

Simulações Metabólicas com FBA

Alexandre Béo da Cruz (a134759@dac.unicamp.br) , Marcelo F. Carazzolle (Orientador), Lucas Miguel de Carvalho

Resumo

Com base nos avanços nas tecnologias de engenharia genética e na posição favorável no Brasil no cenário mundial de produção de etanol, este projeto estuda a produção de etanol de segunda geração analisando as vias metabólicas que podem ser inseridas na *Saccharomyces cerevisiae* que permitem o consumo de xilose para a produção de etanol. Como resultado, podemos ver que a via de oxidação/redução de xilose causa desbalanço nas cofatores NAD, NADH, NADP e NADH enquanto o gene *PsXR^{mut}* corrige esse problema, o que permite sugerir um estudo de bancada para uma levedura inserindo este gene no genoma do organismo.

Keywords

Bioinformática — Etanol — Xilose

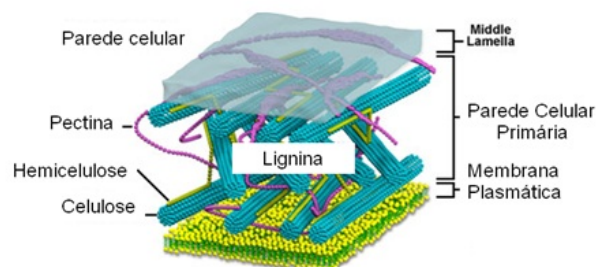
Introdução

O Brasil é pioneiro na produção de etanol e ainda hoje está entre os maiores produtores do mundo. A tecnologia que surgiu na década de 70 deu origem ao que hoje é chamado de etanol de primeira geração, ou *etanol 1G*, que é produzido a partir do açúcar extraído do caldo da cana de açúcar no Brasil. Para isso, utiliza-se da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta o açúcar e gera etanol como subproduto.

No processo do etanol 1G, apenas o colmo da cana é aproveitado, e deste apenas o caldo é transformado em etanol. Todo o resto, chamado de *biomassa*, é queimado para geração de eletricidade. Essa biomassa é composta de *celulose*, *hemicelulose* e *lignina*, dispostas de forma análoga à barras de concreto em construções como mostra a Figura 1, o que dá o caráter resistente que vemos na madeira. Dentre estes, a lignina é a responsável pela maior parte de geração de calor na queima, com capacidade calorífica entre 10000Btu/lb e 11000Btu/lb de acordo com a referência [17].

Com o avanço das tecnologias industriais e das ferramentas de engenharia genética e bioinformática, tem se iniciado o que se chama de etanol de segunda geração, ou *etanol 2G*, que consiste em produzir etanol a partir dessa biomassa. Ao se tornar possível separar a lignina da celulose e hemicelulose, é possível obter praticamente a mesma geração de energia elétrica e usar as duas outras moléculas para a produção de etanol.

A celulose é um polímero de *glicose*, enquanto que a hemicelulose é composta por cerca de 60% de glicose e 40% de



Fonte: Internet

Figura 1. Estrutura da biomassa

xilose. Isso significa que essa parcela de glicose é facilmente fermentada pela *Saccharomyces cerevisiae*, mas a xilose não é consumida naturalmente por esta levedura, sendo necessário o desenvolvimento de leveduras geneticamente modificadas para possibilitar o consumo de xilose.

Diversos organismos consomem xilose naturalmente, como alguns tipos de bactérias e fungos. Assim, a bioinformática permite identificar os genes desses organismos responsáveis por essa *via metabólica*, isto é, o conjunto de genes que permite que esse metabolismo ocorra, e inseri-los na levedura.

Porém isso não funciona sempre, e podemos obter leveduras que, apesar de conterem os genes para esta via metabólica, não produzem etanol a partir da xilose. Para entender melhor esse tipo de situação, existem métodos para simular o metabolismo completo de certos organismos e tentar encontrar os *gargalos*, isto é, etapas da via metabólica que não estão funcionando como se esperava, e sugerir alterações no genoma

que solucionem estes problemas.

Um dos métodos muito utilizados para simulação de organismos é a análise de fluxo metabólico (*Flux balance analysis* - FBA) que permite identificar os gargalos metabólicos e sugerir modificações no genoma de forma a orientar os trabalhos de engenharia genética e dessa forma desenvolver leveduras geneticamente modificadas para produzir a maior quantidade de etanol que for possível. O objetivo deste projeto é utilizar o FBA para criar um modelo cinético para estudar a via de oxidação/redução de xilose (XR-XDH), similar ao criado pelo estudo feita na referência [7].

