

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico Departamento de Engenharia Química e Engenharia de
Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**ESTUDOS *IN SILICO* PARA A PRODUÇÃO BACTERIANA DE
HIDROGÊNIO**

Florianópolis-SC
Junho - 2007

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico Departamento de Engenharia Química e Engenharia de
Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**ESTUDOS *IN SILICO* PARA A PRODUÇÃO BACTERIANA DE
HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Mestranda: Daniela Muccillo

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto
(EQA/UFSC)

Florianópolis-SC

Junho - 2007

DANIELA MUCCILLO

**ESTUDOS *IN SILICO* PARA A PRODUÇÃO BACTERIANA DE
HIDROGÊNIO**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, na área de concentração Processos Químicos e Biotecnológicos, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, Maio de 2007

Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca examinadora:

Luismar Marques Porto – Orientador (EQA/UFSC)

Cíntia Soares – Membro externo

Agenor Furigo Junior – Membro interno EQA/UFSC

Waldir Pedro Martignoni – Membro externo (PETROBRAS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, energia e vontade.

Agradeço aos meus pais Francisco e Edna, pela vida em primeiro lugar. Pela dedicação aos filhos, a educação, os ensinamentos e o incentivo que me deu durante toda a vida.

Agradeço aos meus avós que me deram sempre muito incentivo e carinho.

Ao meu namorado, Luiz, por todo incentivo, paciência e amor.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Luismar, pela oportunidade e orientação.

Agradeço ao Eng. Dr. Waldir Martignoni, pelo incentivo, apoio, pela orientação e pelas idéias.

Agradeço aos colegas de trabalho do Intelab, pela amizade, pelo companheirismo e pela ajuda que cada um pôde dar. Claudemir, Derce, André, Renata, Fernanda, Artiva, Gisele, Rambo, Julia e Gustavo muito obrigado.

Um agradecimento especial ao colega Itamar, pelo apoio, pela paciência e pelos ensinamentos na parte computacional deste trabalho.

Agradeço muito ajuda e colaboração da Cíntia.

Aos amigos que sempre foram essenciais durante os momentos difíceis e momentos de alegria; agradeço muita a parceria de Luciane, Erick, Nohra, André, Marcela, Fernanda, Pira e Ninho.

Aos amigos distantes, Fabi, Aline, Renata, Jully, Luciane, Silvana, Mariline, Maríndia, Gelson e Marcel, valeu pelos encontros que sempre nos fortalece.

Às minhas companheiras de moradia, Fernanda e Aline, obrigada pela força e amizade.

Às minhas irmãs, Mariana e Marcela, pela amizade, força e cooperação. Ao meu sobrinho lindo que desde que nasceu trouxe muitas alegrias, muita luz nas nossas vidas para continuar sempre lutando por algo melhor. Ao meu cunhado, pela colaboração de sempre.

A todos da minha família.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram para esta etapa de minha vida.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE TABELAS	iii
SIMBOLOGIA E NOMENCLATURA	v
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Motivação	1
1.3 Objetivos.....	4
Capítulo 2	5
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Fundamentos da Produção de Energia	5
2.2 Hidrogênio.....	7
2.3 Produção de Hidrogênio	Erro! Indicador não definido.
2.4 Produção Biológica de Hidrogênio.....	8
2.5 Bases Moleculares para Produção Biológica de Hidrogênio por Processos Fermentativos	15
2.6 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	17
2.6.1 <i>Metabolismo da C. acetobutylicum</i>	19
2.7 Engenharia Metabólica.....	26
2.8 Análise de Fluxo Metabólico.....	28
2.9 Análise de Controle Metabólico.....	33
2.9.1 Determinação dos coeficientes de controle de fluxo.....	39
2.9.2 Relação entre os fluxos no estado estacionário:.....	42
2.9.3 Relações cinéticas.....	44
Capítulo 3	46
METODOLOGIA.....	46
3.1 Análise de Fluxo Metabólico (MFA)	46
3.1.1 Modelo matemático proposto para análise de fluxo metabólico	47
3.1.2 Solução do modelo proposto	49
3.1.3 Avaliação do modelo proposto	50
3.2 Análise de Controle Metabólico.....	50
3.2.1 Modelo matemático das reações da via metabólica considerado	50
3.2.1.1 <i>Obtenção das Constantes de Equilíbrio</i>	54
3.2.1.2 <i>Obtenção das velocidades máximas de cada reação</i>	55
3.2.1.3 <i>Obtenção dos Parâmetros Cinéticos</i>	57
3.2.2 Solução do modelo proposto	62
3.2.3 Avaliação do modelo proposto	63
Capítulo 4	64
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
4.1 Análise de Fluxo Metabólico.....	64
4.1.1 Análise de Sensibilidade.....	66
4.2 Análise de Controle Metabólico.....	70
4.2.1 Coeficientes de controle de fluxo	78
Capítulo 5	81
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	81

Referências Bibliográficas.....	83
Apêndice.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estrutura da oferta de energia no Brasil.....	5
Tabela 2.2 – Parâmetros da fermentação contínua em culturas no estado estacionário de <i>C. acetobutylicum</i> com limitação de fosfato.....	26
Tabela 3.1 - Reações da via metabólica da <i>C. acetobutylicum</i> usadas no modelo de análise de fluxo metabólico.....	47
Tabela 3.2 – Equações de velocidade usadas no modelo.....	52
Tabela 3.3 – Constantes de equilíbrio.....	55
Tabela 3.5 - Concentração dos metabólitos internos.....	56
Tabela 3.4 - Parâmetros cinéticos das reações do modelo.....	59
Tabela 4.1 – Fluxo de hidrogênio obtido na literatura e calculado no modelo.....	64
Tabela 4.2 - Fluxos medidos em condições de glicose e condições de glicose-glicerol (GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a).....	49
Tabela 4.3 - Fluxos calculados em condições de glicose.....	65
Tabela 4.4 - Simulação dos fluxos calculados considerando a interrupção da produção de alguns metabólitos em meio contendo somente glicose.....	69
Tabela 4.5 - Simulação dos fluxos calculados considerando a interrupção da produção de alguns metabólitos em meio contendo glicerol e glicose.....	70
Tabela 4.6 – Velocidades máximas usadas nos modelo 1 e 2.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura da oferta interna de energia (Fonte: MINISTÉRIO DE MINAS ENERGIA, 2007).	6
Figura 2.2 - <i>Clostridium acetobutylicum</i> . (Fonte: SIEMERINK, 2005).	18
Figura 2.3 – Fermentação ABE. (Fonte: SIEMERINK, 2005).	19
Figura 2.4 – Esquema da produção de hidrogênio.	21
Figura 2.5 – Esquema do modelo cinético <i>Ping Pong bi bi</i>	22
Figura 2.6 – Via metabólica da <i>Clostridium acetobutylicum</i> . Adaptado de GIRBAL <i>et al.</i> (1995a).	23
Figura 3.1 - Matriz estequiométrica referente às reações da via metabólica da <i>C. acetobutylicum</i>	48
Figura 3.2 – Via metabólica da <i>C. Acetobutylicum</i> simplificada.	51
Figura 4.1 – Fluxos medidos nas duas diferentes condições de cultivo. ... Erro! Indicador não definido.	
Figura 4.2 – Fluxos Calculados em duas diferentes condições de cultivo.	66
Figura 4.3 – Sensibilidade Acumulada.	67
Figura 4.4 – Análise de sensibilidade específica na <i>C. acetobutylicum</i> para produção de hidrogênio.	68
Figura 4.5 – Velocidades de produção obtidas do modelo comparada com as velocidades de produção do trabalho de GIRBAL <i>et al.</i> , (1995a).	72
Figura 4.6 - Coeficientes de controle de fluxo para o ácido butírico.	74
Figura 4.7 – Velocidades de produção normalizadas para glicose nas condições da hipótese 2.	76
Figura 4.8 – Comportamento dinâmico da concentração dos metabólitos (mM) em função do tempo (min).	77
Figura 4.9 - Coeficientes de controle de fluxo para a produção de hidrogênio considerando a hipótese 1.	78
Figura 4.10 – Coeficientes de controle de fluxo para hidrogênio considerando a hipótese 2. .	79

SIMBOLOGIA E NOMENCLATURA

Simbologia

$C_i^{X_j}$	Coefficiente de controle de concentração
$C_i^{J_j}$	Coefficiente de controle de fluxo
ε_j^i	Coefficiente de elasticidade da i -ésima taxa de reação, em relação à concentração do metabólito j , X_j
e_i	Concentração da enzima E_i (mM)
X_j	Concentração do metabólito (mM)
x_j	Concentração do metabólito X_j no estado estacionário (mM)
K_{eq}	Constante de equilíbrio
K_m	Constante de Michaelis-Menten (mM)
E_i	Enzima
J_j	Fluxo no estado estacionário de uma reação j na via metabólica ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
N_C	Matriz de m_0 colunas independentes de N
N_R	Matriz de m_0 linhas independentes de N
N_{RC}	Matriz de m_0 linhas independentes e de m_0 colunas independentes de N
L^X	Matriz de concentração link ($m \times m_0$)
R_r	Matriz de redundância reduzida
S_c	Matriz dos fluxos calculados
L^J	Matriz dos fluxos de ligação
S_m	Matriz dos fluxos medidos
N	Matriz dos metabólitos internos
S	Matriz estequiométrica
I	Matriz identidade

R	Matriz obtida da reconciliação estatística
C	Número condicional
n	Número de colunas da matriz N
n_0	Número de colunas dependentes.
m	Número de linhas da matriz N
m_0	Rank da matriz N
K	Rank da matriz redundância
r_{met}	Velocidade de síntese dos metabólitos intermediários nas reações da via metabólica ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
S^T	Transposta da matriz estequiométrica
v_i	Velocidade da reação da enzima (mM/min)
v_i	Velocidade da reação da enzima E_i (mM/min)
v	Velocidade de reação (mM/min)
V	Velocidade máxima (mM/min)
X_{met}	Vetor das concentrações dos metabólitos (mM)
v	Vetor de fluxos (que contém os fluxos a serem determinados) ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
v_c	Vetor de fluxos calculados ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
v_m	Vetor de fluxos medidos ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
$v_{m,new}$	Vetor dos novos fluxos medidos ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
J_0	Vetor que contém m_0 fluxos dependentes ($m_0 \times 1$) ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
J_R	Vetor que contém n_0 fluxos independentes ($n_0 \times 1$) ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
J	Vetor que contém os fluxos no estado estacionário ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

Nomenclatura

ACAL	Acetaldeído
ACOA	Acetil-Coenzima A
ACP	Acetilfosfato
ACCOA	Acetoacetil Coenzima A
ACT	Acetoácido acético
AC	Acetona
ACET	Ácido acético
BUT	Ácido butírico
BUTOH	Butanol
BUTHD	Butiraldeído
BUTCOA	Butiril Coenzima A
BUTP	Butirilfosfato
COA	Coenzima A
ADP	Difosfato de adenosina
CO ₂	Dióxido de carbono
ETOH	Etanol
Fd _{oxi}	Ferredoxina oxidada
Fd _{red}	Ferredoxina reduzida
P	Fósforo
GLI	Glicose
H ₂	Hidrogênio
LAC	Lactato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
PIR	Piruvato
ATP	Trifosfato de adenosina
vGLI	Fluxo do consumo de Glicose (MFA e MCA)
vPIR	Fluxo da produção de Piruvato (MFA)
vPDH	Fluxo de produção de CO ₂ (MFA e MCA)
vTHI	Fluxo de produção de Acetoacetyl-CoA (MFA e MCA)
vHCOA	Fluxo de produção de 3-Hidroxi-butiril-CoA para MFA e fluxo de produção do Butiril-CoA para MCA
vCrCOA	Fluxo de produção de Crotonil-CoA (MFA)
vBuCOA	Fluxo de produção de Butiril-CoA (MFA)
vPTB	Fluxo de produção de Butiril-fosfato para MFA e fluxo de produção de Butirato para MCA
vBTK	Fluxo de produção do Butirato (MFA)
vACALDH	Fluxo de produção de Acetaldeído para MFA e fluxo de produção do Etanol para MCA
vADH	Fluxo de produção de Etanol (MFA)
vPTA	Fluxo de produção de Acetil-fosfato para MFA e fluxo de produção do Acetato para MCA
vATK	Fluxo de produção de Acetato (MFA)
vGLIC	Fluxo do consumo de Glicerol (MFA)
vLAC	Fluxo de produção do Lactato (MFA)
vCOAT	Fluxo de produção do Acetoacetato para MFA e Fluxo de Produção da Acetona para MCA
vAADC	Fluxo de produção da Acetona (MFA)
vBUTHD	Fluxo de produção do Butiraldeído para MFA e fluxo de produção de Butanol para MCA
vBDHB	Fluxo de produção do Butanol (MFA)
vH ₂	Fluxo de produção do H ₂ (MFA e MCA)
vNADH	Fluxo de consumo de NADH (MCA)

vATPase Fluxo de produção de ADP (MCA)

RESUMO

A produção biológica de hidrogênio é uma excelente alternativa de produção de energia. Dentre os processos biológicos de produção de hidrogênio, os fermentativos são os mais vantajosos do ponto de vista industrial. *Clostridium acetobutylicum* é uma bactéria muito utilizada industrialmente, tem um metabolismo fermentativo complexo que produz muitos metabólitos, incluindo hidrogênio com bons rendimentos e, freqüentemente, mostra um padrão de fermentação bifásico. Após produzir ácido acético, ácido butírico e hidrogênio durante a fase de crescimento exponencial, inicia-se a formação de solventes (etanol, acetona e butanol). Os rendimentos de hidrogênio podem ser melhorados com o uso de engenharia metabólica por meio de um redirecionamento do fluxo de elétrons para a produção de hidrogênio. O objetivo deste trabalho é investigar o metabolismo da *C. acetobutylicum*, visando encontrar as principais etapas que controlam a produção de hidrogênio. Para obter esse entendimento foram aplicadas duas ferramentas de engenharia metabólica: Análise de Fluxo Metabólico e Análise de Controle Metabólico. Dados da literatura foram usados como entrada nos modelos matemáticos construídos para as análises. A primeira ferramenta usada, Análise de Fluxo Metabólico, permitiu quantificar os fluxos internos do metabolismo da bactéria em estudo, sob duas condições de cultivo diferentes. O resultado dessa análise fornece um mapa de distribuição de fluxos. Também permite obter a sensibilidade dos fluxos medidos em relação ao fluxo de interesse. Os modelos mostraram quais são as vias de maior sensibilidade, ou seja, as vias mais indicadas para possíveis modificações por manipulação genética. A segunda etapa desse trabalho foi aplicação de Análise de Controle Metabólico a fim de encontrar as etapas da via metabólica que controlam a produção de hidrogênio. Foi construído um modelo cinético e a partir dele foram obtidos os coeficientes de controle de fluxo, esse modelo foi ajustado com base nos próprios coeficientes de controle de fluxo apontados. O modelo obtido foi analisado e mostrou que as principais etapas que afetam a produção de hidrogênio são a via glicolítica e a via de regeneração do NADH. Pequenas variações na atividade enzimática dessas etapas produzirão grande efeito na produção de hidrogênio. Diante dessas ferramentas é possível prever melhores estratégias de modificações genéticas sítio-dirigidas. As conclusões deste trabalho estão baseadas em estudos *in silico* e não eliminam a necessidade de comprovação experimental.

Palavras – chave: Produção biológica de hidrogênio; Análise de fluxo metabólico; Análise de controle metabólico; *Clostridium acetobutylicum*

ABSTRACT

The biological hydrogen production is an excellent alternative of energy production. Among the biological processes of hydrogen production, the fermentative processes are the ones that have more advantages from the industrial point of view. *Clostridium acetobutylicum* is a bacteria very much used industrially. It has a complex fermentative metabolism, which produces many metabolites, including hydrogen with good yields, and usually shows a biphasic batch fermentation pattern. After producing acetate and butyrate during exponential growth, the organism switches to the formation of acetone, butanol, and ethanol shortly before entering the stationary phase. Hydrogen yields can be improved using metabolic engineering, redirecting the electron flux to the hydrogen production. The objective of this work was to investigate *C. acetobutylicum* metabolism, aiming at to find the main steps that control the hydrogen production. To get this agreement two tools of metabolic engineering had been applied: Metabolic Flux Analysis and Metabolic Control Analysis. Data from the literature were used as input in the mathematical models constructed for the analysis. The first used tool, Metabolic Flux Analysis, allowed to get the quantification of the internal flux of the metabolism of the bacterium in study, under two different conditions of culture. The result of this analysis supplies a map of flux distribution. Also it allows to get the sensitivity of the flux measured in relation to the interest flux. The second stage of this work was application of Metabolic Control Analysis in order to find the step of the metabolic pathway that controls the hydrogen production. A kinetic model was constructed and to leave of it the flux control coefficients had been gotten, this model was adjusted on the basis of the flux control coefficients pointed flux control. The model gotten was analyzed and showed that the main steps that affect the hydrogen production are the glycolysis pathway and the NADH regeneration pathway. Small variations in the enzymatic activity of these steps will produce great effect in the hydrogen production. With these tools it is possible to predict better strategies of small site-directed genetic modifications. The conclusions of this work are based on *in silico* studies, that is, computational analysis, and do not eliminate the need for experimental.

Keywords : Biological hydrogen production; Metabolic flux analysis; Metabolic control analysis; *Clostridium acetobutylicum*

Capítulo 1

Introdução

1.1 Generalidades

Os avanços industriais ocorridos nos últimos séculos estão ligados, de alguma maneira, às transformações e ao poder derivado dos combustíveis fósseis. O funcionamento da sociedade moderna depende do suprimento de energia. Hoje em geral, os processos químicos industriais exigem uma grande quantidade de energia e pressões elevadas, e são dependentes da indústria de petróleo, de gás e de produtos petroquímicos. O calor excedente acaba se convertendo em poluição e em chuva ácida, e promove o chamado efeito estufa.

Além de todos os problemas climáticos causados pelo uso desenfreado de combustíveis fósseis, o pico da produção global de petróleo vem preocupando um grande número de geólogos. Se ocorrer uma crise, os países e as companhias energéticas terão de recorrer a combustíveis fósseis mais impuros – o carvão, o óleo pesado e a areia de alcatrão – como substitutos se não houver uma fonte alternativa (RIFKIN, 2003). A mudança para combustíveis mais impuros representaria um aumento na emissão de dióxido de carbono, uma elevação ainda maior na temperatura da Terra e efeitos na biosfera terrestre ainda mais devastadores (ALBRITTON *et al.*, 2001).

1.2 Motivação

Uma mudança no modo como a energia é usada está prestes a ocorrer. O hidrogênio é um insumo energético que tem sido alvo de muita atenção. É o mais leve e mais onipresente dos elementos do universo. Por não conter nenhum átomo de carbono, não emite dióxido de carbono. Ele existe na natureza na forma combinada – na água, nos combustíveis fósseis e em

todos os seres vivos. Portanto, pode ser extraído de fontes naturais (RIFKIN, 2003). Células a combustível baseadas em hidrogênio já estão sendo comercializadas. As grandes indústrias automobilísticas estão investindo bilhões de dólares no desenvolvimento de carros, ônibus e caminhões com células a combustível de hidrogênio. No entanto, atualmente o hidrogênio é obtido a partir de combustíveis fósseis, o que sustenta a dependência e gera dióxido de carbono na atmosfera.

A produção de energia a partir de substratos renováveis é importante para a geração de energia sustentável e a redução das emissões globais de dióxido de carbono. O hidrogênio pode ser um importante componente de uma infra-estrutura de energia que reduz as emissões de dióxido de carbono, desde que seja produzido a partir de fontes renováveis e usado em células a combustível.

A eficiência de produção de hidrogênio é uma questão crítica para a chamada “Economia do Hidrogênio”. A observação da natureza se torna imprescindível nesse contexto. Por um longo período, a física, a química e a matemática dominaram os progressos tecnológicos. Hoje a biologia, aliada a essas outras ciências, tem sido a solução para o desenvolvimento tecnológico sustentável. A biotecnologia tem ganhado cada vez mais atenção. Os sistemas biológicos são máquinas de grande eficiência que se auto-reproduzem, trabalham à temperatura ambiente e produzem poucos produtos indesejáveis. O mapeamento e a manipulação de genomas, por outro lado, abriram portas para uma nova era nas quais os seres vivos se tornaram uma mercadoria manipulável. Com os avanços ocorridos nos últimos tempos em biologia molecular e biologia computacional, é possível obter organismos superprodutores de insumos desejáveis.

Os processos biológicos de produção de hidrogênio têm sido foco de muitas pesquisas no mundo. Bactérias fermentativas são as candidatas favoritas para a produção de hidrogênio.

Elas degradam matéria orgânica e liberam hidrogênio e dióxido de carbono, e parte dessa matéria orgânica permanece na forma de ácido acético e ácido butírico ou outros ácidos, dependendo da bactéria que a fermenta, e, de forma geral, possuem baixos rendimentos, porque não produzem apenas um metabólito.

Clostridium acetobutylicum, por exemplo, produz aproximadamente dois moles de hidrogênio por mol de glicose. Os rendimentos da liberação de hidrogênio podem ser melhorados por engenharia metabólica por meio de um redirecionamento do fluxo de elétrons para a produção de hidrogênio.

A engenharia metabólica permite um melhoramento direcionado para a formação de produtos ou propriedades celulares por modificações em reações bioquímicas específicas ou pela introdução de outras reações, o que é realizado com o uso da tecnologia do DNA recombinante. Essa técnica permite obter organismos geneticamente modificados por meio de mutações dirigidas em genes que codificam enzimas em vias de interesses (STEPHANOPOULOS, 1998).

A manipulação de vias metabólicas para aumentar a produtividade de metabólitos de interesse tem sido alvo de estudo na biotecnologia. O primeiro passo para modificar o metabolismo de um dado organismo é o entendimento de suas vias metabólicas. Esse entendimento pode ser obtido com o uso da ferramenta análise de fluxo metabólico (MFA, do inglês, “*Metabolic Flux Analysis*”). MFA é a quantificação de fluxos do metabolismo de um dado organismo de interesse, sob condições definidas. O resultado dessa análise fornece um mapa de distribuição de fluxos para uma dada rede metabólica.

O segundo passo é o entendimento dos mecanismos de controle metabólico que levam em conta os parâmetros cinéticos das reações metabólicas, esse entendimento pode ser obtido com a ferramenta análise de controle metabólico (MCA, do inglês, “*Metabolic Control*”).

Analysis”). Diante dessas ferramentas, é possível prever melhores estratégias de modificações genéticas sítio-dirigidas.

1.3 Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é um estudo teórico, *in silico*, ou seja, computacional, visando o entendimento do metabolismo da *C. acetobutylicum* e a aplicação de ferramentas de engenharia metabólica para propor um aumento na produção de hidrogênio.

Objetivos específicos

- Avaliação da distribuição dos fluxos internos e comparação em duas diferentes condições de cultivo.
- Identificação da sensibilidade dos fluxos em relação ao fluxo de hidrogênio.
- Construção de um modelo cinético que represente a via metabólica da *C. acetobutylicum*.
- Identificação dos parâmetros que controlam o fluxo de produção de hidrogênio.

A identificação dos parâmetros de controle é a chave para futuras modificações genéticas que produzirão uma linhagem produtora de hidrogênio com melhores rendimentos comparados à linhagem selvagem.

