[c] + \text{PRPP}[c]$
PPP7	$2\text{DDGLCN}[c] + \text{ATP}[c] \rightarrow 2\text{DDG6P}[c] + \text{ADP}[c]$
PPP8	$2\text{DDG6P}[c] \Leftrightarrow \text{GA3P}[c] + \text{PYR}[c]$
PPP9	$\text{ATP}[c] + \text{DRIB}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{R5P}[c]$
PPP10	$\text{R5P}[c] \Leftrightarrow \text{R1P}[c]$
PI1	$\text{DXYL}[c] + \text{NADPH}[c] \Leftrightarrow \text{NADP}[c] + \text{XOL}[c]$
PI1 2	$\text{NAD}[c] + \text{XOL}[c] \Leftrightarrow \text{DXYLU}[c] + \text{NADH}[c]$
PI2	$\text{ATP}[c] + \text{DXYLU}[c] \Leftrightarrow \text{ADP}[c] + \text{DXU5P}[c]$
PI3	$\text{LARAB}[c] \Leftrightarrow \text{LRBL}[c]$
PI4	$\text{ATP}[c] + \text{LRBL}[c] \Leftrightarrow \text{ADP}[c] + \text{LRU5P}[c]$
PI5	$\text{LRU5P}[c] \Leftrightarrow \text{DXU5P}[c]$
FM1	$\text{ATP}[c] + \text{F1P}[c] \Leftrightarrow \text{ADP}[c] + \text{FDP}[c]$
FM2	$\text{F1P}[c] \rightarrow \text{DHAP}[c] + \text{GLYALD}[c]$
FM3	$\text{MNL1P}[c] + \text{NAD}[c] \Leftrightarrow \text{F6P}[c] + \text{NADH}[c]$
FM4	$\text{MAN6P}[c] \Leftrightarrow \text{F6P}[c]$
FM5	$\text{ATP}[c] + \text{FRU}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{F6P}[c]$
GAL1	$\text{LCTS6P}[c] \Leftrightarrow \text{GAL6P}[c] + \text{GLC}[c]$
GAL2	$\text{GAL6P}[c] \Leftrightarrow \text{TAG6P}[c]$
GAL3	$\text{ATP}[c] + \text{TAG6P}[c] \Leftrightarrow \text{ADP}[c] + \text{TAGDP}[c]$
GAL4	$\text{TAGDP}[c] \Leftrightarrow \text{DHAP}[c] + \text{GA3P}[c]$
GAL5	$\text{ATP}[c] + \text{GAL}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{GAL1P}[c]$
GAL6	$\text{GAL1P}[c] + \text{UDPGLC}[c] \Leftrightarrow \text{G1P}[c] + \text{UDPGAL}[c]$
GAL7	$\text{UDPGAL}[c] \Leftrightarrow \text{UDPGLC}[c]$
GAL8	$\text{G1P}[c] + \text{UTP}[c] \rightarrow \text{PPi}[c] + \text{UDPGLC}[c]$
GAL9	$\text{G1P}[c] \Leftrightarrow \text{G6P}[c]$

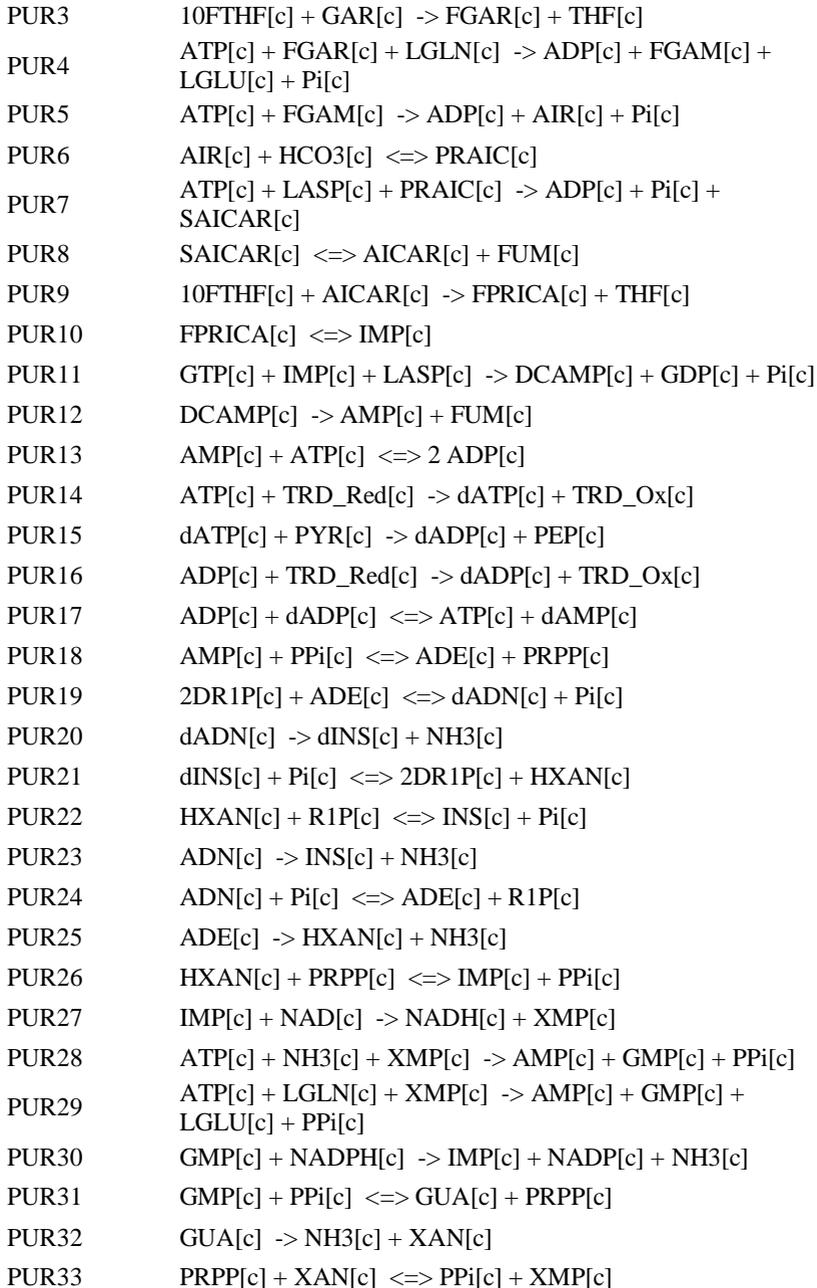
SUCR1	$\text{SUC6P[c]} \rightarrow \text{FRU[c]} + \text{G6P[c]}$
SUCR2	$\text{MALT6P[c]} \rightarrow \text{G6P[c]} + \text{GLC[c]}$
SUCR3	$\text{MALT[c]} \rightarrow 2 \text{GLC[c]}$
SUCR4	$\text{MALT[c]} + \text{Pi[c]} \rightarrow \text{bDG1P[c]} + \text{bDGLC[c]}$
SUCR5	$\text{bDG1P[c]} \Leftrightarrow \text{bDG6P[c]}$
SUCR6	$\text{ATP[c]} + \text{G1P[c]} \rightarrow \text{ADPGLC[c]} + \text{PPi[c]}$
SUCR7	$\text{ADPGLC[c]} \rightarrow \text{ADP[c]} + \text{Glycogen[c]}$
SUCR8	$\text{Glycogen[c]} + \text{Pi[c]} \rightarrow \text{G1P[c]}$
SUCR9	$\text{CLB[e]} \rightarrow 2 \text{bDGLC[e]}$
EX CLB	$\text{CLB[e]} \Leftrightarrow$
AMSU1	$\text{F6P[c]} + \text{LGLN[c]} \rightarrow \text{GAM6P[c]} + \text{LGLU[c]}$
AMSU2	$\text{F6P[c]} + \text{NH}_3[\text{c}] \Leftrightarrow \text{GAM6P[c]}$
AMSU3	$\text{AC[c]} + \text{GAM6P[c]} \Leftrightarrow \text{ACGAM6P[c]}$
AMSU4	$\text{GAM6P[c]} \rightarrow \text{GAM1P[c]}$
AMSU5	$\text{ACCOA[c]} + \text{GAM1P[c]} \rightarrow \text{ACGAM1P[c]} + \text{COA[c]}$
AMSU6	$\text{ACGAM1P[c]} + \text{UTP[c]} \Leftrightarrow \text{PPi[c]} + \text{UACGAM[c]}$