1. Metodologia

Para realizar este estudo, fez-se uma análise do funcionamento do FBA, descrito na referência [18], além da instalação do pacote COBRA Toolbox no software Matlab, que implementa este algoritmo no software e permite que o modelo cinético seja criado e simulado. Ainda, estudou-se os aspectos biológicos da levedura de interesse, de modo a entender as vias metabólicas existentes na *saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol e o modelo da via de oxidação/redução de xilose.

1.1 Softwares Computacionais

O Matlab foi o software escolhido para a implementação do *Flux balance analysis*, isto porque ele permite que alteremos seu Solver para sistemas de equações lineares facilmente. Sendo assim, pode-se instalar o Solver Gurobi e em seguida o pacote computacional COBRA, configurando para que o solver utilizado seja o Gurobi. O link para a instalação se encontra na referência [12]. A versão utilizada foi *MATLAB R2016a*. Para fazer o *download* do pacote COBRA, que é gratuito, é preciso acessar o link da referência [6] e ir para a página de instruções de instalação em: "In order to install The COBRA Toolbox or get help with tutorials, please follow the instructions here."

O COBRA faz o *download* dos arquivos utilizando repositórios Git. Sendo assim, é preciso instalar os comandos de repositório Git no terminal do Windows. Para isso podemos instalar o arquivo obtido no link da referência [13]. Por facilidade, com esse método também já instalamos o *SBMLToolbox 4.1.0*, e o *glpk_mex* em *external/toolboxes*, além do *libSBML-5.13.0-matlab* em *src/io/utilities*. Serão importantes para que possamos ler arquivos SBML. Por fim, é preciso instalar o solver Gurobi, que também é pago mas pode-se conseguir uma licença acadêmica facilmente, apenas oferecendo seu e-mail institucional. O link para a instalação se encontra na referência [14].

Para executar o solver e o pacote COBRA corretamente, sempre que inicializar o Matlab, devemos seguir as seguintes etapas:

- Acesse pelo Matlab a pasta de instalação do Gurobi: `.../gurobi702/win64/matlab`
- Execute no Matlab a instrução `gurobi_setup.m`

- Acesse pelo Matlab a pasta de instalação do COBRA: `.../Cobra/cobratoolbox`
- Execute no Matlab a instrução `initCobraToolbox.m`
- Escolha o solver do Gurobi para o COBRA executando o seguinte comando no Matlab: `changeCobraSolver('gurobi6')`;

1.2 Metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura, pertencendo ao Reino Fungi. Como características gerais dos fungos, não produzem seu próximo alimento, isto é, são *heterotróficos* e portanto não sintetizam o próprio alimento. Ainda, a respiração dos fungos pode ser tanto *aeróbica* se estiver na presença de oxigênio quanto *anaeróbica* se não estiver na presença de oxigênio. A glicose e a xilose são os alimentos dos quais a levedura precisa para a produção de etanol, no caso de leveduras geneticamente modificadas que possuem a via metabólica do consumo de xilose. Porém, o etanol só é produzido na respiração anaeróbica. Sendo assim, são nessas condições que queremos estudar o metabolismo deste ser vivo.

Em um diagrama de uma via metabólica são representadas todas as reações que ocorrem no ser vivo para a transformação de um metabólito em outro. Nessas reações, são indicadas a enzima que permite que essa reação ocorra ou ainda, de forma equivalente, o gene que sintetiza esta enzima. Também são indicados os cofatores presentes no interior do organismo que participam das reações. A figura 2 mostra esquematicamente a via metabólica de consumo de glicose e produção de etanol quando a levedura está fermentando.

