



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

CÍNTIA REGINA SARGO

**ESTUDO DO METABOLISMO DE *Salmonella typhimurium*:
DA ABORDAGEM TRADICIONAL À ANÁLISE DOS FLUXOS
METABÓLICOS**

SÃO CARLOS

2015



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

CÍNTIA REGINA SARGO

**ESTUDO DO METABOLISMO DE *Salmonella typhimurium*:
DA ABORDAGEM TRADICIONAL À ANÁLISE DOS FLUXOS
METABÓLICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami
Co-orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

SÃO CARLOS

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

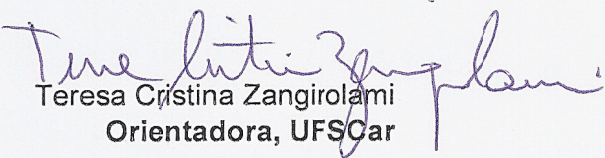
S245em Sargo, Cíntia Regina
Estudo do metabolismo de Salmonella typhimurium :
da abordagem tradicional à análise dos fluxos
metabólicos / Cíntia Regina Sargo. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
181 p.

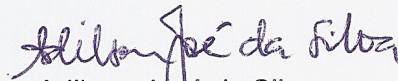
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

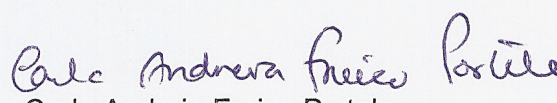
1. Salmonella typhimurium. 2. Metabolismo do
carbono central. 3. Cultivos em biorreator. 4.
Análise dos fluxos metabólicos. 5. Fluxômica.
I. Título.

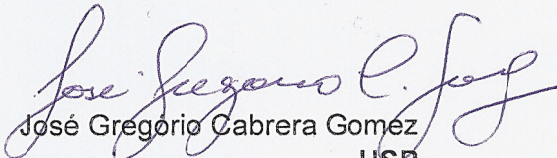
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE CÍNTIA REGINA SARGO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE AGOSTO DE 2015.

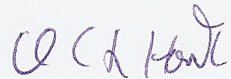
BANCA EXAMINADORA:


Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora, UFSCar


Adilson José da Silva
Coorientador, UFSCar


Carla Andreia Freixo Portela
CTBE


José Gregório Cabrera Gomez
USP


Antonio Carlos Luperni Horta
UFSCar

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, José e Regina, meu irmão Gustavo e minha querida avó Clélia, que de muitas formas sempre me incentivaram e torceram para que hoje mais um sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami por ter sido, durante esses 6 anos de convívio, um exemplo de orientadora, de professora e de mulher, sempre muito disposta a ensinar, a inovar e a solucionar os problemas do cotidiano. Agradeço toda a paciência e dedicação, por ter acreditado no meu trabalho e principalmente pelo seu positivismo admirável, que sempre me incentivou e fez com que eu acreditasse que tudo daria certo.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Adilson José da Silva, que muito antes de se tornar professor, quando ainda era um doutorando, já me orientava, ensinava e confiava em mim. Um professor que também foi um grande amigo de laboratório e que iniciou, em Portugal, este trabalho que tanto me orgulha. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado ao seu lado, aprendendo a todo o momento. E por tudo isso, é um orgulho poder ser sua primeira aluna de doutorado.

Aos prof. Dr. Eugénio Ferreira e Dra. Isabel Rocha que me acolheram tão bem na Universidade do Minho – Portugal, me proporcionando novos conhecimentos em áreas da ciência que eram desconhecidas por mim. Agradeço também toda a dedicação após o meu retorno ao Brasil, sempre disponíveis em ajudar e a contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Roberto de Campos Giordano, grande idealizador deste projeto e responsável pelo nosso ingresso na área da Biologia de Sistemas.

Ao amigo KK e também prof. Dr. Antônio Carlos Luperni Horta, por estar sempre presente, contribuindo com novas ideias. E também pela oportunidade maravilhosa de ter acreditado em mim, me indicando como tutora no curso de Engenharia Ambiental a distância.

Aos meus pais, José Marques e Regina Clélia que são meus maiores e melhores exemplos de vida. Agradeço por todo amor, carinho, esforço, dedicação e torcida em todas as etapas da minha vida, e principalmente por acreditarem nos meus sonhos que muitas vezes parecem utópicos. Esta conquista é graças a vocês.

Ao meu irmão Gustavo, que considero como um pai, por todo o carinho, amizade e momentos inesquecíveis a mim proporcionados.

À minha avó mais do que querida, Clélia, que graças a ela tenho condições de conquistar tudo o que desejo. Muito obrigada por toda ajuda, carinho e ensinamentos.

Ao Fábio, meu grande amor, companheiro, amigo e incentivador, que com muita paciência e carinho me acompanhou durante todo o doutorado, suportando até um oceano de distância.

Às minhas queridas amigas Bruna, Martha e Renata que sempre me apoiaram, que me fizeram sorrir, quando na verdade queria chorar e que transformaram os dias e noites de trabalho em momentos sempre agradáveis e inesquecíveis.

À turminha da Licurga, ou como queiram, aos amigos da Regina, pela linda “família” que nos tornamos em São Carlos. Muito obrigada Bruna, Murilo, Renata e Vitor, viver ao lado de vocês foi uma benção em minha vida.

À todos da família LaDEAC (Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Avançadas de Cultivo), que foram essenciais para a execução deste trabalho. Agradecimento especial à dupla inseparável e inesquecível, Gabriel e Gilson, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e ensinar. Sem os seus conhecimentos, “músculos”, ajudas constantes, e amizade tudo teria sido mais difícil e doloroso.

À amiga Dra. Daniela Correia, que o “destino” fez com que ela fosse uma das primeiras pessoas a me ajudar no início do doutorado, em Portugal, e a concluir este trabalho aqui no Brasil. Graças a ela e toda a sua dedicação, foi possível chegarmos nos resultados aqui apresentados.

À todos do grupo Bioquímica, Agnes, Bruna, Carol, Daniela, Diego, Diogo, Gabriel, Genoveva, Gilson, Guilhermina, Jorge, Leticia, Liliane, Luciano, Margarita, Martha, Mayerlenis, Murilo, Renata, Vitor, William e Willian, pelas trocas de conhecimento e momentos de descontração repletos de muitas risadas e companheirismo, principalmente nas nossas festinhas mensais, que nos aproximaram tanto nos últimos anos.

Ao grupo de pesquisa BiSBII (Bioinformatics and Systems Biology Interdisciplinary Initiative - UMinho/Portugal), por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

À Amandinha e ao André, um exemplo de casal, amigos únicos e maravilhosos, que estiveram presentes em todos os principais momentos da minha vida, sempre me apoiando.

Aos amigos inesquecíveis Amandinha, Elisa, Fabio, Garça, Gustavão, Livoca, Malu, Mô, Taci, Thiaguinho e Zezos, que desde a graduação até o presente momento me acompanharam, ajudaram e fizeram com que esses quase 10 anos de convivência tenham sido simplesmente maravilhosos e inesquecíveis e que mesmo longe continuam morando em meu coração e sempre presentes em minhas lembranças.

Aos meus queridos companheiros de moradia, Greg, Theo e Mag, que sempre com muita paciência estiveram ao meu lado.

Aos amigos que conquistei durante a minha estadia em Braga e que mesmo longe estão sempre em meus pensamentos.

Aos amigos e técnicos Amadeus, Alyne, Thaís e Thiago, por toda a ajuda e paciência.

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

Àqueles que conheci ao longo da vida e que de alguma forma me ensinaram a acreditar em mim, a amar e a sonhar.

E por fim, agradeço à Deus por me permitir cumprir mais essa etapa em minha vida e sonhar com as próximas que virão.

“Test ideas by experiments and observations. Build on those ideas that pass the test. Reject the ones that fail. Follow the evidence wherever it leads, and question everything”.

(Neil Degrasse Tyson)

SARGO, C. R. **Estudo do metabolismo de *Salmonella typhimurium*: da abordagem tradicional à análise dos fluxos metabólicos**. 2015. 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos / SP – Brasil.

RESUMO: Bactérias do gênero *Salmonella* spp. são extensivamente estudadas por serem importantes patógenos, causando frequentemente graves doenças e infecções gastrointestinais em humanos e animais. Além disso, nos últimos anos, estas bactérias vêm ganhando um destaque ainda maior na área da biotecnologia por apresentarem ótimos resultados na produção e veiculação *in vivo* de diversas substâncias com fins vacinais. No entanto, ainda há poucas informações a respeito de seu metabolismo, dificultando tanto o desenvolvimento de novas linhagens atenuadas, como também a produção em larga escala de células vivas e de componentes celulares. Neste sentido, este trabalho se propôs a estudar o metabolismo de *S. typhimurium* LT2, utilizando inicialmente abordagens tradicionais para investigar seu comportamento na presença de diferentes fontes de carbono, em diferentes modos de operação de biorreator e de aeração (aeróbias e anaeróbias). Os resultados obtidos em cultivos em batelada e em quimiostatos evidenciaram que o metabolismo da *S. typhimurium* difere bastante do metabolismo da *E. coli*, espécies consideradas semelhantes com relação ao metabolismo do carbono central. A principal diferença observada entre essas duas bactérias foi a elevada produção de acetato pelas células de *S. typhimurium* LT2, mesmo em baixas velocidades de crescimento nas quais este metabólito não é produzido por diversas estirpes de *E. coli*. Atualmente, modelos metabólicos em escala genômica são ferramentas importantes para que o comportamento do fenótipo de diversos organismos sejam melhor compreendidos. Assim, avaliou-se o modelo STM_v1.0 reconstruído para *S. typhimurium* LT2, comparando-se dados obtidos experimentalmente, em quimiostatos, e os preditos pelo modelo. No entanto, como este modelo foi baseado no modelo da *E. coli*, os resultados simulados para produção de biomassa foram superestimados e, conseqüentemente, os fluxos de acetato foram inferiores aos obtidos experimentalmente. Sendo assim, para se obter dados experimentais úteis para aprimorar o modelo e para uma compreensão maior do metabolismo de *S. typhimurium*, utilizou-se a técnica de análise dos fluxos metabólicos com substrato isotopicamente marcado, permitindo a determinação dos fluxos das principais vias do metabolismo do carbono central da bactéria em estudo. Essa análise revelou diferenças na utilização das vias metabólicas em função da velocidade específica de crescimento, sendo que na menor taxa de diluição avaliada, $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$, a glicose foi predominantemente catabolizada pelas vias pentose fosfato e glicólise,

enquanto na taxa de diluição de $0,48 \text{ h}^{-1}$, a via principal de oxidação da glicose foi a Entner-Doudoroff. Além disso, também observou-se um fluxo relativamente maior na via do ciclo do ácido cítrico na maior taxa de diluição estudada.

Palavras-chaves: *Salmonella typhimurium*, metabolismo do carbono central, cultivos em biorreator, ^{13}C análise dos fluxos metabólicos, fluxômica.

SARGO, C. R. **Metabolism study of *Salmonella typhimurium*: traditional approach to metabolic flux analysis**. 2015. 181 s. Thesis (PhD in Chemical Engineering) - Graduate Program of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, São Carlos / SP – Brazil.

ABSTRACT: The genus *Salmonella* spp. has been extensively investigated because these bacteria are important pathogens that frequently cause severe diseases and gastrointestinal infections in humans and animals. Moreover, in recent years, *Salmonella* has called attention due to the excellent results in the production and *in vivo* delivery of various substances with potential application in Vaccinology. However, there is still little information available concerning aspects of its metabolism, which hampers both the development of new attenuated strains and the large-scale production of live cells and cellular components. Thus, this work aimed to study the *S. typhimurium* LT2 metabolism, using traditional and innovative approaches to investigate different carbon sources as well as different bioreactor operation modes and aeration conditions (aerobic and anaerobic). Results obtained in batch and chemostat cultivations indicated that *S. typhimurium* metabolism differs significantly from *E. coli* metabolism, closely related bacteria species with regard to the central carbon metabolism. The main difference observed between these bacteria was the high level of acetate production exhibited by *S. typhimurium* LT2 cells, which, differently from *E. coli*, occurred even at the lowest dilution rate evaluated. Currently, genome scale metabolic models are important tools for better understanding the phenotypic behavior of many organisms. Therefore the model STM_v1.0 reconstructed for *S. typhimurium* LT2 was evaluated, comparing experimental data, obtained in chemostat cultivations, with model predictions. Since this model was derived from *E. coli* model, the simulated results for biomass formation were overestimated and, consequently, predicted acetate fluxes were lower than those obtained experimentally. Therefore, to obtain experimental data useful to improve the model and to reach a better comprehension of *S. typhimurium* metabolism, the technique of metabolic flux analysis using isotopic labeled substrate was adopted, allowing determination of the fluxes for the main pathways of central carbon metabolism of *Salmonella*. This analysis revealed different preferred metabolic pathways depending on the specific growth rate. At the lowest dilution rate evaluated, $D = 0.24 \text{ h}^{-1}$, glucose was catabolized predominantly by the pentose phosphate and glycolysis pathways, while at the dilution rate of 0.48 h^{-1} , the major pathway of glucose oxidation was Entner-Doudoroff. In addition, a relatively high flux through the citric acid cycle at the higher dilution rate studied was observed.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, central carbon metabolism, bioreactor cultivations, ^{13}C metabolic flux analysis, fluxomic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Imagens de <i>Salmonella enterica</i> . A) Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de cepas selvagens de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. B) Representação tridimensional de cepas de <i>Salmonella typhi</i> baseada em imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	33
Figura 2.2 - Integração das três vias de oxidação da glicose em <i>Salmonella typhimurium</i> LT2.	36
Figura 2.3 – Ciclo do ácido cítrico em <i>Salmonella typhimurium</i> LT2	37
Figura 2.4 – Reações redox que ocorrem durante a etapa de oxidação fosforilativa para produção de energia (ΔE^0 obtido em pH = 7,0 a 25 °C).....	38
Figura 2.5 – Reações anapleróticas responsáveis pela renovação de compostos intermediários importantes no ciclo do ácido cítrico.....	38
Figura 2.6 - Via metabólica de produção e re-assimilação de acetato por <i>E. coli</i> . <i>poxB</i> , piruvato desidrogenase; <i>ackA</i> , acetato quinase; <i>pta</i> , acetil fosfotransferase; <i>acs</i> , acetil coenzima-A sintetase	40
Figura 2.7 - Principais vias metabólicas durante a fermentação da glicose por <i>S. typhimurium</i> . Os genes indicados na figura e as enzimas correspondentes são detalhados na Tabela 2.1.....	41
Figura 2.8 – Modos de operação de um biorreator	48
Figura 2.9 - Representação de uma célula com suas reações (v_n) de degradação (A, B, D) e de produção (B, C, D, E, F) de metabólitos extracelulares e intracelulares e a aplicação do balanço de massa para estes metabólitos.	54
Figura 2.10 – Representação da equação 2.2 na forma matricial dos balanços de massas de metabólitos produzidos e consumidos em uma célula, no estado-estacionário.....	55
Figura 2.11 - Problemas típicos em análises de MFA.....	56
Figura 2.12 – Transição dos átomos de carbono na glicólise e via pentose fosfato ao utilizar [1- ¹³ C] glicose, sendo ○ carbono ¹² C e ● carbono ¹³ C	57
Figura 2.13 - Derivatização da L-Alanina com metil-cloroformato (MCF).....	58

Figura 4.1 - Metabolismo de diferentes fontes de carbono por <i>S. typhimurium</i> LT2 (DHAP, dihidroxiacetona fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato).....	104
Figura 4.2 - Consumo de substrato, produção de biomassa e acetato nos cultivos em batelada realizados com diferentes fontes de carbono e a recuperação de carbono em cada um dos casos estudados. a) Ácido acético b) Glicose; c) Xilose; d) Glicerol como fontes de carbono.....	105
Figura 4.3 – Cultivo de <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 em batelada-alimentada com glicose. Alimentação iniciada com 4,67 h de cultivo (indicada pela primeira linha vertical). As demais linhas verticais, nos tempos de 15 e 19,6 h demonstram mudanças importantes observadas nos perfis de crescimento celular e de produção de acetato. a) Acompanhamento do crescimento celular (C_x), consumo de glicose, e produção de acetato ao longo do cultivo b) Variação da velocidade de crescimento real (μ_{real}), velocidade de produção de acetato (μ_P) e massa de célula ao longo do tempo. c) Variação da concentração e oxigênio dissolvido (COD), da velocidade de produção de CO ₂ e da vazão de alimentação ao longo do cultivo	110
Figure 5.1 - Growth and fermentation product profiles of <i>S. typhimurium</i> LT-2 during aerobic glucose-limited chemostat cultivations under different dilution rates. CER (■), glucose (◇), biomass (C_x) (▶) and acetate (○). The error bars represent standard deviations from three technical replicates.	124
Figure 5.2 - Influence of specific growth rate on the carbon distribution in aerobic glucose-limited chemostats at different dilution rates for A) wild-type <i>S. typhimurium</i> LT-2 and B) <i>E. coli</i> K-12 TG1 (data from Kayser et al.) ³⁷	125
Figure 5.3 - Comparison of fluxes of A) glucose, B) CO ₂ and C) acetate based on experimental data for <i>S. typhimurium</i> LT-2 (■); <i>E. coli</i> K12 TG1 ^a (○); <i>E. coli</i> K12 MG1655 ^b (△) and <i>E. coli</i> BW25113 ^c (*), cultivated as chemostats under aerobic conditions. <i>In silico</i> solutions (—) estimated using experimental GUF and OUF values obtained in this work as the environmental conditions. (Data from: ^a Kayser et al. ³⁷ ; ^b Valgepea et al. ³¹ ; ^c Renilla et al. ²⁶).....	129
Figure 5.4 - Comparison between experimental data for anaerobic batch cultivation and <i>in silico</i> solutions using the experimental GUF value (9.6 mmol g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹), constraining the maximum oxygen uptake rate to zero in the environmental conditions used for the pFBA simulation. (^a Data from Castaño-Cerezo et al. ¹⁹)	130
FIGURE 5.5 - Time-course of optical density (▲), concentration of dissolved oxygen (●) and molar fraction of CO ₂ (■) in glucose-limited chemostat cultures of <i>Salmonella typhimurium</i>	

LT2 growing at dilution rate of A) $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$; B) $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$; C) $D = 0.48$ and 0.24 h^{-1} ; E) $D = 0.67$ and 0.58 h^{-1}	140
Figure 5.6 – Fluxes of DNA (■) during <i>S. typhimurium</i> glucose-limited aerobic chemostat cultivations under different dilution rates.....	142
Figura 6.1 – Esquema elaborado para retirar todo o O_2 presente no frasco utilizado para hidrólise da biomassa (saturação com N_2).....	145
Figura 6.2 – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa de uma amostra com ^{13}C e derivatizada com MCF. A) Perfil cromatográfico de íons totais e B) Espectro de massas (ampliado) relativo a Alanina ($\text{Tr} = 11,3 \text{ min}$), destacando-se 3 íons fragmentados principais com seus respectivos valores de m/z	148
Figura 6.3 – Método requerido pelo OpenFLUX para obter a distribuição dos fluxos metabólicos.....	151
Figura 6.4 - Marcação fracionária (FL com e sem correção da biomassa não marcada) calculada para os aminoácido constituintes da biomassa obtida em cultivos contínuos nas taxas de diluição de $0,24 \text{ h}^{-1}$ (a) e $0,48 \text{ h}^{-1}$ (b). As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas técnicas.	153
Figura 6.5 - Distribuição dos fluxos de carbono de <i>S. typhimurium</i> LT2 determinados por análise de GC-MS da biomassa hidrolisada obtida em cultivos contínuos nas taxas de diluição de $0,24$ e $0,48 \text{ h}^{-1}$. A espessura das setas é proporcional aos fluxos relativos determinados. Os compostos destacados em rosa ($D = 0,24 \text{ h}^{-1}$) e lilás ($D = 0,48 \text{ h}^{-1}$) são os fluxos determinados experimentalmente e fornecidos ao software OpenFLUX. As reações referentes aos fluxos (V_1, V_2, \dots, V_{59}) indicados podem ser observadas no Apêndice 3.....	155
Figura 6.6 - Distribuição dos fluxos metabólicos internos de <i>S. typhimurium</i> na taxa de diluição de $0,24 \text{ h}^{-1}$ (Figura 6.5 – com melhor resolução).....	171
Figura 6.7 - Distribuição dos fluxos metabólicos internos de <i>S. typhimurium</i> na taxa de $0,48 \text{ h}^{-1}$ (Figura 6.5 – com melhor resolução)	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Principais genes envolvidos no metabolismo de <i>S. typhimurium</i> em anaerobiose	41
Tabela 2.2 – Comparação entre o potencial energético do oxigênio (condições aeróbias) e do piruvato e acetaldeído (condições anaeróbias).	43
Tabela 2.3 - Diferentes estratégias utilizadas para minimizar a produção de subprodutos inibitórios comumente formados em cultivos de alta densidade.....	49
Tabela 2.4 - Parâmetros cinéticos obtidos por Oliveira e colaboradores (2011) em cultivos em batelada de <i>S. typhimurium</i> SDV 322.....	51
Tabela 2.5 - Produtos industriais produzidos por organismos geneticamente modificados por engenharia metabólica	53
Tabela 2.6 - Modelos metabólicos em escala genômica para diferentes organismos e suas respectivas características.....	61
Tabela 3.1 - Composição do meio mínimo M9-modificado	85
Tabela 3.2 – Composição da solução de traços de vitaminas.....	86
Tabela 3.3 - Composição da solução de traços de minerais	86
Tabela 3.4 – Balanço de célula, de substrato, de produto e de CO ₂ para diferentes modos de operação do reator	90
Tabela 3.5 - Padrões de ácidos orgânicos presentes no kit da Sigma-Aldrich (kit - Cat. 47264 Supelco) analisados por HPLC e utilizados para identificar os ácidos produzidos nos cultivos realizados de <i>Salmonella typhimurium</i> LT2.....	95
Tabela 4.1 - Abordagens clássicas para otimização de cultivos de organismos geneticamente modificados	98
Tabela 4.2 - Concentração das fontes de carbono avaliadas em diferentes condições de cultivo em biorreator.....	100
Tabela 4.3 - Resultados obtidos nos cultivos de <i>S. typhimurium</i> LT2 em batelada com diferentes fontes de carbono. Produção de biomassa e acetato máximas, produtividade celular máxima, parâmetros cinéticos e estequiométricos.	106

Table 5.1 - Comparison of growth and metabolic parameters of <i>S. typhimurium</i> LT-2 and different <i>E. coli</i> strains in batch aerobic cultures using acetate minimal medium.....	127
Table 5.2 - Comparison of growth and metabolic parameters of <i>S. typhimurium</i> LT-2 and different <i>E. coli</i> strains in batch anaerobic cultures using glucose minimal medium.....	128
Tabela 6.1 – Fluxos obtidos de consumo de glicose e produção de CO ₂ e acetato nos cultivos contínuos em diferentes taxas de diluição.....	152
Tabela 6.2 – Concentrações dos aminoácidos na biomassa utilizados como dados de entrada no <i>software</i> OpenFLUX.....	154
Tabela 6.3 - Análise de sensibilidade de Monte Carlo associada a um intervalo de confiança de 95% a partir de dados obtidos de cultivos contínuos nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h ⁻¹	157
Tabela 6.4 - Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) para os fragmentos dos aminoácidos da biomassa obtida na taxa de diluição de 0,24 h ⁻¹ , sem e com correção da biomassa marcada	161
Tabela 6.5 - Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) para os fragmentos dos aminoácidos da biomassa obtida na taxa de diluição de 0,48 h ⁻¹ , sem e com correção da biomassa marcada	164
Tabela 6.6 - Marcação fracionária (FL) para os isotopômeros de massa dos aminoácidos constituintes da biomassa hidrolisada obtida no cultivo contínuo em D = 0,24 h ⁻¹	167
Tabela 6.7 - Marcação fracionária (FL) para os isotopômeros de massa dos aminoácidos constituintes da biomassa hidrolisada obtida no cultivo contínuo em D = 0,48 h ⁻¹	168
TABELA 6.8 - Modelo estequiométrico simplificado utilizado nas otimizações com o <i>software</i> OpenFLUX e os valores de fluxos obtidos para cada reação considerada nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h ⁻¹	169
Tabela 6.9 – Valores dos isotopômeros de massa obtidos experimentalmente e <i>in silico</i> para os fragmentos de aminoácidos utilizados na determinação dos fluxos intracelulares na taxa de diluição de 0,24 h ⁻¹	173
Tabela 6.10 – Valores dos isotopômeros de massa obtidos experimentalmente e <i>in silico</i> para os fragmentos de aminoácidos utilizados para a determinação dos fluxos intracelulares na taxa de diluição de 0,48 h ⁻¹	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALB/c = camundongo albino de linhagem isogênica

C_{s_0} = concentração de substrato no meio de alimentação (g L^{-1});

C_{s_r} = concentração de substrato residual (g L^{-1})

C_{x_0} = concentração celular no início da fase de alimentação (g L^{-1})

COD = Concentração de oxigênio dissolvido (%)

C_x = Concentração celular (g L^{-1})

DCW = “**D**ry **C**ell **W**eight” (Massa seca)

D = Taxa de diluição (h^{-1})

$\text{DO}_{600\text{nm}}$ = Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm

E. coli = *Escherichia coli*

ED = via Entner-doudoroff

E. rhusiopathiae = *Erysipelothrix rhusiopathiae*

F = Vazão volumétrica (L h^{-1})

GC-MS = “**G**as **C**hromatography – **M**ass **S**pectrometry” (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas)

GL = Glicólise ou via glicolítica

HCDC = “**H**igh **C**ell **D**ensity **C**ulture” (Cultivo de Alta Densidade Celular)

HPLC = “**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography” (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IgG = imunoglobulina

LB = Meio de cultivo complexo **L**uria **B**ertani

MDVs = “**M**ass **I**sotopomer **D**istribution **V**ector” (Vetores de Distribuição de Isotopômeros de Massa)

MFA = “**M**etabolic **F**lux **A**nalysis” (Análise de fluxos metabólicos)

mM = mili molar

m/z = razão massa – carga

PP = via das pentose fosfato (**P**entose **P**hosphate)

PPG = Polipropilenoglicol

PVDF = Membrana de difluoreto de polivinilideno

r.p.m = rotações por minuto

rSpaA = proteína SpaA recombinante

SL3261 = Linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada 3261

SpaA = Surface protective antigen A

S. typhimurium LT2 = *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium LT2

TCA = “Tricarboxylic Acid Cycle” (via do ciclo do ácido cítrico)

V = Volume

VBV = Vetor Bacteriano Vivo

y_{CO_2} = Fração molar de dióxido de carbono

y_{O_2} = Fração molar de oxigênio

$Y_{\text{P/S}}$ = Fator de conversão de substrato a produto ($\text{g}_{\text{produto}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)

$Y_{\text{X/S}}$ = Fator de conversão de substrato a células ($\text{g}_{\text{célula}} \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$)

Letras Gregas

μ = Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

$\mu_{\text{máx}}$ = Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

μ_{real} = velocidade específica de crescimento celular real (h^{-1})

μ_{SET} = velocidade específica de crescimento adotada na fase de alimentação (h^{-1})

τ = taxa de residência (h)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Objetivo	27
1.2. Estrutura da tese.....	27
1.3. Referências.....	28
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1. Características gerais do gênero <i>Salmonella</i> spp.....	33
2.1.1. Metabolismo da bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> LT2	34
2.1.1.1. Metabolismo da <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 na presença de oxigênio	36
2.1.1.1.1. Produção de ácido acético em condições aeróbias	39
2.1.1.2. Metabolismo da <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 na ausência de oxigênio.....	40
2.2. <i>S. typhimurium</i> e sua importância biotecnológica e biomédica.....	43
2.3. Produção em larga escala de diferentes organismos.....	46
2.3.1. Diferentes modos de operação de um biorreator	47
2.3.2. Cultivos de <i>Salmonella</i>	50
2.4. Engenharia metabólica.....	52
2.4.1. Análise de fluxos metabólicos – MFA	54
2.4.1.1. Análise de fluxos metabólicos em experimentos com carbono marcado – ¹³ C MFA	56
2.4.2. Modelos metabólicos.....	60
2.4.3. <i>Software</i> para engenharia metabólica – Optflux.....	64
2.5. Referências.....	66
3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS	85
3.1. Microrganismo.....	85
3.2. Meios de cultivo.....	85
3.3. Preparo de cultura estoque	86
3.4. Cultivos em biorreator	87

3.4.1. Pré-inóculo	87
3.4.2. Inóculo	87
3.5. Métodos analíticos.....	87
3.5.1. Determinação da concentração celular	88
3.5.2. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos	88
3.6. Procedimento de cálculos	89
3.6.1. Balanço de material.....	89
3.6.1.1. Balanço de carbono.....	90
3.6.2. Determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ)	91
3.6.2.1. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$)	92
3.6.2.2. Determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ_{real}) no cultivo em batelada-alimentada.....	92
3.6.3. Determinação da taxa de diluição em cultivos contínuos	93
3.6.4. Determinação do fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) ou de substrato a produto ($Y_{P/S}$).....	93
3.7. Estudos <i>in silico</i>	94
3.7.1. Avaliação do modelo STM_v1.0	94
3.8. Referências	95
3.9. Anexo 1	95
4. ANÁLISE DO METABOLISMO DE <i>Salmonella typhimurium</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	97
4.1. Introdução.....	97
4.2. Material e métodos específicos	100
4.2.1. Cultivos em biorreator	100
4.2.1.1. Cultivos em batelada utilizando glicose, glicerol ou xilose como fonte de carbono.....	100
4.2.1.2. Cultivo em batelada utilizando ácido acético como fonte de carbono.....	101

4.2.1.3. Cultivo em batelada alimentada	102
4.2.2. Métodos analíticos.....	103
4.3. Resultados e Discussão	103
4.3.1. Cultivos em batelada com diferente fontes de carbono.....	103
4.3.2. Cultivo em batelada-alimentada com glicose como fonte de carbono	108
4.4. Referências.....	111
5. DIFERENÇAS ENTRE <i>Salmonella typhimurium</i> E <i>Escherichia coli</i> : BACTÉRIAS SIMILARES COM PERFIS METABÓLICOS DISTINTOS.....	115
5.1. Introduction.....	116
5.2. Materials and Methods.....	118
5.2.1. Bacterial strain, growth medium, and culture conditions	118
5.2.2. Aerobic culture with glucose as carbon source	119
5.2.3. Aerobic culture with acetate as carbon source	120
5.2.4. Anaerobic culture	120
5.2.5. Analytical methods.....	120
5.2.6. Flux calculations.....	121
5.2.7. <i>In silico</i> analysis	123
5.3. Results and Discussion	123
5.3.1. <i>S. typhimurium</i> vs. <i>E. coli</i> aerobic metabolism	123
5.3.2. <i>S. typhimurium</i> vs. <i>E. coli</i> acetate metabolism.....	125
5.3.3. <i>S. typhimurium</i> vs. <i>E. coli</i> anaerobic metabolism.....	127
5.3.4. Quantitative comparison of <i>in silico</i> and experimental data for <i>S. typhimurium</i> metabolism	128
5.4. Conclusions.....	130
5.5. Literature Cited	132
5.6. Supplemental Material 1	140
6. ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS COM CARBONO MARCADO (¹³ C MFA)	143

6.1. Introdução.....	143
6.2. Material e métodos específicos	144
6.2.1. Cultivos contínuos com substrato marcado	144
6.2.2. Métodos analíticos	144
6.2.2.1. Determinação da marcação de ¹³ C nos aminoácidos constituintes da biomassa gerada nos cultivos contínuos com substrato marcado	144
6.2.2.1.1. Tratamento das amostras.....	145
6.2.2.1.2. Análises de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)	146
6.2.2.1.3. Análise dos dados obtidos por GC-MS.....	147
6.2.3. Análise do Fluxo Metabólico com marcação de ¹³ C (¹³ C MFA).....	150
6.3. Resultados	151
6.4. Referências	159
6.5. Apêndices	161
6.5.1. Apêndice 1	161
6.5.2. Apêndice 2	167
6.5.3. Apêndice 3	169
6.5.4. Apêndice 4	171
6.5.5. Apêndice 5	173
7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	179

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento das primeiras vacinas, em 1796, tem-se observado grandes avanços na área da saúde (ANDRÉ, 2003). Cada vez mais estudos e investimentos são realizados no desenvolvimento de novas formulações e, assim, levando à maior disponibilização de novas vacinas, contribuindo de forma expressiva para a redução da mortalidade mundial por doenças infecciosas, tais como pneumonia, gripe, tuberculose, difteria, varíola, coqueluche, sarampo, febre tifoide, entre outras doenças que até o início do século XIX foram as principais causas de morte e de uma baixa expectativa de vida (ANDRÉ, 2003; HILLEMANN, 1998; PLOTKIN e PLOTKIN, 2011; RAPPUOLI et al., 2014). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde de 2013, a vacinação é uma das intervenções de saúde mais bem sucedidas e de baixo custo, que vem salvando inúmeras vidas e que já possibilitou a erradicação de algumas doenças importantes, como a varíola, que teve seu último registro de ocorrência em 1977 (FEIJÓ e SÁFADI, 2006).

Neste sentido, nas últimas décadas, avanços biotecnológicos nos campos da biologia molecular, microbiologia, imunologia e da vacinologia têm permitido o desenvolvimento de novas estratégias para produção de inúmeras vacinas altamente eficazes e benéficas para a saúde humana e animal (RILEY e STEWART, 2013), sendo capazes de prevenir e até curar algumas doenças causadas por patógenos, além de câncer e doenças neurodegenerativas, como mal de Parkinson e de Alzheimer (DAVTYAN et al., 2014; FIORETTI et al., 2013; RAPPUOLI et al., 2014; SCHNEEBERGER et al., 2012; XU et al., 2014)

Além de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, esses avanços tecnológicos também possibilitaram o desenvolvimento de novas estratégias para administrar e apresentar estes antígenos para as células do sistema imune, tornando-as mais seguras, eficazes e polivalentes (SILVA, 1997). Dentre as plataformas para veiculação de vacinas mais utilizadas na atualidade, destacam-se as vacinas constituídas por microrganismos vivos ou atenuados (classificadas como vacinas de primeira geração), de subunidade antigênicas (vacinas de segunda geração) e vacinas de DNA (vacinas de terceira geração) (DINIZ e FERREIRA, 2010; PLOTKIN e PLOTKIN, 2011).

A utilização de microrganismos patogênicos atenuados tem sido muito estudada nos últimos anos (GALEN e LEVINE, 2001), já havendo algumas poucas vacinas licenciadas, como a vacina contra febre tifoide, conhecida como vacina Ty21a e constituída por células de

Salmonella typhi Ty2 atenuadas (WAHID et al., 2012); a vacina contra a tuberculose, conhecida como vacina BCG (Bacillus Calmette-Guerin), que utiliza bactérias atenuadas de *Mycobacterium bovis* (COPIN et al., 2014) e também uma vacina contra catapora, conhecida comercialmente como VARIVAX[®] que vem sendo utilizada na Europa desde 2003, apresentando, até hoje, ótimos resultados (GOULLERET et al., 2010).

Pertencendo ainda à categoria de vacinas atenuadas, os vetores bacterianos vivos constituem uma alternativa para a obtenção de vacinas com larga aplicabilidade, devido à facilidade de manipulação genética e à alta imunogenicidade (GENTSCHEV et al., 2002). Além disso, outras vantagens destes sistemas são: baixo custo de preparação (etapas complexas de purificação e a adição de adjuvantes não são requeridas, em contraste a outras tecnologias de produção de vacinas recombinantes); capacidade natural de induzir resposta imunológica mediada por células; possibilidade de administração por via oral ou nasal. Devido a essas características, sua aplicação é mais prática, com menor risco de reações adversas após a imunização e também menor custos de aplicação, além de estimular a resposta imune das mucosas, prevenindo, assim, a colonização dos tecidos que constituem a porta de entrada da maioria dos agentes infecciosos (DETMER e GLENTING, 2006; MCGHEE et al., 1992; SHATA et al., 2000).

Vários microrganismos vêm sendo utilizados para veicular antígenos recombinantes heterólogos, podendo ser microrganismos comensais, como *Streptococcus gordonii*, *Lactobacillus* spp, *Staphylococcus* spp, ou então patógenos atenuados, como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium bovis*, *Yersinia enterocolitica* e a *Salmonella* spp. Esta última tem se destacado como vetor bacteriano vivo, com vastas aplicações em medicina humana e veterinária na imunização contra diversas doenças infecciosas e não infecciosas (GALEN e CURTISS, 2014; KONG, CLARK-CURTISS e CURTISS III, 2013; MEDINA e GUZMÁN, 2001; ROSCH, TUOMANEN, MCCULLERS, 2014)

Entretanto, mesmo apresentando inúmeras vantagens, ainda há uma grande dificuldade de incorporar essa nova geração de vacinas de vetores vivos no mercado, devido à necessidade de realizar vários testes clínicos rigorosos, além de haver poucas pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de bioprocessos para sua produção em larga escala.

A escolha de estratégias de cultivo que permitam a obtenção de altas densidades celulares e elevadas produtividades é fundamental para a viabilidade econômica do processo de produção de vacinas baseadas em vetores bacterianos vivos. O conhecimento sobre o metabolismo desses organismos é um requisito para a seleção racional da estratégia de cultivo.

No caso específico de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium LT2 (*S. typhimurium* LT2), objeto de estudo deste trabalho, ainda há poucas informações disponíveis sobre os aspectos metabólicos de seu crescimento, o que dificulta o desenvolvimento de protocolos de cultivo em larga escala para produção de vacinas e outros produtos biotecnológicos de interesse, como a flagelina, polissacarídeo capsular Vi e lipossacarídeos (BRAGA et al., 2010; KOTHARI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

Uma área em crescente avanço na atualidade que auxilia a compreensão de sistemas biológicos complexos é a biologia de sistemas, na qual diferentes áreas (biologia, engenharia, informática, matemática) são integradas, de forma que as interações entre os vários componentes celulares possam ser interpretadas a partir de dados experimentais aliados às ferramentas de bioinformática, possibilitando ainda prever o comportamento do organismo em questão em diferentes condições ambientais (NANDIKOLLA et al., 2011; KITANO 2009). Para tanto, é possível utilizar as plataformas tecnológicas conhecidas como “ômicas”, que possibilitam a reconstrução de modelos metabólicos em escala genômica de diversos organismos, melhorando a compreensão do comportamento genótipo e fenótipo destes.

1.1. Objetivo

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar o metabolismo de *S. typhimurium* em cultivos contínuos para elucidação de seu perfil de produção de ácidos orgânicos em diferentes velocidades de crescimento, e comparação dos resultados experimentais com as previsões *in silico* do modelo STM_v1.0 (Thiele et al., 2011). A compreensão mais detalhada do metabolismo desta bactéria é importante para viabilizar o desenvolvimento de protocolos eficientes de cultivo da mesma, necessários para implementação de processos de produção das novas formulações vacinais em desenvolvimento utilizando células de *Salmonella*, e de outros produtos biotecnológicos relacionados. Os resultados obtidos deverão também ser utilizados para validar/aprimorar o modelo empregado, melhorando suas previsões e possibilitando sua utilização para otimizar as vias metabólicas de *S. typhimurium* por manipulação do seu genoma orientada pela Biologia de Sistemas.

1.2. Estrutura da tese

Esta tese está dividida em 7 capítulos. O capítulo 2, “REVISÃO BIBLIOGRÁFICA”, apresenta uma revisão da literatura pertinente ao conteúdo do trabalho,

abordando desde características da bactéria *Salmonella typhimurium*, com uma breve descrição do que há relatado sobre seu metabolismo e de sua aplicação biotecnológica e biomédica, até os conceitos da engenharia metabólica e suas principais ferramentas, como a análise dos fluxos metabólicos e o uso de modelos metabólicos em escala genômica.

No capítulo 3, “MATERIAL E MÉTODOS GERAIS” são descritos o procedimento experimental e as metodologias empregados para o desenvolvimento dos estudos realizados e apresentados nos capítulos subsequentes.

O capítulo 4, “ANÁLISE DO METABOLISMO DE *Salmonella typhimurium* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO”, aborda, de maneira tradicional, o estudo do metabolismo do carbono central da *S. typhimurium* LT2 a partir de dados obtidos em cultivos realizados em batelada, com quatro diferentes fontes de carbono, e em batelada-alimentada.

No capítulo 5, “DIFERENÇAS ENTRE *Salmonella typhimurium* E *Escherichia coli*: BACTÉRIAS SIMILARES COM PERFIS METABÓLICOS DISTINTOS” o metabolismo de *S. typhimurium* é estudado empregando ferramentas da Engenharia Metabólica e comparado ao da *E. coli*.

O capítulo 6 mostra a aplicação da metodologia de “ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS COM CARBONO MARCADO (^{13}C MFA)” para aprofundar o estudo do metabolismo central em *S. typhimurium*.

E, finalmente, no capítulo 7, “CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO” destacam-se os principais resultados obtidos neste trabalho, apresentando-se as conclusões e sugestões para a continuidade do trabalho.

1.3. Referências

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

BRAGA, C. J. et al. CD8+ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC_d flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1373-1382, 2010.

COPIN R, et al. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). **Vaccine**, v. 32, n. 45, p. 5998-6004, 2014.

DAVTYAN, H. et al. A dual vaccine against influenza and Alzheimer's disease failed to enhance anti- β -amyloid antibody responses in mice with pre-existing virus specific memory. **Journal of neuroimmunology**, v. 277, n. 1, p. 77-84, 2014.

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

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotechnology applied to the development of vaccines. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, 19, 2010.

FEIJÓ, R. B.; SÁFADI, M. A. P. Imunizações: três séculos de uma história de sucessos e constantes desafios. **Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 3, S1-S3, 2006.

FIORETTI, D. et al. *In vivo* DNA electrotransfer for immunotherapy of cancer and neurodegenerative diseases. **Current drug metabolism**, v. 14, n. 3, p. 279-290, 2013.

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

GALEN, J. E.; LEVINE, M. M. Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? **Trends in microbiology**, v. 9, n. 8, p. 372-376, 2001.

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.

GOULLERET, N. et al. Safety profile of live varicella virus vaccine (Oka/Merck): five-year results of the European Varicella Zoster Virus Identification Program (EU VZVIP). **Vaccine**, v. 28, n. 36, p. 5878-5882, 2010.

HILLEMANN, M. R. Six decades of vaccine development - a personal history. **Nature medicine**, v. 4, p. 507-514. 1998.

KITANO, H. Computational Systems Biology. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 206-210, 2002.

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.

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.

MCGHEE, J. R. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, v. 10, p. 75–88, 1992.

MEDINA, E.; GUZMÁN, C. A. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. **Vaccine**, v. 19, p. 1573–1580, 2001.

NANDIKOLLA, S. K. et al. Emerging Trends in Various Fields with Systems Biology Approach. **Journal of Computer Science and Systems Biology**, v. 13, n. 2, 2011.

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, n. 4, p. 575-584, 2011.

PLOTKIN, S. A.; PLOTKIN, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 889-893, 2011.

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.

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.

ROSCH, J. W.; TUOMANEN, E. I.; MCCULLERS, J. A. **Live, attenuated Streptococcus pneumonia strain and vaccine for protection against pneumococcal disease**. Washington, DC, United States. n. 20.140.314.812, 2014.

SCHNEEBERGER, A. et al. Vaccination for Parkinson's disease. **Parkinsonism and related disorders**, v. 18, S11-S13, 2012.

SILVA, C. L. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 3, 1997.

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

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.

WAHID, R. et al. Live oral typhoid vaccine Ty21a induces cross-reactive humoral immune responses against *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and *S. Paratyphi B* in humans. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 825-834, 2012.

World Health Organization (2013) Global Vaccine Action Plan 2011 - 2020. Disponível em: www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/
Acessado em 31/03/2015.

XU, X. et al. Effective Cancer Vaccine Platform Based on Attenuated *Salmonella* and a Type III Secretion System. **Cancer research**, v. 74, n 21, p. 6260-6270, 2014.