Capítulo 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fundamentos da Produção de Energia

O Brasil utiliza várias fontes de energia, conforme mostra a Tabela 2.1 (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2007). O petróleo ocupa a maior parte da matriz energética mundial. No futuro, espera-se que ocupe um espaço menor em favor de outras fontes limpas de energia. Como pode ser observado na Tabela 2.1, apesar de a energia renovável dentro da estrutura da matriz energética brasileira ter se mantida praticamente estável entre 2005 e 2006, observa-se que as fontes de energia não renováveis vêm caindo em virtude do aumento de fontes renováveis. Esse quadro pode ser observado no mundo todo, procurando uma melhor qualidade de vida e amenizando os impactos causados pelo uso de combustíveis fósseis.

Tabela 2.1 - Estrutura da oferta de energia no Brasil.

	2004	2005	2006
Energia Não Renovável	56,1%	55,5%	55,6%
Petróleo e Derivados	39,1%	38,6%	38,8%
Gás Natural	8,9%	9,4%	9,5%
Carvão Mineral e Derivados	6,7%	6,4%	5,8%
Urânio e Derivados	1,5%	1,2%	1,5%
Energia Renovável	43,9%	44,5%	44,3%
Energia Hidráulica e Eletricidade	14,4%	14,9%	14,6%
Lenha e Carvão Vegetal	13,2%	13,1%	12,4%
Produtos da Cana de Açúcar	13,5%	13,7%	14,4%
Outras Renováveis	2,7%	2,8%	2,9%

Fonte: Ministério de Minas e Energia, 2007.

O Brasil ocupa uma posição privilegiada na utilização de energias renováveis, conforme pode ser observado na Figura 2.1.

Uma nova fase está acontecendo em termos de energia. Essa fase envolve eficiência dos equipamentos que produzem energia e utilização de outras fontes de energia que não seja o petróleo, o que contribuirá para a estabilidade dos preços, já que as maiores jazidas de petróleo estão nas mãos de poucos países. No Oriente Médio encontram-se as maiores jazidas de petróleo, região de instabilidades políticas, religiosas e econômicas.

A nova economia de energia não consiste em descobertas de grandes fontes de energia, como ocorreu no passado com o carvão e o petróleo, e sim em desenvolvimento tecnológico na utilização das fontes energéticas, tendo-se diversas fontes de energia – a maioria renovável – e equipamentos para a sua geração. A energia deverá ser gerada próxima ao local de consumo, eliminando as perdas que ocorrem na transmissão, o alto custo de construção e a manutenção das linhas de transmissão (NETO, 2005).

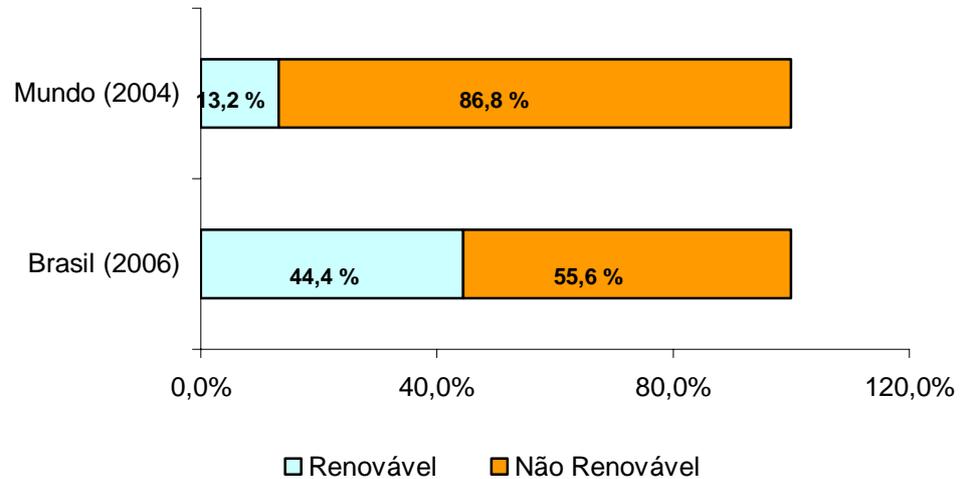


Figura 2.1 - Estrutura da oferta interna de energia (Fonte: MINISTÉRIO DE MINAS ENERGIA, 2007).

O petróleo e o gás natural começarão a se esgotar, segundo especialistas, daqui a alguns anos, mas há tempo suficiente para recorrer a estratégias energéticas alternativas (RIFKIN, 2003).

O hidrogênio é apontado por especialistas como pico para a nova economia mundial. Deverá movimentar aproximadamente 1,7 trilhão de dólares já em 2020 (NETO, 2005). Uma infra-estrutura para o hidrogênio está sendo projetada, o que envolve a construção de estradas, usinas de produção, sistemas de armazenamento e distribuição.

2.2 Hidrogênio

O hidrogênio possui características combustíveis desejáveis, porque apresenta alto conteúdo de energia por peso, maior velocidade de combustão, limites alto de inflamabilidade, temperatura de detonação mais alta, menor energia de ignição, menor densidade e é um bom condutor de calor e eletricidade. É um elemento quimicamente muito ativo, por isso só se encontra na forma combinada: na água (H_2O), em ácidos (H_3O^+), em bases (OH^-), em hidretos e em compostos orgânicos em geral. Por isso não se trata de uma fonte de energia, e sim de um vetor: é necessário primeiro produzi-lo e armazená-lo para depois ser usado como combustível (PENTEADO, 2003).

Hoje o hidrogênio é usado principalmente como matéria-prima em indústrias químicas e petroquímicas. Dentre os seus usos, pode-se citar:

- os processos de hidrogenação: usado para produzir compostos de baixa massa molecular, compostos saturados, craquear hidrocarbonetos e remover enxofre e nitrogênio (dessulfurização do petróleo);
- como um dos reagentes na síntese de amônia (NH_3), base de fabrico de muitos fertilizantes e detergentes;
- na remoção química de oxigênio para prevenir a oxidação e a corrosão;
- como meio refrigerador em geradores elétricos; e

➤ como combustível em foguetes e, atualmente, em misturas de combustíveis para automóveis.

Desta forma esse elemento tem sido foco da atenção de pesquisadores do mundo todo, visto ser um insumo de grande interesse na economia e apontado como o combustível do futuro. Quando utilizado em células a combustível, produz grande quantidade de energia e não emite poluente, e ainda libera como resíduo apenas vapor d'água.

A célula a combustível é uma bateria que converte continuamente a energia química de um combustível e de um oxidante em energia elétrica. O processo envolve essencialmente um sistema constituído por um eletrodo e um eletrólito (KORDESCH e SIMADER, 1996).

O uso de tecnologias limpas baseadas em hidrogênio deverá contribuir para a redução do consumo final de energia (pois são mais eficientes), além de proporcionar benefícios ao meio ambiente. No entanto, 95% da produção atual se dá a partir de combustíveis fósseis, o que libera gases de efeito estufa para o meio ambiente e sustenta a dependência no petróleo e de outras fontes não renováveis.

A produção biológica de hidrogênio é uma alternativa considerada potencialmente promissora, visto que é realizada, em sua maioria, à temperatura ambiente, com bons rendimentos e com o aparecimento de pouquíssimos produtos indesejáveis.

2.3 Produção Biológica de Hidrogênio

A produção de hidrogênio a partir de certos microrganismos está relacionada com a sua sobrevivência. Para realizar o trabalho biológico, a célula necessita de energia química. Essa energia pode ser obtida por meio de energia luminosa por células fotossintéticas, e da oxidação de compostos de carbono, principalmente carboidratos, para células heterotróficas.

Os organismos degradam moléculas energéticas como forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP, que é o principal transportador de energia química em todas as células (LEHNINGER, NELSON e COX, 2000).

A maior parte da produção biológica de hidrogênio da biosfera ocorre a partir da oxidação da matéria orgânica, que decompõe um substrato em dióxido de carbono e hidrogênio. Esse processo de degradação gera elétrons. O processo de geração de hidrogênio ocorre como forma de dissipar elétrons contidos na célula e também permite a geração de energia adicional ao metabolismo celular (KHANAL *et al.*, 2004).

Os processos de geração biológica de hidrogênio são fundamentalmente dependentes de enzimas que atuam na produção de hidrogênio. Essas enzimas catalisam a reação:



Três enzimas estudadas até o momento entre os organismos produtores de hidrogênio são responsáveis por essa reação: a nitrogenase, a Fe-hidrogenase e a NiFe hidrogenase (BENEMANN, 1996).

O metabolismo de células vivas é regulado para ser econômico e equilibrado. As enzimas em cada via metabólica são reguladas de tal forma que cada tipo de molécula é produzido, em quantidades apropriadas às necessidades da célula. Quando há excesso, a célula utiliza-se de mecanismos de inibição enzimática para diminuir esse excesso, ou seja, grandes quantidades de hidrogênio podem inibir a atividade da enzima (LEHNINGER, NELSON e COX, 2000; KHANAL *et al.*, 2004).

Os sistemas biológicos produtores de hidrogênio podem ser divididos em duas categorias: fotossintetizantes e fermentativos. Essa divisão é o mesmo que classificar os organismos como produtores de hidrogênio dependentes da luz como fonte primária de energia e como aqueles que obtêm energia a partir da oxidação de moléculas energéticas e que não necessitam de luz para a sua sobrevivência. No entanto, ambos produzem hidrogênio a partir da decomposição de um substrato.

No campo dos organismos fotossintetizantes estão algumas algas verdes e as cianobactérias. Esses organismos produzem hidrogênio por meio do processo de biofotólise. As bactérias fotossintetizantes também pertencem a esse grupo e produzem hidrogênio pela fotodecomposição de compostos orgânicos. Na categoria de sistemas fermentativos encontram-se as bactérias fermentativas. Certas bactérias liberam hidrogênio durante a fermentação de substratos orgânicos. No ecossistema equilibrado a produção de hidrogênio é acompanhada do consumo desse hidrogênio.

2.3.1 Biofotólise da água utilizando algas verdes e cianobactérias

Biofotólise é a ação da luz sobre um sistema biológico que resulta na decomposição de um substrato, geralmente água, para produzir hidrogênio. GHIRARDI e SEIBERT (2003) mostraram que as algas verdes possuem um mecanismo necessário e eficiente para produzir hidrogênio a partir da água. Elas produzem hidrogênio depois de um período de condições anaeróbias no escuro durante o qual a hidrogenase é ativada e sintetizada. No entanto, sob condições normais em que o oxigênio é subproduto da fotossíntese, a produção de hidrogênio não pode ser mantida por mais que alguns minutos. O oxigênio é um poderoso inibidor da Fe-hidrogenase. A inativação da enzima ocorre pela reação do oxigênio com o ferro localizado no centro catalítico da enzima. GHIRARDI e SEIBERT (2003) estudaram

estratégias para diminuir a sensibilidade ao oxigênio. Essas estratégias consistem na manipulação genética na hidrogenase para remover a sensibilidade do oxigênio e, futuramente, desenvolver recursos fisiológicos para separar o hidrogênio e oxigênio.

As cianobactérias também produzem hidrogênio pelo processo de biofotólise. Elas são consideradas boas candidatas num sistema produtor de hidrogênio por apresentarem requisitos nutricionais simples. As cianobactérias realizam fotossíntese e algumas estirpes são capazes de fixar o nitrogênio (N₂) em amônia (BENEMANN, 1996). Segundo TAMAGNINI (2002) três tipos de enzimas podem estar envolvidos no metabolismo do hidrogênio: nitrogenase, hidrogenase de assimilação e hidrogenase bidirecional.

2.3.2 Fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintetizantes

As bactérias fotossintetizantes são apresentadas na literatura como boas candidatas a um sistema microbiológico de produção de hidrogênio por apresentarem vantagens, tais como: alta conversão de hidrogênio, habilidade de usar amplo espectro de luz, habilidade de consumir substratos orgânicos derivados de resíduos, o que favorece o uso dessas bactérias num sistema produtor de hidrogênio em associação com o tratamento de efluentes. A produção fotobiológica de hidrogênio pode ser realizada por bactérias fotossintéticas utilizando a radiação solar para converter água, compostos de enxofre ou compostos orgânicos, em hidrogênio. KOKU *et al.* (2002) estudaram aspectos do metabolismo da *Rhodobacter sphaeroides*, uma bactéria púrpura não sulfurosa. Quando essas bactérias são submetidas a uma limitação de nitrogênio, a atividade da nitrogenase é induzida e resulta na produção de hidrogênio. A produção de hidrogênio, nesse caso, está associada à ação direta da nitrogenase, a qual catalisa a formação de hidrogênio na ausência de nitrogênio molecular. A eficiente operação dessa enzima, assim como no caso das cianobactérias,

requer grandes quantidades de ATP e capacidade redutora. Por essa razão a síntese e a atividade dessa enzima exigem um rígido controle regulatório. A hidrogenase tem sido encontrada em bactérias fotossintetizantes; no entanto, elas atuam tanto na produção quanto no consumo de hidrogênio. Portanto, nesse caso, a produção de hidrogênio é atribuída, principalmente, à atividade da nitrogenase.

Bactérias fotossintetizantes possuem uma vantagem em relação às bactérias fermentativas. Bactérias anaeróbias não são capazes de degradar glicose completamente a dióxido de carbono e hidrogênio. Essas bactérias, quando digerem um substrato produzem hidrogênio e ácidos orgânicos, pois a variação de energia livre dessa reação é negativa e não há energia suficiente para continuar degradando ácidos. Já as fotossintetizantes podem usar a energia da luz para superar essa barreira e são capazes de degradar ácidos orgânicos e produzir mais hidrogênio. MIYAKE e KAWAMURA (1990) propuseram utilizar os dois tipos de bactérias em um sistema híbrido. Isso diminuiria a demanda de luz utilizada pelas bactérias fotossintetizantes e produziria mais hidrogênio. De qualquer forma, bactérias fotossintetizantes requerem o uso de luz e a atividade da nitrogenase requer grandes quantidades de energia, o que favorece o uso de organismos fermentativos.

2.3.3 Produção de hidrogênio a partir da fermentação de compostos orgânicos

Para produzir hidrogênio biológico em escala industrial, os processos fermentativos oferecem mais vantagens em relação a outros processos. A principal vantagem é que as bactérias fermentativas podem produzir hidrogênio constantemente em um biorreator a partir de substratos orgânicos, sem necessidade de luz. Essas bactérias possuem alta velocidade de conversão de hidrogênio e ainda se reproduzem facilmente para suprir o meio de produção. Elas utilizam substrato simples, tais como açúcares puros (glicose e sacarose), melão de

cana-de-açúcar, ou mesmo águas residuárias. Glicose e sacarose são os substratos de fermentação mais utilizados em laboratório (UENO, OTSUKA, e MORIMOTO, 1996). Os autores operaram um reator em laboratório por 200 dias consecutivos, usando como substrato águas residuárias provenientes de uma fábrica de açúcar e obtiveram rendimento de 2,52 moles de hidrogênio por mol de hexose. Eles utilizaram em seus estudos uma microflora mista.

Somado a esses fatores há ainda o fato de que a fermentação microbiana em escala industrial é um processo conhecido e sua descoberta revolucionou a produção de diversos ácidos, tais como: ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, succínico, e alguns álcoois como: glicerol, isopropanol, butanol e butanodiol, o que facilita o desenvolvimento de reatores com a finalidade de produzir hidrogênio. Fermentações como essa consistem num processo ideal para um engenheiro químico, porque transformações químicas complexas, com muitos passos, são realizadas, em sua maioria à temperatura ambiente, com bons rendimentos e aparecimento de pouquíssimos produtos indesejáveis e ainda são máquinas vivas que se auto-reproduzem (LEHNINGER, NELSON e COX, 2000).

A produção biológica de hidrogênio comparada à produção de etanol leva vantagens, porque uma microflora geradora de hidrogênio é capaz de usar uma ampla faixa de substrato comparado com as leveduras, pelas quais o etanol é produzido. Devido à amplitude aproveitável de substrato há um ganho de energia em relação à produção de etanol (HAWKES *et al.*, 2002).

As bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio incluem: *Enterobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* e *E. coli* (DAS e VEZIROLU, 2001).

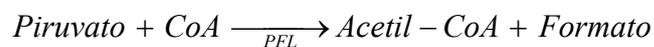
Estudos com *Clostridium* demonstram que essas bactérias possuem alto potencial de produção de hidrogênio e são as preferidas para tal finalidade, pois apresentam rendimentos na faixa de 1,61-2,36 mol de H₂ / mol de glicose. Já o gênero *Enterobacter* apresenta rendimentos em torno de um mol de hidrogênio por mol de glicose (HAWKES *et al.*, 2002).

Clostridia são bactérias caracterizadas por um metabolismo rápido e com capacidade de formar esporos em resposta à condições desfavoráveis do meio ambiente, ou quando submetidas ao aumento de temperatura ou à falta de nutrientes. Quando elas formam esporos necessitam de condições ambientais especiais e nutrientes específicos para a sua germinação.

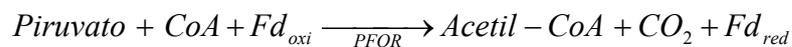
Em processos fermentativos, o hidrogênio é produzido pela ação de hidrogenases como meio de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação de um substrato orgânico. Na maioria dos microorganismos o hidrogênio é produzido por meio do metabolismo anaeróbico do piruvato formado durante o catabolismo da maioria dos substratos orgânicos (HALLENBECK e BENEMANN, 2002).

A degradação do piruvato é catalisada por um dos dois sistemas de enzimas a seguir:

1. Piruvato Formato Liase (PFL)



2. Piruvato Ferredoxina Redutase (PFOR)



Em ambos os sistemas biológicos o piruvato gerado pela glicólise é usado, na ausência de oxigênio, para produzir acetil-CoA e/ou formar formato ou Ferredoxina reduzida

(Fd_{red}) a partir da qual o hidrogênio pode ser produzido. O rendimento global de hidrogênio nesses organismos é relativamente baixo e é formado de um a dois moles de hidrogênio por mol de piruvato consumido. Isso ocorre por ser uma consequência natural da fermentação, que tem sido otimizada pela evolução para produzir biomassa e não hidrogênio. Desta forma a porção de substrato (piruvato) é usada nos dois casos para produzir ATP e como produto ácido acético, o qual é excretado da célula. Em alguns organismos o hidrogênio produzido é reduzido pelo reciclo de hidrogênio devido à presença de hidrogenases reversas, o qual consome a porção de hidrogênio produzido. Assim, a produção de hidrogênio pode ser aumentada com o uso de engenharia metabólica ou manipulação nas condições de cultivo (HALLENBECK e BENEMANN, 2002).

2.4 Bases Moleculares para Produção Biológica de Hidrogênio por Processos Fermentativos

Hidrogênio pode ser produzido pela fermentação de matéria orgânica rica em carboidratos. Esses organismos fermentativos obtêm energia para suas necessidades pela oxidação de moléculas energéticas. A glicose ou os seus polímeros (celulose e amido) são os substratos mais usados para tal finalidade. A decomposição dessa matéria orgânica libera hidrogênio e dióxido de carbono e parte dessa matéria orgânica permanece na forma de ácido acético e ácido butírico ou outros ácidos, dependendo da bactéria que fermenta.

As reações de produção de hidrogênio a partir da sacarose são representadas a seguir (KHANAL *et al.*, 2004):



Observa-se, pelos balanços de carbono, que se a bactéria produzisse apenas ácido acético como subproduto e não produzisse ácido butírico e nenhum outro ácido, ela produziria o dobro de moles de hidrogênio por mol de substrato. No entanto, essas reações são teóricas e baseadas em balanços estequiométricos. Na realidade a bactéria produz os dois ácidos, e além de etanol e lactato em menores quantidades. Porém esta relação pode variar com as condições de cultivo dentro dos limites termodinâmicos determinados (THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977). Uma diminuição da pressão parcial do hidrogênio resulta em um aumento na relação ácido acético e ácido butírico, o que leva a um aumento na produção de hidrogênio (VAN ANDEL *et al.*, 1985).

Essas bactérias podem utilizar como substrato um grande número de carboidratos, tais como xilose: galactose, celulose, sacarose, frutose e amido, todos com bons rendimentos.

Os organismos degradam moléculas energéticas como forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP, que é o principal transportador de energia química em todas as células. O substrato é degradado na primeira fase da fermentação em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar o piruvato e produzir ATP. A energia também é conservada em moléculas de NADH. Os elétrons gerados nessas reações são transferidos para coenzimas especializadas no transporte de elétrons, no caso o NAD^+ , que passa para sua forma reduzida, NADH. Quando um composto é oxidado ele perde elétron ou hidrogênio, o NAD^+ é o carregador de elétron, e quando reduzido fica na forma NADH. O NADH formado durante a degradação deve ser regenerado a NAD^+ . Na segunda fase da fermentação o ácido pirúvico é, então, reduzido através do hidrogênio do NADH em alguns compostos. No caso da *Clostridium* os compostos reduzidos produzidos a partir do piruvato

são: lactato, etanol, ácido butírico, ácido acético e hidrogênio (LEHNINGER, NELSON e COX, 2000).

O gênero *Clostridium* produz hidrogênio por meio da atividade das enzimas piruvato-ferredoxina-oxidoreductase e hidrogenase. A atividade da hidrogenase pode ser inibida em pH baixo. Em um processo anaeróbico típico o hidrogênio é produzido durante a fase de crescimento exponencial da *Clostridium*. Quando a população atinge o estado estacionário, inicia-se a produção de solventes e as reações de produção de ácidos e hidrogênio cessam. O pH deve ser mantido entre 5,5 e 5,7 (KHANAL *et al.*, 2004).

2.5 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum é uma bactéria Gram-positiva, estritamente anaeróbia, do gênero *Clostridium*. É caracterizada por um metabolismo rápido e com capacidade de formar esporos em resposta a condições desfavoráveis do meio ambiente, ou quando submetidas a um aumento de temperatura ou à falta de nutrientes (GIRBAL *et al.*, 1995a, 1995b).

Essas bactérias são conhecidas também como "Organismo Weizmann", em homenagem a CHAIM WEIZMANN, que ajudou a descobrir como culturas de *C. acetobutylicum* podem produzir acetona, butanol e etanol em processos industriais a partir de amido (WEIZMANN e ROSENFELD, 1937). *C. acetobutylicum* também produz ácido acético, ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio.

A Figura 2.2 mostra uma colônia de *C. acetobutylicum*.

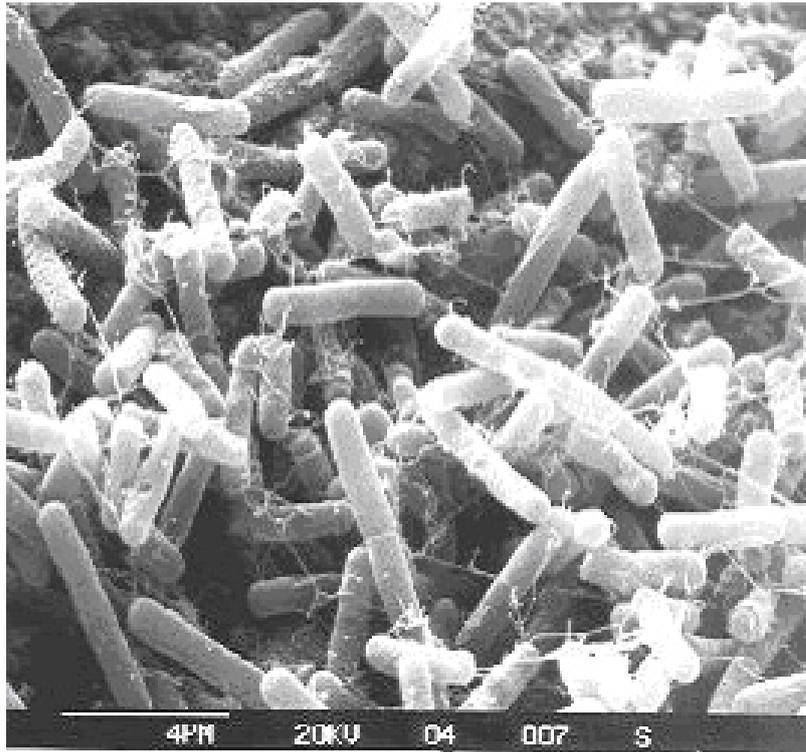


Figura 2.2 - *Clostridium acetobutylicum*. (Fonte: SIEMERINK, 2005).