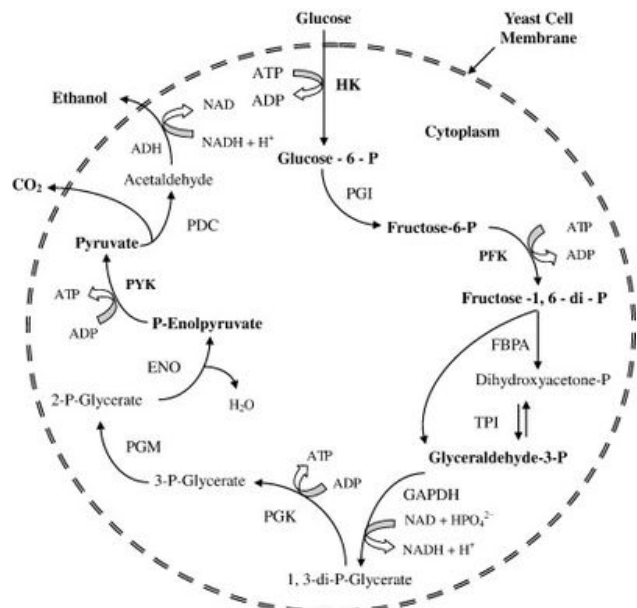


Figura 2. Via metabólica de consumo de glicose e produção de etanol na respiração anaeróbica

Os cofatores ATP, ADP, NAD, NADH, NADP e NADPH são de extrema importância para diversos metabolismos den-

tro da levedura. Por conta disso, um desbalanço na quantidade destes cofatores influencia significativamente nos processos biológicos da *Saccharomyces cerevisiae* e portanto na produção de etanol. A figura 3 mostra a via metabólica de consumo de xilose e produção de etanol.

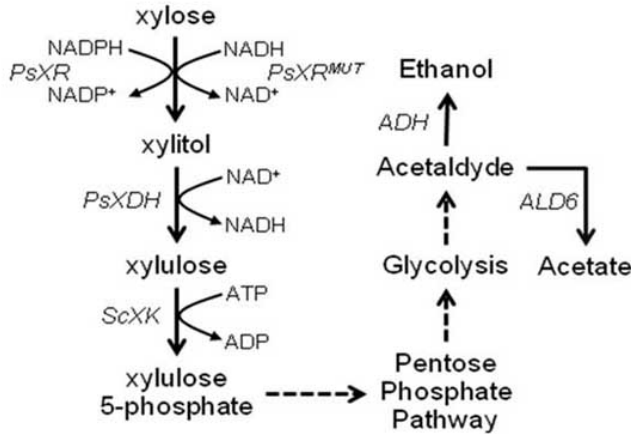


Figura 3. Via metabólica de consumo de xilose e produção de etanol

Na via metabólica da xilose, existem dois genes possíveis, o *PsXR* e o *PsXR^{mut}*, sendo o primeiro o mais comum. Porém, quando adicionamos o *PsXR* ao genoma da levedura estamos colocando um gasto maior de NADPH e NAD, quanto aumentamos a produção de NADP e NADH. Isto causa um *desbalanço redox* que pode interferir na quantidade de etanol que será produzido. Já utilizando o *PsXR^{mut}*, o NADH consumido no início da via é reobtido na reação de xilitol em xilulose, o que corrige este desbalanço. Os detalhes sobre outras vias metabólicas importantes da levedura estão descritos nas referências [19] e [20].

1.3 Modelos Computacionais

Utilizando o pacote COBRA, um modelo computacional para o metabolismo de um organismo pode ser criado adicionando e removendo reações a partir das funções descritas na referência [6]. As funções mais comuns que serão utilizadas são:

- `addReaction`: adiciona uma reação existente ao modelo ou modifica uma reação existente.
- `readCbModel`: lê um modelo base já construído e armazenado em formato SBML
- `removeRxn`: Remove reações de um modelo

Vamos utilizar como base o modelo Yeast 5, descrito na referência [15] que simula uma levedura funcionando tanto em respiração aeróbica quanto em respiração anaeróbica. Os modelos computacionais são feitos utilizando o formato SBML e salvos em formato '.xml'. A figura 4 mostra a evolução dos modelos para o metabolismo do ser vivo de interesse.



Figura 4. Evolução dos modelos computacionais para o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*

O modelo Yeast 5 já incorpora a via de oxidação/redução da xilose, enquanto outros modelos como o iIND750 ainda não possuem essa via metabólica. Ainda, o Yeast 5 adiciona duas reações, a NADP fosfatase e a NADH kinase que transformam os cofatores e balanceiam a oxidação/redução, de modo que o fluxo através dessas reações indica que no metabolismo há reações com desbalanço redox.

2. Resultados

A Figura 5A representa os passos iniciais da via que foi estudada, e a Tabela 1 apresenta as reações e enzimas que foram consideradas no estudo.