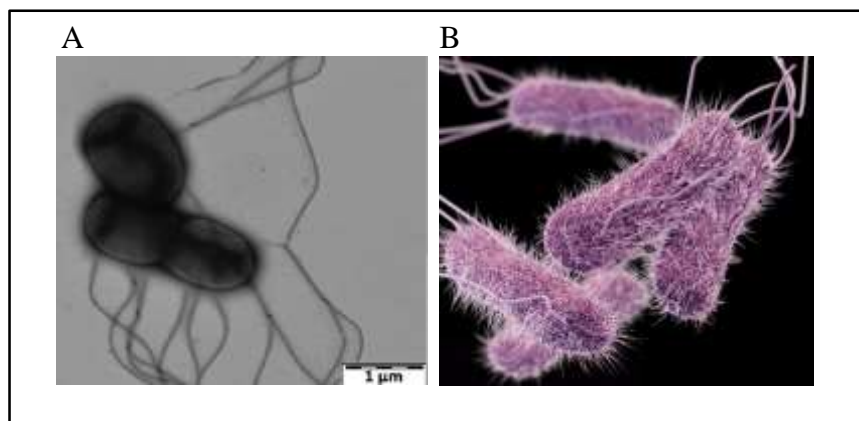
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais do gênero *Salmonella* spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* spp são consideradas um dos principais patógenos intracelulares, transmitidas por alimentos à humanos e animais, causando diversas infecções gastrointestinais, desde diarreia e vômitos até febre tifoide, que pode levar a morte (HENSEL, 2004).

Este gênero é proximamente relacionado aos gêneros *Escherichia* e *Shigella*, ambos pertencentes a família das *Enterobacteriaceae*. É caracterizado por apresentar bactérias na forma de bacilos, Gram-negativas, não-esporulantes, anaeróbias facultativos, com diâmetro médio entre 0,7 a 1,5 μm e comprimento de 2 a 5 μm , como mostra a Figura 2.1 (HEGAZY e HENSEL, 2012). Apresentam motilidade associada à presença de flagelos, que também auxiliam na fase inicial de colonização e por isso tem sido extensivamente estudados como um dos fatores de virulência (JOSENHANS e SUERBAUM, 2002; RAMOS, RUMBO e SIRARD, 2004; STECHER et al., 2004).

FIGURA 2.1 - Imagens de *Salmonella enterica*. A) Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de cepas selvagens de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. B) Representação tridimensional de cepas de *Salmonella typhi* baseada em imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



FONTE: Frahm e colaboradores (2015)^A e Centers for Disease Control and Prevention^B
(<http://www.cdc.gov/media/subtopic/library/diseases.htm>)

Estas bactérias apresentam crescimento ótimo a 37 °C e pH ótimo que varia entre 6,5 a 7,5, sendo que valores superiores a 9,5 e inferiores a 4,5 são bactericidas. São lactose e

sacarose negativas, podendo consumir mais de 70 compostos como fonte de carbono, como glicose, glicerol, maltose, sorbitol, xilose, havendo produção de CO₂, além de serem capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono (GUTNICK et al., 1969; LE MINOR 1992). Muitas são prototróficas, ou seja, capazes de crescer em meio mínimo de glicose-amônia, enquanto outras são auxotróficas e requerem enriquecimento do meio com aminoácidos ou vitaminas, como triptofano, cisteína e nicotinamida, de acordo com o sorotipo (NEIDHARDT et al., 1987).

Os organismos deste gênero são extremamente heterogêneos, com mais de 2600 sorotipos (KAUFMANN, RAUPACH e FINLAY, 2001). De acordo com o Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella*, da Organização Mundial da Saúde (Instituto Pasteur, Paris), baseando-se em características fenotípicas e genotípicas, este gênero, atualmente, é composto por duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, que incluem 2587 e 23 sorotipos, respectivamente (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A espécie *Salmonella enterica* é dividida em 6 subespécies (GUIBOURDENCHE et al., 2010), sendo que os sorotipos mais importantes para a saúde humana são: *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (*S. typhi*), um hospedeiro-específico que infecta apenas uma espécie, causadora de graves infecções sistêmicas como a febre tifoide em humanos (doença endêmica comum em muitos países em desenvolvimento – CRUMP et al., 2004; IVANOFF, LEVINE e LAMBERT, 1994) e a *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. typhimurium*), capaz de infectar um amplo número de hospedeiros (roedores, animais domésticos e humanos), considerada um dos agentes causadores das gastroenterites (GARMORY, BROWN e TITBALL, 2002).

2.1.1. Metabolismo da bactéria *Salmonella typhimurium* LT2

O genoma da *Salmonella 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 Mpb), sendo, um cromossomo com aproximadamente 4857 kb e uma grande região do cromossomo, de 94 kb, situadas nas ilhas de patogenicidade, que codificam vários fatores de virulência.

Sabe-se que a *Escherichia coli* é a *Enterobacteriaceae* mais próxima a *Salmonella*, compartilhando cerca de 85 % do seu genoma (ABUOUN et al., 2009; GÖTZ et al., 2010; MCCLELLAND et al., 2001), e por isso, ambos microrganismos apresentam grande similaridade em suas redes metabólicas, incluindo todos os 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.

As *Salmonellas* são capazes de assimilar vários compostos como fontes de carbono, como já mencionado no item 2.1, entretanto, a glicose é a preferida. Desta forma, a glicose é transportada para dentro das células através do sistema da fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente (PTS) e concomitantemente fosforilada, produzindo a glicose-6-fosfato (POSTMA, LENGELER e JACOBSON, 1993), para, então, ser oxidada pela via glicolítica, gerando, piruvato, energia e metabólitos intermediários que são utilizados em outras vias, ou então, oxidada por vias alternativas à glicólise, como a via das pentoses fosfato e a via Entner-Doudoroff (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006; NEIDHARDT et al., 1987).

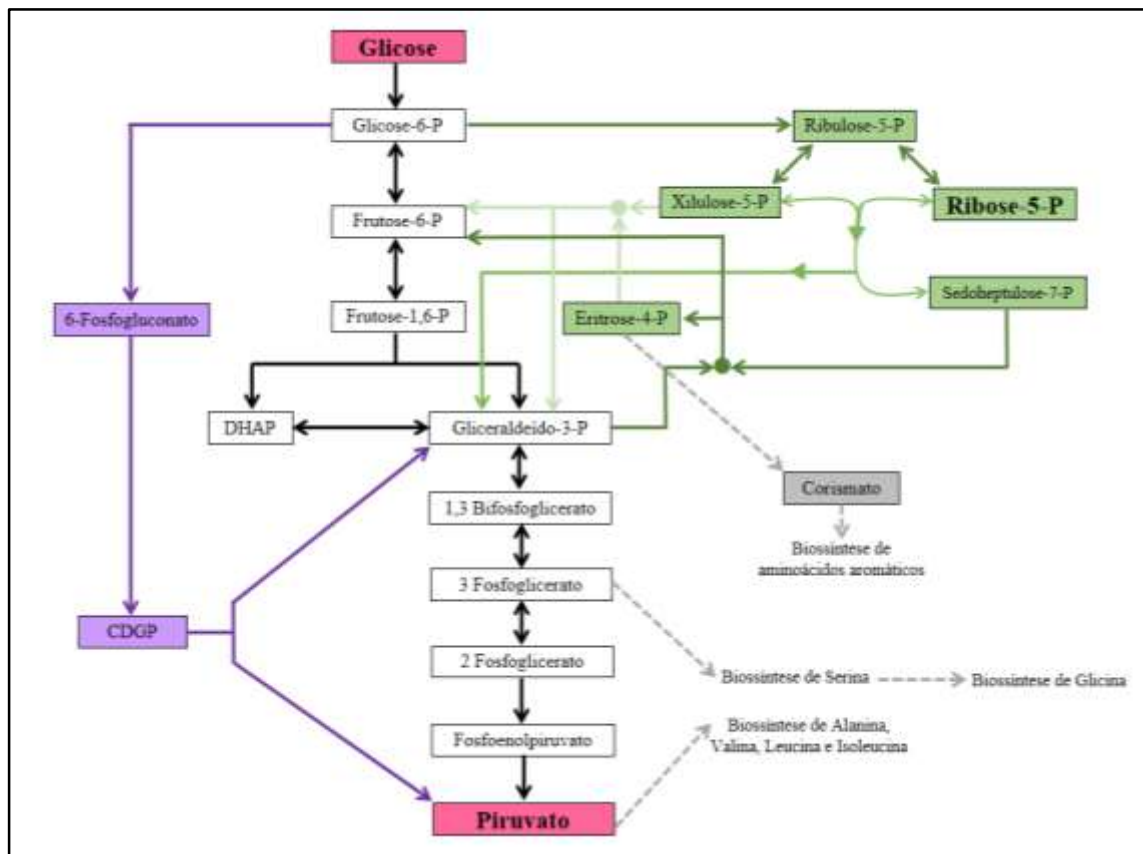
A via das PP é uma via alternativa de oxidação da glicose-6-fosfato, que converte hexoses em pentoses. Nela, é sintetizado o composto ribose-5-fosfato, componente estrutural de nucleotídeos e de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e precursor direto da biossíntese do aminoácido histidina, 2 moléculas de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo), fundamental nos processos de redução, 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 (CASPI et al., 2014).

A via ED é uma via presente, principalmente, em 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 (CASPI et al., 2014; FLAMHOLZ et al., 2013).

Já a GL, também conhecida como via de Embden-Meyerhof, é a principal via de oxidação da glicose, cujo produto final são duas moléculas de piruvato. Além disso, durante a GL, é gerada energia, conservada na forma de ATP (trifosfato de adenosina) e da coenzima reduzida NADH.

A integração dessas três vias de oxidação da glicose pode ser visualizada na Figura 2.2.

FIGURA 2.2 - Integração das três vias de oxidação da glicose em *Salmonella typhimurium* LT2. Em preto estão as reações da Glicólise, em verde, as da via das pentoses fosfato e em roxo as reações da via Entner-Doudoroff (DHAP, dihidroxiacetona fosfato; CDGP, 2-ceto-3-desoxi-6P-gluconato)



FONTE: Adaptado de Caspi e colaboradores (2014) e Tanabe e Kanehisa (2012)

Dependendo da disponibilidade de oxigênio dissolvido, o piruvato pode seguir a via respiratória (na presença de oxigênio) ou fermentativa (na ausência de oxigênio). De maneira geral, na respiração, há outras duas etapas para oxidação dos componentes e obtenção de energia, o TCA e a cadeia respiratória, enquanto na fermentação, o piruvato é convertido em diferentes ácidos orgânicos.

2.1.1.1. Metabolismo da *Salmonella typhimurium* LT2 na presença de oxigênio

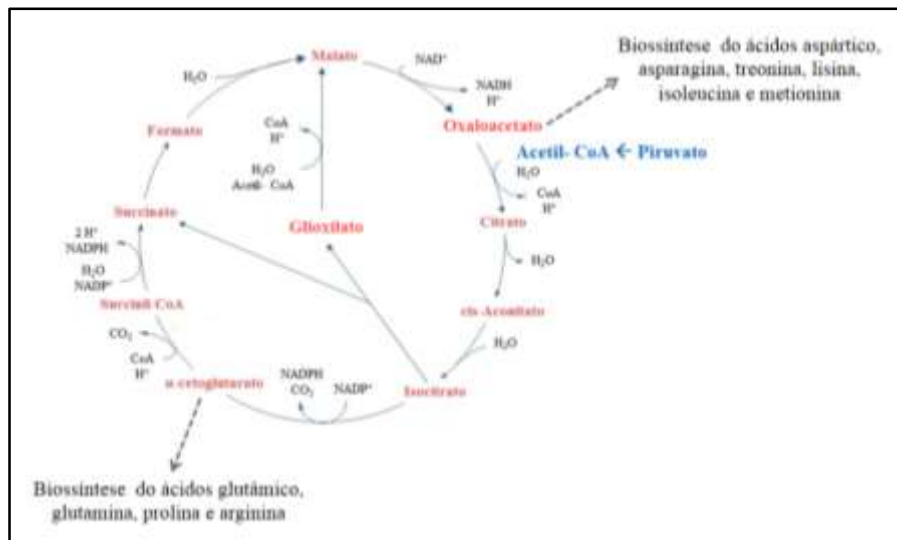
Em condições aeróbias, o piruvato é convertido a acetil-CoA e CO₂. Essa reação de descarboxilação e desidrogenação do piruvato é catalisada pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH - EC 1.2.4.1), composto por três enzimas, a piruvato desidrogenase (E₁ – que requer tiamina-pirofosfato), a di-hidrolipoil-transacetilase (E₂ – que requer ácido lipólico e coenzima A) e a di-hidrolipoil-desidrogenase (E₃ – que requer FAD e

NAD⁺), além de ser regulado por modificação covalente de E₁ pelas enzimas PDH-cinase e PDH-fosfatase, sendo que a fosforilação da enzima E₁ inibe o complexo PDH (DATTA, 1991; FROMM e HARGROVE, 2012; HARVEY e FERRIER, 2012).

O produto desta oxidação, o acetil-CoA, participa de inúmeras reações, seja como substrato ou como produto, podendo entrar no TCA, ou ser utilizado para produção de ácidos graxos ou acetato. Desta forma, o acetil-CoA é um componente-chave para a síntese de biomassa, para o equilíbrio redox e para o rendimento energético (CASTAÑO-CEREZO et al., 2009).

No TCA, o acetil-CoA é condensado com o oxaloacetato, pela ação da enzima citrato sintase (EC 2.3.3.1), produzindo citrato, e sendo convertido por uma série de reações bioquímicas, com liberação de CO₂, gerando energia, conservada na forma de coenzimas reduzidas, NADH e o FADH₂ (hidrogeno-flavina adenina dinucleotídeo), além de produtos intermediários para a síntese de aminoácidos, como mostra a Figura 2.3 (CASPI et al., 2014).

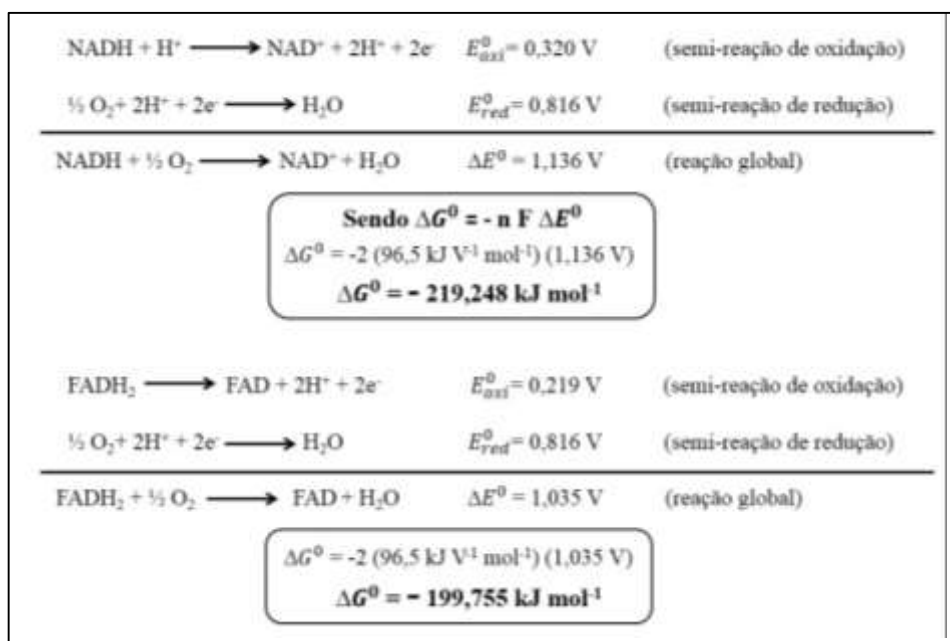
FIGURA 2.3 – Ciclo do ácido cítrico em *Salmonella typhimurium* LT2



FONTE: Adaptado de Caspi e colaboradores (2014) e Tanabe e Kanehisa (2012)

Os compostos altamente energéticos (as coenzimas reduzidas NADH e FADH₂) produzidos durante a degradação dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, sofrem uma série de oxidações na cadeia transportadora de elétrons. A fosforilação oxidativa envolve reações de oxi-redução (dupla redox), havendo uma combinação de duas meias reações, como mostra a Figura 2.4, onde o O₂ é reduzido a H₂O, a partir dos elétrons doados pelo NADH e FADH₂, liberando energia, na forma de ATP (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

FIGURA 2.4 – Reações redox que ocorrem durante a etapa de oxidação fosforilativa para produção de energia (ΔE^0 obtido em pH = 7,0 a 25 °C)

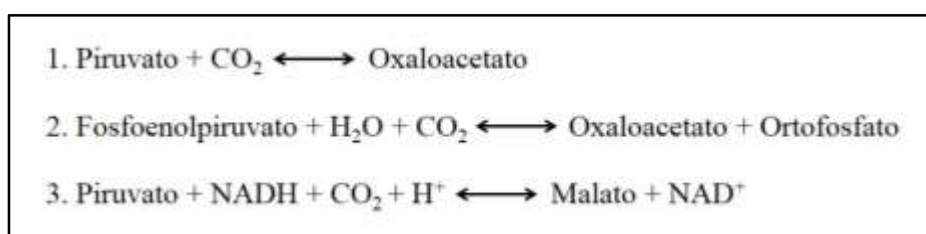


FONTE – Adaptado de Lehninger, Nelson e Cox (2006)

onde, ΔE^0 é o potencial padrão; ΔG^0 é a energia livre de Gibbs, n representa o número de elétrons transferidos na reação e F é a constante de Faraday = 96,5 kJ mol⁻¹).

Como já mencionado, produtos intermediários do TCA podem ser utilizados como precursores em vias biossintéticas, principalmente de aminoácidos. A reposição dos intermediários consumidos pode ser realizada pelas reações anapleróticas, a partir de carboidratos, permitindo a continuidade do TCA. Essas reações envolvem a restituição de malato e oxaloacetato, como mostra a Figura 2.5.

FIGURA 2.5 – Reações anapleróticas responsáveis pela renovação de compostos intermediários importantes no ciclo do ácido cítrico.



FONTE: Tanabe e Kanehisa (2012)

As salmonelas também possuem uma via alternativa de consumo de acetil-CoA, o ciclo do glioxilato. Enquanto no TCA o isocitrato é convertido em α -cetoglutarato (Figura 2.3), no ciclo do glioxilato, a enzima isocitrato liase cliva o isocitrato em succinato e glioxilato.

Este glioxilato é condensado com uma molécula de acetil-CoA, produzindo malato, em uma reação catalisada pela enzima malato sintetase. Em seguida, o malato é oxidado a oxaloacetato, que poderá se condensar com uma outra molécula de acetil-CoA, iniciando um outro ciclo (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

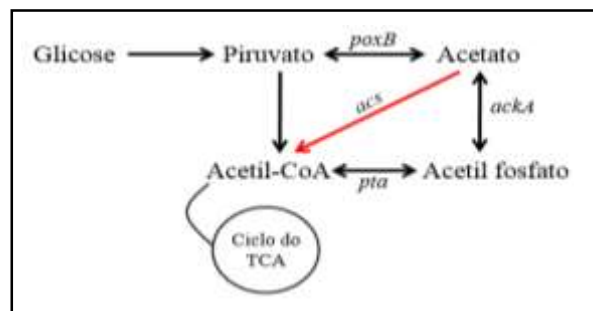
2.1.1.1.1. Produção de ácido acético em condições aeróbias

O acetil-CoA, produzido pela oxidação do piruvato, também pode ser convertido em acetato, mesmo em condições de aerobiose, fazendo com que haja uma menor produção de metabólitos intermediários e de coenzimas reduzidas pelo TCA (CASTAÑO-CEREZO et al., 2009, EITEMAN e ALTMAN, 2006).

Em cultivos de *E. coli* o acetato é o principal subproduto tóxico produzido, e por isso tem sido extensivamente estudado ao longo das últimas décadas (LEE, 1996; LULI e STROHL 1990; RENILLA et al., 2012; VEMURI et al., 2006; WOLFE, 2005), sendo produzido principalmente durante fases de rápido crescimento, em excesso de glicose. Esse fenômeno é conhecido como metabolismo *overflow* e é de grande importância para a indústria biotecnológica. Muitos estudos, com *E. coli*, indicam que concentrações relativamente baixas de acetato, como $0,5 \text{ g L}^{-1}$, já são capazes de reduzir a velocidade de crescimento e o rendimento em biomassa (BERNSTEIN, PAULSON, e CARLSON, 2012; DE MEY et al., 2007; SHILOACH e FASS, 2005; VALGEPEA et al., 2010). Além disso, o acetato afeta diversas proteínas e genes envolvidos nos processos de transcrição-tradução, e também interfere na síntese da metionina, um aminoácido essencial (ROE et al., 2002). De acordo com Renilla e colaboradores (2012), o acúmulo de acetato pode estar associado a um desequilíbrio entre os fluxos de produção e consumo de acetato.

A *S. typhimurium* e a *E. coli* possuem vias metabólicas tanto para produção de acetato, quanto para consumo, como mostra a Figura 2.6.

FIGURA 2.6 - Via metabólica de produção e re-assimilação de acetato por *E. coli*. *poxB*, piruvato desidrogenase; *ackA*, acetato quinase; *pta*, acetil fosfotransferase; *acs*, acetil coenzima-A sintetase



FONTE: Adaptado de Castaño-Cerezo e colaboradores (2009)

Muitos estudos sobre a assimilação do acetato por *E. coli* já foram realizados, entretanto, há muitas divergências em relação a esse assunto. Alguns consideram o complexo enzimático acetato quinase - acetil fosfotransferase (Ack-Pta) o principal responsável pelo consumo do acetato, ao utilizar glicose como fonte de carbono (KAKUDA et al., 1994). Por outro lado, 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 (mais do que 25 mM), a via responsável pelo consumo do acetato seria a Ack-Pta, mas se a concentração de acetato for baixa (abaixo de 10 mM), sua assimilação ocorrerá pela enzima Acs (KUMARI et al., 1995).

A produção e consumo de acetato por *Salmonella* ainda não foram estudadas em cenários variados. Starai e colaboradores (2005), avaliaram o comportamento de diferentes estirpes de *S. typhimurium*, em frascos agitados, incubados a 37 °C e 200 rpm, utilizando etanolamina como fonte de carbono, já que esta é usualmente liberada pelos hospedeiros da *Salmonella*. Estes estudos mostraram que a excreção do acetato é realizada pelas enzimas fosfotransacetilase (EutD) e a Ack, enquanto sua re-assimilação está associada com as enzimas Acs e Ack-Pta.

2.1.1.2. Metabolismo da *Salmonella typhimurium* LT2 na ausência de oxigênio

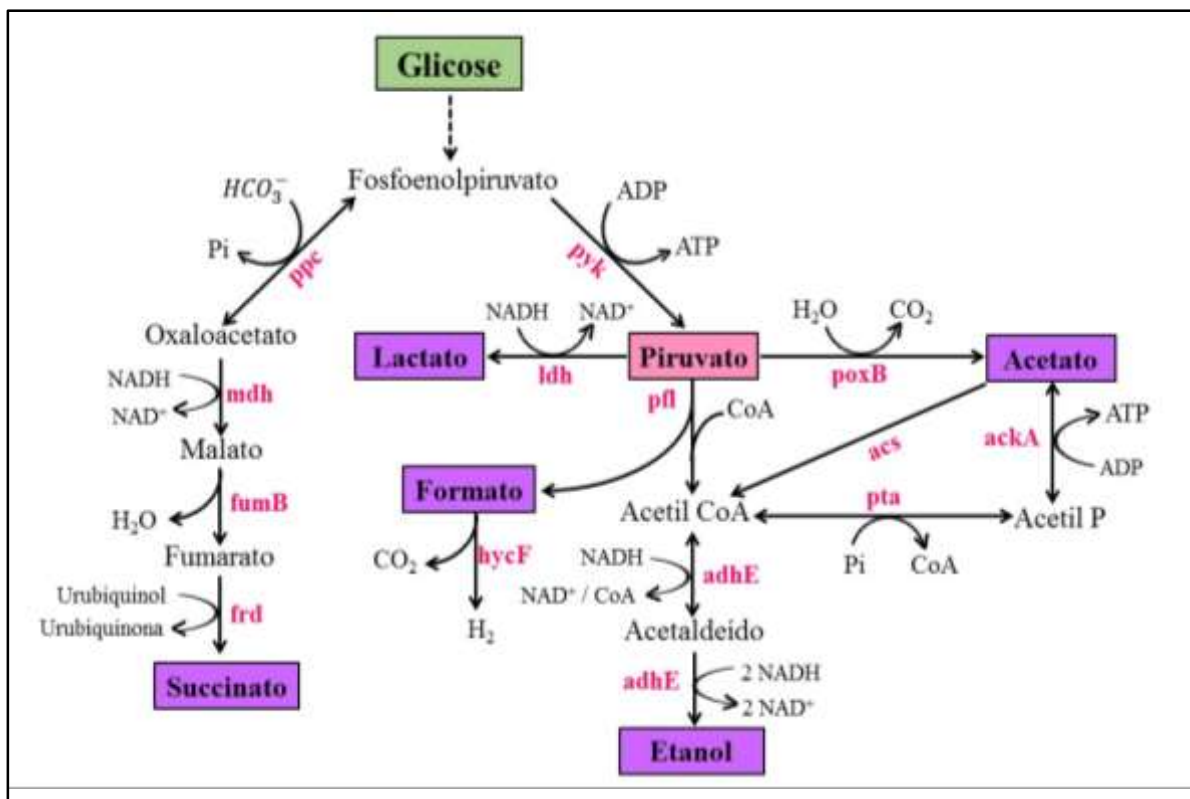
Como já mencionado, as bactérias do gênero *Salmonella* spp. são anaeróbias facultativas, ou seja, possuem genes que codificam enzimas tanto para o metabolismo respiratório quanto para o fermentativo, permitindo que a bactéria consiga sobreviver e se

replicar em *habitats* com ou sem oxigênio, havendo uma rápida mudança em seu metabolismo, dependendo da condição ambiental (YAMAMOTO e DROFFNER, 1985).

Driessen, Postma e Van Dam (1987) realizaram cultivos contínuos com glicose, como fonte limitante de carbono, de *S. typhimurium* PP418 e PP1705, em diferentes taxas de diluição (0,17; 0,25 e 0,33 h⁻¹), em condições de total anaerobiose. Os principais produtos obtidos pelos autores, para ambas as estirpes avaliadas, foram acetato, etanol, formato e pequenas quantidades de lactato e succinato, demonstrando que o gênero da *Salmonella* apresenta os mesmos padrões de fermentação ácido-mista de outras *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* (CLARK, 1989) e *Klebsiella aerogenes* (DE MATTOS e TEMPEST, 1983).

O metabolismo de *S. typhimurium* em anaerobiose pode ser visualizado na Figura 2.7. A ausência de O₂ ou de outros aceptores de elétrons exógenos, durante o crescimento da *Salmonella*, força as células a minimizarem a ação das enzimas do TCA, diminuindo drasticamente a geração de NADH (CLARK, 1989; WANG et al., 2010).

FIGURA 2.7 - Principais vias metabólicas durante a fermentação da glicose por *S. typhimurium*. Os genes indicados na figura e as enzimas correspondentes são detalhados na Tabela 2.1.



FONTE: Adaptado de Caspi e colaboradores (2014); Clark (1989) e Tanabe e Kanehisa (2012)

TABELA 2.1 – Principais genes envolvidos no metabolismo de *S. typhimurium* em anaerobiose

Gene	Número EC	Função
pyk	2.7.1.40	Piruvato quinase
ldh	1.1.1.27	Lactato desidrogenase
pfl	2.3.1.54	Piruvato formato liase
hycF	-	Formato hidrogenliase
adhE	1.2.1.10	Álcool desidrogenase
poxB	1.2.5.1	Piruvato desidrogenase
acs	6.2.1.1	Acetil coenzima-A sintetase
pta	2.3.1.8	Fosfato acetiltransferase
ackA	2.7.2.1	Acetato quinase
ppc	4.1.1.31	Fosfoenolpiruvato carboxilase
mdh	1.1.1.37	Malato desidrogenase
fumB	4.2.1.2	Fumarase B
frd	1.3.5.4	Fumarato redutase

FONTE: Adaptado de Caspi e colaboradores (2014) e Tanabe e Kanehisa (2012)

Nas condições em que o complexo multienzimático PDH é inativado (através da regulação da atividade deste complexo por fosforilação), o piruvato passa a ser convertido em acetil-CoA e formato através da ação da enzima piruvato formato liase (PFL), como mostra a Figura 2.7 (BERRÍOS-RIVERA et al., 2002; SINGH et al., 2006; WANG et al., 2010).

Alguns estudos afirmam que a enzima PFL é inativada na presença do oxigênio (KNAPPE e SAWERS, 1990; MAT-JAN, ALAM e CLARK, 1989; RASMUSSEN et al., 1991; WAGNER et al., 1992). Desta forma, em condições aeróbias, não seria possível observar produção de ácido fórmico. Entretanto, estudos mais recentes (ALEXEEVA et al., 2000; LEVANON, SAN e BENETTT, 2005) demonstram que a PFL e PDH podem estar simultaneamente ativas sob condições microaerófilas, ou seja, quando a concentração de oxigênio dissolvido é relativamente baixa.

Durante o processo fermentativo, o ATP é produzido quase que exclusivamente na etapa de glicólise. Desta forma, para que as células produzam quantidades suficientes de energia para sobrevivência e multiplicação celular, o piruvato e o acetil-CoA são utilizados como aceptores de elétrons, no lugar do O₂, sendo reduzidos a lactato e etanol, respectivamente. Assim, os NADHs produzidos na glicólise são reoxidados a NADs⁺ para que o equilíbrio redox da célula seja mantido. As enzimas responsáveis por manter esse equilíbrio redox são a piruvato formate liase (PFL), lactato desidrogenase (LDH), e álcool desidrogenase (ADHE), identificadas na Figura 2.7 e Tabela 2.1 (WANG et al., 2010).

Entretanto, nenhum desses aceptores de elétrons alternativos possui um potencial energético tão elevado quanto o do oxigênio, como mostra a Tabela 2.2, e por isso, a fermentação ácido-mista é sempre menos eficiente, em termos energéticos, do que a respiração, fazendo com que as velocidades de crescimento obtidas sejam muito menores do que as observadas quando os microrganismos anaeróbios facultativos estão na presença de O₂. (CLARK, 1989; LEHNINGER, NELSON e COX, 2006; WANG et al., 2010).

TABELA 2.2 – Comparação entre o potencial energético do oxigênio (condições aeróbias) e do piruvato e acetaldeído (condições anaeróbias).

Semi-reação	E ⁰ (Volts)
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	+ 0,816
Piruvato + 2H ⁺ + 2e ⁻ → Lactato	- 0,185
Acetaldeído + 2H ⁺ + 2e ⁻ → Etanol	- 0,197

FONTE: Lehninger, Nelson e Cox (2006)

2.2. *S. typhimurium e sua importância biotecnológica e biomédica*

Como já mencionado no item 2.1., 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 extensivamente estudados (KAUFMANN, RAUPACH e FINLAY, 2001). Por apresentar grande habilidade de invadir e de se replicar rapidamente nas células do hospedeiro, durante a década de 70, foram desenvolvidas linhagens atenuadas de *Salmonella* para serem utilizadas como vetores vacinais vivos capazes de prevenir salmonelose em animais e humanos (GERMANIER e FÜER, 1975).

Nas últimas décadas, linhagens recombinantes atenuadas de *Salmonella* estão sendo construídas como veículos vacinais vivos para a entrega de antígenos heterólogos (NAKAYAMA, KELLY e CURTISS III, 1988). Neste sentido, os sorotipos Typhi e Typhimurium vêm se destacando no campo da Vacinologia, sendo microrganismos largamente empregados como vetores bacterianos vivos (VBVs), *S. typhimurium* em camundongos e *S. typhi* em humanos (SHAHABI et al., 2010), constituindo uma promissora alternativa para a obtenção de vacinas mais efetivas, seguras e acessíveis.

Diversos estudos demonstram que linhagens atenuadas de *Salmonella* constituem um veículo potencial para a 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). Além disso, vacinas baseadas em VBVs são facilmente administradas via oral ou nasal, facilitando e tornando mais prática a aplicação da vacina, quando comparada com as tradicionais vacinas injetáveis (BRANGER et al., 2009) e apresentam baixo custo de preparação, sendo, assim, apropriadas para administração em larga escala (WANG et al., 2009).

As atenuações, essenciais para o desenvolvimento de linhagens de *Salmonella* como VBVs, baseiam-se em manipulações genéticas capazes de alterar vias metabólicas, impedindo que o microrganismo se multiplique no hospedeiro. Assim, a patogenicidade da linhagem é reduzida, mas mantendo sua imunogenicidade. Os genes responsáveis pela atenuação de *Salmonella* podem ser divididos em três grandes grupos: genes envolvidos com a síntese de fatores relacionados com a virulência, genes envolvidos com o metabolismo biossintético e genes que participam de processos de regulação gênica (ALMEIDA, MASSIS e FERREIRA, 2002).

De acordo com Cárdenas e Clements (1992), a maioria dos estudos que abordam a obtenção de linhagens atenuadas de *Salmonella* utilizam mutações em genes envolvidos na biossíntese de compostos aromáticos (*aro*), bloqueando a capacidade desses microrganismos de sintetizar compostos aromáticos, requeridos para a produção dos aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), enteroquelina (um composto quelante de ferro), folato, ubiquinona e vitamina K. Desta forma, as bactérias são incapazes de se reproduzir no hospedeiro, mas ainda são capazes de invadir o intestino delgado e permanecer por tempo suficiente para produzir o antígeno e provocar uma resposta imune eficaz (HONE et al., 1991; LEVINE et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2011; WILSON et al., 2003)

Atualmente, a única vacina licenciada baseada em linhagens atenuadas vivas de *Salmonella* é a Vivotif[®], criada inicialmente por Germanier e Fűr (1975) 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 *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 e que por muitos anos é uma das doenças que mais causa óbitos no mundo (JUÁREZ-RODRÍGUEZ et al., 2012), *Salmonella typhi* (GERMANIER e FÜER, 1975; 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., 2012; 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, nosso grupo de pesquisa, juntamente com pesquisadores dos Departamentos de Genética e Evolução e de Morfologia e Patologia / UFSCar, vêm se dedicando, desde de 2007, 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*. Assim, células de vivas de *S. typhimurium* SL3261 (com atenuação da virulência no gene *aroA*) transformadas com plasmídeo recombinante pMOhly1_spaA, foram administradas via intragástrica em camundongos de linhagem BALB/c.

Até o momento, a resposta imunológica e a eficiência de diferentes formulações baseadas no antígeno SpaA foram avaliadas em modelo murino. Silva (2011) e Camillo (2015) observaram que a linhagem vacinal recombinante de *S. typhimurium* é capaz de expressar e apresentar o antígeno heterólogo *in vivo*. Além disso, os animais vacinados produziram uma resposta humoral com a produção de anticorpos séricos IgG anti-rSpaA. Estes resultados positivos podem estar relacionados com o fato das linhagens de *Salmonella* serem boas carregadoras de antígenos heterólogos para o sistema imune de mamíferos, fazendo com que estes sistemas vacinais, em um futuro próximo, possam ser efetivamente utilizados como alternativa profilática para várias doenças infecciosas do homem e animais (ALMEIDA, MASSIS e FERREIRA, 2002).

Apesar de haver um grande interesse na produção de vacinas baseadas em linhagens recombinantes atenuadas de *Salmonella*, e também na produção da flagelina e componentes capsulares, ainda há poucos avanços no desenvolvimento de bioprocessos “*upstream*” que resultem em uma elevada produção de células de *Salmonella*, o que viabilizaria economicamente a produção destes produtos biotecnológicos de grande importância para a saúde humana e veterinária.

2.3. Produção em larga escala de diferentes organismos

A viabilidade técnica e econômica para produção de vacinas utilizando células de microrganismos vivos e atenuados depende de vários fatores, incluindo desde a eficiência da formulação até o rendimento e a produtividade do bioprocessos de cultivo da linhagem vacinal.

Assim, obtenção de altas concentrações celulares do organismo de interesse, em cultivos de curta duração, representa um fator importante para garantir um processo com elevado rendimento e produtividade, sem deixar de pensar no aspecto econômico deste bioprocessos, que deve apresentar baixo custo.

Para isto, Cultivos de Alta Densidade Celular (CADCs) vêm sendo largamente estudados e já utilizados em processos industriais para:

- (i) produção de proteínas heterólogas por *Escherichia coli* recombinante (BABAEIPOUR et al., 2007; FÜCHS et al., 2002; GLAZYRINA et al., 2012; MÄRKL et al., 1993; SARGO, 2011);
- (ii) produção de biocombustíveis por microalgas do gênero *Chlorella* spp. (DOUCHA e LÍVANSKÝ, 2012);
- (iii) produção de polímeros biodegradáveis, como o polihidroxialcanoato (PHA) por bactérias das espécie *Ralstonia eutropha* (HUSCHNER et al., 2015; RIEDEL et al., 2012) ou *Pseudomonas putida* (DAVIS et al., 2015);
- (iv) produção de probióticos a partir de leveduras como as espécies *Kluyveromyces lactis* (HUN et al., 2013) e de bactérias como *Lactobacillus salivarius* (DONG et al., 2014), entre vários outros exemplos.

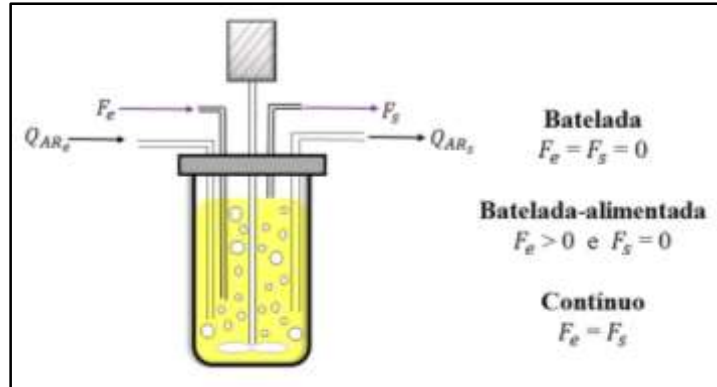
2.3.1. Diferentes modos de operação de um biorreator

Há três modos principais para se operar um biorreator: de maneira contínua (quimiostatos e turbidostato), semi-contínua (batelada-alimentada ou *fed-batch*) ou de maneira descontínua (batelada ou *batch*). A principal diferença entre essas três formas é a maneira como os nutrientes (meio de alimentação) são fornecidos.

Em cultivos descontínuos não há fornecimento de correntes contendo nutrientes e nem correntes de retirada de meio de cultura ao longo do cultivo. Por isso, o volume permanece aproximadamente constante. Já em reatores com operação semi-contínua (batelada alimentada), os substratos são adicionados continuamente ou intermitentemente sem intermitentemente sem correntes de retirada de caldo de cultivo, fazendo com que o volume de caldo aumente constantemente. Nos cultivos contínuos, o meio de alimentação é constantemente adicionado ao biorreator e o caldo de cultivo é removido à mesma vazão de alimentação, fazendo com que o volume de caldo no reator seja mantido constante (SHULER

e KARGI, 2002). A descrição esquemática destes três modos de operação pode ser observada na Figura 2.8.

FIGURA 2.8 – Modos de operação de um biorreator



No caso específico de CADC, a estratégia tipicamente adotada baseia-se na manutenção do crescimento exponencial durante a fase de alimentação posterior à batelada inicial. Essa estratégia possibilita o aumento da produtividade em 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). Entretanto, segundo Lee (1996), esta mesma técnica de cultivo pode ocasionar problemas de inibição por substrato, dificuldade de transferência de oxigênio e acúmulo de metabólitos inibitórios.

Neste sentido, diversos estudos já foram realizados com o intuito de minimizar a formação de metabólitos inibitórios em cultivos de alta densidade celular de diferentes microrganismos. Dentre as estratégias mais investigadas destacam-se: a otimização do meio de cultivo, incluindo a substituição da fonte de carbono preferencialmente assimilada por outras fontes de carbono; o controle adequado da velocidade de crescimento celular imposta pela vazão de alimentação, ou então, mais recentemente, o uso da engenharia metabólica para a criação de linhagens geneticamente modificadas, como mostra a Tabela 2.3.

TABELA 2.3 - Diferentes estratégias utilizadas para minimizar a produção de subprodutos inibitórios comumente formados em cultivos de alta densidade

Microrganismo	Subproduto inibitório	Estratégia utilizada	Biomassa (g _{DCW} L ⁻¹)	[Subproduto] (g L ⁻¹)	Produto de interesse	Referências
<i>Escherichia coli</i>	Ácido Acético	Otimização do meio de cultivos e substituição da glicose por glicerol no meio de cultivo em cultivos em batelada-alimentada	126	0	Proteína recombinante PspA3	SARGO (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JUL3	Etanol produzido em aerobiose com excesso de glicose	Mudanças na composição do meio (50 % de melão) e F (10 mL h ⁻¹) em cultivos em batelada alimentada	96,5	0	Biomassa	KIM et al. (2007)
<i>Bacillus subtilis</i> recombinante	Ácido propiônico	Diferentes velocidades de alimentação (através do controle da glicose residual) em cultivos em batelada-alimentada	184	4,4	β-galactosidase recombinante (129 U mL ⁻¹)	PARK et al. (1992)
<i>Pichia pastoris</i> recombinante	Metanol (substrato indutor)	Diferentes estratégias de alimentação de Glicerol/Metanol em cultivos em batelada-alimentada	50*	5	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (1334 U mL ⁻¹)	MINNING et al. (2001)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glicose	Otimização da estratégia de alimentação em cultivos em batelada-alimentada	116,2	0	Biomassa	WU e SHI (2007)
<i>Escherichia coli</i> VH33	Ácido Acético	Uso de engenharia metabólica para minimizar a produção de acetato em cultivos de <i>E. coli</i> em batelada-alimentada com glicose ($\mu_{\text{alim}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$)	40	0	DNA plasmidial (50 mg L ⁻¹)	SOTO et al. (2011)

*Em base massa seca de proteína

2.3.2. Cultivos de *Salmonella*

Poucos cultivos de *Salmonella* em biorreator são relatados na literatura. Dentre os relatados, os objetivos principais 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).

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

Desta forma, observa-se que até o momento não há estratégias otimizadas de cultivos em biorreator para se alcançar elevadas concentrações celulares de *Salmonella* e tampouco estudos específicos que avaliem a produção de proteínas recombinantes por este VBV.

Grande parte dos cultivos com *Salmonella* são realizados com meio complexo, cujas fontes de carbono e nitrogênio variam entre os trabalhos relatados (extrato de levedura, triptona, soytone, peptona, entre outros). O uso de meio complexo na maioria destes estudos é consequência das mutações realizadas para a obtenção de linhagens de *Salmonella* atenuadas, as quais envolvem a deleção de genes que codificam a biossíntese de compostos aromáticos (*aro*), sendo mais fácil cultivá-las em meios ricos, que contêm grande disponibilidade e variedade desses compostos aromáticos (SILVA 2011; OLIVEIRA et al., 2011, WILSON et al., 2003).

As temperaturas usualmente utilizadas em cultivos de *Salmonella* variam entre 30 a 37 °C e o pH inicial próximo de 7, seguindo as condições ótimas de crescimento deste microrganismo, já descritas no item 2.1.

SILVA (2011) realizou estudos com *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_spaA em frascos agitados, utilizando meio complexo, a fim de avaliar o crescimento deste mutante 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 ($\mu_{\text{máx}}$) 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 $12,7 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ 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. Na Tabela 2.4, pode-se observar os parâmetros cinéticos obtidos por Oliveira e colaboradores (2011) após 10 horas de cultivo.

TABELA 2.4 - Parâmetros cinéticos obtidos por Oliveira e colaboradores (2011) em cultivos em batelada de *S. typhimurium* SDV 322

Parâmetros Cinéticos	
Velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	$0,70 \pm 0,02$
Concentração celular, C_x ($\text{g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$)	$12,50 \pm 0,15$
Coefficiente de rendimento, $Y_{X/S}$ ($\text{g célula/g substrato}$)	$0,33 \pm 0,01$

FONTE: Adaptado de Oliveira e colaboradores (2011)

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, com meio complexo, conduzidos em diferentes pHs iniciais (4,4, 4,8, 5,0, e 7,0), para obter dados suficientes e gerar um modelo estequiométrico de crescimento com o intuito de 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*.