AMSU7	$\text{PEP[c]} + \text{UACGAM[c]} \Leftrightarrow \text{Pi[c]} + \text{UACCG[c]}$
AMSU8	$\text{NADPH[c]} + \text{UACCG[c]} \rightarrow \text{NADP[c]} + \text{UAMR[c]}$
NUSU1	$\text{dTTP[c]} + \text{G1P[c]} \rightarrow \text{PPi[c]} + \text{TDPGLC[c]}$
NUSU2	$\text{TDPGLC[c]} \Leftrightarrow \text{TDPGAL[c]}$
NUSU3	$\text{TDPGLC[c]} \rightarrow \text{TDPDHdGLC[c]}$
NUSU4	$\text{TDPDHdGLC[c]} \rightarrow \text{GDPoRHAM[c]}$
NUSU5	$\text{TDPDHdGLC[c]} \rightarrow \text{TDPoRHAM[c]}$
NUSU6	$\text{GDPoRHAM[c]} + \text{NADPH[c]} \rightarrow \text{GDPRHAM[c]} + \text{NADP[c]}$
NUSU7	$\text{NADPH[c]} + \text{TDPoRHAM[c]} \rightarrow \text{NADP[c]} + \text{TDPRHAM[c]}$
PYR1	$\text{ATP[c]} + \text{PYR[c]} \rightarrow \text{AMP[c]} + \text{PEP[c]} + \text{Pi[c]}$
PYR2	$\text{MAL[c]} + \text{NAD[c]} \rightarrow \text{CO}_2[\text{c}] + \text{NADH[c]} + \text{PYR[c]}$
PYR3	$\text{MAL[c]} + \text{NADP[c]} \rightarrow \text{CO}_2[\text{c}] + \text{NADPH[c]} + \text{PYR[c]}$
PYR4	$\text{ACCOA[c]} + \text{ATP[c]} + \text{HCO}_3[\text{c}] \Leftrightarrow \text{ADP[c]} + \text{MALCOA[c]} + \text{Pi[c]}$
PYR5	$\text{3MOB[c]} + \text{ACCOA[c]} \rightarrow \text{2IPPMAL[c]} + \text{COA[c]}$
PYR6	$\text{COA[c]} + \text{PYR[c]} \rightarrow \text{ACCOA[c]} + \text{FORM[c]}$

METHANE1	$\text{CO}_2[\text{c}] + \text{MECORR}[\text{c}] \rightarrow \text{ACCOA}[\text{c}] + \text{CORR}[\text{c}]$
NITROGEN1	$6 \text{Fd_Red}[\text{c}] + \text{NO}_2[\text{c}] \rightarrow 6 \text{Fd_Ox}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}]$
NITROGEN2	$16 \text{ATP}[\text{c}] + 8 \text{Fd_Red}[\text{c}] + \text{N}_2[\text{c}] \rightarrow 16 \text{ADP}[\text{c}] + 8 \text{Fd_Ox}[\text{c}] + \text{H}_2[\text{c}] + 2 \text{NH}_3[\text{c}] + 16 \text{Pi}[\text{c}]$
NITROGEN3	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}] \rightarrow \text{ADP}[\text{c}] + \text{LGLN}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}]$
NITROGEN4	$\text{AKG}[\text{c}] + \text{LGLN}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] \rightarrow 2 \text{LGLU}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}]$
NITROGEN5	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{LASP}[\text{c}] + \text{LGLN}[\text{c}] \rightarrow \text{AMP}[\text{c}] + \text{LASN}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] + \text{PPi}[\text{c}]$
NITROGEN6	$\text{AKG}[\text{c}] + \text{NADPH}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}] \rightleftharpoons \text{LGLU}[\text{c}] + \text{NADP}[\text{c}]$
NITROGEN7	$\text{LASP}[\text{c}] \rightarrow \text{FUM}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}]$
NITROGEN8	$\text{LASN}[\text{c}] \rightarrow \text{LASP}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}]$
NITROGEN9	$\text{CYST}[\text{c}] \rightarrow \text{LHCYS}[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}] + \text{PYR}[\text{c}]$
SULFUR1	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{SO}_4[\text{c}] \rightarrow \text{APS}[\text{c}] + \text{PPi}[\text{c}]$