A fermentação anaeróbia da *C. acetobutylicum* é um processo conhecido e muito usado industrialmente devido aos seus produtos de interesse (BOWLES e ELLEFSON, 1985; MATTA-EL-AMMOURI *et al.*, 1987). O processo industrial utilizando *C. acetobutylicum* é conhecido por fermentação ABE (Acetona, Butanol e Etanol) (Figura 2.3).



Figura 2.3 – Fermentação ABE. (Fonte: SIEMERINK, 2005).

O genoma da *C. acetobutylicum* ATCC 824 foi sequenciado e está disponível no *GenBank* (NC_003030) e consiste em um cromossomo de 3,94 Mpb com um megaplasmídeo de 192 kpb que contém a maioria dos genes responsáveis para a produção de solvente (NOLLING *et al.*, 2001).

Alguns parâmetros cinéticos de reações metabólicas estão disponíveis na literatura. Essas informações permitem o uso de engenharia metabólica no melhoramento genético desse organismo como forma de obter um organismo com características desejadas.

2.5.1 *Metabolismo da C. acetobutylicum*

As vias metabólicas utilizadas para a conversão dos carboidratos em hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos e os solventes pela *C. acetobutylicum* estão firmemente estabelecidas (JONES e WOODS, 1986).

O complexo metabolismo da *C. acetobutylicum* tem sido estudado em detalhes nos últimos anos (BOWLES e ELLEFSON, 1985; MATTA-EL-AMMOURI *et al.*, 1987; VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994; GIRBAL *et al.*, 1995a, 1995b) e freqüentemente mostra um padrão de fermentação bifásico. Após produzir ácido acético, ácido butírico e hidrogênio, durante a fase de crescimento exponencial, inicia-se a formação de solventes (etanol, acetona e butanol), a qual ocorre bem próxima à fase estacionária. O mecanismo no início da fase de formação de solventes atualmente tem sido foco de muitas pesquisas científicas (BOWLES e ELLEFSON, 1985; JONES e WOODS, 1986; TERRACCIANO e KASHKET, 1986; GIRBAL e SOUCAILLE, 1994; VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994; GIRBAL *et al.*, 1995a, 1995b) e tem mostrado estar associado ao efeito do pH ácido.

Durante a glicólise da *C. acetobutylicum* é gerado menos ATP e mais NADH do que o necessário para a biossíntese e o crescimento. A produção dos ácidos resulta da geração de ATP adicional necessária para a célula. Entretanto, somente uma parcela dos equivalentes redutores produzidos durante a glicólise é consumida durante a produção dos ácidos. Estas bactérias têm a habilidade de produzir hidrogênio, que fornece à célula uma rota eficiente para a eliminação de prótons e de elétrons adicionais (JONES e WOODS, 1986). Nessas bactérias a hidrogenase (E.C 1.12.7.2) é a enzima que permite usar prótons como receptores terminais de elétrons. A ferredoxina possui papel-chave no transporte e na distribuição de elétrons na célula. Sob condições apropriadas, a ferredoxina reduzida é capaz de transferir elétrons para o ferro contido na hidrogenase, o que permite o uso dos prótons como um receptor final de elétrons, resultando na produção do hidrogênio molecular. Durante essa etapa a ferredoxina é reoxidada e o gás hidrogênio é liberado da célula. Outra enzima-chave na distribuição de elétrons é a NADH ferredoxina oxidoreductase (E.C. 1.18.1.3), que atua na oxidação ou na redução do NAD pelo equilíbrio de elétrons entre NAD e ferredoxina (ver Figura 2.4).

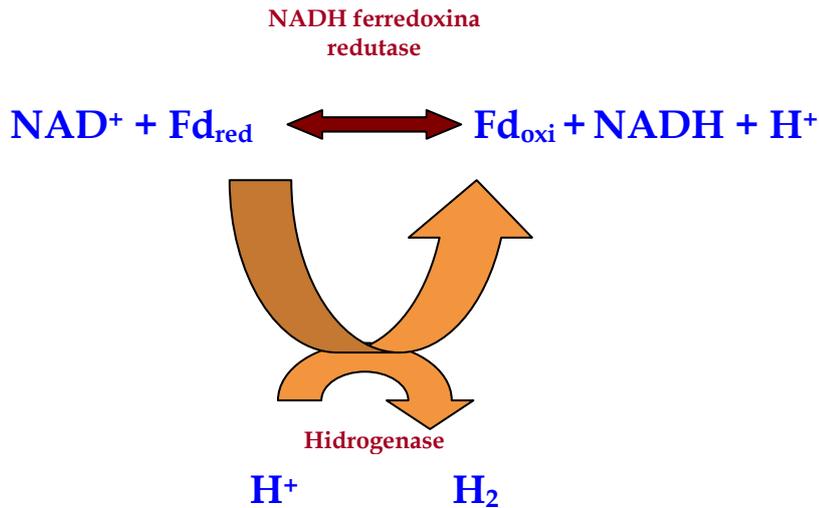


Figura 2.4 – Esquema da produção de hidrogênio.

Durante o metabolismo da produção de ácidos há um fluxo rápido de elétrons decorrente tanto da quebra do piruvato quanto da regeneração do NADH por meio da ferredoxina para produzir hidrogênio.

A conversão de piruvato em acetil-CoA é catalisada pelo complexo de piruvato desidrogenase (EC 1.2.7.1). Esse complexo é um dispositivo altamente integrado, composto de três classes de enzimas (STRYER, 1996). Outros nomes para essa enzima podem ser encontrados: piruvato oxidoreductase, piruvato sintase, piruvato ferredoxina oxidoreductase e pirúvico-ferredoxina oxidoreductase.

Além da conversão do piruvato para acetil-CoA, *C. acetobutylicum* pode também converter o piruvato em ácido láctico sob determinadas circunstâncias. A via do ácido láctico em circunstâncias normais parece ocorrer somente como alternativa para permitir que a geração da energia e a oxidação do NADH continuem quando os mecanismos para a eliminação dos prótons e elétrons pela geração de hidrogênio molecular são obstruídos. A produção de ácido láctico foi observada na diminuição da atividade da hidrogenase, por meio de inibição por monóxido de carbono ou da ausência de ferro, devido aos baixos níveis da ferredoxina e da hidrogenase (JONES e WOODS, 1986).

O fluxo de carbono a partir das ramificações do acetil-CoA conduz à formação dos ácidos e dos solventes, como mostra a Figura 2.6. Esses pontos de bifurcação ocorrem em três metabólitos intermediários: acetil-CoA, acetoacetil-CoA e butiril-CoA.

A tiolase (E.C 2.3.1.19) é a enzima que catalisa a condensação de acetil-CoA a acetoacetil-CoA e é inibida em níveis micromolares de CoA. O mecanismo encontrado para essa reação foi de *ping pong bi bi* (WIESENBORN, RUDOLPH e PAPOUTSAKIS, 1988). *Ping pong bi bi* trata-se de um modelo cinético oscilatório, onde o substrato A e o substrato B não se encontram mutuamente na superfície da enzima.

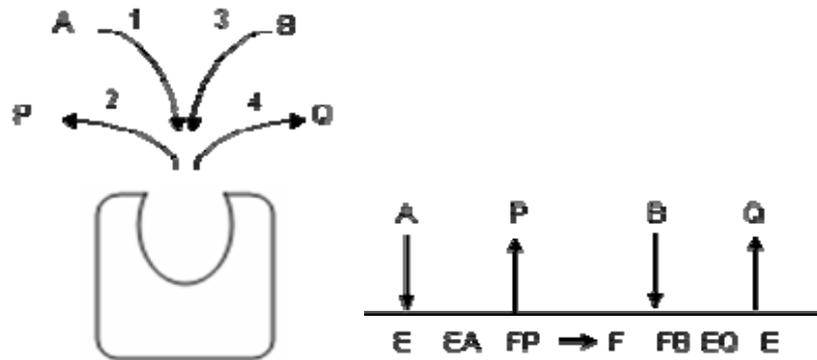


Figura 2.5 – Esquema do modelo cinético *Ping Pong bi bi*.

Durante a fase de produção de ácidos, o ácido acético e o ácido butírico são produzidos a partir do acetil-CoA e butiril-CoA por meio de duas etapas análogas que resultam na produção de acetil-fosfato e butiril-fosfato correspondente, seguidas pela geração de ATP. A butirato quinase da *C. acetobutylicum* foi observada exibindo atividade reversível. Além da tiolase, mais três enzimas estão envolvidas na via metabólica para a formação de butiril-CoA a partir do acetil-CoA, a 3-hidroxi-butiril-CoA dehidrogenase, a crotonase e a butiril-CoA dehidrogenase.

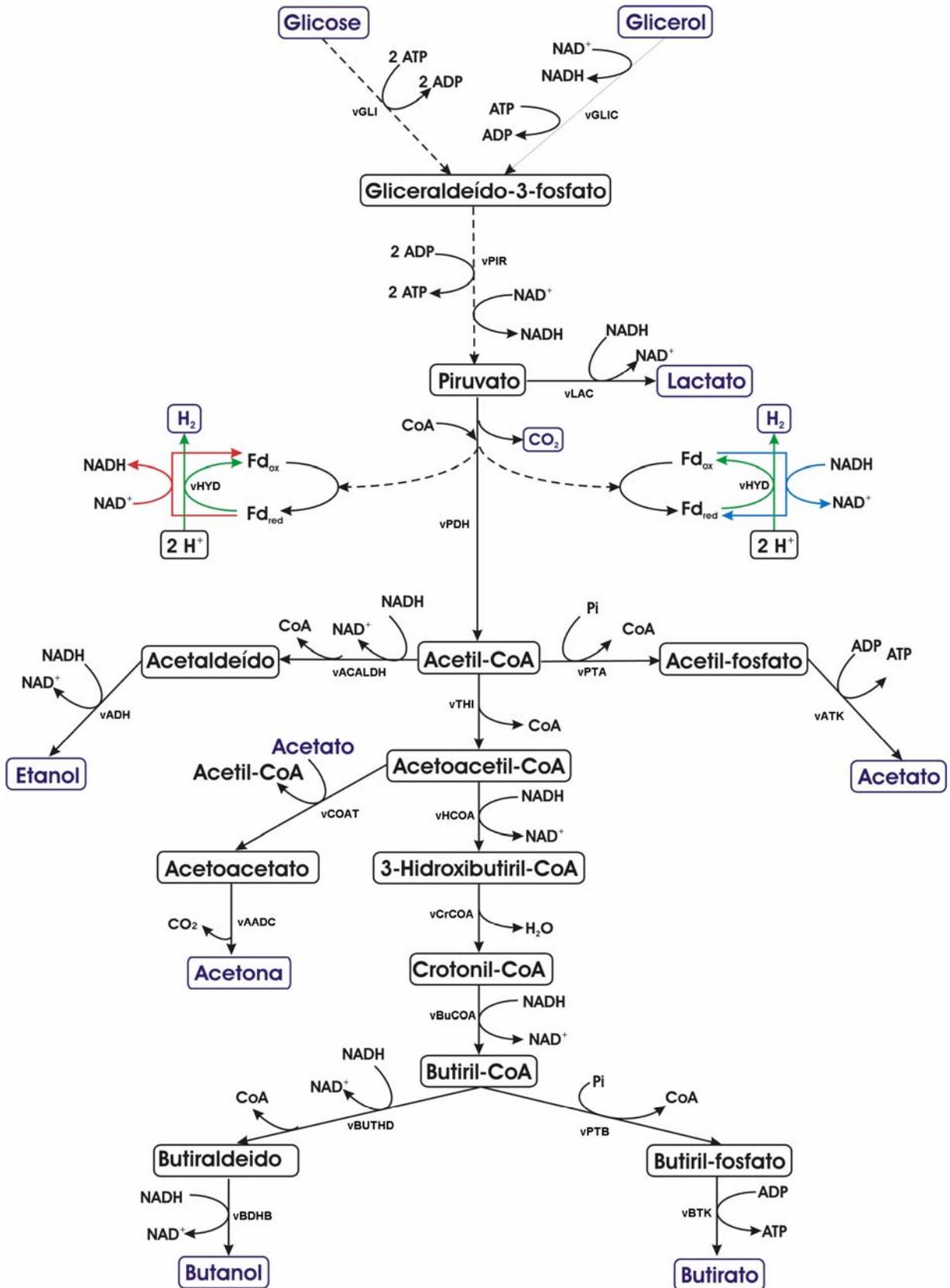


Figura 2.6 – Via metabólica da *Clostridium acetobutylicum*. Adaptado de GIRBAL *et al.* (1995a).

O início da produção de solventes envolve uma interrupção no fluxo de carbono nas vias de produção de ácidos para as vias de produção de solventes. Durante a produção de solvente, o acetil-CoA e a butiril-CoA atuam como intermediários para a produção de etanol e de butanol. Essas vias produzem o acetaldeído e o butiraldeído, respectivamente, como intermediários, e requerem duas desidrogenases que atuam nas reduções necessárias para produzir etanol e butanol. A redução de butiril-CoA a butanol é mediada pela butiraldeído desidrogenase e pela butanol desidrogenase (ANDERSCH, BAHL e GOTTSCHALK, 1983).

Em culturas em batelada o início e a manutenção da produção de solventes estão associados ao baixo pH extracelular e intracelular e à alta concentração de ácido butírico não dissociado (TERRACCIANO e KASHKET, 1986). Em culturas em contínuo, ATP e NADH disponíveis revelam papel-chave na seletividade dos produtos. Altas concentrações de ATP relacionadas com a baixa demanda de ATP ou à alta eficiência de geração de ATP conduz para o aumento da produção de solventes. Isso ocorre nas seguintes situações (GIRBAL e SOUCAILLE, 1994):

- culturas contendo glicose suficiente a baixo pH e com reciclo de biomassa;
- cultura com limitação de ferro, nitrogênio ou fosfato; e
- durante a mudança induzida em culturas com limitação de fosfato pela redução do pH ou pela adição de ácidos orgânicos.

A produção tanto de etanol quanto de butanol está associada ao aumento da disponibilidade de potencial redutor.

A flexibilidade metabólica foi estudada por GIRBAL *et al.* (1995b) pela variação do grau de redução do substrato, usando misturas de glicose, glicerol e piruvato, ou pela adição

de *Neutral red*, um carregador de elétrons artificial, ou pela redução do pH de operação de 6,5 para 4,4. A existência de dois tipos diferentes de mecanismos de mudança para a produção de butanol tem sido demonstrada com dois padrões distintos de expressão das enzimas envolvidas na distribuição do fluxo de elétrons e na via de formação de solventes.

Culturas crescendo em meio contendo apenas glicose como fontes de carbono produzem somente ácidos (acético e butírico) e hidrogênio molecular. Culturas crescendo em meios contendo glicose e glicerol (com uma relação molar glicose/glicerol de 1,96) produzem principalmente alcoóis com baixa produção de ácidos e hidrogênio e nada de acetona. O glicerol é um substrato mais redutor que a glicose: para a mesma quantidade de carbono, o metabolismo do glicerol libera duas vezes mais NADH do que para glicose. O excesso de equivalente redutor fornecido pela conversão de glicerol em piruvato deve ser oxidado pela via de consumo de NADH (Ver Figura 2.6). Surpreendentemente esse potencial redutor não é usado para formar hidrogênio, que é produzido, geralmente, como forma de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a glicólise. O que ocorre é que parte da ferredoxina reduzida produzida via piruvato-ferredoxina oxidoreductase foi usada para gerar NADH, levando a uma baixa na produção de hidrogênio (GIRBAL *et al.*, 1995a). Os resultados estão mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Parâmetros da fermentação contínua em culturas no estado estacionário de *C. acetobutylicum* com limitação de fosfato.

Parâmetros	Glicose	Glicose-Glicerol
Quantidade de substrato (mM)		
Glicose	167	83
Glicerol	-	163
Biomassa (g/l)	0,93	1,06
Velocidade específica de formação ou consumo (mmol/h g em massa seca)		
Glicose	8,72	3,94
Glicerol	-	4,65
Etanol	0,26	1,30
Butanol	0,01	3,86
Acetona	0,02	0,00
Acetato	3,67	0,42
Butirato	6,09	0,66
Lactato	0,00	0,00
CO ₂	16,60	11,00
H ₂	19,10	7,24

Fonte: GIRBAL *et al.*, 1995a.

2.6 Engenharia Metabólica

Metabolismo é o conjunto de todos os processos bioquímicos que ocorrem numa célula. O estudo do metabolismo é de extrema importância para se entender como manipular o genoma e as condições de cultivo de um organismo no intuito de melhorar os processos de obtenção de produtos de interesse do homem. A manipulação de vias metabólicas para aumentar a produtividade de algum produto de interesse na economia tem sido alvo de estudo na biotecnologia. Aumentar a produtividade de um produto consiste em manipular geneticamente ou modificar as condições de cultivo do organismo produtor. Esse conceito de modificações de vias metabólicas com o objetivo de aumentar a produtividade de um elemento é antigo. Ele consiste em manipular geneticamente e escolher as linhagens que melhor atendem ao objetivo desejado. Experimentos de mutações randômicas, ou seja, mutações aleatórias, contribuíram para o desenvolvimento de diversos produtos na indústria, porém são experimentos que consomem muito esforço econômico e humano. Com os avanços

em técnicas de biologia molecular que aconteceram nos últimos anos, é possível obter modificações específicas. Esse conceito é conhecido como engenharia metabólica. As reações são identificadas e técnicas de biologia molecular são aplicadas com o objetivo de amplificar, induzir ou deletar um gene ou uma enzima. Observações sobre comportamento celular em geral são guias para futuras modificações (STEPHANOPOULOS, 1998).

Engenharia metabólica é o melhoramento das propriedades celulares por meio de modificações em reações bioquímicas específicas ou da introdução de outras com o uso da tecnologia do DNA recombinante (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998). Trata-se de um conceito abrangente que envolve muitas áreas da ciência: princípios de engenharia química, ciências da computação, matemática, bioquímica e biologia molecular.

A modelagem matemática é a metodologia principal na engenharia metabólica (WIECHERT, 2002). Decisões de engenharia embasada numa estrutura lógica exigem modelos matemáticos que representem o comportamento dos microorganismos em bioprocessos. Devido à complexa relação entre subsistemas e à não-linearidade e heterogeneidade do comportamento cinético dos elementos no sistema, as quais são características de processos biológicos, os modelos matemáticos têm sido extremamente necessários para análises de sistemas biológicos complexos e para a realização de decisões lógicas apropriadas (BAILEY, 1998).

Existem muitas aplicações da engenharia metabólica. A primeira é aumentar os rendimentos e a produtividade de produtos nativos sintetizados por microorganismos, a segunda aplicação é estender o range de substratos e a terceira é a produção de produtos que são novos para a célula hospedeira (STEPHANOPOULOS, 1998).

2.7 Análise de Fluxo Metabólico

A primeira etapa para o entendimento dos mecanismos celulares é a observação sob diferentes condições. É complicado observar o que ocorre no interior da célula: elas apenas podem ser quantificadas através de medidas extracelulares. Neste contexto, torna-se necessário o uso da análise de fluxo metabólico. O uso dessa ferramenta permite a quantificação dos fluxos internos de uma via metabólica.

A Análise de Fluxo Metabólico (MFA) é a quantificação de fluxos no metabolismo de um dado organismo de interesse, sob condições definidas. O resultado desta análise fornece um diagnóstico do metabolismo. A importância desse diagnóstico está na comparação com condições de cultivo diferentes ou com outros organismos geneticamente modificados. Esse diagnóstico é feito com base em um modelo matemático que se resume em encontrar soluções para um sistema linear de equações algébricas que representam a estequiometria das reações metabólicas consideradas.

A Análise de Fluxo Metabólico é aplicada a partir de um modelo estequiométrico obtido com base nas reações bioquímicas da célula. Esse modelo representa o metabolismo celular. As reações podem ser obtidas na literatura ou a partir de dados experimentais. O modelo estequiométrico é baseado em balanços de massa nos metabólitos considerados.

Desta forma, é possível extrair uma série de informações sobre o metabolismo, as quais podem ser divididas em alguns casos típicos, de acordo com STEPHANOPOULOS e colaboradores (1998). São eles:

- identificação dos controles nos pontos de bifurcação: pela comparação em diferentes condições de cultivo ou com diferentes mutantes da variação no fluxo em uma bifurcação, é possível saber a flexibilidade ou a rigidez de pontos de bifurcação. Em geral,

ponto de bifurcação rígido resiste a variações na razão de divisão de fluxo, enquanto que pontos de bifurcação flexíveis tendem a serem mais ajustáveis. O conhecimento de tais características de uma rede metabólica é importante na racionalização das modificações que terão mais efeitos na alteração dos rendimentos de produtos;

- identificação de vias metabólicas alternativas: a formulação da estequiometria das reações, que é a base do MFA, requer conhecimento detalhado da rota bioquímica, na qual os substratos são convertidos em produtos. Isso, no entanto, pode não ser evidente para muitos microorganismos e muitas vias metabólicas alternativas têm sido encontradas em diferentes organismos e são identificadas por operar em condições de cultivo diferente;
- cálculo de fluxos extracelulares não medidos: em alguns casos, o número de fluxos extracelulares que podem ser medidos é menor do que o necessário para o cálculo de fluxos intracelulares desconhecidos. Nesses casos, é possível obter tais fluxos usando a razão de separação de fluxo, e
- cálculo de rendimentos teóricos máximos: a separação dos fluxos pode ser ajustada de forma a maximizar a quantidade do produto formado e, ainda, identificar os metabólitos limitantes.

O ponto inicial da MFA é a estequiometria da rede de reações que descreve como os substratos são convertidos em produtos metabólicos e constituintes da biomassa. A Equação (2.1) representa o balanço de massa para um estado variável:

$$\frac{dX_{met}}{dt} = r_{met} - \mu X_{met} \quad (2.1)$$

onde:

r_{met} - Velocidade de síntese dos metabólitos intermediários nas reações da via metabólica;

μ - Velocidade específica de crescimento;

X_{met} - Concentração intracelular dos metabólitos.