2.4. Engenharia metabólica

Os primeiros estudos para o melhoramento de diferentes organismos foram desenvolvidos através de vários processos iterativos de mutagêneses aleatórias aliados à seleção de mutantes capazes de otimizar o processo de obtenção do produto de interesse. Entretanto, estas diversas mutações podem produzir linhagens menos estáveis do que as selvagens (WENDISCH, BOTT e EIKMANN, 2006), apresentando deficiências no crescimento celular, baixa tolerância ao estresse e que também podem produzir subprodutos que limitem a eficiência do processo (BECKER et al., 2011), além de acarretarem um custo financeiro e de mão de obra muito elevado.

Assim, segundo Stephanopoulos, Aristidou e Nielsen (1998), uma alternativa para a produção de diferentes produtos por organismos geneticamente modificados (OGMs), de forma direcionada e eficiente, é a utilização da engenharia metabólica, que possibilita melhorar a formação de um produto de interesse, ou as propriedades celulares de um organismo, 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.

O termo engenharia metabólica foi criado por Bailey (1991), e a partir da década de 90 esse campo da Engenharia Bioquímica tem se mostrado extremamente eficiente no melhoramento genético de inúmeros organismos possibilitando:

- (i) minimizar a produção de algum metabólito indesejado como de acetato por *E. coli* (ARISTIDOU, SAN e BENNETT 1994; SOTO et al., 2011); glicerol por *S. cerevisiae*, aumentando a produtividade de etanol (GUO et al., 2011);
- (ii) aumentar a produtividade do produto de interesse como L-lisina (PARK et al., 2011), ácido fumárico (SONG et al., 2013) ou L-fenilalanina (WEINER et al., 2014) por *E. coli*;
- (iii) produzir um novo composto, como o ômega-3, através do design de vias metabólicas da levedura *Yarrowia lipolytica* (XUE et al., 2013).

A Tabela 2.5 mostra alguns produtos biotecnológicos obtidos em diferentes OGMs por meio da aplicação da Engenharia Metabólica.

TABELA 2.5 - Produtos industriais produzidos por organismos geneticamente modificados por engenharia metabólica

Categoria	Produto	Organismo produtor	Referência
Ácidos orgânicos	Ácido succínico	<i>E. coli</i>	YU et al., 2011
	Ácido succínico	<i>S. cerevisiae</i>	RAAB et al., 2010
	Ácido láctico	<i>E. coli</i>	YU et al., 2011
Vitaminas	Riboflavina	<i>E. coli</i>	LIN et al., 2014
Aminoácidos	L-treonina	<i>E. coli</i>	WANG et al., 2014
	L-tirosina	<i>E. coli</i>	JUMINAGA et al., 2012
	L-lisina	<i>C. glutamicum</i>	SCHNEIDER, NIERMANN e WENDISCH, 2011
	L-valina	<i>C. glutamicum</i>	OLDIGES, EIKMANN e BLOMBACH, 2014
Formulações vacinas	HMBPP	<i>S. typhimurium</i>	WORKALEMAHU et al., 2014
	DNA plasmidial	<i>E. coli</i>	BORJA et al., 2012
Polímeros	Melanina	<i>E. coli</i>	CHÁVEZ-BÉJAR et al., 2013
	Polihidroxicanoato	<i>P. putida</i>	POBLETE-CASTRO et al., 2013
Biocombustíveis	Bioetanol	<i>S. cerevisiae</i>	BRO, C. et al. 2006
	Butanol	<i>C. acetobutylicum</i>	LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011
	Isobutanol	<i>S. cerevisiae</i>	CHEN, X. et al. 2011b

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).

A engenharia metabólica vem ganhando cada vez mais destaque na obtenção de OGMs eficientes graças à rápida evolução de recursos analíticos e computacionais ao longo dos últimos 20 anos, voltados para análise de expressão gênica, quantificação de metabólitos intracelulares e extracelulares, detecção do carbono marcado e análise de vias metabólicas, como também na área de bioinformática, que disponibiliza inúmeras ferramentas que permitem a análise *in silico* do metabolismo do organismo de interesse.

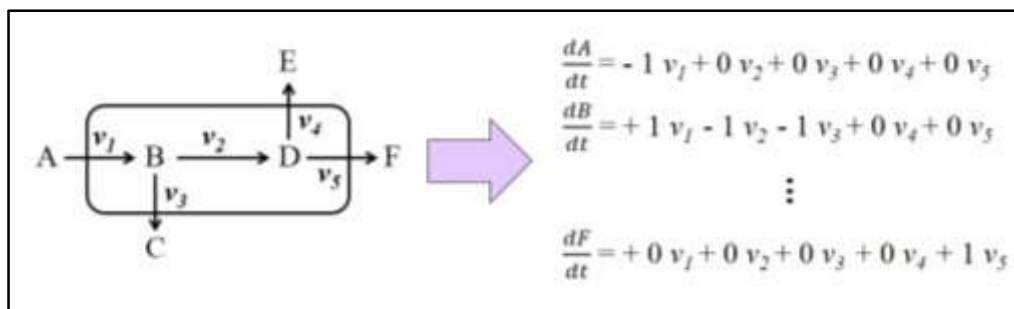
Para a análise das vias metabólicas que integram o metabolismo de um organismo, uma das ferramentas mais eficientes é a análise de fluxos metabólicos (MFA - **Metabolic Flux Analysis**).

2.4.1. Análise de fluxos metabólicos – MFA

Na análise de fluxos metabólicos, os fluxos internos de vias metabólicas podem ser estimados, sob condições definidas, fornecendo informações essenciais sobre os sistemas biológicos.

O MFA baseia-se na utilização de modelos estequiométricos (modelos que representam o metabolismo nas condições de estudo) e na aplicação do balanço de massa para aos metabólitos considerados (Figura 2.9). Estas informações somadas a dados experimentais de fluxos extracelulares (como consumo de substrato e de O₂ assim como produção de metabólitos e CO₂, entre outros) possibilitam a quantificação ou estimativa dos fluxos metabólicos internos.

FIGURA 2.9 - Representação de uma célula com suas reações (v_n) de degradação (A, B, D) e de produção (B, C, D, E, F) de metabólitos extracelulares e intracelulares e a aplicação do balanço de massa para estes metabólitos.



FONTE: Adaptado de Wittmann e Portais (2013)

A equação 2.1 mostra a representação matemática deste tipo de análise (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN 1998).

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v \quad (2.1)$$

em que $\frac{dX}{dt}$ é a variação da concentração dos metabólitos ao longo do tempo; v é o vetor de fluxos (que contém os fluxos a serem determinados) e S é a matriz estequiométrica (onde as linhas correspondem aos compostos e as colunas às reações – Figura 2.10).

Para este tipo de análise é necessário assumir que o volume do meio reacional é praticamente constante e que a concentração de todos os metabólitos intracelulares estão em estado-estacionário ou pseudo-estacionário (OTERO e NIELSEN, 2009), ou seja, não variam com o tempo do experimento (equação 2.2), condições características de cultivos contínuos, ou

quando as células estão em fase exponencial de crescimento (cultivo em batelada ou em batelada-alimentada) (WIECHERT, 2001).

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad \therefore S \cdot v = 0 \quad (2.2)$$

Desta forma, a representação dos balanços de massas dos metabólitos no estado-estacionário, em formato de matriz estequiométrica (S), pode ser melhor visualizado na Figura 2.10, seguindo o exemplo das reações representadas na Figura 2.9.

FIGURA 2.10 – Representação da equação 2.2 na forma matricial dos balanços de massas de metabólitos produzidos e consumidos em uma célula, no estado-estacionário

$$\begin{array}{l} \text{A:} \\ \text{B:} \\ \text{C:} \\ \text{D:} \\ \text{E:} \\ \text{F:} \end{array} \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

FONTE: Adaptado de Wittmann e Portais (2013)

A partir da equação 2.2, obtêm-se um sistema de equações lineares, que podem resultar em 3 tipos de sistemas:

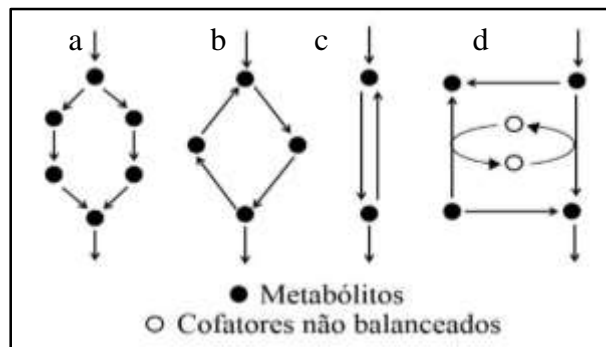
1. **Sistema determinado** (grau de liberdade = 0): quando o número de equações lineares é igual ao número de incógnitas (fluxos a serem determinados), ou seja, o conjunto de equações fornece uma única solução;
2. **Sistema indeterminado** (grau de liberdade > 0): quando o número de equações lineares é menor do que o número de fluxos a serem determinados, ou seja, o conjunto de equações fornece infinitas soluções;
3. **Sistema sobredeterminado** (grau de liberdade < 0): quando o número de equações lineares é maior do que o número de fluxos a serem determinados.

Geralmente, os modelos estequiométricos têm mais fluxos do que metabólitos, ou seja, há mais incógnitas do que equações lineares (sistema indeterminado). Wiechert (2001) destaca 4 motivos para essa indeterminação (Figura 2.11):

- muitos metabólitos podem ser produzidos por diferentes vias metabólicas (Figura 2.11 a);
- existência de alguns ciclos metabólicos (Figura 2.11 b);

- frequente existência de reações reversíveis (Figura 2.11 c);
- vias de divisão quando cofatores (NAD⁺, FADH, CoA, Cu²⁺) não estão balanceados (Figura 2.11 d).

FIGURA 2.11 - Problemas típicos em análises de MFA



FONTE: Adaptado de Wiechert (2001)

Desta forma, torna-se necessário impor algumas restrições a este sistema de forma que os fluxos possam ser estimados. Dentre as possíveis restrições pode-se destacar a medida experimental de fluxos externos (como consumo de substrato e produção de metabólitos facilmente quantificados), a utilização de programação linear (adotando uma função que force a solução do sistema para satisfazer um determinado objetivo - função objetivo).

Outra alternativa que vem sendo bastante utilizada para diminuir os graus de liberdade é a determinação da distribuição de alguns fluxos intracelulares por meio da realização de experimentos com substratos isotopicamente marcados.

2.4.1.1. Análise de fluxos metabólicos em experimentos com carbono marcado – ¹³C MFA

A análise dos fluxos metabólicos utilizando substrato marcado (¹³C MFA) é uma importante ferramenta já utilizada para a determinação dos fluxos internos das vias metabólicas diferentes tipos celulares como, por exemplo, de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*), fungos filamentosos (*Aspergillus niger*) e células animais (CHO) (GOMBERT e NIELSEN, 2000; NIKLAS, SCHNEIDER e HEINZLE, 2010).

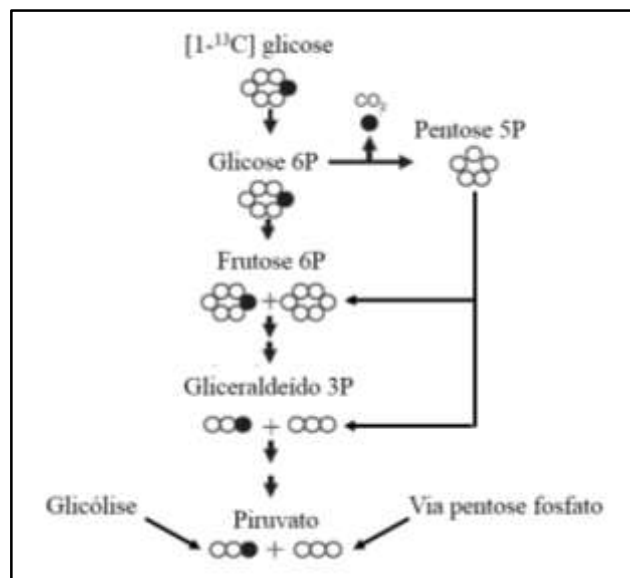
Esta técnica requer a combinação de dados experimentais obtidos em estado estacionário ou pseudo-estacionário, métodos analíticos específicos para detecção de compostos marcados isotopicamente, modelagem matemática e *software* adequados para o

cálculo dos fluxos intracelulares (RIASCOS, GOMBERT e PINTO, 2005; WITTMANN e PORTAIS, 2013).

Geralmente estes experimentos são realizados com meio mínimo, na presença de uma única fonte de carbono (ZAMBONI et al., 2009) e com alimentação de substrato marcado em 1 ou mais posições, como ^{13}C glicose (FISCHER, ZAMBONI e SAUER, 2004; LEIGHTY e ANTONIEWICZ, 2012), ^{13}C piruvato (JEFFREY et al., 2002), ^{13}C acetato (WENDISCH et al., 2000; ZHAO e SHIMIZU, 2003), ^{13}C glicerol (ZHANG, SHIMIZU e YAO, 2003), ^{13}C glutamina (METALLO, WALTHER e STEPHANOPOULOS, 2009), entre outras opções, dependendo do objetivo do experimento.

Os átomos de carbono marcados são então distribuídos em toda a rede metabólica, permitindo diferenciações nas marcações de acordo com a via metabólica que deu origem ao metabólito analisado. Por exemplo, as moléculas de piruvato produzidas na glicólise exibem um padrão de marcação diferente das moléculas de piruvato produzidas pela via das pentoses fosfato, como mostra a Figura 2.12 (ZAMBONI et al., 2009).

FIGURA 2.12 – Transição dos átomos de carbono na glicólise e via pentose fosfato ao utilizar $[1-^{13}\text{C}]$ glicose, sendo \circ carbono ^{12}C e \bullet carbono ^{13}C



FONTE: Adaptado de Wittmann, Hans e Heinzle (2002)

Neste tipo de técnica, os aminoácidos são geralmente medidos ao invés dos metabólitos intracelulares, já que os aminoácidos presentes nos extratos celulares ou na biomassa hidrolisada são mais abundantes do que seus precursores (CHRISTENSEN e NIELSEN 1999).

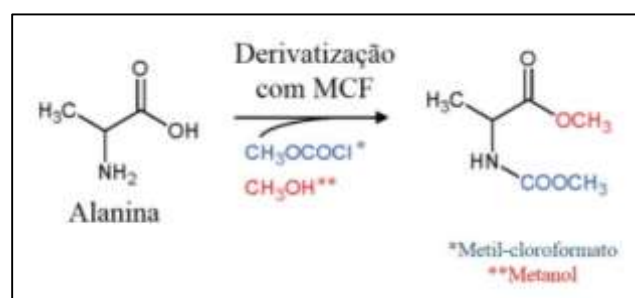
A análise dos aminoácidos marcados com ^{13}C é frequentemente realizada por técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR / Nuclear Magnetic Resonance) (CHEN et al., 2011a; JEFFREY et al., 2002; SAUER et al., 1997) ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS / Gas Chromatography – Mass Spectrometry) (CHRISTENSEN e NIELSEN 1999; GOMBERT et al., 2001; SCHELLENBERGER et al., 2012). Através destas técnicas é possível obter o padrão de marcação dos aminoácidos e relacioná-los com seus precursores.

Atualmente, a técnica de MS vem sendo a mais utilizada por apresentar elevado grau de sensibilidade e especificidade, e ao ser combinada com técnicas de separação, como cromatografia gasosa ou líquido (GC e LC, respectivamente), obtêm-se uma alta resolução cromatográfica e análises reprodutíveis (KVITVANG et al., 2011).

No caso de se utilizar a cromatografia gasosa, é necessário que os constituintes das amostras sejam voláteis e termicamente estáveis. Sendo assim, amostras hidrolisadas da biomassa, obtidas em cultivos com ^{13}C , devem passar por um processo de derivatização que tem a função de substituir os hidrogênios de grupos funcionais polares dos aminoácidos (como OH, NH_2 , e SH) por uma unidade não polar, aumentando a volatilidade dos aminoácidos, diminuindo sua polaridade e melhorando sua estabilidade (STENERSON, 2011).

A derivatização das amostras pode ser realizada por diversos agentes derivatizantes, sendo os agentes sililantes os mais comuns (NANCHEN, FUHRER, SAUER, 2007), como o TBDMS (tert-butil(dimetilsilil)) e o MTBSTFA (N-tert-butil(dimetilsilil)-N-(metil)-trifluoroacetamida). Contudo, outros agentes derivatizantes também vêm sendo muito utilizados, como o MCF (metil-cloroformato) (Figura 2.13), para converter os grupos aminos (RNH_2) das moléculas em ésteres voláteis (RCOOR), de forma que passem a adquirir as características necessárias para as análises por GC-MS (CARNEIRO et al., 2011; KVITVANG et al., 2011; SMART et al., 2010; VILLAS-BÔAS, et al., 2003).

FIGURA 2.13 - Derivatização da L-Alanina com metil-cloroformato (MCF)



FONTE: Adaptado de KVITVANG e colaboradores (2011)

Assim, a partir do padrão de marcação (na forma de isotopômeros – combinação de isômeros e isótopos - de posição, de massa ou marcações fracionárias – item 3.4.3.3.) e de modelos matemáticos é possível calcular os fluxos intracelulares (GOMBERT e NIELSEN, 2000; WIECHERT, 2011).

Alguns *software* já foram desenvolvidos para auxiliar a análise dos fluxos intracelulares, como o FiatFlux (ZAMBONI, FISCHER e SAUER, 2005), ¹³C-FLUX (WIECHERT et al., 2001) e OpenFLUX (QUEK et al., 2009). Em todos eles, utiliza-se dados de padrão de marcação dos aminoácidos obtidos em experimentos realizados com uma fração de ¹³C conhecida, dados experimentais de metabólitos extracelulares (velocidade de crescimento, consumo de substrato, produção de metabólitos e CO₂) e um modelo estequiométrico com a transição dos átomos do metabolismo do carbono central.

O *software* OpenFLUX (QUEK et al., 2009) vem sendo muito utilizado para a análise do metabolismo de diferentes organismos a partir de dados obtidos em experimentos com substratos isotopicamente marcados. Recentemente, Schatschneider e colaboradores (2014) utilizaram o OpenFLUX para estudar o metabolismo da glicose pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (importante patógeno de plantas) a partir da biomassa hidrolisada obtida em ensaios em shaker com 0,3 % de [1-¹³C]glicose, permitindo constatar que a via Entner–Doudoroff é a principal via responsável pelo catabolismo da glicose por esta bactéria. Também em 2014, Arifin e colaboradores puderam comparar o metabolismo da glicose e da sacarose por *Escherichia coli* W a partir da biomassa gerada em experimentos em frascos agitados utilizando 75 % [U-¹³C] e 25 % [1-¹³C] de glicose e 75 % [U-¹³C] e 25 % [1-¹³C] de sacarose. A partir destes experimentos observaram que houve grande diferença em relação ao crescimento celular ao utilizar estas duas fontes de carbono.

Com o auxílio do OpenFLUX, ou dos demais *software* já citados, é possível realizar a análise dos fluxos metabólicos com substrato marcado. A partir desta análise, pode-se gerar um mapa de distribuição de fluxos para inúmeras redes metabólicas, auxiliando na compreensão do funcionamento do metabolismo do organismo em questão, contribuindo na escolha das alterações genéticas necessárias para otimização das vias metabólicas de acordo com o objetivo desejado. Por estas razões essa ferramenta tem sido largamente aplicada em estudos de engenharia metabólica, biotecnologia, medicina e na indústria farmacêutica (BOGHIGIAN et al., 2010; LEIGHTY e ANTONIEWICZ, 2012).

2.4.2. Modelos metabólicos

A engenharia metabólica moderna faz uso de ferramentas de bioinformática para o desenvolvimento de estudos do metabolismo celular de diferentes organismos.

Já estão disponíveis sequências completas do genoma de inúmeros organismos, fato que permite obter informações para a reconstrução das redes metabólicas que podem ser utilizadas para analisar, interpretar e prever a distribuição dos fluxos metabólicos destes organismos. Com base nas informações dos genomas diversos modelos computacionais já foram construídos com o objetivo de representarem as vias metabólicas de muitos organismos, como mostra a Tabela 2.6.

Estes modelos, chamados de modelos metabólicos em escala genômica (**Genome-scale Metabolic Models - GSMMs**) são, de uma maneira geral, uma compilação das informações do metabolismo de um organismo extraídas a partir do genoma, complementadas com dados experimentais. As diversas vias metabólicas são mapeadas e desmembradas em suas respectivas reações e enzimas, correlacionando a informação genética com a fisiologia celular, e possibilitando análises detalhadas sobre os mecanismos moleculares de um organismo em particular, a partir de uma perspectiva da rede metabólica completa (FRANCKE, SIEZEN e TEUSINK, 2005). A correlação entre o genoma e o metabolismo é feita a partir de buscas em bancos de dados como o KEGG (TANABE e KANEHISA, 2012), MetaCyc (CASPI et al., 2014), BRENDA (BARTHELMES et al., 2007) entre outros.

De acordo com Nielsen (2009), a partir desses GSMMs é possível prever o comportamento de um organismo após sofrer determinadas modificações genéticas com o intuito de maximizar a formação de um produto de interesse ou a produção de biomassa, ou ainda minimizar a produção de algum metabólito tóxico à célula, em diferentes condições de crescimento.

TABELA 2.6 - Modelos metabólicos em escala genômica para diferentes organismos e suas respectivas características

Organismo	Genoma sequenciado	Características da rede metabólica					Referência	
		Reações	Metabólitos	Genes	Cobertura do genoma (%) ^a	Compartimentos		Identificação do modelo
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	627	438	660	15,6	Citoplasma, extracelular	<i>iJE660</i>	EDWARDS e PALSSON, 2000
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	931	625	904	21,3	Citoplasma, extracelular	<i>iJR904</i> GSM/GPR	REED et al., 2003
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	1339	1039	1260	29,7	Citoplasma, extracelular, periplasma	<i>iAF1260</i>	FEIST et al., 2007
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	1424	1136	1366	32	Citoplasma, extracelular, periplasma	<i>iJO1366</i>	ORTH et al., 2011
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	2286	1453	1445	-	Citoplasma, extracelular, periplasma	EcoCyc - 18.0 - GEM	WEAVER et al., 2014
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>H. pylori</i> 26695	388	403	291	18,5	Citoplasma, extracelular	<i>iCS291</i>	SCHILLING et al., 2002
	<i>H. pylori</i> 26695	476	485	341	21,6	Citoplasma, extracelular	<i>iIT341</i> GSM/GPR	THIELE et al., 2005
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i> LT2	879	754	1119	-	Citoplasma, extracelular	<i>iRR1083</i>	RAGHUNATHAN et al., 2009
	<i>S. typhimurium</i> LT2	1238	1035	945	-	Citoplasma, extracelular, periplasma	<i>iMA945</i>	ABUOUN et al., 2009
	<i>S. typhimurium</i> LT2	1463	1119	1270	-	Citoplasma, extracelular, periplasma	STM_v.1.0	THIELE et al., 2011

TABELA 2.6 - Continuação

Organismo	Genoma sequenciado	Características da rede metabólica						Referência
		Reações	Metabólitos	Genes	Cobertura do genoma (%) ^a	Compartimentos	Identificação do modelo	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> S288C	842	584	708	12,1	Citoplasma, extracelular, mitocôndria	<i>i</i> FF708	FÖRSTER et al., 2003
	<i>S. cerevisiae</i> S288C	1149	646	750	12,8	Citoplasma, extracelular, mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vacúolo, núcleo, peroxissoma	<i>i</i> ND750	DUARTE, HERRGÅRD e PALSSON 2004
	<i>S. cerevisiae</i> S288C	1446	1013	800	13,6	Citoplasma, extracelular, mitocôndria	<i>i</i> LN800	NOOKAEW et al., 2008
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P. putida</i> KT2440	950	911	746	-	Citoplasma, extracelular	<i>i</i> JN746	NOGALES, PALSSON e THIELE 2008
	<i>P. putida</i> KT2440	877	888	815	-	Citoplasma, extracelular	<i>i</i> JP815	PUCHALKA et al., 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> 168	1020	988	844	20,6	Citoplasma, extracelular	<i>i</i> YO844	OH et al., 2007b
	<i>B. subtilis</i> 168	563	456	534	13	Citoplasma, extracelular	<i>i</i> AG534	GOELZER et al., 2008
	<i>B. subtilis</i> 168	1443	1145	1103	26,8	Citoplasma, extracelular	<i>i</i> Bsu1103	HENRY et al., 2009

TABELA 2.6 - Continuação

Organismo	Genoma sequenciado	Características da rede metabólica					Referência
		Reações	Metabólitos	Genes	Cobertura do genoma (%) ^a	Compartimentos	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	1471	849	1006	-	Citoplasma, mitocôndria, peroxissoma, extracelular	<i>iAL1006</i> AGREN et al., 2003
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	846	739	726	16,5	Citoplasma, extracelular	GSMN-TB BESTE et al., 2007
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	939	828	661	15	Citoplasma, extracelular	<i>iNJ661</i> JAMSHIDI e PALSSON 2007
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1049	838	663	-	Citoplasma, extracelular	<i>iNJ661m</i> FANG, WALLQVIST e REIFMAN 2010
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	502	479	432	-	Citoplasma, extracelular	<i>iJL432</i> LEE et al., 2008
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	522	422	474	-	Citoplasma, extracelular	<i>iRS474</i> SENGER et al., 2008
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	794	707	490	-	Citoplasma, extracelular	<i>iCAC490</i> MCANULTY et al., 2012
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	1342	1137	802	-	Citoplasma, extracelular	<i>iCac802</i> DASH et al., 2014
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. lactis subsp. lactis</i> II1403	621	422	358	30,6	Citoplasma, extracelular	<i>iAO358</i> OLIVEIRA, NIELSEN e FÖRSTER 2005
	<i>L. lactis subsp. cremoris</i> MG1363	754	650	518	-	Citoplasma, extracelular	<i>iNF518</i> FLAHAUT et al., 2013

^aDados obtidos em Otero e Nielsen (2009).

Na Tabela 2.6 é possível observar que apesar de muitos GSMMs já estarem disponíveis, nota-se que estas reconstruções metabólicas ainda representam apenas parcialmente o metabolismo microbiano, como indica a baixa porcentagem de cobertura do genoma (OTERO e NIELSEN, 2009), prejudicando as predições destes modelos com relação ao comportamento de um organismo.

No caso específico da *S. typhimurium*, quatro modelos em escala genômica foram publicados: *iRR1083* (ABUOUN et al., 2009), *iMA945* (RAGHUNATHAN et al., 2009), *STM_v.1.0* (THIELE et al., 2011) cujas diferenças podem ser observadas na Tabela 2.6 e o *MetaSal* (HARTMAN et al., 2014).

Os três primeiros modelos não são inteiramente independentes entre si, sendo que os dois primeiros modelos (*iRR1083* e *iMA945*) foram derivados do modelo metabólico *iAF1260* para *Escherichia coli* K-12 MG1655 (FEIST et al., 2007), enquanto o *STM_v.1.0* foi gerado entre o consenso dos modelos *iRR1083* e *BRecon* (este último ainda não publicado).

Já o modelo recentemente publicado por Hartman e colaboradores (2014), foi baseado em dados bioquímicos de *S. typhimurium* normalizados e disponíveis na base de dados *BioCyc* (KARP, PALEY e ROMERO 2002), sendo este, um modelo derivado diretamente da notação genômica da *Salmonella*, facilitando a identificação das associações entre genes, enzimas e reações auxiliando, também, a comparação com outros organismos encontrados na mesma base de dados. Além disso, para este modelo determinou-se experimentalmente a composição da biomassa (aminoácidos e nucleotídeos) em cultivos de *S. typhimurium* LT2 com meio mínimo e glicose como fonte de carbono, diferentemente dos outros modelos.

No entanto, além desses modelos apresentarem um baixo grau de cobertura em relação ao genoma, o grau de validação deles também é muito reduzido, principalmente por falta de dados experimentais de *Salmonella typhimurium* LT2 obtidos em condições controladas e reprodutíveis. Assim sendo, para que estes modelos possam ser plenamente utilizados para as diversas aplicações possíveis, sua validação e eventuais adequações são necessárias.

2.4.3. *Software* para engenharia metabólica – Optflux

A construção de inúmeros modelos metabólicos em escala genômica para diferentes organismos vem estimulando o desenvolvimento de *software* que possibilitem a avaliação de dados, simulação, previsão e otimização *in silico* dos sistemas metabólicos de interesse.

Neste contexto, Rocha e colaboradores (2011) desenvolveram uma ferramenta computacional com interface amigável para usuários da área de biotecnologia que não sejam especialistas em bioinformática, mas que desejam fazer uso de métodos informáticos para aplicações em Engenharia Metabólica.

O software livre Optflux foi elaborado pelo grupo de pesquisa BiSBII (Bioinformatics and Systems Biology Interdisciplinary Initiative – Universidade do Minho/Portugal), juntamente com a empresa SilicoLife, estando em constante atualização, com a implementação de novas ferramentas e algoritmos, para melhorar as predições do metabolismo de linhagens selvagens e mutantes em diferentes condições ambientais, a partir de modelos metabólicos em escala genômica. Com o Optflux é possível realizar a otimização de linhagens com base no *knock out* de reações e/ou genes visando à produção de um produto metabólico de interesse. Para isso, podem ser utilizados diferentes métodos de simulação, como FBA (Flux Balance Analysis), pFBA (*parsimonious* Flux Balance Analysis) MOMA (Minimization of Metabolic Adjustment) ou ROOM (Regulatory on/off minimization), e também diferentes métodos de otimização (como Algoritmos Evolucionários e Simulated Annealing) para alcançar o melhor conjunto de deleções de genes para uma função objetivo desejada (ROCHA et al., 2010).

O Optflux tem sido utilizado para obtenção de mutantes eficientes na produção de etanol e D-lactato por *E. coli* por Mienda e colaboradores (2014) e Mienda, Shamsir e Salleh (2015), respectivamente.

Porém, para que as análises *in silico* realizadas com o software Optflux gerem resultados consistentes e coerentes, é necessário que os modelos metabólicos empregados sejam baseados em dados experimentais que permitam estabelecer a estequiometria da reação de conversão da fonte de carbono em biomassa, CO₂ e em subprodutos. Para tanto, cultivos em meio definido, operados em estado estacionário (quimiostatos) são requeridos.

Como já mencionado, embora as técnicas de clonagem e expressão usando *S. typhimurium* como VBV estejam estabelecidas, seu genoma já esteja completamente sequenciado e existam, até o momento, quatro modelos metabólicos em escala genômica disponíveis para este microrganismo, ainda não foi relatado na literatura a utilização de análise de fluxos metabólicos aplicada a essa bactéria, havendo, assim, necessidade de dados experimentais para validação destes modelos e posterior otimização de mutantes para a produção de diferentes produtos metabólicos.

2.5. Referências

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.

AGREN, R. et al. The RAVEN toolbox and its use for generating a genome-scale metabolic model for *Penicillium chrysogenum*. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 3, e1002980, 2013.

ALEXEEVA, S. et al. Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4934-4940, 2000.

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.

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.

ARIFIN, Y. et al. *Escherichia coli* W shows fast, highly oxidative sucrose metabolism and low acetate formation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 21, p. 9033-9044, 2014.

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.

BARTHELMES, J. et al. BRENDA, AMENDA and FRENDA: the enzyme information system in 2007. **Nucleic Acids Research**, v. 35, suppl 1, D511-D514, 2007.

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.

BERNSTEIN, H. C.; PAULSON, S. D.; CARLSON, R. P. Synthetic *Escherichia coli* consortia engineered for syntrophy demonstrate enhanced biomass productivity. **Journal of biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 159-166, 2012.

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.

BESTE, D. J. et al. GSMN-TB: a web-based genome-scale network model of *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. **Genome biology**, v. 8, n. 5, R89, 2007.

BHUTTA, Z. et al. Background Paper on Vaccination against Typhoid Fever using New-Generation Vaccines, 2007.

http://www.who.int/immunization/sage/SAGE_Background_paper_typhoid_newVaccines.pdf
(Acessado em 11/08/2015).

BOGHIGIAN, B. A. et al. Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 2, p. 81-95, 2010.

BOLHASSANI, A.; ZAHEDIFARD, F. Therapeutic live vaccines as a potential anticancer strategy. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 8, p. 1733-1743, 2012.

BORJA, G. M. et al. Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 132, 2012.

BRAGA, C. J. et al. CD8⁺ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC_d 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.

BRO, C. et al. *In silico aided metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for improved bioethanol production*. **Metabolic engineering**, v. 8, n. 2, p. 102-111, 2006.

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.

CAMILLO, L. Efeito da imunização com vacina do antígeno recombinante de superfície SpaA de *Erysipelothrix rhusiopathiae* - modelo murino. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado) - Departamento Genética Evolutiva E Biologia Molecular. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

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.

CARNEIRO, S. et al. Metabolic footprint analysis of recombinant *Escherichia coli* strains during fed-batch fermentations. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 3, p. 899-910, 2011.

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.

CHÁVEZ-BÉJAR, M. I. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 108, 2013.

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.

CHEN, X. et al. Synergy between ¹³C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 1, p. 38-48, 2011a.

CHEN, X. et al. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 21, 2011b.

CHIN'OMBE, N. Recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a vaccine vector for HIV-1 Gag. **Viruses**, v. 5, p. 2062-2078, 2013.

CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Isotopomer analysis using GC-MS. **Metabolic engineering**, v. 1, n. 4, p. 282-290, 1999.

CLARK, D. P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 63, n. 3, p. 223-234, 1989.

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.

DASH, S. et al. Capturing the response of *Clostridium acetobutylicum* to chemical stressors using a regulated genome-scale metabolic model. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 144, 2014.

DATTA, A. Characterization of the inhibition of *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex by pyruvate. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 176, n. 1, p. 517-521, 1991.

DAVIS, R. et al. High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 725-733, 2015.

DE MATTOS, M. T.; TEMPEST, D. W. Metabolic and energetic aspects of the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glucose in anaerobic chemostat culture. **Archives of microbiology**, v. 134, n. 1, p. 80-85, 1983.

DE MEY, M. et al. Comparison of different strategies to reduce acetate formation in *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 5, p. 1053-1063, 2007.

DONG, Z. et al. Optimization for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 2, p. 230-236, 2014.

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.

DRIESSEN, M.; POSTMA, P. W.; DAM, K. Energetics of glucose uptake in *Salmonella typhimurium*. **Archives of microbiology**, v. 146, p. 358-361, 1987.

DUARTE, N. C.; HERRGÅRD, M. J.; PALSSON, B. Ø. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. **Genome research**, v. 14, n. 7, p. 1298-1309, 2004.

EDWARDS, J. S.; PALSSON, B. O. *The Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5528-5533, 2000.

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

FANG, X.; WALLQVIST, A.; REIFMAN, J. Development and analysis of an *in vivo*-compatible metabolic network of *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC systems biology**, v. 4, n. 160, 2010.

FEIST, A. M. et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. **Molecular systems biology**, v. 3, n. 121, 2007.

FISCHER, E.; ZAMBONI, N.; SAUER, U. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography–mass spectrometry derived ¹³C constraints. **Analytical biochemistry**, v. 325, n. 2, p. 308-316, 2004.

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.

FLAHAUT, N. A. et al. Genome-scale metabolic model for *Lactococcus lactis* MG1363 and its application to the analysis of flavor formation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 19, p. 8729-8739, 2013.

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

FÖRSTER, J. et al. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. **Genome research**, v. 13, n. 2, p. 244-253, 2003.

FRAHM, M. et al. Efficiency of conditionally attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy. **mBio**, v. 6, n. 2, e00254-15, 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.

FROMM, H. J.; HARGROVE, M. Essentials of biochemistry. In: _____. **The Tricarboxylic Acid Cycle**. Springer Science & Business Media, 2012, p. 206-209.

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.

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.

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.

GOELZER, A. et al. Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. **BMC systems biology**, v. 2, n. 20, 2008.

GOMBERT, A. K.; NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 180-186, 2000.

GOMBERT, A. K. et al. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1441-1451, 2001.

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.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica ilustrada. In: _____. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012. p. 109-115.

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, 179-180, 2003.

HENRY, C. S. et al. *iBsu1103*: a new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, R69, 2009.

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.

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.

HUN, C.H. et al. Bioprocess development for high cell mass production of the probiotic yeast *Kluyveromyces lactis*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 8, p. 49-59, 2013.

HUSCHNER, F. et al. Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 165-172, 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.

JAMSHIDI, N.; PALSSON, B. Ø. Investigating the metabolic capabilities of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using the *in silico* strain iNJ661 and proposing alternative drug targets. **BMC systems biology**, v. 1, n. 26, 2007.

JEFFREY, F. M. H., et al. ¹³C Isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 300, n. 2, p. 192-205, 2002.

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.

KARP, P. D.; PALEY, S.; ROMERO, P. The pathway tools software. **Bioinformatics**, v. 18, suppl 1, S225-S232, 2002.

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.

KNAPPE, J.; SAWERS, G. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 75, n. 4, p. 383-398, 1990.

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.

KVITVANG, H. F. et al. Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 7, p. 2705-2711, 2011.

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, J. et al. Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 849-862, 2008.

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.

LEIGHTY, R. W.; ANTONIEWICZ, M. R. Parallel labeling experiments with [U-¹³C] glucose validate *E. coli* metabolic network model for ¹³C metabolic flux analysis. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 5, p. 533-541, 2012.

LEVANON, S.; SAN, K. Y.; BENNETT, G. N. Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 5, p. 556-564, 2005.

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.

LIN, Z. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2014.

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.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1004-1011, 1990.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 634-647, 2011

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.

MAT-JAN, F.; ALAM, K. Y.; CLARK, D. P. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 1, p. 342-348, 1989.

MÄRKEL, H. et al. Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p. 48-52, 1993.

MCANULTY, M. J. et al. Genome-scale modeling using flux ratio constraints to enable metabolic engineering of clostridial metabolism *in silico*. **BMC systems biology**, v. 6, n. 42, 2008.

MCCLELLAND, M. et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.

METALLO, C. M.; WALTHER, J. L.; STEPHANOPOULOS, G. Evaluation of ^{13}C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. **Journal of biotechnology**, v. 144, n. 3, p. 167-174, 2009.

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.

MIENDA, B. S. et al. *In silico* metabolic engineering interventions of *Escherichia coli* for enhanced ethanol production, based on gene knockout simulation. **IIOAB Journal**, v. 5, n. 2, p. 16-23, 2014.

MIENDA, B. S.; SHAMSIR, M. S.; SALLEH, F. M. *In silico* Evaluation of the Effect of pfl Gene Knockout on the Production of D-lactate by *Escherichia coli* Genome Scale Model using the OptFlux Software Platform. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 172-177, 2015.

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.

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. **Bio/Technology**, 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.

NIKLAS, J.; SCHNEIDER, K.; HEINZLE, E. Metabolic flux analysis in eukaryotes. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 63-69, 2010.

NOGALES, J.; PALSSON, B. Ø.; THIELE, I. A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: *iJN746* as a cell factory. **BMC systems biology**, v. 2, n. 79, 2008.

NOOKAEW, I. et al. The genome-scale metabolic model *iIN800* of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. **BMC Systems Biology**, v. 2, n. 71, 2008.

OH, M. K. et al. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13175-13183, 2007a.

OH, Y. K. et al. Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 39, p. 28791-28799, 2007b.

OLDIGES, M.; EIKMANN, B. J.; BLOMBACH, B. Application of metabolic engineering for the biotechnological production of L-valine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 13, p. 5859-5870, 2014.

OLIVEIRA, A. P.; NIELSEN, J.; FÖRSTER, J. Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. **BMC microbiology**, v. 5, n. 39, 2005.

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.

ORTH, J. D. et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism — 2011. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 535, 2011.

OTERO, J. M.; NIELSEN, J. Industrial systems biology. **Biotechnology and bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 439-460, 2010.

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. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 19, p. 7797-7802, 2007.

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.

POBLETE-CASTRO, I. et al. *In-silico*-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. **Metabolic engineering**, v. 15, p. 113-123, 2013.

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.

PUCHALKA, J. et al. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. **PLoS Computational Biology**, v. 4, n. 10, e1000210, 2008.

QUEK LE, et al. OpenFLUX: efficient modelling software for ¹³C-based metabolic flux analysis. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 25, 2009.

RAAB, A. M. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 6, p. 518-525, 2010.

RAGHUNATHAN, A. et al. Constraint-based analysis of metabolic capacity of *Salmonella typhimurium* during host-pathogen interaction. **BMC systems biology**, v. 3, n. 38, 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.

RASMUSSEN, L. J.; MØLLER, P. L.; ATLUNG, T. Carbon metabolism regulates expression of the pfl (pyruvate formate-lyase) gene in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6390-6397, 1991.

REED, J. L, et al. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). **Genome Biology**, v. 4, n. 9, R54, 2003.

RENILLA, S. et al. Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2109-2124, 2012.

RIASCOS, C. A.; GOMBERT, A. K.; PINTO, J. M. A global optimization approach for metabolic flux analysis based on labeling balances. **Computers & chemical engineering**, v. 29, n. 3, p. 447-458, 2005.

RIEDEL, S. L. et al. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 1, p. 74-83, 2012.

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

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. et al. OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering. **BMC System Biology**, v. 5, n. 45, 2010.

ROE, A. J. et al. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. **Microbiology**, v. 148, p. 2215–2222, 2002.

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

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.

SAUER, U. et al. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 448-452, 1997.

SCHATSCHNEIDER, S. et al. Metabolic flux pattern of glucose utilization by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: prevalent role of the Entner–Doudoroff pathway and minor fluxes through the pentose phosphate pathway and glycolysis. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 10, p. 2663-2676, 2014.

SCHELLENBERGER, J. et al. Predicting outcomes of steady-state ¹³C isotope tracing experiments using Monte Carlo sampling. **BMC systems biology**, v. 6, n. 9, 2012.

SCHILLING, C. H.; PALSSON, B. Ø. Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genome-scale pathway analysis. **Journal of theoretical biology**, v. 203, n. 3, p. 249-283, 2000.

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.

SCHNEIDER, J.; NIERMANN, K.; WENDISCH, V. F. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of biotechnology**, v. 154, n. 2, p. 191-198, 2011.

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.

SENGER, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 1036–1052, 2008.

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.

SHAHABI, V. et al. A. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 235-239, 2010.

SHILOACH, J.; FASS R. Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 5, p. 345-357, 2005

SHULER, M. L.; KARGI, F. How cells grow. In:____. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. Nova York: Prentice Hall PTR, Inc, 2007. p. 155–206.

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.

SINGH, R. et al. Expression of the pfl Gene and Resulting Metabolite Flux Distribution in nuo and ackA-pta *E. coli* Mutant Strains. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 3, p. 898-902, 2006.

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.

SMART, K. F. et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 10, p. 1709-1729, 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.

STENERSON, K. K. The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GC-MS. **Sigma Aldrich Reporter US**, v. 25, n. 3, 2011.

TANABE, M.; KANEHISA, M. Using the KEGG database resource. **Current Protocols in Bioinformatics**, p. 1-12, 2012.

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.

VEMURI, G. N. et al. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 72, n. 5, p. 3653-3661, 2006.

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

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 322, n. 1, p. 134-138, 2003.

WAGNER, A. F. et al. The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 3, p. 996-1000, 1992.

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.

WEAVER, D. S. et al. A genome-scale metabolic flux model of *Escherichia coli* K-12 derived from the EcoCyc database. **BMC systems biology**, v. 8, n. 79, 2014.

WENDISCH, V. F. et al. Quantitative determination of metabolic fluxes during co-utilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 11, p. 3088-3096, 2000.

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.

WIECHERT, W. ¹³C metabolic flux analysis. **Metabolic engineering**, v. 3, n. 3, p. 195-206, 2011.

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.

WITTMANN, C.; HANS, M.; HEINZLE, E. *In vivo* analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS. **Analytical biochemistry**, v. 307, n. 2, p. 379-382, 2002.

WITTMANN, C.; PORTAIS, J. C. Metabolic Flux Analysis. In: LÄMMERHOFER, M.; WECKWERTH, W. **Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 1. ed. 2013, p. 287-312.

WOLFE, A. J. The acetate switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 12-50, 2005.

WORKALEMAHU, G, et al. Metabolic engineering of *Salmonella* vaccine bacteria to boost human V γ 2V δ 2 T cell immunity. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 2, p. 708-721, 2014.

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.