SULFUR2	$\text{APS}[\text{c}] + \text{ATP}[\text{c}] \rightarrow \text{ADP}[\text{c}] + \text{PAPS}[\text{c}]$
SULFUR3	$\text{PAPS}[\text{c}] + \text{TRD_Red}[\text{c}] \rightarrow \text{PAP}[\text{c}] + \text{SO}_3[\text{c}] + \text{TRD_Ox}[\text{c}]$
SULFUR4	$\text{PAP}[\text{c}] \rightarrow \text{AMP}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}]$
SULFUR5	$3 \text{NADPH}[\text{c}] + \text{SO}_3[\text{c}] \rightarrow 3 \text{NADP}[\text{c}] + \text{S}[\text{c}]$
SULFUR6	$\text{ACCOA}[\text{c}] + \text{LSER}[\text{c}] \rightarrow \text{ACSER}[\text{c}] + \text{COA}[\text{c}]$
SULFUR7	$\text{ACSER}[\text{c}] + \text{S}[\text{c}] \rightarrow \text{AC}[\text{c}] + \text{LCYS}[\text{c}]$
SULFUR8	$\text{LHMS}[\text{c}] + \text{SUCCOA}[\text{c}] \rightarrow \text{COA}[\text{c}] + \text{SUCHMS}[\text{c}]$
SULFUR9	$\text{LCYS}[\text{c}] + \text{SUCHMS}[\text{c}] \rightarrow \text{CYST}[\text{c}] + \text{SUCC}[\text{c}]$
GLU1	$\text{AKG}[\text{c}] + \text{LASP}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{LGLU}[\text{c}] + \text{OAA}[\text{c}]$
GLU2	$\text{LGLU}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{DGLU}[\text{c}]$
GLU3	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{DNAD}[\text{c}] + \text{LGLN}[\text{c}] \rightarrow \text{AMP}[\text{c}] + \text{LGLU}[\text{c}] + \text{NAD}[\text{c}] + \text{PPi}[\text{c}]$
GLU4	$4\text{ABUT}[\text{c}] + \text{AKG}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{LGLU}[\text{c}] + \text{SUCCSA}[\text{c}]$
ASPALA1	$\text{ATP}[\text{c}] + \text{LASP}[\text{c}] + \text{LCITR}[\text{c}] \rightarrow \text{AMP}[\text{c}] + \text{ARGSUC}[\text{c}] + \text{PPi}[\text{c}]$
ASPALA2	$\text{ARGSUC}[\text{c}] \rightarrow \text{FUM}[\text{c}] + \text{LARG}[\text{c}]$
ASPALA3	$\text{LASP}[\text{c}] \rightarrow \text{bALA}[\text{c}] + \text{CO}_2[\text{c}]$
ASPALA4	$\text{LGLU}[\text{c}] + \text{PYR}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{AKG}[\text{c}] + \text{LALA}[\text{c}]$
ASPALA5	$\text{LALA}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{DALA}[\text{c}]$
ASPALA6	$\text{LASP}[\text{c}] + \text{O}_2[\text{c}] \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2[\text{c}] + \text{NH}_3[\text{c}] + \text{OAA}[\text{c}]$
ASPALA7	$\text{ATP}[\text{c}] + 2 \text{DALA}[\text{c}] \rightarrow \text{ADP}[\text{c}] + \text{DALADALA}[\text{c}] + \text{Pi}[\text{c}]$
ASPALA8	$\text{DGLU}[\text{c}] + \text{PYR}[\text{c}] \rightleftharpoons \text{AKG}[\text{c}] + \text{DALA}[\text{c}]$

GST1	ATP[c] + LASP[c] -> 4PASP[c] + ADP[c]
GST2	4PASP[c] + NADPH[c] -> ASPSA[c] + NADP[c] + Pi[c]
GST3	ASPSA[c] + NADPH[c] <=> LHMS[c] + NADP[c]
GST4	ATP[c] + LHMS[c] -> ADP[c] + PHOM[c]
GST5	PHOM[c] -> LTHR[c] + Pi[c]
GST6	LTHR[c] <=> ACAL[c] + GLY[c]
GST7	GLY[c] + MLTHF[c] <=> LSER[c] + THF[c]
GST8	LSER[c] -> NH3[c] + PYR[c]
GST9	3PG[c] + NAD[c] -> 3PHP[c] + NADH[c]
GST10	3PHP[c] + LGLU[c] -> AKG[c] + LPSER[c]
