

Daniel de Castro Souza

**Estudo *in silico* guiado por modelos metabólicos
em escala genômica para otimização de uma
plataforma microbiana para produção de ácido
mucônico**

Lorena

2021

Daniel de Castro Souza

Estudo *in silico* guiado por modelos metabólicos em escala genômica para otimização de uma plataforma microbiana para produção de ácido mucônico

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Física da Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de Lorena

Orientador: Cíntia Regina Sargo - Laboratório Nacional de Biorrenováveis
(LNBR/CNPEM)

Lorena
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Daniel de Castro

Estudo in silico guiado por modelos metabólicos em escala genômica para otimização de uma plataforma micrônica para produção de ácido mucônico / Daniel de Castro Souza; orientadora Cíntia Regina Sargo. - Lorena, 2021.
49 p.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Física - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2021

1. Modelos metabólicos em escala genômica. 2. Ácido mucônico. 3. Otimização . 4. Análise de balanço de fluxo. I. Título. II. Sargo, Cíntia Regina , orient.

A todos os meus Professores, colegas e família que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço, inicialmente, à minha família, que sempre me apoiou e me encorajou a a buscar meus sonhos, sendo também meu porto seguro sempre. Gostaria de agradecer a Cíntia Sargo, minha orientadora a quem devo todo o meu aprendizado nos últimos anos, que me guiou em minhas dificuldades e me auxiliou ao máximo em tudo que precisei. Agradeço principalmente por todo seu apoio, por acreditar em mim e por me apresentar a uma nova ciência e um novo mundo, do qual sequer tinha conhecimento da existência, com a qual me encontro completamente vislumbrado e maravilhado. Agradeço também aos meus amigos Lucas Kenji, Fernando Nakayama, Bento, Heimilly e José que me acompanharam nessa jornada, quase diariamente. Agradeço todo o apoio e companhia enquanto eu perseguia meus sonhos.

"Educação não transforma o mundo.

Educação muda as pessoas.

Pessoas transformam o mundo.

Paulo Freire

Resumo

A crise ambiental é hoje, um dos mais graves problemas enfrentados pela humanidade. Entre as causas desta problemática, destaca-se a alta dependência econômica de matérias-primas não renováveis para a produção industrial, gerando assim quantidades exorbitantes de poluentes e rejeitos. Portanto enfatiza-se, na comunidade científica internacional, a necessidade de uma economia circular baseada em biorrenováveis e processos de menor impacto ambiental.

Neste contexto de desenvolvimento de uma economia sustentável encaixa-se este projeto, que ataca esta problemática através do auxílio no desenvolvimento de um processo de produção baseado em plataformas microbianas para a produção de Ácido mucônico. Este é um ácido dicarboxílico de alto valor agregado e de extremo interesse industrial, por ser um precursor direto de várias matérias-primas extensivamente utilizadas na indústria química para a fabricação de nylon-6,6, PET e poliuretano.

No presente trabalho, buscou-se utilizar métodos de engenharia metabólica *in silico* para transformar a bactéria *Escherichia coli* em uma biofábrica de muconato. Isso foi realizado através da inserção de uma via heteróloga em um modelo metabólico em escala genômica da *E. coli*, possibilitando a produção *in silico* do composto de interesse. Para promover uma biossíntese efetiva, foram realizadas simulações por Análise de Balanço de Fluxo e otimizações computacionais a partir do Algoritmo Evolutivo de Força Pareto 2 e Escaneamento de Fluxos baseado em Fluxo Objetivo Imposto, a fim de formular estratégias não intuitivas de manipulações genéticas que aumentem a eficiência do processo de formação do ácido mucônico pela bactéria, utilizando glicose como fonte de carbono renovável, assim como condições ambientais que favoreçam esta biossíntese.

Palavras-chave: Modelos Metabólicos em Escala Genômica, Ácido mucônico, Otimização, Análise de Balanço de Fluxo.

Abstract

The environmental crisis is today, one of the most serious problems facing humanity. Among the causes of this problem, there is the high economic dependence on non-renewable raw materials for industrial production, thus generating exorbitant amounts of pollutants and waste. Therefore, the international scientific community emphasizes the need for a circular economy based on biorenewables and processes with less environmental impact.

In this context of development of a sustainable economy, this project fits, which tackles this problem by helping to develop a production process based on microbial platforms for the production of muconic acid. This is a dicarboxylic acid of high added value and of extreme industrial interest, as it is a direct precursor of several raw materials extensively used in the chemical industry for the manufacture of nylon-6,6, PET and polyurethane.

In the present work, we sought to use *in silico* metabolic engineering methods to transform the *Escherichia coli* bacteria into a muconate biofactory. This was done by inserting a heterologous pathway into a genomic-scale metabolic model of *E. coli*, enabling the production *in silico* of the compound of interest. To promote an effective biosynthesis, simulations by Flux Balance Analysis and computational optimizations were carried out using the Pareto Force 2 Evolutionary Algorithm and Flux Scanning based on Enforced Objective Flux (FSEOF), in order to formulate non-intuitive strategies for genetic manipulations that increase the efficiency of the process of formation of muconic acid by the bacteria, using glucose as a renewable carbon source, as well as environmental conditions that favor this biosynthesis.

Keywords: Genome-Scale Metabolic Models, Muconic Acid, Optimization, Flux Balance Analysis.

Listas de ilustrações

Figura 1 – Visualização simplificada da modelagem baseada em restrições. Através da otimização de uma função objetivo, o FBA pode identificar uma distribuição ótima de fluxo que esteja dentro do limite do espaço de soluções permitido.	25
Figura 2 – Conceito envolvido no FSEOF.	26
Figura 3 – Fluxograma do algoritmo evolutivo aplicado ao desenvolvimento de plataformas microbianas.	28
Figura 4 – Esquema simplificado das reações heterólogas inseridas no modelo. . . .	29
Figura 5 – Loop principal para o FSEOF desenvolvido em python.	30
Figura 6 – Código do SPEA2 desenvolvido em python.	31
Figura 7 – Esquematização das reações selecionadas pelo FSEOF para superexpressão, destacadas em vermelho.	33
Figura 8 – Evolução dos fluxos internos dos resultados selecionados comparados ao fluxo forçado de <i>ccAM</i> e da biomassa ao longo das iterações do FSEOF. . . .	34
Figura 9 – Impacto individual das superexpressões indicadas pelo FSEOF.	34
Figura 10 – Fluxo de TKT2 ao longo das iterações de FSEOF.	35
Figura 11 – Ilustração das reações PHETA1, TYRTA e G3PD2 em relação à via heteróloga de <i>ccAM</i> e ao ciclo TCA, destacadas em vermelho.	37
Figura 12 – Ilustração das relação das reações ACOTA, AGPR, ASPTA, DHORTS, ILETA, ORPT e SDPTA com os metabólitos OAA E PEP.	38
Figura 13 – Análise do impacto da combinação da superexpressão de DDPA, TKT e sub expressão de ASPTA.	39

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais resultados de produção de ácido mucônico por rota biológica.	21
Tabela 2 – Impacto Individual das subexpressões obtidas por FSEOF.	36

Listas de abreviaturas e siglas

<i>ccAM</i>	Ácido <i>cis,cis</i> -mucônico
DW	<i>Dry Weight</i> (Massa seca da célula)
FBA	Análise de Balanço de Fluxo
FSEOF	Escaneamento de Fluxos Baseado em Fluxo Objetivo Imposto
FVA	Análise de Variabilidade de Fluxo
GEM	Modelo Metabólico em Escala Genômica
PET	Polietileno tereftálico
SPEA2	Algoritmo Evolutivo de Força Pareto 2
MEW	<i>Metabolic Engineering Workbench</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Contextualização	19
1.2	Ácido <i>cis,cis</i> -mucônico e aplicações industriais	19
1.3	Objetivos	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Modelos metabólicos em escala genômica como ferramentas cruciais para o design de plataformas microbianas	23
2.2	Modelagem baseada em restrições para a simulação de fenótipos .	24
2.3	Métodos de otimização de fenótipos para desenvolvimento de fábricas microbianas	25
2.3.1	Escaneamento de Fluxos baseado em Fluxo Objetivo Imposto	26
2.3.2	Algoritmo Evolutivo de Força Pareto 2	27
3	METODOLOGIA	29
3.1	Adaptação do Modelo Metabólico e condições ambientais	29
3.2	Implementação dos métodos computacionais para otimização de cepas	30
3.2.1	Implementação do FSEOF	30
3.2.2	Algoritmo evolutivo	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Análise das superexpressões	33
4.2	Análise de subexpressões	36
4.3	Análise da combinação de sub e superexpressões	38
5	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	43

1 Introdução

1.1 Contextualização

Os avanços na indústria química durante os últimos séculos foram catalisadores diretos de abruptas revoluções no estilo e qualidade de vida da civilização contemporânea. Inegavelmente, estas inovações abrangeram inúmeros setores, como o agrícola, alimentício, farmacêutico, de saúde, de materiais, têxtil, energético, entre outros (WONGTSCHOWSKI, 1957). Nesse sentido, o descobrimento e desenvolvimento de produtos químicos, e a formulações de técnicas para produção e síntese destes compostos moveram - e ainda movem - este processo de transformação rápida.

Embora tenha impactado positivamente vários aspectos da sociedade, a indústria química ainda contribui com o agravamento de adversidades enfrentadas no presente, dentre as quais destaca-se a poluição ambiental, visto que a fabricação de produtos químicos de uso industrial ou final, frequentemente dependem de matérias-primas fósseis e metais pesados, além de produzir gases de efeito estufa e outros poluentes na forma de resíduos (ALINI et al., 2007; CHADWICK, 1988).

Sendo assim, com base no panorama de impacto ambiental da indústria química, e tendo em vista a gravidade dos problemas ambientais e mudanças climáticas, assim como os objetivos do desenvolvimento sustentável (ONU, 2015; FIGUERES et al., 2017; ROCKSTRÖM et al., 2009), enfatiza-se a necessidade do desenvolvimento de ciência e tecnologias que promovam uma economia circular, baseada em recursos renováveis (LEITÃO, 2015; BIRCH; TYFIELD, 2013).

