



Produção e consumo de acetato em cultivos de *Salmonella typhimurium* em condições aeróbias

Cíntia R. Sargo¹, Adilson J. da Silva¹, Roberto C. Giordano¹, Eugénio C. Ferreira²,
Isabel Rocha², Teresa C. Zangirolami¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

² Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica

E-mail para contato: srcintia@yahoo.com.br

RESUMO

Linhagens atenuadas de Salmonella typhimurium têm sido amplamente estudadas para o desenvolvimento de diversas vacinas e no tratamento do câncer. No entanto, ainda há poucas informações a respeito de seu metabolismo. S. typhimurium e Escherichia coli apresentam grande similaridade em seus genomas e redes metabólicas. Com o intuito de avaliar o metabolismo da Salmonella sob condições aeróbias, realizou-se seis cultivos contínuos nas taxas de diluição de 0,1 a 0,67 h⁻¹ utilizando glicose como substrato. Estes resultados demonstraram um desvio de carbono para a formação de acetato, a partir da taxa de diluição de 0,1 h⁻¹, diferentemente do que é relatado para E. coli, onde o acúmulo de acetato é detectado somente em taxas de diluição acima de 0,4 h⁻¹. Investigou-se ainda a assimilação do acetato em cultivos em batelada, utilizando ácido acético como substrato principal. Os resultados obtidos confirmaram que a Salmonella possui um fluxo de assimilação de acetato menor do que a E. coli. Apesar de ambos os microrganismos apresentarem as mesmas reações no metabolismo central do carbono, este trabalho apresenta evidências experimentais que demonstram a menor capacidade de S. typhimurium em direcionar os fluxos de carbono para biomassa e produção de energia, caracterizada pela maior formação de acetato. A produção de acetato é considerada um desperdício de carbono, diminuindo a produtividade e os rendimentos, e comprometendo a obtenção de alta densidade celular essencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes de baixo custo. A análise dos fluxos metabólicos pode contribuir para minimizar a formação deste subproduto indesejado, tornando o metabolismo mais eficiente.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) é um importante agente patogênico, capaz de causar gastroenterites agudas em humanos e em diversas espécies de mamíferos. No entanto, linhagens atenuadas desta bactéria têm sido investigadas, a fim de desenvolver diferentes produtos biotecnológicos. Entre eles, destaca-se seu emprego como sistema de veiculação de antígenos para produção de vacinas contra uma grande diversidade de agentes infecciosos bacterianos, virais, parasitas, e contra o câncer, com resultados bastante promissores (Husseiny et al 2014). Sendo assim, *S. typhimurium* vem sendo considerado um microrganismo com grande importância na medicina e biotecnologia, e por isso há muitos estudos em termos de genética e imunologia. No entanto, ainda há poucas informações sobre o seu metabolismo.

Escherichia coli é o microrganismo mais estudado e melhor caracterizado em termos de genética, análises bioquímicas, de biologia molecular, sendo um dos primeiros organismos a ter o genoma sequenciado completamente. Estudos de genômica indicam que a *E. coli* K12 é a espécie bacteriana mais próxima à *Salmonella*, compartilhando cerca de 85% de seus genomas (AbuOun et al, 2009). As principais diferenças entre esses microrganismos estão associadas com fatores de virulência, uma vez que a *E. coli* K12 não é patogênica, diferentemente da *Salmonella*. Assim, muitas informações metabólicas de *S. typhimurium* são baseadas simplesmente em conhecimentos obtidos para *E. coli*, sem estudos mais aprofundados.

Um melhor conhecimento do metabolismo de *S. typhimurium* e do seu perfil de produção de metabólitos extracelulares é necessário para o desenvolvimento de protocolos de cultivos de alta densidade celular, importantes para aprimorar a produção de vacinas e biofármacos em grande escala.

O objetivo deste trabalho é estudar o metabolismo da linhagem selvagem de *S. typhimurium* LT-2, avaliando a produção de metabólitos extracelulares em diferentes condições de cultivo (com glicose ou ácido acético como fontes de carbono). Estes resultados foram comparados com os relatados na literatura para células de *E. coli*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo, Meio de Cultura e Condições de Cultivo

As células de *Salmonella typhimurium* LT-2 foram cultivadas em meio mínimo de composição (*per L*): 7,53 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g de KH_2PO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0,11 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,34 g de tiamina, 0,015 g de CaCl_2 e 2 mL da solução de traços de minerais e 2 mL da solução de vitaminas. A solução de traços de minerais é constituída por (*per L*): 0,42 g de riboflavina, 5,4 g de ácido pantotênico, 6,1 g de ácido nicotínico, 1,4 g de piridoxina, 0,06 g de biotina e 0,042 g de ácido fólico, e a solução de vitaminas por (*per L*): 27 g de FeCl_3 , 2 g de ZnCl_2 , 2 g de CoCl_2 , 2 g de NaMoO_4 , 1 g de CaCl_2 , 1 g de CuCl_2 , 0,5 g de H_3BO_3 e 20 mL/L de HCl. Nos cultivos contínuos utilizou-se 10 g L^{-1} de glicose como fonte de carbono. Já o cultivo em batelada foi realizado com $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de acetato.