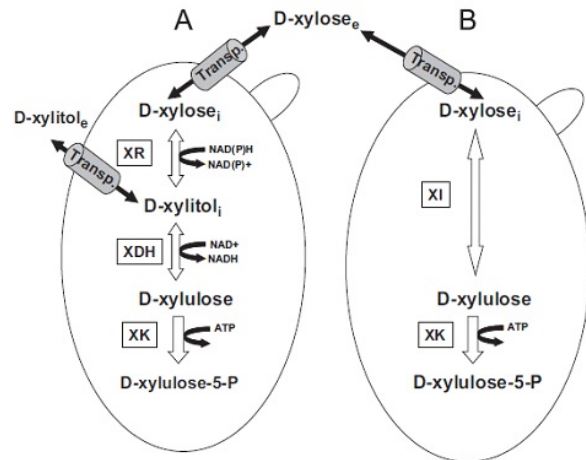


Figura 5. Passos iniciais da utilização de xilose através das vias de oxidação/redução (A) e isomerização (B).

Tabela 1 - Reações bioquímicas utilizadas na construção dos modelos cinéticos.

Reação	Nome	Enzima	Reagente	Produto
1 (↔)	Transporte	Transporter	Xilose(e)	Xilose
2 (↔)	XR	Xylose reductase	Xilose	Xilitol
3 (↔)	XDR	Xylitol dehydrogenase	Xilitol	Xilulose
4 (→)	XK	Xylulokinase	Xilulose	Xilulose-5-P
5 (↔)	XYT diff	Transporter	Xilitol	Xilitol(e)
6 (↔)	XI	Xylose isomerase	Xilose	Xilulose

Legenda: (↔) reversível; (→) irreversível; (e) extracelular.

Comparamos o resultado do modelo Yeast 5 quando utilizamos apenas glicose como metabólito para a produção de etanol com o mesmo modelo utilizando xilose, onde espera-se que ocorra um desbalanço dos cofatores NAD, NADP, NADH e NADPH. Finalmente, foi inserido a via do gene *PsXR^{mut}* para substituir a via do gene *PsXR*, sendo possível verificar se ao fazermos isso, o desbalanço dos cofatores é corrigido.

Para a análise, vamos nos concentrar no fluxo de glicose, xilose, crescimento anaeróbico, álcool, transporte de etanol, NADH kinase e NADP fosfatase. Por convenção, fluxo negativo significa fluxo fora da célula e fluxo positivo significa fluxo dentro da célula.

2.1 Modelo Yeast 5 com glicose e xilose

Com o script do Anexo 'fluxDistribution.m', que simula uma levedura anaeróbica consumindo glicose e uma levedura anaeróbica consumindo xilose, comparamos a diferença no fluxo das reações de interesse, o que resulta no gráfico da figura 6.

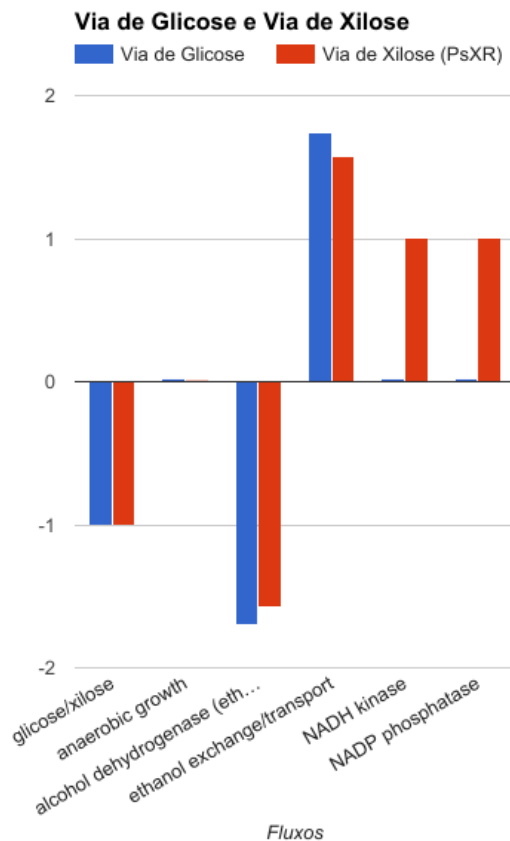


Figura 6. Comparação do modelo Yeast 5 utilizando a via de glicose e a via de xilose com o gene *PsXR*

Pode-se notar que ao trocarmos a glicose pela xilose, existe uma pequena perda de eficiência na produção de etanol, indicado pelo fluxo da alcohol dehydrogenase e ethanol exchange/transport. Numericamente, 1 mol de glicose corresponde a formação de 1,7 mols de etanol, enquanto 1 mol de xilose corresponde a 1,57 mol de etanol. Ainda, o fluxo de NADH kinase e NADP phosphatase que antes era quase zero passou a ser 1,01 com o consumo de xilose, o que indica que está ocorrendo um desbalanço redox.

