

Identificação e caracterização de restrições metabólicas, termodinâmicas e catalíticas na produção de etilenoglicol por *Komagataella phaffii*

Pacheco, T. F.^{1,2}; Almeida, J. R. M.^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília

² Embrapa Agroenergia, Brasília

Resumo: O etilenoglicol, amplamente utilizado nas indústrias química e de polímeros, destaca-se como uma das moléculas mais promissoras que podem ser produzidas a partir de biomassa lignocelulósica. Uma linhagem de *Komagataella phaffii* foi previamente engenheirada para produzir etilenoglicol a partir de xilose pela via de Dahms, na qual xilose é convertida em xilonolactona pela xilose desidrogenase (XDH), que é posteriormente hidrolisada em xilonato pela xilonolactonase (XLA). Este é desidratado a 2-ceto-3-desoxixilonato (KDX) pela xilonato desidratase (XD) e, em seguida, clivado em glicolaldeído e piruvato por uma aldolase (ALDO). O glicolaldeído pode ser reduzido a etilenoglicol pela aldeído redutase (ALDR) ou oxidado a ácido glicólico pela aldeído desidrogenase (ALDH) nativa. Apesar dos esforços de otimização, o processo de produção de etilenoglicol ainda apresenta desempenho inferior ao necessário para a viabilização industrial, indicando a existência de restrições que demandam novas abordagens de engenharia metabólica. Para orientar essas intervenções, foi realizada uma análise integrada de balanço de fluxos metabólicos, viabilidade termodinâmica e limitações catalíticas da via de Dahms implementada. A análise de balanço de fluxos utilizou a rede estequiométrica do metabolismo central de carbono (glicose e xilose) em *K. phaffii*, expandida com as reações da via de Dahms. Três funções objetivo foram avaliadas: minimização do erro global (considerando taxas experimentais), maximização da formação de biomassa e da produção de etilenoglicol. O modelo indicou que a conversão estequiométrica de xilose em etilenoglicol é teoricamente possível, sem bloqueios metabólicos ou desequilíbrios na regeneração de cofatores, sugerindo que as limitações observadas experimentalmente resultem de fatores termodinâmicos ou cinéticos. A viabilidade termodinâmica foi avaliada pela maximização da menor força motriz ($-\Delta G$) entre as reações e, com base nas soluções obtidas, foi determinada a demanda total de proteína para sustentar os fluxos definidos. A robustez da via foi avaliada por análise de sensibilidade utilizando múltiplos modelos independentes. A reação catalisada pela ALDO foi identificada como a principal limitação termodinâmica, operando próxima ao equilíbrio, com eficiência líquida de 55,6%, indicando que, embora termodinamicamente viável, apresenta refluxo considerável, o que compromete a eficiência global da via. Além disso, a oxidação do glicolaldeído a ácido glicólico pela ALDH nativa se mostrou termodinamicamente mais favorável que sua redução

a etilenoglicol, desviando intermediários para a formação de subproduto indesejado. A análise da demanda proteica indicou que a XD responde por 65,8% da proteína total requerida pela via, devido à sua baixa capacidade catalítica. Além disso, a integração com o perfil termodinâmico mostrou que, embora a reação catalisada pela XD apresente um ΔG favorável, sua força motriz efetiva é reduzida pelo acúmulo de KDX, decorrente da baixa eficiência da etapa subsequente catalisada pela ALDO, que opera próxima ao equilíbrio termodinâmico e tem capacidade limitada de remover o intermediário formado. A análise de sensibilidade confirmou XD e ALDO como principais pontos de controle, com variações em suas concentrações resultando em mudanças expressivas no fluxo metabólico, especialmente em condições de superexpressão. Intervenções coordenadas sobre ambas as enzimas foram apontadas como estratégia de maior potencial para aumentar a eficiência e a viabilidade global do processo.

Palavras-chave: Análise de fluxos metabólicos; Viabilidade termodinâmica; Demanda proteica; Limitações catalíticas; Via de Dahms.