Todos os cultivos foram conduzidos em biorreator de 2 L a 37 °C. O pH foi mantido em 7.0 através da adição automática de NH₄OH 5% (v/v) e H₂PO₄ 21% (v/v). A concentração de oxigênio dissolvido manteve-se sempre acima dos 20% da saturação. A aquisição on-line dos dados e o controle automático do pH foram realizados através do software SuperSys_HCDC^R (Horta et al., 2014).

Nos cultivos contínuos, o meio de cultura foi continuamente alimentado ao biorreator nas taxas de diluição (D) de: 0,10 (± 0,01), 0,15 (± 0,01), 0,24 (± 0,02), 0,48 (± 0,03), 0,58 (± 0,04), 0,67 (± 0,04) h⁻¹. O volume de trabalho e a velocidade de agitação foram mantidos constantes em 0,8 L e 800 rpm, respectivamente. Para cada diluição, a condição de estado estacionário foi assumida quando a densidade ótica, a concentração de O₂ dissolvido e a concentração de CO₂ nos gases de saída permaneceram constantes por pelo menos 3 tempos de residência.

O cultivo em batelada com ácido acético como fonte de carbono foi conduzido com um volume de operação de 1,6 L. A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada e mantida em 20% da saturação através de um controle automático que alterava a velocidade de agitação (entre 200 e 900 rpm) e a vazão de ar (entre 0,5 e 0,8 L min⁻¹).

2.2. Métodos Analíticos

O crescimento celular foi acompanhado pela medida da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) bem como por medidas de massa seca. A concentração celular foi estimada a partir das seguintes equações:

$$C_x (g_{DCW} L^{-1}) = (0,39 \pm 0,01) * DO_{600nm} \text{ (experimentos com glicose como fonte de carbono)} \quad (1)$$

$$C_x (g_{DCW} L^{-1}) = (0,36 \pm 0,01) * DO_{600nm} \text{ (experimento com ácido acético como fonte de carbono)} \quad (2)$$

As concentrações de glicose e ácidos orgânicos foram determinadas por HPLC (coluna Aminex HPX-87H - Bio-Rad - como fase estacionária e uma solução de H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, a 60°C). Os ácidos orgânicos foram medidos com detector de UV no comprimento de onda de 210 nm, enquanto a glicose e etanol foram analisados com detector de índice de refração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos em quimiostato com células de *S. typhimurium* LT-2 permitiram mapear a formação de metabólitos em diferentes taxas de diluição (D). As concentrações de biomassa, de glicose residual e acetato e a velocidade de produção de CO₂ (CER) obtidas nas diferentes D podem ser visualizadas na Figura 1. Nota-se que nas menores taxas de diluição (D entre 0,1 e 0,24 h⁻¹) houve o consumo de toda a glicose fornecida e também um aumento linear da produção de dióxido de carbono em função da diluição. Além disso, é possível observar um desvio de carbono para a formação de subprodutos, sendo que nesta fase, o único metabólito detectado foi o acetato. Em taxas de diluição acima de 0,48 h⁻¹, observou-se um menor consumo de glicose, fazendo com que a concentração de glicose residual aumentasse consideravelmente. Conseqüentemente, as concentrações de acetato e biomassa diminuíram devido ao efeito *washout*. Nesta mesma fase, também foi detectado formato em baixas

concentrações ($< 0,5 \text{ g L}^{-1}$). Essa produção de formato, em condições aeróbias, pode estar relacionada com a lise celular e liberação do DNA, formando uma barreira ao redor da célula que dificulta a difusão do oxigênio (Castan e Enfors 2001).

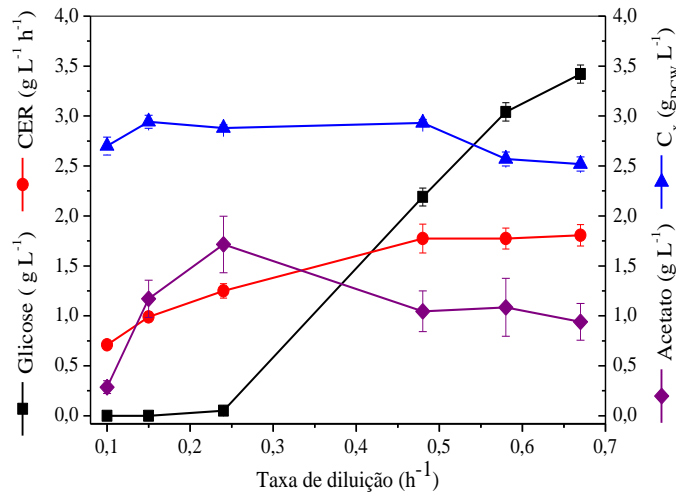


Figura 1. Concentração celular, de glicose residual e de acetato obtidos durante cultivos contínuos de células de *S. typhimurium* LT-2 realizados em diferentes taxas de diluição, em condições aeróbias.