Uma alternativa promissora que pode revolucionar ou pelo menos complementar a produção química é a indústria biotecnológica. Nesta indústria, recursos tipicamente biogênicos são convertidos por microrganismos ou por enzimas, gerando biocombustíveis, aminoácidos, bioplásticos e bioquímicos de valor agregado, visando evitar o esgotamento de recursos fósseis não renováveis e as emissões de gases de efeito estufa (GEE) associadas. Além disso, acredita-se que o uso de recursos renováveis tenha efeitos positivos para o desenvolvimento socioeconômico, especialmente nas áreas rurais, podendo colaborar com o desenvolvimento sustentável (FRÖHLING; HIETE, 2020).

1.2 Ácido *cis,cis*-mucônico e aplicações industriais

Os plásticos são uma grande família de polímeros, tradicionalmente derivados da indústria petroquímica que se caracterizam por apresentarem baixo custo, baixo peso,

durabilidade e facilidade de fabricação. Graças ao amplo espectro de aplicações, a demanda e a produção de plásticos têm aumentado continuamente a cada ano, colocando uma enorme carga sobre os combustíveis fósseis e o consumo de petróleo. Atualmente, a produção de plástico é responsável por cerca de 4 a 8% do consumo de petróleo global, com expectativa de chegar a 20% até 2050 (NARANCIC et al., 2020).

Neste contexto, os bioplásticos têm atraído grande atenção do mercado mundial, sendo um possível substituinte de produtos plásticos convencionais baseados em fósseis. Graças aos avanços crescentes e rápidos na área de engenharia metabólica, é possível construir plataformas microbianas capazes de converter, de forma eficiente, matérias-primas renováveis, incluindo amido, celulose, ácidos graxos, açúcares e proteínas, em uma variedade de monômeros e polímeros que podem ser empregados na síntese de diferentes bioplásticos.

Em particular, é crescente o interesse mundial pelo ácido *cis,cis*-mucônico (ccAM), um ácido dicarboxílico poli-insaturado de 6 carbonos que pode ser utilizado como intermediário na produção de uma ampla gama de bioplásticos, como o polietileno tereftálico (PET), poliamidas (nylon-6,6) e poliuretanos que são usualmente obtidos a partir de recursos fósseis., bem como de novas moléculas, como os ácidos 3-hexenedioco e 2-hexenedioco, que podem gerar polímeros com propriedade novas e avançadas e que não poderiam ser sintetizados efetivamente a partir de petroquímicos (SHANKS; KEELING, 2017).

Tradicionalmente, o ccAM é obtido através de processos químicos dependentes de matérias-primas não renováveis à base de petróleo, na presença de altas concentrações de ácidos e metais pesados, ou ainda a partir de processos cuja mistura de dois isômeros (ácido *cis,cis*- mucônico e *cis,trans*-mucônico) é gerada a partir de catecol, um substrato aromático considerado de alto custo. Ambos os processos químicos industrialmente disponíveis, requerem grande aporte de energia e geram quantidades significativas de subprodutos tóxicos, fatos que intensificam os problemas de poluição ambiental e aquecimento global, além de custos elevados com substratos e/ou processos de separação (XIE et al., 2014; KHALIL et al., 2020).

Por outro lado, o ccAM também é produzido naturalmente como metabólito intermediário da via β -cetoadipato, via responsável pelo catabolismo e destoxificação de compostos aromáticos presente em microrganismos do solo, como leveduras do gênero *Candida* e as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Rhodococcus*. Desta forma, sua produção por rota biotecnológica, empregando plataformas microbianas eficientes e substratos baratos e renováveis se apresenta como uma estratégia ambientalmente e economicamente interessante (CURRAN et al., 2013; KOHLSTEDT et al., 2018). Adicionalmente, ccAM representa um produto importante a ser incorporado dentro do conceito de biorrefinaria pois pode agregar valor à biomassa e viabilizar a implementação industrial do processo, uma vez que pode ser obtido a partir de qualquer monômero, seja

de origem da celulose, hemicelulose e lignina de diferentes biomassas, ou ainda de outros resíduos de processos integrantes da biorrefinaria.

Devido ao seu grande potencial de aplicação biotecnológica, importantes companhias de biotecnologia, como Amyris, Merck, GC Innovation America e Deinove, vêm investindo no desenvolvimento de plataformas microbianas e de bioprocessos eficientes para produção de *ccAM* em escala industrial. Em 2018, o faturamento do mercado de *ccAM* foi de USD 79,6 milhões, com tendência de crescimento significativo, podendo chegar a USD 119,4 milhões em 2024 (IMARC, 2019).

Recentemente, vários estudos têm sido realizados a fim de redesenhar rotas metabólicas de bactérias, como *Pseudomonas sp.*, *Sphingobium sp.*, *Methylococcus capsulatus*, *Corynebacterium glutamicum* e *Escherichia coli*, e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a fim de possibilitar a produção de *ccAM* a partir de substratos baratos e renováveis como carboidratos gerados nos processos de desconstrução de materiais lignocelulósicos (glicose, xilose e compostos derivados da lignina), glicerol (resíduo abundante da indústria de biodiesel), gás metano entre outros resíduos agroindustriais (XIE et al., 2014; SALVACHÚA et al., 2018; HENARD et al., 2019). Progressos significativos quanto à concentração e rendimento de *ccAM* estão sendo alcançados, como mostra a tabela 1:

Tabela 1 – Principais resultados de produção de ácido mucônico por rota biológica.

Micro organismo	Substrato	Concentração (g/L)	Rendimento (mol/mol)	Referência
<i>P. putida</i>	p-coumarato + Glicose	15,6	1,00	(JOHNSON et al., 2016)
<i>P. putida</i>	Catecol + Glicose	25,0	1,00	(KOHLSTEDT et al., 2018)
<i>P. putida</i>	Glicose	22,0	0,36	(BENTLEY et al., 2020)
<i>M. buryatense</i>	Metano	0,001	0,0001	(HENARD et al., 2019)
<i>C. glutamicum</i>	Lignina + Glicose	1,8	ND	(BECKER et al., 2018)
<i>C. glutamicum</i>	Glicose	37,5	0,21	(LEE et al., 2018)
<i>S. cerevisiae</i>	Glicose	0,1	0,01	(CURRAN et al., 2013)
<i>S. cerevisiae</i>	Glicose	5,1	0,07	(PYNE et al., 2018)
<i>E. coli</i>	Glicose	2,4	0,30	(DRATHS; FROST, 1994)
<i>E. coli</i>	Glicose + Glicerol	1,5	0,08	(LIN et al., 2014)
<i>E. coli</i>	Glicose	36,8	0,22	(NIU, 2002)

Fonte: Autor.

Apesar dos avanços já atingidos nessa área, as baixas produtividades de *ccAM*, assim como a elevada produção de subprodutos indesejados, em especial o protocatecuato, produto intermediário da via do chiquimato, são recorrentes nos trabalhos já relatados. Desta forma, o desenvolvimento de plataformas microbianas superprodutoras de *ccAM*

mais robustas e com mínima produção de subprodutos indesejados, além de bioprocessos economicamente viáveis e ambientalmente corretos, permanecem como desafios e requerem esforços de engenharia metabólica e de otimização de bioprocessos.

1.3 Objetivos

Com base neste contexto, o presente projeto visou a investigação *in silico* de estratégias para o desenvolvimento de uma plataforma microbiana para a produção de ácido mucônico. Identificando, através de algoritmos desenvolvidos em *Python*, alvos de engenharia genética para a deleção e super/subexpressão de genes visando o redirecionamento dos fluxos metabólicos da bactéria *Escherichia coli* que favoreçam a produção de ácido mucônico a partir de glicose, uma fonte de carbono renovável.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Modelos metabólicos em escala genômica como ferramentas cruciais para o design de plataformas microbianas

A engenharia metabólica de sistemas, área da ciência que incorpora conceitos e ferramentas de biologia de sistemas, biologia sintética e engenharia evolutiva, tem acelerado o desenvolvimento de cepas industriais de alta performance de forma direcionada e eficiente, e vem contribuindo para o desenvolvimento de rotas sustentáveis alternativas para produção de um vasto espectro de produtos químicos, desde combustíveis e *commodities* até produtos químicos finos (CHOI et al., 2019a; LEE; KIM, 2015).

Após a divulgação da primeira sequência completa do genoma na década 90, as pesquisas sobre modelos metabólicos em escala genômica (GEMs) abriram uma nova era em engenharia metabólica. Hoje em dia, é crescente o uso de modelos metabólicos em escala genômica (GEMs) para analisar e simular o metabolismo celular de diferentes organismos, incluindo microorganismos, plantas e mamíferos. Além disso, tais GEMs são considerados uma ferramenta poderosa para desenho de estratégias de engenharia metabólica (CHAE et al., 2017).

Os GEMs são reconstruídos a partir de informações biológicas curadas experimentalmente com base em dados de anotação de genes, de funções, metabólitos, reações metabólicas e suas interações para um determinado organismo, fornecendo representações matemáticas e computacionais das capacidades metabólicas conhecidas deste organismo (KIM et al., 2015; GU et al., 2019). Estes modelos consistem em centenas ou milhares de reações e são baseados na estequiometria de todas as possíveis reações metabólicas de uma célula, considerando a reversibilidade destas reações.

Com base nestes dados de reações, é possível modelar um sistema de equações diferenciais do balanço de massa para os componentes intracelulares, conforme explicitado na expressão:

$$\frac{d\mathbf{c}_n(t)}{dt} = \mathbf{S}_{mn} \cdot \mathbf{v}(t) \quad (2.1)$$

$$\mathbf{S}_{mn} = \begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} & \cdots & s_{1n} \\ s_{21} & s_{22} & \cdots & s_{2n} \\ s_{31} & s_{32} & \cdots & s_{3n} \\ \vdots & & & \\ s_{m1} & s_{m2} & \cdots & s_{mn} \end{bmatrix}$$

Onde \mathbf{c}_n representa a concentração do *n*-ésimo metabólito, \mathbf{S} é a matriz de coefici-

entes estequiométricos de \mathbf{m} compostos ao longo de \mathbf{n} reações e $\mathbf{v}(t)$ o vetor das velocidades de reação.