YAMAMOTO, N.; DROFFNER, M. L. Mechanisms determining aerobic or anaerobic growth in the facultative anaerobe *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 7, p. 2077-2081, 1985.

YU, C. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 573-583, 2011.

ZAMBONI, N.; FISCHER, E.; SAUER, U. FiatFlux—a software for metabolic flux analysis from ¹³C-glucose experiments. **BMC bioinformatics**, v. 6, n. 209, 2005.

ZAMBONI, N. et al. ¹³C-based metabolic flux analysis. **Nature protocols**, v. 4, n. 6, p. 878-892, 2009.

ZHANG, H.; SHIMIZU, K.; YAO, S. Metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose, glycerol or acetate by ¹³C-labeling experiments. **Biochemical engineering journal**, v. 16, n. 3, p. 211-220, 2003.

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.

ZHAO, J.; SHIMIZU, K. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 101-117, 2003.

www.cdc.gov/media/subtopic/library/diseases.htm (Acessado em 15/01/2015).

www.crucellvaccinescanada.com (Acessado em 31/05/2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

Neste capítulo está descrito todo o material, metodologias e tratamentos matemáticos empregados em comum aos estudos apresentados nos capítulos 4, 5 e 6. A parte experimental específica, utilizada em cada capítulo, será abordada separadamente e com mais detalhes no capítulo pertinente.

3.1. *Microrganismo*

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a linhagem selvagem de *Salmonella typhimurium* LT2 adquirida no banco de culturas “Salmonella Genetic Stock Centre - SGSC” da Universidade de Calgary (Canadá).

3.2. *Meios de cultivo*

O meio utilizado para plaqueamento do estoque congelado de *S. typhimurium* LT2 foi o meio complexo 2xYT-ágar (“2 x Yeast extract, Tryptone”), contendo (por L): 10 g de extrato de levedura, 16 g de triptona, 5 g de NaCl e 15 g de ágar.

Já os cultivos em biorreator foram conduzidos com meio mínimo M9-modificado, definido, contendo uma única fonte de carbono (ROCHA e FERREIRA 2002), como mostram as Tabela 3.1 a Tabela 3.3.

TABELA 3.1 - Composição do meio mínimo M9-modificado

Componentes	Concentração (por L)	Solução
Fonte de Carbono	(ver capítulos 4, 5 ou 6)	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

FONTE: Adaptado de Rocha e Ferreira (2002)

A composição das soluções de traços de vitaminas minerais é fornecida nas Tabela 3.2 e Tabela 3.3, respectivamente.

TABELA 3.2 – Composição da solução de traços de vitaminas

Componentes	Concentração (g/L)
Riboflavina	0,42
Ácido pantotênico	5,4
Ácido nicotínico	6,1
Piridoxina	1,4
Biotina	0,06
Ácido fólico	0,042

TABELA 3.3 - Composição da solução de traços de minerais

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

As fontes de carbonos utilizadas e suas respectivas concentrações variaram entre 5,5 e 100 g L⁻¹ de acordo com os cultivos em biorreator realizados (mais detalhes nos Capítulos 4, 5 e 6).

Para o preparo do meio M9-modificado, a fonte de carbono foi solubilizada em água destilada (solução 1 - Tabela 3.1) e esterilizada separadamente das soluções 2 (composta somente por sais - Tabela 3.1) e 4 (anti-espumante - PPG 30 % v/v). Essas 3 soluções foram autoclavadas, por 20 minutos à 121 °C. Já a solução 3 foi esterilizada por filtração em membrana estéril de PVDF com 22 µm de porosidade (GVS), evitando a degradação destes componentes.

3.3. Preparo de cultura estoque

A cepa recebida foi reativada em tubos Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio 2xYT (item 3.2), incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 12 horas. Após a reativação, a suspensão de células foi transferida com auxílio de uma alça de platina para placas de Petri contendo meio 2xYT-ágar (item 3.2), incubadas em estufa a 30 °C. Após o crescimento das colônias por, cerca de 24 horas, uma única colônia foi ressuspensa em um tubo Falcon contendo 10 mL de meio 2xYT e novamente cultivadas sob as condições já descritas anteriormente. Ao atingir uma densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) próxima a 1,0 (fase de crescimento exponencial), interrompeu-se o cultivo e todo o caldo foi

centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 5 mL de meio 2xYT e glicerol (volume e concentração adequados para se obter uma suspensão com 10 % v/v de glicerol). Alíquotas de 1 mL da suspensão resultante foram distribuídas em 10 criotubos e armazenadas a - 80 °C para uso posterior.

3.4. Cultivos em biorreator

3.4.1. Pré-inóculo

A partir do criotubo estocado a - 80 °C (item 3.3), estriou-se placas de Petri com meio 2xYT-ágar. Após 24 horas incubadas a 30 °C, uma colônia isolada de *S. typhimurium* LT2 foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, contendo 10 mL de meio 2YT. Iniciou-se, assim, a etapa de pré-inóculo, padronizada para todos os cultivos realizados. O tubo 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.

3.4.2. Inóculo

Nesta etapa, transferiu-se parte do pré-inóculo para 2 ou 3 frascos de Erlenmeyers de 500 mL contendo de 80 a 100 mL de meio M9-modificado (dependendo do cultivo realizado).

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 fosse sempre em torno de 0,1 a 0,2.

3.5. Métodos analíticos

Ao longo de todos os cultivos, amostras foram retiradas para análises de crescimento celular e quantificação do consumo de substrato e produção de metabólitos extracelulares. Além disso, nos experimentos realizados com substrato marcado, a biomassa obtida também foi recolhida para posterior análise da marcação dos aminoácidos constituintes da biomassa produzida pelo microrganismo em diferentes condições.

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 (DO_{600nm}), bem como por medidas de massa seca.

As medidas de massa seca foram feitas através da filtração a vácuo de um volume conhecido de caldo de cultivo em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 μm (UNIFIL), previamente pesadas. A membrana com a biomassa foi submetida a 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 (g_{DCW}). A concentração celular (C_X em $g_{DCW} L^{-1}$) foi estimada a partir da correlação linear gerada pelas medidas de DO_{600nm} e massa seca obtidas em todos os experimentos realizados neste trabalho (equações 3.1 e 3.2).

$$C_X = 0,39 \pm 0,01 * DO_{600nm} \text{ (experimentos com glicose, glicerol ou xilose como fontes de carbono)} \quad (3.1)$$

$$C_X = 0,36 \pm 0,01 * DO_{600nm} \text{ (experimentos com ácido acético como fonte de carbono)} \quad (3.2)$$

3.5.2. Determinação de açúcares 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 ou etanol. Para isto, utilizou-se uma coluna de troca iônica (coluna Aminex HPX-87H - Bio-Rad), a 60 °C, com H_2SO_4 (5 mM) como fase móvel e vazão de 0,6 $mL min^{-1}$.

A produção de ácidos orgânicos (acético, fórmico, succínico, láctico, pirúvico, entre outros ácidos listados no Anexo 1 (Tabela 3.5) 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 e o etanol produzido foram analisados pelo detector de índice de refração diferencial (Waters 410).

A concentração de glicose também foi determinada pelo método enzimático glicose-oxidase (GOD-PAP, Laborlab, Brasil)

3.6. Procedimento de cálculos

Neste trabalho foram realizados vários cultivos em biorreator sob diferentes modos de operação. Todos eles podem ser considerados isotérmicos, homogêneos, com pH constante, onde apenas a fonte de carbono foi o substrato limitante ao crescimento celular.

A partir dos resultados obtidos de concentração celular (C_X), fração molar de CO_2 e O_2 , concentração de fonte de carbono e metabólitos foi possível estimar os fluxos de consumo de substratos e de O_2 assim como de produção de biomassa, metabólitos e CO_2 para os diferentes cultivos realizados. O cálculo dos fluxos (equação 3.3) foi baseado na estimativa das velocidades de consumo de substrato ou formação de produto, obtidas a partir do balanço de material para cada componente, dependendo do modo de operação empregado (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998).

$$q_i = \frac{r_i}{C_X} \quad (3.3)$$

onde:

q_i é fluxo de consumo ou produção do componente i (substrato, subprodutos, 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 $\text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{L}^{-1}$.

3.6.1. Balanço de material

O balanço de material geral de um componente i é dado pela equação 3.4

$$\frac{F}{V} \cdot m_{i_s} = \frac{F}{V} \cdot m_{i_0} \pm r_i \cdot V - \frac{d(m_i)}{dt} \quad (3.4)$$

onde:

m_{i_s} é a massa do componente i na corrente de saída

m_{i_0} é a massa do componente i na corrente de entrada

r_i é a velocidade de consumo ou produção do componente i

Através do balanço de material geral (equação 3.4), pode-se obter o balanço para cada componente, dependendo do modo de operação realizado (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU e NIELSEN, 1998), como mostra a Tabela 3.4.

TABELA 3.4 – Balanço de célula, de substrato, de produto e de CO₂ para diferentes modos de operação do reator

	Modo de operação		
	Batelada	Batelada-alimentada	Contínuo (estado estacionário)
Balanço de célula (x)	$r_X = \frac{d(m_X)}{dt} \cdot \frac{1}{V}$	$r_X = \frac{d(C_X)}{dt} + C_X \frac{F}{V}$	$r_X = D \cdot C_{X_S}$
Balanço de substrato (s)	$r_S = -\frac{d(m_S)}{dt} \cdot \frac{1}{V}$	$r_S = \frac{F}{V} \cdot (C_{S_0} - C_S) - \frac{d(C_S)}{dt}$	$r_S = D \cdot (C_{S_0} - C_{S_S})$
Balanço de produto (p)	$r_P = \frac{d(m_P)}{dt} \cdot \frac{1}{V}$	$r_P = \frac{d(C_P)}{dt} + C_P \frac{F}{V}$	$r_P = D \cdot C_{P_S}$

A partir das expressões para determinar as velocidades de consumo ou produção dos componentes apresentadas na Tabela 3.4 é possível calcular os respectivos fluxos (equação 3.3).

3.6.1.1. Balanço de carbono

O balanço de carbono foi utilizado para observar a consistência dos dados obtidos de concentração celular, consumo de substrato e produção de metabólitos e CO₂.

Para os cultivos contínuos, a recuperação do carbono (C_{rec}) foi calculada com os dados obtidos durante a fase estacionária, onde a vazão molar em C-moles h⁻¹ na entrada (proveniente da fonte de carbono presente no meio de alimentação) é igual ao vazão molar total em C-moles h⁻¹ na saída (presente nas células, substrato não consumido e metabólitos formados, incluindo o CO₂). Assim a recuperação do carbono, nesta condição, foi calculada a partir da equação 3.5.

$$C_{rec}(\%) = 100 \cdot \frac{\frac{F \cdot C_{substrato}}{MM_{substrato}} + \frac{F \cdot C_{biomassa}}{MM_{biomassa}} + \frac{F \cdot C_{metabólito}}{MM_{metabólito}} + \dot{n}_{CO_2}}{\frac{F \cdot C_{substrato}^0}{MM_{substrato}}} \quad (3.5)$$

onde F é a vazão volumétrica de alimentação ($L h^{-1}$), C_i é a concentração do componente i ($g L^{-1}$), $n CO_2$ é a vazão molar de CO_2 ($mol h^{-1}$), $C_{substrato}^0$ é a concentração de substrato no meio de alimentação ($g L^{-1}$) e MM_i é a massa molar da fórmula elementar do componente i (no caso da composição elementar da biomassa, utilizou-se a fórmula determinada para *E. coli* - $CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24}$ - BNID 101800, MILO et al., 2010)

Já para os cultivos em batelada, o cálculo é similar, entretanto foi feito em diferentes tempos do cultivo, de forma que a somatória do número de C-moles de carbono no tempo 0 equivale a $C_{rec} = 100\%$. Nos demais tempos do cultivo a C_{rec} é a razão entre a somatória do número de C-moles de carbono no tempo i e no tempo 0, como mostram as equações 3.6 e 3.7.

$$C_{rec}^{t=0} = 100 \cdot \frac{C_{substrato}}{MM_{substrato}} + \frac{C_{biomassa}}{MM_{biomassa}} + \frac{C_{metabólito}}{MM_{metabólito}} + n CO_2 = 100\% \quad (3.6)$$

$$C_{rec}^{t=i}(\%) = \frac{100 \cdot \frac{C_{substrato}}{MM_{substrato}} + \frac{C_{biomassa}}{MM_{biomassa}} + \frac{C_{metabólito}}{MM_{metabólito}} + n CO_2}{C_{rec}^{t=0}} \quad (3.7)$$

3.6.2. Determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ)

A velocidade específica de crescimento celular é definida por meio de um balanço de massa representado pela equação 3.8, sabendo-se que em todos os cultivos realizados neste trabalho não houve biomassa na corrente de alimentação ($F \cdot C_{X_0} = 0$).

Massa produzida	=	Massa no efluente	+	Variação de massa no reator
-----------------	---	-------------------	---	-----------------------------

$$\mu \cdot C_X \cdot V = F \cdot C_{X_S} + \frac{d(C_X \cdot V)}{dt} \quad (3.8)$$

Através da regra da derivada da multiplicação, pode-se calcular o de μ para todos os cultivos realizados (equação 3.9).

$$\mu = \frac{F \cdot C_{X_S}}{V \cdot C_X} + \frac{1}{C_X} \frac{dC_X}{dt} + \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (3.9)$$

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

Na fase exponencial de crescimento celular (durante a batelada de todos os cultivos realizados), a velocidade específica de crescimento é máxima e constante ($\mu_{\text{máx}}$), não há corrente de saída de biomassa e nem variação significativa de volume, assim:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \quad (3.10)$$

$$\frac{F \cdot C_{X_S}}{V \cdot C_X} = 0 \quad (3.11)$$

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (3.12)$$

Desta forma, após incluir essas condições (equações 3.10 a 3.12) na equação 3.9 e integra-la, é possível calcular a velocidade específica de crescimento máxima através da equação 3.13.

$$\ln \frac{C_X}{C_{X_i}} = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (3.13)$$

onde C_{X_i} é a concentração celular no início da fase exponencial e t é o tempo de cultivo durante a fase exponencial.

A equação 3.13 é linear permitindo o cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ através do método dos mínimos quadrados.

3.6.2.2. Determinação da velocidade específica de crescimento celular (μ_{real}) no cultivo em batelada-alimentada

Na fase de alimentação de cultivos em batelada-alimentada, não há corrente de saída do reator (equação 3.8) e considera-se, neste caso, que a variação do volume ao longo do tempo é igual à vazão volumétrica de fornecimento de meio (equação 3.14).

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3.14)$$

Substituindo-se essas condições na equação (equação 3.9) é possível calcular o valor de μ_{real} ao longo da fase de alimentação (equação 3.15)

$$\mu_{real} = \frac{1}{C_X} \frac{dC_X}{dt} + \frac{F}{V} \quad (3.15)$$

A determinação de $\frac{dC_X}{dt}$ foi feita por meio de ajuste de polinômio aos dados da concentração celular (C_X) representados contra o tempo, seguida pela derivação do mesmo. F foi obtido diretamente do conjunto de dados adquiridos *on-line* pelo *software* SuperSys_HCDC[®], e a variação de V foi acompanhada ao longo do tempo de cultivo.

3.6.3. Determinação da taxa de diluição em cultivos contínuos

Nos cultivos contínuos, após o estabelecimento do estado estacionário, a concentração celular no biorreator é constante e igual a concentração de células na corrente de saída. Sendo assim, a velocidade de crescimento celular pode ser calculada a partir da equação 3.16.

$$\mu = \frac{F}{V} = D = \frac{1}{\tau} \quad (3.16)$$

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

3.6.4. Determinação do fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) ou de substrato a produto ($Y_{P/S}$)

Para o cálculo dos fatores de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) ou produtos ($Y_{P/S}$) utilizou-se dados experimentais obtidos na fase exponencial de cada cultivo de acordo com as equações 3.17 e 3.18, respectivamente:

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

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

onde C_{S_0} é a concentração inicial de substrato e C_S é a concentração de substrato variando com o tempo.

A partir do cálculo do consumo de fonte de carbono e da produção de biomassa correspondente para cada intervalo de tempo, foi possível calcular o valor do $Y_{X/S}$ através do método dos mínimos quadrados.

O mesmo procedimento foi utilizado para o cálculo do $Y_{P/S}$ a partir dos dados de consumo de fonte de carbono e da produção de ácido acético, principal produto obtido nos cultivos realizados neste trabalho.

3.7. Estudos *in silico*

As análises *in silico* do metabolismo de *S. typhimurium* LT2 foram realizadas com o modelo metabólico em escala genômica STM_v1.0 construído por Thiele e colaboradores (2011).

Para isto, utilizou-se o *software* livre Optflux 3.2.7 (ROCHA et al., 2010), que dispõe de diversas ferramentas e algoritmos para a simulação e otimização de vias metabólicas.

3.7.1. Avaliação do modelo STM_v1.0

A análise do desempenho do modelo metabólico em escala genômica STM_v1.0 (THIELE et al., 2011) foi realizada comparando-se os dados fornecidos pelas simulações, com os obtidos *in vivo*.

Para isso, os fluxos de consumo de glicose e de oxigênio, medidos nos cultivos contínuos conduzidos sob diferentes velocidades específicas de crescimento, foram utilizados como dados de entrada (condições ambientais) no Optflux. Empregou-se nas simulações o método de otimização *pFBA* (*parsimonious Flux Balance Analysis*), descrito por Lewis e colaboradores (2010), para maximização da função objetivo desejada, que no caso foi a formação de biomassa. Os valores estimados pelo modelo para a velocidade específica de crescimento e fluxos de produção de metabólitos e CO₂ para cada condição foram então comparados com os resultados experimentais.

3.8. Referências

LEWIS, N. E. et al. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. **Molecular Systems Biology**, v. 6, 390, 2010.

MILO, R. et al. BioNumbers - the database of key numbers in molecular and cell biology. **Nucleic Acids Research**, v. 38, D750–D753, 2010.

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, n. 45, 2010.

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

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.

3.9. Anexo 1

TABELA 3.5 - Padrões de ácidos orgânicos presentes no kit da Sigma-Aldrich (kit - Cat. 47264 Supelco) analisados por HPLC e utilizados para identificar os ácidos produzidos nos cultivos realizados de *Salmonella typhimurium* LT2

Padrões dos ácidos orgânicos	
Ácido acético	Ácido malônico
Ácido adípico	Ácido D-málico
Ácido L-ascorbico	Ácido oxálico
Ácido benzoico	Ácido fítico
Ácido butirico	Ácido propínico
Ácido cítrico	Ácido quínico
Ácido isobutirico	Ácido succínico
Ácido fórmico	Ácido shikímico
Ácido fumárico	Ácido D-tartárico
Ácido L-lático	Ácido maleico

4. ANÁLISE DO METABOLISMO DE *Salmonella typhimurium* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.1. Introdução

O grande desafio com relação à produção em larga escala de produtos oriundos de microrganismos em biorreator é a identificação de condições experimentais que possibilitem a obtenção de elevadas concentrações de biomassa e do produto de interesse, com mínima formação de metabólitos tóxicos às células.

Inúmeros trabalhos reportados na literatura utilizam estratégias convencionais para otimização de cultivos de microrganismos selvagens e recombinantes, destacando-se a escolha de diferentes meios de cultura, fontes de carbono, modos de operação do biorreator (batelada simples, batelada alimentada e cultivo contínuo), temperatura de cultivo, entre várias outras estratégias, como mostra a Tabela 4.1.

Desta forma, foi realizado um estudo exploratório do metabolismo do carbono central da *Salmonella typhimurium* em cultivos em batelada, utilizando a abordagem convencional, para diferentes fontes de carbono. Nesses experimentos, variáveis como o crescimento celular, o consumo de substrato, a produção de metabólitos e de CO₂ foram avaliados e comparados entre si.

A partir dos resultados preliminares obtidos nos cultivos em batelada foi proposta e implementada uma estratégia de alimentação para um cultivo em batelada-alimentada sob limitação no fornecimento de substrato.

TABELA 4.1 - Abordagens clássicas para otimização de cultivos de organismos geneticamente modificados

	Objetivo	Estratégia	Resultado	Referência
Meio de cultivo	Otimização do meio de cultivo para produção de rPspA3 por <i>Escherichia coli</i> em cultivos de alta densidade celular.	Mudanças nas concentrações de componentes importantes (sais de fosfato e tiamina) constituintes do meio mínimo HDF.	Com as mudanças no meio foi possível atingir um $C_X = 112 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$.	SARGO, 2011
	Otimização do meio de cultivo para produção do antibiótico natamicina por <i>Streptomyces natalensis</i> .	Avaliar a produção de natamicina em meio complexo ou sintético.	Meio complexo (20 g/L de glicose, 8 g/L de extrato de carne e 2 g/L de extrato de levedura) - 1,5 g/L de natamicina.	FARID et al., 2000
	Otimização da produção de H_2 por <i>Thermotoga maritima</i> e <i>Thermotoga neapolitana</i> em cultivos em batelada.	Avaliar a produção de hidrogênio por estirpes de <i>Thermotoga</i> utilizando-se diferentes meios complexos e sintéticos.	Aumento de 30 % na produção de H_2 (342 mL H_2 gás/L) utilizando meio complexo (7,5 g/L de glicose e 4 g/L de extrato de levedura).	NGUYEN et al., 2008
Fonte de Carbono	Otimização das condições e do meio de cultivo para produção de proteases alcalinas por <i>Aureobasidium pullulans</i> .	Avaliar diferentes fontes de carbono (amido solúvel, sacarose, glicose, lactose, frutose, maltose, amido de milho e ácido cítrico).	2,5 % de amido solúvel (434 U/mg protease); 2 % (m/v) de amido de milho (398 U/mg protease).	CHI et al., 2007
	Otimização do meio de cultivo para a produção de protease alcalina a partir de <i>Bacillus</i> sp. L21.	Avaliar diferentes fontes de carbono (glicose, xarope de milho, amido de milho, amido de batata, melão e soro).	30 - 40 g/L de maltose (306,5 U/mL protease).	TARI, GENCKAL e TOKATLI, 2006
	Otimização do meio de cultivo para produção do antibiótico natamicina por <i>Streptomyces natalensis</i> .	Avaliar diferentes fontes de carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos).	20 g/L de glicose (0,8 g/L de natamicina) e 20 g/L de glicerol (0,6 g/L de natamicina).	FARID et al., 2000

Tabela 4.1 - Continuação

	Objetivo	Estratégia	Resultado	Referência
Modo de operação	Otimização de cultivos em batelada-alimentada a fim de evitar metabolismo por overflow de <i>Sacharomyces cereviasae</i> e <i>Escherichia coli</i> .	Elaborar um controle baseado na detecção online de metabólitos indesejados (<i>S. cereviasae</i> - etanol e <i>E. coli</i> - acetato).	Através do controle desenvolvido foi possível otimizar o crescimento celular dos microrganismos avaliados, com mínima produção de metabólitos tóxicos.	JOBÉ et al., 2003
	Otimização da produção da enzima bacteriana fitase em diferentes cultivos em batelada-alimentada de <i>Escherichia coli</i> .	Comparar diferentes estratégias de alimentação a fim de manter a concentração da glicose residual baixa e constante.	Obtenção de elevadas atividades da fitase (120 U/mL) em um tempo curto de cultivo (14 horas).	KLEIST et al., 2003
Temperatura de cultivo	Otimização das condições e do meio de cultivo para produção de proteases alcalinas por <i>Aureobasidium pullulans</i> .	Avaliar a influência da temperatura na produção de proteases alcalinas.	Temperatura ótima obtida - 24,5 °C (Sendo 20 a 36 °C a temperatura ótima descrita na literatura).	CHI et al., 2007
	Otimização das condições de cultivo de <i>Penicillium</i> spp. para produção de pigmento vermelho.	Avaliar diferentes temperaturas para produção de pigmento vermelho.	Temperatura ótima obtida - 30 °C (950 unidades de pigmento).	GUNASEKARAN e POORNIAMMAL, 2008
	Otimização das condições de cultivos para produção de L-ácido láctico por <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441 a partir de planejamento experimental.	Estudar o efeito da temperatura em cultivos em batelada de <i>L. casei</i> para otimizar a produção de ácido láctico.	Temperatura ótima obtida por metodologia de superfície de resposta foi 35 °C.	HUJANEN et al., 2001

4.2. Material e métodos específicos

4.2.1. Cultivos em biorreator

Todos os cultivos aqui descritos foram inicialmente realizados como descrito no item 3.4, utilizando-se células selvagens de *Salmonella typhimurium* LT2 e meio mínimo M9-modificado (Tabela 3.1 a Tabela 3.3), com quatro diferentes fontes de carbono, como mostra a Tabela 4.2.

TABELA 4.2 - Concentração das fontes de carbono avaliadas em diferentes condições de cultivo em biorreator

Modo de operação	Fonte de Carbono	Concentração (g L ⁻¹)
Batelada em condição aeróbia	Ácido Acético	5,5
	Glicerol	10
	Glicose	10
	Xilose	10
Batelada Alimentada	Glicose ^a	10
	Glicose ^b	100

^a Durante a fase de batelada

^b Durante a fase de alimentação

4.2.1.1. Cultivos em batelada utilizando glicose, glicerol ou xilose como fonte de carbono

Os cultivos em batelada realizados em condições aeróbias utilizando glicose (hexose), xilose (pentose) e glicerol (tríol), como fontes de carbono, foram conduzidos a 37 °C em biorreator tipo tanque agitado, encamisado com capacidade de 2,0 L de volume total (Applikon, Netherlands), com 900 mL de meio M9-modificado, acrescido de 90 mL de inóculo.

O pH de todos estes cultivos foi mantido em 7,0, através da adição automática de NH₄OH (5%, v/v) e H₃PO₄ (21%, v/v). A concentração de oxigênio dissolvido (COD) permaneceu sempre acima dos 30% da saturação através de um controlador que automaticamente ajustava a velocidade de agitação (entre 200 e 900 rpm) e a vazão de ar (entre 0,5 e 4,0 L min⁻¹) controlada por fluxômetro (GFC AALBORG). A composição do gás de saída foi monitorada pelo analisador de gases (Sick / MAIHAK S710) para a 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. Todo o controle e aquisição dos dados foi feito pelo software SuperSys_HCDC[®] 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).

Ao longo dos cultivos amostras foram retiradas a cada hora para acompanhamento do crescimento celular, consumo da fonte de carbono e produção de metabólitos extracelulares, permitindo o cálculo dos parâmetros $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ para as diferentes fontes de carbono.

4.2.1.2. Cultivo em batelada utilizando ácido acético como fonte de carbono

Um cultivo em batelada com a linhagem selvagem de *S. typhimurium* utilizando ácido acético como fonte de carbono também foi realizado com a finalidade de verificar a capacidade (ou incapacidade) destas células em assimilar este ácido, que é considerado o principal metabólito tóxico gerado em cultivos, mesmo em condições aeróbias, de bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp e comparar estes resultados com os obtidos com as outras fontes de carbono (item 4.1.1.).

Para isso, utilizou-se o mesmo biorreator de 2,0 L, as mesmas condições de temperatura, pH, COD e o software SuperSys_HCDC[®] para controle e aquisição dos dados, como descrito no item 4.1.1. Entretanto, após a inoculação (item 3.4.2.), foi necessário realizar um cultivo em batelada com glicose como fonte de carbono a fim de se atingir a concentração celular desejada ($\sim 2 \text{ g L}^{-1}$).

Assim, este cultivo preliminar foi conduzido sob as mesmas condições experimentais descritas no item 4.1.1. em biorreator de 2,0 L (Applikon, Netherlands) com 1,44 L de meio M9-modificado contendo glicose (10 g L^{-1}) e 0,16 L de inóculo, obtendo-se, no final de aproximadamente 6 horas, uma concentração celular de $1,8 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$. O caldo obtido foi removido assepticamente do biorreator e centrifugado. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1,6 L de meio M9-modificado fresco contendo $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido acético, como única fonte de carbono. O novo caldo foi transferido ao biorreator e iniciou-se o cultivo em batelada com ácido acético em condições aeróbias, com retirada de amostras a cada hora, para obtenção de dados experimentais que possibilitaram os cálculos de parâmetros cinéticos característicos desta fonte de carbono.

4.2.1.3. Cultivo em batelada alimentada

O cultivo em batelada alimentada foi conduzido em biorreator convencional de 5,0 L de volume útil, de montagem própria, com as mesmas condições de temperatura, pH, COD e monitoramento pelo software SuperSys_HCDC[®], como descrito no item 4.1.1. O volume inicial de batelada foi de 3,7 L (sendo 3,4 L de meio M9-modificado fresco com 10 g L⁻¹ de glicose e 0,3 L de inóculo que se encontrava na fase exponencial de crescimento) para obtenção de um volume final próximo a 5,0 L com a alimentação.

O esgotamento da fonte de carbono, na fase de batelada, foi identificado através do aumento da COD no reator e conseqüente diminuição da velocidade de agitação. Neste momento, iniciou-se a alimentação do meio M9-modificado contendo 100 g L⁻¹ de glicose. A alimentação deste cultivo seguiu perfil exponencial de acordo com a equação 4.1.

$$F = C_1 e^{C_2 t} \quad (4.1)$$

sendo:

$$C_1 = \left(\frac{\mu_{SET}}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot \frac{C_{X_0} \cdot V_0}{C_{S_0} - C_{S_R}} \quad (4.2)$$

$$C_2 = \mu_{SET} \quad (4.3)$$

onde:

F = vazão volumétrica de alimentação de meio fresco (L h⁻¹);

μ_{SET} = velocidade específica de crescimento adotada (h⁻¹);

$Y_{X/S}$: Fator de conversão de substrato a células (g célula g substrato⁻¹);

m = manutenção (g célula g substrato⁻¹ h⁻¹)

C_{X_0} = concentração celular no início da alimentação (g L⁻¹);

V_0 = volume no início da alimentação (L);

t = tempo (h);

C_{S_0} = concentração de substrato no meio de alimentação (g L⁻¹);

C_{S_R} = concentração de substrato residual (g L⁻¹).

Para acompanhar o μ_{SET} ao longo do cultivo foi necessário monitorar o volume de meio adicionado ao biorreator para estimar o volume de caldo no reator. Para isso, o frasco de alimentação foi colocado sobre uma balança semi-analítica e o volume de cada amostra retirada para análises de DO_{600nm} , massa seca e HPLC foi registrado. Assim, a partir da concentração celular, obtida de hora em hora por meio da medida de DO_{600nm} , e do volume de meio no biorreator foi possível obter o valor da massa de célula (m_X) ao longo do tempo. A partir dos dados obtidos, a equação 4.4 foi ajustada através de método de mínimos quadrados não linear e o valor do μ_{SET} pôde ser determinado ao longo do cultivo.

$$m_X = m_{X_0} \cdot e^{\mu_{SET}(t - t_0)} \quad (4.4)$$

Com essa estratégia, foi possível ajustar os valores das constantes C_1 e C_2 do software SuperSys_HCDC[®] (equações 4.2 e 4.3), durante a fase de alimentação, de modo a manter o μ_{SET} abaixo de $0,1 \text{ h}^{-1}$, com o intuito de limitar o fornecimento de glicose, tentando reduzir a formação de ácido acético pelo metabolismo *overflow*.

4.2.2. Métodos analíticos

Todos os métodos analíticos utilizados para acompanhamento do crescimento celular, consumo de fonte de carbono e produção de metabólitos estão descritos no item 3.5.

4.3. Resultados e Discussão

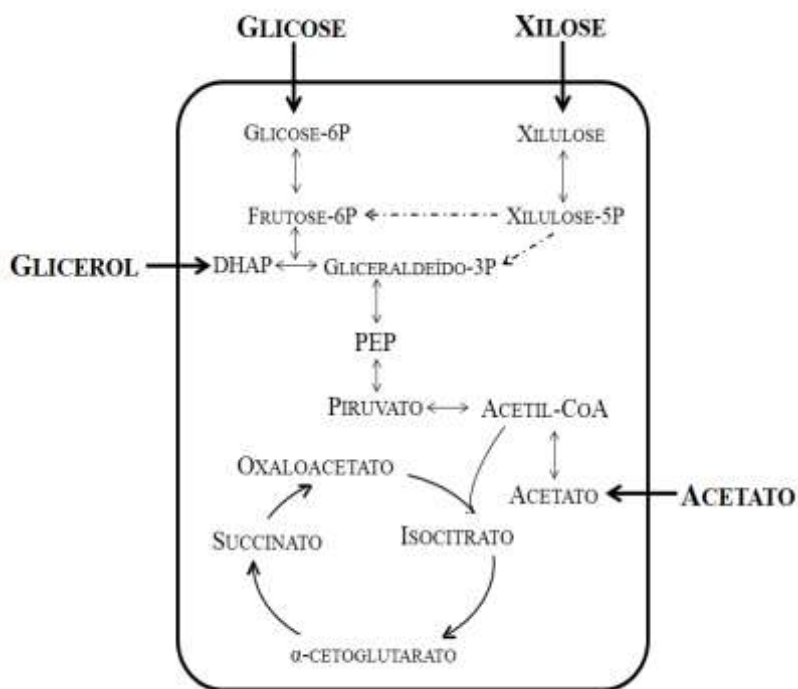
4.3.1. Cultivos em batelada com diferentes fontes de carbono

Pires e colaboradores (2015), avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol e xilose) e de nitrogênio (triptona, extrato de levedura, soytone e phytone) no crescimento de células de *S. typhimurium* LT2 em frascos agitados. Nestes estudos preliminares, foi possível observar diferenças significativas com relação a cinética de crescimento da *Salmonella* dependendo da fonte de carbono utilizada.

Desta forma, decidiu-se investigar mais detalhadamente a influência da fonte de carbono sobre a velocidade de crescimento, o consumo de substrato e a produção de metabólitos, utilizando estratégias tradicionais, como cultivos em batelada de *S. typhimurium*. Para tanto, escolheu-se quatro fontes de carbono distintas (glicose, xilose, glicerol e ácido

acético), que apresentam diferentes transportadores para dentro da célula e diferentes pontos de entrada no metabolismo do carbono central, como mostra a Figura 4.1.

FIGURA 4.1 - Metabolismo de diferentes fontes de carbono por *S. typhimurium* LT2 (DHAP, dihidroxiacetona fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato)

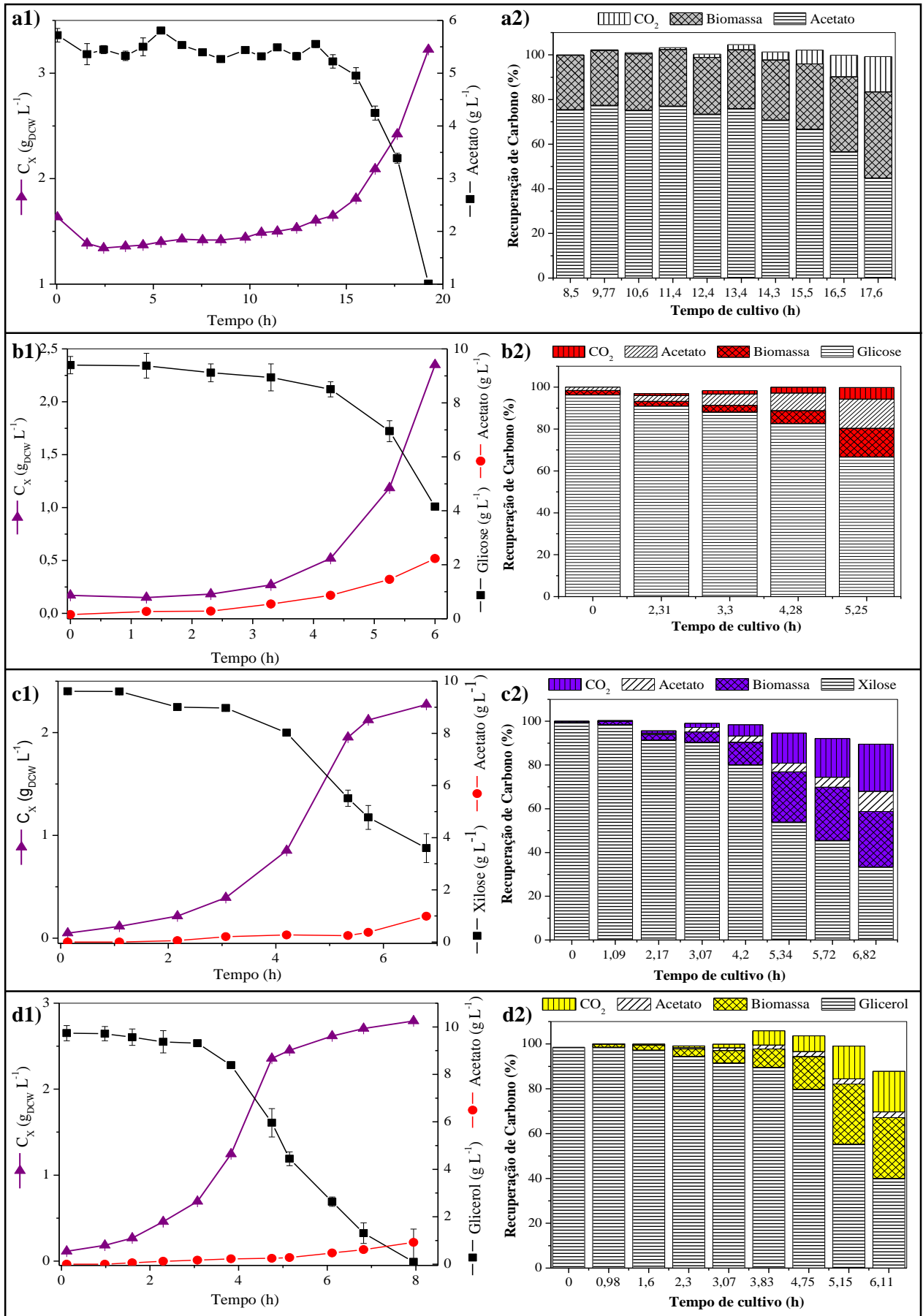


FONTE: Adaptado de Andersson et al. (2007)

A Figura 4.2 mostra os resultados obtidos nos quatros cultivos em batelada realizados. É possível observar que o acetato (Figura 4.2 d) foi a fonte de carbono que promoveu o menor crescimento, chegando a uma concentração celular de $3,3 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ após 20 horas de cultivo, sendo que o acúmulo de biomassa neste intervalo de tempo foi de apenas $1,6 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$.

Nesta mesma condição, também é possível observar uma longa fase lag, de cerca de 13 horas, que pode ser explicada pela forte repressão catabólica exercida pela glicose, uma vez que o inóculo deste experimento foi preparado em biorreator, contendo meio mínimo M9-modificado com glicose, para se obter uma concentração celular inicial adequada para o experimento (item 4.1.1.2.). A repressão catabólica por glicose reprime a expressão de alguns genes e operons que são responsáveis pela utilização de fontes alternativas de carbono (BORIRAK, BEKKER, HELLINGWERF, 2014; GÖRKE e STÜLKE, 2008; MARTÍNEZ et al., 2008).

FIGURA 4.2 - Consumo de substrato, produção de biomassa e acetato nos cultivos em batelada realizados com diferentes fontes de carbono e a recuperação de carbono em cada um dos casos estudados. a) Ácido acético b) Glicose; c) Xilose; d) Glicerol como fontes de carbono



O cultivo em batelada com ácido acético também apresentou o menor fator de conversão de substrato a célula ($Y_{X/S}$), menor fluxo de produção de CO_2 (q_{CO_2}) e observou-se que todo substrato consumido foi convertido em apenas células e CO_2 , sem produção de outros metabólitos, como observa-se na Figura 4.2 a2 e na Tabela 4.3. Esses resultados revelam que, embora a bactéria seja capaz de assimilar o ácido acético, esta fonte de carbono não é a mais adequada para a obtenção de biomassa de *S. typhimurium*, como já era de se esperar, uma vez que o acetato é considerado o subproduto majoritário e tóxico em cultivos de *E. coli* e *Salmonella*. Nos demais cultivos realizados, a concentração final de biomassa atingiu valores entre 2,3 e 2,8 $g_{DCW} L^{-1}$, não sendo influenciada significativamente pela fonte de carbono, conforme mostram as Figuras 4.2 b1, c1 e d1 e a Tabela 4.3. Apenas o glicerol foi totalmente consumido em 8 h de cultivo (Figura 4.2 d1) devido provavelmente à menor inibição do crescimento pelo acetato. As Figuras 4.2 a2, b2, c2 e d2 mostram os resultados do balanço de carbono ao longo do cultivo. Observa-se que o acetato é o principal metabólito formado e que a recuperação do carbono é sempre próxima de 100 %, mostrando a consistência dos dados experimentais obtidos.

TABELA 4.3 - Resultados obtidos nos cultivos de *S. typhimurium* LT2 em batelada com diferentes fontes de carbono. Produção de biomassa e acetato máximas, produtividade celular máxima, parâmetros cinéticos e estequiométricos.

	Fonte de Carbono			
	Glicose	Glicerol	Xilose	Acetato
Tempo total de cultivo (h)	6	7,95	6,8	19,25
Consumo total de substrato ($g L^{-1}$)	$5,2 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,1$	$6,01 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,7$
$C_{Xm\acute{a}x}$ ($g_{DCW} L^{-1}$)	$2,35 \pm 0,03$	$2,79 \pm 0,03$	$2,27 \pm 0,03$	$3,3 \pm 0,03$
Produtividade celular máxima ($g_{DCW} L^{-1} h^{-1}$)	$0,39 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,03$
$C_{\acute{A}CIDO}m\acute{a}x$ ($g_{acetato} L^{-1}$)	$2,2 \pm 0,1$	$0,92 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,1$	0
*$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	$0,65 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$
**$Y_{X/S}$ ($g_{DCW} g_{substrato}^{-1}$)	$0,41 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,09$
$Y_{P/S}$ ($g_{subproduto} g_{substrato}^{-1}$)	$0,54 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	0
Fluxo de consumo de substrato ($mmol_{substrato} g_{DCW}^{-1} h^{-1}$)	$9,4 \pm 0,5$	$18,50 \pm 0,5$	$5,53 \pm 0,4$	$7,5 \pm 1,9$
Fluxo de produção de subproduto ($mmol_{acetato} g_{DCW}^{-1} h^{-1}$)	$11,9 \pm 0,3$	$0,90 \pm 0,09$	$1,65 \pm 0,2$	0
Fluxo de produção de CO_2 ($mmol_{CO_2} g_{DCW}^{-1} h^{-1}$)	$10,5 \pm 0,01$	$14,15 \pm 0,03$	$12,8 \pm 0,03$	4,52

* Estimado utilizando dados apenas da fase exponencial

** Estimado utilizando dados da fase exponencial e estacionária

A comparação entre glicose, glicerol e xilose como fontes de carbono indica que não houve grande variação da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) atingida nestes experimentos. Entretanto, a condição com glicerol apresentou um ganho de cerca de 20 % na produtividade celular máxima, com relação ao cultivo com glicose, devido à utilização mais eficiente do glicerol pelas células cultivadas.

Uma diferença significativa entre estas três fontes de carbono foi o elevado fator de conversão de substrato a acetato na fase exponencial de crescimento ($Y_{P/S}$) no cultivo conduzido com glicose, o qual foi cerca de 10 vezes maior do que o fator obtido com xilose e 25 vezes maior quando comparado com o $Y_{P/S}$ ao utilizar glicerol. Como parcela significativa do substrato foi direcionada para a produção de acetato, o $Y_{X/S}$ obtido para o cultivo com glicose foi o menor ao se comparar estas três fontes de carbono, sendo que o cultivo com glicerol foi o que apresentou o maior fator de conversão à célula e, conseqüentemente, o menor fator de conversão a acetato (Figura 4.2 d 2).

Essa menor produção de acetato ao utilizar glicerol como fonte de carbono, também é confirmada pelo baixo fluxo de produção de acetato (q_p) nesta condição, quando comparado ao fluxo obtido com glicose (Tabela 4.3). Essa diferença entre as duas fontes de carbono já foi bastante estudada em cultivos de *E. coli*, corroborando com o resultado aqui apresentado (CARVALHO et al., 2012; KORZ et al. 1995; MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK, 1996; SARGO 2011; WEINER et al., 2014).