GST11	LPSER[c] -> LSER[c] + Pi[c]
GST12	GLYCAC[c] + NAD[c] <=> HPYR[c] + NADH[c]
MET1	SUCHMS[c] <=> 2OBUT[c] + NH3[c] + SUCC[c]
MET2	AC[c] + CYST[c] <=> ACHMS[c] + LCYS[c]
MET3	ACHMS[c] + S[c] -> AC[c] + LHCYS[c]
MET4	S[c] + SUCHMS[c] -> LHCYS[c] + SUCC[c]
MET5	AMET[c] + LHMS[c] -> AHCYS[c] + LMET[c]
MET6	5MTHF[c] + LHCYS[c] -> LMET[c] + THF[c]
MET7	AHCYS[c] -> ADE[c] + RHCYS[c]
MET8	RHCYS[c] -> DRIB[c] + LHCYS[c]
MET9	ATP[c] + LMET[c] -> AMET[c] + Pi[c] + PPi[c]
MET10	AMET[c] -> AMETA[c] + CO2[c]
MET11	AMETA[c] + PTRC[c] -> METADN[c] + SPERMD[c]
MET12	METADN[c] -> 5METRIB[c] + ADE[c]
CYS1	NH3[c] + PYR[c] + S[c] -> LCYS[c]
VLI0	LTHR[c] -> 2OBUT[c] + NH3[c]
VLI1	2OBUT[c] + HETHMPP[c] -> 2AHBUT[c] + THMPP[c]
VLI2	2AHBUT[c] <=> 3H3MOP[c]
VLI3	3H3MOP[c] + NADPH[c] <=> 23DHMP[c] + NADP[c]
VLI4	23DHMP[c] -> 3MOP[c]
VLI5	3MOP[c] + LGLU[c] <=> AKG[c] + LILE[c]
VLI6	ACLAC[c] <=> 3H3MOB[c]

VLI7	$3H3MOB[c] + NADPH[c] \rightleftharpoons 23DHMB[c] + NADP[c]$
VLI8	$23DHMB[c] \rightarrow 3MOB[c]$
VLI9	$3MOB[c] + LGLU[c] \rightleftharpoons AKG[c] + LVAL[c]$
VLI10	$2IPPMAL[c] \rightleftharpoons 2IPPM[c]$
VLI11	$2IPPM[c] \rightleftharpoons 3IPPMAL[c]$
VLI12	$3IPPMAL[c] + NAD[c] \rightleftharpoons 2IPSUCC[c] + NADH[c]$
VLI13	$2IPSUCC[c] \rightarrow 4MOP[c] + CO_2[c]$
VLI14	$4MOP[c] + LGLU[c] \rightleftharpoons AKG[c] + LLEU[c]$
LYS1	$ASPSA[c] + PYR[c] \rightarrow 23DHDP[c]$
LYS2	$23DHDP[c] + NADPH[c] \rightleftharpoons NADP[c] + THDP[c]$
LYS3	$SUCCOA[c] + THDP[c] \rightarrow COA[c] + SL2A6O[c]$
LYS4	$LGLU[c] + SL2A6O[c] \rightleftharpoons AKG[c] + SL26DA[c]$
LYS5	$SL26DA[c] \rightarrow 26DAP_LL[c] + SUCC[c]$
LYS6	$26DAP_LL[c] \rightleftharpoons 26DAP_M[c]$
LYS7	$26DAP_M[c] \rightarrow CO_2[c] + LLYS[c]$
LYS8	$LLYS[c] \rightarrow CDV[c] + CO_2[c]$
PRO1	$ATP[c] + LGLU[c] \rightarrow ADP[c] + GLU5P[c]$
PRO2	$GLU5P[c] + NADPH[c] \rightleftharpoons GLU5SA[c] + NADP[c] + Pi[c]$
PRO3	$GLU5SA[c] \rightleftharpoons 1PYR5C[c]$
PRO4	$1PYR5C[c] + NADPH[c] \rightleftharpoons LPRO[c] + NADP[c]$
PRO5	$AKG[c] + LORN[c] \rightleftharpoons GLU5SA[c] + LGLU[c]$
ARG1	$LARG[c] \rightarrow LORN[c] + UREA[c]$
ARG2	$CBP[c] + LORN[c] \rightleftharpoons LCITR[c] + Pi[c]$
HIS1	$ATP[c] + PRPP[c] \rightarrow PPI[c] + PRBATP[c]$
HIS2	$PRBATP[c] \rightarrow PPI[c] + PRBAMP[c]$
HIS3	$PRBAMP[c] \rightarrow PRFP[c]$
HIS4	$PRFP[c] \rightarrow PRLP[c]$
HIS5	$LGLN[c] + PRLP[c] \rightarrow AICAR[c] + EIG3P[c] + LGLU[c]$
HIS6	$EIG3P[c] \rightarrow IMACP[c]$
HIS7	$IMACP[c] + LGLU[c] \rightleftharpoons AKG[c] + HISP[c]$
HIS8	$HISP[c] \rightarrow HISTD[c] + Pi[c]$
HIS9	$HISTD[c] + NAD[c] \rightarrow HISTDAL[c] + NADH[c]$
HIS10	$HISTDAL[c] + NAD[c] \rightarrow LHis[c] + NADH[c]$

HIS11	AMET[c] + LHIS[c] -> AHCYS[c] + MLHIS[c]
PTT1	E4P[c] + PEP[c] -> 2DDA7P[c] + Pi[c]
PTT2	2DDA7P[c] -> 3DHQ[c] + Pi[c]
PTT3	3DHQ[c] <=> 3DHSK[c]
PTT4	3DHSK[c] + NADPH[c] <=> NADP[c] + SKM[c]
PTT5	ATP[c] + SKM[c] -> ADP[c] + SKM3P[c]
PTT6	PEP[c] + SKM3P[c] <=> 3PSME[c] + Pi[c]