O uso de GEMs no design de plataformas microbianas contribui para a otimização da produção do produto de interesse, reduzindo os esforços e custos dos tradicionais métodos experimentais baseados em tentativas e erro.

2.2 Modelagem baseada em restrições para a simulação de fenótipos

Para lidar com os avanços no desenvolvimento de GEMs cada vez mais complexos, são requeridos métodos sofisticados de análise de dados. Dentre as abordagens desenvolvidas mais adequadas para este tipo de problemática destaca-se a modelagem baseada em restrições (*Constraint-based modeling-CBM*), que permite análises em larga escala sem necessidade de informações cinéticas (BORDBAR et al., 2014; LEWIS; NAGARAJAN; PALSSON, 2012).

Neste ramo, o primeiro e mais difundido método para previsão de fenótipos em microorganismos é a Análise de Balanço de Fluxo (*Flux Balance Analysis-FBA*). Sua formulação é baseada na hipótese de que o metabolismo de um microorganismo busca otimizar um determinado objetivo celular que pode ser representado matematicamente através da reação que representa a formação de biomassa (IBARRA; EDWARDS; PALSSON, 2002; MAIA; ROCHA; ROCHA, 2016; FEIST; PALSSON, 2010).

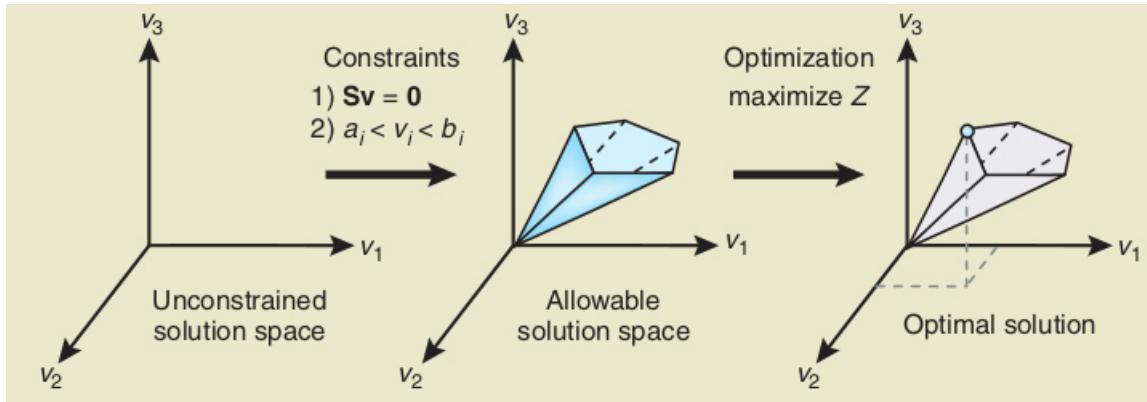
Também é valido notar que o metabolismo ocorre em uma escala de tempo muito mais rápida do que eventos regulatórios, assim como os de divisão celular. Desse modo é razoável afirmar que as concentrações dos metabólitos não alteram-se com o passar do tempo, assumindo-se assim um estado estacionário. Portanto, a equação 2.1 pode ser reduzida a:

$$\mathbf{S}_{mn} \cdot \mathbf{v}(t) = \mathbf{0} \quad (2.2)$$

Ao combinar, portanto, a suposição de estado estacionário com a maximização da biomassa é possível resolver a equação 2.2 para obter, como resultado, o vetor de fluxos metabólicos \mathbf{v} , conforme observável na figura 1 (ORTH; THIELE; PALSSON, 2010; SAVINELL; PALSSON, 1992).

Uma das deficiências do FBA é que o vetor de soluções gerado não é único. Isso significa que uma variedade de distribuições de fluxos pode levar à um mesmo valor ótimo de biomassa. Portanto, para a seleção de fluxos cruciais e eliminação de falsos positivos, é importante que seja realizada a Análise da Variabilidade dos Fluxos (*Flux Variability Analysis-FVA*). Esta análise fornece os valores máximos e mínimos para cada reação dentro de um mesmo valor ótimo de biomassa (MAHADEVAN; SCHILLING, 2003).

Figura 1 – Visualização simplificada da modelagem baseada em restrições. Através da otimização de uma função objetivo, o FBA pode identificar uma distribuição ótima de fluxo que esteja dentro do limite do espaço de soluções permitido.



Fonte: (ORTH; THIELE; PALSSON, 2010)

2.3 Métodos de otimização de fenótipos para desenvolvimento de fábricas microbianas

Como já mencionado, a identificação de genes alvo para manipulação das vias metabólicas de um organismo, seja para melhorar a produção de um produto de interesse ou para minimizar a produção de metabólitos indesejados, também pode ser guiada, de forma racional, por GEMs. Neste caso, o esforço computacional é maior, uma vez que o espaço de busca (combinações de reações a serem deletadas, ou super-expressas, por exemplo) adquire grandes dimensões. Por exemplo, para uma rede metabólica hipotética de 250 reações, uma otimização que contemple 5 knockouts implica em um espaço de busca que ultrapassa $7,8 \cdot 10^9$ possíveis soluções (PATIL et al., 2005). Dado o fato de que os GEMs normalmente possuem uma dimensão superior à deste exemplo, problemas de otimização de dois níveis podem ser empregados para buscar o melhor mutante a ser obtido ao deletar (ou super/subexpressar) alguns genes do microrganismo selvagem de interesse. Deste modo, este microorganismo é forçado a produzir o produto desejado por meio de modificações genéticas ao mesmo tempo que permanece viável.

Neste sentido, diferentes algoritmos de otimização de cepas baseados em métodos de Programação Inteira-Mista Linear de dois níveis (*Mixed Integer Linear Programming - MILP*) ou métodos meta-heurísticos (MAIA; ROCHA; ROCHA, 2016) vêm sendo desenvolvidos e empregados para o desenho de estratégias de engenharia metabólica para biossíntese de um amplo espectro de bioquímicos, como terpenos (SUN et al., 2014; HUANG et al., 2018)), ácidos orgânicos (MIENDA; SALLEH, 2017; MISHRA et al., 2018), aminoácidos e lipídeos.

Com base nisso, para o presente trabalho, foram selecionadas duas metodologias de otimização de plataformas microbianas a fim de encontrar estratégias para a produção de

ccAM em *E. coli*: o algoritmo evolutivo, e o Escaneamento de Fluxos baseado em Fluxo Objetivo Imposto (*Flux Scanning based on Enforced Objective Flux- FSEOF*) representando um método meta-heurística e um MILP, respectivamente (MAIA; ROCHA; ROCHA, 2016; CHOI et al., 2010).

2.3.1 Escaneamento de Fluxos baseado em Fluxo Objetivo Imposto

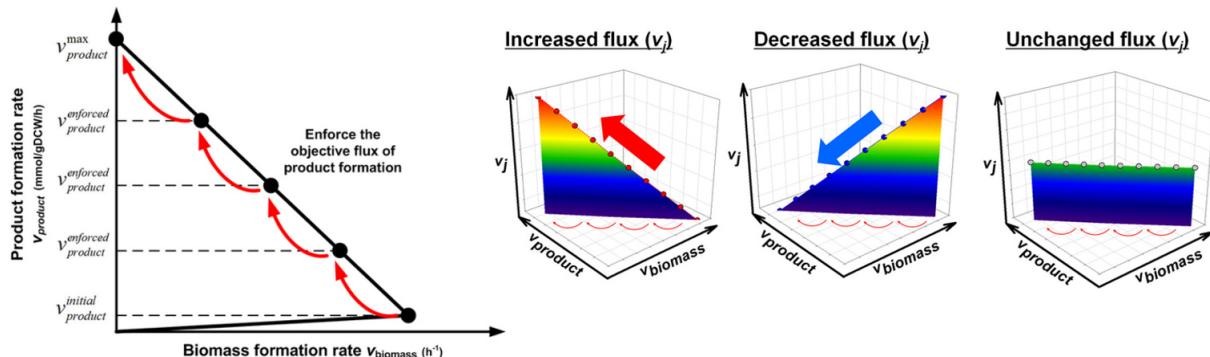
O algoritmo FSEOF, consiste em um método para identificação *in silico* de superexpressões que favoreçam a produção de um determinado metabólito. O algoritmo varre todos os fluxos do modelo e seleciona todos aqueles que aumentam conforme a produção do metabólito é forçadamente aumentada (CHOI et al., 2010).

Para que o FSEOF possa ser devidamente implementado, são calculados os fluxos iniciais ($v_j^{inicial}$) através de um FBA com a maximização da biomassa como objetivo. Em seguida, são calculados os fluxos no máximo teórico de produção do metabólito objetivo ($v_j^{máximo}$). Isso é feito através de outra iteração de FBA na qual o objetivo a ser maximizado é a formação do produto desejado (*ccAM*, no caso deste projeto).

Uma vez que os fluxos iniciais e máximos são computados. FSEOF é conduzido a partir da realização de FBA, com a maximização da biomassa como objetivo, enquanto a formação do produto de interesse é gradualmente aumentada a partir de seu valor inicial até um valor adjacente ao máximo teórico anteriormente calculado, em um total de n avaliações. A cada passo, os fluxos intracelulares calculados são analisados e aqueles que apresentarem um aumento em relação ao passo anterior (sem que haja mudança na direção da reação) são selecionados, conforme a figura 2.

Para o presente trabalho, foi implementada uma instância de FSEOF baseada na incrementação gradual do fluxo de *ccAM* de 10 iterações, até o valor máximo de 6,93 $mmol/gDW.h$.