Na Figura 2, pode-se observar a distribuição do carbono para biomassa, CO₂ e acetato, durante o crescimento celular no estado estacionário de *S. typhimurium* (obtidas neste trabalho) e de *E. coli* K12 (relatadas por Kayser et al. 2004). Para todas as taxas de diluição avaliadas, a recuperação de carbono foi sempre em torno de 100% (Figura 2A), demonstrando consistência nos dados experimentais coletados nos seis cultivos contínuos realizados com *S. typhimurium*. Observa-se, também, que cerca de 11 a 17% da fonte de carbono fornecida é desviada para a produção de ácidos orgânicos, com exceção da $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

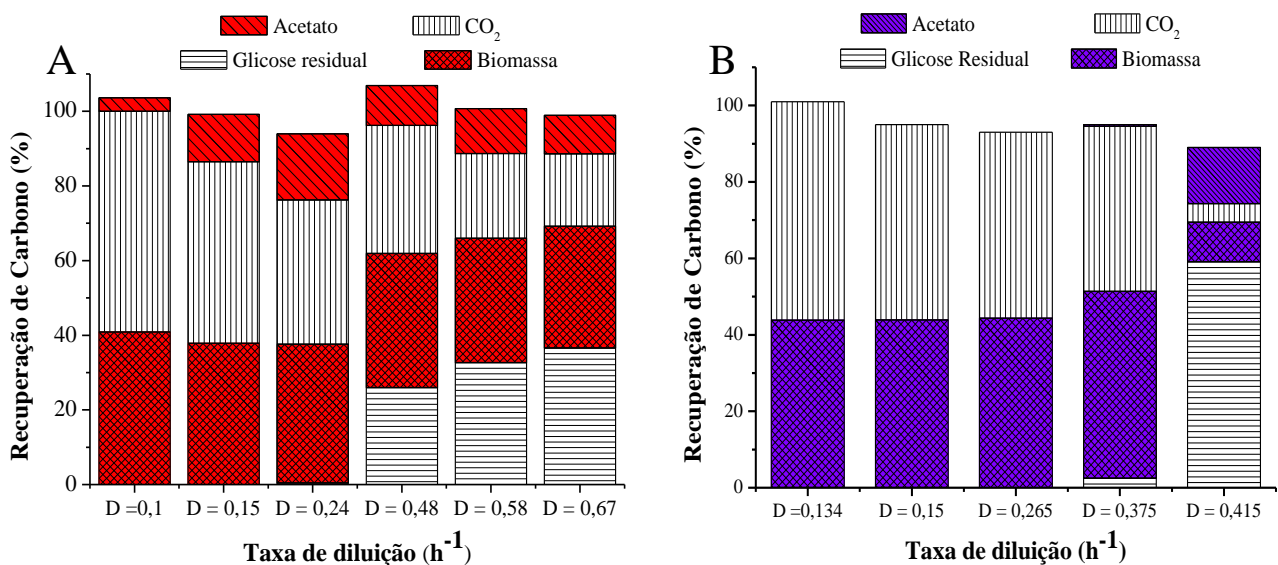


Figura 2. Distribuição de carbono obtido em quimiostatos realizados em diferentes taxas de diluição de A) *S. typhimurium* LT-2 e B) *E. coli* K-12 TG1 (dados obtidos por Kayser et al., 2004).

Comparando os resultados apresentados na Figura 2, observa-se claramente uma grande diferença no metabolismo das duas bactérias. A produção de acetato, por *Salmonella*, observada em baixas taxas de diluição e sem excesso de glicose é um resultado bastante interessante e diferente do que é relatado para *E. coli*. Sendo assim, um estudo a respeito da assimilação do ácido acético é necessário para se compreender as diferenças no comportamento destes microrganismos. As principais vias de produção e consumo de acetato podem ser visualizadas na Figura 3.

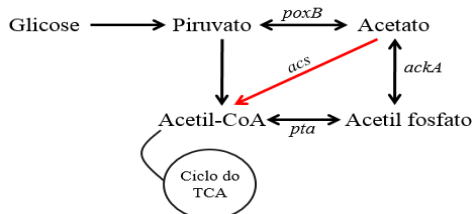


Figura 3. Via metabólica de produção/consumo de acetato por *E. coli*. *poxB*, piruvato oxidase; *ackA*, acetato quinase; *pta*, acetil fosfotransferase; *acs*, acetil coenzima-A sintetase (FONTE: Adaptado de Castaño-Cerezo et al. 2009)

A partir de dados obtidos em cultivo em batelada de *S. typhimurium* LT2 foi possível calcular a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e a velocidade de consumo do ácido acético e compará-los com os relatados para *E. coli*, nas mesmas condições.

