

AVALIAÇÃO *IN SILICO* E EM CULTIVOS CONTÍNUOS DO METABOLISMO DE *S. typhimurium*

C. R. SARGO¹, T. C. ZANGIROLAMI¹, R. C. GIORDANO¹, E. C. FERREIRA²,
I. ROCHA² e A. J. SILVA¹

¹ Universidade Federal de São Carlos (São Carlos – Brasil), Departamento de Engenharia Química

² Universidade do Minho (Braga – Portugal), Departamento de Engenharia Biológica
E-mail para contato: srcintia@yahoo.com.br

RESUMO – Linhagens atenuadas de *Salmonella* têm sido investigadas para o desenvolvimento de diversos produtos biotecnológicos, como vacinas recombinantes. Entretanto, protocolos para obtenção de altas densidades celulares de *Salmonella*, necessárias para viabilizar o processo de produção destes produtos, ainda não foram estabelecidos, sendo necessário para isso contornar a elevada formação de produtos tóxicos de seu metabolismo que inibem o crescimento celular. Neste trabalho empregou-se um modelo metabólico em escala genômica de *S. typhimurium* (STM_v1.0) para prever *in silico*, com o uso do *software* livre Optflux, a formação de metabólitos em diferentes velocidades de crescimento. Para avaliar/validar o resultado das simulações, foram conduzidos cultivos contínuos em diferentes taxas de diluição ($D = 0,1; 0,25; 0,5 \text{ h}^{-1}$) e a produção dos metabólitos extracelulares foi analisada por HPLC e GC/MS. Experimentalmente, o acetato foi o subproduto majoritário produzido pela bactéria nas velocidades de crescimento intermediária ($0,25 \text{ h}^{-1}$) e alta ($0,50 \text{ h}^{-1}$), com fluxos de 0,93 e 2,64 mmol de acetato/h.gDCW, respectivamente. Já *in silico*, o principal metabólito formado foi o formato, com fluxos de 1,4 e 3,65 mmol/h.gDCW, nas duas velocidades de crescimento mais altas. Os resultados mostram que a formação de metabólitos ocorre por metabolismo *overflow*, intensificado com o aumento na velocidade de crescimento.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. compõem um gênero proximoamente relacionado ao gênero da *Escherichia coli*. A espécie *Salmonella enterica* sorotipos Typhi (*S. typhi*) e Typhimurium (*S. typhimurium*) vem se destacando no campo da vacinologia, sendo largamente empregada como vetores bacterianos vivos (VBVs), constituindo uma promissora alternativa para a obtenção de novas vacinas mais efetivas e acessíveis. A viabilidade técnica e econômica de vacinas de VBVs baseados em *Salmonella* depende de vários fatores, incluindo desde a eficiência da formulação como vacina até o rendimento e a produtividade do bioprocessos. Esta última depende da obtenção de altas concentrações de biomassa do microrganismo. Para tanto, é preciso redirecionar os fluxos metabólicos dessa bactéria, uma vez que mesmo em condições plenamente aeróbicas, parte significativa da fonte de carbono é convertida em subprodutos tóxicos como acetato, formato, succinato e lactato, afetando tanto o crescimento como a expressão dos antígenos recombinantes.

Modelos metabólicos em escala genômica podem ser utilizados para analisar, interpretar e prever a distribuição dos fluxos metabólicos de um organismo. No caso específico de *S. typhimurium*, já foram reconstruídos três modelos desta natureza e, com o emprego de softwares como o Optflux, é possível simular o metabolismo de linhagens *wild type* e também otimizar linhagens com base no *knock out* de reações e/ou genes para a obtenção de um perfil metabólico de interesse (Rocha *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo *in silico* dos fluxos metabólicos de *S. typhimurium* e, através de cultivos contínuos em diferentes taxas de diluições, coletar dados experimentais para avaliar/validar as previsões do modelo utilizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As células de *Salmonella typhimurium* LT-2 foram cultivadas em meio mínimo M9 modificado, descrito em Veloso (2007). Os cultivos contínuos foram conduzidos em biorreator de 2 L (Sartorius), com 0,8 L de meio, a 37°C, agitação de 750 rpm e pH 7, concentração de oxigênio dissolvido (COD) de 30% da saturação e aeração de 1,25 vvm. Para cada diluição estipulada, a condição de estado estacionário foi atingida quando os valores das variáveis densidade óptica, COD e fração molar de CO₂ nos gases de saída permaneceram constantes por pelo menos 3 tempos de residência.

