

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ ROBERTO FUZER NETO

ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ACETATO EM CULTIVOS
DE Salmonella typhimurium

São Carlos- SP

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ ROBERTO FUZER NETO

**ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ACETATO EM CULTIVOS
DE *Salmonella typhimurium***

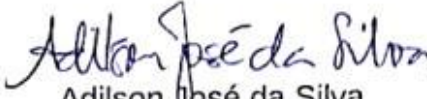
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obter o título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

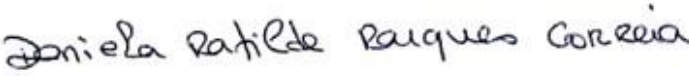
São Carlos- SP
2017

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JOSÉ ROBERTO FUZER NETO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 23 DE FEVEREIRO DE 2017.

BANCA EXAMINADORA:


Adilson José da Silva
Orientador, UFSCar


Teresa Cristina Zangirolami
Coorientadora, UFSCar


Daniela Matilde Marques Correia
UFSCar


Viviane Maimoni Gonçalves
Instituto Butantan

Dedico este trabalho à pessoas essenciais na minha vida: Juliana minha companheira e amiga, meus pai, Paulo e Mônica e minha avó Julieta, que são minha base, me apoiam em todos os momentos e torcem pelo meu sucesso, nada disso seria alcançado sem eles.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por sempre me abençoar, permitir que tudo aconteça no tempo certo e sempre colocar pessoas maravilhosas nos meus caminhos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Adilson José da Silva, de quem tenho o orgulho de ser a sua primeira orientação de mestrado, por toda a dedicação, suporte e conhecimentos compartilhados durante o mestrado, que existam mais professores jovens como você, com novas ideias e vontade de superar novos desafios.

À minha coorientadora, prof. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, de quem tive o prazer de ser aluno e ser orientado ainda na graduação, por toda experiência, ajuda e tempo dedicados à este trabalho, exemplo de professora e pesquisadora a serem seguidos.

À Dra. Cintia Regina Sargo, de quem assumi a responsabilidade de continuar o trabalho desenvolvido no seu doutorado, por todo auxílio e amizade, compartilhando seus conhecimentos, que sem dúvida alguma enriqueceram muito este trabalho.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos Luperni Horta, por todo suporte e conhecimento no controle dos reatores, que sem dúvida foram muito importantes no desenvolvimento dos cultivos.

À Dra. Daniela Matilde Marques Correia, pela colaboração nos modelos metabólicos, além das ideias e contribuições ao longo do trabalho.

A aluna Raquel Paulini Miranda, por toda ajuda no laboratório, pela colaboração no trabalho realizado, e pela amizade.

À minha família, em especial meus pais, Paulo e Mônica, e minha avó, Julieta, que são minha base, cujo apoio, carinho e fé, foram essenciais para toda minha caminhada até aqui.

À Juliana, minha namorada, parceira, amiga e grande amor da minha vida, quem mais me incentiva, acredita e confia, mesmo quando eu mesmo não confio, agradeço pelo seu amor, carinho e dedicação, sem os quais eu não chegaria tão longe.

Ao mestrando Thiago, que foi um grande amigo todo esse tempo no mestrado, sempre disposto ajudar, amizade que levarei para a vida, torço muito pelo seu sucesso.

Aos meus amigos do mestrado, Vanessa, Eric, Alice, Kaio, Camila e Nayana, por terem me aguentado e feito dos dias em São Carlos melhores, com risadas, comilanças e muita sabedoria.

Aos meus amigos da bioquímica, Gilson, Diego, Bruna, Martha, Murilo, Vitor, Thaís e Leticia, por todos os conhecimentos compartilhados, momentos engraçados e festinhas.

Ao pessoal da república, minha irmã Angelina, meu cunhado Murilo e Pedro, por todos bons momentos nesses vários anos que moramos juntos.

Aos técnicos Amadeus, Alyne, Thaís e Thiago, por todo auxílio e suporte oferecidos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES e CNPq, que possibilitaram a execução deste trabalho.

À todos amigos, que de alguma forma contribuíram para que fosse a pessoa que sou hoje.

“Everyone who is seriously involved in the pursuit of science becomes convinced that a spirit is manifest in the laws of the Universe - a spirit vastly superior to that of man, and one in the face of which we with our modest powers must feel humble”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Nos últimos anos, a aplicação de linhagens atenuadas de *Salmonella* spp. vem sendo amplamente investigada para o desenvolvimento de diversos produtos biotecnológicos, principalmente vacinas. No entanto, a implementação de processos industriais para a obtenção destes produtos depende do desenvolvimento de estratégias para o cultivo em alta densidade celular (CADC) deste microrganismo. Para isso, um dos grandes desafios a ser superado se refere às limitações metabólicas da *Salmonella*, uma vez que esta apresenta elevada produção de ácidos orgânicos (principalmente ácido acético) que inibem a formação de biomassa. Neste contexto, este trabalho propõe duas abordagens para lidar com este problema e implementar CADC de *Salmonella*: estudar o crescimento de *Salmonella typhimurium* em glicerol avaliando seu metabolismo como uma fonte de carbono menos propensa à geração de ácidos orgânicos; e estudar a produção destes ácidos por uma cepa de *S. typhimurium* geneticamente modificada para diminuir o acúmulo de acetato (super-expressão do gene *acs*, de *Escherichia coli*, que codifica a enzima acetil-CoA sintetase (ACS) responsável pela assimilação de acetato). Inicialmente foram realizados cultivos em frascos agitados em meio mínimo para duas fontes de carbono (glicose ou glicerol), para a cepa selvagem e para a cepa recombinante. Após os experimentos preliminares, foram realizados cultivos em biorreator operado em modo batelada com a cepa modificada em meio mínimo formulado com glicerol, glicose ou ácido acético, como fonte de carbono, a fim de avaliar a produção e a assimilação de acetato. Foram realizados cultivos em biorreator em modo contínuo com a cepa selvagem em meio mínimo com glicerol com $D=0,10$; $0,17$ e $0,22 \text{ h}^{-1}$ para avaliar o metabolismo do glicerol pela *S. typhimurium*. Ao longo dos cultivos foram coletadas amostras do caldo e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar a produção de ácidos orgânicos e o consumo de substrato. Para quantificar a biomassa produzida, foram realizadas medidas de densidade ótica (600 nm) e de massa seca. Os resultados dos cultivos em frascos agitados e das bateladas indicam que, para ambas as cepas, a produção de acetato é reduzida em meio formulado com glicerol, e que as células modificadas geneticamente apresentam um fenótipo de menor acúmulo de acetato comparadas à linhagem selvagem. Os cultivos contínuos realizados com a cepa selvagem mostraram que não houve acúmulo de acetato para a taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Já nas taxas de $0,17 \text{ h}^{-1}$ e $0,22 \text{ h}^{-1}$, apesar de haver acúmulo, o fluxo de produção de acetato foi cerca de 2 vezes menor que o observado em quimiostato em meio formulado com glicose. Foram realizadas simulações com o modelo STM_v1.0, tendo como dados de entrada os fluxos de glicerol e de oxigênio estimados a partir dos dados experimentais. O modelo descreveu bem os fluxos de biomassa, CO_2 e acetato para as taxas de diluição mais altas. Os resultados obtidos sugerem o cultivo em batelada alimentada com glicerol como fonte de carbono, e alimentação exponencial definida para manter a velocidade específica de crescimento em $0,1 \text{ h}^{-1}$, como uma estratégia promissora para obter altas concentrações celulares de *S. typhimurium* selvagem. Para a *S. typhimurium* recombinante, devido à sua eficiente assimilação de acetato, valores ainda maiores de velocidade específica de crescimento poderiam ser impostos, com elevado aumento de produtividade em biomassa.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella typhimurium*. Cultivos em biorreator. Quimiostato. Metabolismo do carbono central. Glicerol. Acetil-CoA sintetase.

ABSTRACT

In recent years, the application of attenuated *Salmonella* spp. has been investigated for development of several biotechnological products, mainly vaccines. However, the implementation of industrial processes to obtain these products depends on the development of strategies for this microorganism high-cell density cultures (HCDC). One of the HCDC's greatest challenges is overcoming *Salmonella*'s metabolic limitations, as it presents a high organic acids production (mainly acetic acid) that inhibits biomass formation. In this context, this work proposes two approaches to deal with this problem and implement *Salmonella*'s HCDC: studying the cultivation of *S. typhimurium* using glycerol as carbon source to reduce the generation of organic acids; studying the cultivation of a recombinant strain of *S. typhimurium* expressing the enzyme acetyl-CoA synthetase (ACS) from *E. coli*, for improved acetate assimilation). Initially, cultures were grown in agitated flasks in minimal media for two carbon sources (glucose or glycerol) for the wild-type and the recombinant strain. After the preliminary experiments, the recombinant strain was cultivated in bioreactor operated in batch mode with minimal medium formulated with glycerol, glucose or acetic acid as carbon source, to evaluate acetate production and assimilation. The wild-type strain was cultivated in a continuous-mode bioreactor on minimal medium with glycerol at $D=0.10$; 0.17 and 0.22 h^{-1} to evaluate the *S. typhimurium* glycerol metabolism. During the cultivations, samples were collected and analyzed by high-performance liquid chromatography to quantify the production of organic acids and substrate consumption. To quantify the concentration of biomass, optical density (600 nm) readings of culture broth and dry cell weight measurements were performed. Agitated flasks and batch cultivations results indicated that the acetate production is reduced in medium with glycerol for both strains, and that the genetically modified cells present a lower acetate accumulation phenotype compared to the wild-type. Continuous cultures of the wild-type strain showed no acetate accumulation for a 0.1 h^{-1} dilution rate. At rates of 0.17 h^{-1} and 0.22 h^{-1} acetate accumulation was observed, but acetate flux was 2-fold lower than the flux reached in chemostat with glucose-formulated medium. Simulations were performed with the STM_v1.0 model using as input data the glycerol and oxygen fluxes estimated from the experimental results. Good predictions were obtained for the biomass, CO_2 and acetate fluxes at the higher dilution rates. The results suggest that fed-batch culture using glycerol as carbon source along with an exponential feed to maintain a 0.1 h^{-1} specific growth rate as a promising strategy to obtain high cellular concentrations of wild-type *S. typhimurium*. The efficient acetate uptake observed for the recombinant *S. typhimurium* cells may allow higher values of specific growth rate to be used for this strain, resulting in a higher productivity of biomass.

KEYWORDS: *Salmonella typhimurium*. Bioreactor cultivation. Chemostat. Central carbon metabolism. Glycerol. Acetyl-CoA synthetase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Imagem de uma cepa selvagem de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	27
Figura 2.2 - Metabolismo da <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 em várias fontes de carbono	30
Figura 2.3 - Via metabólica de produção e assimilação de acetato por <i>Escherichia coli</i> . POXB, Piruvato desidrogenase; ACKA, acetato quinase; PTA, fosfotransacetilase; ACS, acetil coenzima-A sintetase	32
Figura 2.4 - Acetil fosfato, importante molécula sinalizadora de funções celulares	33
Figura 2.5 – Modos de operação dos biorreatores.....	37
Figura 4.1 - Consumo de substrato, produção de biomassa e acetato nos cultivos realizados em frascos agitados. a) Cepa selvagem em glicose b) Cepa selvagem em glicerol c) Cepa recombinante em glicose d) Cepa recombinante em glicerol	59
Figura 4.2 - Consumo de substrato, produção de biomassa, acetato e recuperação de carbono nos cultivos em batelada com a cepa SR em diferentes fontes de carbono: a) Glicose b) Glicerol c) Ácido acético	62
Figura 4.3 – Consumo de glicerol, produção de acetato e produção de biomassa nos cultivos contínuos.....	69
Figura 4.4 - Fluxo de glicerol, acetato, CO ₂ e O ₂ dos cultivos contínuos com a cepa SS em glicerol (a) e glicose* (b)	70
Figura 4.5 - Recuperação de carbono nos cultivos contínuos.....	70
Figura 4.6 - Comparação dos fluxos de a) biomassa, b) CO ₂ e c) acetato utilizando dados experimentais de <i>S. typhimurium</i> LT2 com as soluções estimadas pelo modelo STM_v1.0 utilizando dados de fluxo de glicerol e O ₂ experimentais.....	72
Figura 4.7 - Valores dos fluxos intracelulares simulados para glicose (TF) e glicerol (RF) para as taxas de diluição: (a) 0,17 h ⁻¹ (b) 0,22 h ⁻¹	74

LISTAS DE TABELAS

Tabela 2.1 – Estatística básica dos modelos metabólicos em escala genômica de <i>S. typhimurium</i> LT2	42
Tabela 3.1 - Experimentos em batelada <i>shaker</i>	43
Tabela 3.2 - Experimentos em batelada Biorreator (B).....	43
Tabela 3.3 - Experimentos contínuos em Biorreator (C).....	44
Tabela 3.4 - Composição do meio complexo LB-ágar	45
Tabela 3.5 - Composição do meio complexo LB	45
Tabela 3.6 - Composição do meio mínimo M9-modificado	46
Tabela 3.7 - Composição da solução de traços de vitaminas	46
Tabela 3.8 - Composição da solução de traços de minerais	47
Tabela 3.9 - Balanço material para diferentes modos de operação do biorreator	54
Tabela 3.10 - Resumo das condições das simulações no Optflux	58
Tabela 3.11 - Estratégias e objetivos das simulações no Optflux	58
Tabela 4.1 - Resultados obtidos nos cultivos em frascos agitados com as cepas SS e SR.....	60
Tabela 4.2 - Comparação dos resultados obtidos nos cultivos em batelada com a cepa SR com os dados obtidos por Sargo (2015) com a cepa SS.....	64
Tabela 4.3 - Comparação dos fluxos obtidos nos cultivos em batelada com a cepa SR com os dados obtidos por Sargo (2015) com a cepa SS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACKA	Acetato quinase
ACS	Acetyl-coenzyme A sythetase (Acetil-coenzima A sintetase)
ATP	Adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina)
C₃H₈O₃	Glicerol
C₆H₁₂O₆	Glicose
CaCl₂	Dicloreto de cálcio
CaCl₂.2H₂O	Dicloreto de cálcio dihidratado
CADC	Cultivo de alta densidade celular
CH₃COOH	Ácido acético
CO₂	Gás dióxido de carbono
CoCl₂	Cloreto de cobalto II
C_P	concentração de produto
C_{P0}	concentração inicial de produto
C_{rec}	recuperação de carbono
C_s	Citosol
C_s	concentração de substrato
C_{s0}	concentração inicial de substrato
C_{SF}	concentração de substrato na alimentação
CuCl₂	Cloreto de cobre II
C_x	concentração celular
D	taxa de diluição
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxiribonucleico)
DO_{600nm}	Densidade ótica, no comprimento de onda de 600nm
ED	Via Entner-Doudoroff
Ex	espaço extracelular
F	vazão volumétrica da alimentação
FeCl₃	Cloreto de ferro III
g_{dcw}	grams dry cell weight (gramas massa seca)
GL	Glicólise
GSMM	Genome-scale Metabolic Models (modelos metabólicos de escala-genômica)
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₃BO₃	Ácido bórico

H₃PO₄	Ácido fosfórico
HCDC	High-cell density cultures
HCl	Ácido clorídrico
J_i	fluxo de consumo ou produção do componente i
KH₂PO₄	Fosfato de potássio
MET	Microscopia eletrônica de varredura
MgSO₄.6H₂O	Sulfato de magnésio hexahidratado
m_{ie}	massa do componente i na entrada
m_{is}	massa do componente i na saída
MM	massa molar
Na₂HPO₄.2H₂O	Fosfato de sódio monobásico dihidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaMoO₄	Molibidato de sódio
n_{CO2}	composição molar de CO ₂
ñ_{CO2}	vazão molar de CO ₂
NH₄Cl	Cloreto de amônio
NH₄OH	Hidróxido de amônio
O₂	gás oxigênio
OGM	Organismos geneticamente modificados
POXB	Piruvato desidrogenase
Pp	Periplasma
PP	Pentose fosfato
PPG	Polipropilenoglicol
PTA	Fosfotransacetilase
PTS	Phosphotransferase (fosfotransferase)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
r_i	velocidade de consumo ou produção do componente i
RNA	rybonucleic acid (ácido ribonucleico)
Rpm	rotações por minuto
SpaA	Surface protective antigen A (antígeno protetor de superfície A)
SR	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2
SS	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 + pUC-acs
STM_v1.0	Modelo metabólico da <i>Salmonella typhimurium</i> (Thiele, 2011)
TCA	tricarboxilic acid cycle (ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs)

V	volume do reator
VBV	Vetores Bacterianos Vivos
$Y_{P/S}$	Rendimento de produto por substrato
$Y_{X/S}$	Rendimento de biomassa por substrato
ZnCl₂	Dicloreto de zinco
μ	velocidade específica de crescimento celular
$\mu_{\text{máx}}$	velocidade específica máxima de crescimento celular
τ	tempo de residência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVO	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 METABOLISMO DA <i>Salmonella typhimurium</i> LT2	28
2.1.1 Overflow	31
2.2 <i>S. typhimurium</i> E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	33
2.3 CULTIVOS DE MICRORGANISMOS EM BIORREATORES	36
2.3.1 Cultivos de <i>Salmonella</i>	38
2.4 ENGENHARIA METABÓLICA	40
2.4.1 Estratégias para diminuição da produção de acetato baseadas em Engenharia Metabólica	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL	43
3.1.1 Microrganismos	44
3.2 MEIOS DE CULTIVO	44
3.3 PREPARO DA CULTURA ESTOQUE.....	47
3.4 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS	48
3.4.1 Inóculo	48
3.4.2 Cultivos	48
3.5 CULTIVOS EM BIORREATOR	48
3.5.1 Pré-inóculo	48
3.5.2 Inóculo	49
3.5.3 Cultivos em modo de operação batelada	49
3.5.3.1 <i>Cultivos em batelada com glicose e glicerol como fonte de carbono</i>	49
3.5.3.2 <i>Cultivo em batelada com ácido acético como fonte de carbono</i>	50
3.5.4 Cultivos em modo de operação contínuo	50
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	51
3.5.1 Determinação da concentração celular	51
3.5.2 Determinação da concentração de substrato e ácidos orgânicos	52
3.6 PROCEDIMENTO DE CÁLCULOS.....	52
3.6.1 Balanço material	53
3.6.2 Balanço de carbono	54
3.6.3 Determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ)	55

3.6.4	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$).....	56
3.6.5	Determinação dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$).....	57
3.7.	SIMULAÇÕES NO OPTFLUX.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1	CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS	59
4.2	CULTIVOS EM BIORREATOR EM MODO BATELADA PARA DIFERENTES FONTES DE CARBONO	61
4.3	CULTIVOS EM BIORREATOR EM MODO CONTÍNUO UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO	68
4.3.1	Fluxos estimados a partir das simulações do modelo metabólico para <i>S. typhimurium</i> selvagem	71
5	CONCLUSÕES.....	77
6	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXO 1.....	91

1. INTRODUÇÃO

As vacinas surgiram em 1796 com os estudos de Edward Jenner, e desde então têm sido de grande importância para a prevenção de doenças. Por isso, são realizadas pesquisas e investimentos no desenvolvimento de novas formulações, resultando numa maior disponibilização de novas vacinas e contribuindo de forma expressiva para a redução da mortalidade mundial por doenças infecciosas, tais como: pneumonia, gripe, tuberculose, difteria, varíola, coqueluche, sarampo, febre tifoide (ANDRÉ, 2003; RAPPUOLI et al., 2014).

Tendo em vista a importância das vacinas, avanços biotecnológicos em relação a biologia molecular, microbiologia, imunologia e vacinologia vêm sendo aplicados no desenvolvimento de novas estratégias para produção de vacinas eficazes para a imunização humana e animal (RILEY; STEWART, 2013).

Dentre os avanços biotecnológicos, a utilização de microrganismos vivos (Vetores Bacterianos Vivos - VBV) para veiculação de antígenos vacinais heterólogos vem sendo muito estudada nos últimos anos (SILVA et al., 2014). Por meio de linhagens atenuadas de algumas bactérias patogênicas ou espécies bacterianas comensais pode-se obter vacinas com larga aplicação, devido à facilidade de manipulação genética das mesmas e à alta resposta imune induzida por estes microrganismos (GENTSCHEV et al., 2002). Além disso, o uso desta tecnologia para a vacinação leva a um menor custo de preparação, devido à redução de etapas complexas de purificação e à ausência de adjuvantes, em comparação com outras tecnologias de produção de vacinas recombinantes. A capacidade natural de induzir resposta imunológica mediada por células, além da possibilidade de administração nas mucosas, por via oral ou nasal são outras vantagens dessas formulações. Com isso a aplicação se torna mais prática, tendo um menor risco de reações adversas após a imunização e reduzindo os custos de aplicação, além da estimulação da resposta imune das mucosas, prevenindo a colonização dos tecidos que servem como porta de entrada para a maioria dos agentes infecciosos (MCGHEE et al., 1992; SHATA et al., 2000; DETMER; GLENTING, 2006).

As bactérias do gênero *Salmonella* vêm sendo muito estudadas como vetores bacterianos vivos (CHIN'OMBE, 2013; KONG; CLARK-CURTISS; CURTISS III, 2013; GALEN; CURTISS, 2014). Porém, para viabilizar seu uso na produção de vacinas faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de cultivo para este microrganismo que permitam a obtenção de altas densidades celulares e elevadas produtividades. Este ponto representa um desafio tecnológico a ser superado para o uso de células de *Salmonella* como VBVs, uma vez que o crescimento celular deste microrganismo é inibido pela formação de ácidos orgânicos

gerados em grande quantidade pelo próprio metabolismo deste gênero de bactérias (SARGO, 2015).