Uma possível explicação para a maior produção de acetato em cultivos com glicose está relacionada ao mecanismo de transporte deste açúcar para o interior da célula: quando a glicose é usada como fonte de carbono sua assimilação se dá através do sistema PTS (fosfotransferase) ocorrendo a transferência de um grupo fosfato de uma molécula de fosfoenolpiruvato para a molécula de glicose. Essa reação tem como produtos a glicose-6-fosfato e piruvato, sendo este último um precursor direto para a formação de acetato. Já para a assimilação de glicerol não há produção de piruvato, uma vez que sua entrada na célula não ocorre através do sistema PTS, mas por difusão passiva ou facilitada (WEINER et al., 2014). Além disso, Martínez-Gómez e colaboradores (2012) observaram que o crescimento de células de *E. coli* JM101 em glicerol ativa uma resposta denominada pelos autores como “*carbon stress acetate recycling*”, que leva à super-expressão de enzimas envolvidas com o metabolismo do acetato e da via do glioxilato. Como resultado, o acetato produzido é reabsorvido pelas células, evitando o acúmulo deste metabólito quando o glicerol é utilizado como única fonte de carbono.

4.3.2. Cultivo em batelada-alimentada com glicose como fonte de carbono

Cultivos em batelada-alimentada são os mais utilizados para produção em larga escala de proteínas recombinantes, ácidos orgânicos, biocombustíveis, aminoácidos, fármacos, entre outros, a partir de organismos geneticamente modificados, permitindo obter altas densidades celulares. Entretanto, este modo de operação exige a determinação de estratégias eficientes de alimentação a fim de se maximizar a produtividade de biomassa, e consequentemente, de produto, e evitar o acúmulo de substratos que podem ocasionar o metabolismo por *overflow* (DEWASME et al., 2011; RODARTE-MORALES et al., 2012; SCHAEPE et al., 2014; TAHERZADEH, NIKLASSON e LIDÉN, 2000).

Para tanto, é necessário levar em consideração parâmetros cinéticos de crescimento celular e variáveis do processo, como por exemplo, os fatores de conversão de substrato em células e em produtos tóxicos, o volume útil máximo do biorreator (implicando na escolha da concentração da fonte de carbono no meio de alimentação), a velocidade específica de crescimento do microrganismo e o perfil da vazão de alimentação do meio suplementar (vazão constante, exponencial, entre outras opções).

Os cultivos em batelada (item 4.3.1.) mostraram que a produção de acetato pelas células de *S typhimurium* LT2 é inevitável, principalmente quando glicose é utilizada como fonte de carbono. Assim, para o cultivo em batelada-alimentada, optou-se por utilizar um meio de alimentação com 100 g L⁻¹ de glicose e uma baixa vazão de meio de alimentação, com perfil exponencial, com a intenção de limitar o fornecimento de glicose e consequentemente diminuir a produção de acetato. Os resultados desse cultivo podem ser observados na Figura 4.3.

A velocidade específica máxima de crescimento da *Salmonella* na fase de batelada, ao utilizar o biorreator de 5,0 L, foi de $\mu_{\text{máx}} = \mu = 0,74 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. Assim, ao final desta fase, a concentração celular chegou a $2,66 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$ com um grande acúmulo de acetato ($4,5 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$).

A fase de alimentação foi iniciada com 4,67 horas de cultivo, após observar-se uma queda acentuada na fração molar de CO₂ nos gás de saída (Figura 4.3 c) e, concomitantemente, a diminuição na velocidade de agitação (dado não apresentado), indicando possível esgotamento glicose.

Após início da alimentação de meio fresco ao biorreator, a concentração celular continuou aumentando, mas com uma velocidade de crescimento muito inferior a observada durante a fase de batelada, passando de $0,73 \pm 0,02$ para $0,10 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, após cerca de 1,5 hora de alimentação (Figura 4.3 b). O mesmo perfil foi observado para a curva de velocidade de

produção de acetato (μ_P), passando de $0,80 \pm 0,09$ para $0,23 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, indicando claramente que a produção de acetato está relacionada com o crescimento celular.

As análises de glicose foram feitas em tempo real, através do método enzimático glicose-oxidase, possibilitando mudanças na estratégia de alimentação caso seu acúmulo fosse verificado. Desta forma, após um acúmulo de glicose ($12,3 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$) após menos de 1,5 hora de alimentação, a vazão de alimentação foi diminuída drasticamente, como mostra a Figura 4.3 c.

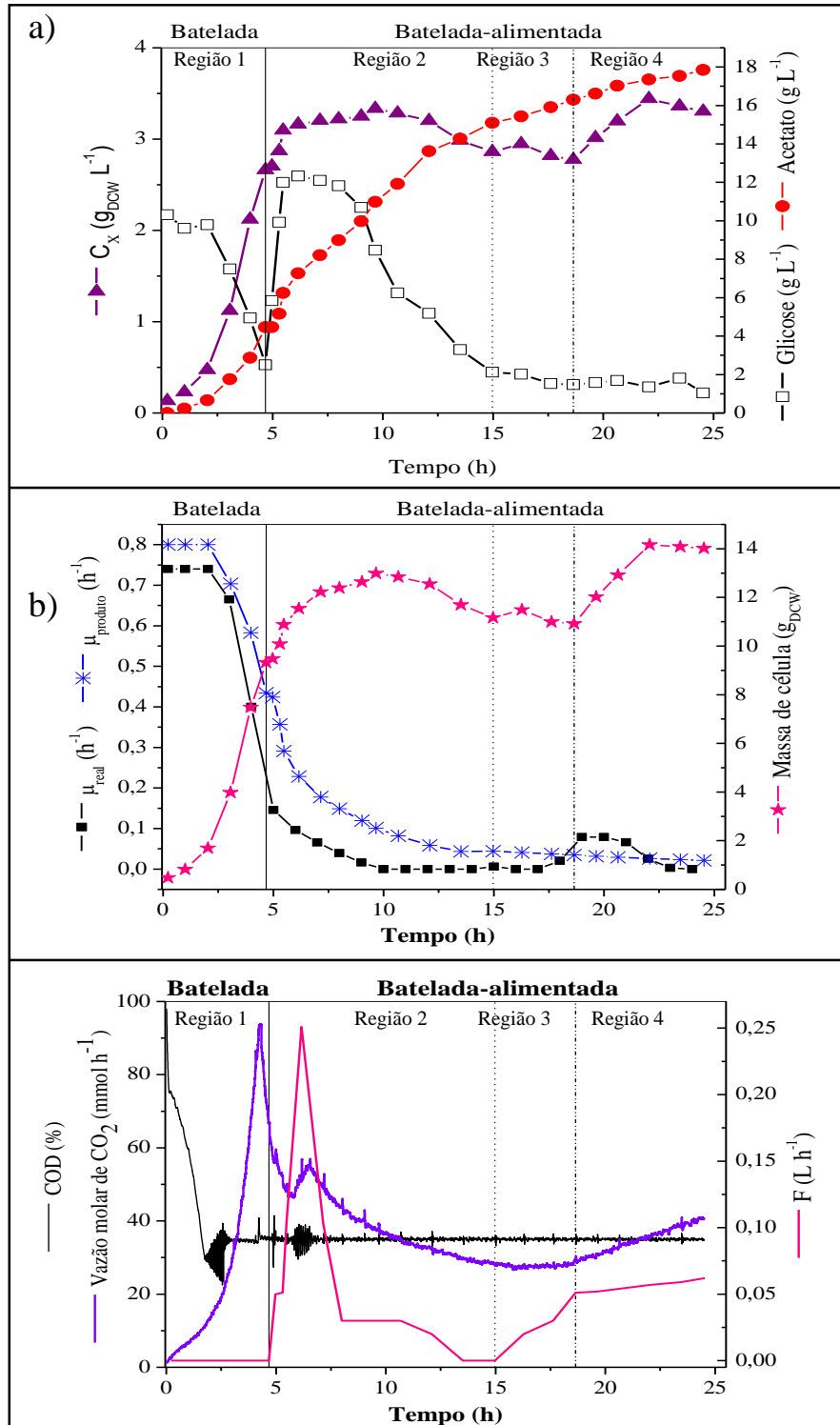
Depois de quase 15 horas de cultivo, o que corresponde a cerca de 10 horas de alimentação, a concentração residual de glicose diminuiu para apenas 2 g L^{-1} e se estabilizou nesse patamar até o final do cultivo. A partir dessas 15 horas observa-se que a velocidade específica de produção de acetato torna-se praticamente constante, em torno de $0,04 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$.

No intervalo de tempo entre 15 a 18,6 h, optou-se por aumentar a vazão de alimentação para observar o comportamento da *Samonella* nesta nova condição, entretanto, tal mudança não acarretou na variação da massa de célula no biorreator devido, provavelmente, à inibição do crescimento pelo acetato.

Todavia, surpreendentemente, em 19,6 horas de experimento, mesmo já havendo grande concentração de acetato acumulado ($16,6 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$), observou-se um aumento na massa de células e, conseqüentemente na velocidade específica de crescimento e na vazão molar de CO_2 , como pode ser notado na Figura 4.3 b e c. Tal comportamento pode sugerir que algumas células possam ter adquirido, ao longo do cultivo, uma maior tolerância ao acetato. Mas para que esta hipótese possa ser confirmada, seria necessário realizar estudos adicionais com essa população de células adaptadas e observar se, por exemplo, haveria diferenças na velocidade de crescimento da população adaptada em novos cultivos utilizando glicose e acetato como fontes de carbono.

Porém, mesmo mantendo a concentração de glicose residual em níveis relativamente baixos, ao final de 24,5 horas de cultivo, o acúmulo de acetato atingiu valores extremamente elevados, passando de 4,4 a $17,8 \text{ g L}^{-1}$ de acetato, enquanto que a massa de células aumentou de 10 para $14 \text{ g}_{\text{DCW}}$ durante as 10 h de alimentação, correspondendo a $C_{X_{\text{máx}}}$ de apenas $3,44 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ L}^{-1}$, evidenciando o efeito tóxico do acetato à célula.

FIGURA 4.3 – Cultivo de *Salmonella typhimurium* LT2 em batelada-alimentada com glicose. Alimentação iniciada com 4,67 h de cultivo (indicada pela primeira linha vertical). As demais linhas verticais, nos tempos de 15 e 19,6 h demonstram mudanças importantes observadas nos perfis de crescimento celular e de produção de acetato. a) Acompanhamento do crescimento celular (C_x), consumo de glicose, e produção de acetato ao longo do cultivo b) Variação da velocidade de crescimento real (μ_{real}), velocidade de produção de acetato (μ_p) e massa de célula ao longo do tempo. c) Variação da concentração de oxigênio dissolvido (COD), da vazão molar de CO_2 e da vazão de alimentação ao longo do cultivo



Estes resultados apontaram a necessidade de um estudo detalhado do metabolismo de *Salmonella*, para identificar possíveis condições de cultivo que favoreçam o crescimento celular em detrimento da produção de acetato. Para este estudo uma estratégia adequada é a realização de cultivos contínuos de *S. typhimurium* em diferentes taxas de diluição a fim de se observar o perfil de assimilação de glicose e produção de acetato em diferentes velocidades específicas de crescimento, conforme descrito nos próximos capítulos.

4.4. Referências

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.

BORIRAK, O.; BEKKER, M.; HELLINGWERF, K. J. Molecular physiology of the dynamic regulation of carbon catabolite repression in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 160, p. 1214-1223, 2014.

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.

CHI, Z. et al. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 534-538, 2007.

DEWASME, L. et al. Extremum-seeking algorithm design for fed-batch cultures of microorganisms with *overflow* metabolism. **Journal of Process Control**, v. 21, n. 7, p. 1092-1104, 2011.

FARID, M. A. et al. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 157-166, 2000.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613-624, 2008.

GUNASEKARAN, S.; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1894-1898, 2008.

HORTA, A. C. L. et al. **Supervisory system for bioreactor high cell density cultivations.** Brazil. Patent 11008-6, PI 2115, 2011.

HORTA, A. C. L. 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, 457-468, 2014.

HUJANEN, M. et al. Optimization of media and cultivation conditions for L (+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p.126-130, 2001.

JOBÉ, A. M. et al. Generally applicable fed-batch culture concept based on the detection of metabolic state by on-line balancing. **Biotechnology and bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 627-639, 2003.

KLEIST, S. et al. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, p. 456-462, 2003.

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.

MARTÍNEZ, K. et al. Co-utilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, 2008.

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**, v. 11, n. 46, 2012.

MEESTERS, P. A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

NGUYEN, T. A. D. et al. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 5, p. 1483- 1488, 2008.

PIRES M. et al. Avaliação de meios de cultura para produção de células de *Salmonella typhimurium*. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2015, Fortaleza.

RODARTE-MORALES, A. I. et al. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. **Biodegradation**, v. 23, n. 1, p. 145-156, 2012.

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

SCHAEPE, S. et al. Avoiding overfeeding in high cell density fed-batch cultures of *E. coli* during the production of heterologous proteins. **Journal of biotechnology**, v. 192, p. 146-153, 2014.

TARI, C.; GENCKAL, H.; TOKATLI, F. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 659-665, 2006.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 69, n. 3, p. 330-338, 2000.

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.

5. DIFERENÇAS ENTRE *Salmonella typhimurium* E *Escherichia coli*: BACTÉRIAS SIMILARES COM PERFIS METABÓLICOS DISTINTOS

Neste capítulo é apresentado um artigo aceito para publicação na revista *Biotechnology Progress* (doi: 10.1002/btpr.2128), no qual estudou-se o metabolismo da *S. typhimurium* LT2, em diferentes condições de cultivos, desde cultivos contínuos com glicose, cultivo em batelada com ácido acético, além de cultivo em condição de anaerobiose, com glicose. Estes resultados foram comparados com os reportados por diferentes estirpes de *E. coli*, já que é relatado que ambas as bactérias possuem grande similaridade em seu metabolismo do carbono central. Além disso, comparou-se resultados *in silico*, utilizando-se um modelo metabólico em escala genômica construído para *S. typhimurium* (STM_v.1.0) com resultados experimentais obtidos com *S. typhimurium* LT2 e com os relatados para *E. coli*.

Salmonella typhimurium and *Escherichia coli* dissimilarity: closely related bacteria with distinct metabolic profiles

BIOTECHNOLOGY
PROGRESS



AIChE

***Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* Dissimilarity: Closely Related Bacteria with Distinct Metabolic Profiles**

Cintia R. Sargo, Gilson Campani, Gabriel G. Silva, Roberto C. Giordano, Adilson J. Da Silva, and Teresa C. Zangirolami

Graduate Program of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

Daniela M. Correia

Graduate Program of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

CEB—Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus De Gualtar, Braga 4710-057, Portugal

Eugenio C. Ferreira and Isabel Rocha

CEB—Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus De Gualtar, Braga 4710-057, Portugal

DOI 10.1002/btpr.2128

Published online 00 Month 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Abstract

Live attenuated strains of *Salmonella typhimurium* have been extensively investigated as vaccines for a number of infectious diseases. However, there is still little information available concerning aspects of their metabolism. *S. typhimurium* and *Escherichia coli* show a high degree of similarity in terms of their genome contents and metabolic networks. However, this work presents experimental evidence showing that significant differences exist in their abilities to direct carbon fluxes to biomass and energy production. It is important to study the metabolism of *Salmonella* in order to elucidate the formation of acetate and other metabolites involved in optimizing the production of biomass, essential for the development of recombinant vaccines. The metabolism of *Salmonella* under aerobic conditions was assessed using continuous cultures performed at dilution rates ranging from 0.1 to 0.67 h⁻¹, with glucose as main substrate. Acetate assimilation and glucose metabolism under anaerobic conditions were also investigated using batch cultures. Chemostat cultivations showed deviation of carbon towards acetate formation, starting at dilution rates above 0.1 h⁻¹. This differed from previous findings for *E. coli*, where acetate accumulation was only detected at dilution rates exceeding 0.4 h⁻¹, and was due to the lower rate of acetate assimilation by *S. typhimurium* under aerobic conditions. Under anaerobic conditions, both microorganisms mainly produced ethanol, acetate, and formate. A genome-scale metabolic model, reconstructed for *Salmonella* based on an *E. coli* model, provided a poor description of the mixed fermentation pattern observed during *Salmonella* cultures, reinforcing the different patterns of carbon utilization exhibited by these closely related bacteria.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; aerobic/anaerobic conditions; extracellular metabolomics.

5.1. Introduction

Salmonella is a rod-shaped, Gram-negative, facultatively anaerobic, flagellated bacterium that belongs to the *Enterobacteriaceae* family, of which *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Klebsiella pneumonia* are also members.¹

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) is an important intracellular pathogen, causing acute gastroenteritis in humans and many other mammalian species.^{2,3} However, attenuated strains of this bacterium have been investigated in order to

develop several biotechnological products.⁴ Amongst these products, promising results have been obtained for potential vaccine delivery systems for foreign antigens against a diversity of infectious agents, including bacteria (such as *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* serotype Typhi and *Streptococcus pneumoniae*), viruses (HIV and influenza), parasitic pathogens, and cancer.⁵⁻⁹ Hence, *S. typhimurium* is a microorganism with significance in both medicine and biotechnology, and has been studied extensively in the areas of genetics¹⁰ and immunology.^{4,11,12} In last years, several studies have been published regarding *S. enterica* metabolism regulation¹³⁻¹⁷ However, there is still little information available concerning the metabolic aspects of its growth under different conditions, which are essential to understand its metabolism and improve biotechnological processes.

Escherichia coli is the most studied and best characterized microorganism in terms of genome annotation, biochemical genetics, molecular biology, and growth behavior, and is one of the first organisms to have had the complete genome sequenced.¹⁸ Studies of its metabolism have demonstrated that *E. coli* cells produce acetate as an extracellular byproduct under aerobic conditions, and that the organism is also able to metabolize this acetate as sole carbon and energy source.¹⁹⁻²³ In the absence of oxygen, the cells produce a mixture of organic acids (formic, lactic, succinic, and acetic) and ethanol.^{24,25}

The production of acetate by *E. coli* strains has been extensively studied over the past few decades²⁶⁻²⁸ and is highly relevant for bioprocesses, because this byproduct decreases cellular growth, even at concentrations as low as 0.5 g L^{-1} , and inhibits the synthesis of recombinant proteins.^{20,29,30,31} This overflow phenomenon occurs at high glucose uptake rates and, according to Vemuri et al.,²⁷ has been attributed to an enzymatic limitation in the TCA cycle, whereby the carbon flux from acetyl-CoA is directed to acetate via acetyl phosphate, instead of entering the TCA cycle.

It is widely known that *E. coli* K12 is the closest bacterial species to *Salmonella*, sharing about 85% of the genome of the latter.^{32,33} The main differences between these organisms are related to virulence factors, because *E. coli* K12 is not pathogenic, unlike *Salmonella*. According to Götz et al.,³⁴ the two microorganisms have similar metabolic settings, including all the genes for the major central metabolic pathways.

Wilson et al.³⁵ described the stoichiometry of *Salmonella typhimurium* LT2 growth in batch cultures carried out with complex medium, at different initial pH values. This study reported that acetic acid was the predominant organic acid produced.

A better knowledge of *S. typhimurium* metabolism and its extracellular metabolite production profile is required in order to develop protocols for growing these cells

at high density and improve bioprocesses for the large scale production of vaccines and biopharmaceutical products. This kind of study has already been reported for other microorganisms such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Mannheimia haemolytica*, based on combinations of steady-state culture data and stoichiometric metabolic models.³⁶⁻³⁸

Studies of the cellular metabolism of many organisms can now be assisted by bioinformatics tools, which combine *in silico* genome-scale reconstruction of metabolic reaction networks with mathematical modeling approaches, such as flux balance analysis (FBA), employing tools such as Optflux.³⁹ According to Raman and Chandra,⁴⁰ these tools enable prediction of the growth rates of organisms and their substrate uptake rates, as well as the rates of production of biotechnologically relevant metabolites, and are important for optimization of industrial bioprocesses. Examples of applications of FBA include maximization of the production of organic acids, polysaccharides, amino acids, and industrial solvents (such as acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum*^{41,42}), as well as the identification of potential drug targets (for example, the identification of targets for anti-tubercular drugs designed by systematically deleting genes *in silico*⁴³), and the analysis of metabolic networks for microorganisms such as *Corynebacterium glutamicum*⁴⁴ and *E. coli*.⁴⁵

The aim of this work was to evaluate the metabolism of wild type *S. typhimurium* under aerobic (with glucose or acetate as carbon source) and anaerobic conditions. Predictions obtained with the genome-scale STM_v1.0 metabolic model reconstructed for *S. typhimurium* by Thiele et al.,⁴⁶ as well as experimental data, were used to compare the extracellular metabolism of *Salmonella* and *E. coli*.

5.2. Materials and Methods

5.2.1. Bacterial strain, growth medium, and culture conditions

The strain used in the present study was *S. typhimurium* LT2 obtained from the Salmonella Genetic Stock Centre (University of Calgary, Canada).

Pre-cultivations of all experiments were conducted in 2YT medium (16 g tryptone, 10 g yeast extract, and 5 g NaCl per liter), and glucose-limited medium (M9 minimum medium) contained (per liter): 7.53 g Na₂HPO₄·2H₂O; 3 g KH₂PO₄; 1 g NH₄Cl; and 0.5 g NaCl. The following components were filter sterilized and then added to the medium: 0.11 g MgSO₄·6H₂O; 0.34 g thiamine; 0.015 g CaCl₂; 2 mL of trace vitamin solution; and 2 mL of trace minerals solution. The composition of the trace vitamin solution was (per liter): 0.42 g

riboflavin; 6.1 g nicotinic acid; 5.4 g pantothenic acid; 1.4 g pyridoxine; 0.06 g biotin; and 0.04 g folic acid. The composition of the trace minerals solution was (per liter): 27 g FeCl₃; 2 g ZnCl₂; 2 g CoCl₂; 2 g NaMoO₄; 1 g CaCl₂; 1 g CuCl₂; 0.5 g H₃BO₃; and 100 mL HCl. Glucose was used as the carbon source in aerobic continuous cultivations (10 g L⁻¹) and anaerobic batch cultivations (15 g L⁻¹). In addition, aerobic batch culture was also carried out using acetate (5.5 g L⁻¹).

5.2.2. Aerobic culture with glucose as carbon source

Aerobic continuous cultivations were conducted at 37 °C in a 2 L stirred tank bioreactor (Applikon, Netherlands) with a working volume of 800 mL. The pH was controlled at 7.0 by automatic addition of NH₄OH (5%, v/v).

In these experiments, two stages of inoculum preparation were performed in flasks. A single colony from a 2YT agar plate was suspended in 10 mL of 2YT medium and, after growing at 200 rpm and 37 °C to an optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of approximately 2.0 (exponential growth phase), 1 mL of cell suspension was transferred to a flask containing 80 mL of M9 minimal medium. The second culture was grown until OD_{600nm} = 2.0 and then inoculated into the reactor to obtain an initial OD_{600nm} of 0.2.

The M9 minimal medium was continuously fed to the bioreactor at dilution rates (D) of 0.10 (± 0.01), 0.15 (± 0.01), 0.24 (± 0.02), 0.48 (± 0.03), 0.58 (± 0.04), and 0.67 (± 0.04) h⁻¹. Changes in D were implemented by altering the flow rate of fresh medium into the bioreactor. An agitation speed of 800 rpm and a constant air flow rate (from 0.8 to 1.5 SLPM, depending on the dilution rate), controlled by a mass flow controller, ensured that dissolved oxygen concentrations remained well above 20% of saturation. The exhaust gas composition was analyzed using a Sick/Maihak S.710 analyzer, and data were monitored with a cFP controller (National Instruments).

The steady state was inferred after measuring the optical density and the concentrations of dissolved oxygen and carbon dioxide in the bioreactor, and was considered to have been reached when these variables remained constant for at least three residence times. On-line data acquisition and automatic pH control employed SuperSys_HCDC software.^{47,48}

5.2.3. Aerobic culture with acetate as carbon source

Aerobic batch culture with acetate minimal medium was performed at 37 °C in a 2 L stirred tank bioreactor (Applikon, Netherlands) with a working volume of 1.6 L. The pH was controlled at 7.0 by automatic addition of NH₄OH (5%, v/v) and H₃PO₄ (21%, v/v), and data were acquired online.

In this experiment, inoculum preparation was carried out in three stages. The first two were the same as described above for the aerobic culture with glucose as carbon source. Subsequently, a batch culture with 10 g L⁻¹ of glucose was conducted to obtain a cellular concentration of ~1.8 g_{DCW} L⁻¹. The final cell suspension was aseptically removed from the reactor and centrifuged. The resulting pellets were resuspended in 1.6 L of M9 minimal fresh medium containing acetate as carbon source. The new suspension was transferred back to the bioreactor and the cultivation was started.

The dissolved oxygen concentration was monitored and maintained at 20% by a controller that automatically adjusted the agitation speed (between 200 and 800 rpm) and the air flow rate (between 0.3 and 0.6 SLPM), using the SuperSys_HCDC software.

5.2.4. Anaerobic culture

The inoculum for anaerobic batch cultivation was prepared as described for the aerobic culture with glucose as carbon source. The centrifuged biomass was resuspended in 1.6 L of M9 minimal fresh medium containing 15 g L⁻¹ of glucose as sole carbon source. The new suspension was transferred back to the 2 L bioreactor (Applikon, Netherlands) and an intense flow of industrial N₂ (0.6 SLPM) was applied to quickly remove traces of dissolved O₂. Anaerobic conditions were maintained by supplying a constant stream of ultra-pure N₂ at a flow rate of 0.3 SLPM. The pH, temperature, and agitation rate were kept at 7.0, 37°C, and 300 rpm, respectively. Anaerobic conditions in the bioreactor were monitored by measuring the O₂ content in the exhaust gas using a Sick/Maihak S.710 analyzer. Only data collected at 0% O₂ mole fraction were used to characterize anaerobic metabolism.

5.2.5. Analytical methods

Cellular growth was followed by measuring the optical density of the culture broth at a wavelength of 600 nm (OD_{600nm}) and by determining the dry cell weight (DCW). For

dry cell weight, a known volume of culture broth was filtered using pre-weighed 0.22 µm cellulose-nitrate membranes (UNIFIL) and dried to a constant weight at 90 °C for 24 h. The biomass concentration (C_x) was estimated from the OD measurements and dry cell weight data obtained in all experiments by linear regression (Eqs. 5.1 or 5.2).

$$C_x \text{ (g/L)} = 0.39 \pm 0.01 * OD_{600} \text{ (experiments with glucose as carbon source)} \quad (5.1)$$

$$C_x \text{ (g/L)} = 0.36 \pm 0.01 * OD_{600} \text{ (experiment with acetate as carbon source)} \quad (5.2)$$

Samples of culture medium were centrifuged at 10,000 rpm and 4 °C for 5 min and the supernatants were further filtered through a 0.2 µm PVDF membrane (GVS) and stored at – 20 °C until further analysis.

The concentrations of glucose and extracellular metabolites (acetate, formate, ethanol, succinate, lactate, among others from Sigma-Aldrich organic acid kit, as well as pyruvate) were determined by HPLC (Waters Corp. system), using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) and 5 mM sulfuric acid solution as the mobile phase (at a flow rate of 0.6 mL/min). The column temperature was 60 °C. Organic acids were detected at 210 nm (Waters 486 UV detector), while glucose and ethanol were measured with a refractive index detector (Waters 410). Glucose was also determined enzymatically using a glucose oxidase assay (GOD-PAP, Laborlab, Brazil), according to the manufacturer’s instruction.

5.2.6. Flux calculations

For all chemostat or batch experiments, fluxes were estimated using Eq. 5.3:⁴⁹

$$J_i = \frac{r_i}{C_x} \quad (5.3)$$

where J_i is the consumption or production flux of component i (substrate, metabolic products, oxygen, or carbon dioxide), in mmol g_{DCW}⁻¹ h⁻¹; r_i is the volumetric rate of consumption or production of component i , in mmol L⁻¹ h⁻¹; and C_x is the biomass concentration (g_{DCW} L⁻¹). From the material balance for a continuous, steady-state bioreactor, with no biomass in the feed stream, the volumetric rates were assessed from the measured concentrations of biomass, glucose (C_s , at the inlet and outlet), and organic acids, according to Eqs. 5.4 – 5.6:

$$r_S = \frac{D \cdot (C_S^{in} - C_S^{out})}{MM_S} \quad (5.4)$$

$$r_P = \frac{D \cdot C_P^{out}}{MM_P} \quad (5.5)$$

$$r_X = \mu \cdot C_X = D \cdot C_X \quad (5.6)$$

where D is the dilution rate (h^{-1}), C_S^{in} is the substrate concentration in the feed medium, C_S^{out} and C_P^{out} are the outlet concentrations of substrate and metabolic products under steady-state conditions (g L^{-1}), MM_S and MM_P are the molecular masses of substrate and metabolic products (g mmol^{-1}), respectively, and μ is the specific growth rate (h^{-1}).

For both continuous and batch cultures, the rates of oxygen consumption (OUR) and carbon dioxide production (CER) were calculated from the mass balance for the gas phase, as follows:

$$OUR = (y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^{out}) \cdot \frac{Q \cdot P}{R \cdot T \cdot V_t} \quad (5.7)$$

and

$$CER = (y_{CO_2}^{out} - y_{CO_2}^{in}) \cdot \frac{Q \cdot P}{R \cdot T \cdot V_t} \quad (5.8)$$

where $y_{O_2}^{in}$ and $y_{CO_2}^{in}$ are the mole fractions of oxygen and carbon dioxide, respectively, in the inlet air; $y_{O_2}^{out}$ and $y_{CO_2}^{out}$ are the mole fractions of oxygen and carbon dioxide, respectively, in the outlet gas; Q is the total gas flow rate (L h^{-1}); P and T are the pressure (atm) and temperature (K), respectively, under STP conditions; R is the molar gas constant ($8.2 \times 10^{-5} \text{ atm L mmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); and V_t is the working volume of the bioreactor (L).

Experimental fluxes for the batch cultures were also calculated with Equation 5.3, using material balances for a batch bioreactor to estimate the volumetric rates of biomass production, organic acid formation, and substrate consumption, as described by Eqs. 5.9 – 5.11:

$$r_S = -\frac{1}{MM_S} \frac{d(m_S/V)}{dt} \quad (5.9)$$

$$r_P = \frac{1}{MM_P} \frac{d(m_P/V)}{dt} \quad (5.10)$$

$$r_X = \frac{d(m_X/V)}{dt} \quad (5.11)$$

where $\frac{d(m_i/V)}{dt}$ is the slope of the curve describing the variation with time of the substrate, product, or biomass experimental mass values divided by the updated bioreactor volume.⁴⁵ Only data from the exponential growth phase were used for the volumetric rate estimates. In addition, since little biomass formation was observed during the period for which data were collected, an average value of C_x was used in Eq. (3). The biomass yield ($Y_{X/S}$) was also calculated using the exponential phase experimental data, according to Eq. 5.12⁵⁰:

$$Y_{X/S} = \frac{C_X - C_{Xin}}{C_{Sin} - C_S} \quad (5.12)$$

where C_{Xin} and C_{Sin} refer to the biomass and substrate concentrations, respectively, at the beginning of the exponential growth phase.

5.2.7. *In silico* analysis

In silico experiments were carried out using the genome-scale STM_v1.0 metabolic model reconstructed for *S. typhimurium* by Thiele et al.,⁴⁶ in order to simulate the metabolic profile of this bacterium under different environmental conditions. The metabolic network described by the model consists of 1270 genes, 2201 intracellular reactions, 345 exchange reactions, and 1119 metabolites.

Simulations were run with the Optflux v. 3.2.1 open-source software platform (www.optflux.org), using the parsimonious flux-balance analysis (pFBA) method, with biomass maximization as the objective function.⁵¹ The results of these simulations were compared with the experimental data obtained from the *in vitro* experiments.

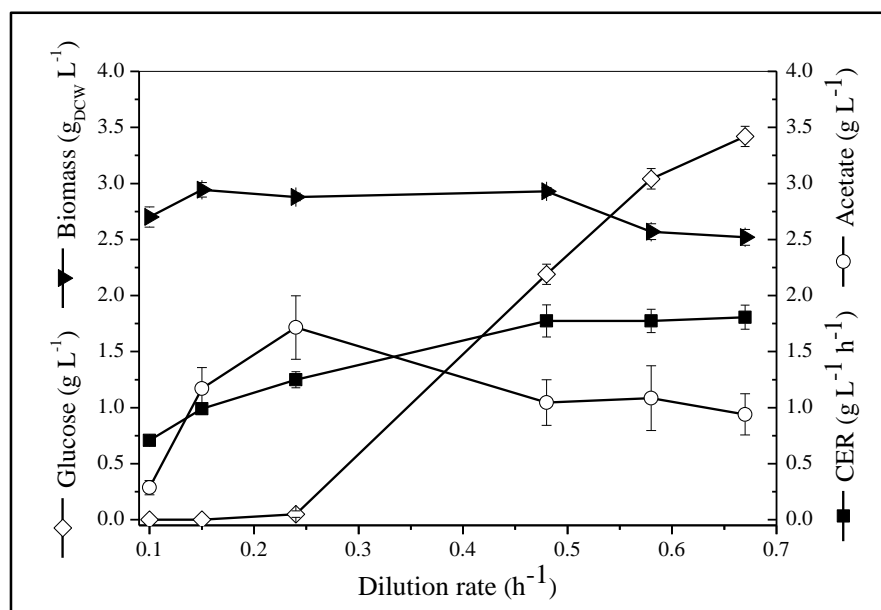
5.3. Results and Discussion

5.3.1. *S. typhimurium* vs. *E. coli* aerobic metabolism

Chemostat experiments with *Salmonella typhimurium* were performed under aerobic conditions with dilution rates (D) ranging from 0.1 to 0.7 h⁻¹, and the results were used to map the formation of metabolites (data presented in Supplemental Material 1 – Figure 5.5).

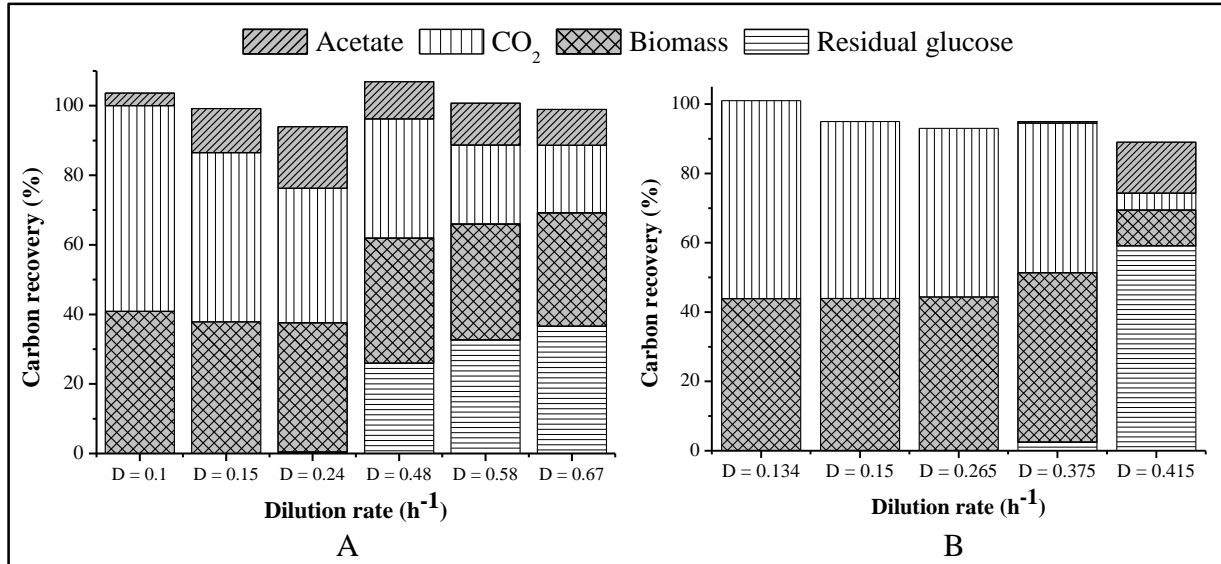
The concentrations of biomass, residual glucose, and byproducts, and the CO₂ evolution rate (CER), were plotted as a function of D (Figure 5.1). At lower dilution rates (between 0.1 and 0.24 h⁻¹), it was observed that the cells consumed all the glucose provided, and that the carbon dioxide evolution increased linearly with the dilution. It was also possible to observe carbon deviation towards byproduct formation by the *S. typhimurium* cells, with acetate as the only metabolite produced. At dilution rates of 0.48 h⁻¹ and above, glucose uptake slowed down (Figure 5.3 A) and a considerable increase of the residual glucose concentration was observed. Consequently, the concentrations of acetate and biomass decreased due to washout effect. Formate at low concentrations (< 0.5 g L⁻¹) was also detected at dilution rates above 0.48 h⁻¹. The formation of this metabolite is probably related to cell lysis and release of DNA, which can act as barrier, hampering oxygen diffusion into the cells⁵² (data presented in Supplemental Material 1 -Figure 5.6).

FIGURE 5.1 - Growth and fermentation product profiles of *S. typhimurium* LT-2 during aerobic glucose-limited chemostat cultivations under different dilution rates. CER (■), glucose (◇), biomass (C_x) (►) and acetate (○). The error bars represent standard deviations from three technical replicates.



All data obtained under steady-state conditions were tested for consistency by applying mass balances. The distribution of carbon towards biomass, carbon dioxide and acetate during steady-state growth, estimated from the mass balance results, are shown in Figure 5.2 A.

FIGURE 5.2 - Influence of specific growth rate on the carbon distribution in aerobic glucose-limited chemostats at different dilution rates for A) wild-type *S. typhimurium* LT-2 and B) *E. coli* K-12 TG1 (data from Kayser et al.)³⁷.



Carbon recovery ranges from 94 to 106 %, which demonstrates the consistency of the experimental data obtained for the chemostat cultures. It was observed that for *Salmonella*, in most cases, from 11 to 17% of the carbon source was directed towards the production of organic acids (except at a dilution rate of 0.1 h⁻¹).

Kayser et al.³⁷ and Brown et al.⁵³ reported that acetate overflow occurs at higher dilution rates in continuous cultures of *E. coli*. In these studies, pronounced acetate production was observed for D above 0.4 and 0.5 h⁻¹, respectively, both close to the washout point, when the concentrations of residual glucose and acetate increased considerably, concomitant with reductions in the biomass concentration and CO₂ production (Figure 5.2 B). Different behavior was observed in the present work for the continuous cultures of *S. typhimurium*. A better understanding of these differences could be obtained from a comparison of acetate metabolism in *E. coli* and *S. typhimurium*, as described below.

5.3.2. *S. typhimurium* vs. *E. coli* acetate metabolism

Batch cultivation with acetate minimal medium was performed to evaluate acetate assimilation by *S. typhimurium* under aerobic conditions and compare it to *E. coli* metabolism. According to Raghunathan et al.,⁵⁴ both microorganisms can grow in acetate as sole carbon source, as supported by the results shown in Table 5.1.

In *E. coli* and *Salmonella*, the metabolism of acetate as sole carbon and energy source involves two steps. Acetate is first transported into the cell and subsequently activated to acetyl-CoA, and is then metabolized in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate shunt.^{22,55} There are two distinct pathways responsible for the acetate activation: Ack-Pta (acetate kinase - EC 2.7.2.1 and phosphotransacetylase – EC 2.3.1.8), where acetate is activated by means of an acetyl phosphate intermediate, or Acs (acetyl coenzyme A synthetase - EC 2.7.2.1).⁵⁶ For *S. typhimurium* there is little information about the activity of enzymes involved in production/assimilation of acetate. According to Starai et al.,¹⁵ the acetate assimilation is associated with Acs and Ack-Pta enzymes when ethanolamine is used as carbon source. In contrast, for *E. coli*, there is a considerable number of studies about acetate uptake.^{19,22,56,57} Despite the conflicting views presented by these works, in general, it is accepted that Ack-Pta and Acs pathways play a role on acetate assimilation.

During the cultivation, a long lag phase (almost 15 hours) was observed, which demonstrates the difficulty experienced by *Salmonella* cells in shifting from glucose to acetate metabolism. Glucose catabolite repression was extensively study for *E. coli*, that can need more than 3 hours to start to grow in a new substrate.^{22,58,59,60} So far, studies addressing glucose repression on *Salmonella* have not been reported.

Comparison of the growth rates achieved on acetate showed that the *Salmonella* growth rate was slower than reported for different *E. coli* strains (Table 5.1). The biomass yields under this condition were similar for the two microorganisms. However, the main difference between the bacteria was the acetate uptake rate, which was 3-fold lower for *Salmonella* cells. The inferior performance on acetate exhibited by *Salmonella* is probably related to a lower activity of Ack-Pta or Acs enzymes than in *E. coli* cells, which can be assessed by comparing Km values for both bacteria. The affinity of AckA for acetate as substrate in *S. typhimurium* is lower or equal ($K_m = 1.2 \text{ mM}^{61}$ or 7 mM^{62}) than the observed for *E. coli* ($K_m = 7 \text{ mM}$).⁶² On the other hand, Acs of *E. coli* K12 binds with much higher affinity ($K_m = 0.2 \text{ mM}$)^{63,64} than the Acs of *S. typhimurium* LT-2 ($K_m = 40^{65}$ or 6 mM^{66}).^{53,54} It is important to highlight that the mentioned Km values were obtained using different pH conditions.

TABLE 5.1 - Comparison of growth and metabolic parameters of *S. typhimurium* LT-2 and different *E. coli* strains in batch aerobic cultures using acetate minimal medium

Growth parameters	<i>S. typhimurium</i> LT-2 ^a	<i>E. coli</i> BW2511 ^b	<i>E. coli</i> B/r ^c
Biomass yield (g _{DCW} g ⁻¹)	0.31 ± 0.09	0.26 ± 0.01	0.19 ± 0.05
Maximum growth rate (h ⁻¹)	0.13 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.09
Acetate uptake rate (mmol g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	7.5 ± 1.9	24.67 ± 1.59	ND

^aDeviations represent mean square error of the regressions.

^bData from Castaño-Cerezo et al.¹⁹

^cData from Andersen and Meyenburg.⁶⁷

ND: not described.

Therefore, although *Salmonella* is able to assimilate acetate, the process occurs at a low rate. For this reason, during the *Salmonella* chemostat cultures, net acetate production was observed for all the dilution rates tested (Figure 5.2 A), which was not the case for *E. coli* (Figure 5.2 B), due to its more efficient acetate uptake system.

5.3.3. *S. typhimurium* vs. *E. coli* anaerobic metabolism

According to Driessen et al.,⁶⁸ the fermentation pattern of *S. typhimurium* is very similar to that observed for *E. coli*, which converts glucose into a mixture of organic acids when cultivated in the absence of O₂.

Acetate was the major by-product in the aerobic chemostat culture. However, in the anaerobic batch culture of *S. typhimurium* LT-2, besides acetate, there was significant production of ethanol and formate, with concentrations of 5.7, 7.1, and 4.3 g L⁻¹, respectively, after 3 h of cultivation. Succinate, a minor fermentation product, was also found, accounting for less than 3% of the total products formed from glucose. In the absence of oxygen, the cells converted almost all the glucose to organic acids, with low cellular growth and negligible production of CO₂.

The concentrations measured during the anaerobic batch culture of *S. typhimurium* were used together with the reactor mass balances (Eqs. 5.3, 5.9, 5.10, and 5.11) to estimate the corresponding fluxes and yield coefficients (Eq. 5.12). These are shown in Table 5.2 and Figure 5.4, together with comparative fluxes and biomass yield values for *E. coli*, determined from data available in the literature.^{19,69}

TABLE 5.2 - Comparison of growth and metabolic parameters of *S. typhimurium* LT-2 and different *E. coli* strains in batch anaerobic cultures using glucose minimal medium

Growth parameters	<i>S. typhimurium</i> LT-2 ^a	<i>E. coli</i> BW2511 ^b	<i>E. coli</i> K- 12MG1655 ^c
Biomass yield (g _{DCW} g ⁻¹)	0.077 ± 0.007	0.1 ± 0.003	0.16 ± 0.02
Growth rate (h ⁻¹)	0.11 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.42 ± 0.01
Glucose uptake flux (mmol g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	9.6 ± 1.1	25.4 ± 0.96	14.9 ± 2.4

^aDeviations represent mean square error of the regressions.