2.2 Alteração na via de xilose para o gene *PsXR^{mut}*

Pelo script do Anexo 'fluxDistribution.m', que simula uma levedura anaeróbica consumindo xilose utilizando o gene *PsXR* e uma levedura anaeróbica consumindo xilose utilizando o gene *PsXR^{mut}*, comparamos novamente a diferença no fluxo das reações de interesse, o que resulta no gráfico da figura 7.

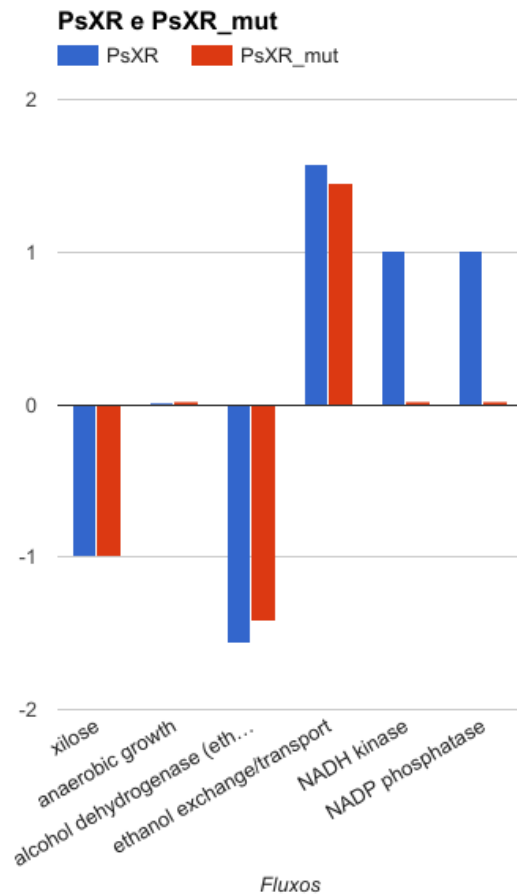


Figura 7. Comparação do modelo Yeast 5 utilizando a via de xilose com o gene *PsXR* e o gene *PsXR^{mut}*

Nesse caso existe também uma perda na produção de etanol, sendo que utilizando o gene *PsXR* a produção de etanol é 1,57 mols para 1 mol de xilose enquanto com o gene *PsXR^{mut}* a produção de etanol é 1,42 mols. Porém, O fluxo de NADH kinase e NADP phosphatase que com o gene *PsXR* é 1,01 passa a ser zero com o gene *PsXR^{mut}*.

2.3 Comparação das 3 cepas de levedura

Comparando os 3 resultados ao mesmo tempo, temos o gráfico da figura 8, em que pode-se perceber que utilizando o gene *PsXR^{mut}* temos um consumo de xilose que não desbalanceia os cofatores da levedura, da mesma forma que o consumo de glicose. Sendo assim, utilizando este gene não é preciso inserir no genoma do organismo as reações NADH kinase e NADP phosphatase para manter o equilíbrio entre os cofatores.