De forma geral, existem duas principais estratégias para contornar a alta produção de metabólitos tóxicos pelas células: a) introdução de modificações genéticas no microrganismo para alteração de seu fenótipo; b) alterações nas condições de cultivo como, por exemplo, utilização de fontes de carbono cuja assimilação seja mais eficientemente direcionada para a produção de energia. Na primeira estratégia, a modificação genética de uma cepa de *Salmonella typhimurium* LT2 através da super-expressão do gene *acs* (responsável pela assimilação de acetato), já realizada em *Escherichia coli* (LIN et al., 2006), foi estudada no presente trabalho para redução no acúmulo de acetato. Na segunda estratégia, o uso do glicerol como fonte de carbono alternativa foi explorado, pois, em trabalhos anteriores do grupo, o metabolismo deste substrato pelas células de *Salmonella* apresentou uma baixa produção de acetato (SARGO, 2015), que é o principal composto relacionado com a inibição do crescimento celular para este microrganismo.

O uso dos modelos metabólicos em escala genômica disponíveis para *S. typhimurium* é um recurso fundamental no estudo do metabolismo do organismo. Com o suporte das simulações do modelo metabólico, estratégias de cultivo podem ser aperfeiçoadas e os alvos para modificações genéticas podem ser escolhidos de maneira mais objetiva (FRANCKE et al., 2005).

Ambas as estratégias propostas no presente trabalho são inéditas na literatura para células de *Salmonella*, até onde vai nosso conhecimento. Juntamente com o emprego de ferramentas da Biologia de Sistemas, os resultados obtidos com a aplicação destas estratégias contribuirão ainda para um melhor entendimento do metabolismo de *S. typhimurium* e o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo.

1.1 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar duas estratégias para reduzir o acúmulo de acetato em cultivos de *S. typhimurium*: a utilização de glicerol como uma fonte de carbono em potencial para cultivos de alta densidade celular; e a utilização de uma cepa geneticamente modificada para intensificar a assimilação de acetato.

Para alcançar este objetivo foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar o metabolismo do glicerol por *S. typhimurium* em cultivos em biorreator operado em modo contínuo;

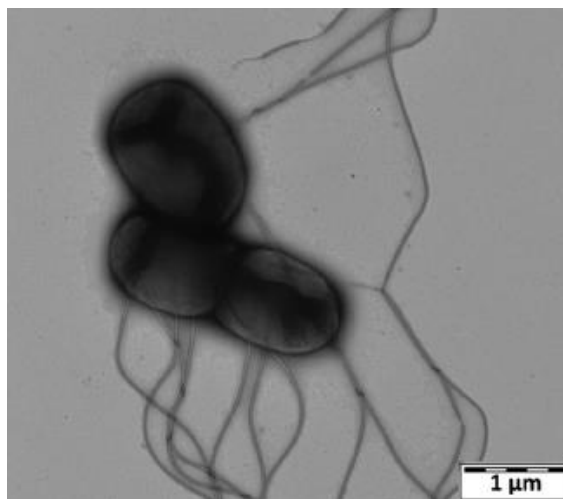
- Incorporar ao modelo metabólico STM_v1.0 os resultados obtidos nos cultivos contínuos para aprimorar a precisão das previsões do modelo e sua posterior utilização;
- Avaliar o acúmulo de acetato em cultivos em biorreator em modo batelada com uma cepa de *S. typhimurium* modificada geneticamente para super-expressar o gene *acs*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas um dos principais patógenos intracelulares, transmitidas por alimentos tanto para humanos quanto para animais, e causam inúmeras infecções gastrointestinais, desde diarreia e vômitos até doenças que podem levar à morte, como a febre tifoide (HENSEL, 2004).

O gênero *Salmonella* faz parte da família das *Enterobacteriaceae* e está proximamente relacionado aos gêneros *Escherichia* e *Shigella*, também pertencentes a esta família. A sua caracterização é dada por bactérias na forma de bacilos, Gram-negativas, não-esporulantes, sendo anaeróbias facultativas, com diâmetro médio entre 0,7 a 1,5 μm e comprimento de 2 a 5 μm (HEGAZY; HENSEL, 2012). Apresentam ainda flagelos, associados a sua motilidade, que também auxiliam na fase inicial de colonização e vem sendo estudados como um dos possíveis fatores de virulência (JOSENHANS; SUERBAUM, 2002; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; STECHER et al., 2004).

Figura 2.1 - Imagem de uma cepa selvagem de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET)



FONTE: Frahm e colaboradores (2015)

O crescimento ótimo dessas bactérias se dá a uma temperatura de 37 °C e seu pH ótimo varia entre 6,5 a 7,5, sendo que valores de pH superiores a 9,5 e inferiores a 4,5 apresenta efeito bactericida. São lactose e sacarose negativas, podendo consumir mais de 70 compostos como fonte de carbono, como glicose, glicerol, maltose, sorbitol, xilose, entre outros, produzindo CO₂ (GUTNICK et al., 1969; LE MINOR, 1992). Muitas são capazes de crescer em meio mínimo de glicose-amônia, chamadas de prototróficas, enquanto outras são chamadas

de auxotróficas necessitando de suplementação do meio com aminoácidos ou vitaminas, variando de acordo com seu sorotipo (NEIDHARDT et al., 1987).

Os organismos deste gênero são extremamente heterogêneos apresentando 2610 sorotipos até agora descobertos, divididos em duas espécies: *Salmonella enterica* (2587 sorotipos) e *Salmonella bongori* (23 sorotipos) (KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2001; GUIBOURDENCHE et al., 2010; KONG; CLARK-CURTISS; CURTISS III, 2013).

A espécie *Salmonella enterica* possui 6 subespécies (GUIBOURDENCHE et al., 2010), das quais os sorotipos mais importantes para a saúde humana são: *Salmonella enterica* sorotipo *Typhi*, que infecta apenas uma espécie, é a causadora da febre tifoide em humanos (IVANOFF; LEVINE; LAMBERT, 1994; CRUMP; LUBY e MINTZ, 2004) e *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium*, capaz de infectar uma variedade de hospedeiros tais como roedores, animais domésticos e humanos, sendo considerada como um dos principais agentes causadores das gastroenterites (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002).

2.1 METABOLISMO DA *Salmonella typhimurium* LT2

O genoma da *S. typhimurium* LT2 foi sequenciado completamente em 2001 por McClelland e colaboradores e está disponível no GenBank (AE006468), com cerca de 4,86 milhões de nucleotídeos (4,86 Mb). Há a presença de ilhas de patogenicidade na *Salmonella* que codificam vários fatores de virulência permitindo a colonização e infecção dos organismos hospedeiros.

Existem poucos estudos do metabolismo da *Salmonella* na literatura. Uma alternativa para contornar essa escassez de informações sobre o metabolismo da *Salmonella* de forma a viabilizar seu entendimento é a utilização de modelos metabólicos de microrganismos que possuam similaridade em suas redes metabólicas, e cujo metabolismo já está bem caracterizado na literatura (SARGO, 2015).

A *Escherichia coli* é uma *Enterobacteriaceae* muito próxima da *Salmonella*, compartilhando cerca de 85% do seu genoma (MCCLELLAND et al., 2001; ABUOUN et al., 2009; GÖTZ et al., 2010). Por essa razão, há uma grande similaridade entre suas redes metabólicas, que possuem os mesmos genes envolvidos nas principais vias metabólicas do carbono central, como, a glicólise (GL), a via Entner-Doudoroff (ED), a via das pentose fosfato (PP), o ciclo do ácido cítrico (TCA), as vias responsáveis pela biossíntese de todos os

aminoácidos, além das principais reações anapleróticas. Assim muito do que se conhece do metabolismo da *E. coli* pode ser aplicado para o metabolismo da *S. typhimurium*.

As *Salmonellas* podem assimilar vários compostos como fontes de carbono, no entanto, a glicose é sua fonte de carbono preferencial. Como mostra a Figura 2.2, a glicose é transportada para dentro das células através do sistema da fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente (PTS) e ao mesmo tempo é fosforilada, produzindo a glicose-6-fosfato (POSTMA; LENGELER; JACOBSON, 1993). A glicose-6-fosfato então é oxidada pela via glicolítica, gerando, piruvato, energia e metabólitos intermediários, precursores de outras vias metabólicas, ou então, é oxidada por vias alternativas à glicólise, como a via das pentoses fosfato e a via Entner-Doudoroff (NEIDHARDT et al., 1987, LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

A via das pentoses fosfato (PP) é uma via alternativa de oxidação da glicose-6-fosfato, convertendo hexoses em pentoses, podendo ocorrer juntamente com a glicólise. Esta via converte a glicose-6-fosfato em ribose-5-fosfato, importante na composição de nucleotídeos e de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e que também é precursor da biossíntese do aminoácido histidina, de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), além de importantes metabólitos intermediários utilizados na GL (como a frutose-6-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato) e na biossíntese de alguns aminoácidos aromáticos, como a L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, a partir do metabólito corismato (SARGO, 2015; CASPI et al., 2016).

A via Entner-Doudoroff é uma via exclusiva de algumas bactérias Gram-negativas, que possibilita a oxidação da glicose em piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. Sabe-se que para a *E. coli*, a via ED é importante por permitir que compostos como gluconato e glucuronato possam ser metabolizados, possibilitando seu crescimento, por exemplo, no intestino de mamíferos ou em ambientes aquáticos (FLAMHOLZ et al., 2013; CASPI et al., 2016).

A via da glicólise, ou via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), é a principal via de oxidação da glicose, cujo produto final são duas moléculas de piruvato. Além disso, durante a glicólise, é gerada energia, conservada na forma de ATP (trifosfato de adenosina) e da coenzima reduzida NADH (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

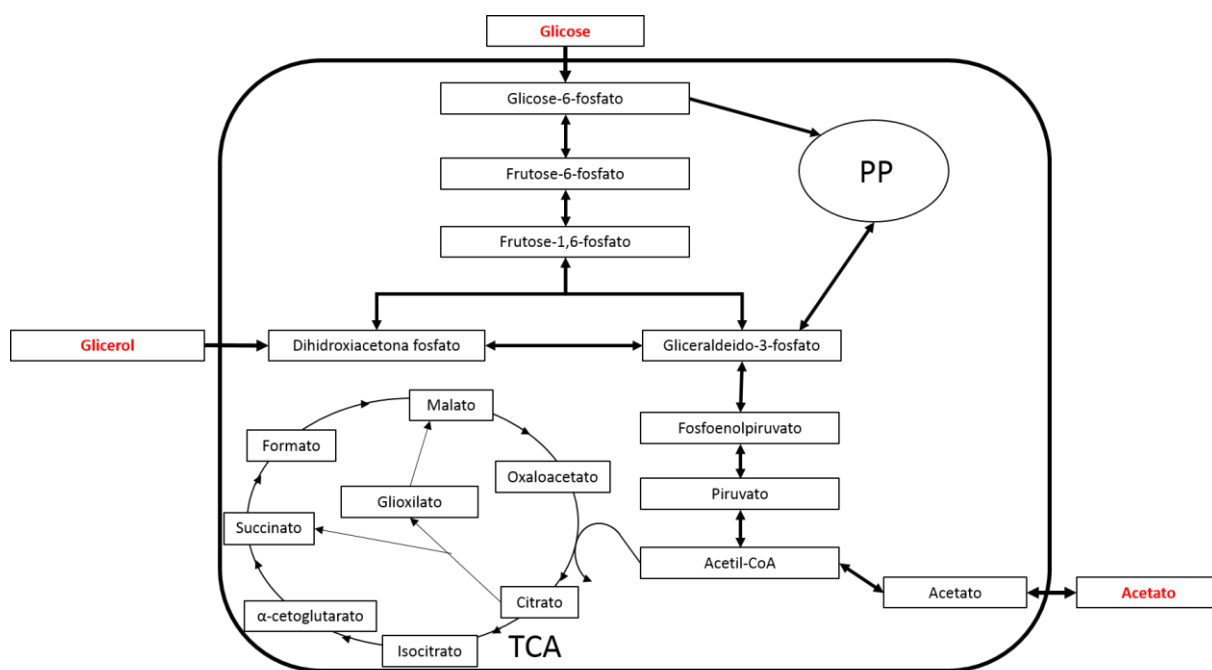
Dependendo da quantidade disponível de oxigênio dissolvido, o piruvato gerado a partir da oxidação da glicose pode seguir por duas vias: a via respiratória (em aerobiose), seguindo para o ciclo do ácido cítrico (TCA) e a cadeia respiratória, gerando energia e para

biossíntese de vários compostos; ou a via fermentativa (em anaerobiose), onde piruvato é convertido em diferentes ácidos orgânicos.

O produto da oxidação do piruvato pela via aeróbia é o acetil-CoA, que participa de várias reações como substrato ou produto, podendo seguir para o TCA, ou ser direcionado para a produção de ácidos graxos ou acetato. O acetil-CoA é, portanto, um intermediário muito importante na síntese de biomassa e no rendimento energético.

No caso do glicerol como fonte de carbono (Figura 2.2), o mesmo é fosforilado pela enzima glicerol quinase, resultando em glicerol-3-fosfato, o qual é oxidado a dihidroxiacetona fosfato pela glicerol-3-fosfato desidrogenase. A dihidroxiacetona fosfato é convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela ação da enzima glicolítica triose fosfato isomerase, e o mesmo é oxidado pela via da glicólise (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

Figura 2.2 - Metabolismo da *Salmonella typhimurium* LT2 em várias fontes de carbono



Fonte: Adaptado de Andersson e colaboradores (2007); Durnin e colaboradores (2008) e Caspi e colaboradores (2014).

O ciclo do glicoxilato desempenha papel fundamental na conversão do acetato (e dos compostos degradados até acetato) em carboidratos, sendo, portanto, essencial para o aproveitamento do acetato como fonte de carbono. No ciclo do ácido cítrico (TCA) o acetil-CoA se condensa com oxaloacetato para formar citrato. Isso também ocorre no ciclo do

glioxilato, no entanto a conversão do isocitrato não ocorre pela ação da enzima isocitrato desidrogenase, mas pela clivagem catalisada pela enzima isocitrato liase, formando succinato e glioxilato. O glioxilato por sua vez se condensa com outra molécula de acetil-CoA formando malato, pela ação da enzima malato sintase (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

Algumas bactérias como a *E. coli* e a *S. typhimurium* possuem um conjunto completo de enzimas tanto do ciclo do ácido cítrico como do glioxilato (localizadas no citosol), o que as torna capazes de crescer tendo o acetato como única fonte de carbono e energia (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

2.1.1 *Overflow*

Mesmo em condições de aerobiose, para fontes de carbono como a glicose, em células de *Salmonella*, assim como de outros anaeróbios facultativos, ocorre o fenômeno chamado metabolismo *overflow*. Esse fenômeno ocorre quando há um desequilíbrio entre o fluxo de glicose assimilada e os fluxos de produção de energia e de biossíntese, resultando em uma sobrecarga do TCA, levando à conversão do acetil-CoA em acetato, ao invés de entrar no TCA, seguida pela secreção deste composto para o meio de cultura (RIESENBERG, 1991; LEHNINGER, NELSON e COX, 2006; VALGEPEA et al, 2010).

O metabolismo *overflow* é acentuado em velocidades mais altas de crescimento, onde as células precisam gastar mais energia com a síntese de proteínas ribossomais, aminoácidos, etc, e economizar energia que era gasta para outras funções. Como a síntese das proteínas do metabolismo aeróbio é bastante custosa energeticamente, a célula acaba diminuindo a produção destas proteínas (do TCA, glicólise, fosforilação oxidativa e proteínas transportadoras). Essa mudança no proteoma, além de questões regulatórias, acaba levando a célula ao metabolismo de *overflow* (BERNAL, CASTAÑO-CEREZO E CÁNOVAS, 2016).

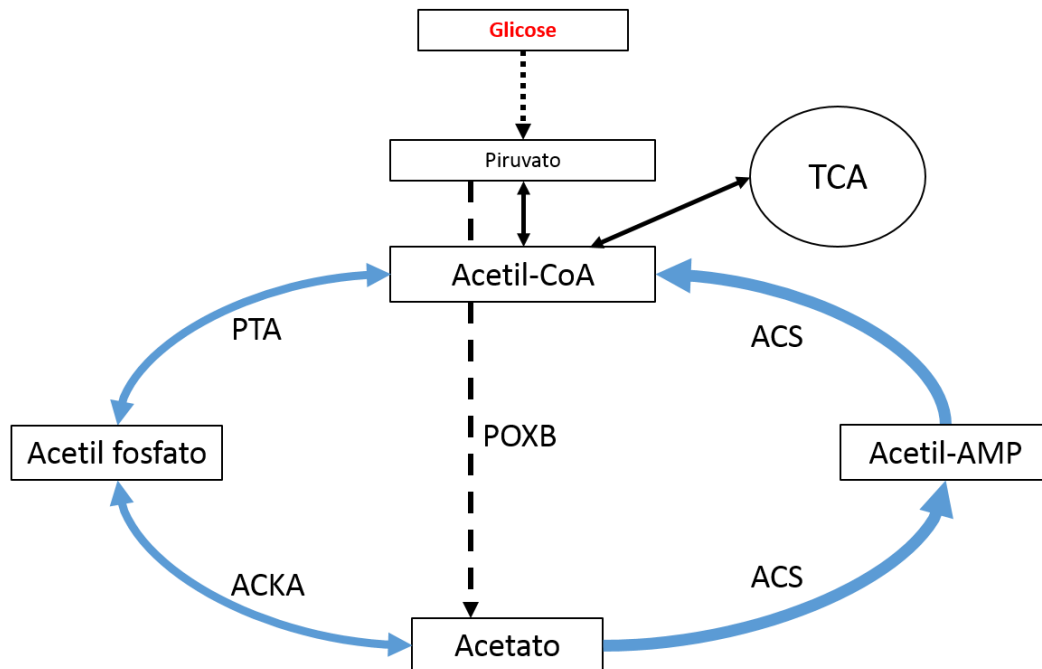
Para compreender os mecanismos de assimilação e produção de acetato, principal produto do *overflow* novamente tomando um microrganismo similar a *Salmonella*, sabe-se que a *E. coli* possui três mecanismos distintos para a produção e assimilação de acetato a partir de acetil-CoA (Figura 2.3). No entanto, apesar de muitos estudos terem sido realizados para *E. coli*, ainda há divergências sobre qual via é responsável pela assimilação e produção de acetato (KAKUDA et al., 1994; KUMARI et al., 1995; OH et al, 2002; VALGEPEA et al, 2010). Para alguns, o complexo enzimático acetato quinase - acetil fosfotransferase (ACKA-PTA) é o principal responsável pelo consumo do acetato, em glicose como fonte de carbono

(KAKUDA et al., 1994). Em contrapartida, Oh e colaboradores (2002) relataram que a acetil coenzima-A sintetase (ACS) é a enzima responsável pela assimilação do acetato. E existem ainda estudos que indicam que a via utilizada pela *E. coli* para a assimilação deste metabólito depende de sua concentração, ou seja, quando a bactéria está exposta a elevadas concentrações de acetato (acima de 25 mM), a via responsável pelo consumo do acetato seria a ACKA-PTA, mas se a concentração de acetato for baixa (abaixo de 10 mM), sua assimilação ocorrerá pela enzima ACS (KUMARI et al., 1995).

Para a *Salmonella* a assimilação e produção de acetato foi pouco estudada. Starai e colaboradores (2005) cultivaram *S. typhimurium* em frascos agitados, utilizando etanolamina como fonte de carbono e avaliando a ação das enzimas envolvidas. Os resultados mostraram que, nas condições estudadas, a produção de acetato é realizada pelas enzimas PTA-ACKA e POXB enquanto a assimilação é feita pelas enzimas ACS e ACKA-PTA.

Figura 2.3 - Via metabólica de produção e assimilação de acetato por *Escherichia coli*.

POXB, Piruvato desidrogenase; ACKA, acetato quinase; PTA, fosfotransacetilase; ACS, acetil coenzima-A sintetase.

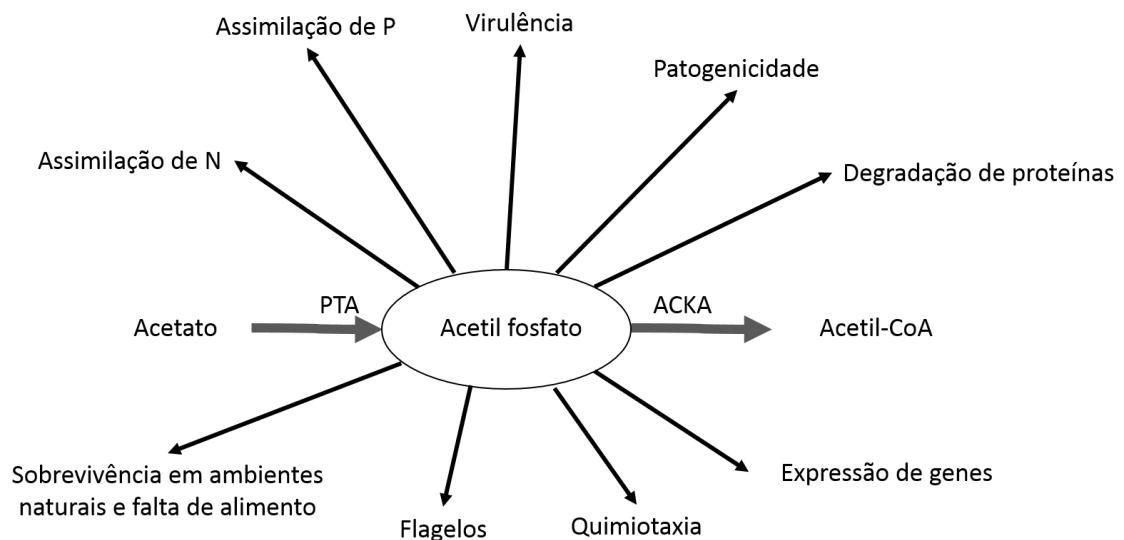


Fonte: Adaptado de Castaño-Cerezo e colaboradores (2009) e Valgepea e colaboradores (2010)

Como estratégia para obter menor acúmulo de acetato é possível fazer-se uso da engenharia genética para deletar ou super-expressar os genes responsáveis pela atuação dessas

enzimas. Dentre as estratégias existentes para diminuir o acúmulo de acetato, é possível que a super-expressão do gene *acs* que codifica a enzima acetil-CoA sintetase possa acarretar uma melhor reassimilação de acetato, como observado para *E. coli* por Lin et al, 2006. Outra possível alternativa seria o nocaute dos genes responsáveis pela fosfotransacetilase (PTA) ou da acetato quinase (ACKA), no intuito de reduzir a produção de acetato. No entanto, alterar a expressão da PTA pode gerar efeitos secundários indesejados, uma vez que ela é responsável pela produção do acetil fosfato, uma importante molécula sinalizadora para várias funções celulares (VALGEPEA et al, 2010) (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Acetil fosfato, importante molécula sinalizadora de funções celulares



Fonte: Adaptado de Valgepea e colaboradores (2010)

2.2 *S. typhimurium* E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A *Salmonella enterica* é um importante patógeno bacteriano intracelular e por isso os mecanismos de interação e patogenicidade da *Salmonella* com as células hospedeiras vêm sendo muito estudados (KAUFMANN, RAUPACH e FINLAY, 2001). O conhecimento sobre a habilidade de invasão e replicação dentro das células do organismo hospedeiro foi muito importante para o desenvolvimento de linhagens atenuadas de *Salmonella* que são utilizadas como vetores vacinais vivos (VBVs) permitindo a prevenção de salmonelose em animais e humanos (GERMANIER e FÜRER, 1983).