A diluição do conjunto de metabólitos devido ao crescimento da biomassa está representada pelo segundo termo da mesma equação. Os efeitos de diluição são considerados muito pequenos quando comparados com os fluxos que afetam os mesmos metabólitos devido ao baixo nível intracelular da maioria dos metabólitos. Desta forma, o segundo termo do lado direito da Equação (2.1) é considerado zero na maioria dos casos. Considerando-se que as concentrações dos metabólitos se ajustam a novos níveis rapidamente, é usada a hipótese de estado pseudo-estacionário, ou seja, o volume não muda e as concentrações dos metabólitos não variam em um curto período de tempo. Assim, o primeiro termo da Equação (2.1) é igual à zero. Desta forma a Equação (2.1) torna-se:

$$r_{met} - \mu X_{met} = 0 \quad (2.2)$$

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, isto é:

$$r_{met} = \mathbf{S}^T \mathbf{v} = 0 \quad (2.3)$$

Assim, obtém-se a equação geral da Análise de Fluxo Metabólico representada pela Equação (2.4):

$$\mathbf{S}^T \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (2.4)$$

onde \mathbf{S} é a matriz estequiométrica e \mathbf{v} é o vetor de fluxos (que contém os fluxos a serem determinados). A Equação (2.4) é a base para a Análise de Fluxo Metabólico. Essa equação vetorial representa K balanços algébricos lineares para K metabólitos com \mathbf{J} fluxos não conhecidos. Como o número de reações (\mathbf{J}) é sempre maior que o número de metabólitos da via (K), existe sempre um certo grau de liberdade no conjunto de equações algébricas dado por $F = J - K$. Alguns elementos de “ \mathbf{v} ” devem ser medidos ou conhecidos para permitir a determinação dos outros. Se exatamente F fluxos são medidos, o sistema torna-se determinado e a solução é única. Se o número de fluxos medidos é superior a F , o sistema é superdeterminado, o que significa que existem equações a mais 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 não conhecidos podem ser determinados apenas se as restrições adicionais forem induzidas ou se um critério de otimização global for imposto aos balanços metabólicos. Em um sistema determinado, os fluxos não conhecidos podem ser obtidos a partir da Equação (2.4) reescrita da seguinte forma:

$$\mathbf{S}^T \mathbf{v} = \mathbf{S}_m^T \mathbf{v}_m + \mathbf{S}_c^T \mathbf{v}_c \quad (2.5)$$

onde \mathbf{v}_m é um vetor que contém os fluxos medidos e \mathbf{v}_c é o vetor de fluxos não medidos (representam as velocidades a serem calculadas). Igualmente, a matriz dos coeficientes estequiométricos \mathbf{S} é dividida em \mathbf{S}_m , que corresponde à matriz dos coeficientes dos metabólitos das reações que foram medidas, e \mathbf{S}_c , que corresponde aos metabólitos internos que serão determinados. O vetor de fluxos não medidos \mathbf{v}_c , pode ser estimado a partir da Equação (2.6).

$$\mathbf{v}_c = -(\mathbf{S}_c^T)^{-1} \cdot \mathbf{S}_m^T \cdot \mathbf{v}_m \quad (2.6)$$

Em sistemas superdeterminados, S_c não pode ser invertível e a solução pode ser obtida pelo uso da pseudo-inversa da matriz:

$$v_c = -\left(S_c^T\right)^\# \cdot S_m^T \cdot v_m \quad (2.7)$$

A reconciliação estatística com o objetivo de se obterem melhores estimativas para os fluxos medidos e não medidos é obtida de acordo com a Equação (2.8). A reconciliação estatística usa ferramentas de estatística para que os dados experimentais sejam melhorados, adaptando-os melhor aos balanços de massa e reduzindo os erros experimentais.

$$R = S_m^T - S_c^T \cdot S_c^{T\#} \cdot S_m^T \quad (2.8)$$

O *rank* de R indica o número de equações linearmente independentes. Com base no *rank* obtém-se a matriz de redundância reduzida (Equação 2.9).

$$R_r = K \cdot R \quad (2.9)$$

A reconciliação estatística permite novas estimativas para os fluxos medidos por meio da Equação (2.10):

$$v_{m,new} = \left(I - R_r \left(R_r \cdot R_r \right)^{-1} R_r \right) v_m \quad (2.10)$$

Assim, novos fluxos calculados podem ser obtidos a partir da Equação (2.6). A qualidade do modelo proposto pode ser analisada pela Equação (2.11).

$$C = \|S^T\| \cdot \left\| \left(S^T \right)^\# \right\| \quad (2.11)$$

De acordo com STEPHANOPOULOS (1998), para uma matriz estequiométrica ser considerada bem condicionada, o número condicional deve estar entre 1 e 100.

A análise de sensibilidade indica qual a via mais vulnerável a pequenas variações nas medidas, e pode ser obtida por meio da Equação (2.12).

$$\frac{dv_c}{dv_m} = -\mathbf{S}_c^{T\#} \cdot \mathbf{S}_m^T \quad (2.12)$$

2.8 Análise de Controle Metabólico

Modificação no metabolismo de um determinado organismo com o objetivo de aumentar os rendimentos de um produto não é uma tarefa fácil. No entanto, a partir do momento em que se identificam as enzimas que controlam a produção do metabólito de interesse, é possível, com o uso de *kits* comerciais de modificação genéticas, inibidores enzimáticos ou ativadores, dependendo do caso, atingir o objetivo desejado. Portanto, o primeiro passo é a identificação das etapas que controlam a produção do produto desejado. Muitos pesquisadores têm usado como ferramenta a Análise de Controle Metabólico para essa finalidade.

HOEFNAGEL *et al.* (2000), interessados na produção biotecnológica de compostos aromáticos tais como, diacetil, acetaldeído e acetoína, utilizaram um modelo matemático para identificação dos pontos chaves para a produção desses compostos na via metabólica da *Lactococcus lactis*. O modelo está baseado na cinética enzimática das reações da via do piruvato combinado com a análise de controle metabólico. Os resultados indicaram as enzimas que produziam maior efeito na produção desses compostos. Normalmente esses compostos são produtos secundários com pequenos rendimentos. Neste trabalho foram realizadas modificações experimentais com o objetivo de confirmar as predições do modelo e obtiveram 75% de aumento nas taxas de formação do produto desejado.

Outros trabalhos realizados *in silico* com essa finalidade estão publicados na literatura (CORTASSA e AON, 1994; CHASSAGNOLE *et al.*, 2002).

A produção biotecnológica de compostos de interesse está diretamente relacionada a uma rede complexa de reações metabólicas. Esta complexidade torna impossível a

identificação intuitiva dos mecanismos responsáveis pelo controle da produção dos metabólitos. Por isso, torna-se necessário o uso de ferramentas matemáticas que auxiliam na determinação desses controles.

Um dos mais importantes objetivos da engenharia metabólica é a avaliação dos parâmetros responsáveis pelo controle dos fluxos. Os fluxos metabólicos podem ser determinados a partir dos balanços de massas em metabólitos intracelulares. O conceito de análise de fluxo metabólico é proveitoso para o estudo das interações entre diferentes vias e quantificação da distribuição dos fluxos sobre os pontos de bifurcação. Porém, a MFA não fornece nenhuma medida quantitativa de controle de fluxo. O controle de fluxo é importante para a manutenção das velocidades de síntese e conversão dos metabólitos balanceados sobre uma ampla variedade de condições externas, sem o aumento ou a queda brusca da concentração dos metabólitos intracelulares (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

Um dos principais objetivos da engenharia metabólica é o esclarecimento da estrutura cinética da rede de reações metabólicas responsáveis pelos fluxos e pelos níveis metabólicos (STEPHANOPOULOS, 1998). KASCER e BURNS (1973), e paralelamente, HEINRICH e RAPAPORT (1974) introduziram o conceito de Análise de Controle Metabólico (MCA), que consiste num sistema para estimar o controle do metabolismo. MCA é uma abordagem sistemática para estimar os efeitos relativos a variações nos níveis de diferentes enzimas, em fluxos e metabólitos, quando eles atuam simultaneamente (KASCER e BURNS, 1973; HEINRICH e RAPOPORT, 1974). Esse conceito tem atraído muito interesse e tem sido amplamente estudado (FELL e SAURO, 1985; SAURO, SMALL e FELL, 1987; FELL e SAURO, 1990; EHLDE e ZACCHI, 1997).

Em geral, MCA é uma estrutura de análise de sensibilidade do sistema e um dos principais métodos desenvolvidos para a descrição quantitativa do metabolismo que permitem a análise e o estudo das respostas do sistema metabólico a variações nos seus parâmetros.

O entendimento de controle de fluxos é importante para a modificação lógica de fluxos metabólicos, que é a meta central da engenharia metabólica. A descoberta de inibição por *feedback*, cooperatividade e modificação covalente em enzimas e o controle da síntese da enzima revelam um número de mecanismos que podem representar uma função no controle de fluxo.

As principais razões para o desenvolvimento da MCA foram:

- a quantificação de como os fluxos no estado estacionário e as concentrações variam em resposta a perturbações; e
- relacionar as propriedades locais do sistema com as propriedades individuais dos componentes do sistema.

MCA é aplicada somente em sistemas que se encontram no estado estacionário ou pseudo-estado estacionário. A atividade da enzima consiste em parâmetro do sistema, assim como a concentração do substrato da primeira reação da via e do produto da última reação da via. A concentração desses metabólitos deve ser mantida constante ou por controle das condições ambientais em quimiostato, por exemplo, ou por meio da regulação intracelular. Parâmetros do sistema, em princípio, podem ser variados e definem o sistema. As propriedades que são determinadas a partir de parâmetros, tais como velocidades das reações ao longo da via metabólica ou concentração de metabólitos intermediários são consideradas variáveis do sistema. MCA relaciona variáveis do sistema com os seus parâmetros (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

As variáveis e os parâmetros do sistema são relacionados por meio dos coeficientes de controle. Esses coeficientes descrevem como um parâmetro (atividade de uma enzima na via metabólica) afeta uma variável do sistema (a velocidade das reações ao longo de uma via metabólica) (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

O coeficiente de controle mais importante é conhecido como coeficiente de controle de fluxo (FCC, do inglês *Flux Control Coefficient*) e é definido pela variação relativa da velocidade no estado estacionário resultante de uma variação infinitesimal da atividade de uma enzima de uma via metabólica sobre a variação relativa da atividade enzimática. Como a atividade enzimática é um parâmetro do sistema independente, sua variação afetará a velocidade tanto diretamente quanto indiretamente por meio de variações transmitidas sobre outras variáveis do sistema (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

A Equação (2.13) representa essa definição:

$$C_i^{J_j} = \frac{e_i}{J_j} \frac{dJ_j}{de_i} = \frac{d \ln J_j}{d \ln e_i} \quad (2.13)$$

onde J_j é o fluxo no estado estacionário de uma reação j na via metabólica e e_i é a concentração da enzima E_i . A Equação (2.13) é a definição original proposta por KACSER e BURNS (1973). Outra definição de coeficiente de controle de fluxo foi apresentada por HEINRICH, RAPOPORT e RAPOPORT (1977) como:

$$C_i^{J_j} = \frac{v_i}{J_j} \frac{dJ_j}{dp} \left(\frac{\partial v_j}{\partial p} \right)^{-1} \quad (2.14)$$

onde p pode ser qualquer parâmetro que atua exclusivamente na velocidade de reação i . Essa é uma definição mais geral: se a atividade enzimática é escolhida como parâmetro, então a Equação (2.14) é reduzida à Equação (2.13) (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

A enzima que possui maior coeficiente de controle de fluxo exerce maior controle no fluxo para um dado estado estacionário. Com um aumento na atividade da enzima, por exemplo, i provocaria um grande aumento no fluxo da reação j . Os FCC's podem assumir valores tanto positivos quanto negativos.

Uma importante consequência da normalização dos FCC's é que a soma deles com relação a cada fluxo deve ser igual à unidade. Essa soma é conhecida como "Teorema da Soma dos Coeficientes de Controle", e é representada pela Equação (2.15):

$$\sum_{i=1}^L C_i^{J_j} = 1 \quad (2.15)$$

A partir dessa equação fica claro que os FCC's são completamente dependentes da estrutura do sistema.

FCC's podem ser usados para fazer previsões de quanto uma perturbação na atividade de uma enzima afetará um determinado fluxo de uma via metabólica.

Outro coeficiente similar é o coeficiente de controle de concentração (CCC, do inglês *Concentration Control Coefficient*), em que a variável afetada pela atividade da enzima é a concentração do metabólito. A Equação (2.16) define essa relação:

$$C_i^{x_j} = \frac{e_i}{x_j} \frac{dx_j}{de_i} = \frac{d \ln x_j}{d \ln e_i} \quad (2.16)$$

onde x_j é a concentração do metabólito X_j no estado estacionário. O valor do coeficiente de controle de concentração é a medida do grau de controle exercido pela enzima E_i na concentração x_j no estado estacionário. Para cada um dos metabólitos da via a soma de todos os CCC's deve ser igual a zero:

$$\sum_{i=1}^L C_i^{x_j} = 0 \quad (2.17)$$

A Equação (2.17) implica que para cada metabólito pelo menos uma enzima deve exercer controle negativo. Por exemplo, quando o nível de uma determinada enzima aumenta, a concentração do metabólito diminui.

O terceiro tipo de coeficiente é o coeficiente de elasticidade que é definido pela Equação (2.18):

$$\varepsilon_j^i = \frac{x_j}{v_i} \frac{\partial v_i}{\partial x_j} = \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln x_j} \quad (2.18)$$

onde v_i é a velocidade da reação da enzima E_i e x_j é a concentração do metabólito X_j . O coeficiente de elasticidade é a medida de como a velocidade de reação v_i responderá a variações na concentração x_j , quando todas as demais concentrações são mantidas constantes.

Os dois coeficientes de controle, FCC e CCC, são propriedades globais do sistema metabólico de forma que eles refletem no estado da via metabólica como um todo. A variação de um parâmetro da via (por exemplo, um valor de K_m , a concentração de uma enzima, etc.) irá afetar todos os coeficientes de controle da via. Por outro lado, o coeficiente de elasticidade é uma propriedade local e reflete somente no estado de uma simples enzima ou de seus causadores. Os coeficientes de elasticidades assumem valores positivos quando estimulam a reação e assumem valores negativos quando diminuem a velocidade da reação.

KACSER e BURNS (1973) definiram o teorema da conectividade que é considerado o mais importante dos teoremas do MCA, porque ele fornece o significado para entendimento

de como a cinética de enzimas locais afetam o controle do fluxo. A Equação (2.19) define o teorema:

$$\sum_{i=1}^L C_i^{J_j} \varepsilon_{X_j}^i = 0 \quad (2.19)$$

Por essa relação é possível observar que grandes elasticidades são associadas a pequenos coeficientes de controle de fluxo, e vice-versa. Reações que operam perto do equilíbrio termodinâmico normalmente são muito sensíveis a variações na concentração dos metabólitos, ou seja, suas elasticidades são altas, o que indica que os coeficientes de controle de fluxo são pequenos (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

O teorema da conectividade relaciona os coeficientes de elasticidade aos coeficientes de controle e, junto com o teorema da soma, formam um sistema linear de equações que torna possível o cálculo das propriedades globais (os coeficientes do controle) a partir das propriedades locais (os coeficientes da elasticidade).

2.8.1 Determinação dos coeficientes de controle de fluxo

A magnitude dos coeficientes de controle de fluxo fornece uma medida do aumento relativo do fluxo que é esperado a partir da amplificação da atividade enzimática. Porém, isso não significa que o aumento do fluxo será proporcional aos FCC's para qualquer amplificação na atividade. No entanto, a medida fornecida pelos FCC's pode ser uma aproximação razoável, especialmente para pequenas variações na atividade enzimática. Etapas enzimáticas com FCC's perto da unidade qualificam esta enzima como etapa limitante. Por outro lado, pequenos FCC's indicam dispersão de controle de fluxo ao longo de muitas etapas, com nenhuma etapa controladora do fluxo (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

Vários métodos têm sido propostos na literatura para determinação dos FCC's. Esses métodos podem ser classificados da seguinte maneira de acordo com STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN (1998):

- métodos diretos, em que os coeficientes de controles são determinados diretamente a partir de medidas do fluxo e da atividade, seguindo pequenas, mas finitas variações na atividade da enzima;
- métodos indiretos, em que o coeficiente de elasticidade é determinado inicialmente e os coeficientes de controle são calculados a partir dos teoremas de MCA, e;
- determinação dos FCC's a partir da medida da concentração dos metabólitos no estado transiente.

No método indireto (que foi utilizado como base nesse trabalho) uma via metabólica arbitrária que contém m metabólitos internos e n reações pode ser convenientemente descrita por uma matriz \mathbf{N} ($m \times n$) chamada matriz estequiométrica. Cada linha da matriz \mathbf{N} corresponde a um metabólito interno (concentração) e cada coluna corresponde a uma reação (taxa). A matriz é construída de acordo com REDER (1988), e os elementos n_{ij} são definidos como segue:

- $n_{ij} = +z$ se a reação j produzir moléculas do metabólito i .
- $n_{ij} = -z$ se a reação j consumir moléculas do metabólito i .
- $n_{ij} = 0$ se a reação j nem produzir nem consumir moléculas do metabólito i .

As relações estruturais da via metabólica podem ser deduzidas facilmente a partir da matriz estequiométrica. Se a matriz \mathbf{N} tem o *rank* m_0 , onde m_0 é menor do que o número de linhas ou igual a ele significa que a matriz \mathbf{N} contém m_0 linhas independentes e as restantes

$m - m_0$ linhas dependentes podem ser escritas como combinações lineares das linhas independentes. Visto que cada linha de \mathbf{N} corresponde a um metabólito, isto também significa que se m_0 for menor que m , a via conterá metabólitos dependentes que podem ser expressos em termos dos metabólitos independentes. Haverá diversas combinações dos metabólitos (linhas de \mathbf{N}) que podem ser escolhidas como independentes e a escolha é arbitrária. Visto que o rank de colunas de uma matriz é sempre igual ao *rank* das linhas, a matriz \mathbf{N} contém também m_0 colunas independentes. Novamente, diversas combinações de colunas independentes podem existir e a escolha também é arbitrária. O número de colunas dependentes, igual a $n - m_0$, é representado por n_0 . Três novas matrizes são construídas a partir de \mathbf{N} . A primeira consiste em m_0 linhas independentes de \mathbf{N} e é representada por \mathbf{N}_R . A segunda consiste em m_0 colunas independentes de N e é representada por \mathbf{N}_C . A terceira consiste nas m_0 linhas independentes e nas m_0 colunas independentes de N e é representada pela Equação (2.23):

$$\mathbf{N} = \begin{pmatrix} n_{11} & \dots & n_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ n_{m1} & \dots & n_{mn} \end{pmatrix} \quad (2.20)$$

$$\mathbf{N}_R = \begin{pmatrix} n_{11} & \dots & n_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ n_{m_0 1} & \dots & n_{m_0 n} \end{pmatrix} \quad (2.21)$$

$$\mathbf{N}_C = \begin{pmatrix} n_{1(n_0+1)} & \dots & n_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ n_{m(n_0+1)} & \dots & n_{mn} \end{pmatrix} \quad (2.22)$$

$$\mathbf{N}_{RC} = \begin{pmatrix} n_{1(n_0+1)} & \dots & n_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ n_{m_0(n_0+1)} & \dots & n_{m_0 n} \end{pmatrix} \quad (2.23)$$

A matriz \mathbf{N}_{RC} é quadrada e sempre poderá ser invertida, visto que todas as linhas (e colunas) são independentes. A matriz estequiométrica \mathbf{N} pode ser decomposta como (REDER, 1988):

$$\mathbf{N} = \mathbf{L}^X \cdot \mathbf{N}_R \quad (2.24)$$

A matriz \mathbf{L}^X ($m \times m_0$) é chamada de matriz de concentração *link*. Se as colunas dependentes de \mathbf{N} e \mathbf{N}_R são eliminadas na Equação (2.24), \mathbf{L}^X pode ser calculado por:

$$\mathbf{L}^X = \mathbf{N}_C \cdot \mathbf{N}_{RC}^{-1} \quad (2.25)$$

Se o *rank* da matriz \mathbf{N} for igual ao mesmo número de linhas ($m_0 = m$), \mathbf{N}_R será igual a \mathbf{N} e \mathbf{L}^X será uma matriz identidade ($m \times m$). Isto pode ser expresso de acordo com REDER (1988) por:

$$\frac{dx}{dt} = \mathbf{L}^X \cdot x_R(t) + A \quad (2.26)$$

onde A é um vetor $m \times 1$, sendo os primeiros elementos igual a zero. A equação especifica a relação de conservação dos metabólitos, ou seja, como os metabólitos dependentes podem ser expressos em termos dos metabólitos independentes.

2.8.2 Relação entre os fluxos no estado estacionário:

Os fluxos no estado estacionário de uma via metabólica podem ser relacionados pelas restrições estruturais da via. Nem todos os fluxos no estado estacionário são independentes. Por exemplo, em uma via linear os fluxos no estado estacionário por meio de cada reação são iguais e somente um pode ser escolhido como independente.

Uma relação importante entre os fluxos independentes e dependentes no estado estacionário de uma via metabólica pode ser realizada com a nova matriz, \mathbf{N}_0 , contendo as m_0 linhas independentes e n_0 colunas dependentes de \mathbf{N} .

As n_0 colunas dependentes corresponderão aos fluxos independentes da via metabólica.

Uma via metabólica compreendendo m metabólitos internos interconectados por n reações enzimáticas, pode ser derivada de m balanços de fluxos, um para cada metabólito da via metabólica. Esse balanço pode ser representado pela seguinte equação:

$$\mathbf{N}_R \cdot \mathbf{J} = 0 \quad (2.27)$$

onde \mathbf{J} é o vetor que contém os fluxos no estado estacionário.

Essa equação pode ser rearranjada com o objetivo de obter m_0 fluxos dependentes, reunidos no vetor \mathbf{J}_0 ($m_0 \times 1$), como função dos n_0 fluxos independentes, reunidos no vetor \mathbf{J}_R ($n_0 \times 1$):

$$\mathbf{J}_0 = -\mathbf{N}_{RC}^{-1} \cdot \mathbf{N}_0 \cdot \mathbf{J}_R \quad (2.28)$$

O produto $-\mathbf{N}_{RC}^{-1} \cdot \mathbf{N}_0$ terá as dimensões $m_0 \times n_0$. A nova matriz, \mathbf{L}^J , será construída a partir deste produto e da matriz identidade n_0 :

$$\mathbf{L}^J = \begin{pmatrix} I_{n_0} \\ -\mathbf{N}_{RC}^{-1} \cdot \mathbf{N}_0 \end{pmatrix} \quad (2.29)$$

A matriz \mathbf{L}^J , que tem dimensões, é chamada matriz dos fluxos de ligação e é igual à matriz \mathbf{K} , definida por REDER (1988). Todos os n fluxos no estado estacionário, \mathbf{J} , podem ser expressos como função de n_0 fluxos independentes no estado estacionário, \mathbf{J}_R , assim:

$$\mathbf{J} = \mathbf{L}^J \cdot \mathbf{J}_R \quad (2.30)$$

Essa equação é base para a análise de fluxo metabólico, a qual fornece um método de determinação de todos os fluxos no estado estacionário.

2.8.3 Relações cinéticas

A concentração dos m metabólicos internos em uma via arbitrária é denotada por (x_1, x_2, \dots, x_m) , e as n velocidades de reação são denotadas por (v_1, v_2, \dots, v_n) . A concentração e as velocidades de reação são agrupadas em um vetor x $m \times 1$ e em um vetor v $n \times 1$ respectivamente. A via também contém r parâmetros, que podem ser concentração de enzimas, parâmetros cinéticos e metabólicos externos, e que são agrupados em um vetor p ($r \times 1$). Cada velocidade de reação é expressa como função da concentração m e dos parâmetros r , e o coeficiente de elasticidade é calculado a partir dessas equações de velocidade de acordo com a Equação (2.18).