^bData from Castaño-Cerezo et al.¹⁹

^cData from Chen et al.⁶⁹

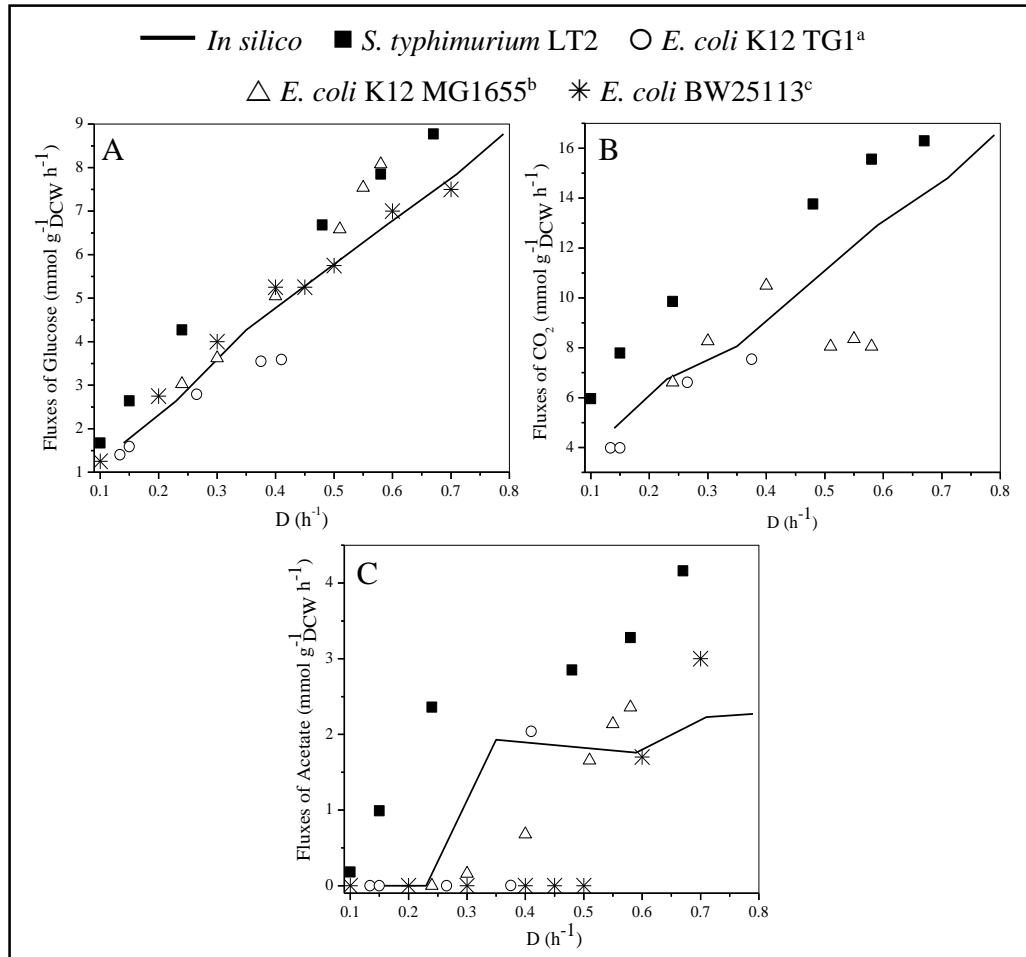
The results indicated that the rate of glucose uptake by *Salmonella* under anaerobic conditions was about 3-fold lower than observed for *E. coli*. In addition, *Salmonella* directed less carbon towards biomass production, and the growth rate was about 4-fold lower than for *E. coli*. For both microorganisms, the main products were formate, ethanol, and acetate, but *S. typhimurium* accumulated more lactate, compared to *E. coli* strains (Figure 5.4).

5.3.4. Quantitative comparison of *in silico* and experimental data for *S. typhimurium* metabolism

In silico studies of *S. typhimurium* glucose metabolism, under both aerobic and anaerobic conditions, were performed using the genome-scale STM_v1.0 metabolic model reconstructed for *S. typhimurium*⁴⁶, in order to evaluate the ability of the model to predict the metabolism of this bacterium. This was accomplished by comparing the *in silico* results with the experimental data.

In the aerobic metabolism simulations, the glucose and oxygen uptake fluxes (GUF and OUF, respectively) were restricted to the values observed experimentally in the chemostat cultures, in order to determine the *in silico* flux distributions of extracellular metabolites, CO₂, and biomass under the conditions employed in the experiments (Figure 5.3). For comparison, chemostat data for *E. coli* cultivated under aerobic conditions³⁷ are also included in Figure 5.3, together with the simulated results using the same model.

FIGURE 5.3 - Comparison of fluxes of A) glucose, B) CO₂ and C) acetate based on experimental data for *S. typhimurium* LT-2 (■); *E. coli* K12 TG1^a (○); *E. coli* K12 MG1655^b (△) and *E. coli* BW25113^c (*), cultivated as chemostats under aerobic conditions. *In silico* solutions (—) estimated using experimental GUF and OUF values obtained in this work as the environmental conditions. (Data from: ^aKayser et al.³⁷; ^bValgepea et al.³¹; ^cRenilla et al.²⁶)

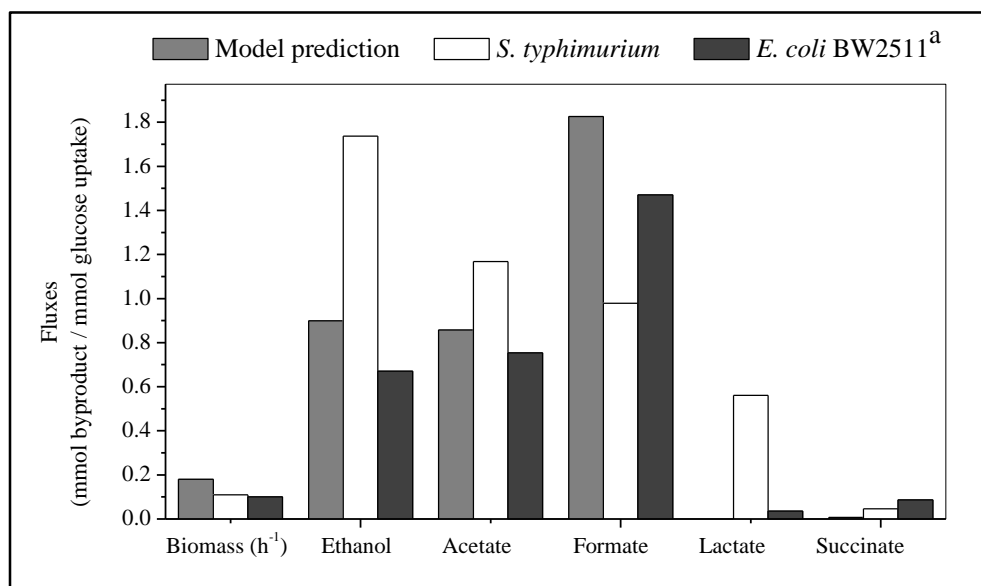


The results obtained *in silico* were qualitatively similar to the experimental data, but the flux values showed significant differences. For all the cases studied under glucose-limited growth conditions (Figure 5.3 A, B, C), the model estimated higher fluxes for biomass formation and lower fluxes for metabolite production when compared to *S. typhimurium* experimental data. The model predictions showed better agreement with the *E. coli* than the *S. typhimurium* data, as can be seen from Figure 3 for the glucose, CO₂ and acetate fluxes. The reconstructed model therefore seemed to be inefficient, because it was not able to describe the lower biomass fluxes and higher organic acid fluxes observed for *Salmonella*.

Simulations with the STM_v1.0 model were also carried out for anaerobic conditions (oxygen flux = 0) using the pFBA method and the same objective function (biomass

maximization). The simulated fluxes are shown in Figure 5.4, together with the experimental values for *E. coli*¹⁹ and *S. typhimurium*, for comparison.

FIGURE 5.4 - Comparison between experimental data for anaerobic batch cultivation and *in silico* solutions using the experimental GUF value ($9.6 \text{ mmol g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), constraining the maximum oxygen uptake rate to zero in the environmental conditions used for the pFBA simulation. (^aData from Castaño-Cerezo et al.¹⁹)



The simulated fluxes confirmed the low growth rate observed experimentally for the anaerobic culture. Substantial formate, ethanol, and acetate fluxes were estimated by the simulations, whereas no lactate or CO₂ formation was predicted. The values of the *in silico* and *in vitro* fluxes were significantly different, especially for *Salmonella*, and once again, the model predictions for the anaerobic conditions did not provide an accurate description of cell metabolism.

5.4. Conclusions

From data obtained during *S. typhimurium* cultures under aerobic and anaerobic conditions, using glucose or acetic acid as carbon source, it was possible to map extracellular metabolite formation.

Chemostat cultivations of *S. typhimurium* at various growth rates showed that *Salmonella* cells exhibit a mixed metabolism, with both respiration and fermentation occurring. Acetate is secreted even under completely aerobic conditions and at low specific growth rates, which was not observed for *E. coli* under the same conditions.

Both bacteria are able to assimilate acetate as carbon source. However, it was shown here that the rate of consumption of acetate by *Salmonella* was much lower than reported for *E. coli* strains. This finding suggests that acetate accumulation is a greater obstacle to the establishment of high cell density cultivations of *S. typhimurium*.

During anaerobic growth, *S. typhimurium* produced mainly ethanol, acetate and formate, as also found for *E. coli*. However, *E. coli* showed a greater ability to assimilate glucose.

In silico studies of *S. typhimurium* metabolism were performed using the genome-scale STM_v1.0 metabolic model reconstructed for *S. typhimurium*. This model, which is based on the *E. coli* metabolic network, provided a poor description of the experimental results obtained with *S. typhimurium*. Although *E. coli* and *Salmonella* share the same reactions involved in the central carbon metabolism pathways, these bacteria show distinct regulation mechanisms and reaction kinetics in these pathways.⁵⁴ For these reasons, they can exhibit different growth rates under similar cultivation conditions, as well as differences in the capacity to metabolize certain substrates.^{46,54}

The results therefore demonstrate that the use of a modified metabolic model originally designed for *E. coli* is not sufficient for description of the central carbon metabolism of *S. typhimurium*. The necessary improvements to the model depend on a better understanding of *S. typhimurium* central carbon metabolism, which could be achieved by a more detailed analysis of intracellular metabolite fluxes provided by ¹³C metabolic flux analysis (¹³C MFA).

Once an improved model becomes available, metabolic engineering strategies based on the results of simulations could be used to optimize cell metabolism and drive the carbon flux more efficiently towards biomass formation.

Acknowledgements

Special thanks to Amadeus Azevedo for the HPLC analyses and technical assistance. The authors acknowledge the national funding received from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), the international cooperation project CAPES-FCT (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brazil - Fundação para a Ciência e a Tecnologia/Portugal – Process 315/11), CAPES (Atração de Jovens Talentos - Process 064922/2014-01) and to Fundação para a Ciência e Tecnologia the strategic funding of UID/BIO/04469/2013 unit.

5.5. Literature Cited

1. Hegazy WAH, Hensel M. *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. *Future Microbiol.* 2012; 7(1): 111-127.
2. Jelsbak L, Hartman H, Schroll C, Rosenkrantz JT, Lemire S, Wallrodt I, Thomsen LE, Poolman M, Kilstrup M, Jensen PR, Olsen JE. Identification of metabolic pathways essential for fitness of *Salmonella typhimurium in vivo*. *PloS One.* 2014; 9(7): e101869.
3. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(6): 882-889.
4. Silva AJ, Zangirolami TC, Novo MTM, Giordano RC, Martins EAL. Live bacterial vaccine vectors: an overview. *Braz J Microbiol.* 2014, 45(4): 1117-1129.
5. Carleton HA. Pathogenic bacteria as vaccine vectors: Teaching old bugs new tricks. *Yale J Biol Med.* 2010; 83: 217-222.
6. Chin'ombe N. Recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a vaccine vector for HIV-1 Gag. *Viruses.* 2013; 5: 2062-2078.
7. Gómez-Duarte OG, Bumann D, Meyer TF. The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of *Helicobacter pylori* related diseases. *Vaccine.* 1999; 17(13): 1667-1673.
8. Husseiny MI, Rawson J, Kaye A, Nair I, Todorov I, Hensel M, Kandeel F, Ferreri K. An oral vaccine for type 1 diabetes based on live attenuated *Salmonella*. *Vaccine.* 2014; 32: 2300-2307.
9. Synnott A, Ohshima K, Nakai Y, Tanji Y. IgA response of BALB/c mice to orally administered *Salmonella typhimurium* flagellin-displaying T2 bacteriophages. *Biotechnol Prog.* 2009; 25(2): 552-558.

10. Hiller J, Franco-Lara E, Weuster-Botz D. Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures. *Biotechnol Lett.* 2007; 29(8): 1169-1178.
11. Darji A, Lage S, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27(4): 341-349.
12. Kong W, Clark-Curtiss J, Curtiss III R. Utilizing *Salmonella* for antigen delivery: the aims and benefits of bacterial delivered vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 2013; 12(4): 345-347.
13. Starai VJ, Escalante-Semerena JC. Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming). *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(16), 2020-2030.
14. Starai VJ, Gardner JG, Escalante-Semerena JC. Residue Leu-641 of acetyl-CoA synthetase is critical for the acetylation of residue Lys-609 by the protein acetyltransferase enzyme of *Salmonella enterica*. *J Biol Chem.* 2005; 280(28): 26200-26205.
15. Starai VJ, Garrity J, Escalante-Semerena JC. 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. *Microbiol.* 2005; 151(11): 3793-3801.
16. Thao S, Escalante-Semerena JC. Control of protein function by reversible N ϵ -lysine acetylation in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(2): 200-204.
17. Wang Q, Zhang Y, Yang C, Xiong H, Lin Y, Yao J, Li H, Xie L, Zhao W, Yao Y, Ning Z, Zeng R, Xiong Y, Guan K, Zhao S, Zhao GP. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science.* 2010; 327(5968): 1004-1007.
18. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 1997; 277(5331): 1453-1462.

19. Castaño-Cerezo S, Pastor JM, Renilla S, Bernal V, Iborra JL, Cánovas M. An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2009; 8(1): 54.
20. De Mey M, Lequeux GJ, Beauprez JJ, Maertens J, Van Horen E, Soetaert WK, Vanrolleghem PA, Vandamme EJ. Comparison of different strategies to reduce acetate formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2007; 23(5): 1053-1063.
21. Kleman GL, Strohl WR. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(11): 3952-3958.
22. Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2002; 277(15): 13175-13183.
23. Paczia N, Nilgen A, Lehmann T, Gätgens J, Wiechert W, Noack S. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. *Microb Cell Fact.* 2012; 11(1): 122.
24. Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2007; 23(2): 381-388.
25. Wang Q, Ou MS, Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT. Metabolic flux control at the pyruvate node in an anaerobic *Escherichia coli* strain with an active pyruvate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(7): 2107-2114.
26. Renilla S, Bernal V, Fuhrer T, Castaño-Cerezo S, Pastor JM, Iborra JL, Sauer U, Cánovas M. Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(5): 2109-2124.

27. Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(5): 3653-3661.
28. Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors SO. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999; 51(5): 564-571.
29. Bernstein HC, Paulson SD, Carlson RP. Synthetic *Escherichia coli* consortia engineered for syntrophy demonstrate enhanced biomass productivity. *J Biotechnol.* 2012; 157(1): 159-166.
30. Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnol Adv.* 2005; 23(5): 345-357.
31. Valgepea K, Adamberg K, Nahku R, Lahtvee PJ, Arike L, Vilu R. Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Syst Biol.* 2010; 4(1): 166.
32. AbuOun M, Suthers PF, Jones G, Carter BR, Saunders MP, Maranas CD, Woodward MJ, Anjum MF. Genome scale reconstruction of a *Salmonella* metabolic model: comparison of similarity and differences with a commensal *Escherichia coli* strain. *J Biol Chem.* 2009; 284(43): 29480-29488.
33. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 2001; 413(6858): 852-856.
34. Götz A, Eylert E, Eisenreich W, Goebel W. Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10586.

35. Wilson PDG, Wilson DR, Brocklehurst TF, Coleman HP, Mitchell G, Waspe CR, Jukes SA, Robins MM. Batch growth of *Salmonella typhimurium* LT2: stoichiometry and factors leading to cessation of growth. *Int J Food Microbiol.* 2003; 89(2): 195-203.
36. du Preez JC, van Rensburg E, Kilian SG. Kinetics of growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in continuous culture. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008; 35(6): 611-618.
37. Kayser A, Weber J, Hecht V, Rinas U. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiol.* 2005; 151(3): 693-706.
38. Sauer U, Hatzimanikatis V, Hohmann HP, Manneberg M, Van Loon AP, Bailey JE. Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(10): 3687-3696.
39. Rocha I, Maia P, Evangelista P, Vilaça P, Soares S, Pinto JP, Nielsen J, Patil KR, Ferreira EC, Rocha, M. OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering. *BMC Syst Biol.* 2010; 4(1): 45.
40. Raman K, Chandra N. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Briefings Bioinf.* 2009; 10(4): 435-449.
- 41 Chaganti SR, Kim DH, Lalman JA. Flux balance analysis of mixed anaerobic microbial communities: effects of linoleic acid (LA) and pH on biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy.* 2011; 36(21): 14141-14152.
42. Senger RS, Papoutsakis ET. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 101(5): 1036-1052.
43. Raman K, Rajagopalan P, Chandra N. Flux balance analysis of mycolic acid pathway: targets for anti-tubercular drugs. *PLoS Comput Biol.* 2005; 1(5): e46.

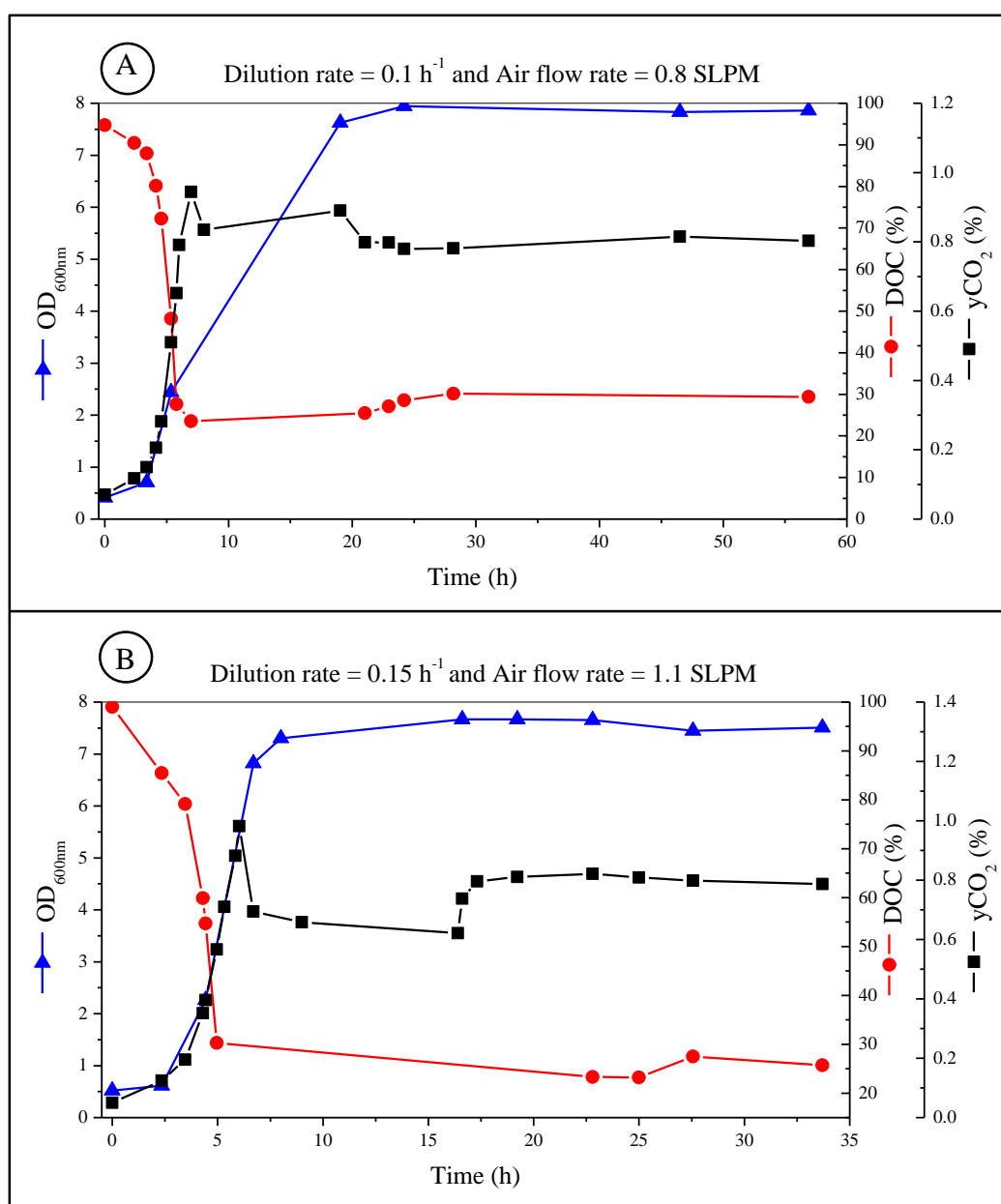
44. Shinfuku Y, Sorpitiporn N, Sono M, Furusawa C, Hirasawa T, Shimizu H. Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*. 2009; 8(1): 43.
45. Varma A, Palsson BØ. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(10): 3724-3731.
46. Thiele I, Hyduke DR, Steeb B, Fankam G, Allen DK, Bazzani S, Charusanti P, Chen F, Fleming RMT, Hsiung CA, Keersmaecker SCJ, Liao Y, Marchal K, Mo ML, Özdemir E, Raghunathan A, Reed JL, Shin S, Sigurbjörnsdóttir S, Steinmann J, Sudarsan S, Swainston N, Thijs IM, Zengler K, Palsson BØ, Adkins JN, Bumann D. A community effort towards a knowledge-base and mathematical model of the human pathogen *Salmonella typhimurium* LT2. *BMC Systems Biology*. 2011; 5: 1-9.
47. Horta ACL, Zangirolami TC, Giordano RC, Cruz AJ, Reis GB, Jesus CDF. Supervisory system for bioreactor high cell density cultivations. Brazil. Patent 11008-6, RPI 2115, 2011.
48. Horta ACL, Silva AJ, Sargo CR, Velez AM, Gonzaga MC, Gonçalves VM, Giordano RC, Zangirolami TC. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. *Braz J Chem Eng*. 2014; 31(2): 457-468.
49. Stephanopoulos G, Aristidou AA, Nielsen J. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press Inc.; 1998.
50. Shuler ML, Kargi F. How cells grow (2nd edition). In: *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. New York: Prentice Hall PTR, Inc.; 2007: 155–206.
51. Lewis NE, Hixson KK, Conrad TM, Lerman JA, Charusanti P, Polpitiya AD, Adkins JN, Schramm G, Purvine SO, Lopez-Ferrer D, Weitz KK, Eils R, König R, Smith RD, Palsson BØ. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. *Mol Syst Biol*. 2010; 6: 390.

52. Castan A, Enfors SO. Formate accumulation due to DNA release in aerobic cultivations of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 77(3): 324-328.
53. Brown SW, Meyer HP, Fiechter A. Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1985; 23(1): 5-9.
54. 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; 3(1): 38.
55. Wendisch VF, Graaf AA, Sahn H, Eikmanns BJ. Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol.* 2000; 182(11): 3088-3096.
56. 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*. *J Biochem.* 1994; 116(4): 916-922.
57. Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, Wolfe AJ. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995; 177(10): 2878-2886.
58. Castaño-Cerezo S, Bernal V, Röhrig T, Termeer S, Cánovas M. Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Nε-lysine acetylation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 1-13.
59. Kao KC, Yang YL, Boscolo R, Sabatti C, Roychowdhury V, Liao JC. Transcriptome-based determination of multiple transcription regulator activities in *Escherichia coli* by using network component analysis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2004; 101(2): 641-646.
60. Kao KC, Tran LM, Liao JC. A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. *J Biol Chem.* 2005; 280(43): 36079-36087.

61. Chittori S, Savithri HS, Murthy MR. Structural and mechanistic investigations on *Salmonella typhimurium* acetate kinase (AckA): identification of a putative ligand binding pocket at the dimeric interface. BMC Struct Biol. 2012; 12(1): 24.
62. Fox DK, Roseman S. Isolation and characterization of homogeneous acetate kinase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1986; 261(29): 13487-13497.
63. Brown TDK, Jones-Mortimer MC, Kornberg HL. The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol. 1977; 102(2): 327-336.
64. Liu F, Gu J, Wang X, Zhang XE, Deng J. Acs is essential for propionate utilization in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun. 2014; 449: 272-277.
65. Chan CH, Garrity J, Crosby HA, Escalante-Semerena JC. In *Salmonella enterica*, the sirtuin-dependent protein acylation/deacylation system (SDPADS) maintains energy homeostasis during growth on low concentrations of acetate. Mol Microbiol. 2011; 80(1): 168-183.
66. Reger AS, Carney JM, Gulick AM. Biochemical and crystallographic analysis of substrate binding and conformational changes in acetyl-CoA synthetase. Biochem. 2007; 46: 6536-6546.
67. Andersen KB, von Meyenburg K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? J Bacteriol. 1980; 144(1): 114-123.
68. Driessen M, Postma PW, Dam K. Energetics of glucose uptake in *Salmonella typhimurium*. Arch Microbiol. 1987; 146: 358-361.
69. Chen X, Alonso AP, Allen DK, Reed JL, Shachar-Hill Y. Synergy between ¹³C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaptation to anaerobiosis in *E. coli*. Metab Eng. 2011; 13(1): 38-48.

5.6. Supplemental Material 1

FIGURE 5.5 - Time-course of optical density (\blacktriangle), concentration of dissolved oxygen (\bullet) and molar fraction of CO_2 (\blacksquare) in glucose-limited chemostat cultures of *Salmonella typhimurium* LT2 growing at dilution rate of A) $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$; B) $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$; C) $D = 0.48$ and 0.24 h^{-1} ; E) $D = 0.67$ and 0.58 h^{-1}



Continuation - FIGURE 5.5

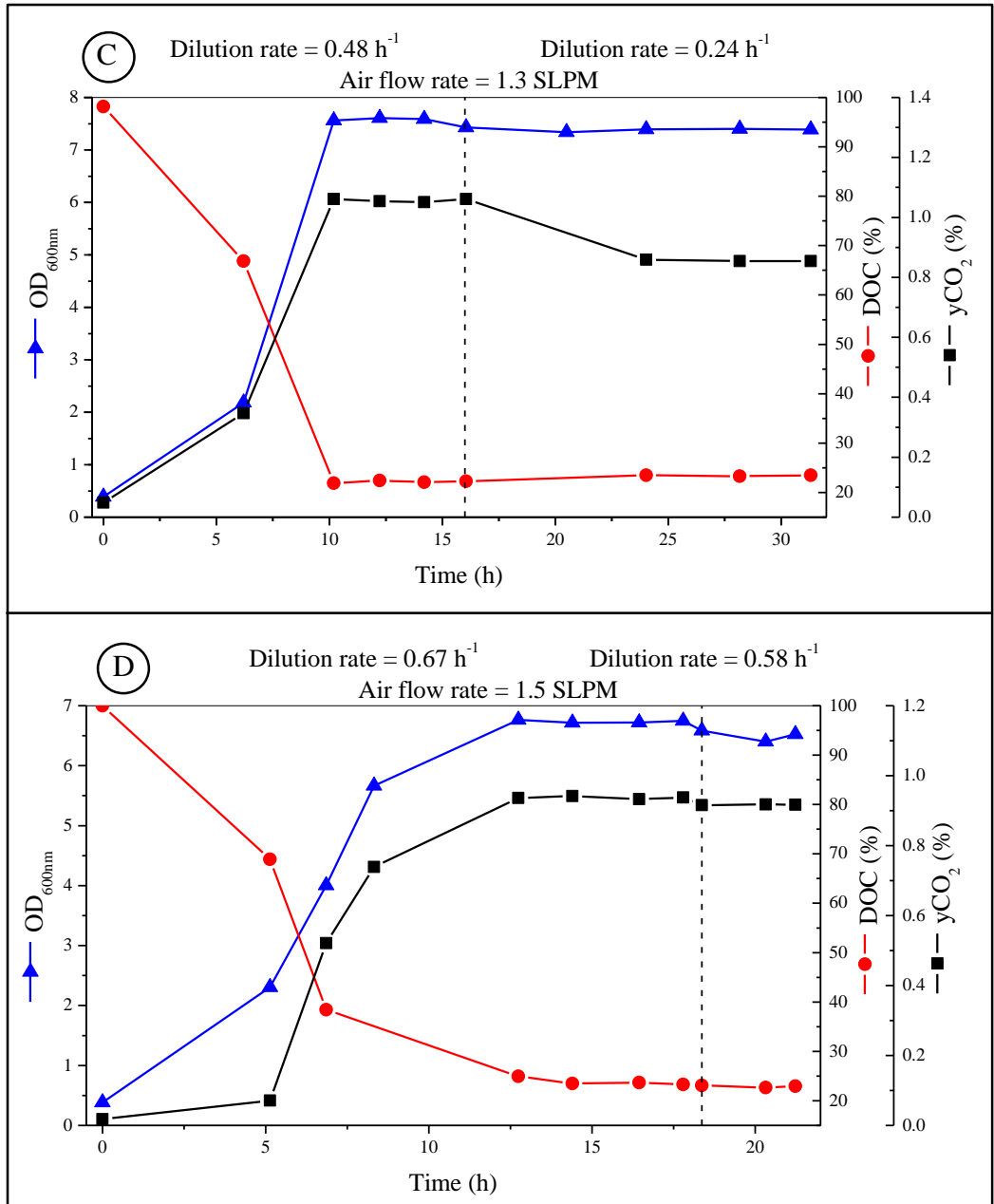
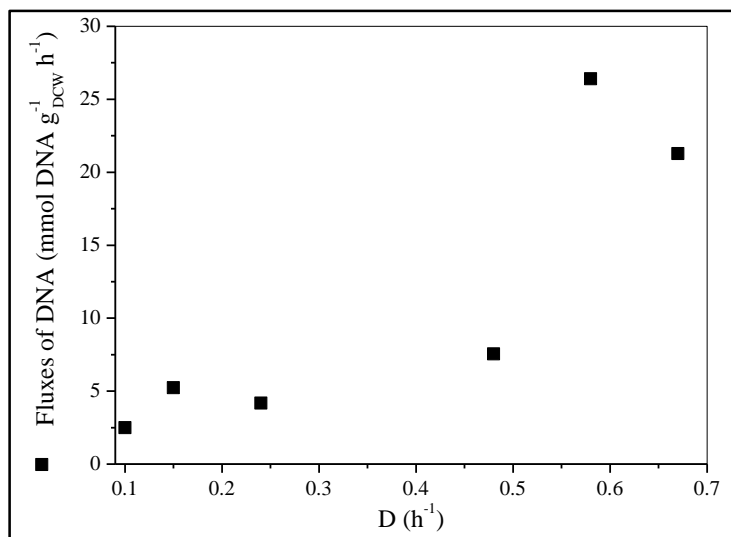


FIGURE 5.6 – Fluxes of DNA (■) during *S. typhimurium* glucose-limited aerobic chemostat cultivations under different dilution rates



TEXT SUPPLEMENTAL 1. Methodology for quantification of DNA concentration

DNA quantification using UV absorbance spectroscopy at 260 nm

DNA concentration measurements in supernatant samples, obtained in aerobic chemostat with glucose, were performed as described by Heptinstall and Rapley (2000). Absorption of DNA is maximal at a wavelength of 260 nm, and DNA concentration may be calculated from Eq A:

$$50 * A_{260\text{nm}} \text{ of sample} = \text{concentration of DNA (mg L}^{-1}\text{)} \quad (\text{A})$$

Degree of purity of DNA samples were evaluated by examining the absorption at a wavelength of 280 nm, in which protein has known absorption maxima. The ratio between $A_{260\text{nm}}$ and $A_{280\text{nm}}$ must be greater than 1.8, otherwise, it indicates some contamination by proteins, impairing the DNA quantification.

Literature Cited

Heptinstall J, Rapley R. Spectrophotometric analysis of nucleic acids. In The nucleic acid protocols handbook. Humana Press. 2000; 57 - 60.

6. ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS COM CARBONO MARCADO (^{13}C MFA)

6.1. Introdução

No Capítulo 4 pôde-se observar que a estratégia adotada no cultivo em batelada-alimentada de *Salmonella typhimurium*, mesmo mantendo a concentração residual de glicose em baixos níveis, não foi suficiente para promover o crescimento celular desejado.

Assim, para que produtos biotecnológicos baseados em células de *S. typhimurium*, já exemplificados no item 2.2., possam ser obtidos com baixo custo de produção é necessária a utilização de outras abordagens para minimizar a produção de acetato. Uma alternativa para aumentar a formação de biomassa seria a utilização de técnicas de manipulação das vias metabólicas baseadas na seleção racional de genes alvos que minimize a produção de acetato.

A maioria dos estudos que envolvem mudanças dirigidas no metabolismo de organismos, realizaram manipulações de poucos genes, de modo a melhorar o rendimento de um metabólito de interesse. Geralmente estes genes são escolhidos por meio da análise das vias metabólicas descritas na literatura ou então por tentativa e erro, gerando assim um grande número de mutantes que nem sempre apresentam o resultado esperado (KIM et al., 2008).

Atualmente, as ferramentas de engenharia metabólica estão em constante avanço tecnológico, possibilitando estudos *in silico* capazes de indicar possíveis genes alvo para *knockout*, sub ou super-expressão. Um exemplo ilustrativo do uso destas ferramentas pode ser encontrado no trabalho de Park e colaboradores (2007) onde se desenvolveu uma estirpe de *E. coli* geneticamente modificada capaz de produzir elevadas concentrações de L-valina em cultivos em batelada alimentada utilizando meio semi-definido com glicose como fonte de carbono, obtendo, após apenas 29,5 h de cultivo, 60,7 g L⁻¹ de L-valina.

Mas, para que resultados como os de Park e colaboradores (2007), sejam alcançados, é fundamental que o modelo metabólico em escala genômica do organismo estudado seja capaz de prever, com um bom nível de precisão, seu fenótipo para diferentes condições, permitindo o desenvolvimento *in silico* de estratégias de engenharia metabólica, desenho de meios de cultivo e de processos (OBERHARDT, PALSSON e PAPIN, 2009).

Como foi verificado no capítulo 5, o modelo metabólico em escala genômica para *S. typhimurium* LT2 (STM_v1.0 – THIELE et al., 2011) não foi capaz de prever,

adequadamente, a produção de acetato nas diferentes condições analisadas, necessitando de ajustes para tornar suas previsões mais precisas.

Melhores resultados podem ser obtidos nas simulações do modelo a partir da redução do espaço de soluções possíveis. A introdução (*input*) de dados experimentais na simulação, na forma de valores definidos ou faixas mais estreitas de valores possíveis para alguns fluxos metabólicos, tem esse efeito de restringir as soluções possíveis para se otimizar uma determinada função-objetivo. Tais dados experimentais podem ser obtidos através da Análise dos Fluxos Metabólicos, utilizando-se substrato isotopicamente marcado (^{13}C MFA), em cultivos contínuos.

6.2. Material e métodos específicos

6.2.1. Cultivos contínuos com substrato marcado

Estes experimentos foram conduzidos nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h^{-1} , sob as mesmas condições, já descritas no capítulo 5, com glicose não marcada até atingir-se o estado estacionário e este ser mantido por pelo menos 2 tempos de residência, sob as mesmas condições descritas no item 5.2.2. A partir deste ponto, iniciou-se a alimentação do meio M9-modificado com 80% de $^{12}\text{C}_6$ glicose (glicose não-marcada) e 20% de D[U- $^{13}\text{C}_6$] glicose (99% de glicose uniformemente marcada com ^{13}C nos seis carbonos - Omicron Bio) pelo período de um tempo de residência.

Ao longo destes cultivos, amostras foram retiradas para análises de crescimento celular e quantificação do consumo de substrato e produção de metabólitos extracelulares. Além disso, a biomassa obtida após 1 tempo de residência com alimentação de ^{13}C também foi recolhida e centrifugada para posterior análise por GC-MS (item 6.2.2.1.) da marcação dos aminoácidos constituintes dessa biomassa.

6.2.2. Métodos analíticos

6.2.2.1. Determinação da marcação de ^{13}C nos aminoácidos constituintes da biomassa gerada nos cultivos contínuos com substrato marcado

A análise dos fluxos metabólicos foi realizada a partir da biomassa obtida nos quimiostatos realizados nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h⁻¹ após 1 tempo de residência com alimentação do meio M9-modificado com 20% de D[U-¹³C₆] glicose.

Entretanto, para obter-se a distribuição de ¹³C nos aminoácidos constituintes da biomassa, esta foi submetida a um processo de hidrólise, fragmentando as proteínas constituintes da biomassa em seus respectivos aminoácidos. Em seguida, a biomassa hidrolisada precisou ser derivatizada, para então ser analisada por GC-MS, obtendo-se os dados necessários para as análises subsequentes.

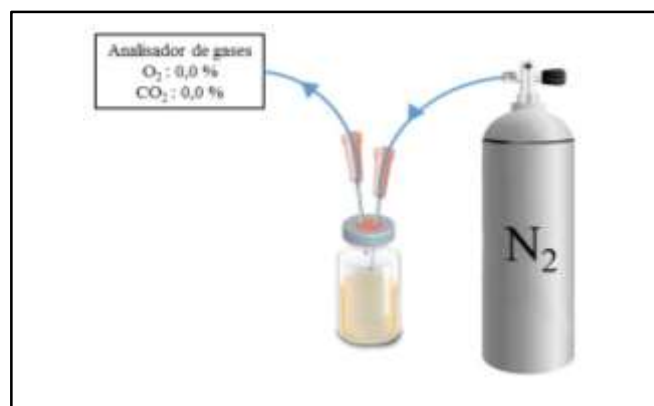
Todas estas etapas estão descritas no itens 6.2.2.1.1. a 6.2.2.1.3. e foram realizadas no Departamento de Engenharia Biológica (UMinho - Portugal), sob orientação dos Profs. Eugénio Ferreira e Isabel Rocha.

6.2.2.1.1. Tratamento das amostras

Após 1 tempo de residência com alimentação de meio M9-modificado com 20% de D[U-¹³C₆] glicose, várias alíquotas de 5 mL de caldo de cultivo foram retiradas e centrifugadas. Os sobrenadantes foram descartados, e os pellets ressuspensos em 1 mL de solução salina 0,9% e novamente centrifugados.

A biomassa obtida foi hidrolisada com 6 M HCl (495 µL) e 1 % (v/v) de ácido tioglicólico (5 µL), sob atmosfera inerte, ou seja, sem a presença de O₂ no frasco utilizado para a hidrólise, para evitar a oxidação de alguns aminoácidos (Figura 6.1), a 105 °C por 24 horas. No final desse processo as amostras foram neutralizadas com 10 M NaOH (500 µL) para interromper o processo de hidrólise. Em seguida as amostras foram liofilizadas por 24 horas.

FIGURA 6.1 – Esquema elaborado para retirar todo o O₂ presente no frasco utilizado para hidrólise da biomassa (saturação com N₂)



FONTE: Acervo próprio

Para que as amostras pudessem ser analisadas por GC-MS, foi necessário submetê-las a um processo de derivatização, utilizando o metil-cloroformato (MCF), como agente derivatizante.

A derivatização com MCF foi realizada seguindo o procedimento descrito por Villas-Bôas e colaboradores (2003). As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 200 μL de uma solução de NaOH (1 M) e agitadas vigorosamente utilizando um vortex. Centrifugou-se as amostras por 1 minuto a 1500 rpm e em seguida, transferiu-se todo o conteúdo para tubos silanizados (SMART et al., 2010) e 167 μL de metanol foram adicionados. A solução foi novamente centrifugada, para posterior adição de 34 μL de piridina. Um volume de 20 μL de MCF (99%) foi adicionado à mistura reacional e esta foi agitada vigorosamente por 30 segundos. Mais uma vez foram adicionados 20 μL de MCF e novamente agitou-se vigorosamente a solução por mais 30 segundos. Para separar a mistura em duas fases (orgânica e aquosa), 400 μL de clorofórmio foram adicionados, agitou-se a solução por 10 segundos, e rapidamente acrescentou-se 400 μL de solução de bicarbonato de sódio (50 mM). Esta mistura foi agitada vigorosamente por mais 10 segundos e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. Com uma pipeta de Pasteur removeu-se a fase aquosa (camada superior). Por fim, acrescentou-se cerca de 100 mg de sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para retirar qualquer vestígio de água. A fase orgânica “seca” foi transferida para vials com inserts silanizados para que, então, as amostras hidrolisadas e derivatizadas com MCF fossem analisadas por GC-MS.

6.2.2.1.2. Análises de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

As amostras derivatizadas com MCF foram injetadas no GC-MS (Varian 4000 GC/MS), composto por um cromatógrafo a gás, modelo Varian CP-3800, equipado com amostrador automático (CP-8400) e acoplado a um espectrômetro de massas (Varian CP-3800) com analisador do tipo Ion Trap (Varian 4000) e operando com ionização por impacto eletrônico (EI) de 70 eV.

A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna capilar ZB-1701, de polaridade intermediária (composta por 14% de cianopropilfenil e 86% de dimetilpolisiloxano), com dimensões internas de 30 m x 0,25 mm e 0,25 μm de espessura do filme e pré coluna de 5 m (Phenomenex, USA), usando hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL min^{-1} . As injeções de 1 μL de amostra foram feitas no modo splitless a 290 $^{\circ}\text{C}$ e utilizou-se a seguinte rampa de temperatura: temperatura inicial do forno mantida a 45 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min e programada para aumentar 9 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 180 $^{\circ}\text{C}$ e mantida por 5 min. Em seguida, a

temperatura foi elevada $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida por 5 min. Mais uma vez a temperatura foi elevada $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida por 11,5 min. E por fim, a temperatura foi elevada $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida por 2 min, totalizando uma corrida cromatográfica de 43 min.

A temperatura do injetor foi mantida em $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a temperatura de interface GC-MS a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que a temperatura do Ion trap foi mantida constante em $190\text{ }^{\circ}\text{C}$. O espectrômetro de massas (MS) foi operado no modo *full scan* (com varredura de íons de m/z entre 38 a 650 m/z) e início de detecção após 5 min. O espectro de massa foi gravado a $1,64\text{ scan s}^{-1}$.

Assim, neste trabalho, os aminoácidos derivatizados constituintes da biomassa obtida nos quimiostatos com ^{13}C foram eluídos na coluna cromatográfica, em períodos de tempo distintos (tempo de retenção), sendo em seguida ionizados gerando uma variedade de íons fragmentados, que permitiram a identificação destes aminoácidos e de sua marcação.

6.2.2.1.3. Análise dos dados obtidos por GC-MS

Os aminoácidos presentes nas proteínas constituintes das biomassas hidrolisadas foram identificados a partir da biblioteca de padrões de aminoácidos derivatizados com MCF, criada por Correia (2014). Essa identificação foi feita por comparação, considerando-se os tempos de retenção de cada aminoácido e seus respectivos espectros de massa. A comparação foi realizada manualmente e também através do *software* AMDIS (*software* livre e distribuído pela National Institute of Standards and Technology - NIST) (DAVIES, 1998; SMART et al., 2011).