Por isso, as linhagens atenuadas de *Salmonella* têm sido utilizadas, além da imunização contra doenças causadas por ela própria, para a construção de veículos vacinais vivos entregando antígenos heterólogos (NAKAYAMA, KELLY e CURTISS III, 1988; SUN et al 2013).

Uma das grandes vantagens da utilização de vacinas baseadas em VBVs está ligada à facilidade de administração, seja por via oral ou nasal, que torna a aplicação mais prática quando comparada com as tradicionais vacinas injetáveis, além de apresentar um baixo custo de preparação, fazendo com que sua administração em larga escala seja mais viável (BRANGER et al., 2009; WANG et al., 2009).

Apesar de existir uma certa dificuldade de aceitação da imunização por VBVs, já existem diversos estudos que mostram que linhagens atenuadas de *Salmonella* constituem um potencial veículo de entrega de antígenos heterólogos de outras doenças ao sistema imune do hospedeiro, sem causar uma infecção real, induzindo uma resposta imune local na mucosa e estimulando respostas humorais e celulares (ZHANG et al., 2013).

As atenuações realizadas na *Salmonella* são manipulações genéticas para que o microrganismo induza no hospedeiro uma resposta imune ao antígeno carregado por ele, no entanto de forma que não gere uma grave infecção. Desta forma os genes manipulados são responsáveis pela síntese de fatores relacionados com a virulência, envolvidos com o metabolismo biossintético de compostos importantes para replicação e que participam de processos de regulação gênica (ALMEIDA, MASSIS e FERREIRA, 2002).

Segundo Cárdenas e Clements (1992), a maioria dos estudos realizados na obtenção de linhagens atenuadas de *Salmonella* utilizam mutações em genes envolvidos na biossíntese de compostos aromáticos (*aro*), impedindo a capacidade de síntese de compostos requeridos para a produção dos aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), entre outros compostos necessários para sua replicação. Uma vez que as bactérias são incapazes de se reproduzir no hospedeiro, elas apenas invadem o intestino delgado do organismo vacinado e permanecem aí pelo tempo suficiente para provocar uma resposta imune eficaz (HONE et al., 1991; LEVINE et al., 1990; WILSON et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

Atualmente, a única vacina licenciada baseada em linhagens atenuadas vivas de *Salmonella* é a Vivotif®, criada inicialmente por Germanier e Fürer (1983) e hoje, após algumas modificações em sua formulação, comercializada pela companhia Crucell Switzerland LTD (www.crucellvaccinescanada.com). Esta vacina é composta por células vivas de *S. typhi* Ty21a

e administrada oralmente, imunizando adultos e crianças com mais de 6 anos contra a febre tifoide (GERMANIER e FÜRER, 1983; KANTELE et al., 2012)

Entretanto, nas últimas décadas inúmeros estudos, principalmente utilizando modelos murinos, comprovam que o uso de mutantes auxotróficos de *S. typhi* e *S. typhimurium* são eficazes na expressão e administração de antígenos heterólogos para a imunização contra diversos agentes infecciosos, destacando-se: (i) diferentes espécies de bactérias, como *Helicobacter pylori*, responsável pela ocorrência da maioria das úlceras e das gastrites crônicas (ANGELAKOPOULOS e HOHMANN, 2000; BUMANN et al., 2001; CHEN et al., 2012; GÓMEZ-DUARTE et al., 1999), *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose, uma das doenças que mais causa óbitos no mundo (JUÁREZ-RODRÍGUEZ et al., 2012), *Salmonella typhi* (GERMANIER e FÜRER, 1983; HOHMANN, OLETTA e MILLER, 1996; IVANOFF, LEVINE e LAMBERT, 1994; SPRENG, DIETRICH e WEIDINGER, 2006) e *Streptococcus pneumoniae*, causando principalmente pneumonia e meningite (SEO et al., 2012; WANG e CURTISS III, 2014); (ii) vírus, como HIV (CHIN'OMBE N, 2013) e diferentes tipos de influenza (BEN-YEDIDIA e ARNON, 2007; HUANG, ZHENG e YUEN, 2015); (iii) parasitas patogênicos, como os gêneros *Plasmodium spp.*, parasita causador da malária humana (TARTZ et al., 2008), *Leishmania spp.*, que causa a leishmaniose em humanos e cães (SALJOUGHIAN, TAHERI e RAFATI, 2014; SCHROEDER et al., 2011).

Linhagens atenuadas de *Salmonella* também estão sendo muito estudadas no tratamento e vacinação contra doenças não infecciosas, como diferentes tipos de câncer (melanoma, câncer de mama, colo do útero, pâncreas, próstata, entre inúmeros outros) e em diferentes fases desta doença (BOLHASSANI e ZAHEDIFARD, 2012; FORBES et al., 2010; HEIMANN e ROSENBERG, 2003), para avaliação do controle do crescimento tumoral e da sobrevivência em diversos modelos animais.

Além disso, alguns componentes das células da *Salmonella*, como o antígeno Vi, a flagelina e lipossacarídeos também vêm sendo utilizados no campo da vacinologia: (i) antígeno Vi: é o polissacarídeo capsular presente na superfície de alguns sorotipos e utilizado em uma das vacinas comerciais contra febre tifoide (BHUTTA et al., 2007; BRAGA et al., 2010; LU et al., 2012; ROBBINS e ROBBINS, 1984); (ii) flagelina: proteína presente nos flagelos desta bactéria, potente ativadora de respostas do sistema imune, e por isso vem sendo testada em formulações vacinais contra gripe, peste, malária e também como protetora celular durante quimioterapias e radioterapias (OLIVEIRA et al., 2011; SKOUNTZOU et al., 2010); (iii) lipossacarídeo: é o principal componente da superfície da maioria das bactérias Gram-

negativas, sendo um fator de virulência, como também é composto por um antígeno protetor (antígeno “O”) que pode ser purificado e conjugado a outras proteínas, conferindo proteção (KOTHARI et al., 2014; MICOLI et al., 2013; ROBBINS e SCHNEERSON, 1990).

Assim, as *Salmonellas*, seja na forma celular ou de seus componentes, vêm se tornando cada vez mais promissoras em ensaios clínicos de novas formulações vacinais (PACHECO et al., 2004).

Neste contexto, o grupo de pesquisa do Departamento de Engenharia Química, juntamente com pesquisadores dos Departamentos de Genética e Evolução e de Morfologia e Patologia / UFSCar, desde 2007, vem se dedicando ao desenvolvimento de diferentes formulações vacinais contra a erisipela suína, uma das enfermidades que mais prejudica à suinocultura mundial, cujo agente patogênico é a bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* (MAKINO et al., 1998; SILVA et al., 2012). Dentre as formulações já testadas, destaca-se a vacina de VBV baseada em linhagens recombinantes atenuadas de *S. typhimurium*, expressando a proteína SpaA (Surface protective antigen A), principal antígeno da *E. rhusiopathiae*.

Apesar do grande potencial e interesse em produzir vacinas baseadas em linhagens recombinantes atenuadas de *Salmonella*, ainda existem poucos avanços no desenvolvimento de processos para obtenção de uma elevada massa de células de *Salmonella*, o que poderia viabilizar a produção destes produtos biotecnológicos de grande importância para a saúde humana e veterinária (SARGO, 2015).

2.3 CULTIVOS DE MICRORGANISMOS EM BIORREADORES

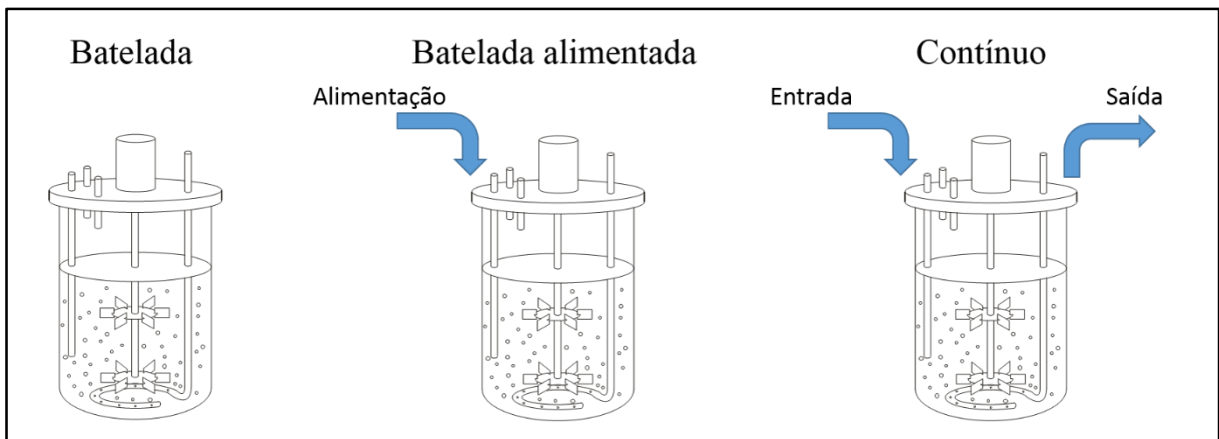
A realização de cultivos em biorreatores possibilita desde a produção em larga escala de microrganismos, como a produção de diversos produtos de interesse como proteínas, etanol e biopolímeros. A escolha do modo de operação do biorreator está intimamente ligada ao objetivo a ser alcançado no cultivo. Os diferentes modos de operação são esquematizados na Figura 2.5.

No modo de operação em batelada simples o reator é carregado no início do cultivo e não há alimentação de nutrientes nem retirada de caldo ao longo do cultivo. O fornecimento de todo substrato ocorre no início da operação e o produto formado é acumulado. Ambos fatores podem resultar em inibição do crescimento. Quando o cultivo em batelada é realizado sob condições controladas (pressão, temperatura, pH, aeração e agitação), os dados

obtidos podem ser utilizados na estimativa de parâmetros cinéticos do microrganismo. No entanto, não é adequado para mapear o metabolismo do mesmo, uma vez que na batelada a concentração de células, produtos e substrato são transientes. (DORAN, 2013)

Para obter dados em estado estacionário que possibilitem o mapeamento do metabolismo, o modo de operação contínuo se mostra mais adequado. Neste caso, uma corrente de alimentação de meio fresco é fornecida continuamente ao reator e acompanhada pela retirada simultânea do caldo de cultivo, de forma que as condições após estabilização do reator (quando o estado estacionário é alcançado) permanecem constantes. O balanço material para as células em um reator operado continuamente, no estado estacionário e na ausência de células na alimentação, leva a um resultado muito importante: a taxa de diluição (D), definida como a razão entre o vazão de alimentação e o volume do meio reacional, impõe a condição de crescimento do microrganismo, já que μ , a velocidade específica de crescimento, é igual a D . Assim, realizando cultivos contínuos para diferentes taxas de diluição, é possível caracterizar o metabolismo para diferentes condições de crescimento (DORAN, 2013).

Figura 2.5 - Modos de operação dos biorreatores



Para cultivos de alta densidade, o modo de operação em batelada alimentada é geralmente empregado e a estratégia de cultivo é baseada na manutenção do crescimento exponencial durante a fase de alimentação após a batelada inicial. Esta estratégia possibilita o aumento da produtividade de biomassa, para um volume de cultivo reduzido, contribuindo para diminuir a geração de efluentes e os custos de produção, já que requer menor investimento em equipamentos (RIESENBERG e GUTHKE, 1999). No entanto, a utilização desta técnica de cultivo pode ocasionar problemas de inibição por substrato, dificuldade de transferência de oxigênio e acúmulo de metabólitos inibitórios (LEE, 1996).

Portanto, o grande desafio para os cultivos de alta densidade está em diminuir ou evitar a formação de metabólitos inibitórios para o microrganismo cultivado. Para tanto, várias estratégias são estudadas: otimização do meio de cultivo (escolha de fontes de carbono que produzam menos metabólitos inibitórios); controle adequado da velocidade de crescimento celular imposta pela vazão de alimentação (impedindo o acúmulo de substrato e minimizando o metabolismo *overflow*) e uso de estratégias de engenharia metabólica (criação de linhagens geneticamente modificadas para produzir menos metabólitos inibitórios) (PARK et al, 1992; MINNING et al, 2001; KIM et al, 2007; WU e SHI, 2007; SARGO, 2011; SOTO et al, 2011).

A utilização do glicerol como fonte de carbono tem sido estudada para diversos tipos de cultivos, voltados para a produção de vários produtos biotecnológicos, como proteínas recombinante, enzimas e medicamentos. (SARGO, 2011; ESCALLÓN, 2013). Além de ser uma fonte de carbono de baixo custo, sua aplicação em CADC de *E. coli* é favorecida pela menor produção de acetato, quando comparado com a glicose, sendo assim uma estratégia já consolidada e muito empregada (SARGO 2011; CARVALHO et al., 2012; WEINER et al., 2014). No entanto para cultivos de *S. typhimurium*, o uso de glicerol como fonte de carbono e as condições de cultivo que levem a menor produção de acetato ainda foram pouco investigadas.

2.3.1 Cultivos de *Salmonella*

São poucos os cultivos de *Salmonella* em biorreator relatados na literatura. Dentre os mencionados, os principais objetivos foram a produção de lipossacarídeos (KOTHARI et al., 2014; MICOLI et al., 2013; SCHLECHT e GALANOS, 1994) ou então a produção e posterior estudo da purificação do polissacarídeo capsular Vi (JANG et al., 2008; KOTHARI et al., 2013) e da flagelina (OLIVEIRA et al., 2011; SIMON et al., 2014).

As maiores concentrações celulares obtidas nos diferentes cultivos de *Salmonella* foram na ordem de $13 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$, produção muito inferior às relatadas em cultivos de outros microrganismos, como por exemplo de *Bacillus subtilis* ($77 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ em KWON et al., 2011), de *Chlorella vulgaris* ($117 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ em DOUCHA e LÍVANSKÝ, 2011) ou de *E. coli* ($100 - 190 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ em FÜCHS et al., 2002; KNOLL et al., 2007; KORZ et al., 1995; SARGO, 2011; SOTO et al., 2011).

As temperaturas usualmente utilizadas em cultivos de *Salmonella* variam entre 30 a 37 °C e o pH inicial próximo de 7, de acordo com as condições ótimas de crescimento deste microrganismo. A maioria dos cultivos é realizada com meio complexo, pois como

consequência das mutações realizadas para a obtenção de linhagens de *Salmonella* atenuadas, algumas cepas apresentam deficiência na biossíntese de alguns compostos, e estes já se encontram presentes nos meios ricos, possibilitando o crescimento celular (SILVA 2011; OLIVEIRA et al., 2011, WILSON et al., 2003).

Silva (2011) realizou estudos com *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_spaA em frascos agitados, utilizando meio complexo, a fim de avaliar o crescimento do microrganismo recombinante sob diferentes condições de aeração: com agitação de 200 rpm (aerobiose) ou sem agitação (microaerofilia). Neste estudo, foi possível observar um favorecimento do crescimento celular na condição de maior disponibilidade de oxigênio dissolvido. Assim, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) calculada a partir de dados de densidade ótica foi de $1,0 \text{ h}^{-1}$ para a condição aeróbia e $0,83 \text{ h}^{-1}$ para a microaerofilia.

Nos estudos realizados por Augusto (1998) em biorreatores de 0,7 e 10 L, avaliaram-se diferentes modos de operação (regime descontínuo e contínuo) e de meios de cultura (meio complexo e mínimo). O melhor resultado, em termos de produção celular, foi obtido em cultivo descontínuo com meio mínimo, chegando a uma concentração celular de $12,7 \text{ gDCW L}^{-1}$ em menos de 9 horas. Entretanto, foi observada uma elevada produção de acetato e de um produto desconhecido, em todas as condições estudadas, que corresponderam a cerca de 80 % do carbono consumido.

Oliveira e colaboradores (2011) avaliaram os parâmetros cinéticos de crescimento e de produção e purificação da flagelina em cultivo em batelada de *S. typhimurium* SDV 322, conduzido sob condições aeróbias em biorreator de 3 L, contendo 2 L de meio complexo SN (20 g de soytone, 20 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl por litro de meio). A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 30% da saturação e durante o cultivo, glicose foi adicionada à medida que o pH do meio aumentava, indicando que os carboidratos presentes estavam sendo consumidos.

Outro trabalho bastante interessante relacionado com cultivos em biorreator de *S. typhimurium* foi realizado por Wilson e colaboradores (2003). Nele, o crescimento do patógeno foi investigado em cultivos em batelada, alcançando a concentração celular de aproximadamente $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, com meio complexo, conduzidos em diferentes pHs iniciais (4,4, 4,8, 5,0, e 7,0), para obter dados suficientes e gerar dados estequiométricos para prevenir seu crescimento em alimentos. Assim como observado por Augusto (1998), este estudo também

constatou que o ácido acético foi o principal ácido orgânico produzido, chegando a inibir o crescimento da *Salmonella*.

Apenas Sargo (2015) apresenta um estudo específico com *Salmonella* visando otimizar cultivos em biorreator para alcançar elevadas concentrações celulares, avaliando o metabolismo de várias fontes de carbono: glicose, glicerol, xilose e ácido acético. Neste trabalho foi avaliada a produção de ácidos orgânicos para condições aeróbias e anaeróbias. A produção de acetato para os cultivos em batelada foi 50% menor em glicerol e xilose, quando comparada com o cultivo nas mesmas condições em glicose. Houve um maior direcionamento do fluxo de substrato para a formação de biomassa ($Y_{X/S}=0,57 \text{ g}_{\text{DWC}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) na batelada com glicerol. Também foi realizado um cultivo em batelada alimentada com glicose, e mesmo mantendo a glicose residual baixa na fase de alimentação, houve um grande acúmulo de acetato ($17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) ao final do cultivo, resultando numa concentração celular de apenas $3,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

O glicerol mostrou-se promissor nos cultivos de Sargo (2015), reduzindo o acúmulo de acetato. Desta forma, é necessária uma melhor avaliação do potencial do glicerol como fonte de carbono, o que depende de estudos mais detalhados do seu metabolismo, como propõe o presente trabalho.

2.4 ENGENHARIA METABÓLICA

Inicialmente o melhoramento de diferentes organismos era realizado através de processos iterativos de mutagêneses aleatórias juntamente com a seleção de mutantes que fossem capazes de otimizar o processo de obtenção do produto de interesse. Contudo estas mutações podem produzir linhagens que são menos estáveis do que as selvagens (WENDISCH, BOTT e EIKMANN, 2006), podendo apresentar deficiências no crescimento celular, baixa tolerância ao estresse e que também podem produzir subprodutos que limitem a eficiência do processo (BECKER et al., 2011).

Como uma alternativa aos processos de mutações, a utilização da engenharia metabólica torna possível a produção de diferentes produtos por organismos geneticamente modificados (OGMs), de forma direcionada e mais eficiente, através de modificações em uma ou mais reações bioquímicas ou adição de novas reações a partir da tecnologia do DNA recombinante, otimizando os processos metabólicos, regulatórios e de transporte da célula estudada (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU E NIELSEN, 1998).

A definição de engenharia metabólica segundo Stephanopoulos, Aristidou e Nielsen (1998) é a melhoria dirigida da formação do produto ou propriedades celulares através da modificação de reações bioquímicas específicas ou a introdução de novas reações com o uso da tecnologia de DNA recombinante.

A engenharia metabólica, termo introduzido por Bailey (1991), é um campo da Engenharia Bioquímica que vem sendo aplicado desde a década de 90 no melhoramento genético de inúmeros organismos e tem se mostrado muito eficiente, como exemplo permitindo: (i) a minimização da produção de metabólitos indesejados como o acetato por *E. coli* (ARISTIDOU, SAN e BENNETT 1994; SOTO et al., 2011) e o glicerol por *S. cerevisiae*, aumentando a produtividade de etanol (GUO et al., 2011); (ii) o aumento da produtividade de algum produto de interesse como L-lisina (PARK et al., 2011), ácido fórmico (SONG et al., 2013) e L-fenilalanina (WEINER et al., 2014) por *E. coli*; (iii) a produção de novos compostos, como o ômega-3, através do design de vias metabólicas da levedura *Yarrowia lipolytica* (XUE et al., 2013).