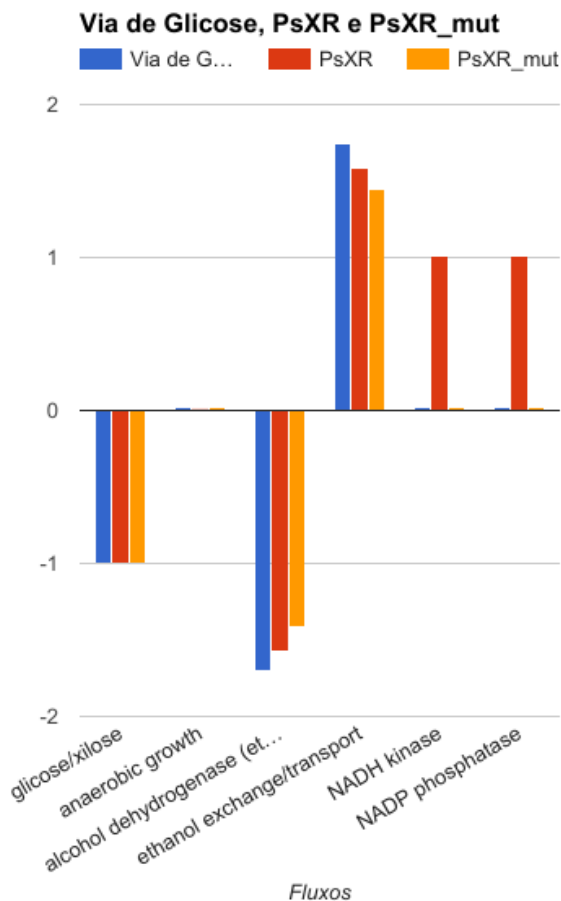


Figura 8. Comparação das 3 cepas de leveduras simuladas

3. Conclusões

A partir dos resultados obtidos das simulações, podemos perceber que de fato, ao inserirmos a via de xilose na *Saccharomyces cerevisiae* criamos um desbalanço nos cofatores. Contudo, não é possível perceber o efeito deste desbalanço na produção de etanol pois o modelo Yeast 5 possui as reações NADH kinase e NADP phosphatase que corrigem esses cofatores.

Para uma simulação em que não existem essas duas reações, é possível continuar os trabalhos utilizando agora o modelo iND750, que é mais antigo e não possui as reações para balanço de cofatores, o que permitiria quantificar o impacto do desbalanço redox na produção de etanol. Medidas experimentais do efeito da adição da NADH kinase no metabolismo da levedura podem ser encontrados no artigo da referência [21].

Ainda, utilizando a via metabólica do gene *PsXR^{mut}*, podemos perceber que o desequilíbrio redox é corrigido pois o fluxo das reações NADH kinase e NADP phosphatase são zerados. Este gene, de acordo com a referência [22], só é encontrado no organismo *Pichia stipitis* 0. Existe uma queda na produção de etanol ao utilizarmos este gene, porém não podemos concluir se esta queda é real pois precisamos de um modelo que não possui reações que corrigem o desequilíbrio dos cofatores.

Estes dados nos permite propor esta mudança no genoma de uma levedura para testes de bancada, isto é, adicionar o gene da *Pichia stipitis* 0 e retirar o gene *PsXR* da via metabólica da xilose. Porém, mais simulações podem ser feitas com o iND750 para tornar os resultados do FBA mais confiáveis.

4. Opinião do Orientador

O orientador do projeto concorda com o descrito no relatório, ressaltando que apesar do final da disciplina de iniciação científica, o aluno continuará os trabalhos, como mencionado, fazendo simulações utilizando o modelo iND750 e estudando outra via de consumo de xilose, a via de isomerização descrita na figura 5B.

Referências

- [1] L.V. Santos, M.C.B. Grassi, J.C.M. Gallardo, R.A.S. Pirolla, L.L. Caldero, O.V. Carvalho-Netto, L.S. Parreiras, E.L.O. Camargo, A.L. Drezza, S.K. Missawa, G.S. Teixeira, I. Lunardi, J. Bressiani, G.A.G. Pereira Second-generation ethanol: the need is becoming a reality Ind. Biotechnol., 12 (2016), pp. 40–57
- [2] Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? Nature Biotechnology, 28(3), 245–248. <http://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- [3] R. Mahadevan, C.H. Schilling, The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models, Metabolic Engineering, Volume 5, Issue 4, October 2003, Pages 264-276, ISSN 1096-7176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2003.09.002>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717603000582>) Keywords: In silico model; Escherichia coli; Alternate optima; Spectrum analysis; Flux variability
- [4] Jonathan R. Karr, Jayodita C. Sanghvi, Derek N. Macklin, Miriam V. Gutschow, Jared M. Jacobs, Benjamin Bolival Jr., Nacyra Assad-Garcia, John I. Glass, Markus W. Covert, A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype, Cell, Volume 150, Issue 2, 20 July 2012, Pages 389-401, ISSN 0092-8674, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.044>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412007763>)