Desta forma novas equações na forma de matriz são obtidas:

$$\mathbf{C}^X = \mathbf{L}_F^X \cdot \mathbf{C}_R^X \quad (2.31)$$

$$\mathbf{C}^J = \mathbf{L}_F^J \cdot \mathbf{C}_R^J \quad (2.32)$$

Os coeficientes de controle de fluxo e de controle de metabólicos são calculados a partir da Equação (2.33).

$$\begin{pmatrix} \mathbf{C}_R^J \\ \mathbf{C}_R^X \end{pmatrix} = (\mathbf{L}_F^J - \varepsilon \cdot \mathbf{L}_F^X) \quad (2.33)$$

Capítulo 3

METODOLOGIA

No presente capítulo, será apresentada a metodologia utilizada para o cálculo dos fluxos internos, utilizando conceitos de análise de fluxo metabólico, e cálculo dos coeficientes de controle de fluxo empregando conceitos de análise de controle metabólico.

Na primeira etapa do trabalho foi realizada a análise de fluxo metabólico para verificar a influência de duas diferentes condições de cultivo na distribuição de fluxo no metabolismo da *C. acetobutylicum*.

Na segunda etapa do trabalho foi construído um modelo cinético para a análise de controle metabólico a fim de verificar qual enzima exerce maior controle no fluxo de hidrogênio.

3.1 Análise de Fluxo Metabólico (MFA)

Como mencionado anteriormente, *C. acetobutylicum* possui um metabolismo complexo. Quando as culturas estão crescendo em glicose produzem somente ácidos (acético e butírico) e hidrogênio molecular. Culturas crescendo em meios contendo glicose e glicerol produzem, principalmente, álcoois, com baixa produção de ácidos, hidrogênio e nada de acetona. Para entender a distribuição interna de fluxos metabólicos aplicados nessas duas diferentes condições de cultivo, foi usada a Análise de Fluxo Metabólico.

3.1.1 Modelo matemático proposto para análise de fluxo metabólico

Para realizar a MFA, foi construída a matriz estequiométrica **S** referente às reações da via metabólica da *C. acetobutylicum*, representadas na Figura 2.6. As reações usadas no modelo estão descritas na Tabela 3.1

Tabela 3.1 - Reações da via metabólica da *C. acetobutylicum* usadas no modelo de análise de fluxo metabólico.

r1	vGLI	Glicose + 2ATP ↔ 2ADP + 2Gliceraldeído-3-fosfato
r2	vPIR	Gliceraldeído-3-fosfato + 2ADP + NAD ⁺ ↔ Piruvato + 2ATP + NADH + H ⁺
r3	vPDH	Piruvato + CoA + NAD ⁺ ↔ Acetil-CoA + NADH + H ⁺ + CO ₂
r4	vTHI	Acetil-CoA ↔ Acetoacetil-CoA + CoA
r5	vHCOA	Acetoacetil-CoA + NADH + H ⁺ ↔ 3-Hidroxiacetil-CoA + NAD ⁺
r6	vCrCOA	3-Hidroxiacetil-CoA ↔ Crotonil-CoA + H ₂ O
r7	vBuCOA	Crotonil-CoA + NADH + H ⁺ ↔ Butiril-CoA + NAD ⁺
r8	vPTB	Butiril-CoA + ATP ↔ Butiril-fosfato + CoA + ADP
r9	vBTK	Butiril-fosfato + ADP ↔ Butirato + ATP
r10	vACALDH	Acetil-CoA + NADH + H ⁺ ↔ Acetaldeído + CoA + NAD ⁺
r11	vADH	Acetaldeído + NADH + H ⁺ ↔ Etanol + NAD ⁺
r12	vPTA	Acetil-CoA + P ↔ Acetil-fosfato + CoA
r13	vATK	Acetil-fosfato + ADP ↔ Acetato + ATP
r14	vGLIC	Glicerol + NAD ⁺ + ATP ↔ Gliceraldeído-3-fosfato + NADH + H ⁺ + ADP
r15	vLAC	Piruvato + NADH + H ⁺ ↔ Lactato + NAD ⁺
r16	vCOAT	Acetoacetil-CoA + CH ₃ COOH ↔ CH ₃ COSCoA + Acetoacetato
r17	vAADC	Acetoacetato ↔ CO ₂ + Acetona
r18	vBUTHD	Butiril-CoA + NADH + H ⁺ ↔ NAD ⁺ + CoA + Butiraldeído
r19	vBDHB	Butiraldeído + NADH + H ⁺ ↔ NAD ⁺ + Butanol
r20	vH₂	NADH + H ⁺ ↔ NAD ⁺ + H ₂

A matriz S , representada na Figura 3.1 foi construída com base nas reações metabólicas da via da *C. acetobutylicum* que foram obtidas na literatura (GIRBAL *et al.*, 1995a). Todas as reações no modelo estequiométrico são consideradas reversíveis e a via metabólica consiste em uma representação estequiométrica de 20 reações e 21 metabólitos. A matriz do modelo é construída com base nas representações estequiométricas. Em cada linha da matriz coloca-se o coeficiente estequiométrico na coluna referente ao metabólito daquela reação; nas demais colunas colocam-se zero. Em seguida, separam-se os metabólitos em três matrizes: substratos S_s , produtos S_p , e metabólitos intracelulares S_c . Somente a matriz dos metabólitos intracelulares é usada na resolução; e essa matriz é a matriz S_c .

Figura 3.1 - Matriz estequiométrica referente às reações da via metabólica da *C. acetobutylicum*.

	Glicose	Glicerol	CO ₂	Butirato	Etanol	Acetato	H ₂	Acetona	Butanol	'ADP'	'G3P'	'PIR'	'H'	'COA'	'ACOA'	'ACCOA'	'HCOA'	'CRCOA'	'BUTCOA'	'BUTP'	'ACAL'	'ACP'	'ACT'	'BUTHD'	'ATP'	'NAD'	'NADH'	
'vGLI'	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
'vPIR'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	-1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-1	1
'vPDH'	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1
'vTHI'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
'vHCOA'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1
'vCrCOA'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
'vBuCOA'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1
'vPTB'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
'vBTK'	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
'vPTA'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	-1
'vATK'	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	-1	0
'vACALDI'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
'vADH'	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	0
'vGLIC'	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	1	0
'vLAC'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1
'vCOAT'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
'vAADC'	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
'vBUTHD'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-1
'vBDHB'	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	-1	
'vH ₂ '	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	

Do mesmo trabalho (GIRBAL *et al.*, 1995a) foram obtidos os valores dos fluxos medidos para composição do vetor dos fluxos medidos v_m , cujos valores estão representados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Fluxos medidos em condições de glicose e condições de glicose-glicerol (GIRBAL *et al.*, 1995a).

Fluxos medidos (mmol h ⁻¹ g ⁻¹)		
	Glicose	Glicose-glicerol
'vGLI'	8,72	3,94
'vPDH'	16,2	10,90
'vBTK'	6,09	0,66
'vADH'	0,26	1,30
vATK'	3,67	0,42
'vGLIC'	0,00	4,65
'vAADC'	0,02	0,00
vBDHB'	0,01	3,86

S_m é um vetor que contém somente a posição dos fluxos medidos.

$$S_m = (1,3,9,11,13,14,17,19)$$

Os fluxos não medidos v_c são obtidos pela Equação (2.7).

3.1.2 Solução do modelo proposto

Os resultados foram obtidos com o uso do *toolbox* de MFA, desenvolvido por MENDES, OLIVEIRA e PORTO (2005). O software MATLAB (versão 7.0) foi utilizado na implementação das rotinas. O *toolbox* permite a obtenção de todos os fluxos intracelulares por balanço de massa, melhoria dos dados experimentais por reconciliação estatística e análise de sensibilidade.

O *toolbox* recebe a matriz estequiométrica S a partir da rede metabólica proposta e o vetor v_m , que contém os fluxos medidos experimentalmente. As linhas da matriz S ($i \times j$) representam o número da reação (fluxos) e, as colunas, representam os metabólitos.

Com o número de equações linearmente independentes, obtido a partir do *rank* da matriz, obtém-se a matriz de redundância reduzida a partir da Equação (2.9). Assim, novas

estimativas para os fluxos medidos são obtidas a partir da Equação (2.10). Com os novos fluxos medidos a partir da reconciliação estatística, são obtidos novos fluxos calculados pela Equação (2.6).

3.1.3 Avaliação do modelo proposto

A consistência do modelo é analisada por meio do número condicional, C . Para uma matriz estequiométrica ser considerada bem condicionada, o número condicional deve estar entre 0 e 100 (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

A velocidade de produção de hidrogênio, embora tenha sido medido no trabalho citado, foi considerado como não medido a fim de verificar a validade do modelo.

A sensibilidade é analisada pela Equação (2.12) e o resultado mostra a sensibilidade dos fluxos calculados a pequenas perturbações nas medidas. O *toolbox* gera sensibilidades acumuladas em toda a rede metabólica, mostrando quais fluxos medidos têm maior importância em toda a rede, e as sensibilidades específicas com relação a um fluxo calculado (não medido) de interesse.

3.2 Análise de Controle Metabólico

3.2.1 Modelo matemático das reações da via metabólica considerado

Para a realização da análise de controle metabólico, foi construído um modelo cinético para as reações consideradas na via metabólica simplificada, conforme mostrado na Figura 3.2. A via metabólica foi simplificada em relação à via completa que foi utilizada para análise de fluxo metabólico, pois a chave do entendimento do controle do metabolismo está apenas nas ramificações da via metabólica.

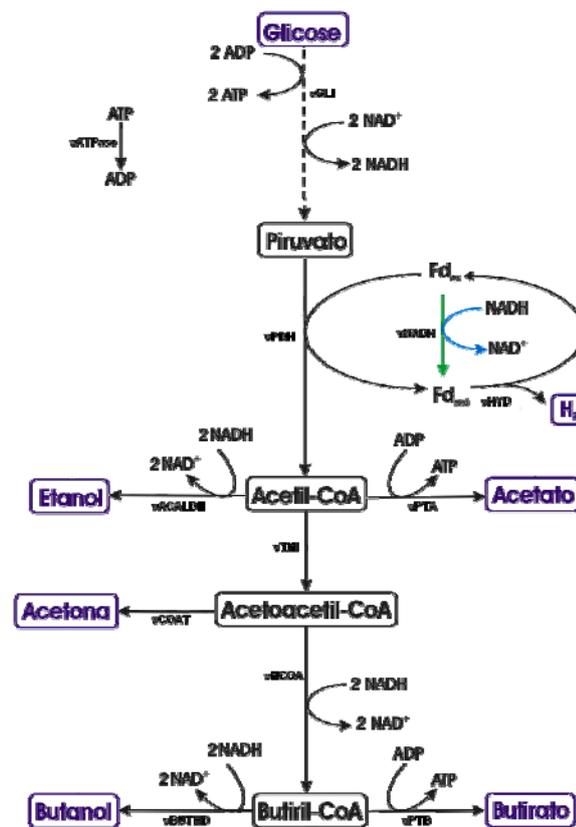


Figura 3.2 – Via metabólica da *C. Acetobutylicum* simplificada.

As seguintes considerações foram aplicadas:

- não foram considerados mecanismos de ativação e inibição enzimática; e
- a coenzima (CoA) não foi considerada nos balanços por ser um metabólito cíclico da via metabólica.

A via metabólica da *C. acetobutylicum* é composta de uma série de reações catalisadas por enzimas. A via da glicólise foi modelada considerando um simples passo irreversível, de acordo com estudos realizados por HOEFNAGEL *et al.* (2000). Os parâmetros cinéticos usados foram desse mesmo estudo, com exceção da velocidade máxima.

A conversão de piruvato para acetil-CoA foi modelada utilizando o mecanismo de Michaelis-Menten reversível.

Embora o mecanismo da reação de condensação de acetil-CoA a acetoacetyl-CoA catalisada pela tiolase obedece a cinética de *ping pong bi bi* e é inibido a níveis micromolares de CoA (WIESENBORN, RUDOLPH e PAPOUTSAKIS, 1988), neste trabalho foi utilizado o mecanismo de Michaelis-Menten reversível simples como simplificação, pois, CoA não foi considerada no modelo e a cinética de *ping pong bi bi* exige dois substrato e dois produtos.

As velocidades consideradas para a via metabólica proposta estão representadas na Tabela 3.3. Com excessão da equação 1, correspondente a via da glicólise, obtida do trabalho de HOEFNAGEL *et al.* (2000) as equações cinéticas mostradas são proposições deste trabalho.

Tabela 3.3 – Equações de velocidade usadas no modelo.

1	$\text{GLI} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD} \rightarrow 2\text{PYR} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH}$ $v_{\text{GLI}} = \frac{V_{\text{max}} \left(\frac{\text{GLI}}{K_{m,\text{Gli}}} \right) \times \left(\frac{\text{NAD}}{K_{m,\text{NAD}}} \right) \times \left(\frac{\text{ATP}}{K_{m,\text{ATP}}} \right)}{\left(1 + \frac{\text{GLI}}{K_{m,\text{GLI}}} + \frac{\text{PIR}}{K_{m,\text{PIR}}} \right) \times \left(1 + \frac{\text{NAD}}{K_{m,\text{NAD}}} + \frac{\text{NADH}}{K_{m,\text{NADH}}} \right) \times \left(1 + \frac{\text{ADP}}{K_{m,\text{ADP}}} + \frac{\text{ATP}}{K_{m,\text{ATP}}} \right)}$
2	$\text{PYR} + \text{Fd}_{\text{oxi}} \rightarrow \text{ACOA} + \text{Fd}_{\text{red}}$ $v_{\text{PDH}} = \frac{V_{\text{max}} \left(\frac{1}{K_{m,\text{PIR}} \times K_{m,\text{Fd}_{\text{oxi}}}} \right) \times \left(\text{PIR} \times \text{Fd}_{\text{oxi}} - \frac{\text{ACOA} \times \text{Fd}_{\text{red}}}{K_{\text{eq}}} \right)}{\left(1 + \frac{\text{PIR}}{K_{m,\text{PIR}}} + \frac{\text{ACOA}}{K_{m,\text{ACOA}}} \right) \times \left(1 + \frac{\text{Fd}_{\text{oxi}}}{K_{m,\text{Fd}_{\text{oxi}}}} + \frac{\text{Fd}_{\text{red}}}{K_{m,\text{Fd}_{\text{red}}}} \right)}$
3	$2\text{ACOA} \rightarrow \text{ACCOA}$ $v_{\text{THI}} = \frac{V_{\text{max}} \left(\frac{1}{K_{m,\text{ACOA}}} \right) \times \left(\text{ACOA} - \frac{\text{ACCOA}}{K_{\text{eq}}} \right)}{\left(1 + \frac{\text{ACOA}}{K_{m,\text{ACOA}}} + \frac{\text{ACCOA}}{K_{m,\text{ACCOA}}} \right)}$

4	<p style="text-align: center;">$ACOA + ADP \rightarrow ACET + ATP$</p> $v_{PTA} = \frac{V_{\max} \left(\frac{1}{K_{m,ACOA} \times K_{m,ADP}} \right) \times \left(ACOA \times ADP - \frac{ACET \times ATP}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{ACOA}{K_{m,ACOA}} + \frac{ACET}{K_{m,ACET}} \right) \times \left(1 + \frac{ADP}{K_{m,ADP}} + \frac{ATP}{K_{m,ATP}} \right)}$
5	<p style="text-align: center;">$ACOA + 2NADH \rightarrow ETOH + 2NAD$</p> $v_{ACALDH} = \frac{V_{\max} \left(\frac{1}{K_{m,ACOA} \times K_{m,NADH} \times K_{m,NADH}} \right) \times \left(ACOA \times NADH \times NADH - \frac{NAD \times NAD \times ETOH}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{NAD}{K_{m,NAD}} \times \frac{NAD}{K_{m,NAD}} + \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \times \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \right) \times \left(1 + \frac{ACOA}{K_{m,ACOA}} + \frac{ETOH}{K_{m,ETOH}} \right)}$
6	<p style="text-align: center;">$ACCOA + 2NADH \rightarrow BUTCOA + 2NAD$</p> $v_{HCOA} = \frac{V_{\max} \left(\frac{1}{K_{m,ACCOA} \times K_{m,NADH} \times K_{m,NADH}} \right) \times \left(ACCOA \times NADH \times NADH - \frac{NAD \times NAD \times BUTCOA}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{NAD}{K_{m,NAD}} \times \frac{NAD}{K_{m,NAD}} + \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \times \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \right) \times \left(1 + \frac{ACCOA}{K_{m,ACCOA}} + \frac{BUTCOA}{K_{m,BUTCOA}} \right)}$
7	<p style="text-align: center;">$BUTCOA + 2NADH \rightarrow 2NAD + BUTOH$</p> $v_{BUTHD} = \frac{V_{\max} \left(\frac{1}{K_{m,BUTCOA} \times K_{m,NADH} \times K_{m,NADH}} \right) \times \left(BUTCOA \times NADH \times NADH - \frac{NAD \times NAD \times BUTOH}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{NAD}{K_{m,NAD}} \times \frac{NAD}{K_{m,NAD}} + \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \times \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \right) \times \left(1 + \frac{BUTCOA}{K_{m,BUTCOA}} + \frac{BUTOH}{K_{m,BUTOH}} \right)}$
8	<p style="text-align: center;">$ACCOA \rightarrow AC$</p> $v_{COAT} = \frac{V_{\max} \times ACCOA}{ACCOA + K_{m,ACCOA}}$
9	<p style="text-align: center;">$BUTCOA + ADP \rightarrow ATP + BUT$</p> $v_{PTA} = \frac{V_{\max} \left(\frac{1}{K_{m,BUTCOA} \times K_{m,NADH}} \right) \times \left(BUTCOA \times NADH - \frac{BUT \times NAD}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{NAD}{K_{m,NAD}} + \frac{NADH}{K_{m,NADH}} \right) \times \left(1 + \frac{BUTCOA}{K_{m,ACOA}} + \frac{BUT}{K_{m,BUTOH}} \right)}$

10	$\text{Fd}_{\text{red}} \rightarrow \text{Fd}_{\text{oxi}} + \text{H}_2$ $v_{\text{HYD}} = \frac{V_{\text{máx}} \times \text{Fd}_{\text{red}}}{\text{Fd}_{\text{red}} + K_{\text{m},\text{Fd}_{\text{red}}}}$
11	$\text{Fd}_{\text{oxi}} + \text{NADH} \rightarrow \text{Fd}_{\text{red}} + \text{NAD}$ $v_{\text{NADH}} = \frac{V_{\text{máx}} \left(\frac{1}{K_{\text{m},\text{Fd}_{\text{oxi}}} \times K_{\text{m},\text{NADH}}} \right) \times \left(\text{Fd}_{\text{oxi}} \times \text{NADH} - \frac{\text{Fd}_{\text{red}} \times \text{NAD}}{K_{\text{eq}}} \right)}{\left(1 + \frac{\text{NAD}}{K_{\text{m},\text{NAD}}} + \frac{\text{NADH}}{K_{\text{m},\text{NADH}}} \right) \times \left(1 + \frac{\text{Fd}_{\text{oxi}}}{K_{\text{m},\text{Fd}_{\text{oxi}}}} + \frac{\text{Fd}_{\text{red}}}{K_{\text{m},\text{Fd}_{\text{red}}}} \right)}$
12	$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ $v_{\text{ATPase}} = V_{\text{máx}} \frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$

3.2.1.1 Obtenção das Constantes de Equilíbrio

As constantes de equilíbrio foram calculadas a partir da energia livre de Gibbs (ΔG^0) obtidas de THAUER, JUNGERMANN e DECKER (1977), de acordo com a Equação (3.1):

$$K'_{\text{eq}} = e^{-\left(\frac{\Delta G^0}{RT}\right)} \quad (3.1)$$

A constante de equilíbrio usada para a reação vPTB foi a mesma do vPTA, pois corresponde a vias de etapas análogas.

Tabela 3.4 – Constantes de equilíbrio.

Enzima	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)	K'_{eq}	Referência
PDH	-19,2	2329,2	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977
THI	-25	24231	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977
PTA	-4	5,0294	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977
ACALDH	-45,6	99334000	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977
BUTHD	-	74	PALOSAARI e ROGERS, 1988

3.2.1.2 Obtenção das velocidades máximas de cada reação

A partir dos parâmetros cinéticos (Tabela 3.6), das concentrações dos metabólitos (Tabela 3.5) no estado estacionário e dos fluxos internos obtidos a partir da análise de fluxo metabólico é possível obter as velocidades máximas de cada reação considerada no modelo de acordo com a Equação (3.2), pois a única variável de cada equação cinética é a velocidade máxima:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{F}{v} \quad (3.2)$$

onde F é o fluxo calculado pela análise de fluxo metabólico, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima e v é a equação da velocidade de reação representada na Tabela 3.3. Para isso foi obtido na literatura o valor de concentração desses metabólitos no estado estacionário. Após foi realizada a análise de fluxo metabólico para a via simplificada considerada neste modelo e determinados os fluxos internos. As concentrações dos metabólitos internos no estado estacionário usadas para o cálculo das velocidades máximas estão resumidas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Concentração dos metabólitos internos no estado estacionário.

Metabólito	Concentração (mM)	Referência
Glicose	167	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
ATP	1,5096	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
ADP	0,4440	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
NADH	0,1295	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
NAD ⁺	3,58	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
Piruvato	7,5	<i>E. coli</i> , YANG, BENNETT e SAN, 2001
Butirato	66,92	GRUPE e GOTTSCHALK, 1992
Acetato	30,38	GRUPE e GOTTSCHALK, 1992
Butanol	2,69	GRUPE e GOTTSCHALK, 1992
Acetona	0	GRUPE e GOTTSCHALK, 1992
Butiril-CoA	0,6771	GRUPE e GOTTSCHALK, 1992
Acetil-CoA	0,4033	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977
ATP	1,5096	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
ADP	0,4440	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
NADH	0,1295	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
NAD ⁺	3,58	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a

No entanto, alguns fluxos apresentaram valor negativo, conseqüência da maioria das reações do modelo serem consideradas reversíveis. Isso impede de se usar as velocidades máximas correspondentes a esses valores negativos. Outra limitação está relacionada à obtenção do estado estacionário empregando as velocidades máximas obtidas por essa metodologia. Acredita-se que isto seja conseqüência da utilização de concentrações dos metabólitos internos obtidos de experimentos conduzidos em diferentes condições. Assim, optou-se por utilizar essa metodologia somente para a reação da glicólise, da ATPase e da PDH. Convém salientar que, no caso da glicólise, as concentrações dos metabólitos

envolvidos nessa reação foram obtidas no mesmo experimento, com exceção do piruvato (ver Tabela 3.5); na reação da ATPase as concentrações de ATP e ADP foram obtidas também do mesmo experimento; e na reação PDH apresentou melhor ajuste em relação a utilização da atividade enzimática com à utilização dessa abordagem.