A aplicação de Engenharia Metabólica exige análise e compreensão do metabolismo do organismo de interesse, permitindo identificar os melhores alvos para modificações genéticas. Essas modificações são avaliadas *in vivo*, escolhendo-se as que geraram os fenótipos mais próximos do desejado (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

O uso da engenharia metabólica vem ganhando cada vez mais destaque na obtenção de OGMs eficientes devido à rápida evolução dos recursos analíticos e computacionais nos últimos anos, focados na análise da expressão gênica, quantificação de metabólitos intracelulares e extracelulares, detecção do carbono marcado e análise de vias metabólicas, assim como evolução na área de bioinformática, que disponibiliza várias ferramentas que permitem a análise *in silico* do metabolismo de inúmeros organismos de interesse (SARGO, 2015).

2.4.1 Estratégias para diminuição da produção de acetato baseadas em Engenharia Metabólica

Apesar do desenvolvimento de modelos metabólicos e diversas ferramentas computacionais, a abordagem clássica da engenharia metabólica, baseada apenas no conhecimento do metabolismo celular, ainda pode ser empregada com sucesso em alguns casos. Como exemplo, pode-se citar o trabalho realizado por Miranda (2015) onde foi desenvolvida

uma cepa de *S. typhimurium* recombinante: com a expressão heteróloga do gene que codifica a enzima acetil-CoA sintetase (ACS), foi obtida uma linhagem com capacidade acentuada de assimilação de acetato, reduzindo o acúmulo deste metabólito tóxico às células, de maneira análoga ao realizado por Lin e colaboradores (2006) para *E. coli*.

No entanto, com a obtenção das sequências completas do genoma de inúmeros organismos, tornou-se possível a reconstrução de redes metabólicas complexas através de modelos computacionais, que podem ser utilizados tanto para analisar como interpretar e prever a distribuição dos fluxos metabólicos da célula, e assim auxiliarem no desenvolvimento de estratégias da engenharia metabólica. Estes modelos são chamados de modelos metabólicos em escala genômica (*Genome-scale Metabolic Models - GSMMs*) e possuem uma compilação das informações do metabolismo de um organismo extraídas a partir do genoma, complementadas com dados experimentais (FRANCKE et al., 2005). Existem ferramentas de bioinformática que vêm sendo desenvolvidas para avaliação de dados, simulação, previsão e otimização *in silico* dos sistemas metabólicos de interesse utilizando GSMMs. Alguns softwares permitem realizar a otimização de linhagens para diversas aplicações baseados no *knock out* ou inserção de reações e/ou genes nas vias metabólicas do organismo (ROCHA et al., 2010).

Apesar de existirem quatro modelos metabólicos em escala genômica disponíveis para *S. typhimurium* (Tabela 2.1), ainda não foi relatada na literatura a utilização de análise de fluxos metabólicos aplicada a essa bactéria, havendo, assim, necessidade de dados experimentais para validação destes modelos.

Tabela 2.1 - Estatística básica dos modelos metabólicos em escala genômica de *S. typhimurium* LT2

Modelo	Genes	Reações	Metabólitos	Compartimentos*	Referência
iRR1083	1083	1087	744	cs, ex	RAGHUNA THAN <i>et al.</i> , 2009
iMA945	945	1964	1036	cs, ex, pp	ABUOUN <i>et al.</i> , 2009
STM_v1.0	1270	2201	1119	cs, ex, pp	THIELE <i>et al.</i> , 2011
MetaSal	824	1097	1088	cs, ex, pp	HARTMAN <i>et al.</i> , 2014

*cs: citosol; ex: espaço extracelular; pp: periplasma.

Os dados obtidos no presente trabalho devem ajudar na compreensão do metabolismo do glicerol por *S. typhimurium* e ajudar a aprimorar a precisão das previsões do modelo STM_v1.0 e sua posterior utilização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Os experimentos realizados neste trabalho estão descritos nas tabelas 3.1, 3.2 e 3.3, experimentos em *shaker* (A); em biorreator em modo de operação batelada (B) e em biorreator em modo de operação contínuo (C). Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de *S. typhimurium* LT2, uma selvagem (SS) e uma recombinante (SR) que serão descritas no item 3.1.1. Ainda foram utilizadas três fontes de carbono distintas (glicose, glicerol ou acetato) de acordo com os objetivos de cada experimento.

Tabela 3.1 - Experimentos em batelada *shaker* (A)

Experimentos	Linhagem	Fonte de carbono	Objetivos
A1	<i>S. typhimurium</i> LT2 selvagem (SS)	Glicose	<ul style="list-style-type: none"> Obtenção de parâmetros cinéticos para definir as condições de cultivos em biorreator; Comparação entre as linhagens selvagem e recombinante para as duas fontes de carbono
A2	<i>S. typhimurium</i> LT2 selvagem (SS)	Glicerol	
A3	<i>S. typhimurium</i> LT2 recombinante (SR)	Glicose	
A4	<i>S. typhimurium</i> LT2 recombinante (SR)	Glicerol	

Tabela 3.2 - Experimentos em batelada Biorreator (B)

Experimentos	Linhagem	Fonte de carbono	Objetivos
B1	<i>S. typhimurium</i> LT2 recombinante (SR)	Glicose	<ul style="list-style-type: none"> Caracterização do microrganismo recombinante em relação ao acúmulo de acetato; Comparação com cultivos realizados por Sargo (2015) nas mesmas condições com o microrganismo selvagem
B2	<i>S. typhimurium</i> LT2 recombinante (SR)	Glicerol	
B3	<i>S. typhimurium</i> LT2 recombinante (SR)	Acetato	

Tabela 3.3 – Experimentos contínuos em Biorreator (C)

Experimentos	Taxa de diluição (D)	Linhagem	Fonte de carbono	Objetivos
C1	0,1 h ⁻¹	<i>S. typhimurium</i> LT2 selvagem (SS)	Glicerol	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo do acúmulo de acetato pela cepa selvagem em glicerol para várias taxas de diluição; • Comparação com cultivos realizados por Sargo (2015) em glicose; • Comparação dos fluxos de carbono experimentais com fluxos simulados pelo Optflux
C2	0,17 h ⁻¹			
C3	0,22 h ⁻¹			

3.1.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado nos experimentos A1, A2, C1, C2 e C3 foi a linhagem selvagem de *S. typhimurium* LT2 (SS) adquirida no banco de culturas “*Salmonella Genetic Stock Centre* - SGSC” da Universidade de Calgary (Canadá).

O microrganismo utilizado nos experimentos A3, A4, B1, B2 e B3 foi a linhagem recombinante de *S. typhimurium* LT2 (SR) transformada com o plasmídeo pUC19 contendo o gene *acs* de *Escherichia coli* que codifica a enzima acetil-CoA sintetase (ACS), realizada por Miranda (2015), cuja clonagem está descrita no ANEXO 1.

3.2 MEIOS DE CULTIVO

O meio utilizado para plaquear o estoque congelado das cepas SR e SS foi o meio LB-ágar (“Luria-Bertani”), contendo a composição apresentada na tabela 3.4. Em todos experimentos realizados com a SR foi adicionada ampicilina 50 mg.L⁻¹ como marcador de seleção para o microrganismo recombinante.

Tabela 3.4 - Composição do meio complexo LB-ágar

Componentes	Concentração por litro
Extrato de levedura	10 g
Triptona	5 g
NaCl	5 g
Ágar	15 g

Para preparar o meio complexo LB-ágar os reagentes foram solubilizados em água destilada e autoclavados, por 20 minutos à 121°C, para sua esterilização.

O meio utilizado para preparação dos pré-inóculos dos cultivos da cepa SS e SR foi o meio LB (“Luria-Bertani”), contendo a composição apresentada na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Composição do meio complexo LB

Componentes	Concentração por litro
Extrato de levedura	10 g
Triptona	5 g
NaCl	5 g

Para preparar o meio complexo LB os reagentes foram solubilizados em água destilada e autoclavados, por 20 minutos à 121°C, para sua esterilização.

Todos os cultivos em *shaker* e biorreator foram realizados com meio mínimo M9-modificado, contendo uma única fonte de carbono (ROCHA e FERREIRA, 2002), com a composição descrita na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Composição do meio mínimo M9-modificado

Componentes	Concentração por litro	Solução
Fonte de carbono	10 g	1
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	7,53 g	2
KH ₂ PO ₄	3 g	2
NH ₄ Cl	1 g	2
NaCl	0,5 g	2
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,12 g	3
Tiamina	0,34 g	3
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,015 g	3
Solução de traços de vitaminas	2 mL	3
Solução de traços de minerais	2 mL	3
PPG (30% v/v)	1 mL	4
Ampicilina	50mg	5

Fonte: Adaptado de Rocha e Ferreira (2002)

As fontes de carbono utilizadas nos experimentos foram: glicerol (C₃H₈O₃), glicose (C₆H₁₂O₆) e ácido acético (CH₃COOH). A utilização de cada fonte de carbono variou de acordo com o objetivo do experimento.

As composições das soluções de traços de vitaminas e minerais que compõem o meio mínimo M9-modificado são mostradas nas Tabelas 3.7 e 3.8.

Tabela 3.7 - Composição da solução de traços de vitaminas

Componentes	Concentração por litro
Riboflavina	0,42 g
Ácido pantotênico	5,4 g
Ácido nicotínico	6,1 g
Piridoxina	1,4 g
Biotina	0,06 g
Ácido fólico	0,042 g

Tabela 3.8 - Composição da solução de traços de minerais

Componentes	Concentração por litro
FeCl ₃	27 g
ZnCl ₂	2 g
CoCl ₂	2 g
NaMoO ₄	2 g
CaCl ₂	2 g
CuCl ₂	1 g
H ₃ BO ₃	0,5 g
HCl	100 mL

Para preparar o meio mínimo M9-modificado, a fonte de carbono foi solubilizada em água destilada (solução 1) e esterilizada separadamente das soluções 2 (composta por sais) e 4 (antiespumante - PPG 30 % v/v). Essas três soluções foram autoclavadas, por 20 minutos à 121°C. As soluções 3 e 5 foram esterilizadas por filtração em membrana estéril de PVDF com 22 µm de porosidade (GVS), evitando a degradação dos componentes. A solução 4 só foi utilizada nos cultivos em biorreator e a solução 5 (ampicilina) foi utilizada como marcador de seleção em todos os cultivos com a cepa SR.

3.3 PREPARO DA CULTURA ESTOQUE

A cepa selvagem foi reativada a partir de um criotubo em tubos falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio LB, incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm por 12 horas. Após reativada, a suspensão de células foi transferida com uma alça de platina para placas de Petri contendo meio LB-ágar e incubadas em estufa a 37°C. Após o crescimento das colônias por um período de 24 horas, foi selecionada uma colônia única e ressuspensa em um tubo falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio LB, novamente a 37°C e 200 rpm. Ao atingir a densidade ótica, no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}), de 1,0 (crescimento exponencial), o cultivo foi interrompido, centrifugando todo o caldo. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensa em 5 mL de meio LB e glicerol (para obter uma suspensão com 10% v/v de glicerol). A suspensão foi distribuída em dez criotubos, armazenados em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C para utilização nos experimentos, e três criotubos foram armazenados em

nitrogênio líquido. O mesmo procedimento descrito foi utilizado para o estoque das células recombinantes de *S. typhimurium* LT2.

3.4 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS

3.4.1 Inóculo

A partir do criotubo estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram estriadas placas de Petri com meio LB-ágar. Após 24 horas incubadas a 37°C , foi selecionada uma colônia isolada da cepa SS e transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de meio LB. Assim foi feita a etapa de inóculo, padronizada para todos os cultivos realizados. O Erlenmeyer foi incubado em agitador orbital (*shaker*) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 rpm por cerca de 12 horas, até se atingir uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 2.

O procedimento para a cepa SR foi realizado de maneira análoga ao descrito para a cepa selvagem, acrescido de uma etapa de estriamento em placas de Petri com meio mínimo M9-modificado-ágar incubado a 37°C por 48 horas, logo após a etapa em meio LB-ágar.

3.4.2 Cultivos

A suspensão do inóculo foi transferida para Erlenmeyers de 500 mL contendo cerca de 50 mL de meio M9-modificado, de forma que a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ do cultivo estivesse entre 0,1 e 0,2. As culturas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 rpm até a estabilização da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ em três amostragens consecutivas a cada uma hora. Este procedimento foi realizado para os cultivos A1, A2, A3 e A4. As amostras retiradas foram analisadas quanto à concentração de ácidos orgânicos (acetato, formato, succinato e lactato) e fonte de carbono. As metodologias analíticas empregadas estão descritas no item 3.6.

3.5 CULTIVOS EM BIORREATOR

3.5.1 Pré-inóculo

A partir do criotubo estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram estriadas placas de Petri com meio LB-ágar. Após 24 horas incubadas a 37°C , foi selecionada uma colônia isolada da cepa SS e

transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de meio LB. Assim foi feita a etapa de pré-inóculo, padronizada para todos os cultivos realizados. O Erlenmeyer foi incubado em agitador orbital (*shaker*) a 37 °C e 200 rpm por cerca de 12 horas, até se atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 2,5.

O procedimento para a cepa SR foi realizado de maneira análoga ao descrito para a cepa selvagem, acrescido de uma etapa de estriamento em placas de Petri com meio mínimo M9-modificado-ágar incubado a 37°C por 48 horas, logo após a etapa em meio LB-ágar.

3.5.2 Inóculo

A suspensão do pré-inóculo foi transferida para Erlenmeyers de 1L contendo cerca de 80 e 100 mL de meio M9-modificado (dependendo do cultivo, calculado para completar o volume do reator). Após cerca de 6 horas de incubação em câmara incubadora a 37 °C e 200 rpm, as células em crescimento exponencial foram transferidas para o biorreator de modo que a DO_{600nm} inicial do cultivo estivesse em torno de 0,1 a 0,2. Este procedimento foi realizado para os cultivos com ambas cepas, selvagem e recombinante.

3.5.3 Cultivos em modo de operação batelada

Os cultivos em batelada foram realizados seguindo os passos descritos no item 3.5 utilizando a cepa SR descrita no item 3.1.1 em meio mínimo M9 modificado para as três fontes de carbono já mencionadas (glicose, glicerol e ácido acético).

3.5.3.1 Cultivos em batelada com glicose e glicerol como fonte de carbono

Os cultivos em batelada foram feitos em condições aeróbias utilizando glicose ou glicerol ($\sim 10 \text{ g.L}^{-1}$) como fonte de carbono, em biorreator tipo tanque agitado e aerado, encamisado, com capacidade total de 2,0 L de volume (Applikon), com 1 L de volume de operação, dos quais 900 mL de meio M9-modificado e 100 mL de inóculo.

A temperatura do cultivo foi mantida a 37°C e o pH foi mantido em 7,0, pela adição automática de NH_4OH (5%, v/v) e H_3PO_4 (15%, v/v). A concentração de oxigênio dissolvido (COD) permaneceu acima de 30% da saturação pelo controle da velocidade de

agitação (entre 200 e 900 rpm) e vazão de ar (entre 0,5 e 4L.min⁻¹) controlado por fluxômetro (GFC ALBORG). A composição do gás de saída foi monitorada pelo analisador de gases (Sick / MAIHAK S710) para aquisição automática da fração molar de CO₂, e pelo sensor de oxigênio amperométrico / polarográfico (InPro 6830-12-220 / Mettler Toledo), ambos com aquisição analógica via cFP. O controle e aquisição de dados foi feito pelo software SuperSys_HDCD[®] desenvolvido em LabVIEW[®] (National Instruments) e MATLAB[®] (MathWorks) pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LADABio) do Departamento de Engenharia Química –UFSCar (HORTA et al., 2011; HORTA et al., 2014).

3.5.3.2 Cultivo em batelada com ácido acético como fonte de carbono

No cultivo em batelada realizado utilizando ácido acético como fonte de carbono foi necessário um cultivo preliminar em glicose para alcançar a concentração celular de aproximadamente 2 g.L⁻¹.

Para tanto este cultivo preliminar foi realizado nas mesmas condições descritas no item 3.4.3.1. Após alcançar a concentração celular desejada, o caldo de cultivo foi drenado do reator assepticamente e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 1 L de meio M9-modificado fresco contendo ácido acético (~10 g.L⁻¹) como fonte de carbono. O novo caldo foi transferido para o reator e foi realizado o cultivo em batelada com ácido acético em condições aeróbias, nas mesmas condições descritas no item 3.5.3.1.

3.5.4 Cultivos em modo de operação contínuo

Os cultivos contínuos foram feitos com a cepa selvagem de *S. typhimurium* LT2 em condições aeróbias utilizando glicerol (~10 g.L⁻¹) como fonte de carbono, em biorreator tipo tanque agitado, encamisado com capacidade total de 2,0 L de volume (Applikon), com 800 mL de volume de operação.

Inicialmente foi realizado um cultivo em batelada, após os passos descritos nos itens 3.5.1 e 3.5.2, até alcançar uma concentração de células de aproximadamente 1 g.L⁻¹, e então deu-se início à alimentação.

A temperatura do cultivo foi mantida a 37°C e o pH foi mantido em 7,0, pela adição automática de NH₄OH (5%, v/v) e H₃PO₄ (15%, v/v). A concentração de oxigênio

dissolvido (COD) permaneceu acima de 30% da saturação, através do controle da velocidade de agitação foi de 800 rpm e da vazão de ar ($0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) e O_2 ($0,07 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) através de um fluxômetro (GFC ALBORG) e de um rotâmetro, respectivamente. A composição do gás de saída foi monitorada pelo analisador de gases (Sick / MAIHAK S710) para aquisição automática da fração molar de CO_2 , e pelo sensor de oxigênio amperométrico / polarográfico (InPro 6830-12-220 / Mettler Toledo), ambos com aquisição analógica via cFP. O controle e aquisição de dados foi todo feito pelo software SuperSys_HDCD[®] desenvolvido em LabVIEW[®] (National Instruments) e MATLAB[®] (MathWorks) pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LADABio) do Departamento de Engenharia Química –UFSCar (HORTA et al, 2011; HORTA et al., 2014).

A alimentação foi realizada pelo bombeamento (bomba ISMATEC ISM931C) do meio M9-modificado com glicerol ($\sim 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como única fonte de carbono e a saída pela retirada (bomba ISMATEC ISM444) do excesso de caldo de cultivo mantendo o volume do reator constante. Ambas, entrada e saída, foram aferidas ao longo do cultivo, medindo a massa de entrada e de saída de forma a garantir a vazão constante, necessária para a taxa de diluição desejada.

Considerou-se que o estado estacionário foi atingido após as medidas da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ e das concentrações de oxigênio dissolvido e gás carbônico permanecerem constantes por três tempos de residência.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

Ao longo dos cultivos foram retiradas amostras para análises de crescimento celular, quantificação do consumo de substrato e produção de metabólitos extracelulares.

3.5.1 Determinação da concentração celular

A determinação do crescimento celular foi feita pela medida da densidade ótica do caldo de cultivo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), bem como por medidas de massa seca.

As medidas de massa seca foram feitas através da filtração à vácuo de um volume conhecido de caldo de cultivo em membrana de nitrocelulose com poro de $0,22 \mu\text{m}$ (UNIFIL),

previamente pesadas. A membrana com a biomassa foi submetida à secagem por 24 horas em estufa a 90 °C e pesada posteriormente. A diferença entre as massas da membrana antes e após o procedimento de filtração e secagem foi utilizada para o cálculo da massa seca (gDCW). A concentração celular (C_X em gDCW.L⁻¹) foi estimada a partir da correlação linear gerada pelas medidas de DO600nm e massa seca obtidas em todos os experimentos realizados neste trabalho (equação 3.1).

$$C_X = (0,45 \pm 0,01) \cdot DO_{nm} \quad (3.1)$$

3.5.2 Determinação da concentração de substrato e ácidos orgânicos

Os sobrenadantes recolhidos ao longo dos cultivos de *S. typhimurium* foram analisados por HPLC (Waters Corp. system) a fim de avaliar o consumo da fonte de carbono e secreção de ácidos orgânicos. Para isto, utilizou-se uma coluna de troca iônica (coluna Aminex HPX-87H - Bio-Rad), a 60 °C, com H₂SO₄ (5 mM) como fase móvel e vazão de 0,6 mL.min⁻¹.

A produção de ácidos orgânicos (acético, fórmico, succínico e láctico presentes no kit de padrões de ácidos orgânicos da Sigma-Aldrich kit - Cat. 47264 Supelco) foi avaliada pelo detector de UV (Waters 486) a 210 nm de comprimento de onda. Todas as fontes de carbono, utilizadas nos cultivos foram analisadas pelo detector de índice de refração diferencial (Waters 410).

A concentração de glicose e glicerol também foi determinada por métodos enzimáticos (GLICOSE-PP - ANALISA e TRIGLICÉRIDES-PP - ANALISA).

3.6 PROCEDIMENTO DE CÁLCULOS

No trabalho desenvolvido foram realizados cultivos em biorreator para diferentes modos de operação. Estes cultivos podem ser considerados isotérmicos e homogêneos, com pH constante, cujo único substrato limitante ao crescimento celular foi a fonte de carbono utilizada.

Os fluxos de consumo de substrato, e de produção de biomassa, O₂, CO₂ e ácidos orgânicos, foram calculados a partir dos dados obtidos da concentração celular (C_X), fração molar de O₂ e CO₂, concentração da fonte de carbono e de ácidos orgânicos. O cálculo dos fluxos (equação 3.2) foi baseado nas velocidades de consumo de substrato ou formação de

produto, obtidas pelo balanço material para cada componente, variando segundo o modo de operação do biorreator (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

$$J_i = \frac{r_i}{C_X} \quad (3.2)$$

onde:

J_i é o fluxo de consumo ou produção do componente i (substrato, produto, CO_2 e O_2), em $\text{mmol.g}_{\text{DCW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; r_i é a velocidade de consumo ou produção do componente i , em $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; e C_X é a concentração celular, em $\text{g}_{\text{DCW}}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

Outra maneira de calcular os fluxos é a partir de $\mu_{\text{máx}}$ e coeficientes de conversão $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ (SAUER, 1999).