Para a determinação dos fluxos metabólicos, nas diferentes taxas de diluição realizadas com ^{13}C , foi necessário, primeiramente, calcular os vetores de distribuição de isotopômeros de massa (**Mass isotopomer Distribution Vector – MDVs**) para os principais íons detectados em cada aminoácido e/ou do íon molecular (molécula ionizada que não foi fragmentada), como mostra a equação 6.1 (NANCHEN, FUHRER e SAUER, 2007).

$$MDV_{\alpha} = \begin{bmatrix} (m_0) \\ (m_1) \\ (m_2) \\ \vdots \\ (m_n) \end{bmatrix} \text{ com } \sum_{i=0}^n m_i = 1 \quad (6.1)$$

sendo:

n o número de carbonos isotopicamente marcados (^{13}C);

m_0 a abundância do isotopômero de massa correspondente ao íon sem átomo de ^{13}C ;

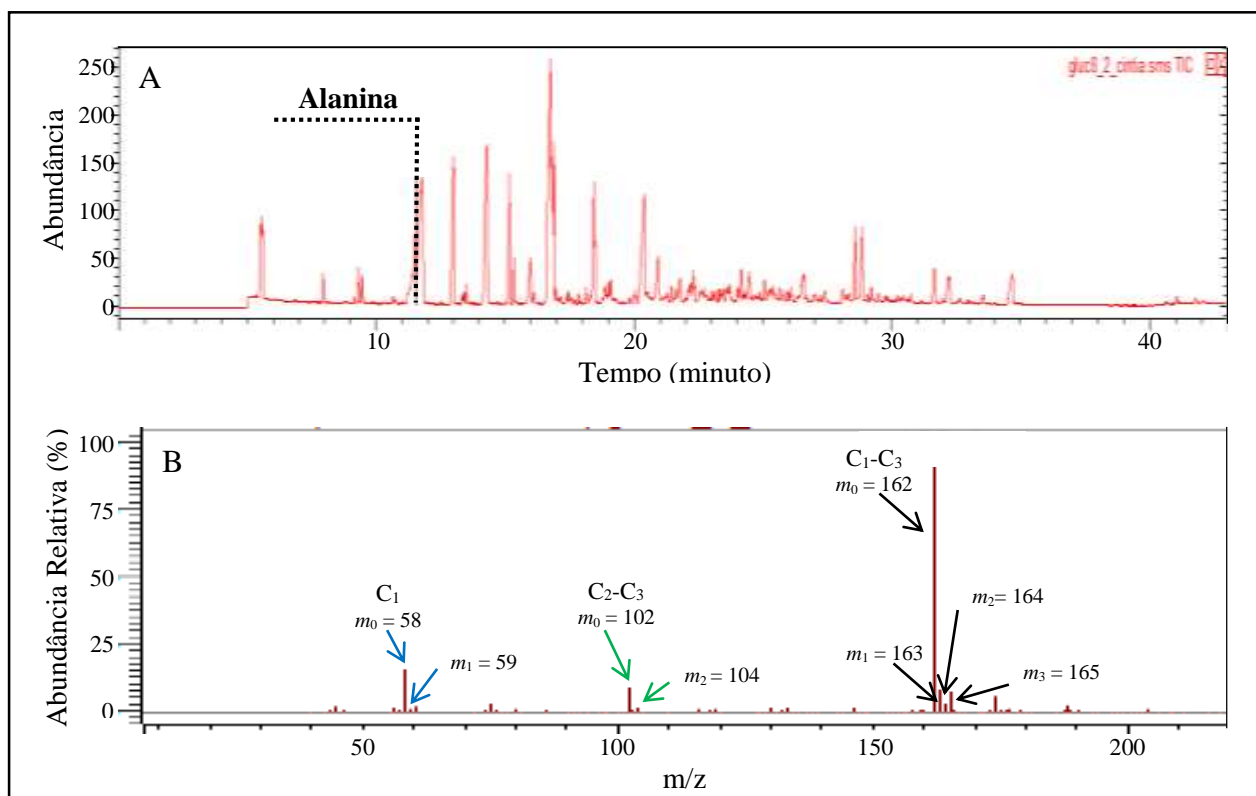
m_1 a abundância do isotopômero de massa correspondente ao íon com 1 átomo de ^{13}C ;

m_n a abundância do isotopômero de massa correspondente ao íon com n átomos de ^{13}C .

Por exemplo, a alanina ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$) derivatizada com MCF e marcada com ^{13}C , apresenta tempo de retenção de 11,3 min (Figura 6.2 A). Após sua ionização pode-se gerar 3 íons fragmentados principais, como mostra a Figura 6.2 B, sendo:

- o íon molecular $\text{C}_1\text{-C}_3$ ($m/z = 162$) que pode ter massa de m_0 , m_1 , m_2 e m_3 ;
- um íon contendo as ligações $\text{C}_2\text{-C}_3$ ($m/z = 102$) que pode ter massa de m_0 , m_1 , m_2 ;
- um íon com o carbono C_1 ($m/z = 58$) que pode ter massa de m_0 , m_1 .

FIGURA 6.2 – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa de uma amostra com ^{13}C e derivatizada com MCF. A) Perfil cromatográfico de íons totais e B) Espectro de massas (ampliado) relativo a Alanina ($\text{Tr} = 11,3$ min), destacando-se 3 íons fragmentados principais com seus respectivos valores de m/z .



FONTE: Acervo próprio

Continuando com o exemplo da alanina, o MDV_{α} do fragmento (M-162)⁺, é dado pela equação 6.2 (intensidades extraídas do espectro de massa da alanina – dados não apresentados neste trabalho):

$$MDV_{\alpha} = \begin{bmatrix} 0,82869 \\ 0,06932 \\ 0,01940 \\ 0,08258 \end{bmatrix} \quad (6.2)$$

Entretanto, as intensidades dos isotopômeros de massa obtidas nos espectros de massa devem ser corrigidas, já que nos fragmentos gerados, também há átomos naturalmente marcados como: ²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁸O, ²⁹Si, ³⁰Si, ³³S, ³⁴S, entre outros, que estão presentes nos constituintes do meio de cultivo e também nos reagentes utilizados no processo de derivatização (CHRISTENSEN e NIELSEN, 2000; MARCHINI et al., 1997;. NANCHEN, FUHRER e SAUER, 2007). Assim, a MDV_{α} corrigida (MDV_{α}^*) é calculada a partir de uma matriz de correção (equações 6.3 e 6.4) que leva em consideração o número de elementos que possuem abundância natural de isótopos estáveis e que estão presentes no fragmento analisado.

$$MDV_{\alpha}^* = C_{corr,CONHSiS}^{-1} \cdot MDV_{\alpha} \quad (6.3)$$

onde:

$$C_{corr,CONHSiS} = C_{corr,C} \cdot C_{corr,O} \cdot C_{corr,N} \cdot C_{corr,H} \cdot C_{corr,Si} \cdot C_{corr,S} \quad (6.4)$$

Também é importante desconsiderar a contribuição da biomassa que não foi marcada com ¹³C ao longo de 1 tempo de residência nos quimiostatos realizados, obtendo-se assim o vetor de distribuição de isotopômeros de massa para cada aminoácido (MDV_{AA}), a partir da equação 6.5 (NANCHEN, FUHRER e SAUER, 2007).

$$MDV_{AA} = \frac{MDV_{\alpha}^* - f_{n\grave{a}o\ marcado} \cdot MDV_{n\grave{a}o\ marcado,n}}{1 - f_{n\grave{a}o\ marcado}} \quad (6.5)$$

onde $f_{n\grave{a}o\ marcado}$ é a fração da biomassa que não foi marcada com ¹³C (equação 6.6) e $MDV_{n\grave{a}o\ marcado,n}$ é a distribuição de massa de um fragmento com n átomos de ¹²C.

$$f_{\text{não marcado}} = e^{-D \cdot t} \quad (6.6)$$

sendo D a taxa de diluição de cada quimiostato (h^{-1}) e t o tempo de alimentação com substrato marcado (h).

Também é importante analisar a marcação fracionária (*fractional labeling* - FL) para os diferentes fragmentos dos aminoácidos obtidos nos espectros de massa (equação 6.7 – NANCHEN, FUHRER e SAUER, 2007). Como neste trabalho utilizou-se 20 % de D[U- $^{13}\text{C}_6$] glicose nos cultivos contínuos, a FL deve ser próxima a 20 % para todos os fragmentos. Assim, nos casos em que a análise da FL para um determinado íon fragmentado foi inferior a 15 % ou superior a 25 %, esse fragmento foi desconsiderado para os cálculos seguintes de análise dos fluxos metabólicos.

$$FL = \frac{\sum_{i=0}^n i m_i}{n \cdot \sum_{i=0}^n m_i} \quad (6.7)$$

onde:

n é o número de átomos de C no fragmento do aminoácido;

m_i são as frações dos isotopômeros de massa;

i é o número de carbonos marcados em cada fração do íon analisado.

6.2.3. Análise do Fluxo Metabólico com marcação de ^{13}C (^{13}C MFA)

A distribuição dos fluxos metabólicos da *S. typhimurium* nos cultivos contínuos conduzidos com ^{13}C ($D = 0,24$ e $0,48 \text{ h}^{-1}$) foi realizada em colaboração com a Dra. Daniela Matilde Marques Correia utilizando o OpenFLUX, um software livre, flexível e de interface amigável (QUEK et al., 2009).

Assim, para que o OpenFLUX gerasse, como resposta final, a distribuição dos fluxos, foi necessário fornecer dois grupos de informações, assim como é ilustrado na Figura 6.3.

(i) dados para que o analisador Java calcule automaticamente o balanço de metabólitos (matriz estequiométrica) e de isótopos:

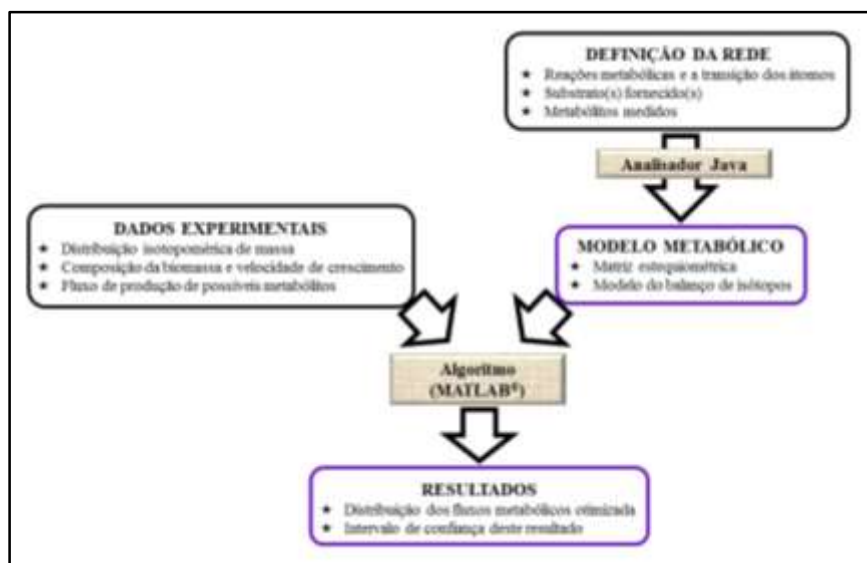
- as reações envolvidas nas vias do metabolismo do carbono central e as respectivas transições dos átomos de carbono;

- os fluxos dos substratos fornecidos (glicose, [U-¹³C₆] glicose e CO₂);
- os aminoácidos medidos.

(ii) dados experimentais:

- a distribuição isotopomérica de massa dos fragmentos dos aminoácidos que puderam ser utilizados neste cálculo, ou seja, com FL próxima de 20% (ver item 6.2.2.1.3.e equação 6.7);
- a composição da biomassa e velocidade de crescimento;
- os fluxos de produção dos metabólitos extracelulares (quantificados por HPLC) que foram normalizados em função do fluxo de absorção de glicose.

FIGURA 6.3 – Método requerido pelo OpenFLUX para obter a distribuição dos fluxos metabólicos



FONTE: Adaptado de QUEK et al., 2009

Vale ressaltar que a correção dos MDVs com relação a abundância natural dos elementos foi feita automaticamente pelo OpenFLUX.

6.3. Resultados

A fim de se determinar e comparar os fluxos metabólicos do metabolismo do carbono central da *S. typhimurium* em diferentes condições de crescimento, realizou-se cultivos contínuos com 20 % de D[U-¹³C] glicose em duas taxas de diluição ($D = 0,24$ e $0,48 \text{ h}^{-1}$) e utilizou-se a ferramenta OpenFLUX.

Os dados de crescimento celular, produção de acetato, consumo de glicose e balanço de carbono podem ser observados nas “Figure 5.1” e “Figure 5.2”. Já os fluxos medidos, também na fase estacionária destes quimiostatos, estão listados na Tabela 6.1.

TABELA 6.1 – Fluxos obtidos de consumo de glicose e produção de CO₂ e acetato nos cultivos contínuos em diferentes taxas de diluição

Taxa de Diluição (h ⁻¹)	Fluxo de Glicose	Fluxo de CO ₂ (mmol g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	Fluxo de Acetato
0,24	4,27 ± 0,11	9,86 ± 0,05	2,36 ± 0,05
0,48	6,68 ± 0,27	13,76 ± 0,03	2,85 ± 0,03

As biomassas obtidas nestes cultivos foram hidrolisadas, derivatizadas e analisadas por GC-MS, como descrito no item 6.2.2.1.

Através dos cromatogramas obtidos (utilizados para identificação dos aminoácidos presentes na amostra pela comparação dos tempos de retenção obtidos para todos os padrões de aminoácidos anteriormente injetados) e dos espectros de massas (utilizados para observação das fragmentações de cada aminoácido detectado na amostra, que também foram comparadas com as fragmentações dos padrões), foi possível obter as intensidades dos picos característicos de cada aminoácido.

Para ambos os experimentos não foi possível detectar os aminoácidos cisteína e triptofano, que podem ter sido oxidados durante o processo de hidrólise (DAUNER e SAUER, 2000) e glicina, que pode estar presente na biomassa em concentrações a baixo do limite de detecção do equipamento. A arginina também não foi detectada, já que não é derivatizada por este método. O processo de hidrólise adotado promove ainda a conversão da glutamina e da asparagina em glutamato e aspartato, respectivamente (DAUNER e SAUER, 2000; PICKERING e NEWTON, 1990). Histidina e metionina foram detectadas, entretanto, após a derivatização, estas se tornam instáveis e assim as intensidades obtidas podem interferir negativamente nas análises subsequentes.

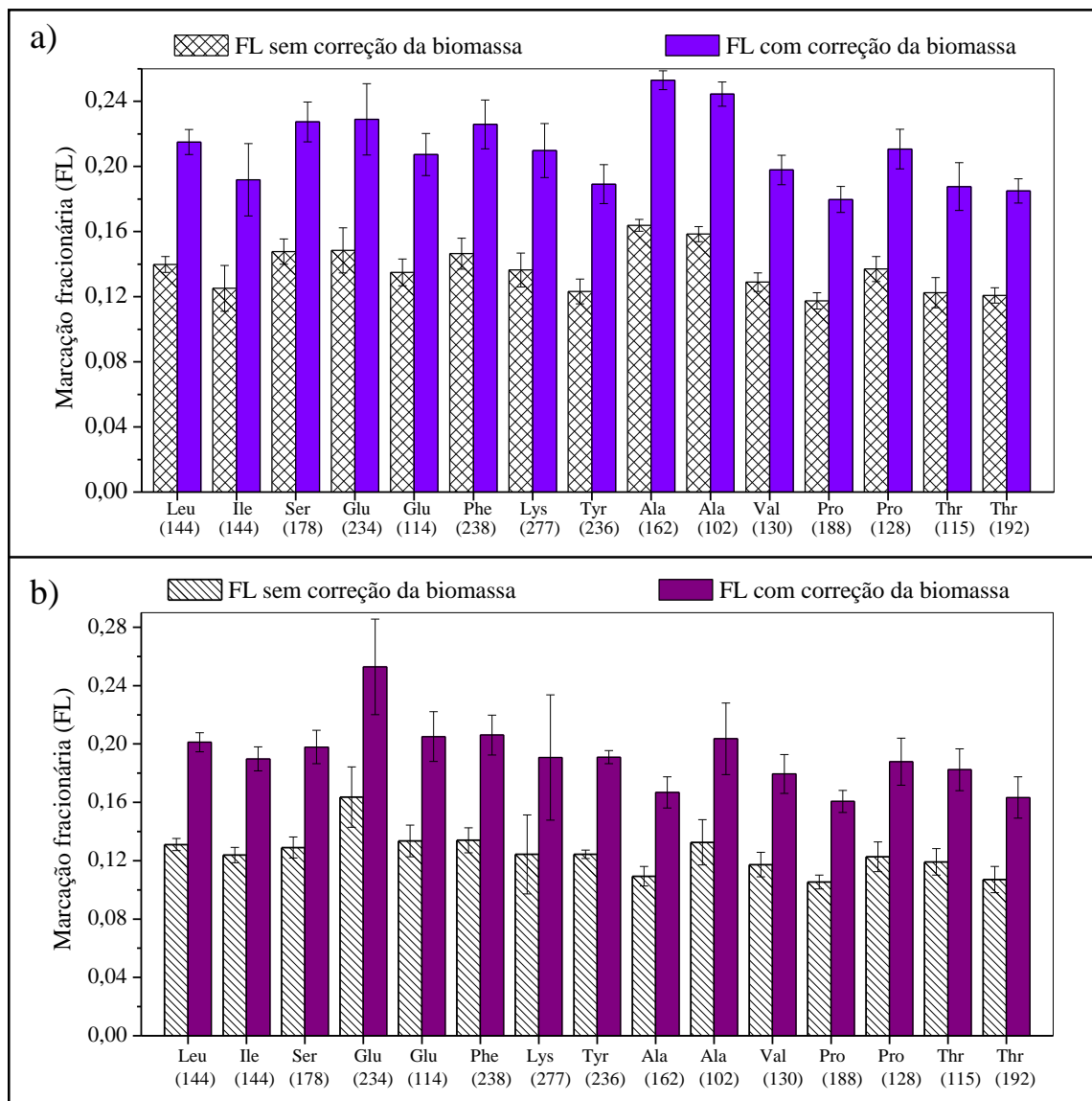
Os vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) dos fragmentos obtidos a partir das intensidades dos principais fragmentos dos aminoácidos detectados podem ser observados no Apêndice 1 (Tabela 6.4 e Tabela 6.5).

Com os MDVs dos principais fragmentos dos aminoácidos analisados, calculou-se a marcação fracionária destes, permitindo determinar a contribuição da marcação de ¹³C em cada fragmento analisado (equação 6.7). A média das marcações fracionárias de três réplicas calculadas para os diferentes fragmentos dos aminoácidos estão disponíveis no Apêndice 2 (Tabela 6.6 e Tabela 6.7), sendo que apenas os fragmentos que apresentaram marcação fracionária entre 15 % < FL < 25 % foram escolhidos para serem utilizados nas análises dos

fluxos metabólicos, podendo ser visualizados na Figura 6.4, onde também há a comparação entre a marcação fracionária que não foi corrigida em relação à biomassa e a marcação fracionária após correção da biomassa não marcada com ^{13}C ao longo de 1 tempo de residência nos quimiostatos realizados (equações 6.5 e 6.6).

A Figura 6.4 mostra claramente que a correção da biomassa não marcada altera significativamente os valores da marcação fracionária. Sem essa correção os valores não seriam realistas e poucos fragmentos apresentariam marcação dentro da faixa estipulada como aceitável (15 a 25 %), impedindo a utilização dos dados para a análise dos fluxos.

FIGURA 6.4 - Marcação fracionária (FL com e sem correção da biomassa não marcada) calculada para os aminoácidos constituintes da biomassa obtida em cultivos contínuos nas taxas de diluição de $0,24\text{ h}^{-1}$ (a) e $0,48\text{ h}^{-1}$ (b). As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas técnicas.



Sendo os aminoácidos: Leu, Leucina; Ile, Isoleucina; Ser; Serina; Glu, Glutamato; Phe; fenilalanina; Lys, Lisina; Tyr, Tirosina; Ala, Alanina; Val, Valina; Pro, Prolina; Thr; Treonina.

Assim, após essa análise dos fragmentos dos aminoácidos, escolhendo-se aqueles com porcentagem de marcação aceitável e descartando-se os demais, foi possível determinar os fluxos metabólicos através do software OpenFLUX (QUEK et al., 2009).

Para a determinação dos fluxos metabólicos da *S. typhimurium* LT2, utilizando o software OpenFLUX, foi necessário gerar um arquivo de texto, contendo o modelo estequiométrico simplificado da *Salmonella typhimurium*, consistindo em 59 reações presentes na glicólise, nas vias da pentose fosfato e Entner-Doudoroff, no ciclo do TCA e na de formação dos aminoácidos. Também foram fornecidas as reações de transição dos átomos de carbono, estabelecendo-se o sentido das reações (reversível ou irreversível). Dados experimentais, como os fluxos de glicose, acetato e CO₂ (Tabela 6.1) assim como os valores estimados de alguns aminoácidos, de acordo as concentrações de aminoácidos constituintes da biomassa de *S. typhimurium* LT2 (HARTMAN et al., 2014 - Tabela 6.2), além dos MDVs corrigidos com a biomassa não marcada e seus erros padrão (Apêndice 1 - Tabela 6.4 e Tabela 6.5) foram também fornecidos.

TABELA 6.2 – Concentrações dos aminoácidos na biomassa utilizados como dados de entrada no software OpenFLUX

Aminoácidos	Concentração (mmol g _{DCW} ⁻¹)*	Fluxo dos aminoácidos (mmol g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)		Fluxos normalizados (mol mol ⁻¹)**	
		D = 0,24 h ⁻¹	D = 0,48 h ⁻¹	D = 0,24 h ⁻¹	D = 0,48 h ⁻¹
Alanina	0,683	0,164	0,328	3,839	4,908
Glutamato	0,72	0,173	0,346	4,047	5,174
Isoleucina	0,319	0,077	0,153	1,793	2,292
Leucina	0,527	0,126	0,253	2,962	3,787
Lisina	0,387	0,093	0,186	2,175	2,781
Fenilalanina	0,216	0,052	0,104	1,214	1,552
Prolina	0,24	0,058	0,115	1,349	1,725
Serina	0,308	0,074	0,148	1,731	2,213
Treonina	0,325	0,078	0,156	1,827	2,335
Tirosina	0,182	0,044	0,087	1,023	1,308
Valina	0,504	0,121	0,242	2,833	3,622

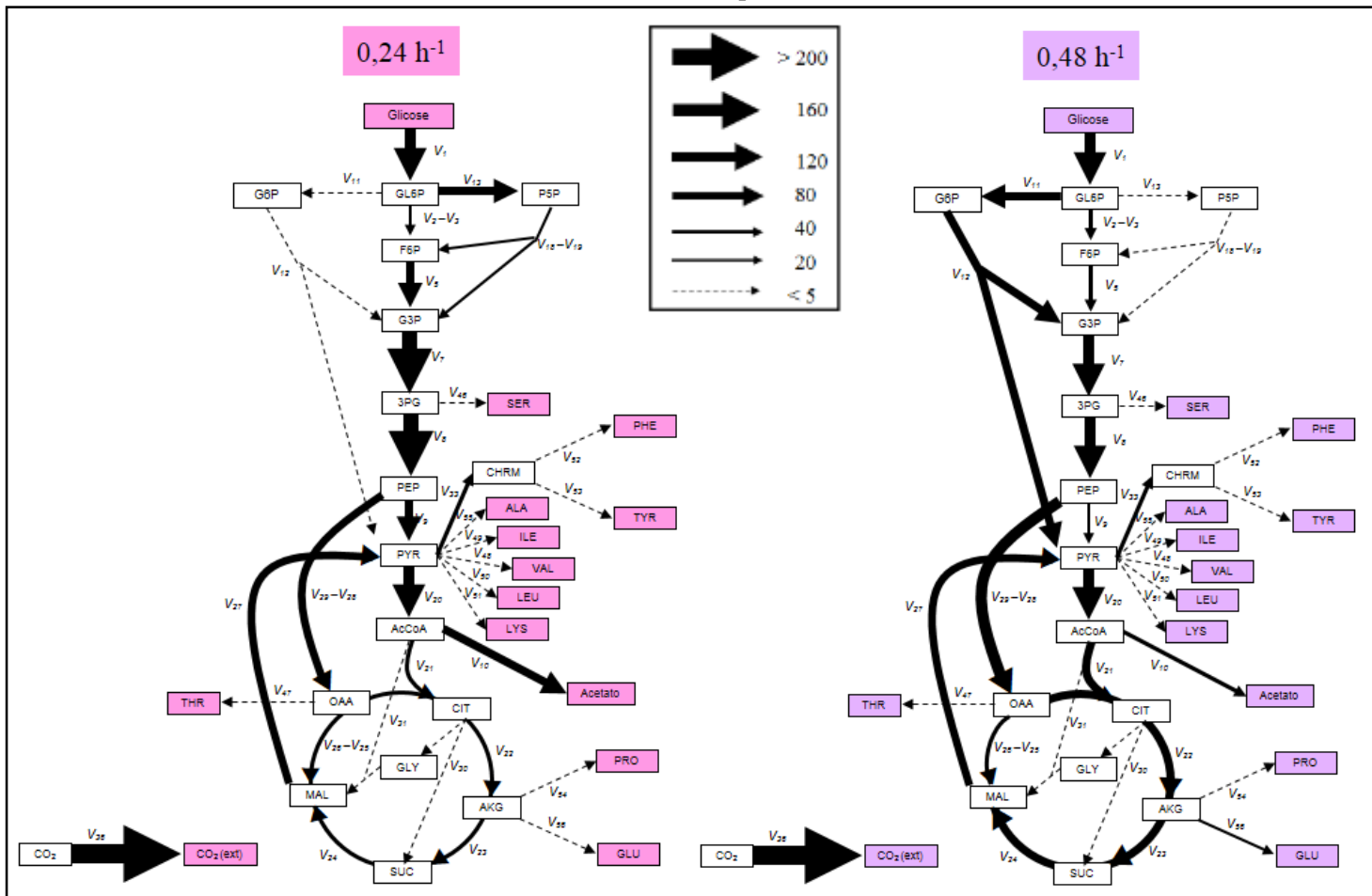
* Dados retirados de Hartman e colaboradores (2014)

** Fluxos dos aminoácidos normalizadas em função do fluxo de glicose em cada taxa de diluição ($r_{\text{glicose}}^{-1} \times 100$ em % de mol mol⁻¹)

Para cada taxa de diluição, foram feitos 50 ciclos de otimização, como descrito por Quek e colaboradores (2009). Assim, foi possível comparar as principais diferenças na distribuição dos fluxos para as 2 taxas de diluição estudadas em cultivos contínuos utilizando 20 % D-[U-¹³C]glicose. A Figura 6.5 ilustra estas distribuições dos fluxos que foram expressas

em uma base molar e normalizadas em função do fluxo de glicose ($r_i r_{\text{glicose}}^{-1} \times 100$ em % de mol mol⁻¹). Os resultados completos das simulações, para as duas taxas de diluição estão disponíveis no Apêndice 3 (Tabela 6.8).

FIGURA 6.5 - Distribuição dos fluxos de carbono de *S. typhimurium* LT2 determinados por análise de GC-MS da biomassa hidrolisada obtida em cultivos contínuos nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h⁻¹. A espessura das setas é proporcional aos fluxos relativos determinados. Os compostos destacados em rosa (D = 0,24 h⁻¹) e lilás (D = 0,48 h⁻¹) são os fluxos determinados experimentalmente e fornecidos ao software OpenFLUX. As reações referentes aos fluxos (V_1, V_2, \dots, V_{59}) indicados podem ser observadas no Apêndice 3



sendo GLC6P, glicose-6-fosfato; G6P, 6 fosfo-D-gluconato; P5P, pentose fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; 3PG, 3-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; AcCoA, acetil-CoA; CIT, citrato; AKG, α -cetoglutarato; SUC, succinato; GLY, glioxilato; MAL, malato; OAA, oxaloacetato, LEU, leucina; ILE, isoleucina, SER; serina; GLU, glutamato; PHE; fenilalanina; LYS, lisina; TYR, tirosina; ALA, alanina; VAL, valina; PRO, prolina; THR, treonina; CHR, corismato. Estas figuras podem ser visualizadas com melhor resolução no Apêndice 4 (Figura 6.6 e Figura 6.7).

Observando a Figura 6.5, é possível verificar diferenças nítidas na distribuição dos fluxos obtidos para as taxas de diluição analisadas. Os dados indicam que após a entrada da glicose na célula, esta é direcionada, majoritariamente, para a via da pentose fosfato e

glicólise na taxa de diluição de $0,24 \text{ h}^{-1}$, enquanto que na taxa de diluição de $0,48 \text{ h}^{-1}$, a glicose é catabolisada, predominantemente, pela via Entner-Doudoroff.

Um comportamento semelhante ao observado na taxa de diluição de $0,48 \text{ h}^{-1}$ também foi descrito para a bactéria aeróbia Gram-negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em experimentos em shaker (SCHATSCHNEIDER et al., 2014), em que a via ED é preferencialmente utilizada.

Segundo Conway (1992), esta via é mais primitiva do que a glicólise. Estudos genéticos vêm sendo realizados com bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Zymomonas mobilis* para que esta via possa ser melhor compreendida, não havendo informações disponíveis para *S. typhimurium*.

A maior diferença encontrada entre a via ED e a glicólise está relacionada com a produção de ATP e de co-fatores. Na via ED, é formado apenas um ATP, um NADPH e um NADH, enquanto que na glicólise, são formados dois ATP e dois NADHs (WHITE, DRUMMOND e FUQUA, 2007). Uma possível explicação relatada por estes autores, seria que as bactérias que utilizam preferencialmente a via ED para catabolizar a glicose não estariam limitadas por energia, e por isso não precisariam seguir a via glicolítica que acarretaria em uma maior produção de ATP.

Na taxa de diluição de $0,24 \text{ h}^{-1}$, nota-se um fluxo significativo na via da pentose fosfato. (Figura 2.2). No entanto, na taxa de diluição de $0,48 \text{ h}^{-1}$ o fluxo neste sentido foi o mínimo requerido para a produção dos aminoácidos aromáticos (Figura 6.5).

Ainda na Figura 6.5, observa-se que em ambos os casos, 100 % do piruvato é convertido em acetil-CoA, que então é direcionado ao acetato e ao ciclo do TCA. Na taxa de diluição de $0,48 \text{ h}^{-1}$ o ciclo do TCA apresenta um fluxo superior.

Em ambas as taxas de diluição estudadas verificou-se um elevado fluxo nas reações anapleróticas, aquelas responsáveis por repor intermediários, como o malato e oxaloacetato, utilizados para biossíntese de aminoácidos, permitindo a continuidade do ciclo do TCA, havendo pequenas diferenças nos fluxos nas duas taxas de diluição. Em D de $0,48 \text{ h}^{-1}$, o fluxo do fosfoenolpiruvato a oxaloacetato é ligeiramente superior ao obtido na outra taxa de diluição. Essa diferença pode ser explicada pelo fato do ciclo do TCA na D de $0,48 \text{ h}^{-1}$ ter um fluxo mais elevado, havendo uma necessidade maior em repor o oxaloacetato.

Utilizando o OpenFLUX também foi possível realizar uma análise de sensibilidade Monte Carlo, sendo esta um técnica muito utilizada na reconstrução de modelos metabólicos em escala-genômica, possibilitando avaliar a consistência dos dados gerados nas simulações. Desta forma, através dessa análise, pôde-se obter o valor ótimo para os fluxos das

reações avaliadas e os limites para um intervalo de confiança de 95 % (limites superiores e inferiores), para cada taxa de diluição estudada, resultados, estes, que podem ser observados na Tabela 6.3.

TABELA 6.3 - Análise de sensibilidade de Monte Carlo associada a um intervalo de confiança de 95 % a partir de dados obtidos de cultivos contínuos nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h⁻¹

* As reações referentes aos fluxos aqui indicados podem ser observadas no Apêndice 3 (Tabela 6.8)

Fluxos*	Parâmetros obtidos para D = 0,24 h ⁻¹			Parâmetros obtidos para D = 0,48 h ⁻¹		
	Lim. Inferior	Valor ótimo	Lim. superior	Lim. inferior	Valor ótimo	Lim. Superior
V ₂ - V ₃	-179,0	15,1	213,0	-161,0	32,1	215,0
V ₄	0,000	62,2	97,9	0	24,2	64,5
V ₅	0,000	62,2	97,9	0	24,2	64,5
V ₆	0,000	62,2	97,9	0	24,2	64,5
V ₇	79	141,0	177,0	76,2	100,0	141,0
V ₈	77,2	139,0	175,0	74,0	98,2	138,0
V ₉	0	65,6	136,0	0	15,2	92,4
V ₁₀	55,3	55,3	55,3	42,7	42,7	42,7
V ₁₁	0,000	3,8	49,0	7,4	67,9	99,0
V ₁₂	0,000	3,8	49,0	7,4	67,9	99,0
V ₁₃	-162,0	81,1	279,0	-214,0	0,000	254,0
V ₁₄ - V ₁₅	-46,8	34,1	100,0	-63,5	7,9	92,6
V ₁₆ - V ₁₇	-46,8	34,1	100,0	-63,5	7,9	92,6
V ₁₈ - V ₁₉	-67,9	13,0	79,0	-87,3	-15,9	68,8
V ₂₀	53,0	89,3	123,0	58,1	100,0	123,0
V ₂₁	-34,9	31,1	112,0	-30,8	53,9	125,0
V ₂₂	-135,0	31,1	229,0	-138,0	53,9	239,0
V ₂₃	-140,0	25,7	224,0	-145,0	47,0	232,0
V ₂₄	-40,3	25,7	107,0	-37,7	47,0	118,0
V ₂₆ - V ₂₅	-78,7	37,0	106,0	-86,6	21,6	97,4
V ₂₇	-89,3	62,6	166,0	-81,8	68,6	167,0
V ₂₉ - V ₂₈	-58,8	73,8	175,0	-18,4	82,9	138,0
V ₃₀	-117,0	0,000	99,70	-114,0	3,5E-07	107
V ₃₁	-117,0	0,000	99,70	-114,0	3,5E-07	107
V ₃₂	21,00	21,00	21,00	23,8	23,8	23,8
V ₃₃	21,00	21,00	21,00	23,8	23,8	23,8
V ₃₄	18,80	18,80	18,80	20,9	20,9	20,9
V ₃₅	2,96	2,96	2,96	3,8	3,8	3,8

É possível verificar na Tabela 6.3, que a grande maioria dos fluxos determinados para as reações analisadas apresentaram amplos intervalos de confiança, como por exemplo a reação catalisada pela fosfoglicomutase ($V_2 - V_3$) que apresenta um variação de - 179,0 a 213,0 na taxa de diluição de $0,24 \text{ h}^{-1}$. Assim esse fluxo não pode ser considerado estatisticamente significativo em um intervalo de confiança de 95 %. Já a reação de conversão do piruvato à acetil-CoA, por exemplo, apresentou uma faixa um pouco menor na taxa de diluição de $0,48 \text{ h}^{-1}$, variando de 58,1 a 123,0, fluxo esse que pode ser considerado estatisticamente significativo.

Esta ampla faixa nos intervalos de confiança se refletiu em diferenças significativas entre os valores dos isotopômeros de massa obtidos experimentalmente e os simulados pelo software, gerando erros elevados (Apêndice 5 - Tabela 6.9 e Tabela 6.10).

Neste trabalho optou-se por utilizar todos os dados experimentais disponíveis para a determinação dos fluxos intracelulares, porém, algum ou vários fragmentos usados podem estar causando estes erros, não permitindo que os dados simulados convirjam para o mesmo valor que os experimentais.

Sabe-se que não é necessário utilizar os dados de todos os aminoácidos e de todos os seus fragmentos para se obter resultados confiáveis de distribuição de fluxos. A maioria dos trabalhos publicados, que também utilizam a ferramenta da MFA- ^{13}C , utilizam apenas os 3 primeiros valores dos MDVs (m_0 , m_1 e m_2), independentemente do número de carbonos do fragmento, uma vez que os maiores erros experimentais são observados nos últimos íons do fragmento, os quais têm sempre uma abundância menor (Apêndice 5 - Tabela 6.9 e Tabela 6.10). Sendo assim, uma estratégia que será empregada em breve, a fim de minimizar os erros, será retirar os dados experimentais que estão introduzindo os elevados erros padrão nos valores dos fluxos simulados.

Para complementar os dados obtidos neste trabalho, seria interessante realizar o mesmo estudo para taxas de diluição mais baixas e mais altas, como por exemplo $0,1 \text{ h}^{-1}$ e $0,7 \text{ h}^{-1}$, o que deve gerar informações relevantes para se obter uma visão mais completa do metabolismo da *Salmonella*.

O cultivo contínuo com a taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ já foi realizado, entretanto ainda não foi possível realizar as análises por GC-MS e a subsequente análise dos fluxos metabólicos nesta condição. No entanto, é importante ressaltar que os dados obtidos até o momento já representam um grande avanço no que diz respeito ao metabolismo de *Salmonella typhimurium*, sendo este, o primeiro trabalho realizado, até hoje, que tenhamos conhecimento, na área da fluxômica para este microrganismo.

Os fluxos metabólicos intracelulares determinados experimentalmente neste trabalho, poderão ser utilizados como restrições para as reações individuais presentes nos modelos metabólicos em escala genômica para *Salmonella* já relatados na literatura.

Com isso, espera-se obter um modelo metabólico mais realista e preciso, que permita o desenho *in silico* de modificações genéticas que permitam direcionar o metabolismo da *Salmonella* para a formação de um determinado produto de interesse.

6.4. Referências

CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Metabolic network analysis of *Penicillium chrysogenum* using ^{13}C -labeled glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 6, p. 652-659, 2000.

CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS microbiology reviews**, v. 103, n. 1, p. 1-28, 1992.

DAVIES, A. N. The new Automated Mass Spectrometry Deconvolution and Identification System (AMDIS). **Spectroscopy Europe**, v. 10, p. 24–27 (1998).

DAUNER, M.; SAUER, U. GC-MS Analysis of Amino Acids Rapidly Provides Rich Information for Isotopomer Balancing. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 4, p. 642-649, 2000.

CORREIA, D. M. **Systems analysis of metabolism in *Helicobacter pylori***. 2014. 261 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica) - Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Braga, 2014.

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.

KIM, T. Y. et al. Strategies for systems-level metabolic engineering. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 5, p. 612-623, 2008.

MARCHINI, J. S. et al. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em medicina. **Medicina**, v. 30, n. 4, p. 494-507, 1997.

NANCHEN, A.; FUHRER, T.; SAUER, U. Determination of Metabolic Flux Ratios From ^{13}C -Experiments and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Data. In: Weckwerth, W. **Metabolomics: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press Inc., 2007. p. 177-197.

OBERHARDT, M. A.; PALSSON, B. Ø.; PAPIN, J. A. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 320, 2009.

PARK, J. H. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 19, p. 7797-7802, 2007.

PICKERING, M. V.; NEWTON, P. Amino acid hydrolysis: old problems, new solutions. **LC-GC**, v. 8, n. 10, p. 779-781, 1990.

QUEK LE, et al. OpenFLUX: efficient modelling software for ¹³C-based metabolic flux analysis. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 25, 2009.

SCHATSCHNEIDER, S. et al. Metabolic flux pattern of glucose utilization by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: prevalent role of the Entner–Doudoroff pathway and minor fluxes through the pentose phosphate pathway and glycolysis. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 10, p. 2663-2676, 2014.

SMART, K. F. et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 10, p. 1709-1729, 2010.

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.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Simultaneous analysis of amino and non-amino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 322, p. 134-138, 2003.

WHITE, D.; DRUMMOND, J. T.; FUQUA, C. The physiology and biochemistry of prokaryotes. In: _____. **Central Metabolic Pathways**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2007. p. 210-212.

6.5. Apêndices

6.5.1. Apêndice 1

Valores dos vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) para cada fragmento de aminoácido considerado, constituinte da biomassa hidrolisada obtida nos cultivos contínuos de *Salmonella typhimurium* LT2 nas taxas de diluição de 0,24 h⁻¹ e 0,48 h⁻¹. Os valores representam as médias de triplicatas técnicas com o desvio padrão correspondente entre parênteses, e sendo $m_0, m_1, m_2, \dots, m_n$ os isotopômeros de massa com n números de carbono marcados isotopicamente.