Para as outras enzimas consideradas na via optou-se por usar as atividades específicas determinadas por VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE (1994) como velocidades máximas. As atividades específicas foram determinadas em $\mu\text{mol} (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$. Para corrigir a unidade da velocidade máxima para mM/min, utilizou-se a seguinte abordagem: o volume interno para *C. acetobutylicum* é, em μl de espaço intracelular por mg de massa seca de células ($\mu\text{l}/\text{mg}$ de células secas), 1,67 na fase acidogênica, 2,13 na fase solventogênica e 2,8 no fim da fase solventogênica (TERRACCIANO e KASHKET, 1986). Fazendo-se uma média dos dois primeiros valores obtém-se 1,9 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de células secas. Além disso, para essa bactéria sabe-se que 1 mg de células secas corresponde a 0,7 mg de proteína (HARTMANIS e GATENBECK, 1984). Com esses valores obtém-se o fator de conversão de mol/mg de proteína para mmol/l ou mM:

$$\frac{0,7 \text{ mg proteína}}{\text{mg DW}} \frac{1 \text{ mg DW}}{1,9 \mu\text{l}} \approx 0,37 \frac{\text{mg proteína}}{\mu\text{l}}$$

Os $V_{\text{máx}}$ obtidos a partir dessa metodologia estão resumidos na Tabela 3.6.

3.2.1.3 Obtenção dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram obtidos na literatura e estão resumidos na Tabela 3.6. Para reação da glicólise (v_{GLI}) foram usados os parâmetros obtidos no trabalho de HOEFNAGEL *et al.* (2002), pois não foi encontrado na literatura estudo da cinética da glicólise em *C. acetobutylicum*. No entanto a velocidade máxima usada no modelo, foi obtida

através de Análise de Fluxo Metabólico, conforme explicado acima, realizada neste trabalho utilizando como dados de entrada os valores medidos obtidos por GIRBAL *et al.* (1995a), que é o trabalho referência, onde serão comparados os dados obtidos a partir do modelo matemático proposto neste trabalho com os dados experimentais obtidos pelo autor.

A velocidade máxima da reação de conversão de piruvato para acetil-CoA ($vPDH$) foi obtida também por Análise de Fluxo Metabólico os outros parâmetros para esta reação foram encontrados na literatura. Os $K_{m,PIR}$, $K_{m,Fdoxi}$, $K_{m,Fdred}$ foram obtidos do mesmo trabalho realizado em *C. acetobutylicum*, o $K_{m,ACO}$ não foi encontrado para *C. acetobutylicum*, neste caso foi usado a constante encontrado para outro organismo (*Azotobacter*, BRESTERS *et al.*, 1975).

A reação da hidrogenase (vH_2) foi encontrada o $K_{m,HYD}$ para *C. acetobutylicum*. A reação do NADH ($vNADH$) foi encontrada os $K_{m,NADH}$, $K_{m,Fdoxi}$, $K_{m,Fdred}$ e a constante de equilíbrio foi estimada com base em reação análoga com valor de 1. Assim foi calculado o $K_{m,NAD}$.

A velocidade máxima para a reação da ATPase foi obtida também por análise de fluxo metabólico.

Todos os parâmetros das reações da Tiolase ($vTHI$), Fosfotransacetilase ($vPTA$), Butiraldeído deidrogenase ($vBUTHD$), Fosfotransbutirilase ($vPTB$) foram encontrados para *C. acetobutylicum*, conforme mostrado na Tabela 3.6.

Os parâmetros da reação da etanol deidrogenase ($vACALDH$) foram obtidos do BRENDA, uma base de dados pública de enzimas (<http://brenda.uni-koeln.de/>).

A etapa de formação de Butiril-CoA ($vHCOA$), foi simplificada, e não foi encontrado parâmetros cinéticos para os metabólitos dessa reação, os parâmetros cinéticos utilizados

neste trabalho foram estimados a partir de constantes cinéticas encontradas na literatura de reações análogas a esta.

Tabela 3.6 - Parâmetros cinéticos das reações do modelo.

Parâmetros	Unidades	Referência
v_{GLI}	mM/min	
$V = 69,15$	mM/min	MFA, obtida neste trabalho
$K_{m,PIR} = 25$	mM	<i>L. lactis</i> , HOEFNAGEL <i>et al.</i> 2002
$K_{m,GLI} = 0,1$	mM	<i>L. lactis</i> , HOEFNAGEL <i>et al.</i> 2002
$K_{m,NAD} = 0,1412$	mM	<i>L. lactis</i> , HOEFNAGEL <i>et al.</i> 2002
$K_{m,NADH} = 0,08999$	mM	<i>L. lactis</i> , HOEFNAGEL <i>et al.</i> 2002
$K_{m,ADP} = 0,04699$	mM	<i>L. lactis</i> , HOEFNAGEL <i>et al.</i> 2002
$K_{m,ATP} = 0,01867$	mM	<i>L. lactis</i> , HOEFNAGEL <i>et al.</i> 2002
v_{PDH}	mM/min	
$V = 787,02$	mM/min	MFA, obtida neste trabalho
$K_{m,PIR} = 0,322$	mM	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
$K_{m,Fdoxi} = 0,08$	mM	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
$K_{m,ACO} = 0,008$	mM	<i>Azotobacter</i> , BRESTERS <i>et al.</i> , 1975
$K_{m,Fdred} = 0,007$	mM	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
$K_{eq} = 2329,2$	-	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977
v_{H_2}	mM/min	
$V = 839,9$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994
$K_{m,HYD} = 0,0061$	mM	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
v_{NADH}	mM/min	
$V = 68,45$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994
$K_{eq} = 1$	-	Estimado
$K_{m,NADH} = 0,034$	mM	Base de dados: BRENDA
$K_{m,Fdoxi} = 0,00091$	mM	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
$K_{m,NAD} = 0,0031$	mM	Calculado
$K_{m,Fdred} = 0,0016$	mM	GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a
v_{ATPase}	mM/min	
$V = 90071$	mM/min	MFA, obtida neste trabalho

<i>vTHI</i>	mM/min		
$V = 3848$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994	
$K_{eq} = 24231$	-	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977	
$K_{m,ACO} = 0,27$	mM	WIESENBORN, RUDOLPH e PAPOUTSAKIS, 1988	
$K_{m,ACCO} = 0,032$	mM	WIESENBORN, RUDOLPH e PAPOUTSAKIS, 1988	
<i>vPTA</i>	mM/min		
$V = 2590$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994	
$K_{m,ACO} = 0,078$	mM	WINZER, LORENZ e DURRE, 1997	
$K_{m,ADP} = 0,71$	mM	WINZER, LORENZ e DURRE, 1997	
$K_{m,ATP} = 0,37$	mM	WINZER, LORENZ e DURRE, 1997	
$K_{m,ACET} = 73$	mM	WINZER, LORENZ e DURRE, 1997	
$K_{eq} = 5,0294$	-	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977	
<i>vACALDH</i>	mM/min		
$V = 22,57$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994	
$K_{m,ACO} = 0,055$	mM	Base de dados: BRENDA	
$K_{m,NADH} = 0,003$	mM	Base de dados: BRENDA	
$K_{m,NAD} = 0,16$	mM	Base de dados: BRENDA	
$K_{m,ETO} = 7,2$	mM	Base de dados: BRENDA	
$K_{eq} = 99334000$	-	THAUER, JUNGERMANN e DECKER, 1977	
<i>vHCOA</i>	mM/min		
$V = 2,22$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994	
$K_{eq} = 1$	-	Estimado	
$K_{m,ACO} = 0,05$	mM	Base de dados: BRENDA	
$K_{m,NADH} = 0,07$	mM	Estimado	
$K_{m,BUTCO} = 0,006$	mM	Estimado	
$K_{mNAD} = 0,1$	mM	Estimado	
<i>vCOAT</i>	mM/min		
$V = 77,7$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994	
$K_m = 0,6$	mM	Base de dados: BRENDA	
<i>vBUTHD</i>	mM/min		
$V = 0,148$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994	

$K_{m,BUTCOA} = 0,045$	mM	PALOSAARI e ROGERS, 1988
$K_{m,NADH} = 0,003$	mM	PALOSAARI e ROGERS, 1988
$K_{m,NAD} = 0,16$	mM	PALOSAARI e ROGERS, 1988
$K_{m,BUTOH} = 1,6$	mM	PALOSAARI e ROGERS, 1988
$K_{eq} = 74$	-	PALOSAARI e ROGERS, 1988
v_{PTB}	mM/min	
$V = 3700$	mM/min	VASCONCELOS, GIRBAL e SOUCAILLE, 1994
$K_{m,BUTCOA} = 0,11$	mM	WIESENBORN, RUDOLPH e PAPOUTSAKIS, 1989
$K_{m,ADP} = 0,01$	mM	TWAROG e WOLFE, 1962
$K_{m,ATP} = 0,0014$	mM	TWAROG e WOLFE, 1962
$K_{m,BUT} = 0,02$	mM	TWAROG e WOLFE, 1962
$K_{eq} = 5,0294$	-	Estimado

3.2.2 Cálculo dos coeficientes de Controle de Fluxo

Neste trabalho foi usado o método indireto para o cálculo dos coeficientes de controle, em que o coeficiente de elasticidade foi determinado a partir do modelo cinético da via metabólica da *Clostridium acetobutylicum* e os coeficientes de controle de fluxo determinados a partir dos coeficientes de elasticidade. A metodologia utilizada neste trabalho foi a descrita no trabalho de EHDLE e ZACCHI (1997).

A matriz com todos os metabólitos e reações é denominada neste trabalho de matriz **S**. As linhas que possuem somente números positivos representam os metabólitos de saída e as linhas que possuem somente números negativos representam os metabólitos de entrada. Desta forma, a matriz **N** é facilmente obtida eliminando linhas que possuem somente números positivos e linhas que possuem somente números negativos. Na matriz **N** somente constam os metabólitos internos e suas reações. O *rank* da matriz estequiométrica pode ser obtido pelo método de eliminação de Gauss.

3.2.3 Balanço de Massa da Via Metabólica

Para cada metabólito interno é realizado um balanço de massa e um sistema de equações diferenciais ordinárias é gerado para descrever a dependência da concentração de cada metabólito com o tempo. Desta forma têm-se:

$$\frac{dPYR}{dt} = 2v_{GLI} - v_{PDH} \quad (3.3)$$

$$\frac{dATP}{dt} = -v_{ATPase} + 2v_{GLI} + v_{PTB} + v_{PTA} \quad (3.4)$$

$$\frac{dNADH}{dt} = -2v_{BUTHD} - v_{NADH} + 2v_{GLI} - 2v_{ACALDH} - 2v_{HCOA} \quad (3.5)$$

$$\frac{dACOA}{dt} = v_{PDH} - 2v_{THI} - v_{PTA} - v_{ACALDH} \quad (3.6)$$

$$\frac{dFdred}{dt} = v_{NADH} + v_{PDH} - v_{HYD} \quad (3.7)$$

$$\frac{dACCOA}{dt} = v_{THI} - v_{HCOA} - v_{COAT} \quad (3.8)$$

$$\frac{dBUTCOA}{dt} = v_{HCOA} - v_{PTB} - v_{BUTHD} \quad (3.9)$$

A partir do sistema de equações diferenciais ordinárias geradas, das equações de velocidade para cada reação representada na Tabela 3.3 e dos parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 3.6 são calculadas as concentrações dos metabólitos internos no estado estacionário.

3.2.4 Solução do modelo proposto

O software MATLAB (versão 7.0) foi utilizado na implementação das rotinas. O programa recebe as reações da via metabólica, equações dos modelos cinéticos de cada reação

e os parâmetros cinéticos. Com essas entradas geram-se as matrizes e com o uso das equações descritas no trabalho de EHLDE e ZACCHI (1997) encontram-se os coeficientes de elasticidades e os coeficientes de controle de fluxo.

3.2.5 Avaliação do modelo proposto

O modelo obtido foi comparado aos dados experimentais obtidos por GIRBAL *et al.* (1995a).

As propriedades fundamentais dos coeficientes do controle são expressas por duas relações de soma. De acordo com KACSER e BURNS (1973) a soma de coeficientes do controle do fluxo é 1. Esta consiste na primeira relação de soma.

A segunda relação de soma foi proposta por HEINRICH e RAPOPORT (1974), e diz que a soma dos coeficientes do controle da concentração é igual a zero.

A análise do modelo foi avaliada respeitando essas propriedades.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise de Fluxo Metabólico

A partir dos dados de fluxos medidos encontrados na literatura e realizados em sistema contínuo (GIRBAL *et al.*, 1995a), foram determinados os fluxos não medidos. O fluxo de hidrogênio, embora medido no trabalho citado, foi considerado como não medido, a fim de se validar o modelo. O valor estimado do fluxo de hidrogênio apresentou-se bem próximo àquele determinado experimentalmente, validando, desta forma, o modelo. A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4.1 – Fluxo de hidrogênio obtido na literatura e calculado no modelo.

Fluxo de H ₂ (mmol h ⁻¹ g ⁻¹)	Glicose	Glicose-Glicerol
Literatura (GIRBAL <i>et al.</i> , 1995a)	19,10	7,24
Calculado neste trabalho	19,45	7,09

As velocidades dos metabólitos internos calculadas a partir de MFA para cultura crescendo em meio de glicose e em meio que contém mistura de glicose-glicerol estão mostradas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Fluxos calculados em condições de glicose.

Fluxos calculados (mmol h ⁻¹ g ⁻¹)		
	Glicose	Glicose - glicerol
vPIR'	9,36	7,59
'vTHI'	6,73	4,87
'vHCOA'	7,20	5,14
'vCrCOA'	7,44	5,27
'vBuCOA'	7,68	5,41
'vPTB'	9,02	2,50
'vPTA'	-0,30	0,98
'vACALDH'	3,11	0,10
'vLAC'	-7,24	-3,41
'vCOAT'	-0,22	-0,14
'vBUTHD'	-1,10	3,05
'vH ₂ '	19,45	7,09

Observa-se que o uso de glicerol favorece a produção de alcoóis e, em função dessa nova redistribuição de elétrons, a produção de hidrogênio é desfavorecida. GIRBAL *et al.*(1995a) mostrou que o glicerol aumenta a relação NADH/NAD⁺. Com o aumento do potencial redox, o excesso de NADH produzido precisa ser regenerado, isto é, consumido através da produção de butanol e etanol. Estas vias prejudicam a produção de hidrogênio (vH₂) pois essa bactéria, em meio contendo glicerol, possui a atividade da NADH ferredoxina redutase desfavorecida no sentido de regeneração de NADH e favorecida no sentido de produção de NADH. Essa inversão desfavorece a produção de hidrogênio e outras rotas de regeneração de NADH são, portanto, utilizadas, tais como produção de butanol e de etanol.

Nesse trabalho pode ser comprovado essa observação, a Figura 4.1 mostra a variação nas duas diferentes condições de alimentação.

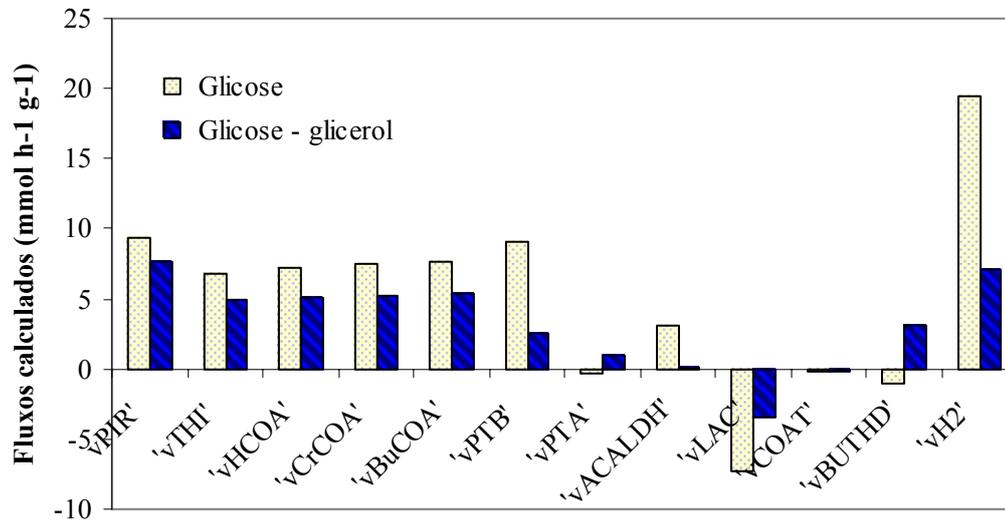


Figura 4.1 – Fluxos Calculados em duas diferentes condições de cultivo.

Observa-se que os fluxos correspondentes as reações vPTB, vPTA, vACALDH, vBUTHD e vH₂ nas duas culturas foram os que mais sofreram variação comparando as duas culturas. Este é o comportamento esperado, visto que ocorre uma mudança de fluxo em função da produção de alcoóis com o uso de glicerol como fonte de carbono.

A qualidade do modelo proposto foi satisfatória de acordo com o número condicional. No modelo da *C. acetobutylicum*, o número condicional foi de 18,6.

4.1.1 Análise de Sensibilidade

A Figura 4.2 mostra a sensibilidade acumulada, que representa os fluxos medidos que possuem maior importância em toda a rede na via metabólica. Pela análise da figura percebe-se que as reações que mais influenciam na via metabólica como um todo são as vPDH, vADH, vATK e vBDHB, correspondentes a reação da conversão do piruvato a acetil-CoA, da produção de acetona, de etanol e de butanol, respectivamente. Esses resultados refletem o

comportamento observado por GIRBAL *et al.*(1995a) que mostraram que a produção de acetona, butanol e etanol influencia no metabolismo da via.

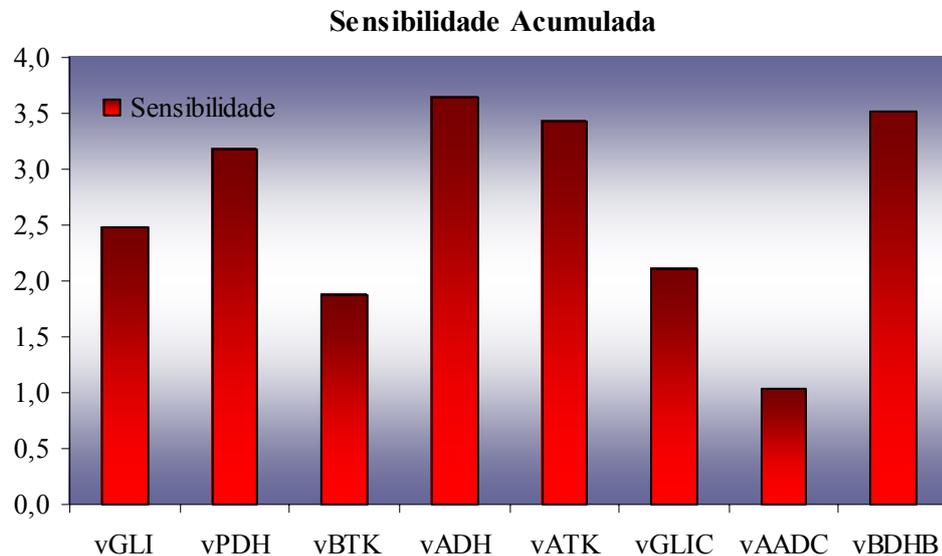


Figura 4.2 – Sensibilidade Acumulada.

A sensibilidade acumulada indica a sensibilidade de cada fluxo medido em relação à via metabólica como um todo, enquanto a sensibilidade específica é calculada em relação a um fluxo de interesse. Neste caso, foi calculada a sensibilidade específica dos fluxos medidos em relação ao fluxo de hidrogênio.

A análise da sensibilidade específica indica quais fluxos medidos são mais susceptíveis a variações em relação a um fluxo específico.

O estudo da estratégia mais eficiente de produzir hidrogênio com o uso de glicerol como fonte de carbono, por ser um substrato de fácil obtenção e resíduo da produção de biodiesel, foi realizado neste trabalho. Os resultados experimentais obtidos na literatura (GIRBAL *et al.*, 1995a) mostraram que o glicerol desfavorece a liberação de hidrogênio em função da produção de álcoois. Neste contexto, foi usada análise de sensibilidade específica para identificação dos fluxos mais sensíveis a variação em relação a produção de hidrogênio.

Isso significa encontrar os fluxos onde uma pequena variação desses fluxos produziria um grande aumento na produção de hidrogênio.

O resultado da análise de sensibilidade pode indicar um bom direcionamento da via metabólica mais apropriada a ser eliminada, visando a obtenção de uma rota eficiente para produção de hidrogênio com uso de glicerol.

A análise da sensibilidade específica para a produção de hidrogênio aplicada à *C. acetobutylicum* está apresentada na Figura 4.3 que mostra que a via de produção de butanol (vBDHB) apresenta maior sensibilidade. Uma interrupção nessa via, por meio da deleção do gene produtor da enzima butiraldeído dehidrogenase, responsável pela reação vBUTHD, reação imediatamente anterior à reação vBDHB, combinada com a alimentação com glicerol, pode ser uma estratégia de manipulação genética mais eficiente para a rota desejada.

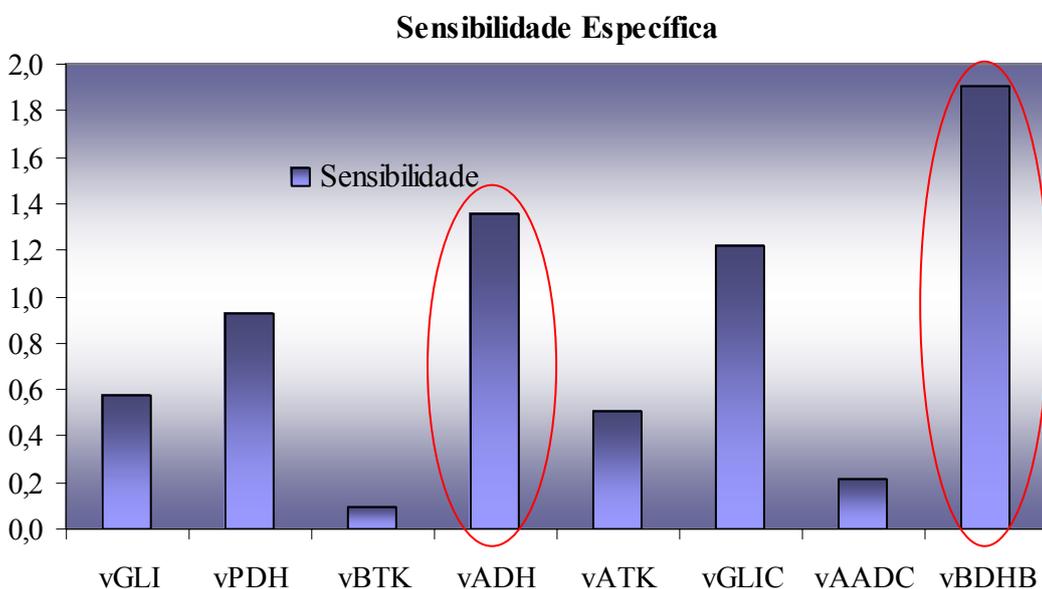


Figura 4.3 – Análise de sensibilidade específica na *C. acetobutylicum* para produção de hidrogênio.

Com base nos resultados da sensibilidade específica apontada para a via de butanol foram realizadas simulações com objetivo de verificar o aumento da produção de hidrogênio, caso a via de produção de butanol for eliminada por meio de manipulação genética. Também

foram realizadas simulações eliminando a via de produção de etanol, visto que foi a reação que apresentou segunda maior sensibilidade específica em relação à produção de hidrogênio.

Os resultados mostraram que a eliminação da via do butanol (vBDHB), mantendo o meio de cultura tendo glicose como fonte de carbono, não apresenta aumentos significativos, pois a produção de butanol é baixa nessas condições e a eliminação dessa via não produziria resultados consideráveis. Os mesmos comportamentos foram observados no caso da eliminação da reação de produção de etanol. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Simulação dos fluxos calculados considerando a interrupção da produção de alguns metabólitos em meio contendo somente glicose.