Para experimentos em batelada na fase exponencial de crescimento μ apresenta valor constante e igual a $\mu_{\text{máx}}$, sendo válidas as equações 3.3; 3.4 e 3.5 para o cálculo do fluxos de biomassa, substrato e produto.

$$J_X = \mu_{\text{máx}} \quad (3.3)$$

J_X é o fluxo de produção de células, em $\text{mmol.g}_{\text{DCW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $\mu_{\text{máx}}$ é a velocidade específica máxima de crescimento em h^{-1} .

$$J_S = \frac{J_X}{Y_{X/S}} \quad (3.4)$$

J_S é o fluxo de consumo de substrato, em $\text{mmol.g}_{\text{DCW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $Y_{X/S}$ é o coeficiente de conversão de substrato em células.

$$J_P = Y_{P/X} \cdot J_X \quad (3.5)$$

J_P é o fluxo de produção de produto em $\text{mmol.g}_{\text{DCW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $Y_{P/X}$ é a razão do coeficiente de conversão de substrato em produto pela conversão de substrato em células.

3.6.1 Balanço material

O balanço de material geral para um componente i é dado pela equação 3.6:

$$\frac{F}{V} \cdot m_{iS} = \frac{F}{V} \cdot m_{iE} \pm r_i \cdot V - \frac{d(m_i)}{dt} \quad (3.6)$$

onde:

F é a vazão volumétrica da alimentação, em $L \cdot h^{-1}$; V é o volume do reator, em L ; m_{iS} é a massa do componente i na corrente de saída, em g_{DCW} ; m_{iE} é a massa do componente i na entrada; r_i é a velocidade de consumo ou produção do componente i .

A partir do balanço de material geral (equação 3.6) é possível obter as expressões para cada componente em cada modo de operação (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998), como mostrado na tabela 3.6. A partir dessas expressões é possível o cálculo dos fluxos (equação 3.2).

Tabela 3.9 - Balanço material para diferentes modos de operação do biorreator

Balanço Material	Modo de operação	
	Batelada	Contínuo
Células (X)	$r_X = \frac{d(m_X)}{dt} \cdot \frac{1}{V}$	$r_X = D \cdot C_X$
Substrato (S)	$r_S = -\frac{d(m_S)}{dt} \cdot \frac{1}{V}$	$r_S = D \cdot (C_{SE} - C_{SS})$
Produto (P)	$r_P = \frac{d(m_P)}{dt} \cdot \frac{1}{V}$	$r_P = D \cdot C_{PS}$

3.6.2 Balanço de carbono

O balanço de carbono foi realizado para verificar a consistência dos dados obtidos de concentração celular, consumo de substrato, produção de ácidos orgânicos e CO_2 .

Nos cultivos em batelada essa recuperação de carbono foi feita para diferentes tempos do cultivo, onde a somatória do número de C-mols de carbono no tempo inicial ($t=0$) é equivalente a $C_{rec}=100\%$. Para os outros tempos a recuperação de carbono (C_{rec}) é dada pela razão entre a soma de C-mols de carbono no tempo i e no tempo 0 (equações 3.7 e 3.8).

$$C_{rec}^{t=0} = 100. \left(\left(\frac{m_S}{MM_S} \right) + \left(\frac{m_X}{MM_X} \right) + \left(\frac{m_P}{MM_P} \right) + n_{CO_2} \right) = 100\% \quad (3.7)$$

$$C_{rec}^{t=i} = \frac{100. \left(\left(\frac{m_S}{MM_S} \right) + \left(\frac{m_X}{MM_X} \right) + \left(\frac{m_P}{MM_P} \right) + n_{CO_2} \right)}{C_{rec}^{t=0}} \quad (3.8)$$

onde:

n_{CO_2} é a composição molar de CO_2 , em mols no tempo i ; m_j é a massa do componente j no tempo i , em g; e MM_j é a massa molar da fórmula elementar do componente j no tempo i , em $g.mol^{-1}$ (para a composição elementar da biomassa foi utilizada a fórmula para *E. coli* - $CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24}$ - BNID 101800, MILO et al., 2010).

Para os cultivos contínuos a recuperação de carbono foi calculada para os dados obtidos no estado estacionário, onde a vazão total molar (C-mols. h^{-1}) na entrada é igual a vazão total da saída (equação 3.9).

$$C_{rec} = \frac{100. \left(\left(\frac{F.C_S}{MM_S} \right) + \left(\frac{F.C_X}{MM_X} \right) + \left(\frac{F.C_P}{MM_P} \right) + \dot{n}_{CO_2} \right)}{\left(\frac{F.C_S^F}{MM_S} \right)} \quad (3.9)$$

onde:

F é a vazão volumétrica de alimentação, em $L.h^{-1}$; \dot{n}_{CO_2} é a vazão molar de CO_2 , em $mols.h^{-1}$; C_i é a massa do componente i , em $g.L^{-1}$; C_S^F é a concentração de substrato no meio de alimentação, em $g.L^{-1}$; e MM_i é a massa molar da fórmula elementar do componente i , em $g.mol^{-1}$.

3.6.3 Determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ)

A velocidade específica de crescimento celular é definida pela equação 3.10.

$$\mu. C_X.V = F. C_{X_S} - F. C_{X_0} + \frac{d(C_X.V)}{dt} \quad (3.10)$$

Como não houve alimentação de biomassa nos cultivos realizados, resulta na equação 3.11.

$$\mu \cdot C_X \cdot V = F \cdot C_{X_S} + \frac{d(C_X \cdot V)}{dt} \quad (3.11)$$

Utilizando a regra do produto para resolver a derivação, o cálculo de μ para os cultivos é dado pela equação 3.12.

$$\mu = F \cdot \frac{C_{X_S}}{V \cdot C_X} + \frac{1}{C_X} \cdot \frac{dC_X}{dt} + \frac{1}{V} \cdot \frac{d(V)}{dt} \quad (3.12)$$

Nos cultivos contínuos a concentração celular no biorreator é constante quando se atinge o estado estacionário, e é igual a concentração de células no efluente do reator. Portanto, a velocidade de crescimento celular pode ser calculada pela equação 3.13.

$$\mu = \frac{F}{V} = D = \frac{1}{\tau} \quad (3.13)$$

onde:

D é a taxa de diluição (h^{-1}); e τ é o tempo de residência (h)

Para os cultivos em batelada, considerando o volume constante, a equação 3.12 ficaria

$$\mu = \frac{1}{C_X} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad (3.14)$$

3.6.4 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$)

Nos experimentos em batelada é possível calcular, na fase exponencial do crescimento celular, a velocidade específica de crescimento, pois ela é máxima e constante. A equação 3.14 resulta na equação 3.15.

$$\mu = \mu_{\text{máx}} = \frac{1}{C_X} \cdot \frac{dC_X}{dt} \quad (3.15)$$

Integrando a equação 3.15 é possível obter a velocidade específica máxima de crescimento através da equação 3.16.

$$\mu_{\text{máx}} \cdot t = \ln \frac{C_X}{C_{X_i}} \quad (3.16)$$

onde:

C_{X_i} é a concentração no início da fase exponencial; e t é o tempo de cultivo da fase exponencial

A equação 3.16 é linear permitindo o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ graficamente com auxílio de um *software* obtendo coeficiente da reta do gráfico t versus $\ln(C_X/C_{X_i})$, ou então, através de métodos numéricos, como o método dos mínimos quadrados.

3.6.5 Determinação dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$)

Para obter os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foram utilizados dados da fase exponencial dos cultivos em batelada, conforme as equações 3.17 e 3.18.

$$Y_{X/S} = \frac{(C_X - C_{X_0})}{(C_{S_0} - C_S)} \quad (3.17)$$

$$Y_{P/S} = \frac{C_P}{(C_{S_0} - C_S)} \quad (3.18)$$

A partir dos dados de consumo da fonte de carbono e da produção de biomassa e ácido acético foi possível calcular o $Y_{X/S}$ e o $Y_{P/S}$ graficamente com auxílio de um *software* obtendo coeficiente da reta do gráfico $(C_X - C_{X_0})$ versus $(C_{S_0} - C_S)$ e C_P versus $(C_{S_0} - C_S)$, respectivamente, ou então, através de métodos numéricos, como o método dos mínimos quadrados.

3.7. SIMULAÇÕES NO OPTFLUX

Os fluxos metabólicos para a cepa SS foram simulados utilizando o software livre Optflux 3.3.0, desenvolvido pelo grupo de pesquisa coordenado pelos professores Isabel Rocha e Eugenio Ferreira da Universidade do Minho/Portugal, juntamente com a empresa SilicoLife (ROCHA et al, 2010).

O modelo STM_v1.0 utiliza uma equação de biomassa derivada de dados experimentais da composição das células de *S. typhimurium* para os componentes de membrana, componentes da parede celular e compartimentos solúveis extraídos do modelo iRR1083 (RAGUNATHAN et al, 2009), juntamente com a composição e contribuição de íons iguais aos da *E. coli* K-12 MG1655 no modelo iAF1260 (FEIST et al, 2007). O modelo STM_v1.0_nova_biomassa possui modificações na equação de biomassa do modelo STM_v1.0 adicionando a composição e contribuição de proteínas, nucleotídeos e glicogênio determinados para células de *S. typhimurium* por Santos e Rocha (2015).

Na Tabela 3.10 são apresentadas as condições utilizadas nas simulações realizadas no presente trabalho.

Tabela 3.10 - Resumo das condições das simulações no Optflux

Modelo metabólico	STM_v1.0 (THIELE et al, 2011)
Dados fornecidos	Fluxos calculados de O ₂ e substrato a partir dos dados experimentais
Dados obtidos	Fluxo de biomassa, CO ₂ e produto
Variáveis manipuladas	ATP de manutenção

As estratégias e objetivos das simulações em comparação com os dados dos cultivos estão descritas na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Estratégias e objetivos das simulações no Optflux

Cultivos	Estratégia	Objetivo
Contínuos (cepa SS)	Manipulando o valor de ATP de manutenção, aproximar o fluxo de biomassa, CO ₂ e acetato dos valores obtidos experimentalmente	Comparar os dados simulados com os dados experimentais, para verificar a capacidade de previsão do modelo

O valor de ATP de manutenção em $\text{mmol}_{\text{ATP.gDWC}^{-1}.\text{h}^{-1}}$ é um parâmetro que foi manipulado para aproximação do modelo aos dados experimentais, no entanto esse valor não exprime o valor do coeficiente de manutenção (m_s) em $\text{mmol}_{\text{substrato.gDWC}^{-1}.\text{h}^{-1}}$.

Empregou-se nas simulações o método pFBA (*parsimonious Flux Balance Analysis*), descrito por Lewis e colaboradores (2010), para maximização da formação de biomassa (função objetivo).

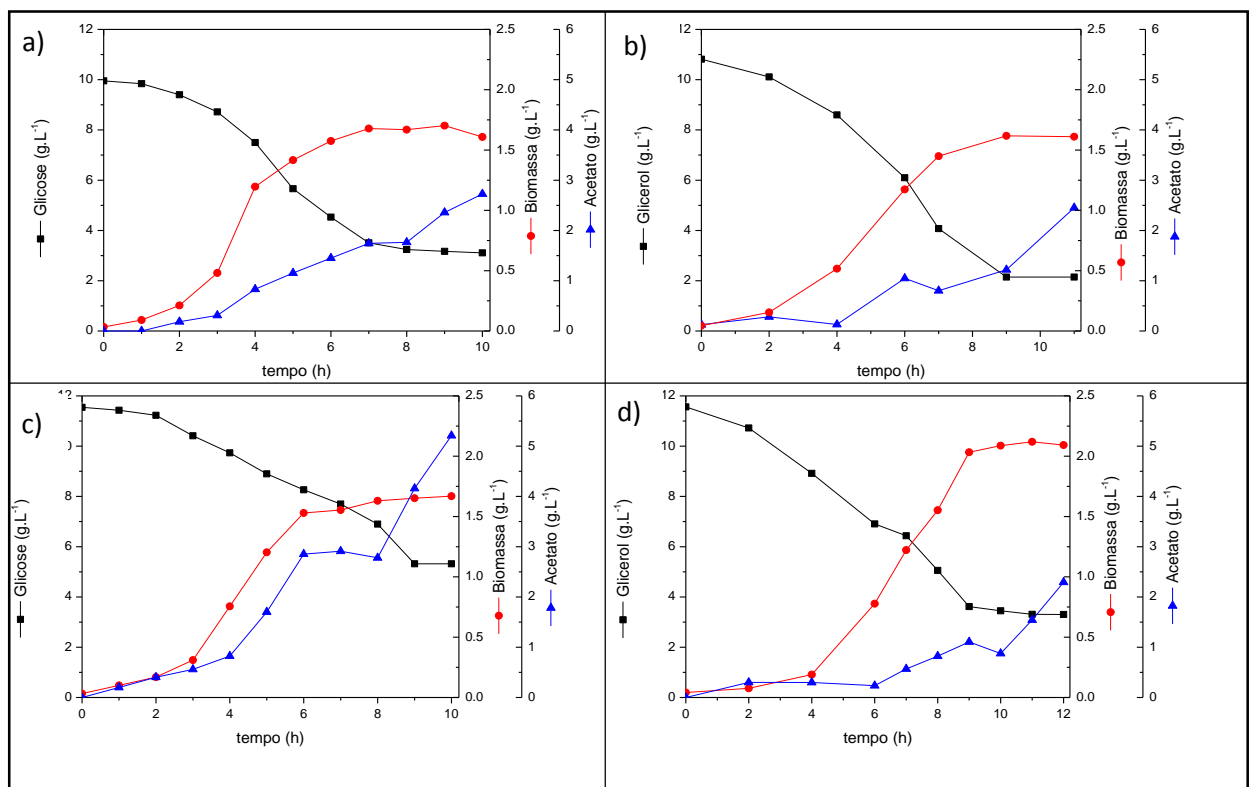
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS

Estes experimentos foram realizados para obtenção de resultados preliminares sobre a cinética de crescimento da cepa SR, e comparação com a cepa SS. Para isso foram realizados cultivos em Erlenmeyers de 500 mL, seguindo os procedimentos descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2 e utilizando glicerol e glicose como fontes de carbono. Os cultivos foram conduzidos até a concentração celular se manter constante de acordo com a leitura da densidade ótica (DO_{600nm}), indicando o final da fase exponencial e início da fase estacionária.

A Figura 4.1 mostra os resultados obtidos nos quatro cultivos em frascos agitados, realizados com as cepas SS e SR, nas duas fontes de carbono (glicose e glicerol).

Figura 4.1 - Consumo de substrato, produção de biomassa e acetato nos cultivos realizados em frascos agitados. a) Cepa SS em glicose b) Cepa SS em glicerol c) Cepa SR em glicose d) Cepa SR em glicerol



Observando os perfis de crescimento mostrados na Figura 4.1 é possível perceber que, apesar do crescimento celular se estabilizar, entrando em fase estacionária, em nenhum dos cultivos houve o consumo total do substrato. Em contrapartida, em todas as

condições estudadas houve acúmulo de acetato, que possui caráter inibitório ao crescimento, sendo a provável causa da desaceleração do crescimento. Observou-se ainda que, nos cultivos com glicerol como fonte de carbono a produção de acetato foi mais baixa e, para o caso da cepa recombinante, a produção de acetato foi cerca de 50% menor do que em meio formulado com glicose.

Na tabela 4.1 são apresentados alguns parâmetros cinéticos dos experimentos realizados, com os desvios padrões calculados para os parâmetros.

Tabela 4.1 - Resultados obtidos nos cultivos em frascos agitados com as cepas SS e SR cultivadas em meio definido com glicose ou glicerol

Cepa	SS		SR	
	Glicose	Glicerol	Glicose	Glicerol
Tempo total de cultivo (h)	10	11	10	12
Consumo total de substrato (g.L ⁻¹)	6,7	8,7	6,2	8,3
Produtividade celular máxima (g _{DWC} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,17	0,14	0,17	0,17
C _{Xmáx} (g _{DWC} .L ⁻¹)	1,70	1,61	1,67	2,09
C _{acetatomáx} (g _{acetato} .L ⁻¹)	2,72	2,45	5,21	2,29
μ _{máx} (h ⁻¹) *	0,88±0,06	0,61±0,04	0,74±0,03	0,65±0,03
Y _{X/S} (g _{DWC} .g _{substrato} ⁻¹) *	0,46±0,02	0,25±0,04	0,45±0,02	0,29±0,03
Y _{P/S} (g _{acetato} .g _{substrato} ⁻¹) *	0,46±0,03	0,22±0,05	0,40±0,03	0,19±0,01

* dados calculados na fase exponencial de crescimento

Para ambas as cepas o consumo de substrato foi semelhante, e suas velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{máx}) foram superiores em glicose como fonte de carbono, cerca de 40% na cepa selvagem e 15% na cepa recombinante.

Analisando o coeficiente de rendimento em produto (Y_{P/S}) observa-se que houve um menor direcionamento de substrato para a formação de acetato para ambas as cepas em glicerol. Este resultado confirma o que foi observado por Sargo (2015) em cultivos com a cepa

selvagem em meio mínimo formulado com glicerol, onde o acúmulo de acetato foi duas vezes menor quando comparado em meio formulado com glicose.

As produtividades celulares foram parecidas para ambas as cepas nas duas fontes de carbono.

Estes estudos prévios forneceram dados cinéticos da cepa recombinante que serviram como base para o planejamento de sua caracterização em biorreator, em condições controladas de pH e aeração.

4.2 CULTIVOS EM BIORREATOR EM MODO BATELADA PARA DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Sargo (2015) realizou cultivos em biorreator para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol, xilose e ácido acético) no crescimento de células de *S. typhimurium* LT2. Então, para avaliar a cepa SR, foi escolhido realizar cultivos em biorreator nas mesmas condições para três fontes de carbono distintas (glicose, glicerol e ácido acético) possibilitando a comparação das linhagens quanto à produção e assimilação de acetato.

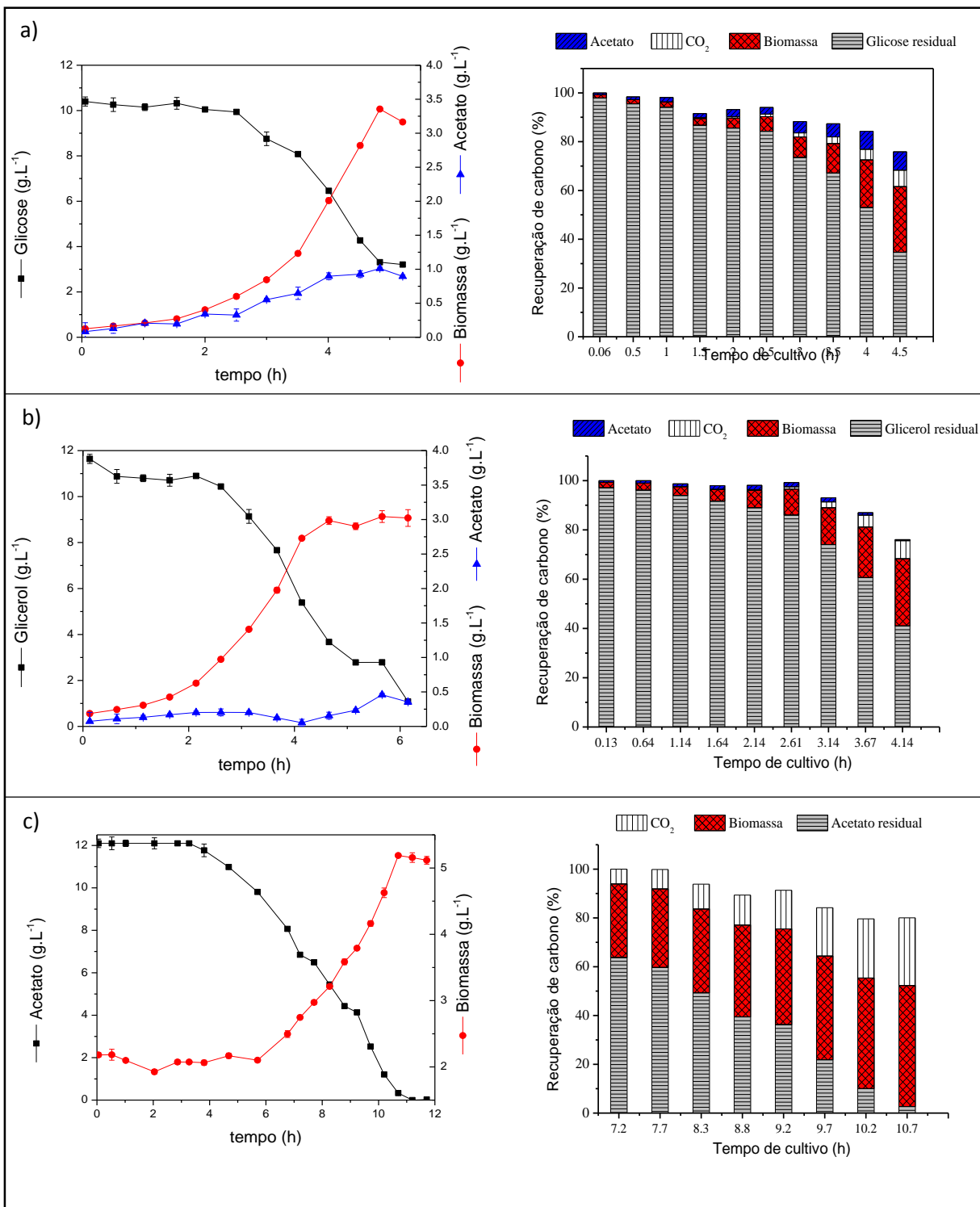
Na figura 4.2 são mostrados os perfis de consumo de substrato e produção de biomassa e acetato obtidos nos cultivos em biorreator realizados. Glicerol e acetato foram totalmente consumidos pelas células (Figuras 4.2b e c) em 6 e 10 h de cultivo, respectivamente. O cultivo em glicose teve duração de cerca de 5 horas, quando se observou a estabilização do crescimento (Figura 4.2a). A concentração de biomassa final atingida nos cultivos com glicerol e glicose foi similar. Já a formação de acetato foi 50 % menor no cultivo tendo glicerol como substrato em comparação com a observada com a glicose.