PTT7	3PSME[c] -> CHOR[c] + Pi[c]
PTT8	CHOR[c] + LGLN[c] -> ANTH[c] + LGLU[c] + PYR[c]
PTT9	ANTH[c] + PRPP[c] -> PPI[c] + PRAN[c]
PTT10	PRAN[c] <=> 2CPR5P[c]
PTT11	2CPR5P[c] -> 3IG3P[c] + CO2[c]
PTT12	3IG3P[c] -> GA3P[c] + INDOLE[c]
PTT13	INDOLE[c] + LSER[c] -> LTRP[c]
PTT14	CHOR[c] <=> PPHN[c]
PTT15	PPHN[c] -> CO2[c] + PHPYR[c]
PTT16	LGLU[c] + PHPYR[c] <=> AKG[c] + LPHE[c]
PTT17	DGLU[c] + PHPYR[c] <=> AKG[c] + DPHE[c]
PTT18	NAD[c] + PPHN[c] -> 34HPP[c] + CO2[c] + NADH[c]
PTT19	34HPP[c] + LGLU[c] <=> AKG[c] + LTYR[c]
TYR1	AMET[c] + MTYRAM[c] -> AHCYS[c] + HOR[c]
TYR2	AKG[c] + LTYR[c] <=> 34HPP[c] + LGLU[c]
TYR3	4H2KPM[c] -> PYR[c] + SUCCSA[c]
UREA1	ACCOA[c] + LGLU[c] -> ACGLU[c] + COA[c]
UREA2	ACGLU[c] + ATP[c] -> ACGLU5P[c] + ADP[c]
UREA3	ACGLU5P[c] + NADPH[c] -> ACGLU5SA[c] + NADP[c] + Pi[c]
UREA4	ACGLU5SA[c] + LGLU[c] <=> ACORN[c] + AKG[c]
UREA5	ACORN[c] + LGLU[c] <=> ACGLU[c] + LORN[c]
GTH1	2 GTH_Red[c] + H2O2[c] -> GTH_Ox[c]
PUR1	LGLN[c] + PRPP[c] -> LGLU[c] + PPI[c] + PRAM[c]
PUR2	ATP[c] + GLY[c] + PRAM[c] -> ADP[c] + GAR[c] + Pi[c]



PUR34	$\text{Pi}[c] + \text{XANT}[c] \rightleftharpoons \text{R1P}[c] + \text{XAN}[c]$
PUR35	$\text{ATP}[c] + \text{GMP}[c] \rightleftharpoons \text{ADP}[c] + \text{GDP}[c]$
PUR36	$\text{GDP}[c] + \text{PEP}[c] \rightleftharpoons \text{GTP}[c] + \text{PYR}[c]$
PUR37	$\text{GTP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dGTP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PUR38	$\text{dGTP}[c] + \text{PYR}[c] \rightleftharpoons \text{dGDP}[c] + \text{PEP}[c]$
PUR39	$\text{GDP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dGDP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PYRM1	$2 \text{ATP}[c] + \text{HCO}_3[c] + \text{LGLN}[c] \rightarrow 2 \text{ADP}[c] + \text{CBP}[c] + \text{LGLU}[c] + \text{Pi}[c]$
PYRM2	$\text{CBP}[c] + \text{LASP}[c] \rightarrow \text{CBASP}[c] + \text{Pi}[c]$
PYRM3	$\text{CBASP}[c] \rightleftharpoons \text{DHOR_S}[c]$
PYRM4	$\text{DHOR_S}[c] + \text{NAD}[c] \rightleftharpoons \text{NADH}[c] + \text{OROT}[c]$
PYRM5	$\text{OROT}[c] + \text{PRPP}[c] \rightarrow \text{OROT5P}[c] + \text{PPi}[c]$
PYRM6	$\text{OROT5P}[c] \rightarrow \text{CO}_2[c] + \text{UMP}[c]$
PYRM7	$\text{ATP}[c] + \text{UMP}[c] \rightleftharpoons \text{ADP}[c] + \text{UDP}[c]$
PYRM8	$\text{ATP}[c] + \text{UDP}[c] \rightleftharpoons \text{ADP}[c] + \text{UTP}[c]$
PYRM9	$\text{ATP}[c] + \text{NH}_3[c] + \text{UTP}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{CTP}[c] + \text{Pi}[c]$
PYRM10	$\text{ATP}[c] + \text{LGLN}[c] + \text{UTP}[c] \rightarrow \text{ADP}[c] + \text{CTP}[c] + \text{LGLU}[c] + \text{Pi}[c]$
PYRM11	$\text{CTP}[c] \rightarrow \text{NH}_3[c] + \text{UTP}[c]$
PYRM12	$\text{ADP}[c] + \text{CTP}[c] \rightleftharpoons \text{ATP}[c] + \text{CDP}[c]$
PYRM13	$\text{ADP}[c] + \text{CDP}[c] \rightleftharpoons \text{ATP}[c] + \text{CMP}[c]$