	Fluxos calculados em meio contendo glicose ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)			
	Linhagem selvagem	<i>Knockout</i> do vBDHB	<i>Knockout</i> do vADH	<i>Knockout</i> do vBDHB e do vADH
vPIR'	9,36	9,36	9,37	9,38
'vTHI'	6,73	6,73	6,85	6,85
'vHCOA'	7,20	7,19	7,29	7,29
'vCrCOA'	7,44	7,43	7,53	7,52
'vBuCOA'	7,68	7,67	7,76	7,75
'vPTB'	9,02	9,02	9,05	9,05
'vPTA'	-0,30	-0,29	-0,54	-0,53
'vACALDH'	3,11	3,12	3,13	3,14
'vLAC'	-7,24	-7,24	-7,23	-7,22
'vCOAT'	-0,22	-0,22	-0,21	-0,21
'vBUTHD'	-1,10	-1,11	-1,06	-1,07
vH₂'	19,45	19,48	19,73	19,76

Novas simulações foram realizadas considerando o meio contendo glicerol e glicose. Os resultados mostraram que a deleção do gene responsável pela produção de butanol e o uso de glicerol aumentaria em 112% em relação à linhagem selvagem. Somente a deleção do gene responsável pela produção de etanol aumentaria 20% a produção de hidrogênio. A combinação das duas deleções traria um aumento acima de 130%.

Ainda assim, com esses ganhos não é atingida a eficiência máxima de produção de hidrogênio quando a glicose é utilizada como fonte de carbono. Porém, consiste em uma rota alternativa de utilização do glicerol como substrato para produção de hidrogênio com melhores rendimentos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.4 - Simulação dos fluxos calculados considerando a interrupção da produção de alguns metabólitos em meio contendo glicerol e glicose.

Fluxos calculados em meio contendo glicose e glicerol ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$)				
	Linhagem selvagem	<i>Knockout</i> do vBDHB	<i>Knockout</i> do vADH	<i>Knockout</i> do vBDHB e do vADH
vPIR'	7,59	8,00	7,66	8,08
'vTHI'	4,87	4,46	5,44	5,04
'vHCOA'	5,14	4,25	5,63	4,74
'vCrCOA'	5,27	4,14	5,72	4,59
'vBuCOA'	5,41	4,03	5,82	4,44
'vPTB'	2,50	3,42	2,66	3,59
'vPTA'	0,98	1,55	-0,22	0,35
'vACALDH'	0,10	0,67	0,20	0,77
'vLAC'	-3,41	-3,00	-3,34	-2,92
'vCOAT'	-0,14	0,11	-0,09	0,15
'vBUTHD'	3,05	0,50	3,25	0,70
vH₂'	7,09	15,02	8,49	16,42

Essas conclusões estão baseadas somente em balanços estequiométricos, e não levam em consideração as informações cinéticas existentes na via metabólica. Sendo assim, as informações obtidas por essa análise são limitadas. As análises no metabolismo foram complementadas com uso da análise de controle metabólica, para se levar em conta as cinéticas das vias consideradas.

4.2 Análise de Controle Metabólico

MCA quantifica a importância de cada enzima no controle do fluxo através da via de produção de um dado metabólito, que nesse caso está relacionado à produção de hidrogênio.

As enzimas que possuem maior coeficiente de controle de fluxo em relação ao fluxo de hidrogênio são as enzimas que exercem maior efeito na produção de hidrogênio.

Para encontrar esses coeficientes, um modelo cinético que descreve a via metabólica da *C. acetobutylicum*, representada na Figura 2.6, que contém 17 metabólitos e 12 reações foi construído. Dados cinéticos *in vitro* obtidos na literatura foram usados como dados de entrada.

O modelo matemático desenvolvido neste trabalho para o metabolismo da *C. acetobutylicum* foi obtido após diversas tentativas de detalhar ao máximo as informações sobre regulação conhecidas sobre essa bactéria. A complexidade do metabolismo da *C. acetobutylicum* e o desconhecimento de alguns mecanismos de controle na mudança de fase de produção de ácidos para a produção de solventes dificultaram a obtenção de um modelo matemático que representasse o metabolismo da *C. acetobutylicum*. Os primeiros modelos obtidos durante a execução deste trabalho foram modelos extremamente complexos do ponto de vista matemático e não atingiam o estado estacionário para alguns metabólitos. O estado estacionário é um pré-requisito essencial para aplicações de análise de controle metabólico no modelo matemático da via metabólica.

Possivelmente o modelo não funcionou devido à complexidade do metabolismo considerado, e como os dados cinéticos são obtidos independentemente para cada reação, mecanismos de regulação importantes podem não ter sido incluídos. Além disso, os dados cinéticos são obtidos em determinadas condições fisiológicas (por ex., pH) e sabe-se que esses parâmetros são dependentes das condições do experimento. Para dar continuidade às análises de controle foram, então, adotadas algumas simplificações no modelo. Algumas informações de inibição e ativação foram desconsideradas para se obter o estado estacionário da via metabólica, condição necessária para a MCA.

Desta forma optou-se por simplificar o modelo a fim de obter um modelo que melhor se ajustasse aos valores experimentais e atingisse o estado estacionário para realização da análise de controle metabólico.

As matrizes **S** e **N** foram obtidas a partir de rotinas desenvolvidas por OLIVEIRA, I. L. (2007). A matriz **N** possui 10 metabólitos internos e 12 reações. Portanto $m = 10$ e $n = 12$. O *rank* da matriz estequiométrica foi obtido pelo método de eliminação de Gauss, e neste caso é 7. Isto significa que a via metabólica da *C. acetobutylicum* contém 7 linhas e colunas independentes, ou seja $m_0 = 7$ e $n_0 = n - m_0 = 5$.

A partir do modelo simplificado foram obtidos os valores produzidos pelos metabólitos de saída e comparados aos dados experimentais obtidos por GIRBAL *et al.* (1995a). Os resultados teóricos e experimentais foram normalizados em função da velocidade de consumo de glicose e comparados como mostrado na Figura 4.4.

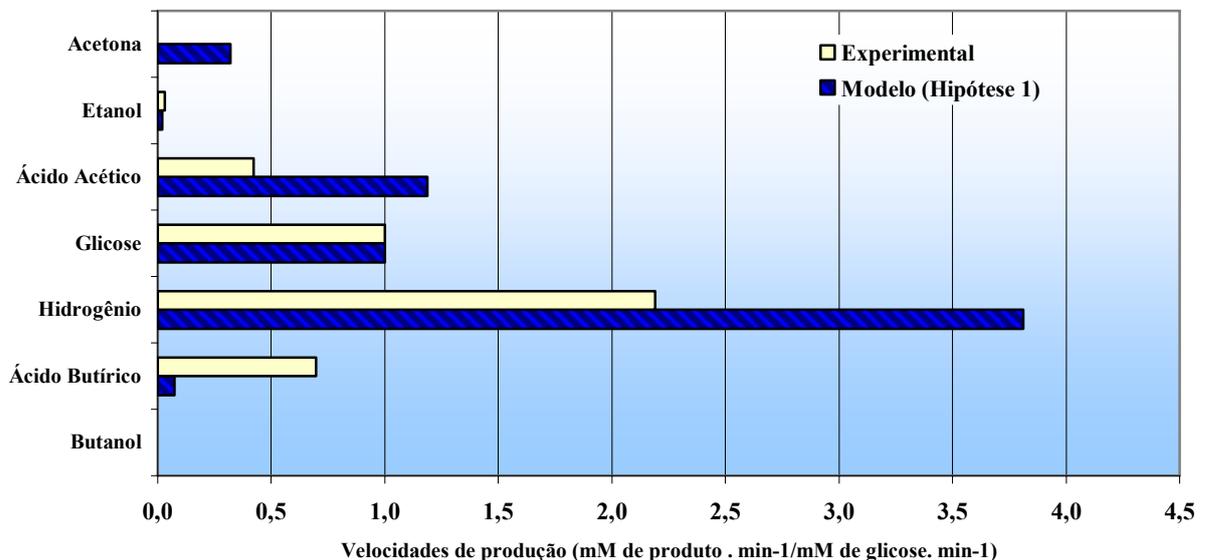


Figura 4.4 – Velocidades de produção obtidas do modelo comparada com as velocidades de produção do trabalho de GIRBAL *et al.*, (1995a).

Observa-se que os dados diferem consideravelmente para alguns metabólitos. Acredita-se que essa diferença está relacionada à falta de mecanismo de regulação não

associada ao modelo e ao fato de terem sido utilizados no modelo parâmetros cinéticos obtidos de fontes diversas e em condições de pH distintos. Convém salientar que o pH é uma das principais variáveis que afeta a velocidade da reação refletindo na troca de padrão acidogênico para solventogênico. No entanto, é importante salientar que não é necessária a disponibilidade de todas as informações sobre regulação e parâmetros obtidos na mesma condição para se alcançar o objetivo desejado. Essa limitação pode ser contornada de diferentes formas já utilizadas por outros autores em trabalhos dessa natureza. Por exemplo, os parâmetros cinéticos obtidos no trabalho de CORTASSA e AON (1994) foram obtidos através da otimização a partir da concentração dos metabólitos determinada experimentalmente.

Nesse trabalho foi utilizada uma abordagem diferente e inovadora. Ao se analisar as velocidades de produção (Figura 4.4), obtidas a partir do modelo e dos dados experimentais, observou-se que a produção de hidrogênio e ácido acético no modelo apresenta-se mais alta que os valores experimentais. Por outro lado, esse ganho nas velocidades pode estar associado à pequena velocidade de produção de ácido butírico obtida no modelo, a qual mostra, experimentalmente, uma velocidade de produção muito maior. As constatações feitas quando analisado o comportamento das velocidades de produção obtidas no modelo indicam a necessidade de se incluir meios de ajuste dos parâmetros da velocidade de produção de ácido butírico. Para atingir esse intento foram utilizados os próprios coeficientes de controle de fluxo para a identificação das etapas que controlam a produção de ácido butírico, já que este foi o produto que apresentou resultado muito inferior ao obtido experimentalmente.

Uma vez que as velocidades máximas dependem das condições fisiológicas do organismo (por exemplo, nível de expressão das enzimas da via metabólica), é por ela que será ajustado o modelo aos dados experimentais a partir do conceito de coeficiente de controle de fluxo.

Desta forma foram analisados os coeficientes de controle de fluxo (Figura 4.5) para a produção de ácido butírico e verificadas quais enzimas exercem controle no fluxo de ácido butírico com o objetivo de melhorar a produção de ácido butírico para aproximar os dados do modelo aos dados experimentais.

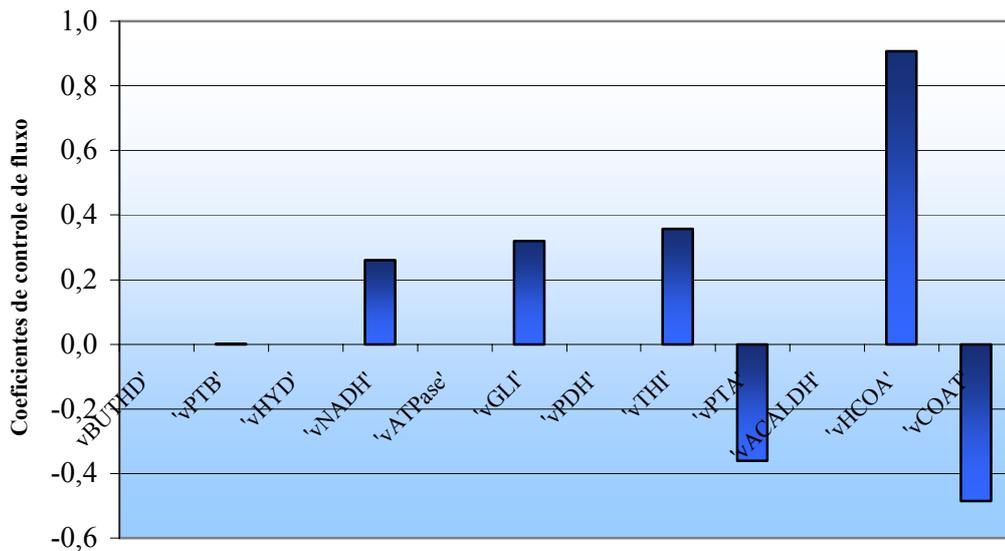


Figura 4.5 - Coeficientes de controle de fluxo para o ácido butírico.

Observa-se na Figura 4.5 que as etapas que exercem maior controle na produção de ácido butírico são: vHCOA positivo, vPTA negativo, vCOAT negativo. Os fluxos correspondentes a vGLI, vTHI e vNADH apesar de mostrar controle positivo significativo não foram alterados, porque comparado ao controle exercido pelo fluxo vHCOA, são menor que a metade. Nos demais, a velocidade de reação foi aumentada 10 vezes para os que exercem controle positivo e reduzida 10 vezes para os que exercem controle negativo. A Tabela 4.5 contém as velocidades máximas usadas no modelo nas hipóteses 1 e 2.

Tabela 4.5 – Velocidades máximas usadas nos modelo 1 e 2.

	$V_{\text{máx}}$ do Modelo (Hipótese 1)	$V_{\text{máx}}$ do Modelo (Hipótese 2)
'vBUTHD'	0,148	0,148
'vPTB'	3700	3700
'vH2'	839,9	839,9
'vNADH'	68,45	68,45
'vATPase'	90071	90071
'vGLI'	60,78	60,78
'vPDH'	787,02	787,02
'vTHI'	3848	3848
'vPTA'	2590	259
'vACALDH'	22,57	22,57
'vHCOA'	2,22	22,2
'vCOAT'	77,7	7,77

O modelo com as novas velocidades máximas (Hipótese 2) foi testado e observou-se uma aproximação com os dados experimentais por meio deste ajuste, evidenciando a importância dos coeficientes de controle de fluxo no metabolismo. Os resultados do novo modelo permitem concluir que limitações do modelo podem ser contornadas com o uso dos coeficientes de controle de fluxo, o que os torna altamente importantes para aproximação do modelo aos dados experimentais.

As novas velocidades de produção estão mostradas na Figura 4.6.

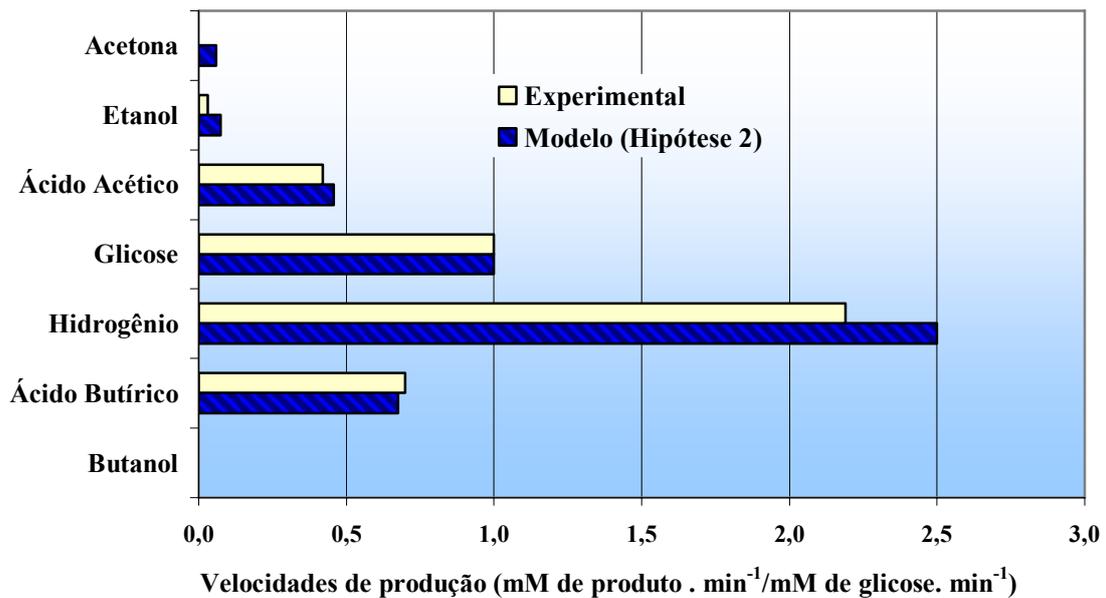


Figura 4.6 – Velocidades de produção normalizadas para glicose nas condições da hipótese 2.

O modelo obtido a partir dos ajustes representa bem os dados obtidos por GIRBAL *et al.* (1995a).

As Equações (3.2) a (3.8) podem ser utilizadas para a realização do estudo dinâmico da via metabólica proposta. A Figura 4.6 mostra a variação da concentração (mM) dos metabólitos internos em função do tempo (minuto).

As concentrações de ADP, ATP, Ferredoxina oxidada (Fdoxi), Ferredoxina reduzida (Fdred) e Acetil-CoA (ACOA) atingem rapidamente a condição de estado estacionário. Acetoacetil-CoA, apresenta um pico de produção e logo após inicia-se o consumo desse metabólito em função da produção dos compostos seguintes e atinge o estado estacionário em níveis de concentração de 0,2 mM. A formação da coenzima NADH pode ser observada, o estado estacionário é atingido na concentração de 3 mM, correspondente ao consumo de NAD que atinge o estado estacionário em níveis de concentração (2,1mM). O Piruvato (PIR) é produzido no primeiro momento e rapidamente inicia o consumo e atinge o estado estacionário rapidamente.

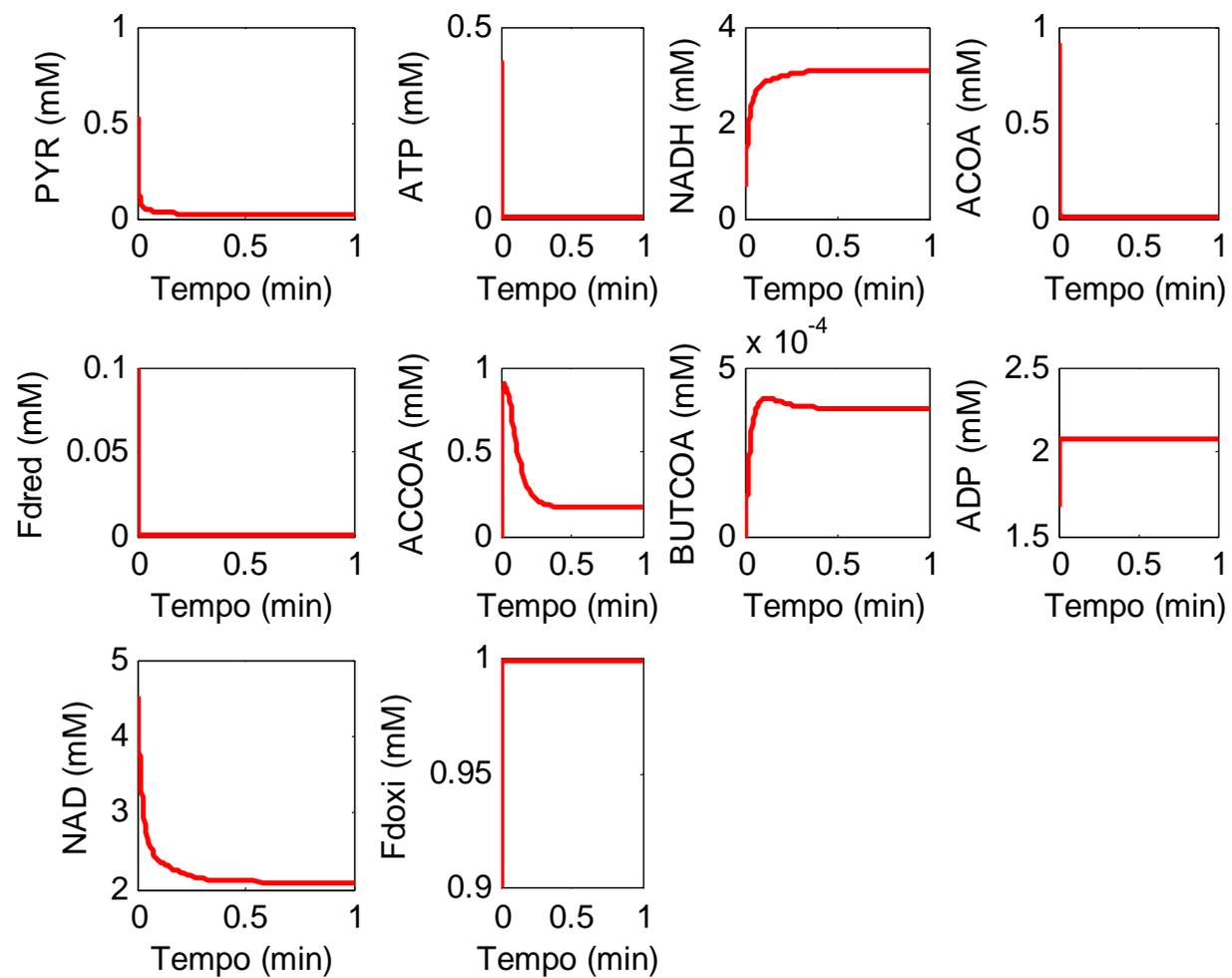


Figura 4.7 – Comportamento dinâmico da concentração dos metabólitos (mM) em função do tempo (min).

4.2.1 Coeficientes de controle de fluxo

Os coeficientes de controle de fluxo do modelo com as condições da hipótese 1 para a produção de hidrogênio foram obtidos e estão mostrados na Figura 4.8. Os maiores coeficientes de controle de fluxo em relação ao fluxo de hidrogênio foram os do vNADH e vGLI. Um aumento na atividade das enzimas correspondentes a essas duas reações (vNADH e vGLI) produziriam aumento na produção de hidrogênio. No entanto, a produção de hidrogênio obtida nesse modelo já se apresenta otimizada em relação aos dados experimentais.

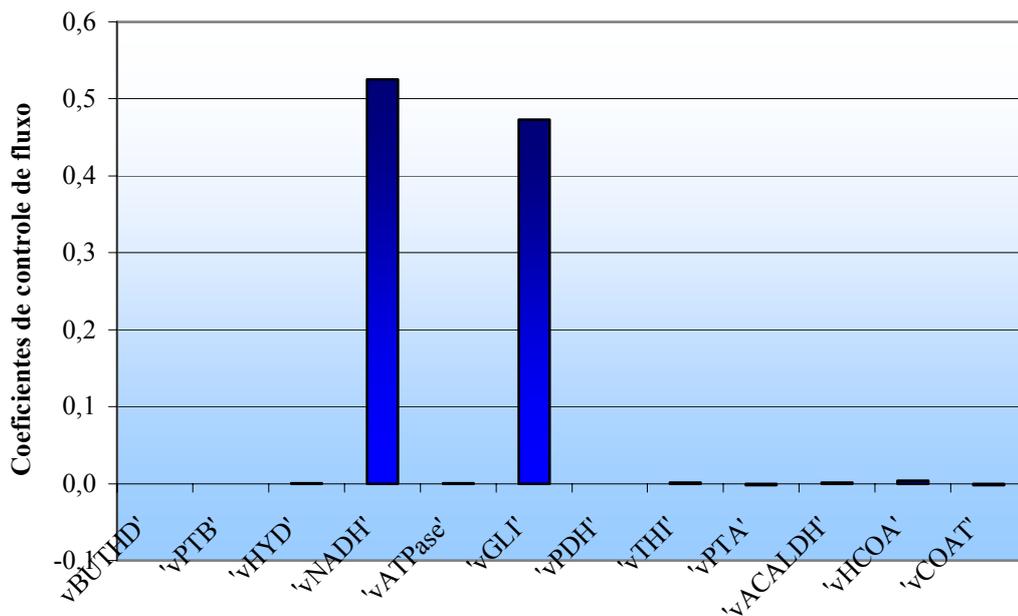


Figura 4.8 - Coeficientes de controle de fluxo para a produção de hidrogênio considerando a hipótese 1.