A partir dos perfis de crescimento é possível observar que a cepa SR cresceu de maneira similar ao relatado nos cultivos de Sargo (2015) com a cepa SS (Tabela 4.2), nas três fontes de carbono utilizadas, alcançando concentrações celulares de aproximadamente $3 \text{ g}_{\text{DWC}} \cdot \text{L}^{-1}$.

Foi observada uma fase lag de cerca de 6 horas no cultivo em acetato como fonte de carbono, mesmo comportamento observado nos cultivos com a cepa SS que apresentou uma fase lag de cerca de 13 horas (SARGO, 2015). Este comportamento pode relacionado à repressão catabólica causada pela glicose, uma vez que o inóculo para o cultivo em acetato foi obtido em glicose como fonte de carbono, devido ao lento crescimento do microrganismo em acetato. Em presença de glicose como fonte de carbono as vias de assimilação de outras fontes

de carbono têm a expressão de alguns genes e operons reprimidas, causando a chamada repressão catabólica (BORIRAK, BEKKER, HELLINGWERF, 2014), resultando em um período de adaptação do microrganismo, caracterizado também pelo consumo de substrato sem crescimento, observado na Figura 4.2 no cultivo em acetato.

Figura 4.2 - Consumo de substrato, produção de biomassa, acetato e recuperação de carbono nos cultivos em batelada com a cepa SR em diferentes fontes de carbono: a) Glicose b) Glicerol c) Acetato.



A recuperação de carbono foi de 80 a 102% para os três cultivos, para a fase exponencial de crescimento celular. Nas análises do sobrenadante por cromatografia líquida, foram identificados os metabólitos formato e lactato. No entanto, a concentração desses ácidos orgânicos atingiu, no máximo, 0,2 g/l, não contribuindo significativamente para a recuperação de carbono. A diminuição na recuperação de carbono no final da fase exponencial pode estar relacionada à liberação de polissacarídeos solúveis no meio, comportamento já observado em cultivos de *E. coli* recombinante (SILVA, 2015).

A Tabela 4.2 mostra os principais resultados dos cultivos em batelada com a cepa SR em comparação com os cultivos de Sargo (2015) com a cepa SS em termos de parâmetros de desempenho como rendimento em produto, em biomassa, consumo de substrato e produtividade de células.

Tabela 4.2 - Comparação dos resultados obtidos nos cultivos em batelada com a cepa SR com os dados obtidos por Sargo (2015) com a cepa SS

Fonte de carbono	Glicose		Glicerol		Ácido acético	
Cepa	SS*	SR	SS*	SR	SS*	SR
Tempo total de cultivo (h)	6	5,21	7,95	6,15	19,25	11,71
Consumo total de substrato (g.L ⁻¹)	5,2±0,3	8,5±0,2	9,6±0,1	10,6±0,1	5,5±0,7	12,1±0,5
C _{Xmáx} (gDCW.L ⁻¹)	2,35±0,03	3,36±0,03	2,79±0,03	3,02±0,03	3,30±0,03	5,12±0,03
Produtividade celular máxima (gDCW.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,39±0,03	0,64±0,03	0,48±0,03	0,49±0,03	0,08±0,03	0,25±0,03
C _{acetatomáx} (gacetato.L ⁻¹)	2,2±0,1	1,01±0,03	0,92±0,07	0,46±0,05	-	-
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,65±0,06	0,79±0,01	0,69±0,01	0,74±0,02	0,13±0,01	0,18±0,01
Y _{X/S} (gDCW.g _{substrato} ⁻¹)	0,41±0,01	0,43±0,02	0,57±0,06	0,39±0,03	0,31±0,09	0,32±0,01
Y _{P/S} (gacetato.g _{substrato} ⁻¹)	0,54±0,05	0,16±0,01	0,02±0,01	0,004±0,001	-	-

*Fonte: Sargo (2015)

Os cultivos em glicose e glicerol com a cepa SR apresentaram uma produção de acetato cerca de 50% menor quando comparados com os dados obtidos por Sargo (2015) com a cepa SS. Este resultado também contrasta com o obtido nos cultivos em *shaker*, onde a linhagem recombinante, em meio formulado com glicose, produziu mais acetato que a cepa selvagem. Analisando as condições de cultivo, é provável que o resultado em *shaker* tenha sido influenciado pelas limitações de agitação e aeração, bem como pela ausência de controle do pH, fatores estressantes para as células que podem resultar num maior acúmulo de metabólitos, que não são observados em biorreator, onde todas essas condições foram controladas.

Ainda comparando os resultados apresentados na Tabela 4.2, nota-se que a produtividade celular foi semelhante nos cultivos em glicerol com ambas cepas. No entanto, foi cerca de 40% maior no cultivo da recombinante em glicose, resultado provavelmente relacionado ao fato do acúmulo de acetato ter sido duas vezes menor para a recombinante, resultando numa menor inibição deste metabólito sobre o crescimento. Esse aumento de produtividade não foi evidenciado para a cepa recombinante em glicerol, provavelmente por esta ser uma fonte de carbono que já propicia um menor acúmulo de acetato, de forma que a super-expressão da enzima ACS não se torna tão vantajosa.

Analisando os coeficientes de rendimento $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, percebe-se que o direcionamento da fonte de carbono para a formação de células foi muito semelhante para as duas cepas, exceto para a cepa selvagem em glicerol, onde o valor de $Y_{X/S}$ foi cerca de 45% maior que para a recombinante. No entanto o direcionamento de carbono para a produção de acetato foi cerca de 3 vezes menor na cepa recombinante em glicose.

Este resultado promissor com a glicose como fonte de carbono usando a cepa recombinante de SR confirma ser válido para *Salmonella* o observado em *E. coli* por Lin e colaboradores (2006) onde a super-expressão da enzima ACS levou à melhor reassimilação do acetato em meio mínimo com glicose como fonte de carbono. Estudos recentes indicam que a enzima ACS tem um papel fundamental no metabolismo *overflow*: essa enzima tem sua expressão altamente regulada e, em cultivos com glicose, é reprimida na fase exponencial de crescimento por repressão catabólica. Como essa é uma importante via de assimilação de acetato, na fase de crescimento com glicose o acetato produzido é acumulado. Em seguida, na fase estacionária, a síntese da ACS é induzida para que a célula passe a consumir o acetato como fonte de carbono (VALGEPEA et al, 2010).

O menor acúmulo de acetato nos cultivos com glicerol também pode estar relacionado ao fato do glicerol não apresentar repressão catabólica para o acetato (como pode

ser observado nos cultivos contínuos em glicerol, na Figura 4.3, onde há o consumo simultâneo de glicerol e acetato) então a expressão da enzima ACS não é reprimida na fase de crescimento exponencial (EPPLER et al, 2002; BETTENBROCK et al, 2006), e dessa forma, pode haver menor ou nenhum acúmulo de acetato no meio, como observado para a linhagem de *E. coli* W, que é capaz de crescer em sacarose sem acumular acetato (BERNAL, CASTAÑO-CEREZO E CÁNOVAS, 2016).

Outra hipótese provável, já observada para *E. coli*, está relacionada ao rendimento energético do glicerol, que por ser uma fonte pobre de energia, gera uma condição de crescimento estressante para a célula, alterando a transcrição dos genes relacionados a reassimilação de acetato, redirecionando o metabolismo e propiciando o consumo de outras fontes de carbono como o acetato (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al, 2012).

No cultivo realizado para avaliar a assimilação do acetato pela cepa SR, em comparação aos cultivos de Sargo (2015) com a cepa SS, o consumo total de acetato foi duas vezes maior e em um tempo de cultivo duas vezes menor na cepa recombinante. Isso evidencia uma melhor assimilação de acetato pelas células recombinantes.

Os resultados mostram que a cepa SR pode ser uma alternativa viável para contornar o problema do acúmulo de acetato, tendo em vista que com apenas uma modificação genética obteve-se uma redução expressiva da produção de acetato sem comprometer a formação de biomassa.

A Tabela 4.3 apresenta os fluxos calculados a partir dos dados experimentais para os cultivos com a cepa SR em comparação com os fluxos obtidos nos cultivos de Sargo (2015) com a cepa SS.

Os fluxos de produção de acetato para a cepa SR foram cerca de 2 vezes menor que os fluxos para a cepa SS nos meios formulados com glicose e glicerol, confirmando o menor acúmulo já observado. Nos cultivos com acetato como fonte de carbono o fluxo de consumo 40% maior da cepa SR evidencia essa melhor assimilação.

Tabela 4.3 - Comparação dos fluxos obtidos nos cultivos em batelada com a cepa SR com os dados obtidos por Sargo (2015) com a cepa SS

Fonte de carbono	Glicose		Glicerol		Ácido acético	
Cepa	SS*	SR	SS*	SR	SS*	SR
Fluxo de consumo de substrato ($\text{mmol}_{\text{substrato}} \cdot \text{g}_{\text{DWC}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	9,4±0,5	10,1±0,3	18,50±0,5	20,5±0,4	6,4±0,4	9,4±0,2
Fluxo de produção de subproduto ($\text{mmol}_{\text{acetato}} \cdot \text{g}_{\text{DWC}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	11,9±0,3	4,5±0,4	0,44±0,05	0,18±0,04	-	-
Fluxo de produção de CO ₂ ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{g}_{\text{DWC}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	10,50±0,01	10,00±0,02	14,15±0,03	11,60±0,03	4,52	5,80

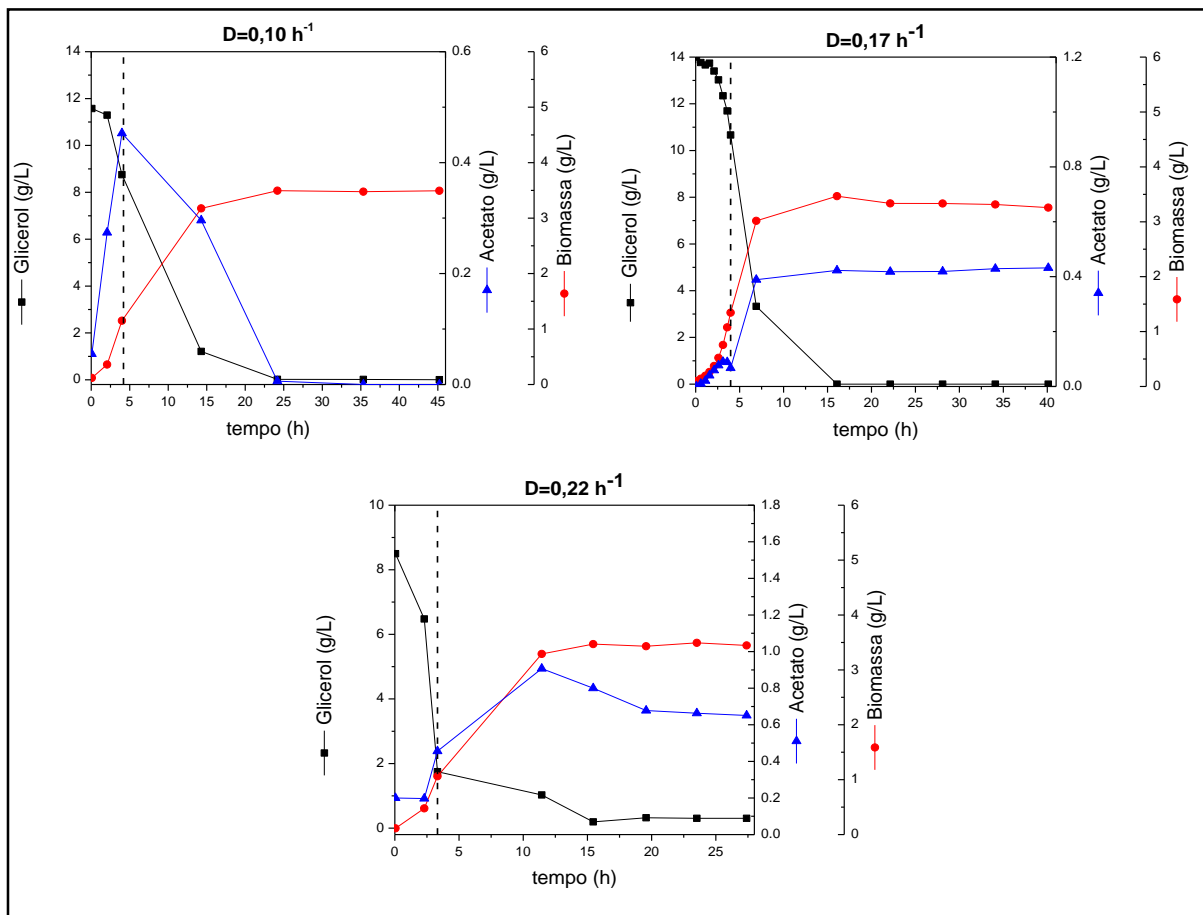
4.3 CULTIVOS EM BIORREATOR EM MODO CONTÍNUO UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

Para todas as condições estudadas nos cultivos contínuos de *S. typhimurium* LT2 realizados por Sargo (2015) em meio formulado com glicose, mesmo para baixas velocidades específicas de crescimento, houve acúmulo de acetato. Tendo em vista estes resultados, foi proposta no presente trabalho a avaliação do glicerol como fonte de carbono, investigando-se a influência da velocidade específica de crescimento (taxa de diluição) sobre o acúmulo de acetato para essa fonte de carbono alternativa.

Uma vez determinada uma taxa de diluição onde não há inibição, este conhecimento pode ser empregado no controle da vazão de alimentação em cultivos em batelada alimentada para a obtenção de alta densidade celular. Além disso, os dados obtidos nos cultivos contínuos são importantes para a validação e aprimoramento do modelo metabólico para esta fonte de carbono.

A Figura 4.3 apresenta os dados de consumo de substrato, produção de biomassa e acetato para os cultivos contínuos com a cepa SS em meio formulado com glicerol. As concentrações se mantiveram constantes por três tempos de residência confirmando o estado estacionário. A concentração residual de glicerol no estado estacionário foi de 0,3 g.L⁻¹ observada apenas para a taxa de diluição de 0,22 h⁻¹. Já a concentração de biomassa no estado estacionário foi de aproximadamente 3,5 g.L⁻¹ para as três taxas de diluição investigadas. E, como esperado, a concentração de acetato passou de 0,4 para 0,6 g.L⁻¹ com o aumento da taxa de diluição de 0,17 para 0,22 h⁻¹. A taxa de diluição de 0,1 h⁻¹ apresentou um resultado interessante, uma vez que nesta condição não se observou produção de acetato.

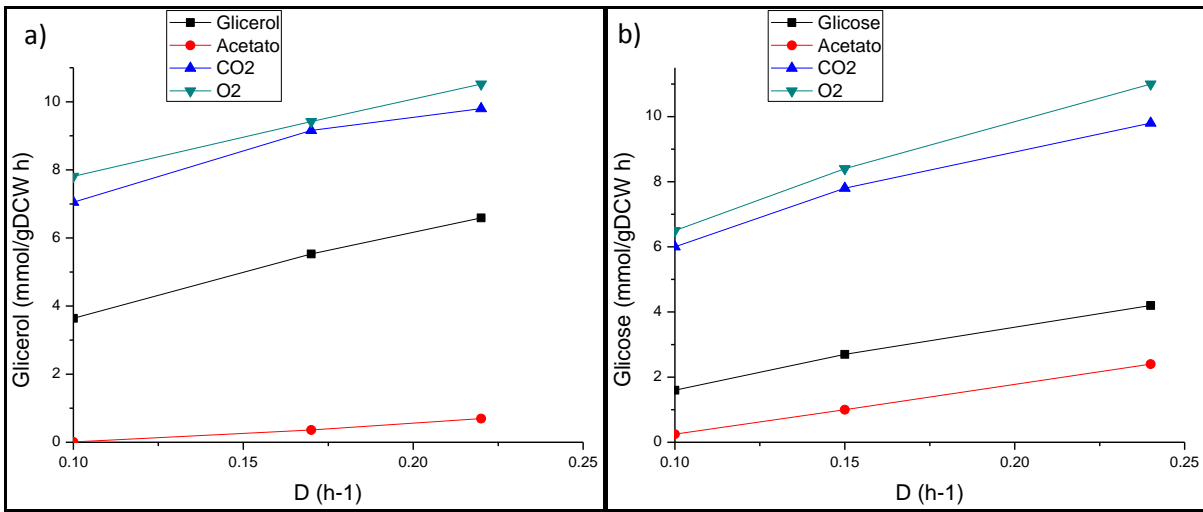
Figura 4.3 - Consumo de glicerol, produção de acetato e produção de biomassa nos cultivos contínuos



A partir dos dados obtidos nos cultivos contínuos, foram calculados os fluxos de glicerol, acetato, CO₂ e O₂ para as taxas de diluição de 0,10, 0,17 e 0,22 h⁻¹, mostrados na Figura 4.4. Na mesma figura são ainda mostrados os valores correspondentes obtidos por Sargo (2015) nos quimiostatos realizados com glicose.

A comparação entre as Figuras 4.5 (a) e (b) mostra ainda que, para qualquer taxa de diluição investigada, a produção de acetato com glicerol foi cerca de 60% menor do que com glicose. Esse resultado é consistente com os maiores fluxos de CO₂ observados nos quimiostatos conduzidos com glicerol. Embora o fluxo de assimilação de glicerol pareça maior que o de glicose em todas as taxas de diluição, em C-mmol eles seriam praticamente iguais.

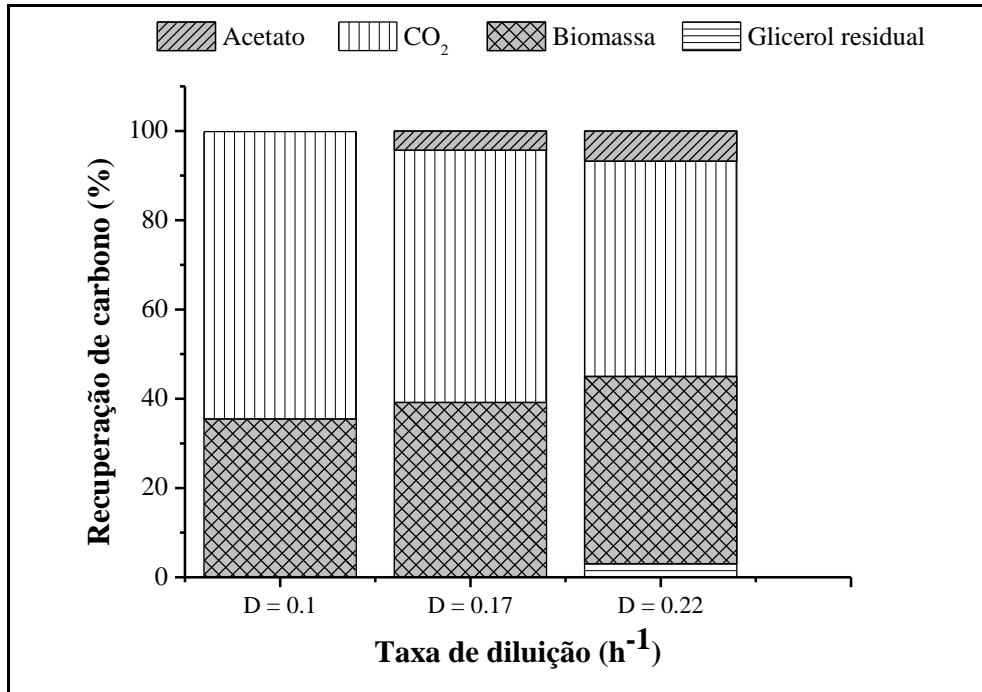
Figura 4.4 - Fluxo de glicerol, acetato, CO₂ e O₂ dos cultivos contínuos com a cepa SS em glicerol (a) e glicose* (b)



*realizado por Sargo (2015)

A recuperação de carbono foi de 100 a 102% para as três taxas de diluição, o que comprova a consistência dos dados experimentais obtidos, como mostrado na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Recuperação de carbono nos cultivos contínuos



4.3.1 Fluxos estimados a partir das simulações do modelo metabólico para *S. typhimurium* selvagem

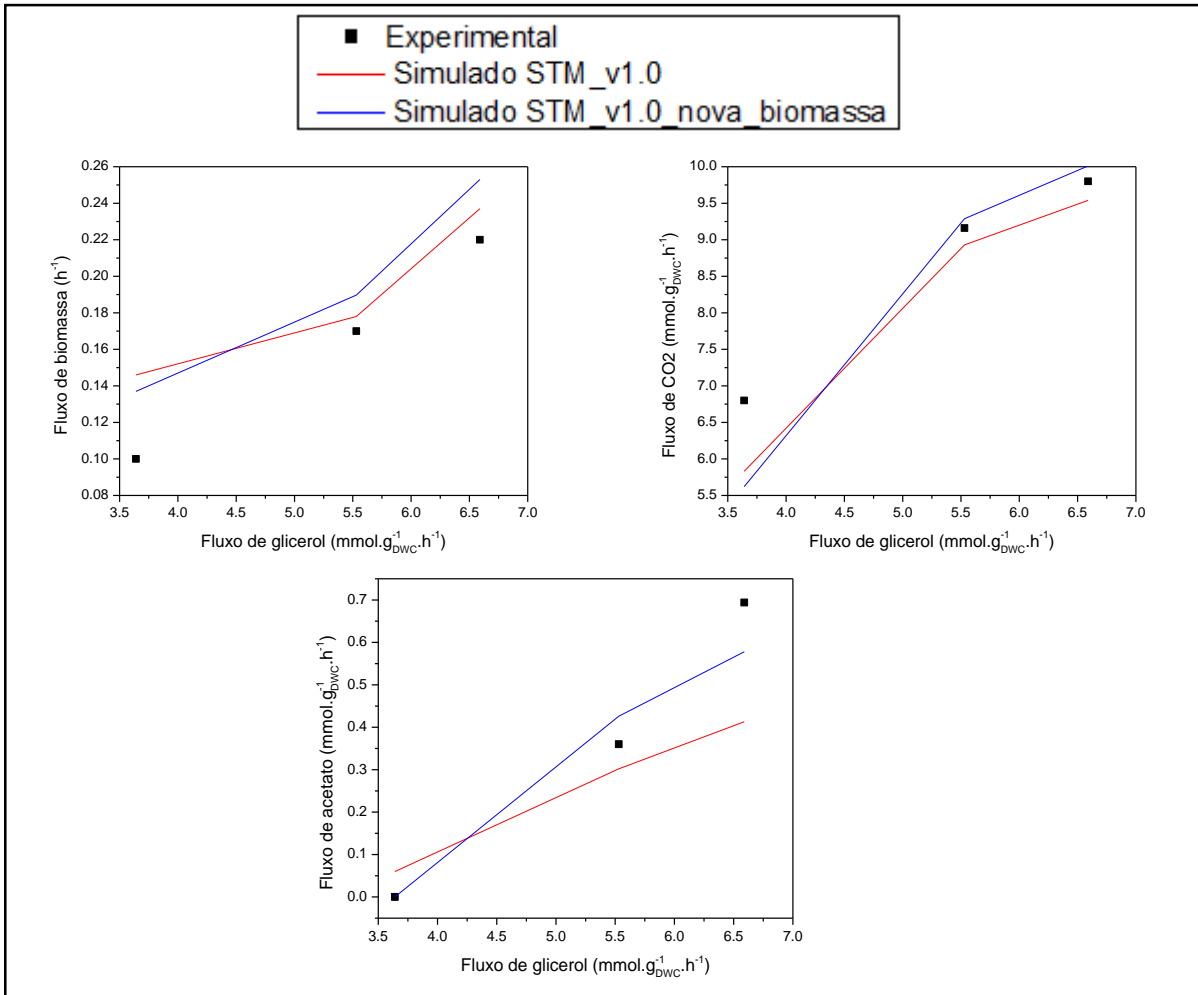
Para avaliar o modelo metabólico STM_v1.0, reconstruído para *S. typhimurium* LT2 (Thiele et al, 2011), foram realizadas as simulações conforme descrito no item 3.7 e os fluxos simulados foram comparados com os fluxos experimentais obtidos nos cultivos contínuos em glicerol, já apresentados na Figura 4.4 (a).