PYRM14	$\text{CTP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dCTP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PYRM15	$\text{CDP}[c] + \text{TRD_Red}[c] \rightarrow \text{dCDP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PYRM16	$\text{NADPH}[c] + \text{TRD_Ox}[c] \rightarrow \text{NADP}[c] + \text{TRD_Red}[c]$
PYRM17	$\text{ADP}[c] + \text{dCTP}[c] \rightleftharpoons \text{ATP}[c] + \text{dCDP}[c]$
PYRM18	$\text{ADP}[c] + \text{dCDP}[c] \rightleftharpoons \text{ATP}[c] + \text{dCMP}[c]$
PYRM19	$\text{dCMP}[c] \rightarrow \text{dUMP}[c] + \text{NH}_3[c]$
PYRM20	$\text{TRD_Red}[c] + \text{UTP}[c] \rightarrow \text{dUTP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$
PYRM21	$\text{dCTP}[c] \rightarrow \text{dUTP}[c] + \text{NH}_3[c]$
PYRM22	$\text{dUTP}[c] \rightarrow \text{dUMP}[c] + \text{PPi}[c]$
PYRM23	$\text{ADP}[c] + \text{dUTP}[c] \rightleftharpoons \text{ATP}[c] + \text{dUDP}[c]$
PYRM24	$\text{ADP}[c] + \text{dUDP}[c] \rightleftharpoons \text{ATP}[c] + \text{dUMP}[c]$
PYRM25	$\text{TRD_Red}[c] + \text{UDP}[c] \rightarrow \text{dUDP}[c] + \text{TRD_Ox}[c]$

PYRM26	$dUMP[c] + MLTHF[c] \rightarrow DHF[c] + dTMP[c]$
PYRM27	$ATP[c] + dTMP[c] \rightleftharpoons ADP[c] + dTDP[c]$
PYRM28	$ATP[c] + dTDP[c] \rightleftharpoons ADP[c] + dTTP[c]$
PL1	$ATP[c] + GLYCAC[c] \rightarrow 3PG[c] + ADP[c]$
PL2	$ATP[c] + GLYC[c] \rightarrow ADP[c] + GLYC3P[c]$
PL3	$0.073 C140_ACP[c] + 0.521 C160_ACP[c] + 0.065 C161_ACP[c] + 0.022 C17CYC_ACP[c] + 0.036 C180_ACP[c] + 0.102 C181_ACP[c] + 0.181 C19CYC_ACP[c] + GLYC3P[c] \rightarrow 1MAG3P[c] + ACP[c]$
PL4	$1MAG3P[c] + 0.073 C140_ACP[c] + 0.521 C160_ACP[c] + 0.065 C161_ACP[c] + 0.022 C17CYC_ACP[c] + 0.036 C180_ACP[c] + 0.102 C181_ACP[c] + 0.181 C19CYC_ACP[c] \rightarrow ACP[c] + PA[c]$
PL5	$12DAG[c] + ATP[c] \rightarrow ADP[c] + PA[c]$
PL6	$GLYC3P[c] + NAD[c] \rightleftharpoons DHAP[c] + NADH[c]$
PL7	$GLYC3P[c] + NADP[c] \rightleftharpoons DHAP[c] + NADPH[c]$
PL8	$CTP[c] + PA[c] \rightarrow CDP_DAG[c] + PPI[c]$
PL9	$CDP_DAG[c] + GLYC3P[c] \rightarrow CMP[c] + PGP[c]$
PL10	$PGP[c] \rightarrow PG[c] + Pi[c]$
PL11	$2 PG[c] \rightarrow CDL[c] + GLYC[c]$
PL12	$CDP_DAG[c] + PG[c] \rightarrow CDL[c] + CMP[c]$
PL13	$CDP_DAG[c] + LSER[c] \rightarrow CMP[c] + PS[c]$
PL14	$PS[c] \rightarrow CO2[c] + PE[c]$
PL15	$12 PG[c] \rightarrow 12 12DAG[c] + POLYGP[c]$
FAS1	$ACCOA[c] + ACP[c] \rightleftharpoons ACACP[c] + COA[c]$
FAS2	$ACP[c] + MALCOA[c] \rightleftharpoons COA[c] + MALACP[c]$
FAS3	$ACACP[c] + 6 MALACP[c] + 12 NADPH[c] \rightarrow 6 ACP[c] + C140_ACP[c] + 6 CO2[c] + 12 NADP[c]$
FAS4	$ACACP[c] + 7 MALACP[c] + 14 NADPH[c] \rightarrow 7 ACP[c] + C160_ACP[c] + 7 CO2[c] + 14 NADP[c]$
FAS5	$ACACP[c] + 7 MALACP[c] + 13 NADPH[c] \rightarrow 7 ACP[c] + C161_ACP[c] + 7 CO2[c] + 13 NADP[c]$
FAS6	$ACACP[c] + 8 MALACP[c] + 16 NADPH[c] \rightarrow 8 ACP[c] + C180_ACP[c] + 8 CO2[c] + 16 NADP[c]$
FAS7	$ACACP[c] + 8 MALACP[c] + 15 NADPH[c] \rightarrow 8 ACP[c] + C181_ACP[c] + 8 CO2[c] + 15 NADP[c]$
FAS8	$AMET[c] + C161_ACP[c] \rightarrow AHCYS[c] + C17CYC_ACP[c]$