Figura 2 – Conceito envolvido no FSEOF.



Fonte: (CHOI et al., 2010)

2.3.2 Algoritmo Evolutivo de Força Pareto 2

A classe dos algoritmos evolutivos lança mão do princípio de evolução Darwiniano em uma metodologia meta-heurística de otimização. Esta abordagem consiste na ideia de que dada uma população de indivíduos sob determinada pressão ambiental, a competição por recursos causa uma seleção natural e os indivíduos mais aptos sobrevivem, causando um aumento na aptidão geral da população.

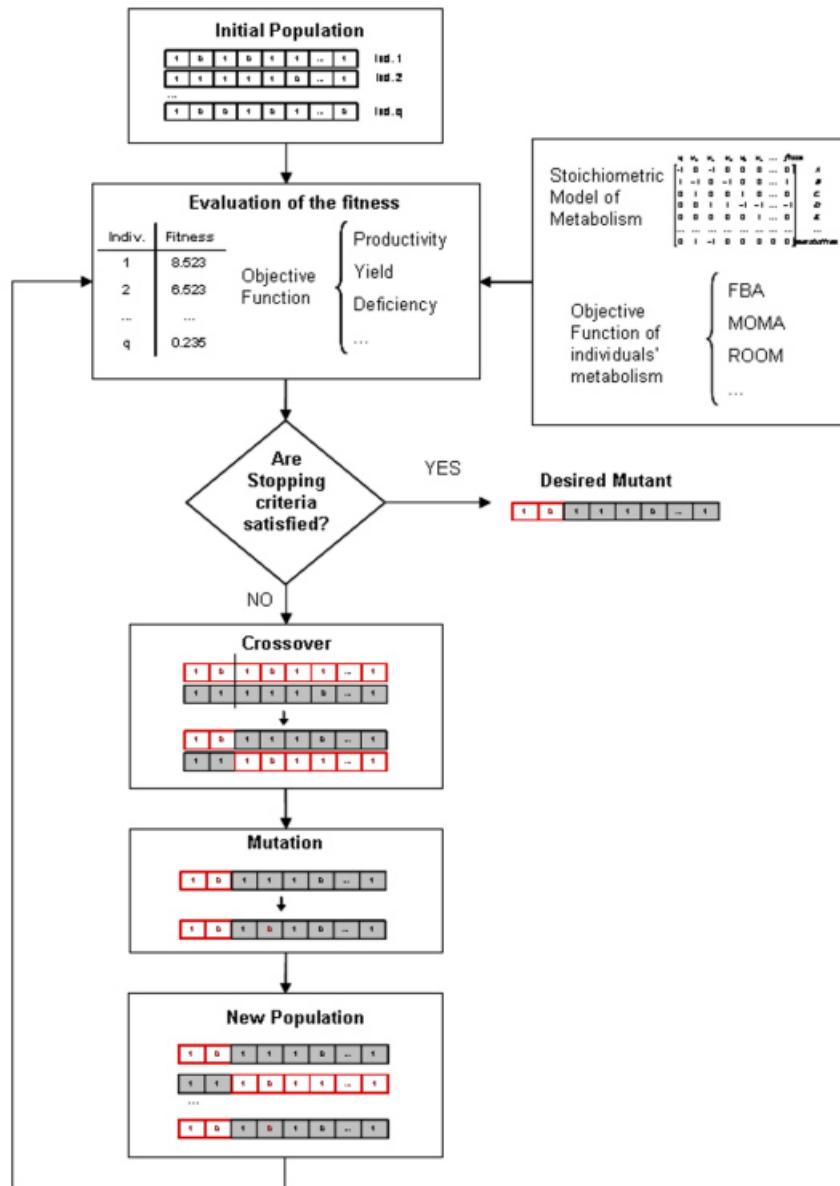
Analogamente, dada uma função a ser maximizada, pode-se gerar aleatoriamente um conjunto de possíveis soluções. Em sequência, aplica-se a função a este conjunto de soluções como medida de ajuste, selecionando as soluções com maiores valores na função. Estes valores, por sua vez, são sujeitos a operadores de variação para formular um novo conjunto de soluções. Este é novamente sujeito à mesma função de avaliação, e este mesmo processo se repete até que um certo valor seja atingido ou um certo número de iterações deste processo seja realizado. Com base nessa analogia, pode-se denominar as possíveis soluções como indivíduos, cada conjunto como uma geração e, por fim, os operadores de variação podem ser denominados de mutação, quando aplicados à um único indivíduo, e crossover, quando aplicados a dois ou mais indivíduos (EIBEN; SMITH, 2015).

Este método de abordagem vêm sendo amplamente utilizado, em conjunto com CBMs, e indicado para a identificação de deleções que favoreçam o desenvolvimento de plataformas microbianas (PATIL et al., 2005; VIEIRA et al., 2019). Neste nicho, cada indivíduo é formado por um vetor binário indicando quais genes do modelo sofrerão deleção, e os fenótipos de cada indivíduo são então avaliados de acordo com o objetivo de produção do metabólito de interesse, conforme a figura 3:

Dado o formato base do algoritmo evolutivo, há uma pluralidade de opções disponíveis para utilização, podendo permutar desde os operadores de variação até os métodos de seleção de indivíduos. Um dos algoritmos evolutivos mais empregados na otimização de cepas para engenharia metabólica, é o Algoritmo Evolutivo de Força Pareto 2 (SPEA2). Esta versão, em específico, apresenta diversas vantagens, mas a principal diferença a ser notada, é a possibilidade de otimização multiobjetivo (ZITZLER; LAUMANN; THIELE, 2001).

O SPEA2 destaca-se como uma das alternativas meta-heurísticas mais bem consolidadas para otimização multiobjetivo. Este difere-se da categoria pela utilização do conceito de eficiência de Pareto na seleção de *fitness* de indivíduos, permitindo portanto, a utilização de diversos critérios como funções de ajuste.

Figura 3 – Fluxograma do algoritmo evolutivo aplicado ao desenvolvimento de plataformas microbianas.



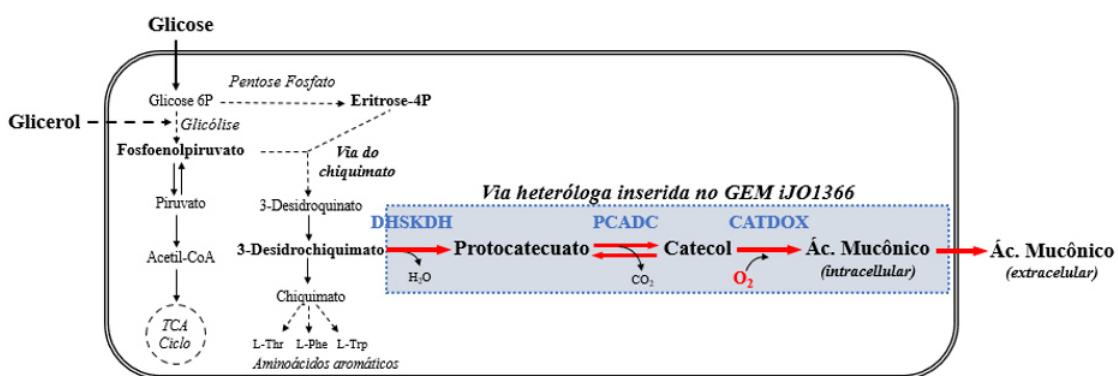
Fonte: (PATIL et al., 2005)

3 Metodologia

3.1 Adaptação do Modelo Metabólico e condições ambientais

Os estudos neste trabalho foram baseados no GEM iJO1366, por tratar-se de um modelo já curado e amplamente utilizado em trabalhos de Engenharia Metabólica para *E. coli* (ORTH et al., 2011). O modelo é composto por 1366 genes, 2583 reações, sendo 2253 reações de conversão e 330 reações de transporte, assim como 1805 metabólitos, fornecendo portanto uma variedade de fluxos capaz de mimetizar o comportamento da bactéria de maneira satisfatória. Como a *E. coli* não produz o metabólito ccAM naturalmente, foi necessário adaptar o modelo IJO1366, inserindo uma via heteróloga para viabilizar a formação do produto de interesse, assim como as reações de transporte do muconato para o meio extracelular. A via selecionada inclui três reações partindo do intermediário 3-desidrochiquimato (DHS), conforme a figura: 4. Dentre as 5 vias metabólicas já descritas na literatura para a biossíntese de ccAM, selecionou-se a via cujo precursor principal é o Dehidrochiquimato, em estudos prévios, por ser a rota com o maior potencial para produção de ácido mucônico, com um fluxo máximo teórico avaliado em $8.4 \text{ mmol.gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ (AVERESCH; KRÖMER, 2014).

Figura 4 – Esquema simplificado das reações heterólogas inseridas no modelo.



Fonte: Autor.

Uma vez adaptado o modelo metabólico, algumas restrições foram alteradas de forma a representar as condições sob as quais pretende-se submeter a cepa de *E. coli* para a produção de ccAM. Inicialmente, o fluxo de entrada do substrato (glicose) foi fixado em $10 \text{ mmol.gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$. Em seguida, com base em análises prévias, conforme a necessidade de oxigênio como reagente para a catecol 1,2-dioxigenase (CATDOX), optou-se por uma via aeróbica de produção. No entanto, a ingestão de oxigênio também foi fixada em $10 \text{ mmol.gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$.

3.2 Implementação dos métodos computacionais para otimização de cepas

A adaptação do GEM iJO1366, assim como a implementação dos métodos discutidos neste trabalho foram desenvolvidos em um computador *desktop* com Intel®CoreTM i7-7500U @ 2.7 GHz. O projeto foi inteiramente desenvolvido a partir da linguagem *Python* 3.9.7.

Dentre os pacotes disponíveis, foram utilizados o COBRApy e MEWpy, respectivamente para análises metabólicas baseadas em restrições e otimizações evolutivas (EBRAHIM et al., 2013; PEREIRA; CRUZ; ROCHA, 2021). Todo o código desenvolvido encontra-se disponível em: <<https://github.com/dn8-bit/Muacc>>.