Nas simulações foram utilizados como dados de entrada o fluxo experimental de glicerol e de O₂, para estimar os fluxos de acetato, biomassa e CO₂, e verificar o quão precisa é a estimativa do modelo STM_v1.0 e uma versão mais recente atualizada com novos dados de biomassa de *S. typhimurium* LT2, identificado como STM_v1.0_nova_biomassa.

As simulações utilizando os dados dos fluxos de O₂ e glicerol geraram valores para os demais fluxos bastante distantes dos valores experimentais. Uma das possíveis razões para este distanciamento pode estar relacionada ao fato do modelo para *Salmonella* utilizado ter sido reconstruído a partir do modelo proposto para o metabolismo de *E. coli*. Apesar de compartilharem as mesmas reações no metabolismo central, estas bactérias apresentam fenótipos diferentes em alguns aspectos, provavelmente como reflexo de diferenças cinéticas e/ou regulatórias de algumas reações. Mas por se tratar de um modelo metabólico, o modelo STM_v1.0 não contempla questões cinéticas e regulatórias. Para tentar representar o efeito destes fenômenos pode-se, por exemplo, realizar alterações no modelo com relação ao valor do coeficiente de manutenção da célula. Mesmo que não representem biologicamente os fenômenos responsáveis pelo fenótipo observado, o emprego deste ou de outros artifícios pode ser útil para permitir que o modelo passe a descrever e gerar dados de saída mais próximos ao real. Ainda, de acordo com Raghunathan e colaboradores (2009) diferenças quantitativas entre os dados simulados e os dados experimentais podem estar ligadas a diferenças nos valores deste coeficiente. Para o modelo STM_v1.0 usa-se o valor do coeficiente de manutenção das células de *E. coli* (8.39 mmol_{ATP}.g_{DWC}⁻¹.h⁻¹), o que pode ter um impacto significativo nos resultados gerados para a simulação do metabolismo das células de outra espécie (no caso, *S. typhimurium*).

Dessa forma, o valor da manutenção foi alterado tentando aproximar a estimativa do modelo aos dados experimentais. Para a taxa de 0,1 h⁻¹ foi fixado o valor de 18 mmol_{ATP}.g_{DWC}⁻¹.h⁻¹ e para as demais taxas foi fixado o valor de 32 mmol_{ATP}.g_{DWC}⁻¹.h⁻¹, pois o valor usado para as taxas mais altas resultou em acúmulo de acetato de 2,7 g.L⁻¹ de acetato, o que não foi observado experimentalmente para a taxa de 0,1 h⁻¹ que não apresentou acúmulo.

Figura 4.6 - Comparação dos fluxos de a) biomassa, b) CO₂ e c) acetato utilizando dados experimentais de *S. typhimurium* LT2 com as soluções estimadas pelo modelo STM_v1.0 utilizando dados de fluxo de glicerol e O₂ experimentais



A Figura 4.6 apresenta os resultados das simulações com os dados experimentais obtidos nos quimiostato com a cepa SS em glicerol e os valores do coeficiente de manutenção mencionados acima. Os valores para o fluxo de biomassa foram superestimados tanto para o modelo STM_v1.0, quanto para o modelo STM_1.0_nova_biomassa, principalmente para a taxa de diluição de 0,1 h⁻¹. Sargo (2015) realizou simulações com a mesma cepa em condições semelhantes em meio formulado com glicose, para o modelo STM_v1.0 e os fluxos de biomassa também foram superestimados.

Os fluxos de CO₂ simulados ficaram bem próximos dos experimentais para os dois modelos para as taxas de 0,17 e 0,22 h⁻¹, correspondentes aos valores maiores de fluxos de glicerol.

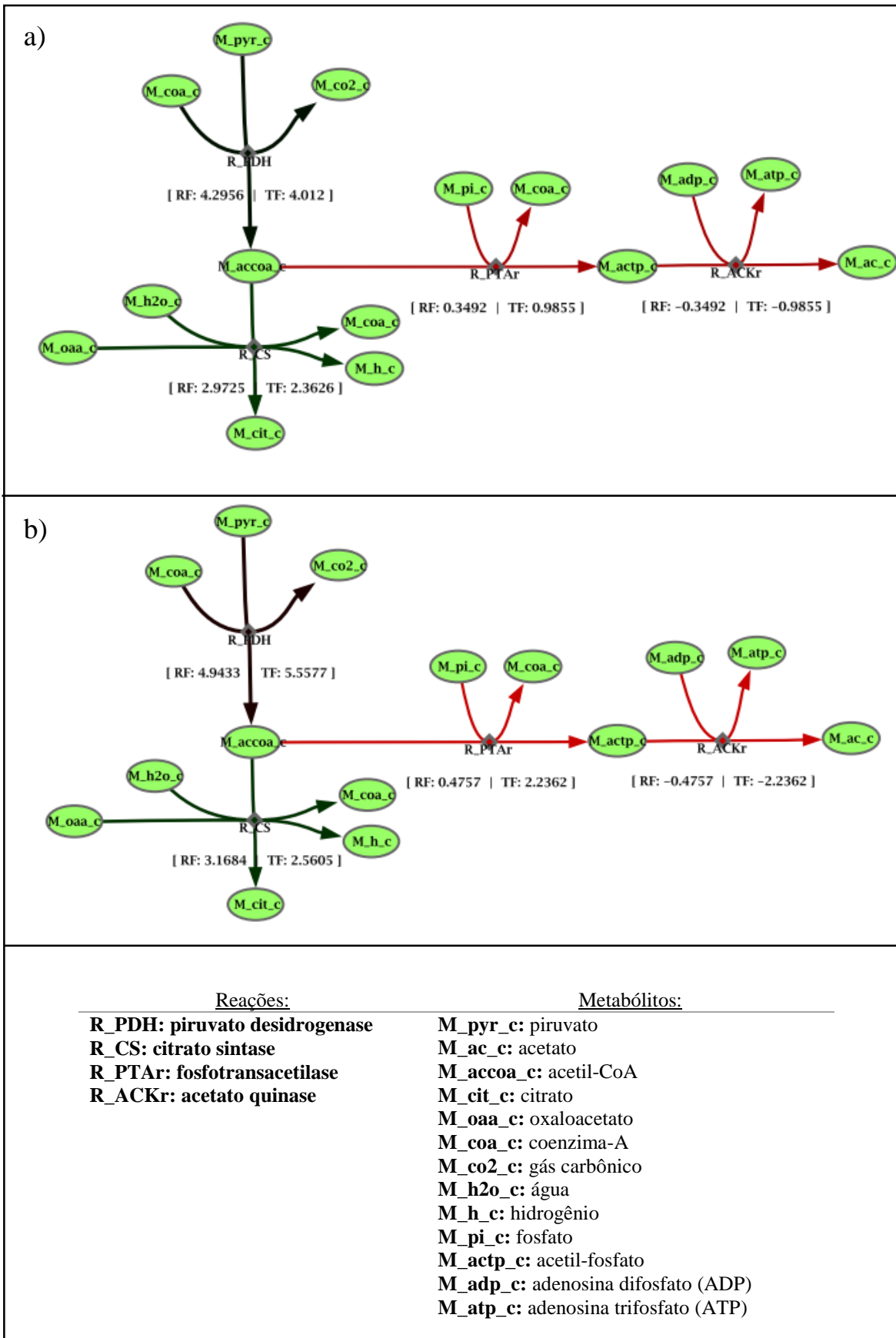
O fluxo de acetato simulado pelo modelo STM_v1.0 foi subestimado na taxa de 0,22 h⁻¹, comportamento que pode ser explicado pelo direcionamento de substrato para a

formação de formato nas simulações. No entanto, no modelo STM_v1.0_nova_biomassa não houve a formação de formato e o fluxo de acetato foi mais próximo do experimental.

Ao analisar o desempenho dos modelos metabólicos, deve-se levar em conta que são modelos estequiométricos, não sendo capazes de representar fenômenos mais complexos do metabolismo celular. Neste sentido, o modelo STM_v1.0_nova_biomassa apresentou um bom desempenho, pois foi capaz de prever adequadamente os fluxos metabólicos de CO₂, biomassa e acetato para as taxas de diluição mais altas. No caso da taxa de diluição de 0,1 h⁻¹, diversas simulações foram realizadas e os resultados do fluxo de biomassa se mostraram bastante sensíveis aos fluxos de O₂ e aos valores do coeficiente de manutenção utilizados. Nessa taxa de diluição e na presença de baixa concentração de biomassa, a determinação do fluxo experimental de O₂ é imprecisa, pois a fração molar de oxigênio no gás efluente do reator é muito próxima da fração molar do oxigênio presente no ar, o que também contribui para dificultar a definição das condições de entrada das simulações.

A Figura 4.7 apresenta os fluxos intracelulares simulados no Optflux para os dados experimentais de cultivos contínuos com a cepa SS em glicerol e dos dados de Sargo (2015) em glicose. O fluxo do cultivo em glicerol é o fluxo de referência (RF - *reference flux*) e o fluxo do cultivo em glicose é o fluxo alvo (TF - *target flux*). As setas pretas representam fluxos parecidos de glicose e glicerol, as setas verdes representa onde o fluxo de glicerol é maior, e as setas vermelhas onde o fluxo de glicose é maior.

Figura 4.7 - Valores dos fluxo intracelulares simulados para glicose (TF) e glicerol (RF) para as taxas de diluição: (a) 0,17 h⁻¹ (b) 0,22 h⁻¹



Comparando-se os fluxos intracelulares simulados pelo Software para os dados dos cultivos contínuos com glicose e com glicerol (Figura 4.7), verifica-se que para as taxas de diluição mais altas há um desvio mais pronunciado do fluxo de carbono em direção à formação de acetato nas condições simuladas com glicose. Para os cultivos com glicerol há maior direcionamento do carbono para o ciclo de Krebs, e apenas uma pequena fração do fluxo é desviada para a formação de acetato.

Para ambas as condições, a formação de acetato pela conversão direta do piruvato (via POXB) não é prevista, assim como o fluxo de assimilação de acetato pela enzima ACS também é nulo. Computacionalmente, a produção de acetato pela via PTA-ACKA é preferencial, uma vez que nesta sequência de reações há também formação de 1 molécula de ATP. Da mesma forma, a captação de acetato via ACS não é prevista, já que nessa reação há consumo de ATP e a possibilidade de formação de um ciclo fútil, onde o acetato é convertido em acetil-CoA pela ACS, que em seguida é convertido novamente em acetato pela via PTA-ACKA. Outra limitação importante quanto à ativação do fluxo da via ACS pelo software é a questão de que o acetato é formado durante o crescimento, não sendo uma fonte de carbono disponível no início da simulação (como um dado de entrada). Dessa forma, o programa parece tratar este composto apenas como um produto final, e não como uma fonte de carbono que vai se acumulando e que pode ser reassimilada. Por conta desta limitação, não foi possível também simular o metabolismo da linhagem recombinante com super-expressão da ACS cultivada em glicose ou glicerol, devido à dificuldade em se representar a reassimilação do acetato produzido durante o crescimento.

Sabe-se que uma série de fatores influencia o acúmulo de acetato (*overflow*). Entre eles, podemos citar as velocidades de consumo da fonte de carbono e da captação de oxigênio, a atividade da enzima acetil-CoA sintetase (que reassimila o acetato formado), e questões regulatórias (EITEMAN e ALTMAN, 2006; BERNAL, CASTAÑO-CEREZO E CÁNOVAS, 2016). Apesar de não contemplar informações cinéticas e regulatórias, a partir da relação entre os fluxos de entrada de oxigênio e da fonte de carbono, além do ajuste no coeficiente de manutenção, o modelo estequiométrico empregado foi capaz de prever satisfatoriamente a formação de acetato nas condições estudadas.

5 CONCLUSÕES

A cepa recombinante de *S. typhimurium* estudada neste trabalho apresentou um grande potencial na redução do acúmulo de acetato no meio de cultivo formulado com glicose, com apenas uma modificação genética, podendo ser uma alternativa viável para a obtenção de cultivos de alta densidade celular (CADC).

Os resultados dos cultivos contínuos em glicerol pela cepa selvagem de *S. typhimurium* para $D = 0,1; 0,17$ e $0,22 \text{ h}^{-1}$ evidenciaram que, para a taxa de diluição de 0,1 não houve acúmulo de acetato. Além disso, os fluxos de produção de acetato foram cerca de 3 vezes menores em glicerol do que os obtidos em glicose, sob condições similares em quimiostatos conduzidos por Sargo (2015). Este resultado é muito promissor e viabiliza a definição de estratégia para cultivo em batelada alimentada visando alcançar altas concentrações de biomassa de Salmonella em glicerol. É importante notar que a alta produção de acetato observada com glicose praticamente inviabiliza o uso desse substrato para obtenção de altas densidades com a cepa selvagem. Desta forma, a principal contribuição deste trabalho reside na viabilização e caracterização de 2 alternativas para minimizar a produção de acetato por Salmonella, condição essencial para intensificar a formação de biomassa.

O modelo metabólico STM_v1.0_nova_biomassa se mostrou bastante adequado para descrever o metabolismo de glicerol por *S. typhimurium* selvagem. Experimentos específicos para elucidar o consumo de oxigênio em baixas taxas de diluição e a influência da velocidade específica de crescimento sobre o coeficiente de manutenção são necessários para aperfeiçoar o modelo, tendo em vista a forte influência do coeficiente de manutenção nos resultados simulados.

6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

Para a continuidade dos estudos com as cepas de *S. typhimurium* selvagem e recombinante, sugere-se:

- Completar os estudos em quimiostato com glicerol, investigando o metabolismo da cepa selvagem em taxas de diluição mais altas, para avaliar a formação de outros metabólitos além do ácido acético, conforme previsto pelas simulações do modelo metabólico;
- Caracterizar o metabolismo da cepa recombinante em quimiostato com glicose, para identificar a velocidade crítica de crescimento que leva à formação mais acentuada de acetato;
- A partir da condição encontrada nos cultivos contínuos com a cepa SS ($D=0,1 \text{ h}^{-1}$), onde não houve acúmulo de acetato, implementar estratégia de alimentação em batelada alimentada e definir composição do meio de cultivo para obtenção de altas concentrações celulares;
- Adequar o modelo metabólico para descrever o metabolismo da cepa recombinante e validar com os dados experimentais disponíveis;
- Utilizar os modelos metabólicos validados para avaliar possíveis alvos para futuras modificações genéticas visando minimizar a formação de acetato

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUOUN, M. et al. Genome scale reconstruction of a *Salmonella* metabolic model: comparison of similarity and differences with a commensal *Escherichia coli* strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 43, p. 29480-29488, 2009.

ALMEIDA, M. E. S.; MASSIS, L. M.; FERREIRA, L. C. S. *Salmonella* vacinai Biotecnologia - Uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas orais multivalentes. **Ciência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 22-26, 2002.

ANDERSSON, C et al. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 381-388, 2007.

ANDRÉ, F. E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. **Vaccine**, v. 21, n. 7, p. 593-595, 2003.

ANGELAKOPOULOS, H.; HOHMANN, E. L. Pilot Study of *phoP/phoQ-Deleted Salmonella enterica Serovar Typhimurium* Expressing Helicobacter pylori Urease in Adult Volunteers. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 2135-2141, 2000.

ARISTIDOU, A. A.; SAN, K. Y.; BENNETT, G. N. Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, n. 8, p. 944-951, 1994.

AUGUSTO, E. F. P. Estudo do cultivo de *Salmonella typhimurium* em processo descontínuo e contínuo, visando a produção de vacina contra salmonelose bovina. 1998. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1998.

BABAEIPOUR, V. et al. Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 112-117, 2007.

BAILEY, J. E. Toward a science of metabolic engineering. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1668-1675, 1991.

BECKER, J. et al. From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 2, p. 159-168, 2011.

BEN-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Epitope-based vaccine against influenza. **Expert review of vaccines**, v. 6, n. 6, p. 939-948, 2007.

BERNAL, V.; CASTAÑO-CEREZO, S.; CÁNOVAS, M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 8985-9001, 2016.

- BERRÍOS-RIVERA, S. J.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. **Metabolic engineering**, v. 4, n. 3, p. 217-229, 2002.
- BETTENBROCK, K. et al. A Quantitative Approach to Catabolite Repression in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n. 5, p. 2578-2584, 2006.
- BHUTTA, Z. et al. Background Paper on Vaccination against Typhoid Fever using New-Generation Vaccines, 2007.
- BOLHASSANI, A.; ZAHEDIFARD, F. Therapeutic live vaccines as a potential anticancer strategy. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 8, p. 1733-1743, 2012.
- BORIRAK, O.; BEKKER, M.; HELLINGWERF, K. J. Molecular physiology of the dynamic regulation of carbon catabolite repression in *Escherichia coli*. n. 2014, p. 1214–1223, 2014.
- BRAGA, C. J. et al. CD8⁺ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1373-1382, 2010.
- BRANGER, C. G. et al. Oral Vaccination with LcrV from *Yersinia pestis* KIM delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* elicits a protective immune response against challenge with *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. **Vaccine**, v. 27, p. 5363–5370, 2009.
- BUMANN, D. et al. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhi* Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. **Vaccine**, v. 20, n. 5, p. 845-852, 2001.
- CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J. D. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 328–42, 1992.
- CARVALHO, R. J. et al. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 683-694, 2012.
- CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic acids research**, v. 42, Database: D459-D471, 2014.
- CASTAÑO-CEREZO, S. et al. An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 54, 2009.
- CHEN, J. G. et al. Oral vaccination with attenuated *Salmonella choleraesuis* C 500 expressing recombinant UreB and CagA antigens protects mice against *Helicobacter pylori*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 31, p. 8038-8044, 2012.
- CHIN'OMBE, N. Recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* as a vaccine vector for HIV-1 Gag. **Viruses**, v. 5, p. 2062-2078, 2013.

CRUMP, J. A.; LUBY, S. P.; MINTZ, E. D. The global burden of typhoid fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p. 346-353, 2004.

DETMER, A; GLENTING, J. Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 23, 2006.

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles. Londres: Academic Press, 2006. 439 p.

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 1, p. 35-43, 2012.

DURNIN, G.; et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 148–161, 2009.

EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 530-536, 2006.

EPPLER, T. et al. Glycerol-3-Phosphate-Induced Catabolite Repression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 11, p. 3044-3052, 2002.

ESCALLÓN, A. M. V. Produção de penicilina G acilase por organismos geneticamente modificados. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

FEIST A.M., HENRY C.S., REED J.L., KRUMMENACKER M., KARP P.D., BROADBELT L.J., HATZIMANIKATIS V., PALSSON B.Ø. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. **Mol. Syst. Biol.** 2007; 3:121.

FLAMHOLZ, A. et al. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p. 10039-10044, 2013.

FORBES, N. S. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 11, p. 785-794, 2010.

FRAHM, M. et al. Efficiency of Conditionally Attenuated *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* in Bacterium-Mediated Tumor Therapy. v. 6, n. 2, p. 1–11, 2015.