FAS9	AMET[c] + C181_ACP[c] -> AHCYS[c] + C19CYC_ACP[c]
STERO1	DMPP[c] + IPDP[c] -> GRDP[c] + PPI[c]
STERO2	GRDP[c] + IPDP[c] -> FRDP[c] + PPI[c]
STERO3	FRDP[c] + IPDP[c] -> GGRDP[c] + PPI[c]
STERO4	GGRDP[c] + 7 IPDP[c] -> 7 PPI[c] + UDCPDP[c]
STERO5	GA3P[c] + PYR[c] -> CO2[c] + dXYLU5P[c]
STERO6	dXYLU5P[c] + NADPH[c] -> MERYTH4P[c] + NADP[c]
STERO7	CTP[c] + MERYTH4P[c] -> CDPMERYTH[c] + PPI[c]
STERO8	ATP[c] + CDPMERYTH[c] -> ADP[c] + CDPMERY2P[c]
STERO9	CDPMERY2P[c] -> CMP[c] + MERYcDP[c]
STERO10	MERYcDP[c] + ProDTH[c] -> HMB4DP[c] + ProDS[c]
NAD1	ACCOA[c] + FORM[c] + LASP[c] -> QULN[c]
NAD2	PRPP[c] + QULN[c] -> CO2[c] + NAMN[c] + PPI[c]
NAD3	ATP[c] + NAMN[c] -> DNAD[c] + PPI[c]
NAD4	ATP[c] + NAD[c] <=> ADP[c] + NADP[c]
NAD5	NA[c] + PRPP[c] -> NAMN[c] + PPI[c]
NAD6	ATP[c] + NMN[c] -> NAD[c] + PPI[c]
NAD7	NAMNs[c] + Pi[c] <=> NA[c] + R1P[c]
PANCOA1	3MOB[c] + MLTHF[c] -> 2DHP[c] + THF[c]
PANCOA2	2DHP[c] + NADPH[c] -> NADP[c] + PANT[c]
PANCOA3	ATP[c] + bALA[c] + PANT[c] -> AMP[c] + PNT0[c] + PPI[c]
PANCOA4	ATP[c] + PNT0[c] -> 4PPAN[c] + ADP[c]
PANCOA5	4PPAN[c] + ATP[c] + LCYS[c] -> 4PPCYS[c] + ADP[c] + Pi[c]
PANCOA6	4PPAN[c] + CTP[c] + LCYS[c] -> 4PPCYS[c] + CDP[c] + Pi[c]
PANCOA7	4PPCYS[c] -> CO2[c] + PAN4P[c]
PANCOA8	ATP[c] + PAN4P[c] -> DPCOA[c] + PPI[c]
PANCOA9	ATP[c] + DPCOA[c] -> ADP[c] + COA[c]
PANCOA10	4PCYS[c] + ATP[c] -> 4PPCYS[c] + ADP[c]
PANCOA11	ATP[c] + PAN[c] -> ADP[c] + PAN4P[c]
RIBFLA1	DRU5P[c] -> DB4P[c] + FORM[c]

RIBFLA2	4R5AU[c] + DB4P[c] -> DMLZ[c] + Pi[c]
RIBFLA3	GTP[c] -> 25DRAPP[c] + FORM[c] + PPI[c]
RIBFLA4	25DRAPP[c] -> 5APRBU[c] + NH3[c]
RIBFLA6	5APRBU[c] + NADP[c] -> 5APRU[c] + NADPH[c]
RIBFLA7	5APRU[c] -> 4R5AU[c] + Pi[c]
RIBFLA8	2 DMLZ[c] -> 4R5AU[c] + RIBFLA[c]
RIBFLA9	ATP[c] + RIBFLA[c] -> ADP[c] + FMN[c]
RIBFLA10	ATP[c] + FMN[c] -> FAD[c] + PPI[c]
RIBFLA11	RIBFLA[c] -> DMBZID[c]
RIBFLA12	DMBZID[c] + NAMN[c] -> 5PRDMBZ[c] + NA[c]
FOLATE1	GTP[c] -> FAPTP[c]
FOLATE2	FAPTP[c] -> DAPTP[c] + FORM[c]
FOLATE3	DAPTP[c] -> DATHAO[c]
FOLATE4	DATHAO[c] -> AHTHDH[c]
FOLATE5	AHTHDH[c] -> DHNPP[c] + PPI[c]
FOLATE6	DHNPP[c] -> DHNP[c] + Pi[c]
FOLATE7	DHNP[c] -> AHHMDHP[c] + GLYCALD[c]
FOLATE8	AHHMDHP[c] + ATP[c] -> ADHHP[c] + AMP[c]
FOLATE9	ADHHP[c] + PABA[c] -> DHPT[c] + PPI[c]
FOLATE10	AHHMDHP[c] + PABA[c] -> DHPT[c]
FOLATE11	ATP[c] + DHPT[c] + LGLU[c] -> ADP[c] + DHF[c] + Pi[c]
FOLATE12	DHF[c] + NADP[c] <=> FOL[c] + NADPH[c]
FOLATE13	NADP[c] + THF[c] <=> DHF[c] + NADPH[c]
FOLATE14	5FTHF[c] + ATP[c] -> ADP[c] + METHF[c] + Pi[c]
FOLATE15	METHF[c] -> 5FTHF[c]
FOLATE16	MLTHF[c] + NADH[c] -> 5MTHF[c] + NAD[c]
FOLATE17	10FTHF[c] <=> METHF[c]
FOLATE18	MLTHF[c] + NADP[c] <=> METHF[c] + NADPH[c]
FOLATE19	ATP[c] + FORM[c] + THF[c] -> 10FTHF[c] + ADP[c] + Pi[c]
PORCHL1	ATP[c] + LGLU[c] + NADPH[c] -> AMP[c] + GLU1SA[c] + NADP[c] + PPI[c]
PORCHL2	GLU1SA[c] -> 5AOP[c]
PORCHL3	2 5AOP[c] -> PPBNG[c]

PORCHL4	4 PPBNG[c] -> HMBIL[c] + 4 NH3[c]
PORCHL5	HMBIL[c] -> UPPG3[c]
PORCHL6	2 AMET[c] + CPPPG3[c] -> 2 CO2[c] + 2 dADN[c] + 2 LMET[c] + PPPG9[c]