Os sobrenadantes recolhidos ao longo dos cultivos foram analisados por HPLC (coluna Aminex HPX-87H - Bio-Rad - e H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL/min, a 60°C) e também por GC-MS (Varian CP-3800, analisador ion trap, coluna ZB1701 e vazão de hélio de 1 mL/min). O cálculo dos fluxos dos produtos (em mmol/h gDCW) foi realizado a partir das concentrações de metabólitos medidas no efluente líquido, a produção de CO₂ foi estimada pela lei dos gases ideais a partir da fração molar de CO₂ no efluente gasoso medida pelo analisador de gases e da vazão de ar. O fluxo de formação de biomassa (μ) foi equivalente à taxa de diluição (D) adotada em cada experimento. O fluxo de glicose consumida foi calculado a partir dos dados de concentração de glicose nas correntes de alimentação e do efluente.

As análises *in silico* do metabolismo de *S. typhimurium* foram realizadas com o *software* livre Optflux v 3.0.6 (<http://www.optflux.org/>), utilizando o modelo metabólico em escala genômica STM_v1.0 (Thiele *et al.*, 2011). Nas simulações realizadas, utilizou-se o método FBA (*Flux Balance Analysis* – Patil *et al.*, 2005) para maximização da função objetivo desejada (formação de biomassa).

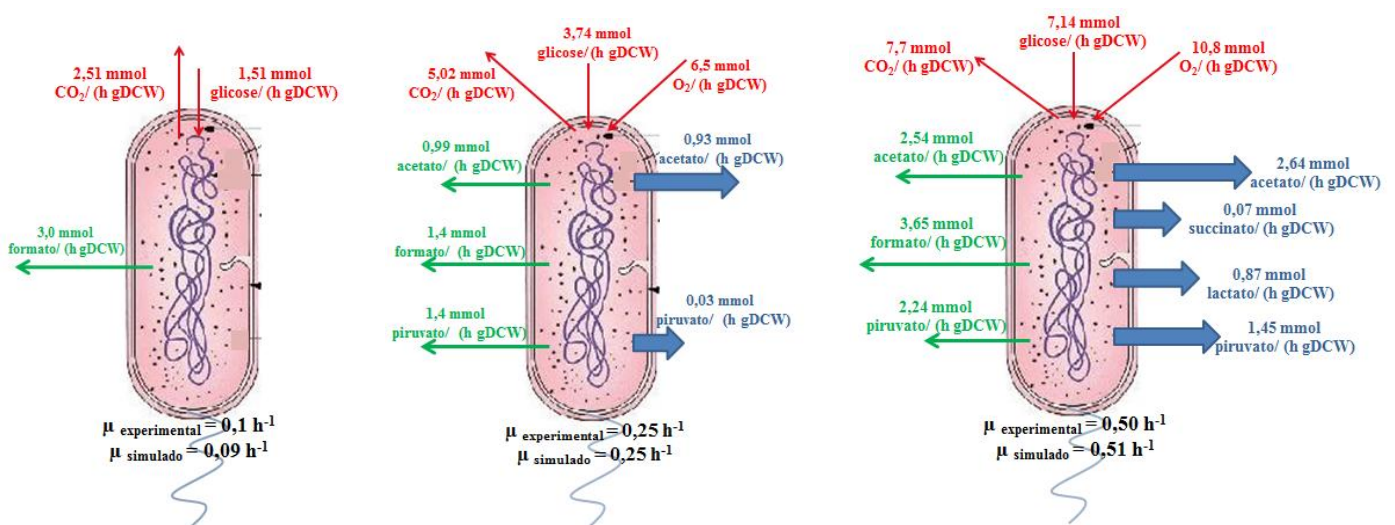
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos contínuos de *S. typhimurium* em estado estacionário permitiram mapear os fluxos de Carbono, identificando as frações de substrato direcionadas para formação de biomassa, produção de CO₂ e formação de ácidos orgânicos em cada condição estudada. Os fluxos calculados a partir dos dados experimentais foram comparados com os previstos pelo *software* Optflux. Para tanto, os valores experimentais dos fluxos de glicose e CO₂ foram fixados nas simulações e avaliou-se a produção *in silico* de subprodutos em cada uma das três taxas de diluição empregadas.

Na velocidade de crescimento de $0,1 \text{ h}^{-1}$ todo o carbono consumido foi direcionado para a produção de biomassa e formação de CO_2 . Já para as demais taxas de diluição ($0,25$ e $0,50 \text{ h}^{-1}$), as análises das amostras coletadas revelaram a produção de ácido acético e pirúvico (em ambas as condições) e ácido láctico e succínico com $D = 0,50 \text{ h}^{-1}$ (Figura 1), apesar da concentração de oxigênio dissolvido ter sido mantida acima de 30 % do valor de saturação em todos os experimentos, caracterizando a ocorrência de metabolismo *overflow*, conforme esperado.