FRANCKE, C.; SIEZEN, R. J.; TEUSINK, B. Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 11, p. 550-558, 2005.

FÜCHS C, et al. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 243–251, 2002.

GALEN, J. E.; CURTISS, R. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 35, p. 4376-4385, 2014.

GARMORY, H. S., BROWN, K. A., TITBALL, R. W. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **Microbiology Reviews**, v. 26, p. 339–353, 2002.

GENTSCHEV, I. et al. Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 6, p. 577-582, 2002.

GERMANIER R, FÜRER E. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S. typhi* Ty21a. **Developments in Biological Standardization**, v. 53, p. 3–7, 1983.

GLAZYRINA, J. et al. Glucose-limited high cell density cultivations from small to pilot plant scale using an enzyme-controlled glucose delivery system. **New biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 235-242, 2012.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; BUMANN, D.; MEYER, T. F. The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of Helicobacter pylori-related diseases. **Vaccine**, v. 17, n. 13, p. 1667-1673, 1999.

GÖTZ, A. et al. Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. **PLoS One**, v. 5, e10586, 2010.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. **Research in microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

GUO, Z. P. et al. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 1, p. 49-59, 2011.

GUTNICK, D. et al. Compounds which serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT-2. **Journal of Bacteriology**, v. 100, p. 215-219, 1969.

HARTMAN, H. B. et al. Identification of potential drug targets in *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* using metabolic modelling and experimental validation. **Microbiology**, v. 160, p. 1252-1266, 2014.

HEGAZY, W. A. H.; HENSEL, M. *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. **Future Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 111-127, 2012.

HEIMANN, D. M.; ROSENBERG, S. A. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella typhimurium* in patients with metastatic melanoma. **Journal of Immunotherapy**, v. 26, n. 2, p. 179-180, 2003.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 2, p. 95-102, 2004.

HOHMANN, E. L.; OLETTA, C. A.; MILLER, S. I. Evaluation of a phoP/phoQ-deleted, aroA-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. **Vaccine**, v. 14, n. 1, p. 19-24, 1996.

HONE, D. M. et al. Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. **Vaccine**, v. 9, n. 11, p. 810-816, 1991.

HORTA, A. C. et al. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 31, n. 2, p. 457–468, 2014.

HUANG, J. D.; ZHENG, B. J.; YUEN, K. Y. Live recombinant *Salmonella* oral vaccine against avian influenza viruses. **Journal of Hong Kong Medicine**, v. 21, n. 3, Supplement 4, 2015.

IVANOFF, B.; LEVINE, M. M.; LAMBERT, P. H. Vaccination against typhoid fever: present status. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 72, n. 6, p. 957–971, 1994.

JANG, H. et al. Optimization of Vi capsular polysaccharide production during growth of *Salmonella enterica serotype Typhi* Ty2 in a bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p; 71–77, 2008.

JOSENHANS, C.; SUERBAUM, S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 8, p. 605-614, 2002.

JUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. D. et al. Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**, v. 80, n. 2, p. 815-831, 2012.

KAKUDA, H.; HOSONO, K.; ICHIHARA, S. Identification and characterization of the AckA (acetate kinase A)-Pta (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an AckA-Pta deletion mutant of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 4, p. 916-922, 1994.

KANTELE, A. et al. Live oral typhoid vaccine *Salmonella Typhi* Ty21a–A surrogate vaccine against non-typhoid salmonella? **Vaccine**, v. 30, n. 50, p. 7238-7245, 2012.

KAUFMANN, S.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes Infection**, v. 3, p. 1177-1181, 2001.

KIM, Y. et al. High Cell Density Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in Fed-batch Culture for the Production of beta-Glucan. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry-Seoul**, v. 13, n. 1, p. 153, 2007.

KONG, W.; CLARK-CURTISS, J.; CURTISS III, R. Utilizing *Salmonella* for antigen delivery: the aims and benefits of bacterial delivered vaccination. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n 4, p. 345–347, 2013.

KORZ, D. J. et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 59–65, 1995.

KOTHARI, S. et al. A novel method for purification of Vi capsular polysaccharide produced by *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Typhi*. **Vaccine**, 31(42), 4714-4719, 2013.

KOTHARI, S. et al. Purification of O-specific polysaccharide from lipopolysaccharide produced by *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi* A. **Vaccine**, v. 32, p. 21, p. 2457-2462, 2014.

KNOLL, A. et al. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. **Journal of biotechnology**, v. 132, n. 2, p; 167-179, 2007.

- KUMARI, S. et al. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.177, n. 10, p. 2878-2886, 1995.
- KWON, E. Y. et al. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 34, n. 7, p. 789-793, 2011.
- LE MINOR, L. The genus *Salmonella*. In: DWORKIN, M. et al. The prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 2760-2774.
- LEE, S. Y., High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Ibitech March*, v. 14, p. 98-105, 1996.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry, 4 ed., Worth Publisher, Inc.: New York, 2006.
- LEVINE, M. M. et al. Clinical and field trials with attenuated *Salmonella typhi* as live oral vaccines and as “carrier” vaccines. **Research in microbiology**, v. 141, n. 7, p. 807-816, 1990.
- LEWIS N.E., HIXSON K.K., CONRAD T.M., LERMAN J.A., CHARUSANTI P., POLPITIYA A.D., ADKINS J.N., SCHRAMM G., PURVINE S.O., LOPEZ-FERRER D., WEITZ K.K., EILS R., KÖNIG R., SMITH R.D., PALSSON B.Ø. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genomescale models. **Mol Syst Biol**. 2010; 6: 390.
- LIN, H.; CASTRO, N. M.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: A potential tool in metabolic engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 870–874, 2006.
- LU, Y. J. et al. A bivalent vaccine to protect against *Streptococcus pneumoniae* and *Salmonella typhi*. **Vaccine**, v. 30, n. 23, p. 3405-3412, 2012.
- MAKINO, S. I. et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 25, n. 2, p. 101-109, 1998.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, K. et al. New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. **Microbial Cell Factories**. p. 1-21, 2012.
- MCCLELLAND, M. et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.
- MCGHEE, J. R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, v. 10, p. 75–88, 1992.
- MICOLI, F. et al. A scalable method for O-antigen purification applied to various *Salmonella* serovars. **Analytical biochemistry**, v. 434, n.1, p. 136-145, 2013.

MINNING, S. et al. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 86(1), 59-70, 2001.

MIRANDA, R. P. Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Salmonella typhimurim* para produção de vacinas. 2015. Trabalho de conclusão de curso - Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

NAKAYAMA, K.; KELLY, S. M.; CURTISS, R. III. Construction of an Asd⁺ expression vector: stable maintenance and high expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. **Nature biotechnology**, v. 6, n. 693–697, 1988.

NEIDHARDT, F. C. et al. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. **American Society for Microbiology**, 1987.

OH, M. K. et al. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13175-13183, 2002.

OLIVEIRA, B. H. et al. Production of native flagellin from *Salmonella typhimurium* in a bioreactor and purification by tangential ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p; 575-584, 2011.

PACHECO, L. G. C. et al. *Salmonella* como vetor de vacinas vivas orais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 3, p.115-123, 2004.

PARK, J. H. et al. *Escherichia coli* W as a new platform strain for the enhanced production of L-valine by systems metabolic engineering. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 5, p. 1140-1147, 2011.

PARK, Y. S. et al. Enhanced β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, n. 6, p. 686-696, 1992.

POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 3, p. 543-594, 1993.

RAGHUNATHAN A., REED J., SHIN S., PALSSON B., DAEFLER S. Constraint-based analysis of metabolic capacity of *Salmonella typhimurium* during host-pathogen interaction. **BMC Syst. Biol.** 2009.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 11, p. 509-517, 2004.

RAPPUOLI, R. et al. Vaccines, new opportunities for a new society. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 34, p. 12288-12293, 2014.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 422 – 430, 1999.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 168-178, 2013.

ROBBINS, J. D.; ROBBINS, J. B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. **Journal of infectious diseases**, v. 150, n. 3, p. 436-449, 1984.

ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R. Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. **The Journal of infectious diseases**, p. 821-832, 1990.

ROCHA, I.; FERREIRA, E. C. On-line simultaneous monitoring of glucose and acetate with FIA during high cell density fermentation of recombinant *E. coli*. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, n. 2, p. 293-304, 2002.

ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC System Biology**, v. 4(1): 45, 2010.

SALJOUGHIAN, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 5, article 134, 2014.

SANTOS S, ROCHA I. Development of computational and experimental methods for biomass composition and evaluation of its impact in genome-scale models prediction. **Microbiotec'15 - Congress of Microbiology and Biotechnology 2015**. Évora, Portugal. 2015; 377-377. (Conference Proceedings).

SARGO, C. R. Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de *rE. coli* utilizando glicerol como fonte de carbono. 2011 112f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SARGO, C. R. Estudo do metabolismo de *Salmonella typhimurium*: da abordagem tradicional à análise dos fluxos metabólicos. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SCHLECHT, S.; GALANOS, C. Influence of the glucose concentration on the yield of biomass and lipopolysaccharide in *Salmonella* cultures. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 281, n. 1, p. 30-37, 1994.

SCHROEDER, J. et al. Single dose novel *Salmonella* vaccine enhances resistance against visceralizing *L. major* and *L. donovani* infection in susceptible BALB/c mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, e1406, 2011.

SEO, S. U. et al. Effective protection against secondary pneumococcal pneumonia by oral vaccination with attenuated *Salmonella* delivering PspA antigen in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 48, p. 6816-6823, 2012.

SHATA, M. T. et al. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 66-71, 2000.

SILVA, A. J. Vacinas recombinantes contra Erisipela Suína: Desenvolvimento integrado de bioprocesso, da Biologia Molecular ao Biorreator. 2011. 176 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SILVA, A. J. et al. Cloning, auto-induction expression, and purification of rSpaA swine erysipelas antigen. **Current microbiology**, v. 65, n. 4, p. 369-374, 2012.

SIMON, R. et al. A scalable method for biochemical purification of *Salmonella* flagellin. **Protein expression and purification**, v. 102, p. 1-7, 2014.

SKOUNTZOU, I. et al. *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4103-4112, 2010.

SONG, C. W. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 7, p. 2025-2034, 2013.

SOTO, R. et al. High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 165-171, 2011.

SPRENG, S.; DIETRICH, G.; WEIDINGER, G. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. **Methods**, v. 38, n. 2, p. 133-143, 2006.

STARAI, V. J. et al. Acetate excretion during growth of *Salmonella enterica* on ethanolamine requires phosphotransacetylase (EutD) activity, and acetate recapture requires acetyl-CoA synthetase (Acs) and phosphotransacetylase (Pta) activities. **Microbiology**, v. 151, n. 11, p. 3793-3801, 2005.

STECHER, B. et al. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* colitis in streptomycin-pretreated mice. **Infection and immunity**, v. 72, n. 7, p. 4138-4150, 2004.

STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic Engineering: Principles and Methodologies**. 1. ed. San Diego: Academic Press Inc, 1998.

SUN, W.; OLINZOCK, J.; WANG, S.; SANAPALA, S.; CURTISS, R. Evaluation of YadC protein delivered by live attenuated *Salmonella* as a vaccine against plague. p. 119–131, 2014.

TARTZ, S. et al. Complete protection against *P. berghei malaria* upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing *Salmonella* type III secretion system and *Bordetella* adenylate cyclase toxoid. **Vaccine**, v. 26, n. 47, p. 5935-5943, 2008.

THIELE, I. et al. A community effort towards a knowledge-base and mathematical model of the human pathogen *Salmonella Typhimurium* LT2. **BMC systems biology**, v. 5, n. 8, 2011.

VALGEPEA, K. et al. Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 166, 2010.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós genômica. **Biociência**, n. 36, 2006.

WANG, Q. et al. Metabolic flux control at the pyruvate node in an anaerobic *Escherichia coli* strain with an active pyruvate dehydrogenase. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, p. 7, p. 2107-2114, 2010.

WANG, Q. L., et al. An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 27, p. 6712-6722, 2009.

WANG, S.; CURTISS III R. Development of *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Using Live Vectors. **Vaccines**, v. 2, p. 49-88, 2014.

WEINER, M. et al. Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 62-69, 2014.

WENDISCH, V. F.; BOTT, M.; EIKMANN, B. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 268-274, 2006.

WILSON, P. D. G. et al. Batch growth of *Salmonella typhimurium* LT2: stoichiometry and factors leading to cessation of growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 195-203, 2003.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Letters in applied microbiology**, v. 44, p. 13-18, 2007.

XUE, Z. et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 734-740, 2013.

ZHANG, S. et al. Recombinant *Salmonella* vaccination technology and its application to human bacterial pathogens. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 209-219, 2013.

ANEXO 1

A seguir estão descritos de forma resumida os procedimentos experimentais extraídos do trabalho de conclusão de curso de Miranda (2015) para a obtenção da linhagem recombinante de *S. typhimurium* utilizada neste trabalho. Esta linhagem foi construída para expressão heteróloga do gene *acs* de *Escherichia coli*, com objetivo de intensificar sua capacidade de assimilação de acetato.

A1. Amplificação do gene *acs* de *Escherichia coli*

A sequência do gene que codifica a enzima Acetil-CoA sintetase (ACS) de *E. coli* (GenBank, ID NC_012971.2) foi amplificada a partir do DNA genômico extraído de células de *E. coli* BL21(DE3), com os *primers* descritos a seguir:

Primer DIRETO 5' AAGCTTACATCACCATCACatgagccaaattcacaac 3'

Primer REVERSO 5' GGATCCttacgatggcatcgcg 3'

Em sublinhado estão destacadas as sequências das enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI*, presentes nos *primers* direto e reverso, respectivamente; em itálico está a sequência codificadora de 4 resíduos de histidina adicionada no *primer* direto para possibilitar a detecção da proteína recombinante com o uso de anticorpos Anti-His em procedimentos de *immunoblotting*; em minúsculo estão as sequências das extremidades 3' e 5' do gene *acs* de *E. coli*, respectivamente (*frame* de leitura: -1); em negrito está uma base adicionada no *primer* direto para preservar o *frame* de leitura correto da sequência do gene a ser amplificado.

Escolheu-se realizar a clonagem do gene *acs* de *E. coli* ao invés do gene *acs* de *S. typhimurium* devido ao fato do valor relatado de K_M (constante de Michaelis-Menten) para a enzima ACS de *E. coli* ser de 30 a 200 vezes inferior ao valor descrito para a enzima de *Salmonella*, o que sugere que a enzima de *E. coli* apresenta maior afinidade pelo acetato.

A amplificação do gene de interesse ocorreu por meio de uma reação de PCR utilizando o termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo) e os *primers* específicos descritos. Na reação de PCR foram adicionados 20 ng de DNA molde (DNA genômico), 10 pmol do *primer* direto, 10 pmol do *primer* reverso, 1 µL de solução de dNTPs 10 mM, 1,25 unidades de enzima Dream Taq DNA polimerase (Thermo Scientific), 2,5 µL do tampão da enzima e a reação foi completada para um volume final de 25,0 µL. Os parâmetros da reação foram: 1x

(95 °C por 5 minutos); 30x (95 °C por 60 segundos / 60 °C por 60 segundos / 70 °C por 3 minutos); 1x (70 °C por 10 minutos). A temperatura de hibridização dos *primers* foi selecionada a partir de um ensaio prévio onde a reação de PCR foi realizada com diferentes temperaturas de anelamento (programa de gradiente de temperatura).

O resultado da PCR foi analisado em gel de agarose 1% e o fragmento amplificado foi purificado com o uso do kit AxyPrep DNA Gel Extraction (Axygen Biosciences) e quantificado por espectrofotômetro (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific).

A2. Clonagem do gene *acs* no vetor de propagação

Todos os procedimentos para a clonagem do gene de interesse foram realizados de acordo com protocolos padrão (SAMBROOK e RUSSEL, 2001), exceto quando indicado.

O fragmento gênico amplificado e purificado foi ligado ao vetor de propagação pTZ57R/T na proporção de 3:1 (inserto:plasmídeo) utilizando o kit de clonagem “InsTAclone PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific). A reação foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e a 4 °C *overnight* seguindo as instruções do fabricante.

Um volume de 2,5 µL da reação de ligação foi utilizado para a transformação de uma alíquota de 50 µL de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes. Após incubação em meio SOC a 37 °C e 50 rpm por 1 hora, as células transformadas por choque térmico foram plaqueadas em meio 2YT ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de X-Gal e 1 mM de IPTG, e incubadas a 37 °C, *overnight*.

Algumas colônias obtidas foram analisadas por PCR de colônia utilizando os *primers* universais M13 (que se anelam na sequência de vetores como o pTZ57R/T e o pUC19), já que a utilização dos *primers* desenhados para amplificação do gene *acs* de *E. coli* resultaria em possíveis falsos positivos (uma vez que esta etapa da clonagem foi realizada com células de *E. coli*). As condições da PCR foram as mesmas descritas para amplificação do gene *acs* a partir do DNA genômico, com exceção da temperatura de anelamento que foi alterada para 51 °C. Como molde foi utilizado 1 µL da suspensão de uma colônia em 50 µL de água.

Após a confirmação de clones positivos, uma das colônias foi cultivada em meio 2YT com 50 µg/mL de ampicilina a 37 °C e 150 rpm, *overnight*. Foi feita a extração plasmidial a partir das células cultivadas (kit PureLink Quick Plasmid Miniprep – Invitogen) e o material obtido foi quantificado e submetido a um ensaio de restrição com as enzimas *HindIII* e *BamHI* (FastDigest – Thermo Scientific) por 15 min seguindo as instruções do fabricante. A reação foi interrompida por aquecimento a 80 °C por 10 min, e o resultado foi analisado em gel de agarose

1%. O restante do material da reação de digestão foi aplicado em gel de agarose 1%, e o fragmento foi extraído e purificado para ser utilizado na etapa descrita a seguir.

A3. Sub-clonagem do gene *acs* no vetor de expressão

O plasmídeo pUC19 foi escolhido como vetor de expressão, já que apresenta a capacidade de se replicar tanto em células de *E. coli* quanto em células de *S. typhimurium* (FANG et al., 1991). Além disso, o plasmídeo apresenta em sua sequência a região promotora lacZ (promotor bem caracterizado), comumente utilizada em estudo com patógenos para expressão de proteínas recombinantes (VALDIVIA et al., 1996), e foi também o plasmídeo utilizado por LIN e colaboradores (2006) para expressão do gene ACS em *E. coli*.

Apesar de o promotor escolhido ser um promotor induzível, a ausência de expressão constitutiva do repressor lacI (codificado no *operon lac*, ausente em *S. typhimurium*) permite a utilização do promotor lacZ sem necessidade da adição de indutores, levando à produção da proteína ACS de forma contínua, já que não há repressão da transcrição.

O plasmídeo pUC19 (Thermo Scientific) foi propagado em células de *E. coli* XL1-Blue, sendo em seguida extraído, quantificado e digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI, conforme descrito na seção A2 para o plasmídeo pTZ57R/T contendo o gene *acs*.

O produto da reação de digestão foi purificado a partir do gel de agarose com o kit AxyPrep DNA Gel Extraction (Axygen Biosciences).

Em seguida foi feita a reação de ligação na proporção de 2:1 (inserto:vetor), e a reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e depois armazenada na geladeira a 4 °C *overnight*. Ao final, uma alíquota da reação de ligação foi usada para transformar células de *E. coli* XL1-Blue quimiocompetentes e a seleção das colônias recombinantes foi realizada conforme o procedimento descrito no item A2.

A4. Transformação das células de *S. typhimurium*

O plasmídeo pUC19 contendo o gene *acs* extraído das células de *E. coli* XL1-blue (item A3) foi utilizado para transformar as células de *S. typhimurium* por eletroporação.

Inicialmente a transformação foi feita com uma linhagem intermediária (*S. typhimurium* SL1493 - linhagem deficiente em restrição e proficiente em modificação),

responsável por realizar modificações na estrutura do DNA de forma que o mesmo não seja degradado pelo hospedeiro final (*S. typhimurium* LT2, que é proficiente em restrição).

Para a transformação, o estoque de células eletrocompetentes foi descongelado em banho de gelo e incubado com aproximadamente 100 ng do DNA de interesse. Em seguida, 50 µL da mistura de células e DNA foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm de distância entre os eletrodos e foi feita a descarga do pulso elétrico de 25 µF de capacitância, 2,5 KV e 200 Ω de resistência (eletroporador Bio-Rad, modelo Gene Pulser Xcell). Imediatamente após o pulso foram adicionados 400 µL de meio SOC à cubeta, e a suspensão foi transferida para um tubo de 1,5 mL, a fim de ser incubada por 1 hora a 37 °C e 170 rpm. Após isso, foi feito o plaqueamento de alíquotas de 100 µL da cultura em placas de 2YT ágar com ampicilina 50 µg/mL, que foram então incubadas a 37 °C por 16 horas.

Após o *screening* de colônias por PCR para confirmação dos clones positivos, foi feita a extração plasmidial de uma colônia selecionada e a transformação da linhagem de *S. typhimurium* LT2 seguindo o mesmo protocolo. Por fim, foi feita a análise por PCR de uma das colônias resultantes da transformação, e após confirmação, estas células foram utilizadas para preparo de um banco de cultura e para os experimentos descritos neste trabalho.

A5. Referências Bibliográficas

FANG, F. C.; KRAUSE, M.; ROUDIER, C.; FIERER, J.; GUINEY, D. G. Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence. **J Bacteriology**, Vol. 173, No. 21, p. 6783-6789, 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning – a laboratory manual**. 3.ed. Nova Iorque: CSH Press, 2001, Vol. 1 e Vol. 2.

VALDIVIA, R. H.; HROMOCKYJ, A E.; MONACK, D.; RAMAKRISHNAN, L.; FALKOW, S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of hostpathogen interactions. **Gene**, Vol. 173, No. 1 Spec No, p. 47–52, 1996.