TABELA 6.4 - Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) para os fragmentos dos aminoácidos da biomassa obtida na taxa de diluição de 0,24 h⁻¹, sem e com correção da biomassa marcada

Aminoácido (Fragmento - íon)	Isotopômeros de massa	Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs)	
		Sem correção da biomassa	Com correção da biomassa
Alanina (C ₁ -C ₃ - 162)	m_0	0,757 (± 0,017)	0,633 (± 0,026)
	m_1	0,097 (± 0,015)	0,135 (± 0,023)
	m_2	0,045 (± 0,012)	0,071 (± 0,019)
	m_3	0,102 (± 0,009)	0,161 (± 0,014)
Alanina (C ₂ -C ₃ - 102)	m_0	0,809 (± 0,003)	0,711 (± 0,005)
	m_1	0,064 (± 0,006)	0,089 (± 0,009)
	m_2	0,126 (± 0,009)	0,200 (± 0,014)
Glutamato (C ₁ -C ₅ - 234)	m_0	0,590 (± 0,045)	0,381 (± 0,071)
	m_1	0,181 (± 0,016)	0,256 (± 0,026)
	m_2	0,154 (± 0,021)	0,244 (± 0,034)
	m_3	0,054 (± 0,005)	0,085 (± 0,008)
	m_4	0,016 (± 0,002)	0,025 (± 0,003)
	m_5	0,006 (± 0,001)	0,009 (± 0,002)
Glutamato (C ₂ -C ₄ - 114)	m_0	0,700 (± 0,009)	0,543 (± 0,014)
	m_1	0,211 (± 0,008)	0,316 (± 0,013)
	m_2	0,073 (± 0,014)	0,116 (± 0,022)
	m_3	0,016 (± 0,005)	0,025 (± 0,007)
Leucina (C ₂ -C ₅ - 144)	m_0	0,653 (± 0,080)	0,476 (± 0,126)
	m_1	0,190 (± 0,011)	0,277 (± 0,172)
	m_2	0,114 (± 0,001)	0,180 (± 0,002)
	m_3	0,029 (± 0,025)	0,045 (± 0,039)
	m_4	0,014 (± 0,005)	0,022 (± 0,008)

Continuação da Tabela 6.4

Aminoácido (Fragmento - íon)	Isotopômeros de massa	Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs)	
		Sem correção da biomassa	Com correção da biomassa
Isoleucina (C ₂ -C ₆ - 144)	<i>m</i> ₀	0,719 (± 0,024)	0,581 (± 0,038)
	<i>m</i> ₁	0,125 (± 0,001)	0,174 (± 0,002)
	<i>m</i> ₂	0,106 (± 0,017)	0,167 (± 0,027)
	<i>m</i> ₃	0,034 (± 0,010)	0,054 (± 0,015)
	<i>m</i> ₄	0,015 (± 0,007)	0,024 (± 0,012)
Serina (C ₁ -C ₃ - 178)	<i>m</i> ₀	0,773 (± 0,013)	0,659 (± 0,021)
	<i>m</i> ₁	0,102 (± 0,006)	0,143 (± 0,010)
	<i>m</i> ₂	0,035 (± 0,001)	0,055 (± 0,002)
	<i>m</i> ₃	0,090 (± 0,008)	0,143 (± 0,013)
Fenilalanina (C ₁ -C ₉ - 238)	<i>m</i> ₀	0,569 (± 0,019)	0,372 (± 0,030)
	<i>m</i> ₁	0,121 (± 0,009)	0,141 (± 0,015)
	<i>m</i> ₂	0,088 (± 0,005)	0,139 (± 0,008)
	<i>m</i> ₃	0,085 (± 0,007)	0,135 (± 0,011)
	<i>m</i> ₄	0,053 (± 0,001)	0,085 (± 0,002)
	<i>m</i> ₅	0,025 (± 0,004)	0,040 (± 0,007)
	<i>m</i> ₆	0,017 (± 0,001)	0,027 (± 0,002)
	<i>m</i> ₇	0,010 (± 0,003)	0,016 (± 0,005)
	<i>m</i> ₈	0,022 (± 0,010)	0,035 (± 0,016)
	<i>m</i> ₉	0,008 (± 0,005)	0,013 (± 0,001)
Lisina (C ₁ -C ₆ - 277)	<i>m</i> ₀	0,616 (± 0,043)	0,430 (± 0,068)
	<i>m</i> ₁	0,148 (± 0,021)	0,198 (± 0,033)
	<i>m</i> ₂	0,109 (± 0,017)	0,171 (± 0,027)
	<i>m</i> ₃	0,079 (± 0,040)	0,125 (± 0,062)
	<i>m</i> ₄	0,031 (± 0,011)	0,050 (± 0,018)
	<i>m</i> ₅	0,008 (± 0,010)	0,013 (± 0,016)
	<i>m</i> ₆	0,008 (± 0,007)	0,013 (± 0,012)

Continuação da Tabela 6.4

Aminoácido (Fragmento - ion)	Isotopômeros de massa	Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs)	
		Sem correção da biomassa	Com correção da biomassa
Tirosina (C ₁ -C ₉ - 236)	<i>m</i> ₀	0,594 (± 0,030)	0,411 (± 0,048)
	<i>m</i> ₁	0,132 (± 0,011)	0,157 (± 0,018)
	<i>m</i> ₂	0,087 (± 0,003)	0,138 (± 0,004)
	<i>m</i> ₃	0,092 (± 0,013)	0,146 (± 0,020)
	<i>m</i> ₄	0,041 (± 0,009)	0,065 (± 0,014)
	<i>m</i> ₅	0,018 (± 0,008)	0,028 (± 0,013)
	<i>m</i> ₆	0,018 (± 0,004)	0,029 (± 0,007)
	<i>m</i> ₇	0,012 (± 0,017)	0,019 (± 0,003)
	<i>m</i> ₈	0,002 (± 0,001)	0,002 (± 0,002)
	<i>m</i> ₉	0,004 (± 0,000)	0,006 (± 0,000)
Valina (C ₂ -C ₅ - 130)	<i>m</i> ₀	0,733 (± 0,010)	0,602 (± 0,016)
	<i>m</i> ₁	0,075 (± 0,003)	0,094 (± 0,004)
	<i>m</i> ₂	0,156 (± 0,007)	0,247 (± 0,012)
	<i>m</i> ₃	0,016 (± 0,004)	0,025 (± 0,006)
	<i>m</i> ₄	0,020 (± 0,004)	0,032 (± 0,007)
Prolina (C ₁ -C ₅ - 188)	<i>m</i> ₀	0,663 (± 0,013)	0,499 (± 0,021)
	<i>m</i> ₁	0,162 (± 0,008)	0,227 (± 0,013)
	<i>m</i> ₂	0,113 (± 0,011)	0,179 (± 0,018)
	<i>m</i> ₃	0,047 (± 0,005)	0,073 (± 0,008)
	<i>m</i> ₄	0,010 (± 0,001)	0,016 (± 0,002)
	<i>m</i> ₅	0,003 (± 0,001)	0,005 (± 0,002)
Prolina (C ₂ -C ₅ - 128)	<i>m</i> ₀	0,666 (± 0,021)	0,496 (± 0,033)
	<i>m</i> ₁	0,165 (± 0,011)	0,237 (± 0,017)
	<i>m</i> ₂	0,133 (± 0,010)	0,021 (± 0,016)
	<i>m</i> ₃	0,026 (± 0,003)	0,041 (± 0,005)
	<i>m</i> ₄	0,009 (± 0,001)	0,016 (± 0,002)
Treonina (C ₁ -C ₂ - 115)	<i>m</i> ₀	0,819 (± 0,005)	0,726 (± 0,007)
	<i>m</i> ₁	0,116 (± 0,014)	0,172 (± 0,022)
	<i>m</i> ₂	0,064 (± 0,018)	0,101 (± 0,029)
Treonina (C ₁ -C ₄ - 192)	<i>m</i> ₀	0,714 (± 0,009)	0,573 (± 0,015)
	<i>m</i> ₁	0,153 (± 0,004)	0,219 (± 0,006)
	<i>m</i> ₂	0,079 (± 0,010)	0,124 (± 0,015)
	<i>m</i> ₃	0,041 (± 0,005)	0,065 (± 0,008)
	<i>m</i> ₄	0,012 (± 0,002)	0,020 (± 0,003)

TABELA 6.5 - Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs) para os fragmentos dos aminoácidos da biomassa obtida na taxa de diluição de 0,48 h⁻¹, sem e com correção da biomassa marcada

Aminoácido (Fragmento - íon)	Isotopômeros de massa	Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs)	
		Sem correção da biomassa	Com correção da biomassa
Alanina (C ₁ -C ₃ - 162)	<i>m</i> ₀	0,841 (± 0,011)	0,766 (± 0,017)
	<i>m</i> ₁	0,063 (± 0,008)	0,082 (± 0,013)
	<i>m</i> ₂	0,023 (± 0,003)	0,036 (± 0,005)
	<i>m</i> ₃	0,073 (± 0,009)	0,115 (± 0,014)
Alanina (C ₂ -C ₃ - 102)	<i>m</i> ₀	0,838 (± 0,023)	0,756 (± 0,036)
	<i>m</i> ₁	0,059 (± 0,013)	0,081 (± 0,020)
	<i>m</i> ₂	0,103 (± 0,017)	0,163 (± 0,027)
Glutamato (C ₁ -C ₅ - 234)	<i>m</i> ₀	0,565 (± 0,061)	0,342 (± 0,097)
	<i>m</i> ₁	0,177 (± 0,020)	0,250 (± 0,031)
	<i>m</i> ₂	0,167 (± 0,026)	0,263 (± 0,041)
	<i>m</i> ₃	0,066 (± 0,012)	0,105 (± 0,019)
	<i>m</i> ₄	0,018 (± 0,005)	0,029 (± 0,008)
Glutamato (C ₂ -C ₄ - 114)	<i>m</i> ₅	0,007 (± 0,001)	0,012 (± 0,002)
	<i>m</i> ₀	0,724 (± 0,022)	0,582 (± 0,035)
	<i>m</i> ₁	0,162 (± 0,010)	0,238 (± 0,016)
	<i>m</i> ₂	0,103 (± 0,008)	0,163 (± 0,012)
Leucina (C ₂ -C ₅ - 144)	<i>m</i> ₃	0,011 (± 0,006)	0,017 (± 0,010)
	<i>m</i> ₀	0,703 (± 0,016)	0,554 (± 0,025)
	<i>m</i> ₁	0,127 (± 0,013)	0,177 (± 0,020)
	<i>m</i> ₂	0,124 (± 0,004)	0,1970 (± 0,006)
	<i>m</i> ₃	0,033 (± 0,000)	0,053 (± 0,001)
	<i>m</i> ₄	0,012 (± 0,002)	0,019 (± 0,002)

Continuação da Tabela 6.5

Aminoácido (Fragmento - íon)	Isotopômeros de massa	Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs)	
		Sem correção da biomassa	Com correção da biomassa
Isoleucina (C ₂ -C ₆ - 144)	<i>m</i> ₀	0,725 (± 0,003)	0,590 (± 0,005)
	<i>m</i> ₁	0,115 (± 0,010)	0,158 (± 0,017)
	<i>m</i> ₂	0,111 (± 0,008)	0,176 (± 0,013)
	<i>m</i> ₃	0,035 (± 0,007)	0,055 (± 0,012)
	<i>m</i> ₄	0,013 (± 0,004)	0,021 (± 0,006)
Serina (C ₁ -C ₃ - 178)	<i>m</i> ₀	0,804 (± 0,010)	0,709 (± 0,016)
	<i>m</i> ₁	0,083 (± 0,008)	0,112 (± 0,012)
	<i>m</i> ₂	0,034 (± 0,014)	0,054 (± 0,022)
	<i>m</i> ₃	0,079 (± 0,017)	0,124 (± 0,026)
Fenilalanina (C ₁ -C ₉ - 238)	<i>m</i> ₀	0,592 (± 0,011)	0,408 (± 0,018)
	<i>m</i> ₁	0,112 (± 0,008)	0,126 (± 0,012)
	<i>m</i> ₂	0,083 (± 0,008)	0,130 (± 0,012)
	<i>m</i> ₃	0,095 (± 0,005)	0,150 (± 0,008)
	<i>m</i> ₄	0,051 (± 0,004)	0,081 (± 0,006)
	<i>m</i> ₅	0,022 (± 0,001)	0,035 (± 0,001)
	<i>m</i> ₆	0,015 (± 0,001)	0,023 (± 0,001)
	<i>m</i> ₇	0,008 (± 0,002)	0,013 (± 0,003)
	<i>m</i> ₈	0,016 (± 0,011)	0,026 (± 0,017)
	<i>m</i> ₉	0,005 (± 0,001)	0,009 (± 0,002)
Lisina (C ₁ -C ₆ - 277)	<i>m</i> ₀	0,626 (± 0,053)	0,445 (± 0,084)
	<i>m</i> ₁	0,172 (± 0,020)	0,237 (± 0,031)
	<i>m</i> ₂	0,083 (± 0,009)	0,131 (± 0,014)
	<i>m</i> ₃	0,086 (± 0,022)	0,136 (± 0,035)
	<i>m</i> ₄	0,015 (± 0,005)	0,024 (± 0,008)
	<i>m</i> ₅	0,015 (± 0,017)	0,024 (± 0,026)
	<i>m</i> ₆	0,002 (± 0,003)	0,003 (± 0,005)

Continuação da Tabela 6.5

Aminoácido (Fragmento - íon)	Isotopômeros de massa	Vetores de distribuição de isotopômeros de massa (MDVs)	
		Sem correção da biomassa	Com correção da biomassa
Tirosina (C ₁ -C ₉ - 236)	<i>m</i> ₀	0,594 (± 0,015)	0,411 (± 0,024)
	<i>m</i> ₁	0,116 (± 0,009)	0,133 (± 0,014)
	<i>m</i> ₂	0,088 (± 0,009)	0,139 (± 0,014)
	<i>m</i> ₃	0,093 (± 0,007)	0,147 (± 0,011)
	<i>m</i> ₄	0,055 (± 0,007)	0,087 (± 0,012)
	<i>m</i> ₅	0,023 (± 0,005)	0,037 (± 0,008)
	<i>m</i> ₆	0,016 (± 0,005)	0,025 (± 0,008)
	<i>m</i> ₇	0,008 (± 0,004)	0,013 (± 0,006)
	<i>m</i> ₈	0,003 (± 0,002)	0,005 (± 0,003)
	<i>m</i> ₉	0,004 (± 0,003)	0,006 (± 0,004)
Valina (C ₂ -C ₅ - 130)	<i>m</i> ₀	0,755 (± 0,015)	0,636 (± 0,024)
	<i>m</i> ₁	0,066 (± 0,003)	0,0802 (± 0,004)
	<i>m</i> ₂	0,153 (± 0,009)	0,243 (± 0,015)
	<i>m</i> ₃	0,008 (± 0,003)	0,013 (± 0,005)
	<i>m</i> ₄	0,018 (± 0,004)	0,029 (± 0,007)
Prolina (C ₁ -C ₅ - 188)	<i>m</i> ₀	0,712 (± 0,010)	0,575 (± 0,016)
	<i>m</i> ₁	0,122 (± 0,003)	0,163 (± 0,005)
	<i>m</i> ₂	0,110 (± 0,002)	0,174 (± 0,004)
	<i>m</i> ₃	0,041 (± 0,007)	0,066 (± 0,012)
	<i>m</i> ₄	0,011 (± 0,001)	0,017 (± 0,002)
	<i>m</i> ₅	0,003 (± 0,001)	0,005 (± 0,001)
Prolina (C ₂ -C ₅ - 128)	<i>m</i> ₀	0,713 (± 0,030)	0,571 (± 0,048)
	<i>m</i> ₁	0,127 (± 0,016)	0,177 (± 0,026)
	<i>m</i> ₂	0,127 (± 0,0090)	0,201 (± 0,0156)
	<i>m</i> ₃	0,020 (± 0,004)	0,031 (± 0,007)
	<i>m</i> ₄	0,012 (± 0,000)	0,020 (± 0,001)
Treonina (C ₁ -C ₂ - 115)	<i>m</i> ₀	0,824 (± 0,017)	0,734 (± 0,028)
	<i>m</i> ₁	0,114 (± 0,017)	0,168 (± 0,026)
	<i>m</i> ₂	0,062 (± 0,009)	0,098 (± 0,014)
Treonina (C ₁ -C ₄ - 192)	<i>m</i> ₀	0,740 (± 0,013)	0,614 (± 0,021)
	<i>m</i> ₁	0,143 (± 0,015)	0,203 (± 0,024)
	<i>m</i> ₂	0,071 (± 0,006)	0,112 (± 0,010)
	<i>m</i> ₃	0,038 (± 0,014)	0,060 (± 0,022)
	<i>m</i> ₄	0,007 (± 0,003)	0,012 (± 0,004)

6.5.2. Apêndice 2

Marcação fracionária (FL) calculada manualmente, antes e depois da correção da biomassa não marcada com ^{13}C , para os isotopômeros de massa dos aminoácidos constituintes da biomassa hidrolisada obtida nos cultivos contínuos nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h^{-1} . Os valores representam a média de triplicatas técnicas (\pm desvio padrão).

TABELA 6.6 - Marcação fracionária (FL) para os isotopômeros de massa dos aminoácidos constituintes da biomassa hidrolisada obtida no cultivo contínuo em $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$

Aminoácido	Fórmula molecular	Íon	FL sem correção da biomassa	FL corrigida com a biomassa
Alanina	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	162	0,164 ($\pm 0,004$)	0,253 ($\pm 0,006$)
Alanina	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	102	0,158 ($\pm 0,005$)	0,244 ($\pm 0,007$)
Glutamato	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	234	0,149 ($\pm 0,014$)	0,229 ($\pm 0,022$)
Glutamato	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	114	0,135 ($\pm 0,008$)	0,207 ($\pm 0,013$)
Leucina	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	144	0,140 ($\pm 0,005$)	0,215 ($\pm 0,008$)
Isoleucina	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	144	0,125 ($\pm 0,014$)	0,192 ($\pm 0,022$)
Serina	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	178	0,148 ($\pm 0,008$)	0,227 ($\pm 0,012$)
Fenilalanina	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	238	0,146 ($\pm 0,009$)	0,226 ($\pm 0,015$)
Lisina	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	277	0,136 ($\pm 0,010$)	0,210 ($\pm 0,017$)
Tirosina	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	236	0,123 ($\pm 0,008$)	0,189 ($\pm 0,012$)
Valina	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	130	0,129 ($\pm 0,006$)	0,198 ($\pm 0,009$)
Prolina	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	188	0,117 ($\pm 0,005$)	0,180 ($\pm 0,008$)
Prolina	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	128	0,137 ($\pm 0,008$)	0,211 ($\pm 0,012$)
Treonina	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	115	0,123 ($\pm 0,009$)	0,198 ($\pm 0,019$)
Treonina	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	192	0,121 ($\pm 0,005$)	0,186 ($\pm 0,007$)

TABELA 6.7 - Marcação fracionária (FL) para os isotopômeros de massa dos aminoácidos constituintes da biomassa hidrolisada obtida no cultivo contínuo em $D = 0,48 \text{ h}^{-1}$

Aminoácido	Fórmula molecular	Íon	FL sem correção da biomassa	FL corrigida com a biomassa
Alanina	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	162	0,109 ($\pm 0,0071$)	0,167 ($\pm 0,011$)
Alanina	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	102	0,133 ($\pm 0,016$)	0,204 ($\pm 0,025$)
Glutamato	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	234	0,164 ($\pm 0,021$)	0,253 ($\pm 0,033$)
Glutamato	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	114	0,134 ($\pm 0,011$)	0,205 ($\pm 0,017$)
Leucina	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	144	0,131 ($\pm 0,004$)	0,201 ($\pm 0,007$)
Isoleucina	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	144	0,124 ($\pm 0,005$)	0,190 ($\pm 0,008$)
Serina	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	178	0,129 ($\pm 0,0071$)	0,198 ($\pm 0,011$)
Fenilalanina	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	238	0,134 ($\pm 0,009$)	0,206 ($\pm 0,014$)
Lisina	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	277	0,124 ($\pm 0,027$)	0,191 ($\pm 0,043$)
Tirosina	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	236	0,124 ($\pm 0,003$)	0,191 ($\pm 0,005$)
Valina	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	130	0,117 ($\pm 0,008$)	0,179 ($\pm 0,013$)
Prolina	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	188	0,105 ($\pm 0,005$)	0,161 ($\pm 0,008$)
Prolina	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	128	0,123 ($\pm 0,010$)	0,188 ($\pm 0,016$)
Treonina	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	115	0,119 ($\pm 0,0094$)	0,182 ($\pm 0,014$)
Treonina	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	192	0,107 ($\pm 0,009$)	0,163 ($\pm 0,020$)

6.5.3. Apêndice 3

TABELA 6.8 - Modelo estequiométrico simplificado utilizado nas otimizações com o software OpenFLUX e os valores de fluxos obtidos para cada reação considerada nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h⁻¹

Fluxo	Reação	D = 0,24 h ⁻¹	D = 0,48 h ⁻¹
V ₁	GLC_EX = GLC6P	100,0	100,0
V ₂	GLC6P = F6P	15,1	32,1
V ₃	F6P = GLC6P	0,000	0,000
V ₄	F6P = F16BP	62,2	24,2
V ₅	F16BP = DHAP + G3P	62,2	24,2
V ₆	DHAP = G3P	62,2	24,2
V ₇	G3P = 3PG	141,0	100,0
V ₈	3PG = G3P	139,0	98,2
V ₉	PEP = PYR	65,6	15,2
V ₁₀	ACCOA = ACE	55,3	42,7
V ₁₁	GLC6P = G6P	3,8	67,9
V ₁₂	G6P = G3P + PYR	3,8	67,9
V ₁₃	GLC6P = P5P + CO ₂	81,1	0,000
V ₁₄	P5P + P5P = S7P + G3P	178,0	7,9
V ₁₅	S7P + G3P = P5P + P5P	144,0	0,000
V ₁₆	S7P + G3P = E4P + F6P	34,1	15,7
V ₁₇	E4P + F6P = S7P + G3P	0,000	7,8
V ₁₈	E4P + P5P = F6P + G3P	13,0	19900,0
V ₁₉	F6P + G3P = E4P + P5P	0,000	19900,0
V ₂₀	PYR = ACCOA + CO ₂	89,3	100,0
V ₂₁	ACCOA + OAA = CIT	31,1	53,9
V ₂₂	CIT = AKG + CO ₂	31,1	53,9
V ₂₃	AKG = 0.5 SUC + 0.5 SUC + CO ₂	25,7	47,0
V ₂₄	SUC = MAL	25,7	47,0
V ₂₅	MAL = OAA	12,7	541,0
V ₂₆	OAA = MAL	49,7	562,0
V ₂₇	MAL = PYR + CO ₂	62,6	68,6
V ₂₈	OAA = PEP + CO ₂	0,000	0,000
V ₂₉	PEP + CO ₂ = OAA	73,8	82,9
V ₃₀	CIT = GLYOXY + 0.5 SUC + 0.5 SUC	0,000	0,000
V ₃₁	GLYOXY + ACCOA = MAL	0,000	0,000
V ₃₂	E4P + PYR = SHKM	21,0	23,8
V ₃₃	SHKM + PYR = CHRM	21,0	23,8
V ₃₄	CHRM = ANTHR + PYR	18,8	20,9
V ₃₅	PYR + PYR = ISV + CO ₂	3,0	3,8
V ₃₆	CO ₂ = CO ₂ _EX	231,0	206,0
V ₃₇	ACE = ACE_EX	55,3	42,7

Continuação da Tabela 6.8

Fluxo	Reação	D = 0,24 h ⁻¹	D = 0,48 h ⁻¹
V ₃₈	VAL = VAL_BIO	2,8	3,6
V ₃₉	PHE = PHE_BIO	1,2	1,6
V ₄₀	TYR = TYR_BIO	1,0	1,3
V ₄₁	ILE = ILE_BIO	1,8	2,3
V ₄₂	LEU = LEU_BIO	3,0	3,8
V ₄₃	LYS = LYS_BIO	2,2	2,8
V ₄₄	SER = SER_BIO	1,7	2,2
V ₄₅	THR = THR_BIO	1,8	2,3
V ₄₆	3PG = SER	1,7	2,2
V ₄₇	OAA = THR	1,8	2,3
V ₄₈	PYR + PYR = VAL + CO ₂	2,8	3,6
V ₄₉	PYR + OAA = ILE + CO ₂	1,8	2,3
V ₅₀	ISV + ACCOA = LEU + CO ₂	3,0	3,8
V ₅₁	OAA + PYR = LYS + CO ₂	2,2	2,8
V ₅₂	CHRM = PHE + CO ₂	1,2	1,6
V ₅₃	CHRM = TYR + CO ₂	1,0	1,3
V ₅₄	AKG = PRO	1,4	1,7
V ₅₅	PYR = ALA	3,8	4,9
V ₅₆	AKG = GLU	4,1	5,2
V ₅₇	PRO = PRO_BIO	1,4	1,7
V ₅₈	ALA = ALA_BIO	3,8	4,9
V ₅₉	GLU = GLU_BIO	4,1	5,2

* As linhas destacadas em lilás representam as reações cujos fluxos foram utilizados como dados de entrada para o software OpenFLUX

6.5.4. Apêndice 4

FIGURA 6.6 - Distribuição dos fluxos metabólicos internos de *S. typhimurium* na taxa de diluição de $0,24 \text{ h}^{-1}$ (Figura 6.5 – com melhor resolução)

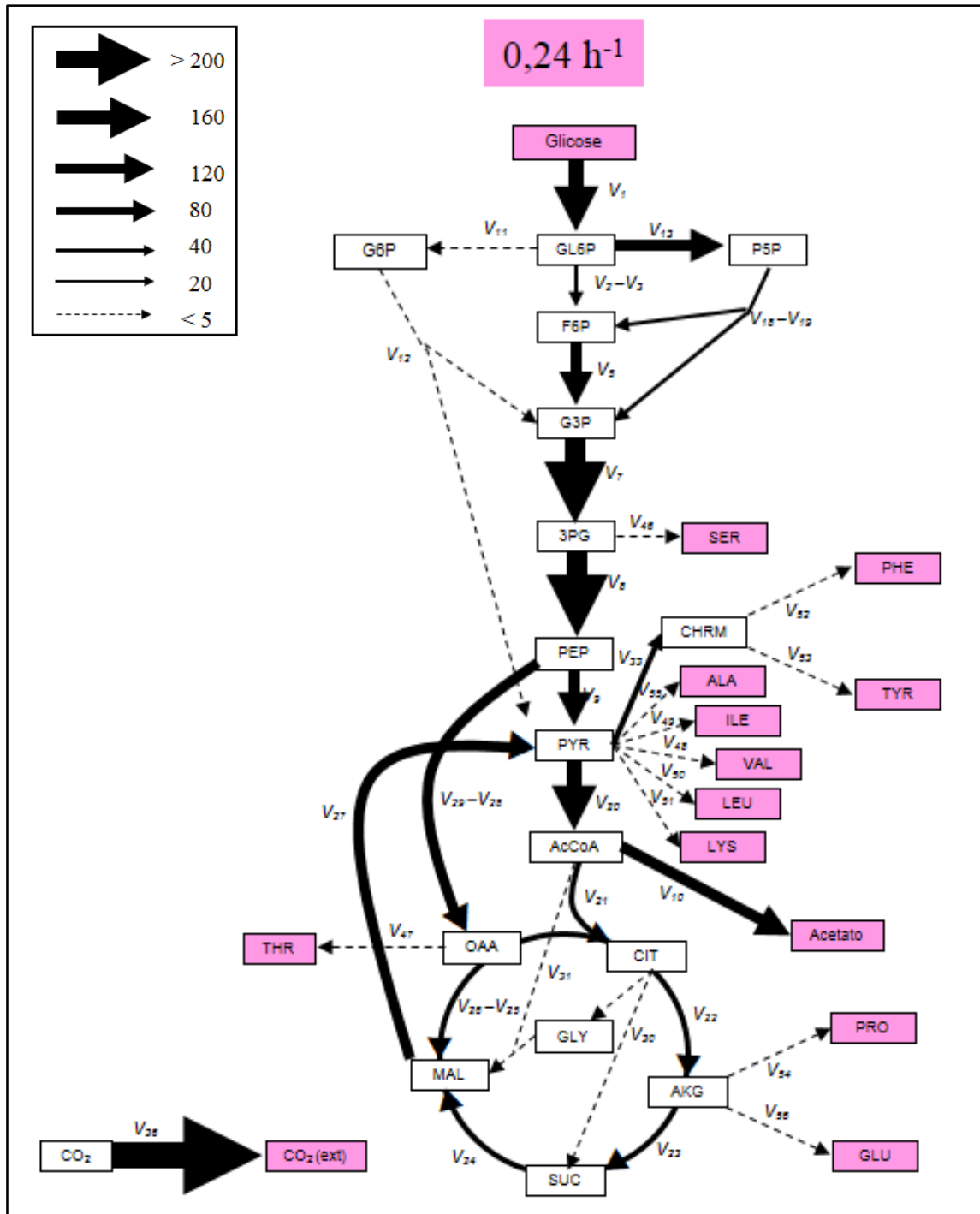
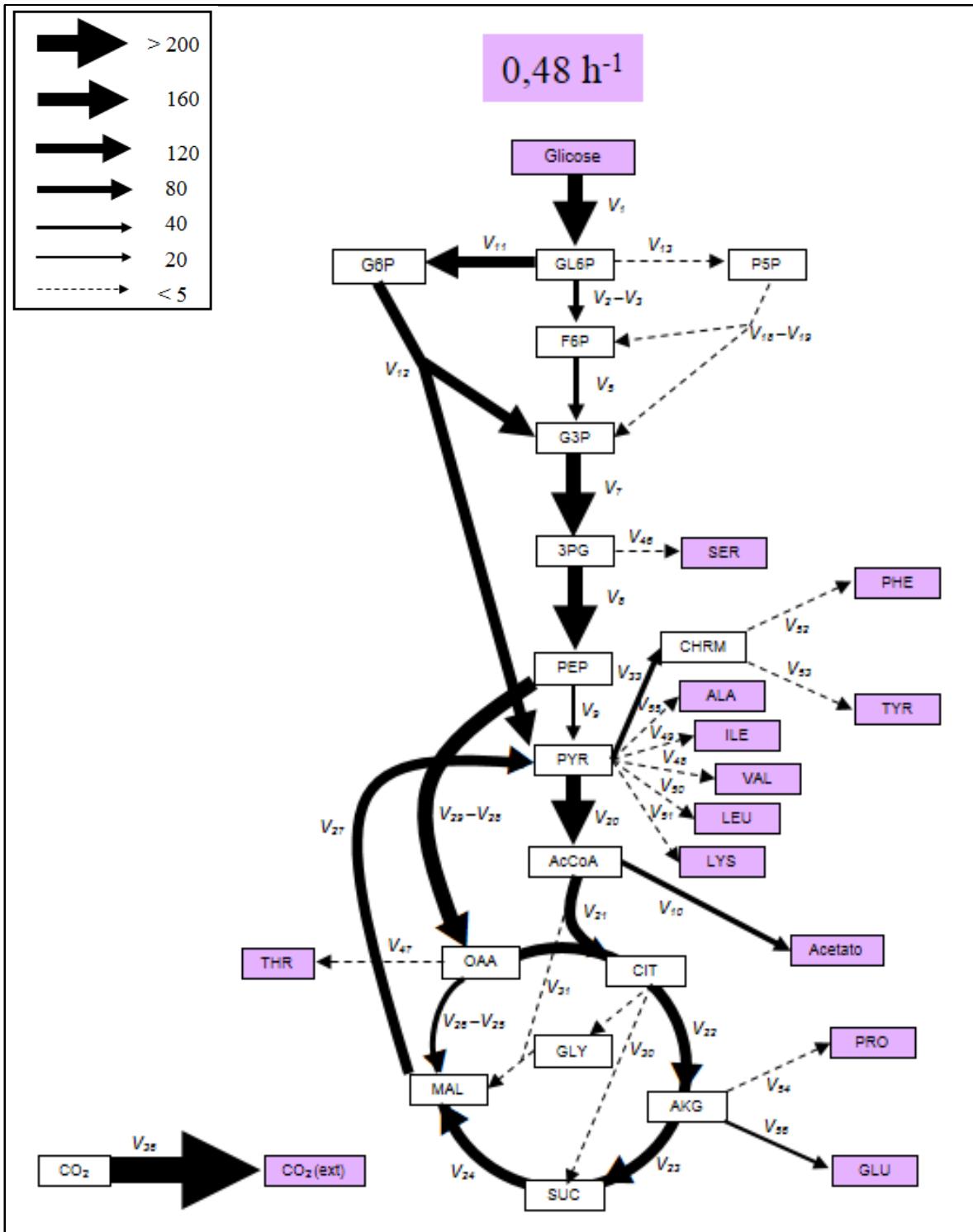


FIGURA 6.7 - Distribuição dos fluxos metabólicos internos de *S. typhimurium* na taxa de 0,48 h⁻¹ (Figura 6.5 – com melhor resolução)



6.5.5. Apêndice 5

Comparação dos MDVs obtidos nos cultivos contínuos com carbono marcado nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h⁻¹ e os valores simulados através da análise de sensibilidade de Monte Carlo associada a um intervalo de confiança de 95 %

TABELA 6.9 – Valores dos isotopômeros de massa obtidos experimentalmente e *in silico* para os fragmentos de aminoácidos utilizados na determinação dos fluxos intracelulares na taxa de diluição de 0,24 h⁻¹

Aminoácido		Dados exp.	Dados sim.	Desv. relativo (%)
Ala 162	<i>m</i> ₀	0,634	0,680	-7,275
	<i>m</i> ₁	0,135	0,117	13,460
	<i>m</i> ₂	0,071	0,076	-7,778
	<i>m</i> ₃	0,161	0,127	20,844
Ala 102	<i>m</i> ₀	0,711	0,737	-3,626
	<i>m</i> ₁	0,089	0,094	-4,935
	<i>m</i> ₂	0,200	0,170	15,106
Leu 144	<i>m</i> ₀	0,476	0,456	4,150
	<i>m</i> ₁	0,277	0,301	-8,571
	<i>m</i> ₂	0,180	0,170	5,823
	<i>m</i> ₃	0,045	0,064	-40,274
	<i>m</i> ₄	0,022	0,010	54,647
Ile 144	<i>m</i> ₀	0,581	0,472	18,662
	<i>m</i> ₁	0,175	0,278	-59,226
	<i>m</i> ₂	0,167	0,169	-1,446
	<i>m</i> ₃	0,054	0,070	-28,672
	<i>m</i> ₄	0,024	0,011	53,882
Ser 178	<i>m</i> ₀	0,659	0,698	-5,983
	<i>m</i> ₁	0,143	0,096	32,764
	<i>m</i> ₂	0,055	0,061	-11,330
	<i>m</i> ₃	0,143	0,144	-0,921
Phe 238	<i>m</i> ₀	0,372	0,329	11,374
	<i>m</i> ₁	0,140	0,163	-16,387
	<i>m</i> ₂	0,139	0,155	-11,206
	<i>m</i> ₃	0,135	0,152	-12,685
	<i>m</i> ₄	0,085	0,098	-16,075
	<i>m</i> ₅	0,040	0,050	-25,020
	<i>m</i> ₆	0,027	0,031	-17,355
	<i>m</i> ₇	0,016	0,014	11,989
	<i>m</i> ₈	0,035	0,004	87,582
<i>m</i> ₉	0,013	0,002	84,072	

Continuação da Tabela 6.9

Aminoácido		Dados exp.	Dados sim.	Desv. relativo (%)
Lys 277	m_0	0,430	0,404	5,895
	m_1	0,199	0,208	-4,587
	m_2	0,172	0,170	0,731
	m_3	0,126	0,134	-7,075
	m_4	0,050	0,051	-2,653
	m_5	0,013	0,026	-96,322
	m_6	0,013	0,007	46,475
Val 130	m_0	0,602	0,554	8,020
	m_1	0,094	0,126	-34,412
	m_2	0,247	0,258	-4,553
	m_3	0,025	0,032	-28,168
	m_4	0,032	0,029	8,157
Pro 188	m_0	0,499	0,424	14,936
	m_1	0,227	0,205	9,700
	m_2	0,179	0,237	-31,988
	m_3	0,074	0,088	-19,673
	m_4	0,016	0,036	-126,667
	m_5	0,006	0,010	-72,719
Pro 128	m_0	0,496	0,568	-14,402
	m_1	0,237	0,100	57,737
	m_2	0,210	0,272	-29,572
	m_3	0,041	0,028	32,568
	m_4	0,016	0,032	-106,498
Thr 192	m_0	0,573	0,529	7,625
	m_1	0,219	0,228	-4,045
	m_2	0,124	0,085	31,344
	m_3	0,065	0,120	-85,040
	m_4	0,020	0,038	-93,905
Thr 115	m_0	0,726	0,725	0,256
	m_1	0,172	0,121	29,693
	m_2	0,102	0,155	-51,950

Continuação da Tabela 6.9

Aminoácido		Dados exp.	Dados sim.	Desv. relativo (%)
Tyr 236	m_0	0,411	0,329	19,902
	m_1	0,157	0,163	-3,871
	m_2	0,138	0,155	-12,497
	m_3	0,146	0,152	-4,059
	m_4	0,065	0,098	-50,603
	m_5	0,028	0,050	-80,564
	m_6	0,029	0,031	-7,230
	m_7	0,019	0,014	26,668
	m_8	0,003	0,004	-73,310
	m_9	0,006	0,002	62,460
Glu 234	m_0	0,381	0,441	-15,563
	m_1	0,256	0,194	24,153
	m_2	0,244	0,239	2,063
	m_3	0,085	0,082	2,738
	m_4	0,025	0,035	-41,433
	m_5	0,010	0,009	6,358
Glu 114	m_0	0,543	0,597	-9,849
	m_1	0,316	0,201	36,501
	m_2	0,116	0,160	-38,095
	m_3	0,025	0,043	-71,901

TABELA 6.10 – Valores dos isotopômeros de massa obtidos experimentalmente e *in silico* para os fragmentos de aminoácidos utilizados para a determinação dos fluxos intracelulares na taxa de diluição de 0,48 h⁻¹

Aminoácido		Dados exp.	Dados sim.	Desv. relativo (%)
Ala 162	m_0	0,766	0,702	8,403
	m_1	0,082	0,098	-19,854
	m_2	0,036	0,050	-39,335
	m_3	0,115	0,150	-30,095
Ala 102	m_0	0,756	0,737	2,526
	m_1	0,081	0,093	-14,764
	m_2	0,163	0,170	-4,167
Leu 144	m_0	0,555	0,457	17,583
	m_1	0,177	0,300	-69,205
	m_2	0,197	0,170	13,486
	m_3	0,053	0,064	-20,189
	m_4	0,019	0,010	47,725
Ile 144	m_0	0,590	0,465	21,146
	m_1	0,158	0,288	-81,933
	m_2	0,176	0,169	4,032
	m_3	0,055	0,067	-20,578
	m_4	0,021	0,011	48,544
Ser 178	m_0	0,709	0,711	-0,268
	m_1	0,112	0,084	25,022
	m_2	0,054	0,048	11,418
	m_3	0,124	0,156	-25,503
Phe 238	m_0	0,408	0,364	10,697
	m_1	0,126	0,142	-12,520
	m_2	0,130	0,136	-4,375
	m_3	0,150	0,144	4,255
	m_4	0,081	0,107	-31,936
	m_5	0,035	0,049	-41,787
	m_6	0,023	0,033	-39,316
	m_7	0,013	0,019	-41,353
	m_8	0,026	0,005	81,846
	m_9	0,009	0,003	61,034

Continuação da Tabela 6.10

Aminoácido		Dados exp.	Dados sim.	Desv. relativo (%)
Lys 277	m_0	0,445	0,403	9,459
	m_1	0,237	0,194	18,109
	m_2	0,131	0,197	-50,842
	m_3	0,136	0,121	11,290
	m_4	0,024	0,055	-128,099
	m_5	0,024	0,023	6,224
	m_6	0,003	0,007	-108,750
Val 130	m_0	0,636	0,555	12,763
	m_1	0,080	0,124	-55,194
	m_2	0,243	0,259	-6,804
	m_3	0,013	0,032	-148,062
	m_4	0,029	0,030	-3,860
Pro 188	m_0	0,575	0,418	27,279
	m_1	0,163	0,214	-31,127
	m_2	0,174	0,234	-34,174
	m_3	0,066	0,089	-35,213
	m_4	0,017	0,035	-104,651
	m_5	0,005	0,009	-77,692
Pro 128	m_0	0,571	0,537	5,938
	m_1	0,177	0,158	10,835
	m_2	0,201	0,242	-20,159
	m_3	0,031	0,038	-21,865
	m_4	0,020	0,026	-31,795
Thr 192	m_0	0,614	0,528	13,978
	m_1	0,203	0,211	-4,095
	m_2	0,112	0,122	-8,638
	m_3	0,060	0,103	-72,241
	m_4	0,012	0,037	-218,103
Thr 115	m_0	0,734	0,734	-0,041
	m_1	0,168	0,102	39,213
	m_2	0,098	0,164	-66,667

Continuação da Tabela 6.10

Aminoácido		Dados exp.	Dados sim.	Desv. relativo (%)
Tyr 236	m_0	0,411	0,364	11,414
	m_1	0,133	0,142	-7,089
	m_2	0,139	0,136	2,158
	m_3	0,147	0,144	1,840
	m_4	0,087	0,107	-23,130
	m_5	0,037	0,049	-32,615
	m_6	0,025	0,033	-32,520
	m_7	0,013	0,019	-43,511
	m_8	0,005	0,005	-2,609
	m_9	0,006	0,003	44,426
Glu 234	m_0	0,342	0,434	-26,938
	m_1	0,250	0,204	18,367
	m_2	0,263	0,236	10,334
	m_3	0,105	0,083	20,821
	m_4	0,029	0,034	-16,897
	m_5	0,012	0,008	26,810
Glu 114	m_0	0,582	0,564	3,093
	m_1	0,238	0,257	-7,983
	m_2	0,163	0,145	10,988
	m_3	0,017	0,034	-97,661

7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

No presente trabalho foram utilizadas diferentes abordagens para mapear a produção de metabólitos, o consumo de diferentes fontes de carbono e as principais reações do metabolismo do carbono central da *Salmonella typhimurium* LT2.

O metabolismo da glicose por *S. typhimurium* foi detalhadamente estudado em cultivos batelada, batelada-alimentada e contínuos. Os fluxos de consumo de glicose e de produção de metabólitos e de CO₂ em quimiostatos conduzidos em diferentes taxas de diluição revelaram que, mesmo em condições de grande limitação do crescimento, como velocidade específica de crescimento de 0,1 h⁻¹ e fluxo de glicose de 1,7 mmol g_{DCW}⁻¹ h⁻¹, houve desvio do carbono fornecido para a produção de acetato. Esse resultado foi diferente do esperado, tendo em vista que a formação de acetato em quimiostatos de *E. coli*, com glicose como fonte de carbono, só ocorre a partir de taxas de diluição superiores a 0,4 h⁻¹. A formação de acetato em baixas velocidades específicas de crescimento torna muito mais difícil o estabelecimento de uma estratégia de cultivo em batelada alimentada para obtenção de alta concentração celular de *S. typhimurium* tendo glicose como fonte de carbono, conforme o presente trabalho mostra. Um melhor desempenho do cultivo em batelada alimentada talvez possa ser alcançado diminuindo a concentração inicial de glicose na batelada para 5 g L⁻¹, diminuindo a temperatura e controlando o fornecimento de meio suplementar de forma que a velocidade específica de crescimento seja mantida em 0,1 h⁻¹.

Além dos estudos com glicose, cultivos conduzidos com xilose e glicerol como fontes de carbono também foram realizados. Os resultados obtidos com os substratos alternativos mostraram que, mesmo em condições plenamente aeróbias, parte do carbono assimilado é direcionada para a formação de acetato, porém em menor proporção. Mesmo para um fluxo de consumo de glicerol de 18,5 mmol_{glicerol} g_{DCW}⁻¹ h⁻¹, o dobro do valor calculado para a assimilação de glicose, o fluxo de formação de acetato foi de apenas 0,9 mmol_{acetato} g_{DCW}⁻¹ h⁻¹, cerca de 10 vezes menor do que o obtido com glicose. Conseqüentemente, o rendimento em biomassa atingiu 0,57 g_{DCW} g_{glicerol}⁻¹, sendo 40 % superior ao observado quando glicose foi empregada como fonte de carbono. Assim, a utilização de glicerol como fonte de carbono, em substituição à glicose, mostrou-se uma estratégia promissora para cultivos em batelada alimentada e merece ser explorada em futuros trabalhos. Sugere-se ainda que o estudo do

metabolismo do glicerol por *S. typhimurium* seja aprofundado e detalhado utilizando cultivos em quimiostatos e a análise dos fluxos metabólicos com carbono marcado.

O ácido acético foi a quarta fonte de carbono estudada no presente trabalho. Constatou-se que a *Salmonella* possui via (s) metabólica (s) que permitem a assimilação do acetato, assim como a *Escherichia coli*, gênero bacteriano considerado o mais próximo à *Salmonella*. Entretanto, o fluxo de assimilação desta fonte de carbono e a velocidade de crescimento da *Salmonella* são muito inferiores aos valores relatados para diferentes estipes de *E. coli*. Apesar das vias de assimilação/formação de acetato estarem bem caracterizadas na literatura para *E. coli*, há controvérsia sobre o papel desempenhado pelos sistemas enzimáticos acetato-quinase/fosfotransacetilase (Ack-Pta) e acetil-CoA sintetase (Acs). Tendo em vista que a compreensão sobre o metabolismo do acetato é fundamental para estabelecer estratégias que diminuam sua formação, sugere-se que estudos específicos do metabolismo desse ácido orgânico sejam conduzidos na continuidade do trabalho. Seria importante conduzir experimentos em diferentes concentrações iniciais de acetato para acompanhamento das atividades das enzimas Ack-Pta e Acs. Além disso, a construção de mutantes com deleções de genes das vias de assimilação do acetato poderia elucidar o papel desempenhado por essas enzimas. Este trabalho também descreve uma estratégia de cultivo em batelada-alimentada com glicose, como fonte de carbono, que não foi eficiente para a produção de altas concentrações celulares de *Salmonella*, mesmo mantendo a concentração residual de glicose em níveis baixos. Através deste experimento verificou-se que a abordagem mais adequada para a identificação de condições de cultivo que favorecessem o crescimento celular seria a realização de cultivos contínuos.

Os fluxos de consumo de substrato e formação de produtos calculados a partir dos dados de cultivos em quimiostato com glicose foram ainda empregados para avaliar o modelo metabólico em escala genômica STM_v1.0, reconstruído para *Salmonella typhimurium* LT2, proposto por Thiele e colaboradores (2011). Verificou-se que os resultados simulados se ajustaram melhor aos dados gerados em cultivos de *E. coli*, uma vez que este modelo é derivado de um modelo metabólico em escala genômica de *E. coli* K-12. O fraco desempenho do modelo disponível na literatura, no contexto estudado, é reflexo das diferenças no metabolismo das bactérias *E. coli* e *S. typhimurium* reveladas no presente trabalho.

Para o desenvolvimento de um novo modelo capaz de descrever com mais precisão o metabolismo de *S. typhimurium*, informações adicionais sobre os fluxos metabólicos são necessárias. Assim, a metodologia de análise dos fluxos metabólicos com carbono marcado (^{13}C MFA) foi empregada para estimar os fluxos internos das principais reações envolvidas nas

vias do metabolismo do carbono central a partir dos dados obtidos em cultivos contínuos com glicose marcada com ^{13}C , conduzidos nas taxas de diluição de 0,24 e 0,48 h^{-1} . Os resultados preliminares obtidos sugerem grandes diferenças no metabolismo da *S. typhimurium* nestas duas taxas de diluição, particularmente em relação à via predominantemente utilizada pela *Salmonella* após a entrada da glicose na célula. Na taxa de diluição de 0,24 h^{-1} , o carbono foi direcionado para a via da pentose fosfato e glicólise, enquanto que na taxa de diluição de 0,48 h^{-1} , a glicose foi catabolisada, predominantemente, pela via Entner-Doudoroff.

Para concluir os estudos de análise dos fluxos metabólicos, sugere-se que cultivos contínuos de *S. typhimurium*, com glicose isotopicamente marcada, sejam realizados nas taxas de diluição de 0,1 e 0,7 h^{-1} , para que as mudanças nos fluxos das vias metabólicas observadas no presente trabalho possam ser confirmadas.

Futuramente, os resultados obtidos neste trabalho poderão ser utilizados para aprimorar os modelos metabólicos em escala genômica existentes para *Salmonella*. O melhor conhecimento sobre o metabolismo de *S. typhimurium* poderá auxiliar no desenvolvimento de medicamentos para prevenção de infecções causadas por *Salmonella*, assim como na exploração dessa bactéria como plataforma para produção de importantes produtos farmacêuticos.