Para reproduzir *in silico* a condição de *overflow*, foram feitas novas simulações restringindo-se os fluxos de consumo de O_2 (em $6,5$ e $10,8 \text{ mmol O}_2 / (\text{h.gDCW})$ para $D = 0,25$ e $0,5 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Restringiu-se também o fluxo de produção de formato em 50 % do seu valor máximo para ambas as condições na tentativa de contornar as diferenças nos valores do fluxo de CO_2 experimental e simulado, já que este metabólito pode ser degradado levando à formação de CO_2 . Segundo as previsões do modelo, a partir do fluxo de entrada de glicose utilizado nos experimentos, a formação de gás carbônico deve ser superior à observada experimentalmente. Adotando-se o valor do fluxo de CO_2 calculado a partir dos dados experimentais como restrição, as simulações preveem a produção de ácido fórmico, acético e pirúvico superiores aos observados experimentalmente (Figura 1). Cultivos preliminares de *S. typhimurium* em batelada indicaram expressiva formação de ácido fórmico e acético. É provável que a produção desses compostos nos cultivos contínuos tenha sido subestimada, já que pode ter ocorrido perda significativa devido à volatilidade e ao arraste pela corrente de ar em cultivos prolongados. Essa possibilidade é reforçada pelo balanço de carbono, que gerou recuperações de 80, 85 e 94 % para as velocidades de crescimento de $0,1$, $0,25$ e $0,50 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Figura 1 – Comparação da produção de subprodutos do metabolismo de *S.typhimurium* LT-2 *in silico* (em verde), com as devidas restrições (em vermelho) e em cultivos contínuos (em azul) com diferentes taxas de diluição.



De acordo com as simulações sob as condições de restrição impostas, formato e piruvato são os subprodutos majoritários do metabolismo *overflow* em *S. typhimurium*,

enquanto os dados experimentais indicam o acetato como principal subproduto e demais fluxos direcionados à formação de piruvato e lactato, principalmente. Essas diferenças entre os resultados experimentais e os simulados são previsíveis, já que os resultados simulados são gerados a partir da otimização dos fluxos metabólicos em um modelo que representa a estequiometria das reações intracelulares, enquanto que *in vivo* os fluxos são fortemente influenciados pela atividade das enzimas que catalisam as reações.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram mapear o metabolismo aeróbico de *S. typhimurium*, constatando-se a intensificação do metabolismo *overflow* com o aumento da velocidade específica de crescimento. Procedimentos adicionais serão incorporados aos futuros experimentos para verificar a presença de acetato e formato no efluente gasoso. As informações obtidas no presente estudo serão ainda utilizadas no aprimoramento do modelo STM_v1.0 que, por ter sido construído a partir do modelo existente para a *E. coli*, necessita de ajustes para reproduzir mais fielmente o metabolismo de *S. typhimurium*, em condições de aerobiose. O modelo aprimorado será utilizado em etapas futuras do trabalho para identificar possíveis modificações genéticas que levem ao redirecionamento dos fluxos do microrganismo de forma a reduzir a produção de metabólitos tóxicos e maximizar a formação de biomassa.

5. REFERÊNCIAS

- PATIL, K. R., ROCHA, I., FÖRSTER, J., NIELSEN, J. Evolutionary programming as a platform for *in silico* metabolic engineering. *BMC Bioinformatics*, v. 6, p. 308-319, 2005.
- ROCHA, I., MAIA, P., EVANGELISTA, P., VILAÇA, P., SOARES, S., PINTO, J. P., NIELSEN, J., PATIL, K. R., FERREIRA, E. C., ROCHA, M. Optflux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering. *BMC Systems Biology*, v. 4, p. 2-12, 2010.
- SHAHABI, V., MACIAG, P. C., RIVERA, S., WALLECHA, A. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioengineered Bugs*, v. 1, p. 235-239, 2010.
- THIELE, I.; HYDUKE, D. R.; STEEB, B.; FANKAM, G.; ALLEN, D. K.; BAZZANI, S.; CHARUSANTI, P.; CHEN, F.; FLEMING, R. M. T.; HSIUNG, C. A.; KEERSMAECKER, S. C. J.; LIAO, Y.; MARCHAL, K.; MO M. L.; ÖZDEMIR, E.; RAGHUNATHAN, A.; REED, J. L.; SHIN, S.; SIGURBJÖRNSDÓTTIR, S.; STEINMANN, J.; SUDARSAN, S.; SWAINSTON, N.; THIJS, I. M.; ZENGLER, K.; PALSSON, B. O.; ADKINS, J. N.; BUMANN, D. A community effort towards a knowledge-base and mathematical model of the human pathogen *Salmonella typhimurium* LT2. *BMC Systems Biology*, v. 5, p. 1-9, 2011.
- VELOSO, A. C. A. Otimização de estratégias de alimentação para identificação de parâmetros de um modelo de *E. coli*. Utilização do modelo em monitorização e controlo. Braga: Universidade do Minho. Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica, 2007.