- [5] Henning Schmidt, Mats Jirstrand; Systems Biology Toolbox for MATLAB: a computational platform for research in systems biology. *Bioinformatics* 2006; 22 (4): 514-515. doi: 10.1093/bioinformatics/bti799
- [6] <http://opencobra.github.io/cobratoolbox/latest/> Um dos pacotes computacionais que será utilizado no projeto
- [7] Skorupa Parachin N, et al. (2009) Comparison of engineered *Saccharomyces cerevisiae* and engineered *Escherichia coli* for the production of an optically pure keto alcohol. *Appl Microbiol Biotechnol* 84(3):487-97
- [8] Maria Angélica Lopes de Souza, Zanoni Dias; Alinhamento múltiplo progressivo de sequências de proteínas <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000778122>
- [9] Sérgio Jeferson Rafael Ordine, Zanoni Dias; Alinhamento múltiplo de proteínas utilizando algoritmos genéticos <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000955292>
- [10] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy> bando de dados de tabelas de tradução de códons
- [11] Jack Dongarra, Francis Sullivan; Guest Editors' Introduction: The Top 10 Algorithms *Comput. Sci. Eng.* 2, 22 (2000)
- [12] <https://www.mathworks.com/products/matlab.html> Site para a compra e instalação do software Matlab
- [13] <https://git-scm.com/downloads> Site para instalar os comandos de repositório Git no terminal do Windows
- [14] <http://www.gurobi.com/> Site para instalar do solver Gurobi
- [15] Heavner BD, Smallbone K, Barker B, Mendes P, Walker LP; Yeast 5—an expanded reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *BMC Syst Biol.* 2012;6: 55. pmid:22663945
- [16] Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR, Palsson BØ. 2011, Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols* 6 : 1290-1307.
- [17] BAKER, A. J. 1983. Wood fuel properties and fuel products from woods. Pages 14-25 in *Proc. Fuelwood Management and Utilization Seminar*, Nov. 9-11, 1982, Michigan State Univ., East Lansing, MI.
- [18] Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248. <http://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- [19] Goold, Hugh D. and Kroukamp, Heinrich and Williams, Thomas C. and Paulsen, Ian T. and Varela, Cristian and Pretorius, Isak S. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology* (2017) 10(2), 264–278 10.1111/1751-7915.12488
- [20] Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2000;64(1):34-50.
- [21] Hou J., Vemuri GN, Bao X, Olsson L. Impact of overexpressing NADH kinase on glucose and xylose metabolism in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009 Apr;82(5):909-19. doi: 10.1007/s00253-009-1900-4. Epub 2009 Feb 17.
- [22] Seiya Watanabe, Ahmed Abu Saleh, Seung Pil Park, Narayana Annaluru, Tsutomu Kodaki, and Keisuke Makino. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing proteinengineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology* (2007), 153, 3044–3054

```
function fluxDistribution(filename)

model = readCbModel(filename,inf);
model2 = readCbModel(filename,inf);
models = [model,model2]; % Cria uma lista com os dois objetos
%models(i) acessa a i-esima posicao da lista

% Altera o XML nos em todos os modelos ao mesmo tempo
for i=1:numel(models)
    ind = strcmp('oxygen exchange',models(i).rxnNames); models(i).lb(ind) = 0;
    ind = ismember(models(i).rxnNames,{'...
        'lipid pseudoreaction [no 14-demethylsterol, no ergosta-5,7,22,24(28)
tetraen-3beta-ol]'
        'ergosterol exchange'
        'lanosterol exchange'
        'zymosterol exchange'
        'phosphatidate exchange'
    });
    models(i).lb(ind) = -Inf;
    models(i).ub(ind) = Inf;
    ind = strcmp('lipid pseudoreaction',models(i).rxnNames); models(i).ub(ind) = 0;
    %Altera o metabolismo da levedura para anaerobico
end

%-----Altera a via de xilose para PsXR_mut-----