3.2.1 Implementação do FSEOF

A utilização do pacote COBRApy permite uma fácil implementação do FSEOF a partir de poucas linhas de código (EBRAHIM et al., 2013). Oferecendo métodos para a leitura do GEM, na forma da função *load_json_model*, assim como a realização das simulações FBA, na forma da função "*optimize*". Sendo, portanto, necessário apenas formular o loop principal das iterações do algoritmo, conforme observável na figura 5.

Figura 5 – Loop principal para o FSEOF desenvolvido em python.

```
for item in fluxos_forcados:
    i+=1
    #fixando o valor de ccAM
    reacao_alvo.upper_bound=item
    reacao_alvo.lower_bound=item
    simulacao= cobra_model.optimize().fluxes #simulação FBA
    simulacao.to_csv(f'fluxos/Fluxos iteracao {i}') #registrando os fluxos em um arquivo CSV
    lista_fluxos.append(simulacao)
    a=[]
    for reacao in cobra_model.reactions: #seleção dos fluxos que acompanharam o aumento do produto alvo
        if lista_fluxos[i-1][reacao.id]<lista_fluxos[i][reacao.id] and lista_fluxos[i][reacao.id]*lista_fluxos[i-1][reacao.id]>=0:
            a.append(reacao.id)
    fva=cobra.flux_analysis.flux_variability_analysis(cobra_model,reaction_list=a) #implementação do FVA
    fva.to_csv(f'FVA/FVA iteracao {i}')
    lista_fva.append(fva)
    lista_selecionadas.append(a) #lista de candidatas

with open('resultados.txt', 'w') as out_file: #Registro dos resultados selecionados
    for a in lista_selecionadas:
        out_file.writelines(str(a)+ '\n')
    lista_fluxos.append(fluxos_maximo)
```

Fonte: Autor (Disponível em <<https://github.com/dn8-bit/Muacc>>).

Por fim, todas as reações selecionadas ao final das n avaliações foram também sujeitas a uma análise FVA para eliminação de falsos positivos. Sendo assim, ao final de todos os passos, as reações candidatas à superexpressão foram armazenadas em um arquivo CSV.

3.2.2 Algoritmo evolutivo

Para a implementação em *python* do SPEA2, optou-se pelo recém desenvolvido *Metabolic Engineering Workbench for python* (MEWpy) (PEREIRA; CRUZ; ROCHA, 2021). A biblioteca, idealizada para resolver este exato tipo de problema, oferece opções que exigem pouco volume de código para a implementação de um algoritmo evolutivo para previsão de deleções. Através das classes EA, *TargetFlux* e *RKOPProblem*, é possível obter uma construção funcional da otimização em menos de 30 linhas de código, conforme observável na figura 6.

Figura 6 – Código do SPEA2 desenvolvido em *python*.

```
from mewpy.problems import RKOPProblem
from mewpy.optimization.evaluation import TargetFlux
from mewpy.optimization import EA
from cobra.io import load_json_model
from mewpy.util.constants import EAConstants
import csv

#configurando o modelo
EAConstants.NUM_CPUS = 8
model= load_json_model('RotaA.json')
biomassa="R_Ec_biomass_ij01366_core_53p95M"
produto="R_DHSKDH"
o2="R_EX_o2_LPAREN_e_RPAREN_"
glc="R_EX_glc_LPAREN_e_RPAREN_"

#preparando condições ambientais e simulação
envcond={glc: (-10.000,-9.99999),o2:(-10.000,-9.99999)}
model.objective="R_Ec_biomass_ij01366_core_53p95M"
simulation=get_simulator(model,envcond=envcond)
res=simulation.simulate(method='FBA')

#Implementação do EA para knock-out
evaluator= TargetFlux(produto,biomass=biomassa, min_biomass_value=0.02)
problem=RKOPProblem(model,fevaluation=[evaluator],envcond=envcond,candidate_max_size=5)
ea=EA(problem,max_generations=10000 ,visualizer=False,mp=True,algorithm='SPEA2')
final_pop=ea.run()

#depositando resultados em arquivo csv
with open('filename', 'wb') as myfile:
    wr = csv.writer(myfile, quoting=csv.QUOTE_ALL)
    wr.writerow(final_pop)
```

Fonte: Autor (Disponível em <<https://github.com/dn8-bit/Muacc>>).

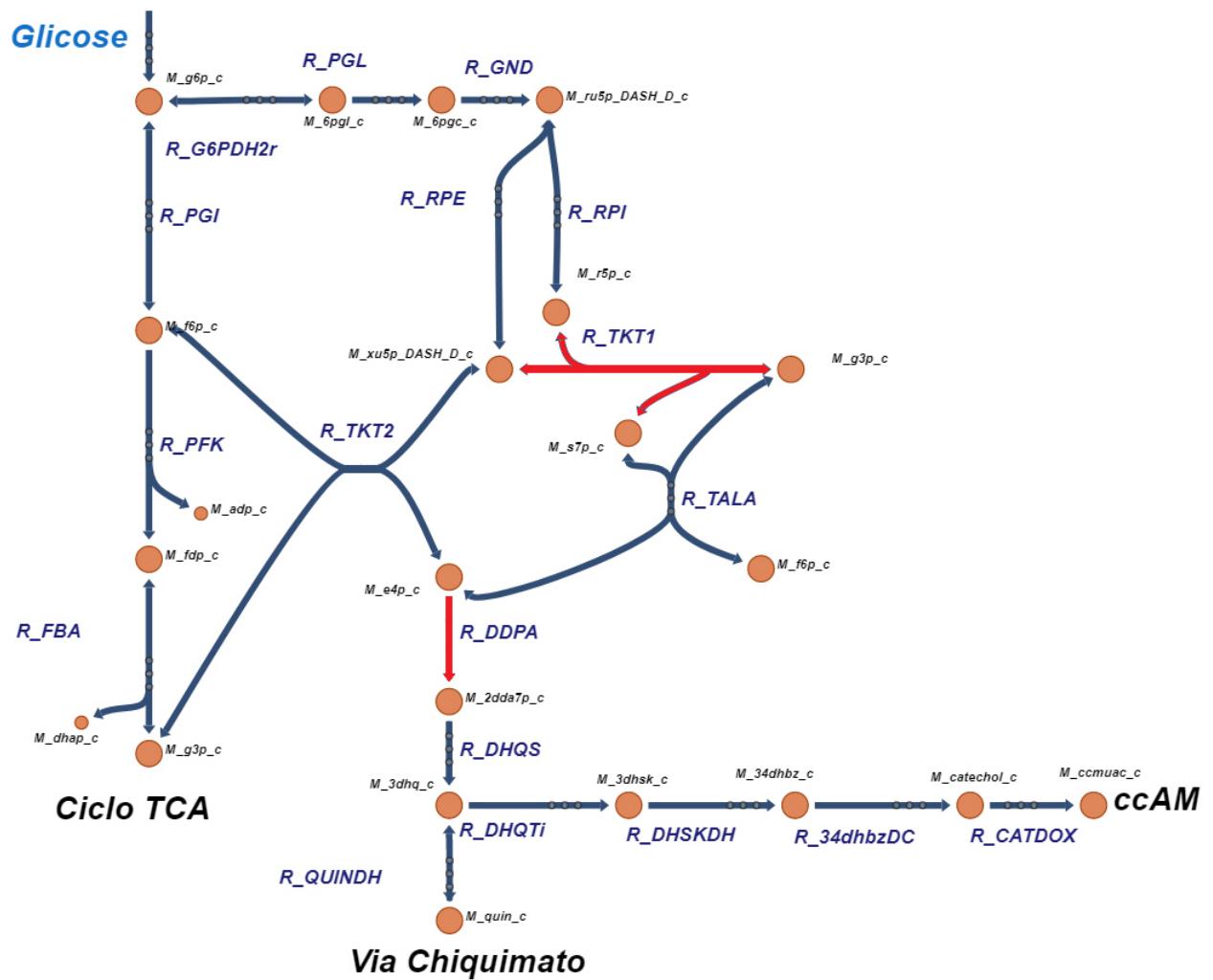
A implementação da otimização evolutiva, embora funcional, não foi capaz de apresentar resultados no tempo hábil deste projeto devido ao alto custo computacional das ferramentas disponíveis em *Python*.

4 Resultados e discussão

4.1 Análise das superexpressões

A implementação desenvolvida para o FSEOF indicou apenas duas reações para superexpressão: Transketolase (TKT1) e 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato sintetase (DDPA), ambas relacionadas ao consumo e disponibilidade do precursor D-eritrose 4-fosfato (E4P). A relação entre tais superexpressões e a produção de ccAM pode ser facilmente explicada pelo fato de que estas promovem um desvio de carbono do substrato do metabolismo usual em favor à via do chiquimato, conforme a figura 7 abaixo:

Figura 7 – Esquematização das reações selecionadas pelo FSEOF para superexpressão, destacadas em vermelho.