Os resultados da Tabela 1 indicam que a *Salmonella* apresenta uma menor velocidade de crescimento, se comparado com diferentes estirpes de *E. coli*, quando utiliza-se ácido acético como única fonte de carbono. O crescimento celular foi similar para ambos os microrganismos. No entanto, a principal diferença entre elas é a velocidade de consumo de acetato, sendo 3 vezes menor para as células de *S. typhimurium*. Este menor desempenho exibido pela *Salmonella* provavelmente está relacionado com a ação da enzima acetil coenzima-A sintetase (*Acs*), que é considerada a principal enzima responsável pelo consumo de acetato (Figura 3). Em *S. typhimurium*, a *Acs* liga-se fracamente ao acetato ($K_m = 41$ mM), enquanto em *E. coli* K12, esta enzima liga-se com uma afinidade muito maior ($K_m = 0,2$ mM - 20 vezes menor).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos obtidos em cultivos em batelada utilizando meio mínimo e ácido acético como fonte de carbono de *S. typhimurium* LT-2 e diferentes estirpes de *E. coli*.

Parâmetros cinéticos	<i>S. typhimurium</i> LT-2	<i>E. coli</i> BW2511 ^a	<i>E. coli</i> B/r ^b
Rendimento em biomassa ($g_{DCW} g^{-1}$)	0,31 ± 0,09	0,26 ± 0,01	0,19 ± 0,05
Velocidade máxima de crescimento (h^{-1})	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,09
Velocidade de consumo de acetato ($mmol g^{-1} h^{-1}$)	7,5 ± 1,9	24,67 ± 1,59	ND

^aDados obtidos por Castaño-Cerezo et al. (2009)

^bDados obtidos por Andersen and Meyenburg (1980)

ND: não descrito

Com estes resultados foi possível constatar que a *Salmonella* é capaz de assimilar acetato, porém, com uma baixa velocidade. Por esta razão, durante os cultivos contínuos de *S. typhimurium*

observou-se um acúmulo elevado de acetato, mesmo em baixas taxas de diluição (Figura 2A), o que não acontece para cultivos de *E. coli* (Figura 2B), já que esta apresenta um sistema de consumo de acetato mais eficiente.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos cultivos contínuos de *S. typhimurium*, utilizando glicose como fonte de carbono, permitiram mapear a produção de metabólitos extracelulares em condições aeróbias. Mesmo em baixas taxas de diluição, observou-se um expressivo desvio do carbono fornecido para a produção de acetato, o que não é observado em cultivos de *E. coli*, nas mesmas condições.

Ambas as bactérias são capazes de assimilar acetato como fonte de carbono. No entanto, constatou-se que a velocidade de consumo de acetato por *Salmonella* é muito mais baixa do que a relatada para diferentes estirpes de *E. coli*. Com isso, essa excessiva produção e acúmulo de acetato pode ser um obstáculo ainda maior para o desenvolvimento de protocolos de cultivos de alta densidade celular de *S. typhimurium*.

5. REFERÊNCIAS

- AbuOun ,M., Suthers, P.F., Jones, G., Carter, BR., Saunders, M.P., Maranas, C.D., Woodward, M.J., Anjum, M.F. 2009. Genome Scale Reconstruction of a *Salmonella* Metabolic Model comparison of similarity and differences with a commensal *Escherichia coli* strain. J Biol Chem, 284(43), 29480-29488.
- Andersen, K.B., von Meyenburg, K. 1980. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration?. J Bacteriol 144(1), 114-123.
- Castan, A., Enfors, S.O. 2002 Formate accumulation due to DNA release in aerobic cultivations of *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng. 77(3), 324-328
- Castaño-Cerezo, S., Pastor, J.M., Renilla, S., Bernal, V., Iborra, J.L., Cánovas, M. 2009. An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact 8(1), 54 - 72.
- Horta, A.C.L., Silva, A.J., Sargo, C.R., Velez, A.M., Gonzaga, M.C., Gonçalves, V.M., Giordano, R.C., Zangirolami, T.C. 2014. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. Braz J Chem Eng 31(2), 457 - 468.
- Kayser, A., Weber, J., Hecht, V., Rinas, U. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. Microbiol 151(3), 693 -706.
- Husseiny, M.I., Rawson, J., Kaye, A., Nair, I., Todorov, I., Hensel, M., Kandeel, F., Ferreri, K. 2014. An oral vaccine for type 1 diabetes based on live attenuated *Salmonella*. Vaccine 32, 2300 –2307