

Preparo de amostra em metabolômica de leveduras para a determinação dos metabólitos produzidos na fermentação de xilose

Christiane G. Campos^{1,2}, Henrique C. T. Veras^{1,3}, José Antônio de A. Ribeiro¹, Patrícia P. K. G. Costa¹, Clenilson M. Rodrigues¹, João Ricardo M. Almeida^{1,3}, Patrícia V. Abdelnur^{1,2}

Introdução

O preparo de amostra em metabolômica é um dos fatores determinantes para a obtenção de dados representativos e reprodutíveis da via metabólica de microrganismos e consiste em duas etapas: *quenching* e extração. O *quenching* é a interrupção do metabolismo celular realizado através de variações bruscas de pH ou temperatura. Durante a etapa de extração, as paredes celulares são quimicamente, termicamente ou mecanicamente rompidas para a passagem dos metabólitos para a fase líquida (BERGDAHL et al., 2012). Diversos estudos encontrados na literatura não detalham o preparo de amostra, sendo necessário o desenvolvimento de um protocolo aplicável ao laboratório.

Este trabalho tem como objetivo otimizar e aplicar o preparo de amostra em metabolômica para identificação dos metabólitos intra e extracelulares produzidos por leveduras fermentadoras de xilose em diferentes condições de crescimento aeróbico. O estudo do metabolismo destes microrganismos pode facilitar a compreensão dos fatores limitantes para conversão de xilose a etanol e fornecer dados para a obtenção de linhagens melhoradas geneticamente. Dois métodos analíticos baseados em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem* (UPLC-MS/MS) foram utilizados para a identificação de metabólitos.

Métodos

Inicialmente foi realizada a fermentação das leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum* em quadruplicata nas condições aeróbica e microaeróbica. O experimento foi feito em um fermentador sob condições controladas para o crescimento celular a: 28 °C, agitação de 200 rpm, fluxo mínimo de ar em 0,05 L.min⁻¹, pH 5,5 e O₂ inicial com 100%, sendo consumido no decorrer do tempo de cultivo, até ficar em condição microaeróbica. Para a condição aeróbica foi mantido 100% de ar com fluxo de 0,5-0,8

1 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil

2 Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia/GO, Brasil

3 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil

*camposchristiane@gmail.com

L.min⁻¹. As amostras foram coletadas em três pontos específicos e em triplicata durante a fase exponencial de crescimento, entre 20 e 40 horas de fermentação para as duas condições testadas. Após a coleta da amostra seguiu-se as etapas de *quenching* e extração.

O método do *quenching* foi realizado a partir da adição de 2 mL de amostra em 8 mL de uma solução tampão de metanol 60% submerso em um banho termostático a -40°C. Em seguida esta mistura foi centrifugada a -9°C, e o *pellet* resultante congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até futura extração. A etapa de extração foi realizada utilizando o método do etanol fervente [CAMPOS et al., 2014; CARNICER et al., 2012]. Inicialmente as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e colocadas no banho termostático a -40°C, por 5 minutos. Uma solução tampão de etanol (75% de etanol, 10mM de acetato de amônio, pH 7,4) foi aquecida à aproximadamente 85°C. O etanol quente foi adicionado diretamente no *pellet* na proporção (1:1). As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex, transferidas para um tubo *ependorf* e incubadas por 3 minutos a 85°C, em um termoagitador para tubo *ependorf* com agitação vigorosa constante. As células foram resfriadas a -40°C no banho termostático e centrifugadas em uma microcentrifuga refrigerada, a 5000 rpm e -9°C por 3 minutos. Os restos celulares foram descartados e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo *ependorf* de 2 mL. As amostras foram então levadas à secura em um concentrador a vácuo e armazenadas a -80°C. Para a análise dos metabólitos, as amostras foram reconstituídas em 200 µL de água ultra pura e submetidos ao ultrassom por 5 minutos, a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante resultante transferido para o *vial*. Em seguida as amostras foram analisadas por UHPLC-MS/MS segundo método descrito por Campos et al. (PARK et al., 2012).

Resultados e Conclusões

A otimização do preparo de amostra foi essencial para a determinação de fatores como: i) número de replicatas e pontos de coleta, ii) volume de amostra e iii) escolha dos materiais e equipamentos a serem utilizados. Entre os diferentes tempos de coleta durante a fase exponencial de crescimento é esperado similaridade do metabolismo, tendo em vista que nesta etapa as células se adaptaram ao meio e passaram a se dividir igualmente. No entanto, o mínimo de três determinações (triplicata) é recomendado para obter-se resultados estatísticos representativos, por este motivo foi estabelecido a coleta em triplicata de três diferentes pontos durante a fase de crescimento exponencial da levedura. A retirada de mais replicatas poderia influenciar diretamente no processo fermentativo, alterando suas condições controladas de oxigênio. O volume escolhido para a otimização do preparo de amostra foi 2 mL, pois este foi o volume máximo que se adequou ao preparo de amostra com as menores perdas durante o processo. Além disso, este volume de amostra permitiu a utilização dos equipamentos utilizados na incubação e na centrifugação durante a etapa de

extração. Através dos métodos analíticos baseados em UHPLC-MS/MS, as amostras foram analisadas qualitativamente e alguns metabólitos puderam ser identificados: xilose, xilitol, xilulose, fosfo(enol)piruvato, glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ácido málico e glicerol. Pode-se concluir que o protocolo de preparo de amostra desenvolvido mostrou-se eficiente e será fundamental para o estudo e comparação do metabolismo da fermentação da xilose por leveduras, os quais poderão ter diferentes aplicações em biotecnologia.

Apoio Financeiro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

BERGDAHL, B.; HEER, D.; SAUER, U.; HAHN-HÄGERDAL, B.; VAN NIEL, E. W. Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 34, 2012.

CAMPOS, C. G.; RIBEIRO, J. A. de A.; COSTA, P. P. K. G.; RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. V. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de metabólitos em leveduras por UPLC-MS/MS. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS, 2014, Campos do Jordão, SP. **Livro de resumos**. [S.l.]: AB Sciex, 2014. p. 293.

CARNICER, M.; CANELAS, A. B.; TEN PIERICK, A.; ZENG, Z.; VAN DAM, J.; ALBIOL, J.; FERRER, P.; HEIJNEN, J. J.; VAN GULIK, W. Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*. **Metabolomics**, New York, v. 8, n. 2, p. 284-298, 2012.

PARK, C.; YUN, S.; LEE, S. Y.; PARK, K.; LEE, J. Metabolic profiling of *Klebsiella oxytoca*: evaluation of methods for extraction of intracellular metabolites using UPLC/Q-TOF-MS. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Totowa, v. 167, n. 3, p. 425-438, 2012.