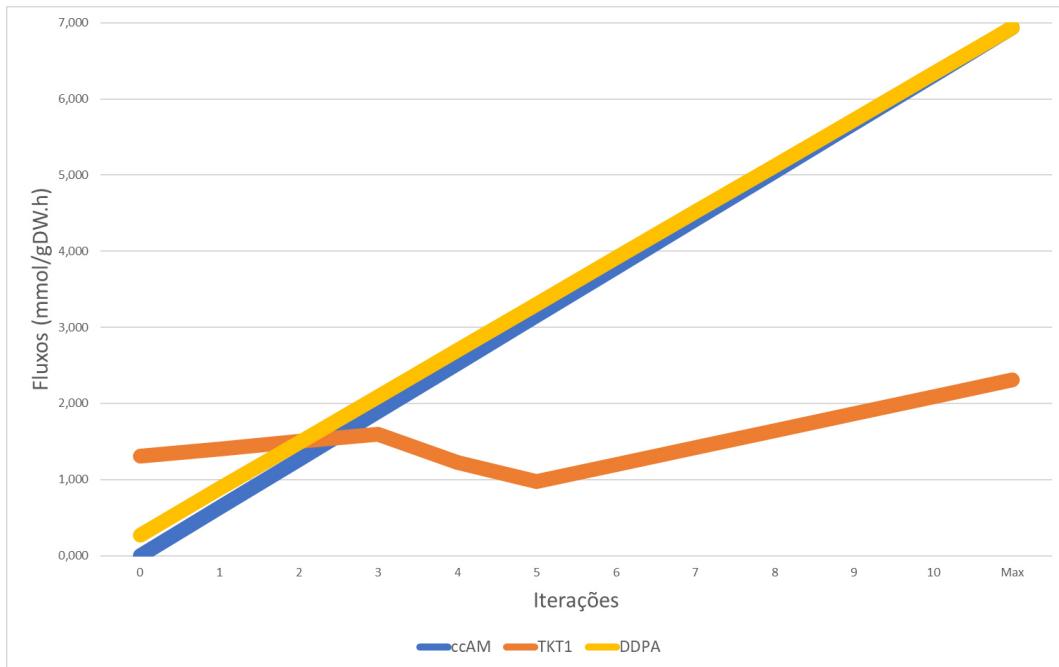


Fonte: Autor.

Apesar de ambas serem apresentadas como candidatas pelo algoritmo, apenas a DDPA apresenta um crescimento linear no fluxo de modo a acompanhar o aumento no

fluxo de *ccAM*, conforme identificado na figura 8:

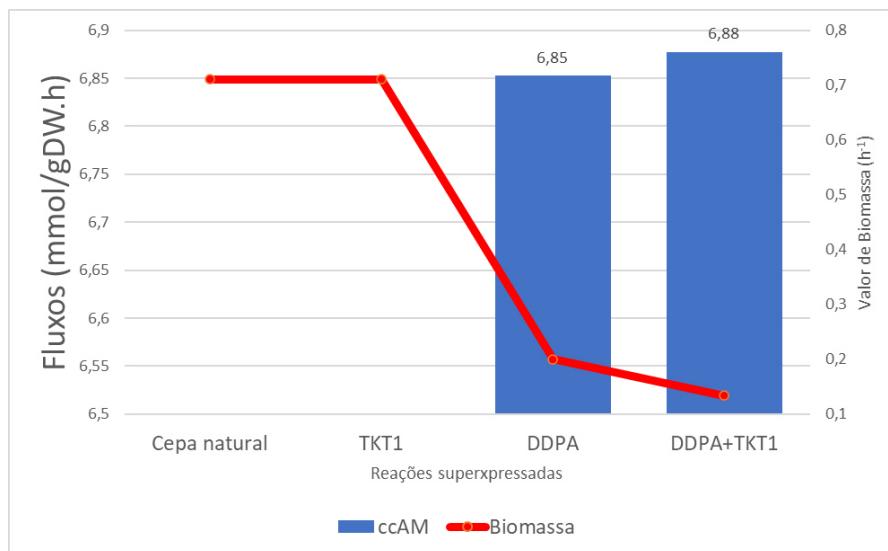
Figura 8 – Evolução dos fluxos internos dos resultados selecionados comparados ao fluxo forçado de *ccAM* e da biomassa ao longo das iterações do FSEOF.



Fonte: Autor.

Uma análise do impacto individual de cada superexpressão indica que o maior impacto na formação de *ccAM* é obtido pela superexpressão da DDPA, enquanto a superexpressão apenas de TKT1 resulta em um acréscimo de somente 0,3% no produto de interesse, conforme a figura 9.

Figura 9 – Impacto individual das superexpressões indicadas pelo FSEOF.



Fonte: Autor.

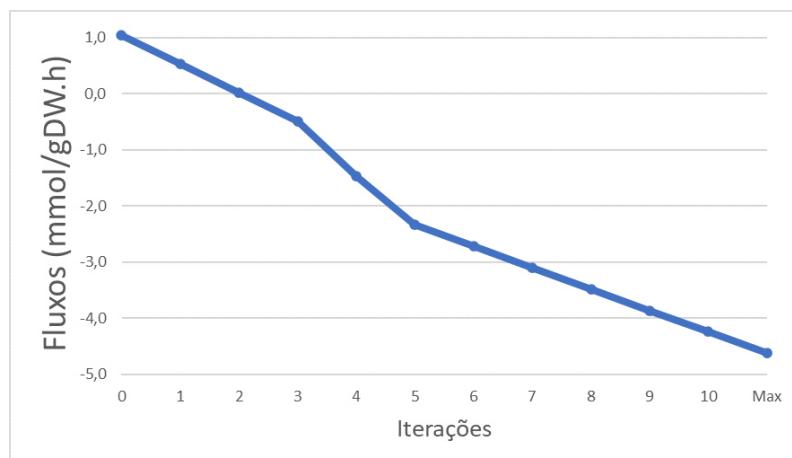
Após buscas na literatura, foi possível confirmar que há evidências prévias em favor da hipótese de que estas modificações estão associadas à produção de *ccAM*, tendo

sido aplicadas com sucesso em *Saccharomyces cerevisiae* (AVERESCH; KRÖMER, 2014; CURRAN et al., 2013; CHOI et al., 2019b). Niu *et al.* (2002), também relata a formação de *ccAM* em *E. coli* através da superexpressão da transketolase (NIU, 2002). Nos trabalhos analisados, é afirmado que a superexpressão da transketolase promove um aumento na disponibilidade do precursor E4P, que por sua vez é consumido na reação DDPA, promovendo um aumento no fluxo de carbono na via do chiquimato.

Os resultados experimentais relatados na literatura, portanto, indicam a importância da superexpressão da transketolase para a formação de ácido mucônico. As simulações realizadas neste trabalho, no entanto apontam não apontam para as mesmas conclusões, havendo pouca influência da Transketolase na produção de *ccAM*, conforme já explicitado na figura 9. Uma hipótese para esta discordância reside no fato de que duas (TKT1 e TKT2) são reguladas pelo mesmo gene e a reação TKT2 possui um fluxo contrário ao sentido da produção de E4P no modelo utilizado, dessa maneira a medida que o fluxo de *ccAM* é incrementado, a reação muda de direção, não sendo selecionada pelo FSEOF. Sendo assim, uma simulação FBA precisa desta superexpressão exigiria ajustes complexos no modelo.

Portanto, uma maneira de confirmar a importância da superexpressão da transketolase como estratégia para a plataforma microbiana através dos resultados obtidos é observar a mudança de sinal e o crescente fluxo negativo em TKT2, conforme observável na figura 10.

Figura 10 – Fluxo de TKT2 ao longo das iterações de FSEOF.



Fonte: Autor.

Sendo assim, reafirma-se a importância das superexpressões dos genes da TKT e DDPA como estratégias de suma importância a serem empregadas nos testes *in vivo*.

4.2 Análise de subexpressões

Outra seção dos resultados selecionados pelo FSEOF é composta por reações cujo fluxo apresenta valores negativos que tornam-se mais próximos de zero conforme ocorre o incremento do produto de interesse, sem que haja troca de direção da reação no máximo teórico. Estes resultados podem ser interpretados como sugestões de subexpressões para direcionamento do metabolismo em favor da formação de ácido mucônico.

A partir dos dados obtidos, é possível destacar um total de 17 reações cujos fluxos diminuíram gradativamente conforme a formação de ccAM foi imposta. A partir dos valores obtidos, foi realizada uma análise do impacto individual de cada subexpressão, conforme observável na tabela 4.2:

Tabela 2 – Impacto Individual das subexpressões obtidas por FSEOF.

Reação	Fluxo de ccAM (mmol/gDW.h)	Valor de biomassa
ACOTA	2,963	0,014
AGPR	2,963	0,014
ASAD	0,006	0,021
ASPTA	3,303	0,071
CTECOAI7	0,000	0,709
DHORTS	2,963	0,014
G3PD2	2,377	0,071
GLUDy	0,000	0,657
HSDy	0,002	0,007
ILETA	3,105	0,007
MOX	0,000	0,710
ORPT	2,377	0,071
PGK	0,000	0,440
PGM	0,000	0,525
PHETA1	2,377	0,071
SDPTA	2,377	0,071
TYRTA	2,377	0,071

Fonte: Autor.

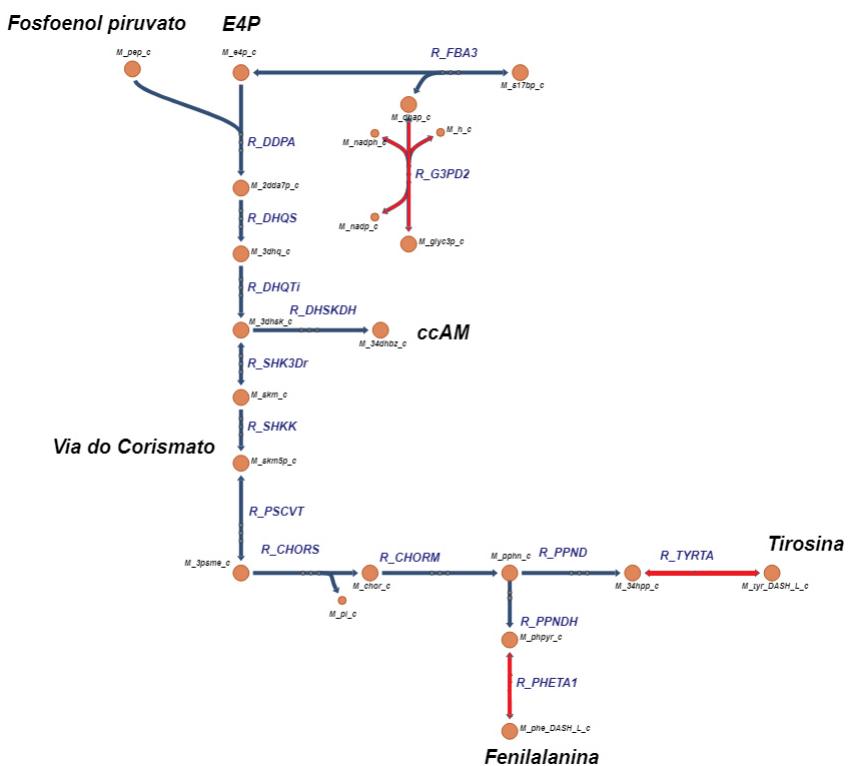
A partir destes dados, nota-se que 4 modificações não resultaram em produção de ácido mucônico: Isomerase 3-cis-2-trans-enoil-CoA (CTECOAI7), glutamato desidrogenase (GLUDy), malato oxidase (MOX), fosfoglicerato quinase (PGK), fosfoglicerato mutase (PGM). Além disso, as análises FBA adicionais atestaram que nenhuma combinação de duas ou mais subexpressões resultou em ganhos na formação de produto em relação às modificações individuais. Sendo assim, para as análises subsequentes foram consideradas apenas as reações individuais que resultaram em ganhos na produção de ccAM.