PORCHL7	2 AMET[c] + UPPG3[c] -> 2 AHCYS[c] + PRCR2[c]
PORCHL8	NAD[c] + PRCR2[c] -> NADH[c] + SHCL[c]
PORCHL9	Fe2[c] + SHCL[c] -> SHEME[c]
PORCHL10	COBALT[c] + SHCL[c] -> CPRCR2[c]
PORCHL11	AMET[c] + CPRCR2[c] -> AHCYS[c] + CPRCR3[c]
PORCHL12	AMET[c] + CPRCR3[c] -> AHCYS[c] + CPRCR4[c]
PORCHL13	AMET[c] + CPRCR4[c] -> AHCYS[c] + CPRCR5A[c]
PORCHL14	CPRCR5A[c] -> ACAL[c] + CPRCR5B[c]
PORCHL15	AMET[c] + CPRCR5B[c] -> AHCYS[c] + CPRCR6[c]
PORCHL16	CPRCR6[c] + NADPH[c] -> CDHPRCR6[c] + NADP[c]
PORCHL17	AMET[c] + CDHPRCR6[c] -> AHCYS[c] + CPRCR7[c]
PORCHL18	AMET[c] + CPRCR7[c] -> AHCYS[c] + CO2[c] + CPRCR8[c]
PORCHL19	CPRCR8[c] -> CBRN[c]
PORCHL20	2 ATP[c] + CBRN[c] + 2 LGLN[c] -> 2 ADP[c] + CBRNDA[c] + 2 LGLU[c] + 2 Pi[c]
PORCHL21	AMET[c] + PRCR3B[c] -> AHCYS[c] + PRCR4[c]
PORCHL22	AMET[c] + PRCR4[c] -> AHCYS[c] + PRCR5[c]
PORCHL23	NADPH[c] + PRCR6A[c] -> NADP[c] + PRCR6B[c]
PORCHL24	PRCR8[c] -> HGBRN[c]
PORCHL25	ACBRNDA[c] + 4 ATP[c] + 4 LGLN[c] -> ACBRNHA[c] + 4 ADP[c] + 4 LGLU[c] + 4 Pi[c]
PORCHL26	1APROH[c] + ACBRNHA[c] + ATP[c] -> ACBA[c] + ADP[c] + Pi[c]
PORCHL27	ACBA[c] + ATP[c] -> ACBAP[c] + ADP[c]
PORCHL28	ACBA[c] + GTP[c] -> ACBAP[c] + GDP[c]
PORCHL29	ACBRNHA[c] + APROHP[c] + ATP[c] -> ACBAP[c] + ADP[c] + Pi[c]
PORCHL30	ACBAP[c] + GTP[c] -> AGDPCBA[c] + PPi[c]
PORCHL31	AGDPCBA[c] + ARBZL[c] -> CACO[c] + GMP[c]
PORCHL32	ARBZL5P[c] -> ARBZL[c] + Pi[c]

LIMPIN1	HIPCOA[c] + NAD[c] -> IPCHCCOA[c] + NADH[c]
LIMPIN2	MTNOL[c] + NAD[c] + O2[c] -> MTNAL[c] + NADH[c]
LIMPIN3	HDMHCOA[c] + NAD[c] -> DMMOHCOA[c] + NADH[c]
DNA	4.403 ATP[c] + 1.118 dATP[c] + 0.501 dCTP[c] + 0.501 dGTP[c] + 1.118 dTTP[c] -> 4.403 ADP[c] + DNA[c] + 4.403 Pi[c] + 3.236 PPI[c]
RNA	1.05 ATP[c] + 1.124 CTP[c] + 0.832 GTP[c] + 0.873 UTP[c] -> 1.554 ADP[c] + 1.554 Pi[c] + 3.879 PPI[c] + RNA[c] 37.195 ATP[c] + 1.078 GLY[c] + 0.775 LALA[c] + 0.133 LARG[c] + 0.156 LASN[c] + 0.156 LASP[c] + 1.216 LCYS[c] + 0.127 LGLN[c] + 0.127 LGLU[c] + 0.146 LHis[c]
PROTEIN	+ 0.436 LILE[c] + 0.429 LLEU[c] + 0.336 LLYS[c] + 0.783 LMET[c] + 0.185 LPHE[c] + 0.457 LPRO[c] + 0.427 LSER[c] + 0.41 LTHR[c] + 0.043 LTRP[c] + 0.801 LTYR[c] + 1.172 LVAL[c] -> 37.195 ADP[c] + 37.195 Pi[c] + PROTEIN[c]
PLIPID	0.109 CDL[c] + 0.8 PE[c] + 0.397 PG[c] -> PLIPID[c]
TEICHOIC	0.129 ATP[c] + 0.129 LLYS[c] + 0.518 POLYGP[c] + 0.129 UACGAM[c] -> 0.129 ADP[c] + 0.129 Pi[c] + TEICH[c] + 0.129 UDP[c]
TRACE	0.199 COA[c] + 0.182 FAD[c] + 0.313 FMN[c] + 0.215 NAD[c] + 0.192 NADP[c] + 0.321 THF[c] -> TRACE[c]
PEPTIDO	1.106 26DAP_M[c] + 4.425 ATP[c] + 1.106 DALADALA[c] + 1.106 LALA[c] + 1.106 LGLU[c] + 1.064 UACGAM[c] + 1.064 UAMR[c] -> 4.425 ADP[c] + 1.106 DALA[c] + PEPTIDO[c] + 4.425 Pi[c] + 1.106 UDP[c] + 1.106 UMP[c]
CARBO	4.115 UDPGAL[c] + 2.058 UDPGLC[c] -> CARBO[c] + 6.173 UDP[c]
BIOMASS	40 ATP[c] + 0.0432 CARBO[c] + 0.026 DNA[c] + 0.1009 PEPTIDO[c] + 0.076 PLIPID[c] + 0.5284 PROTEIN[c] + 0.0655 RNA[c] + 0.08 TEICH[c] + 0.0494 TRACE[c] -> 40 ADP[c] + 40 Pi[c]