% Altera o XML só no segundo modelo
ind = strcmp('D-xylose exchange',models(2).rxnNames);
models(2).ub(ind) = 99999.00;
models(2).lb(ind)=-1.00;
%Inicia o transporte de xilose 1 mol de xilose
ind = strcmp('D-glucose exchange',models(2).rxnNames);
models(2).ub(ind) = 0;
models(2).lb(ind) = 0;
%Zera o transporte de glicose

% Resolve todos os modelos ao mesmo tempo e cria uma lista de solucoes
FBAsolutions = [];
for i=1:numel(models)
    FBAsolution = optimizeCbModel(models(i), [], 'one');
    FBAsolutions = [FBAsolutions FBAsolution];
end

% Compara os valores das duas primeiras solucoes
desvio = 0;
fprintf('%.2f\t%.2f\t%s\n',FBAsolutions(1).f, FBAsolutions(2).f, 'anaerobic growth');
for i = 1:length(models(1).rxnNames)
    for j = 1:length(models(2).rxnNames)
        if strcmp(models(1).rxns{i},models(2).rxns{j}) == 1 && abs(FBAsolutions(2).x
```

```
(j) - FBAsolutions(1).x(i) > 0.1
        fprintf('%0.2f\t%0.2f\t%s\n',FBAsolutions(1).x(i), FBAsolutions(2).x(j),
models(1).rxnNames{i});
        desvio = desvio + abs(FBAsolutions(2).x(j) - FBAsolutions(1).x(i))*ab
(FBAsolutions(2).x(j) - FBAsolutions(1).x(i));
        end
    end
end
fprintf('\n%0.2f\t%s\n',sqrt(desvio), 'desvio padrão');
```



```

function fluxDistribution(filename)

model = readCbModel(filename,inf);
model2 = readCbModel(filename,inf);
models = [model,model2]; % Cria uma lista com os dois objetos
%models(i) acessa a i-esima posicao da lista

% Altera o XML nos em todos os modelos ao mesmo tempo
for i=1:numel(models)
    ind = strcmp('oxygen exchange',models(i).rxnNames); models(i).lb(ind) = 0;
    ind = ismember(models(i).rxnNames,{'...
        'lipid pseudoreaction [no 14-demethylsterol, no ergosta-5,7,22,24(28)
tetraen-3beta-ol]'
        'ergosterol exchange'
        'lanosterol exchange'
        'zymosterol exchange'
        'phosphatidate exchange'
    });
    models(i).lb(ind) = -Inf;
    models(i).ub(ind) = Inf;
    ind = strcmp('lipid pseudoreaction',models(i).rxnNames); models(i).ub(ind) = 0;
    %Altera o metabolismo da levedura para anaerobico

    ind = strcmp('D-xylose exchange',models(i).rxnNames);
    models(i).ub(ind) = 99999.00;
    models(i).lb(ind)=-1.00;
    %Inicia o transporte de xilose 1 mol de xilose

    ind = strcmp('D-glucose exchange',models(i).rxnNames);
    models(i).ub(ind) = 0;
    models(i).lb(ind) = 0;
    %Zera o transporte de glicose
end

%-----Altera a via de xilose para PsXR_mut-----

% Altera o XML só no segundo modelo
models(2)=addReaction(models(2),{'r_2112','XR2'},'s_0578[c_03] + s_0794[c_03] +
s_1203[c_03] <=> s_1198[c_03] + s_1566[c_03]');
models(2)=changeRxnBounds(models(2),'XR2',-999999.0000,'l');
models(2)=changeRxnBounds(models(2),'XR2',999999.0000,'u');
%Adiciona a reação do gene PsXR_mut

ind = strcmp('xylose reductase',models(2).rxnNames);
models(2).ub(ind) = 0;
models(2).lb(ind) = 0;
%Zera a reação do gene PsXR

% Resolve todos os modelos ao mesmo tempo e cria uma lista de solucoes

```

```
FBAolutions = [];  
for i=1:numel(models)  
    FBAolution = optimizeCbModel(models(i), [], 'one');  
    FBAolutions = [FBAolutions FBAolution];  
end  
  
% Compara os valores das duas primeiras solucoes  
desvio = 0;  
fprintf('%0.2f\t%0.2f\t%s\n', FBAolutions(1).f, FBAolutions(2).f, 'anaerobic growth');  
for i = 1:length(models(1).rxnNames)  
    for j = 1:length(models(2).rxnNames)  
        if strcmp(models(1).rxns{i}, models(2).rxns{j}) == 1 && abs(FBAolutions(2).x(j) - FBAolutions(1).x(i)) > 0.1  
            fprintf('%0.2f\t%0.2f\t%s\n', FBAolutions(1).x(i), FBAolutions(2).x(j), models(1).rxnNames{i});  
            desvio = desvio + abs(FBAolutions(2).x(j) - FBAolutions(1).x(i)) * abs(FBAolutions(2).x(j) - FBAolutions(1).x(i));  
        end  
    end  
end  
fprintf('\n%0.2f\t%s\n', sqrt(desvio), 'desvio padrão');
```