Dentre as subexpressões que geraram formação de ccAM, destacam-se inicialmente, as reações fenilalanina transaminase (PHETA1) e tirosina transaminase (TYRTA). A relação destas pode ser facilmente explicadas por serem reações de formação de aminoácidos

derivados da via do Corismato, competindo diretamente com a produção de ácido mucônico. Sendo assim, tais modificações permitem que mais carbono seja desviado para a produção de Protocatechuato e, por consequência, de ccAM. Conforme ilustrado na figura 11.

Além disso, outra subexpressão notável encontra-se na reação glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PD2), esta foi relatada na literatura como candidata para deleção em *S. cerevisiae*, aumentando a disponibilidade de E4P para a via do chiquimato, conforme a figura 11 (AVERESCH; KRÖMER, 2014). Tal deleção, no entanto, teve de ser acompanhada da superexpressão de reações produtoras de piruvato, uma vez que este *Knock-out* inviabiliza o crescimento celular (HUBMANN; GUILLOUET; NEVOIGT, 2011; BOLES et al., 1997).

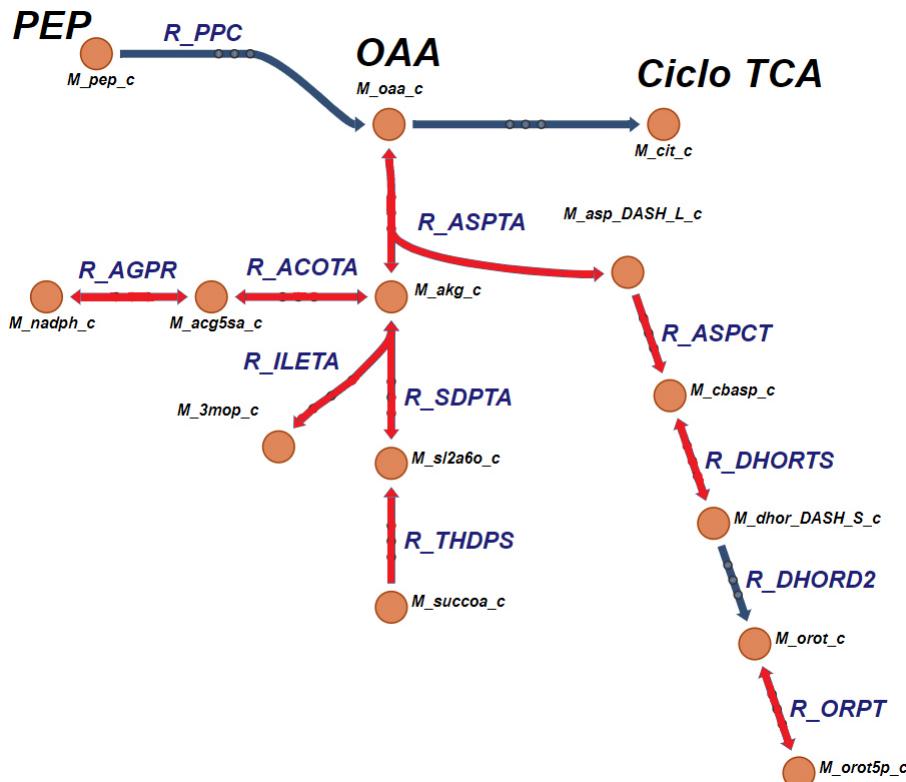
Figura 11 – Ilustração das reações PHETA1, TYRTA e G3PD2 em relação à via heteróloga de ccAM e ao ciclo TCA, destacadas em vermelho.



Fonte: Autor.

Por fim, não foram encontrados na literatura, indícios que auxiliem na explicação das subexpressões restantes. Uma hipótese que justifica o impacto dessas modificações é o consumo de fosfoenol piruvato (PEP), através do Oxaloacetato (OAA). Este configura-se como um nó que relaciona o PEP com as demais subexpressões sugeridas, que por sua vez é um precursor essencial para a via heteróloga inserida (SAUER; EIKMANNS, 2005). Embora não haja uma conexão direta entre o OAA e o ccAM, as simulações realizadas neste estudo sugerem uma relação entre as reações que envolvem oxaloacetato e a produção de ácido mucônico, exigindo análises subsequentes ao presente trabalho.

Figura 12 – Ilustração das relações das reações ACOTA, AGPR, ASPTA, DHORTS, ILETA, ORPT e SDPTA com os metabólitos OAA E PEP.



Fonte: Autor.

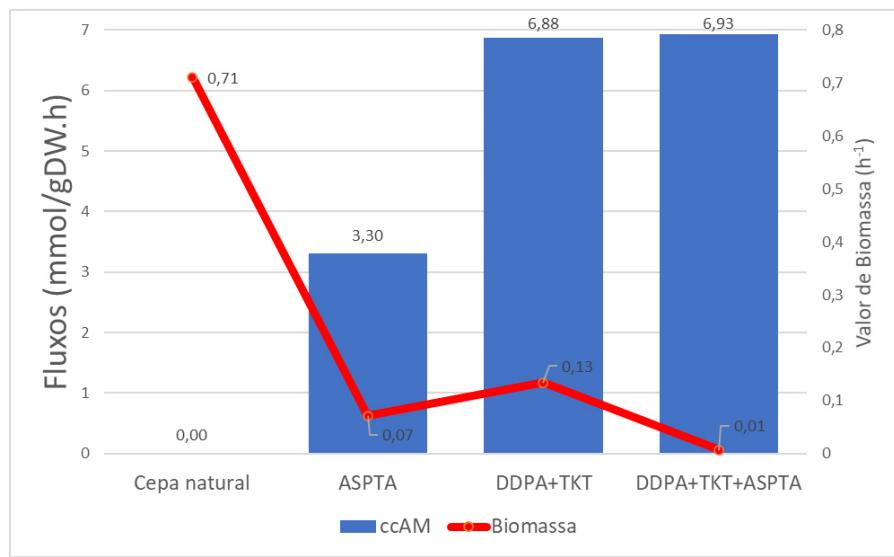
4.3 Análise da combinação de sub e superexpressões

Como análise final, as candidatas à subexpressão foram combinadas às superexpressões previamente discutidas para avaliar os efeitos da utilização de ambas estratégias em conjunto.

Conforme indicado anteriormente, a utilização de duas ou mais subexpressões em conjunto não implica em aumento na produção de ccAM e, em concordância com tais análises, o mesmo comportamento pode ser observado nestas simulações. Apenas uma Subexpressão individual, ao ser combinada com as modificações de TKT e DDPA, foi capaz de apresentar uma melhora na formação do produto de interesse: Aspartato Transamionase (ASPTA). O acréscimo desta subexpressão causou um aumento de 0,7% no fluxo de ccAM, elevando o valor final para $6,93 \text{ mmol.gDW}^{-1}.h^{-1}$, conforme observável na figura 13.

O fato de que a ASPTA apresenta-se como única reação a promover um acréscimo na produção de ccAM corrobora com a hipótese de que há uma relação entre o consumo de oxaloacetato e a produção de ácido mucônico, isso se dá pelo fato de que essa reação representa o desvio inicial do Fosfoenol Piruvato através do consumo de OAA. Sendo assim, a diminuição do consumo de OAA e o aumento da disponibilidade do precursor PEP são as principais causas prováveis do aumento no fluxo do produto de interesse.

Figura 13 – Análise do impacto da combinação da superexpressão de DDPA, TKT e sub expressão de ASPTA.



Fonte: Autor.

O valor obtido ao combinar estas 3 modificações genéticas corresponde ao máximo forçado pelo FSEOF, atingindo assim o maior fluxo possível através dessa otimização. Isso indica que a combinação destas modificações configura-se como uma estratégia ótima para o desenvolvimento de uma plataforma microbiana de *ccAM*.

5 Conclusão

Com base nas análises desenvolvidas no presente trabalho, foi possível identificar 3 modificações no metabolismo da *E. coli* com potencial para construção de uma plataforma microbiana de produção de ácido mucônico: superexpressão das reações TKT1/TKT2 e DDPA, assim como a subexpressão da reação ASPTA. Além disso, foi possível identificar que a subexpressão das vias de produção dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, que concorrem diretamente com a via heteróloga inserida, podendo promover uma maior produtividade de *ccAM*. Por fim, foi identificada uma relação entre o consumo de oxaloacetato e a produção de *ccAM*, através da subexpressão de reações relacionadas ao OAA.

Para futuros trabalhos *in silico*, espera-se detalhar a relação entre OAA e *ccAM* em *E. coli*. Além disso, deve-se refinar código em *Python* para otimização SPEA2, uma vez que a metodologia ainda pode gerar resultados assim que seja atingida uma diminuição do custo computacional, ou uma maior disponibilização de recursos para o projeto.