Para o novo modelo da hipótese 2 foi realizada a análise de controle de fluxo e novos coeficientes de controle de fluxo foram obtidos (Figura 4.9). A partir da figura observa-se que os coeficientes que exercem maior controle são os correspondentes as reações de vGLI e vNADH. O vHCOA também exerce controle positivo na produção de hidrogênio. O fluxo correspondente à reação vPTA, que corresponde a produção de ácido acético, apresentou

coeficiente de controle negativo, o que indica que a diminuição desse fluxo produziria um aumento na produção de hidrogênio. A via de produção de acetona, representada por v_{COAT} , também mostrou coeficiente de controle negativo. No entanto, a produção de acetona é baixa nas condições estudadas no modelo e uma diminuição desse produto não traria tantos ganhos na produção de hidrogênio.

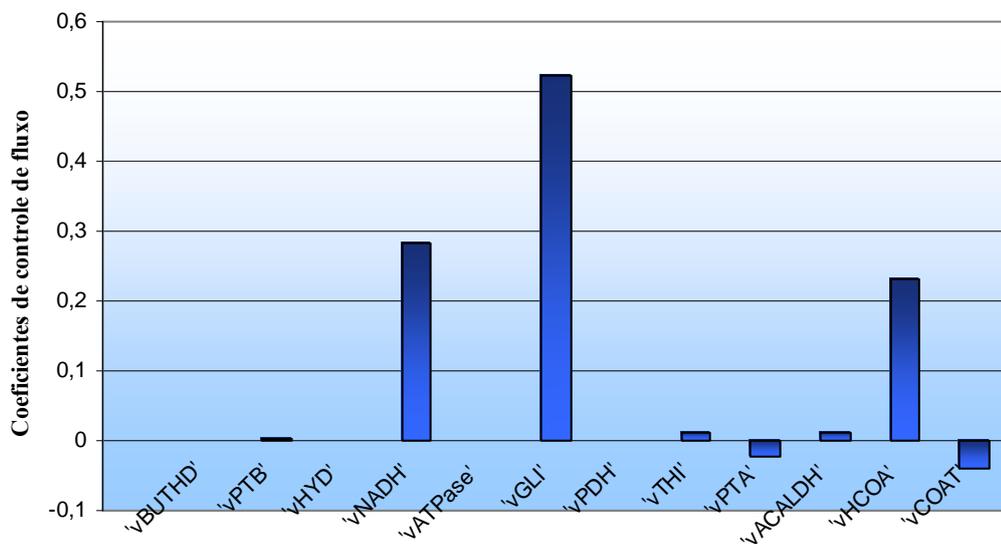


Figura 4.9 – Coeficientes de controle de fluxo para hidrogênio considerando a hipótese 2.

Esses coeficientes são confiáveis, pois o modelo se ajustou bem aos dados experimentais.

Em uma primeira análise da via metabólica espera-se que as vias que mais interferem na produção de hidrogênio são as que consomem NADH para regenerar a NAD. Isso se deve ao fato da produção de hidrogênio estar diretamente associada a necessidade da célula em regenerar o NADH, o que ocorre nas vias de produção de butanol e etanol. Apesar das simplificações do modelo, os resultados mostraram que o v_{GLI} apresentou maior coeficiente de controle de fluxo (é a via que mais interfere positivamente na produção de hidrogênio, exatamente porque é a via de produção de NADH). A segunda via mais importante na

produção de hidrogênio é a via de regeneração do NADH, ou seja, um aumento na demanda de NADH na célula é favorável a produção de hidrogênio.

O modelo poderá ser melhorado na medida que mais dados cinéticos e estudos *in vitro* de cada etapa estiverem disponíveis. Apesar dessas limitações, o modelo fornece resultados coerentes com o esperado.

Certamente, se os parâmetros cinéticos para o sistema em estudo estiverem disponíveis, a construção de um modelo cinético é relativamente simples. Mesmo sem a disponibilidade de todos os parâmetros cinéticos, podem ser realizadas simplificações que permitem a construção de um modelo que possa ser útil. Por exemplo, este trabalho foi focado na distribuição dos fluxos da via metabólica da *C. Acetobutylicum* sobre as ramificações da via do piruvato. Desse modo, evitou-se a modelagem detalhada de todas as etapas da via glicolítica. Com base nos coeficientes do controle pode-se projetar uma estratégia da engenharia genética que testará o modelo cinético. Esta modificação tem por objetivo atingir melhorias biotecnológicas.

Capítulo 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho foi proposto um estudo teórico visando a investigação da etapa do metabolismo da *C. acetobutylicum* que mais afeta a produção de hidrogênio. Para alcançar esse objetivo foram usadas duas ferramentas de Engenharia Metabólica: Análise de Fluxo Metabólico e Análise de Controle Metabólico.

As conclusões do modelo obtido por análise de fluxo metabólico estão baseadas em balanços estequiométricos e, conseqüentemente, não levam em consideração interações cinéticas. No entanto, como primeira análise, foi possível verificar a distribuição de fluxos internos, obter-se a sensibilidade em relação aos fluxos calculados e usar o conceito na obtenção de algumas velocidades máximas usadas na análise de controle de fluxo.

A partir do modelo cinético da *C. acetobutylicum* foi possível obter os coeficientes de controle de fluxo, que mostraram quais vias exercem controle na produção de hidrogênio.

A partir do desenvolvimento desse trabalho, concluiu-se que os coeficientes de controle de fluxo exercem papel importante na adequação do modelo matemático aos dados experimentais, pois a partir deles melhores resultados foram obtidos e foi possível analisar as etapas que controlam a via metabólica estudada.

Os resultados da análise de controle metabólico obtido nesse trabalho permitem concluir que apesar das simplificações do modelo, os coeficientes de controle de fluxo apontados para a produção de hidrogênio mostraram-se adequados. As etapas que mais influenciam positivamente na produção de hidrogênio são a via glicolítica e a via de

regeneração do NADH. A via do HCOA também mostrou influência positiva na produção de hidrogênio.

Convém mencionar que as conclusões obtidas nesse trabalho foram comparadas com o trabalho de GIRBAL e colaboradores (1995a). Uma modificação no metabolismo deve vir acompanhada de um experimento em linhagem selvagem, seguida da obtenção das velocidades de produção para determinadas condições, comparação com os dados do modelo, e ajuste do modelo a partir dos coeficientes de controle para a nova situação de modo que seja possível a obtenção de parâmetros para a modificação desejada.

As principais dificuldades para realização deste trabalho foi à obtenção de informações na literatura necessárias para construção e solução do modelo, um trabalho como esse depende exclusivamente da disponibilidade de dados. Se os dados não estão disponíveis fica muito difícil analisar, pois se a maioria dos parâmetros forem estimados comprometeria muito os resultados obtidos. Neste sentido um banco de dados como o BRENDA tornou viável a obtenção dos parâmetros necessários e os não encontrados a partir do BRENDA foi possível avaliar as condições e reações para outros organismos que poderiam ser usadas como estimativas, pois se tratava de reações análogas e condições semelhantes.

Como sugestão para trabalhos futuros fica o aperfeiçoamento do modelo, na medida que se conhece mais informações sobre a regulação do metabolismo da *C. acetobutylicum*. Experimentos para obtenção dos fluxos medidos, obtenção dos coeficientes utilizando este modelo e modificação genética na bactéria com base nos direcionamentos obtido a partir dos coeficientes de controle de fluxo são sugestões para trabalhos futuros.

Referências Bibliográficas

- ALBRITTON, D. L.; ALLEN, M. R.; BAEDE, A. P. M.; CHURCH J. A.; CUBASCH, U.; XIAOSU, D.; YIHUI, D.; et al. Summary for Policymakers: A Report of Working Group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC: 20, 2001.
- ANDERSCH, W.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 18: 327-332, 1983.
- BAILEY, J. E. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. **Biotechnol. Prog.**, 14(1): 8-20, 1998.
- BENEMANN, J. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. **Nat. Biotechnol.**, 14(9): 1101-3, 1996.
- BOWLES, L. K.; ELLEFSON, W. L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. **Appl Environ Microbiol**, 50(5): 1165-70, 1985.
- BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System Disponível em: <<http://www.brenda.uni-koeln.de/>>. Acesso em: 10 março 2007.
- CHASSAGNOLE, C.; NOISOMMIT-RIZZI, N.; SCHMID, J.W., MAUCH, K.; REUSS, M. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, 79 (1): 53 – 73, 2002.
- CORTASSA, S.; AON M. A. Metabolic control analysis of glycolysis and branching to ethanol production in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon, nitrogen, or phosphate limitations. **Enzyme and microbial technology**, 16(9): 761-770, 1994.
- DAS, D.; VEZIROLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, 26(1): 13-28, 2001.
- EHLDE, M.; ZACCHI, G. A General Formalism for Metabolic Control Analysis. **Chem. Eng. Sci.**, 52(15): 2599-2606, 1997.
- FELL, D. A.; SAURO, H. M. Metabolic control analysis. The effects of high enzyme concentrations. **Eur J Biochem**, 192(1): 183-7, 1990.
- FELL, D. A.; SAURO, H. M. Metabolic control and its analysis. Additional relationships between elasticities and control coefficients. **Eur J Biochem.**, 148(3): 555-61, 1985.
- GHIRARD, M. L.; SEIBERT M. Algal Systems for Hydrogen Photoproduction. **Report**, National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2003
- GIRBAL, L.; CROUX, C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiol Rev.**, 17(3): 287-297, 1995(a).

- GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous culture: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. **J Bacteriol**, 176(21): 6433-6438, 1994.
- GIRBAL, L.; VASCONCELOS, I.; SAINT-AMANS, S.; SOUCAILLE, P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. **FEMS Microbiol Rev**, 16(2-3): p.151-162, 1995(b).
- GRANDE, H.J.; BRESTERS, T.W.; ABREU, R. D.; KOK, A.; VEEGER, C. The pyruvate-dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. **Eur J Biochem**, 59(2): 335-45, 1975.
- GRUPE, H.; GOTTSCHALK, G. Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. **Appl Environ Microbiol.**, 58(12): 3896-3902, 1992.
- HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, 27(11-12): 1185-1193, 2002.
- HARTMANIS, M. G.; GATENBECK, S. Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. **Appl Environ Microbiol.**, 47(6): 1277-1283, 1984.
- HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, 27(11-12): 1339-1347, 2002.
- HEINRICH, R.; RAPOPORT, S. M.; RAPOPORT, T. A. Metabolic Regulation and Mathematical Models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 32: 1-82, 1977.
- HEINRICH, R.; RAPOPORT, T. A. A linear steady state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. **European Journal of Biochemistry**, 42: 89-95, 1974.
- HOEFNAGEL, M. H. N.; STARRENBURG, M. J. C.; MARTENS, D. E.; HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M.; VAN SWAM, I. I.; BONGERS, R.; WESTERHOFF, H. V.; SNOEP, J. L. Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modelling, metabolic control and experimental analysis. **Microbiology**, 148: 1003-1013, 2000.
- JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiol Rev.**, 50(4): 484-524, 1986.
- KACSER, H.; BURNS, J. A. The Control of Flux. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, 27: 65-104, 1973.
- KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, 29(11): 1123-1131, 2004.

- KOKU, H.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, 27(11-12): 1315-1329, 2002
- KORDESCH, K.; SIMADER, G. **Fuel Cells and Their Applications**, Wiley-VCH, 1996.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier,. 839 p. Tradução de: Principles of biochemistry, 2000.
- MATTA-EL-AMMOURI, G.; JANATI-IDRISSI, R.; JUNELLES, A. M.; PETITDEMANGE, H.; Gay, R. Effects of butyric and acetic acids on acetone-butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **Biochimie**, 69(2): 109-15, 1987.
- MENDES, E., OLIVEIRA, I. L., PORTO, L. M. MATLAB® Metabolic Flux Analysis Toolbox. X-Meeting. Caxambu, MG: 1st International Conference of the AB3C. Oct. 4-7, 2005. 90 p.
- MINISTÉRIO DE MINAS ENERGIA. Empresa de Pesquisa energética – EPE. **Relatório INFORME À IMPRENSA** Resultados preliminares. Rio de Janeiro, 2007. disponível em: http://ben.epe.gov.br/downloads/Resultados_Pre_BEN_2007.pdf .
- MIYAKE, J.; KAWAMURA, S. Efficiency of light energy conversion to hydrogen by photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, 12:147–149, 1987
- NETO, E. H. G. Hidrogênio, Evoluir Sem Poluir. Curitiba, BRASIL H2 FUEL CELL ENERGY, 2005.
- NOLLING, J., et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. **J Bacteriol**, 183(16): 4823-38, 2001.
- OLIVEIRA, I. L. Comunicação pessoal, 2007.
- PALOSAARI, N. R.; ROGERS, P. Purification and properties of the inducible coenzyme A-linked butyraldehyde dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. **J Bacteriol**, 170(7): 2971-6, 1988.
- PENTEADO, R. Energias Renováveis: na pista do hidrogênio. **França Flash.**, São Paulo: 16, 2003.
- REDER, C. Metabolic control theory: a structural approach. **J Theor Biol**, 135(2): 175-201, 1988.
- RIFKIN, J. A Economia do Hidrogênio. São Paulo, M.Books do Brasil Editora Ltda, 2003.
- SAURO, H. M.; SMALL J. R.; FELL, D. A. Metabolic control and its analysis. Extensions to the theory and matrix method. **Eur J Biochem**, 165(1): 215-21, 1987.
- SIEMERINK, M. (2005). "Revival of butanol production by Clostridia." Acesso em: março, 2006, disponível em <http://www.ftns.wau.nl/micr/bacgen/marco/>.

- STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering. **Biotechnol Bioeng**, 58(2-3): 119-20, 1998.
- STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering: Principles and Methodologies. San Diego, Academic Press, 1998.
- STRYER, L. Bioquímica. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan S.A., 1996
- TAMAGNINI, P.; LEITÃO, E.; OLIVEIRA, P. Biohidrogênio: produção de H₂ utilizando cianobactérias. **Boletim de Biotecnologia**, 75: 3-6, 2003.
- TERRACCIANO, J. S.; KASHKET, E. R. Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*. **Appl Environ Microbiol**, 52(1): 86-91, 1986.
- THAUER, R. K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. **Bacterial Rev.**, 1: 80-100, 1977.
- TWAROG, R.; WOLFE, R. S. Enzymatic phosphorylation of butyrate. **J Biol Chem.**, 237: 2474-7, 1962.
- UENO, Y.; OTSUKA, S.; MORIMOTO, M. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 82(2): 194-197, 1996.
- VAN ANDEL, J. G.; ZOUTBERG, G. R.; CRABBENDAM, P. M.; BREURE, A. M. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. **Applied microbiology and biotechnology**, 23(1): 21-26, 1985.
- 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. **J Bacteriol**, 176(5): 1443-50, 1994.
- WEIZMANN, C.; ROSENFELD, B. The activation of the butanol-acetone fermentation of carbohydrates by *Clostridium acetobutylicum* (Weizmann). **Biochem J**, 31(4): 619-39, 1937.
- WIECHERT, W. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. **J Biotechnol**, 94(1): 37-63, 2002.
- WIESENBORN, D. P.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E. T. Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. **Appl Environ Microbiol**, 55(2): 317-22, 1989.
- WIESENBORN, D. P.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E. T. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. **Appl Environ Microbiol**, 54(11): 2717-2722, 1988.
- WINZER, K.; LORENZ, K.; DURRE, P. Acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum*: a highly specific enzyme that is actively transcribed during acidogenesis and solventogenesis. **Microbiology**, 143 (Pt 10): 3279-86, 1997.

YANG, Y.; BENNETT, G.; SAN, K. The Effects of Feed and Intracellular Pyruvate Levels on the Redistribution of Metabolic Fluxes in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering** ,3(2): 115-123, 2001.

Apêndice

Programa utilizado para Análise de Controle Metabólico

A seguir será apresentado o programa utilizado neste trabalho desenvolvido para a obtenção dos coeficientes de controle de fluxo.

Arquivos de entrada:

Nome do arquivo: Clostridium.txt

vGLI: $GLI + 2ADP + 2NAD \rightarrow 2PYR + 2ATP + 2NADH$
 vPDH: $PYR + Fdoxi \rightarrow ACOA + Fdred$
 vTHI: $2ACOA \rightarrow ACCOA$
 vPTA: $ACOA + ADP \rightarrow ACET + ATP$
 vACALDH: $ACOA + 2NADH \rightarrow ETOH + 2NAD$
 vHCOA: $ACCOA + 2NADH \rightarrow BUTCOA + 2NAD$
 vBUTHD: $BUTCOA + 2NADH \rightarrow 2NAD + BUTOH$
 vCOAT: $ACCOA \rightarrow AC$
 vPTB: $BUTCOA + ADP \rightarrow ATP + BUT$
 vH2: $Fdred \rightarrow Fdoxi + H2$
 vNADH: $Fdoxi + NADH \rightarrow Fdred + NAD$
 vATPase: $ATP \rightarrow ADP$

 Nome do arquivo: Kin1

%Glucose rate function, %v1

vGLI

$$V = 60.78$$

$$\%V = 0.6758$$

$$Kmpyr = 25$$

$$KmGLI = 0.1$$

$$KmNAD = 0.1412$$

$$KmNADH = 0.08999$$

$$KmADP = 0.04699$$

$$KmATP = 0.01867$$

:dep

$$Kgli = GLI/KmGLI$$

$$Knad = NAD/KmNAD$$

$$Kadp = ADP/KmADP$$

$$Knadh = NADH/KmNADH$$

$$Katp = ATP/KmATP$$

$$Kpyr = PYR/Kmpyr$$

$$vGLI = (V * Kgli * Knad * Kadp) / ((1 + Kgli + Kpyr) * (1 + Knad + Knadh) * (1 + Kadp + Katp))$$

Pyruvate dehydrogenase, vPDH

vPDH

$$V = 787.02$$

$$K_m\text{PYR} = 0.322$$

$$K_m\text{Fdoxi} = 0.08$$

$$K_m\text{ACOA} = 0.008$$

$$K_m\text{Fdred} = 0.007$$

$$K_{eq} = 2329.2$$

$$v\text{PDH} = V2(\text{PYR}, \text{Fdoxi}, \text{ACOA}, \text{Fdred}, V, K_{eq}, K_m\text{Fdoxi}, K_m\text{PYR}, K_m\text{Fdred}, K_m\text{ACOA})$$

Hydrogenase (HYD),

vH2

$$V = 839.9$$

$$K_m = 0.0061$$

$$v\text{H2} = V * \text{Fdred} / (\text{Fdred} + K_m)$$

NADH ferredoxin reductase (NADH), vNADH

vNADH

$$V = 68.45$$

$$K_{eq} = 1$$

$$K_m\text{NADH} = 0.034$$

$$K_m\text{Fdoxi} = 0.00091$$

$$K_m\text{NAD} = 0.0031$$

$$K_m\text{Fdred} = 0.0016$$

$$v\text{NADH} = V2(\text{NADH}, \text{Fdoxi}, \text{NAD}, \text{Fdred}, V, K_{eq}, K_m\text{Fdoxi}, K_m\text{NADH}, K_m\text{Fdred}, K_m\text{NAD})$$

ATPase, vATPase

vATPase

$$V = 90071$$

$$v\text{ATPase} = V * (\text{ATP} / \text{ADP})$$

vTHI

$$V = 3848$$

$$K_{eq} = 2.4231e+004$$

$$K_m\text{ACoA} = 0.27$$

$$K_m\text{ACCoA} = 0.032$$

$$v\text{THI} = V * (\text{ACOA} - \text{ACCoA} / K_{eq}) / (1 + \text{ACOA} / K_m\text{ACoA} + \text{ACCoA} / K_m\text{ACCoA})$$

Phosphotransacetylase (PTA)

vPTA

V = 2590
 KmACOA = 0.078
 KmADP = 0.71
 KmATP = 0.37
 KmCOA = 0.093
 KmACET = 73
 Keq = 5.0294

vPTA = V2(ACOA, ADP, ACET, ATP, V, Keq, KmADP, KmACOA, KmATP, KmACET)
 %v12

%Acetaldehyde dehydrogenase (ACALDH), vACALDH
 vACALDH

V = 22.57
 KmACOA = 0.055
 KmNADH = 0.003
 KmNAD = 0.16
 KmETOH = 7.2
 Keq = 99334000

vACALDH = V2(ACOA, NADH, ETOH, NAD, V, Keq, KmNADH, KmACOA, KmNAD, KmETOH)

%v5

%3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (HCOA), vHCOA
 vHCOA

V = 2.22
 Keq = 1
 KmACCoA = 0.05
 KmNADH = 0.07
 KmButCoA = 0.006
 KmNAD = 0.1

vHCOA = V2(ACCoA, NADH, BUTCOA, NAD, V, Keq, KmNADH, KmACCoA, KmNAD, KmButCoA)

%v14

%CoA Transferase (COAT), v14, vCOAT
 vCOAT

V = 77.7
 Km = 0.6

vCOAT = V*ACCoA/(ACCoA + Km)

%vBUTHD

V = 0.148
 KmBUTCOA = 0.045
 KmNADH = 0.003
 KmNAD = 0.16
 KmCOA = 0.093

KmBUTOH = 1.6
Keq = 74

vBUTHD = V2(BUTCOA, NADH, BUTOH, NAD, V, Keq, KmNADH, KmBUTCOA, KmNAD, KmBUTOH)

%%%

%v8
%Phosphotransbutyrylase (PTB), vPTB
vPTB

V = 3700
KmBUTCOA = 0.11
KmADP = 0.01
KmATP = 0.16
KmCOA = 0.045
KmBUT = 1.6
Keq = 5.0294

vPTB = V2(BUTCOA, ADP, BUT, ATP, V, Keq, KmADP, KmBUTCOA, KmATP, KmBUT)

Nome do arquivo: valinit.txt

ACOA = 0.92
GLI = 167
COA = 0.24
PYR = 0.5
Fdoxi = 0.9
Fdred = 0.1

NAD = 4.5333; %6.8/1.5
ADP = 1.6667; %2.5/1.5
ATP = 0.4133; %0.62/1.5
NADH = 0.6467; %0.97/1.5

Programa para cálculo da Análise de controle metabólico (OLIVEIRA, I. L., 2007):

```
clear all
clc
a = mca('Clostridium.txt','valInit.txt','kin.txt');
objmca = mca('Clostridium.txt')
notes(objmca)
objmca = setInit(objmca,'valInit.txt');
objmca = setKinetic(objmca,'kin.txt');
objmca = mca('Clostridium.txt','valInit.txt','kin.txt')
x0 = steadystate(objmca)
[t,X] = transient(a,[0 1]);
plotTrans(a, X, t);
subplotTrans(a,4,X,t);
F = ssflux(objmca)
[Eps, fcc, ccc] = contrlCoef(objmca)
```

sum(fcc,2)
sum(ccc,2)

Os códigos fontes do programa mca podem ser obtidos mediante solicitação junto a autora deste trabalho.