O próximo passo do projeto será avaliar a qualidade das estratégias desenvolvidas para um melhor direcionamento das análises *in vivo*, permitindo assim um desenvolvimento mais eficiente da plataforma microbiana desejada.

Referências

- ALINI, S. et al. Development of new catalysts for n₂o-decomposition from adipic acid plant. *Applied Catalysis B: Environmental*, Elsevier, v. 70, n. 1-4, p. 323–329, 2007. Citado na página 19.
- AVERESCH, N. J.; KRÖMER, J. O. Tailoring strain construction strategies for muconic acid production in *s. cerevisiae* and *e. coli*. *Metabolic Engineering Communications*, Elsevier, v. 1, p. 19–28, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 29, 35 e 37.
- BECKER, J. et al. Metabolic engineering of *corynebacterium glutamicum* for the production of cis, cis-muconic acid from lignin. *Microbial cell factories*, BioMed Central, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018. Citado na página 21.
- BENTLEY, G. J. et al. Engineering glucose metabolism for enhanced muconic acid production in *pseudomonas putida* kt2440. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 59, p. 64–75, 2020. Citado na página 21.
- BIRCH, K.; TYFIELD, D. Theorizing the bioeconomy: biovalue, biocapital, bioeconomics or... what? *Science, Technology, & Human Values*, Sage Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 38, n. 3, p. 299–327, 2013. Citado na página 19.
- BOLES, E. et al. Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (pyk2p) in *saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 9, p. 2987–2993, 1997. Citado na página 37.
- BORDBAR, A. et al. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics*, Nature Publishing Group, v. 15, n. 2, p. 107–120, 2014. Citado na página 24.
- CHADWICK, S. S. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. *Reference Services Review*, MCB UP Ltd, 1988. Citado na página 19.
- CHAE, T. U. et al. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Current opinion in biotechnology*, Elsevier, v. 47, p. 67–82, 2017. Citado na página 23.
- CHOI, H. S. et al. In silico identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 76, n. 10, p. 3097–3105, 2010. Citado na página 26.
- CHOI, K. R. et al. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends in Biotechnology*, Elsevier, v. 37, n. 8, p. 817–837, 2019. Citado na página 23.
- CHOI, S.-S. et al. Cell factory design and culture process optimization for dehydroshikimate biosynthesis in *escherichia coli*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, Frontiers, v. 7, p. 241, 2019. Citado na página 35.
- CURRAN, K. A. et al. Metabolic engineering of muconic acid production in *saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 15, p. 55–66, 2013. Citado 3 vezes nas páginas 20, 21 e 35.

- DRATHS, K. M.; FROST, J. W. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from d-glucose. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 116, n. 1, p. 399–400, 1994. Citado na página 21.
- EBRAHIM, A. et al. Cobrapy: constraints-based reconstruction and analysis for python. *BMC systems biology*, Springer, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2013. Citado na página 30.
- EIBEN, A. E.; SMITH, J. E. What is an evolutionary algorithm? In: *Introduction to Evolutionary Computing*. [S.l.]: Springer, 2015. p. 25–48. Citado na página 27.
- FEIST, A. M.; PALSSON, B. O. The biomass objective function. *Current opinion in microbiology*, Elsevier, v. 13, n. 3, p. 344–349, 2010. Citado na página 24.
- FIGUERES, C. et al. Three years to safeguard our climate. *Nature News*, v. 546, n. 7660, p. 593, 2017. Citado na página 19.
- FRÖHLING, M.; HIETE, M. Sustainability and life cycle assessment in industrial biotechnology: a review of current approaches and future needs. *Sustainability and life cycle assessment in industrial biotechnology*, Springer, v. 173, p. 143–204, 2020. Citado na página 19.
- GU, C. et al. Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome biology*, Springer, v. 20, n. 1, p. 1–18, 2019. Citado na página 23.
- HENARD, C. A. et al. Muconic acid production from methane using rationally-engineered methanotrophic biocatalysts. *Green Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 21, n. 24, p. 6731–6737, 2019. Citado na página 21.
- HUANG, Y.-Y. et al. Enhanced squalene biosynthesis in *yarrowia lipolytica* based on metabolically engineered acetyl-coa metabolism. *Journal of biotechnology*, Elsevier, v. 281, p. 106–114, 2018. Citado na página 25.
- HUBMANN, G.; GUILLOUET, S.; NEVOIGT, E. Gpd1 and gpd2 fine-tuning for sustainable reduction of glycerol formation in *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 77, n. 17, p. 5857–5867, 2011. Citado na página 37.
- IBARRA, R. U.; EDWARDS, J. S.; PALSSON, B. O. Escherichia coli k-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 420, n. 6912, p. 186–189, 2002. Citado na página 24.
- IMARC. *Research and Market - Muconic Acid 2019, Muconic Acid Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2019–2024*. 2019. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/4775781/muconic-acid-market-global-industry-trends>>. Citado na página 21.
- JOHNSON, C. W. et al. Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity. *Metabolic engineering communications*, Elsevier, v. 3, p. 111–119, 2016. Citado na página 21.
- KHALIL, I. et al. Muconic acid isomers as platform chemicals and monomers in the biobased economy. *Green Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 22, n. 5, p. 1517–1541, 2020. Citado na página 20.

- KIM, B. et al. Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, Oxford University Press, v. 42, n. 3, p. 339–348, 2015. Citado na página 23.
- KOHLSTEDT, M. et al. From lignin to nylon: cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *pseudomonas putida*. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 47, p. 279–293, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.
- LEE, H.-N. et al. Corynebacterium cell factory design and culture process optimization for muconic acid biosynthesis. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. Citado na página 21.
- LEE, S. Y.; KIM, H. U. Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nature biotechnology*, Nature Publishing Group, v. 33, n. 10, p. 1061–1072, 2015. Citado na página 23.
- LEITÃO, A. Economia circular: uma nova filosofia de gestão para o séc. xxi. 2015. Citado na página 19.
- LEWIS, N. E.; NAGARAJAN, H.; PALSSON, B. O. Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of *in silico* methods. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 4, p. 291–305, 2012. Citado na página 24.
- LIN, Y. et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *escherichia coli*. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 23, p. 62–69, 2014. Citado na página 21.
- MAHADEVAN, R.; SCHILLING, C. H. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 5, n. 4, p. 264–276, 2003. Citado na página 24.
- MAIA, P.; ROCHA, M.; ROCHA, I. *In silico* constraint-based strain optimization methods: the quest for optimal cell factories. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Am Soc Microbiol, v. 80, n. 1, p. 45–67, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 24, 25 e 26.
- MIENDA, B. S.; SALLEH, F. M. Bio-succinic acid production: *Escherichia coli* strains design from genome-scale perspectives. *AIMS Bioengineering*, AIMS Press, v. 4, n. 4, p. 418–430, 2017. Citado na página 25.
- MISHRA, P. et al. Genome-scale model-driven strain design for dicarboxylic acid production in *yarrowia lipolytica*. *BMC systems biology*, BioMed Central, v. 12, n. 2, p. 9–20, 2018. Citado na página 25.
- NARANCIC, T. et al. Recent advances in bioplastics: application and biodegradation. *Polymers*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 12, n. 4, p. 920, 2020. Citado na página 20.
- NIU, W. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnology progress*, Wiley Online Library, v. 18, n. 2, p. 201–211, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 35.
- ONU. *Objetivos do Desenvolvimento Sustentável*. 2015. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pos2015/>>. Citado na página 19.

ORTH, J. D. et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of escherichia coli metabolism—2011. *Molecular systems biology*, John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, v. 7, n. 1, p. 535, 2011. Citado na página 29.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, Nature Publishing Group, v. 28, n. 3, p. 245–248, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.

PATIL, K. R. et al. Evolutionary programming as a platform for in silico metabolic engineering. *BMC bioinformatics*, BioMed Central, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2005. Citado 3 vezes nas páginas 25, 27 e 28.

PEREIRA, V.; CRUZ, F.; ROCHA, M. Mewpy: a computational strain optimization workbench in python. *Bioinformatics*, 2021. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.

PYNE, M. E. et al. An engineered aro1 protein degradation approach for increased cis, cis-muconic acid biosynthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 84, n. 17, p. e01095–18, 2018. Citado na página 21.

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operating space for humanity. *nature*, Nature Publishing Group, v. 461, n. 7263, p. 472–475, 2009. Citado na página 19.

SALVACHÚA, D. et al. Bioprocess development for muconic acid production from aromatic compounds and lignin. *Green Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 20, n. 21, p. 5007–5019, 2018. Citado na página 21.

SAUER, U.; EIKMANN, B. J. The PEP—pyruvate—oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria: We dedicate this paper to Rudolf K. Thauer, Director of the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology in Marburg, Germany, on the occasion of his 65th birthday. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, n. 4, p. 765–794, 09 2005. ISSN 0168-6445. Citado na página 37.

SAVINELL, J. M.; PALSSON, B. O. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. i. development of mathematical formalism. *Journal of theoretical biology*, Elsevier, v. 154, n. 4, p. 421–454, 1992. Citado na página 24.

SHANKS, B. H.; KEELING, P. L. Bioprivileged molecules: creating value from biomass. *Green Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 19, n. 14, p. 3177–3185, 2017. Citado na página 20.

SUN, Z. et al. Identification of novel knockout targets for improving terpenoids biosynthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 9, n. 11, p. e112615, 2014. Citado na página 25.

VIEIRA, V. et al. Comparison of pathway analysis and constraint-based methods for cell factory design. *BMC bioinformatics*, Springer, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2019. Citado na página 27.

WONGTSCHOWSKI, P. *Indústria química: riscos e oportunidades*. [S.l.]: Editora Blucher, 1957. v. 1. Citado na página 19.

XIE, N.-Z. et al. Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 32, n. 3, p. 615–622, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.

ZITZLER, E.; LAUMANNS, M.; THIELE, L. Spea2: Improving the strength pareto evolutionary algorithm. *TIK-report*, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH), Institut für Technische . . ., v. 103, 2001. Citado na página 27.